

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(ヨウ化メチル)の試験法開発事業報告書

ヨウ化メチル試験法の検討結果

[緒言]

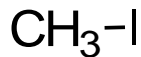
1. 目的及び試験法の検討方針

ヨウ化メチルについて、「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

ヨウ化メチル



化学式：CH₃I

分子量：141.95

化学名 (IUPAC) : iodomethane

外 観：無色透明液体

融 点：-66℃

沸 点：42℃

蒸気圧：0.0133 mPa (11.7℃)、0.0756 mPa (34.4℃)

溶解性：水 14.2 g/L (25℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=1.51 (25℃)

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0)

2) 基準値

トマト 0.05 ppm、

メロン類果実 0.05 ppm

くり 0.5 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

試料は都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

①玄米は低温状態のものを速やかに採取。

②大豆は低温状態のものを速やかに採取。

③ばれいしょは低温状態で泥を水で軽く洗い落とし、約5 mm角以下に細切した。

④ほうれんそうは低温状態でひげ根及び変質葉を除き、約5 mm角以下に細切した。

⑤キャベツは低温状態で外側変質葉及びしんを除き、約5 mm角以下に細切した。

⑥りんごは低温状態で花おち、しん及び果梗の基部を除き、約5 mm角以下に細切した。

⑦オレンジは低温状態で約5 mm角以下に細切した。

⑧茶は低温状態のものを速やかに採取。

⑨トマトは低温状態でへたを除き、約5 mm角以下に細切した。

⑩くりは低温状態で外果皮を除き、約5 mm角以下に細切した。

2. 試薬・試液

n-ヘキサン（残留農薬試験用）

消泡用シリコン（信越化学工業株式会社製）

ヨウ化メチル標準品（純度99.5 %以上、関東化学株式会社製）

3. 装置

	型式	会社
GC 装置	6890	Agilent Technologies

4. 測定条件

GC 条件	
検出器	ECD
カラム	DB-624 : 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.8 μm DB-WAX : 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.5 μm
カラム温度(°C)	50°C (15 分)
注入口温度(°C)	250°C
検出器温度(°C)	250°C
キャリアーガス	ヘリウム (DB-624 : 1.0 mL/min, DB-WAX : 1.5 mL/min)
メイクアップガス	窒素 (DB-624 : 29.0 mL/min, DB-WAX : 28.5 mL/min)
注入量(μL)	2
保持時間の目安	ヨウ化メチル : 4分 (DB-624) 、3分 (DB-WAX)

5. 定量

ヨウ化メチル標準品1000 mgをヘキサンに溶解し、20.0 g/Lの標準溶液を調製した。このヨウ化メチル標準溶液を*n*-ヘキサンで希釈し、0.01、0.02、0.05、0.1及び0.2 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液2 μLをGC-ECDに注入し、得られたピーク面積又はピーク高から検量線を作成した。試験溶液2 μLをGC-ECDに注入し、得られたピーク面積又はピーク高と作成した検量線からヨウ化メチルの含量を算出した。

1) 検量線の直線性

4. の測定条件において、濃度0.01 mg/L (0.02 ng) ~0.2 mg/L (0.4 ng) の範囲で良好な直線性を示した。検量線の一例を図1-1及び1-2に示した。

2) 標準溶液の検出感度

定量限界相当の検出量 : 0.04 ng (0.02 mg/L×2 μL) のピークのS/N比は10以上であった。標準溶液クロマトグラムの一例を図2-1及び2-2に示した。

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

密閉状態の蒸留法（写真1）によりヨウ化メチルを試料からヘキサン層に捕集した後、GC-ECDで定量及び確認した。

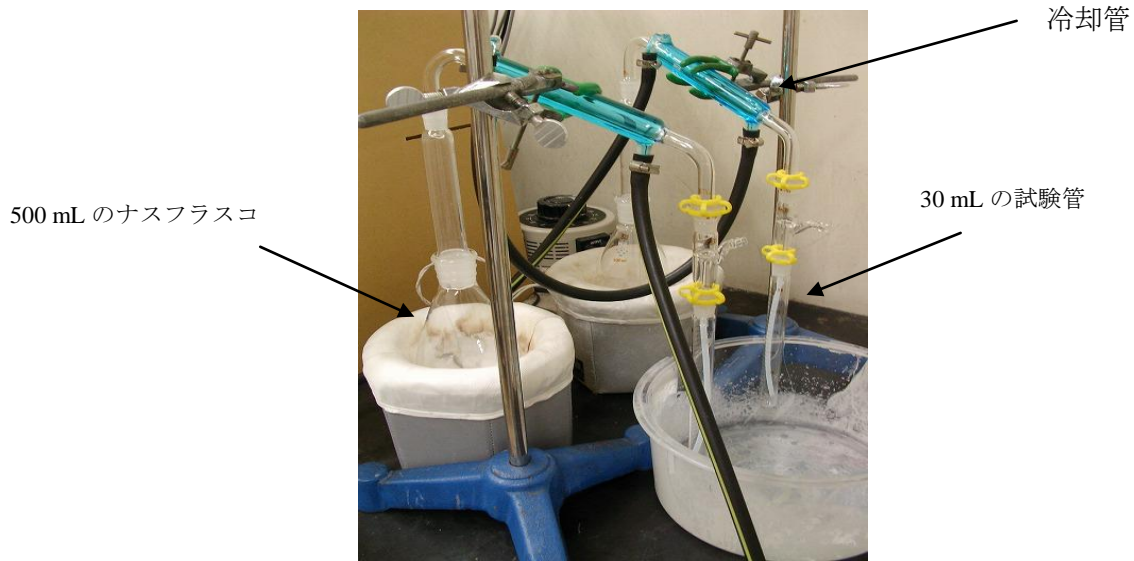


写真1 蒸留装置

① 穀類、豆類、種実類、果実及び野菜の場合

検体を冷凍した後、包丁等で約5 mm角以下に細切した試料40.0 gを500 mLナス型フラスコにはかり取り、水200 mL及び*n*-ヘキサン5 mLを加える。

これに消泡用シリコンを数滴加えた後、蒸留装置に取り付ける。試料を入れたナス型フラスコ及びヨウ化メチルを捕集する試験管を低温循環装置を用いて2°C以下に冷却した冷却管でつなぎ、装置を組み立てる。受器の試験管には*n*-ヘキサン4 mLを入れ、氷で冷却しておく。ナス型フラスコをマントルヒーターを用いて約20分間加熱し、受器の試験管に*n*-ヘキサン及び約1 mLの水を捕集する。捕集した*n*-ヘキサン層を*n*-ヘキサンの洗い込みながら20 mLメスフラスコへ移し、*n*-ヘキサンを加えて正確に20 mLとしたものを試験溶液とする。

② 茶及び抹茶の場合

抹茶以外の茶の場合は、検体を冷凍した後、包丁等で細切した試料20.0 gをナス型フラスコにはかり取り、水200 mL及び*n*-ヘキサン5 mLを加える。

抹茶の場合は検体20.0 gをナス型フラスコにはかり取り、水200 mL及び*n*-ヘキサン5 mLを加える。

これに消泡用シリコンを数滴加えた後、蒸留装置に取り付ける。試料を入れたナス型フラスコ及びヨウ化メチルを捕集する試験管を低温循環装置を用いて2°C以下に冷却した冷却管でつなぎ、装置を組み立てる。受器の試験管には*n*-ヘキサン4 mLを入れ、氷で冷却しておく。ナス型フラスコをマントルヒーターを用いて約20分間加熱し、受器の試験管に*n*-ヘキサン及び約1 mLの水を捕集する。捕集した*n*-ヘキサン層を*n*-ヘキサンの洗い込みながら10 mLメスフラスコへ移し、*n*-ヘキサンを加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

③ 分析法フローシート

秤 取

↓ 穀類、豆類、種実類、果実及び野菜：試料40.0 g

↓ 茶：試料20.0 g

蒸 留

- | 試料を入れたナスフラスコに水200 mL、*n*-ヘキサン5 mL、消泡用シリコン数滴を加える
- | 受器の試験管に*n*-ヘキサン4 mLを入れ、氷で冷却する
- | 蒸留装置に取り付け後、マントルヒーターを用いて約20分間加熱し、フラスコ内液体が沸騰後、
- | 受器の試験管に水が落ち始めたところを終点とする
- | (受器の試験管に*n*-ヘキサン層と水を約1 mL捕集)
- | 試験管中の*n*-ヘキサン層を*n*-ヘキサンで洗い込みながら20 mL (茶の場合は10 mL)
- | メスフラスコを用いて定容

GC-ECD定量

2 μL注入

2) 定量限界

0.01 mg/kg

茶以外の農産物： [(20 mL/40 g) × (0.04 ng/2 μL)]

茶： [(10 mL/20 g) × (0.04 ng/2 μL)]

7. マトリックス添加標準溶液の調製

ヨウ化メチルは揮発性が高く、試験溶液の濃縮操作が出来ないため、ブランク試験溶液を1 mL分取した後、添加回収試験の添加濃度相当となるよう、マイクロシリンジを用いて一定量の標準溶液を加え、マトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) 分析カラムの検討

分析カラムについては比較的汎用性の高い微極性カラム (DB-5) や無極性カラム (DB-1) など試したが、ピーク確認が困難であったり、ブロードピークとなったり、定量は困難であった。また、これらのカラムにおいては、内径を変更 ($\phi 0.25 \mu\text{m}$ から $\phi 0.32 \mu\text{m}$) しても改善されなかった。そこで、揮発性化合物の分析に用いられるDB-624及び極性の高いDB-WAXを試したところ、保持時間は比較的早いものの、ピーク形状、感度、再現性など良好だったことから、分析カラムについてはDB-624及びDB-WAXを用いることとした。なお、これら2種のカラムにおいても $\phi 0.25 \mu\text{m}$ のカラムではピーク形状が不良であったため、 $\phi 0.32 \mu\text{m}$ を用いることにした。なお、 $\phi 0.32 \mu\text{m}$ の分析カラムを選択したが、使用内径に通常適した流量では保持時間が1分程度になってしまうことから、キャリアーガス流量はDB-624で1.0 mL/min、DB-WAXで1.5 mL/minと少なめの設定とした。

2) 温度条件の検討

GC オープン温度、注入口温度において検討を行った。

ヨウ化メチルの保持時間が DB-624 カラムで約 4 分、DB-WAX で約 3 分と早いことから、昇温プログラムは使用せず、初期温度を一定に保つプログラムでの測定とした。これによる次サンプル注入における前サンプルの夾雑成分等の影響は見られなかった。また、注入口温度は 100°C~250°Cの間で数点試したが、温度が低いとピーク幅が広く、高温ほどシャープに検出できたため、250°Cでの設定とした。

3) MS の検討

GC-MSでの測定も試みたが、GC測定同様、溶出時間が非常に早く、フィラメント保護として通常設ける溶媒待ち時間 (4分~5分) 中にピーク検出となる等の不都合が生じ、ピーク形状、感度共に不良であったため、GC-MSでの測定は困難であると判断した。GC-MS測定条件は下記に示した。

GC-MS 測定条件

分析カラム	DB-624 : 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.4 μ m
カラム温度(°C)	50°C (15 分)
注入口温度(°C)	250°C
インターフェイス温度	280°C
注入方法	スプリットレス
キャリアガス	ヘリウム 1.0 mL/min
注入量(μ L)	2
イオン化モード (電圧)	EI (70 eV)
主なイオン(m/z)	142,127
保持時間	約1.5分

2. 試験溶液調製法の検討

1) 試験工程

低沸点物質であり、揮発性が高いため、減圧濃縮や精製工程を避ける必要があり、蒸留による分析方法を選択した。ディーン・スターク蒸留装置も試みたが、検討段階で回収率が約 5 割程度とロスが大きかったため、密閉系での蒸留を行う試験方法を採用した。

2) 実残留サンプル (くり) での蒸留時間検討

① 実残留サンプルの調製

くり約 800 g、ヨウ化メチル 5 g を 45 cm \times 30 cm \times 55 cm の容器中で 4 時間くん蒸処理し、その後 30 分間ガス抜き (解放) を行った。

② 試験用サンプルの調製

くん蒸処理済みのくりの外皮をむき、渋皮付の状態のくりを包丁で約 5 mm 角に細切り、試験用サンプルとした。

③ 試験方法

試験用サンプルを用いて蒸留操作を開始し、次の i) ~ iii) の条件で検出濃度の比較を行った。

- i) 約 17 分間加熱し、受器の試験管には *n*-ヘキサンのみ捕集
- ii) 約 20 分間加熱し、受器の試験管には *n*-ヘキサン及び約 1 mL の水を捕集
- iii) 約 23 分間加熱し、受器の試験管には *n*-ヘキサン及び約 5 mL の水を捕集

④ 結果

結果を Table1 に示した。

Table1 実残留サンプル (くり) からのヨウ化メチル検出濃度

	検出濃度 (ppm)		
	試行 1	試行 2	平均
i)	0.259	0.296	0.277
ii)	0.280	0.276	0.278
iii)	0.298	0.269	0.283

上記結果、ヨウ化メチルはどの条件においてもほぼ同程度の検出濃度であり、くりの作物残留試験で用いた抽出条件 (今回の試験法開発でも採用の条件) でヨウ化メチルが十分に抽出できるものと判断された。分析時間やその後のメスフラスコへの定容等の作業性も考慮し、蒸留については約 20 分間加熱し、受器の試験管には *n*-ヘキサン及び約 1 mL の水を捕集する方法とした。

3. 添加回収試験

農産物は、玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ及び茶の8品目にトマト及びくりを加えた10品目を試料とした。

試料に、ヨウ化メチルを0.01 ppm（トマトは0.05 ppm、くりは0.5 ppm）相当添加し、[実験方法] 6.1) の分析法に従って添加回収試験を行った。

当初、水と混和する溶媒での添加を検討した。試料にはりんごを使用し、アセトン、アセトン及び水の混液（1:1）及びメタノールの3種類の溶媒で調製した標準溶液を0.05 ppm相当添加し、回収試験を行った。それぞれの回収率は約40～70%と低く、また、アセトン溶液においては、最終試験溶液にアセトンが残るため、添加時のアセトンの量によってはクロマト上において目的成分（ヨウ化メチル）直前に妨害となって溶媒ピークの出現が確認された。また、上記3種の溶媒で調製した標準溶液に加え、*n*-ヘキサン溶液で調製した標準溶液での添加において、添加後に試料との攪拌を行ったり、添加後に30分程度の放置を行うと回収率は10%程度になることも確認された。そのため、添加用の標準溶液には*n*-ヘキサン溶液を用いた。また、ヨウ化メチルの非常に高い揮発性、試料中成分と反応してしまう懸念もある反応性の高さ等を考慮し、添加後の試料との混合及び30分間放置は実施しなかった。以上のことから、添加は500 mLナス型フラスコにはかり取った試料に*n*-ヘキサン溶液で調製した標準溶液1 mL（茶は0.5 mL）を添加し、直ちに水200 mL、*n*-ヘキサン4 mL（茶は4.5 mL）を順次加える方法とした。

すべての農産物において、ヨウ化メチルの真度は分析カラムDB-624において74～84%、分析カラムDB-WAXにおいて72～81%と良好な結果が得られた。また、併行精度も目標値である<15%を十分満たす良好な結果であった。

結果をTable2及び3に示した。

Table2 ヨウ化メチル添加回収試験結果（分析カラムDB-624）

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.01	78	77	72	77	73	75	3.6
大豆	0.01	74	72	73	78	75	74	3.1
ばれいしょ	0.01	76	86	91	86	82	84	6.6
ほうれんそう	0.01	82	83	80	81	84	82	1.9
キャベツ	0.01	80	77	72	78	80	77	4.2
りんご	0.01	79	80	78	76	78	78	1.9
オレンジ	0.01	77	77	77	76	74	76	1.7
茶	0.01	68	74	76	89	84	78	10.6
トマト	0.05	74	72	76	70	78	74	4.3
くり	0.5	76	74	75	73	74	74	1.5

Table3 ヨウ化メチル添加回収試験結果（DB-WAX）

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.01	77	76	72	71	76	74	3.6
大豆	0.01	72	72	70	74	73	72	2.1
ばれいしょ	0.01	76	84	84	81	80	81	4.1
ほうれんそう	0.01	76	77	73	75	76	75	2.0
キャベツ	0.01	74	71	69	78	80	74	6.2
りんご	0.01	76	77	74	78	80	77	2.9
オレンジ	0.01	77	76	77	78	75	77	1.5
茶	0.01	71	70	74	90	85	78	11.5
トマト	0.05	73	78	76	73	78	76	3.3
くり	0.5	78	80	77	75	77	77	2.3

4. 試料マトリックスの測定への影響

試料由来の夾雑物質によるマトリックス効果等の影響を把握するために、[実験方法]7. に従ってマトリックス添加標準溶液を調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響を確認した。

結果をTable4に示した。すべての農産物においてマトリックスの影響はないことが確認された。

Table4 試料マトリックスの測定への影響

試料	測定条件	
	DB-624	DB-WAX
玄米	99	98
大豆	103	101
ばれいしょ	96	97
ほうれんそう	97	99
キャベツ	102	104
りんご	101	99
オレンジ	100	102
茶	107	106
トマト	93	100
くり	88	96

数値 (%)：(マトリックス標準溶液/標準溶液) × 100

5. 選択性

農産物10品目のブランク試料を[実験方法]6. 1)の分析法に従って試験し、定量を妨害するピークの確認を行った。分析カラムDB-624においては、何れの試料においても妨害ピークは検出されなかった。また、分析カラムDB-WAXにおいては、玄米、ばれいしょ、ほうれんそう及び茶で近傍に妨害が見られたが、定量限界濃度に対して十分許容できる範囲でのピークであった。ヨウ化メチルのGC-ECD定量及び確認のクロマトグラムを図3に示した。

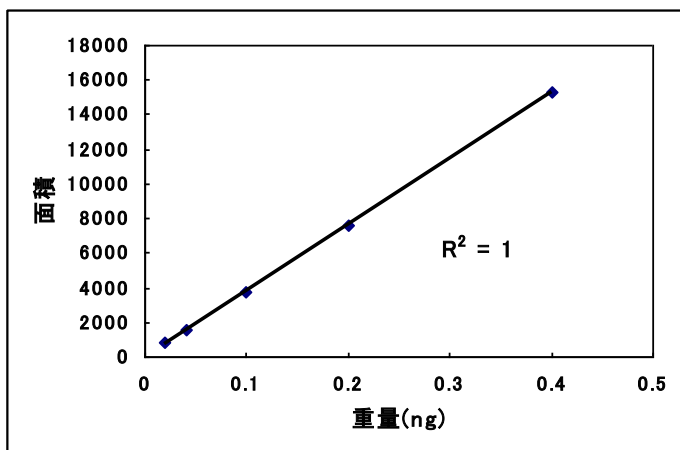
[結論]

ヨウ化メチルを試料から密閉状態の蒸留操作により n -ヘキサン層に捕集、定容後GC-ECDで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、トマト及びくりに適用した場合、ヨウ化メチルの真度は分析カラムDB-624において74~84%、分析カラムDB-WAXにおいて72~81%であり、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

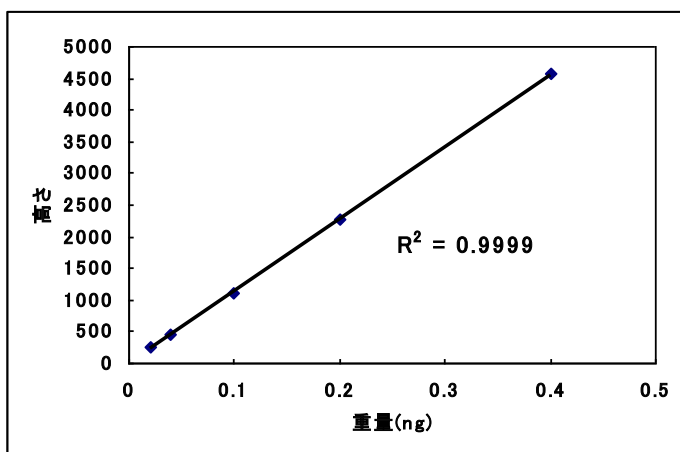
[参考文献]

ヨウ化メチル農薬抄録



データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : Agilent Technologies
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.02 ng~0.4 ng
 検量線傾き (a) : a=38229.10511
 検量線切片 (b) : b=3.775824859

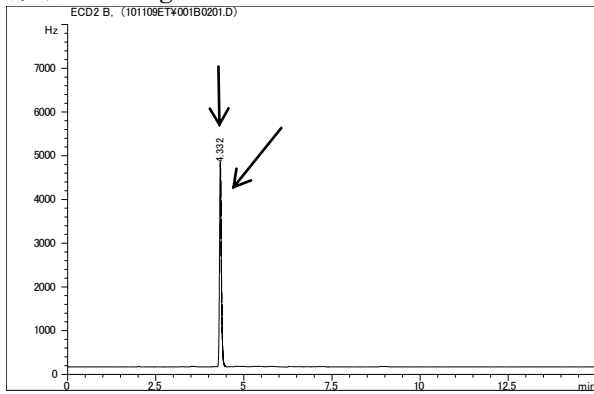
図 1-1 ヨウ化メチル検量線 (一例) (測定分析カラム DB-624)



データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : Agilent Technologies
 ピークの定量方法 : ピーク高法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.02 ng~0.4 ng
 検量線傾き (a) : a=11409.90216
 検量線切片 (b) : b=-5.286659884

図 1-2 ヨウ化メチル検量線 (一例) (測定分析カラム DB-WAX)

標準品0.4 ng



標準品0.04 ng (定量限界相当)

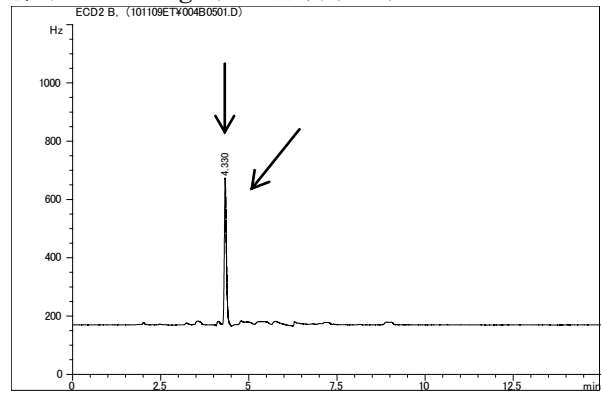
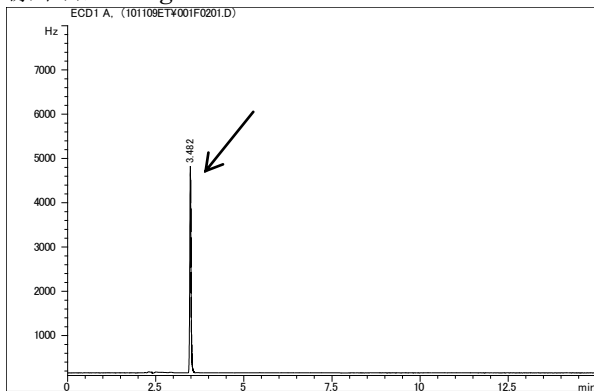


図 2-1 ヨウ化メチル標準溶液のクロマトグラム (一例) (測定分析カラム DB-624)

標準品0.4 ng



標準品0.04 ng (定量限界相当)

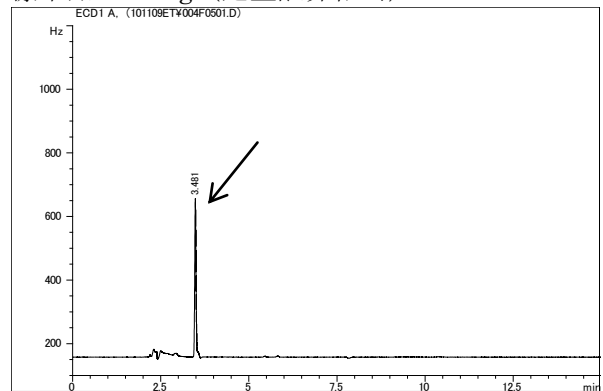
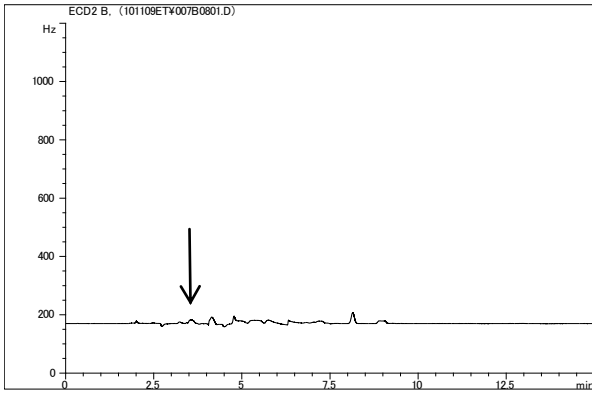
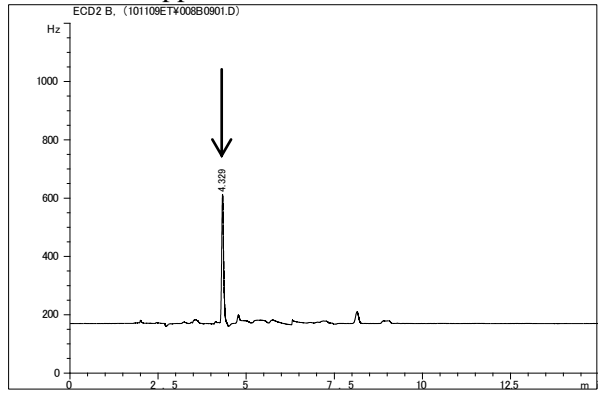


図 2-2 ヨウ化メチル標準溶液のクロマトグラム (一例) (測定分析カラム DB-WAX)

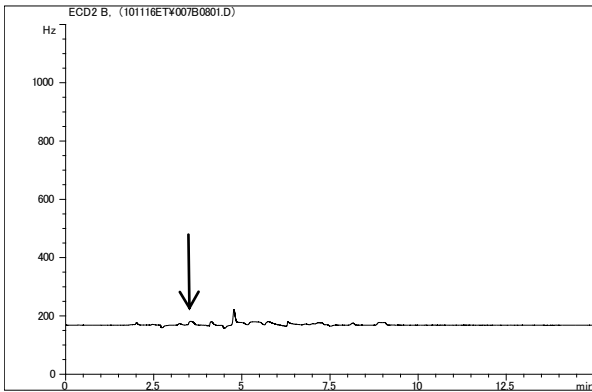
玄米 無添加



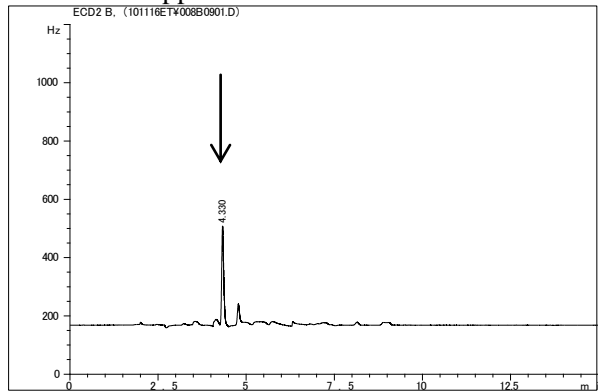
玄米 0.01 ppm 添加



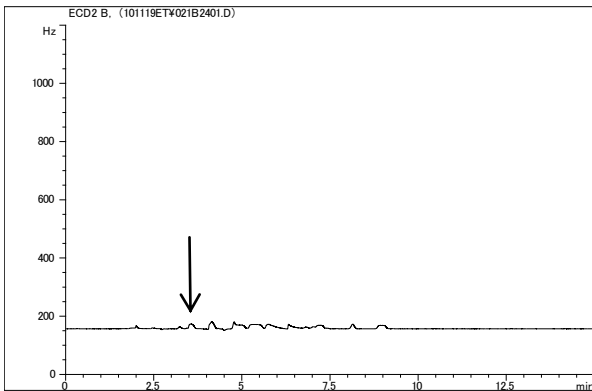
大豆 無添加



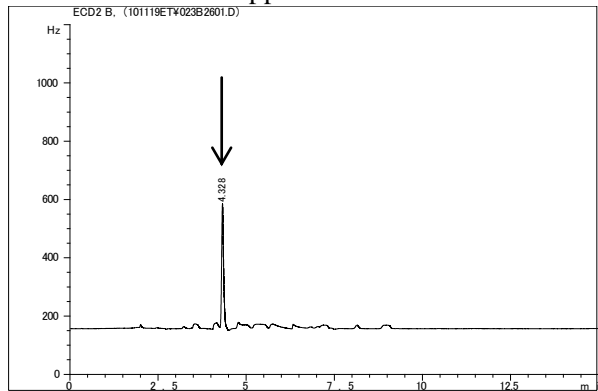
大豆 0.01 ppm 添加



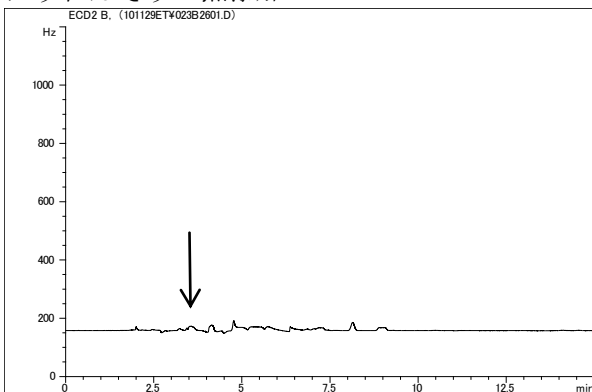
ばれいしょ 無添加



ばれいしょ 0.01 ppm 添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm 添加

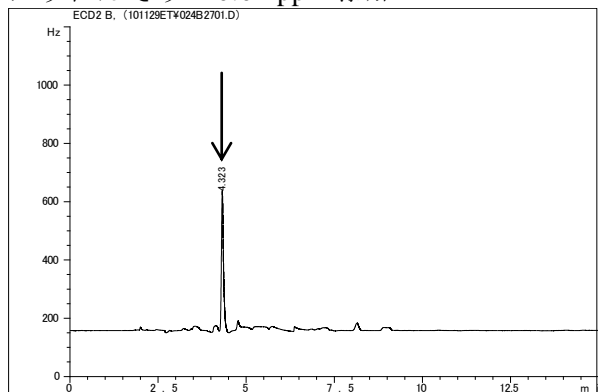
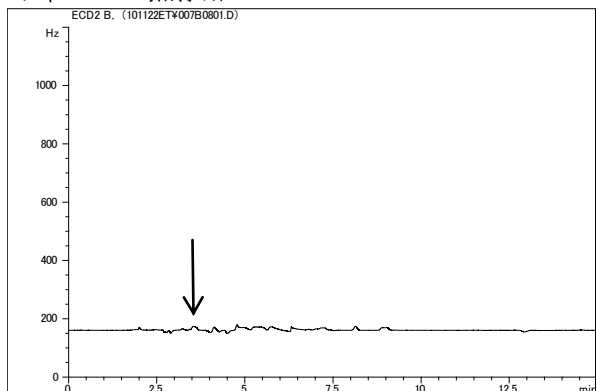
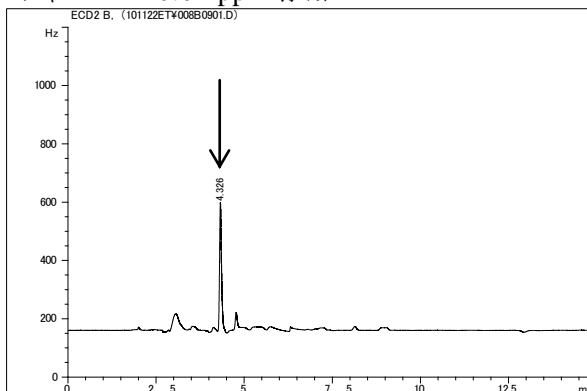


図 3-1-1 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-624)

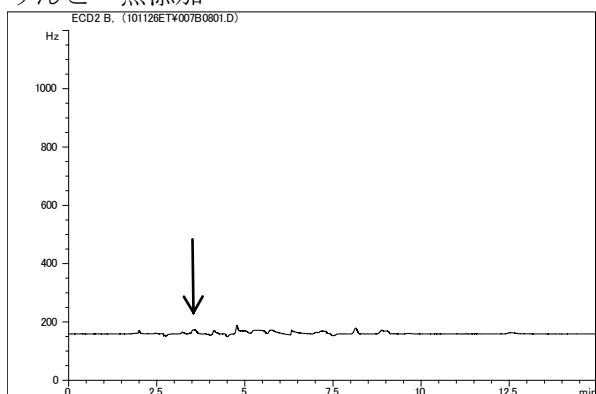
キャベツ 無添加



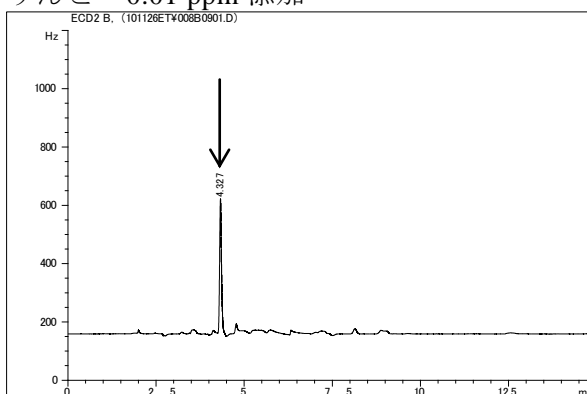
キャベツ 0.01 ppm 添加



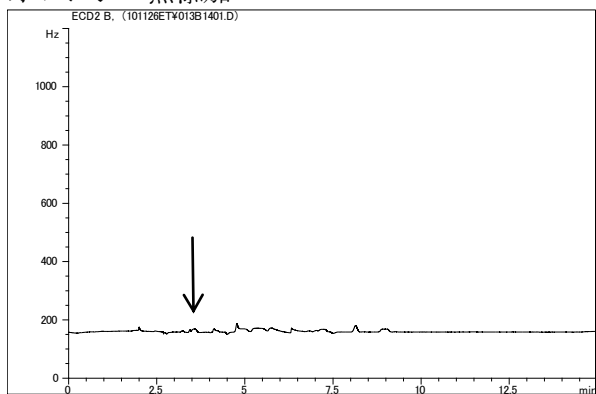
りんご 無添加



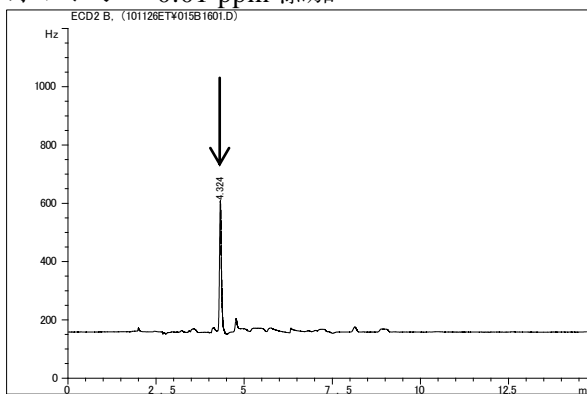
りんご 0.01 ppm 添加



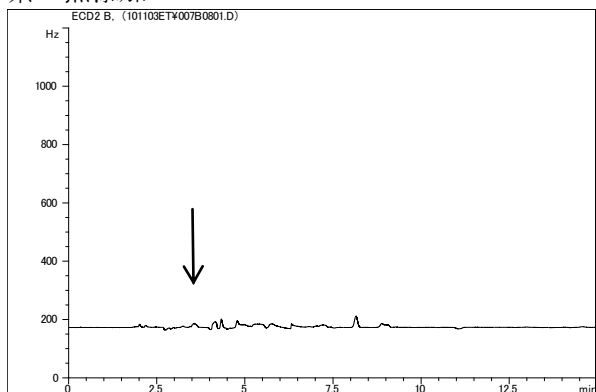
オレンジ 無添加



オレンジ 0.01 ppm 添加



茶 無添加



茶 0.01 ppm 添加

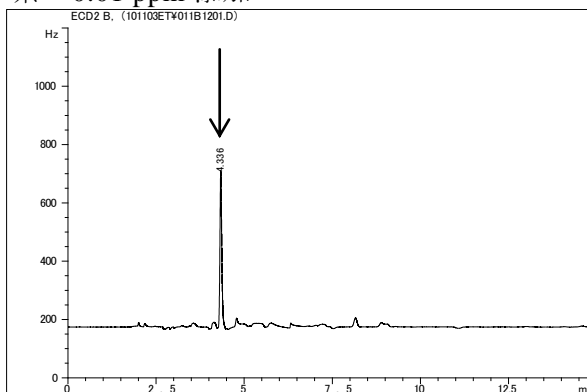
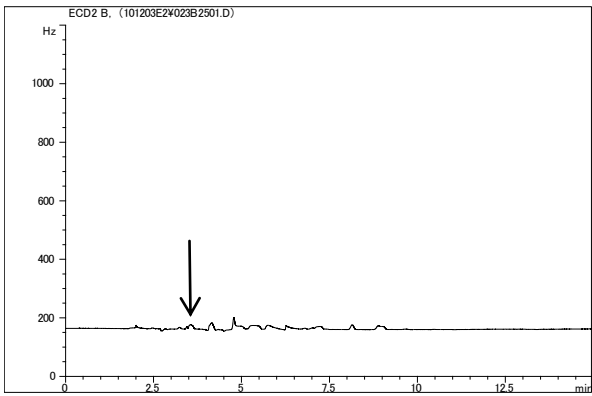
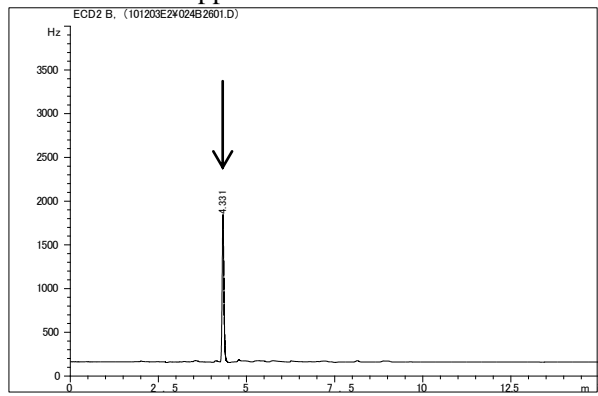


図 3-1-2 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-624)

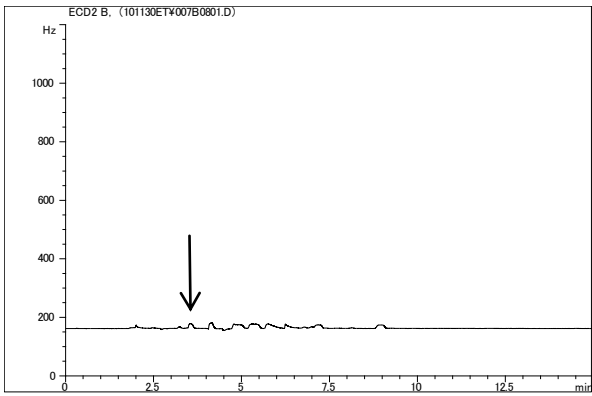
トマト 無添加



トマト 0.05 ppm 添加



くり 無添加



くり 0.5 ppm 添加 (10 倍希釈)

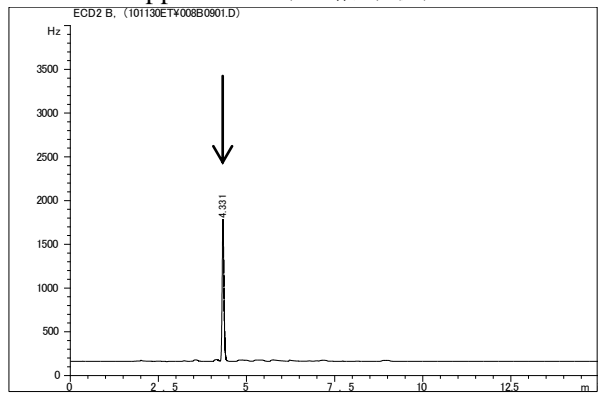
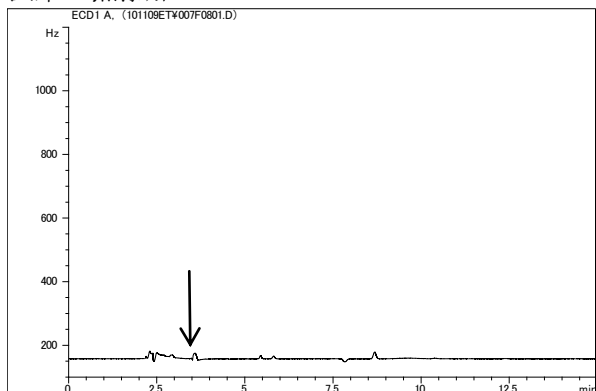
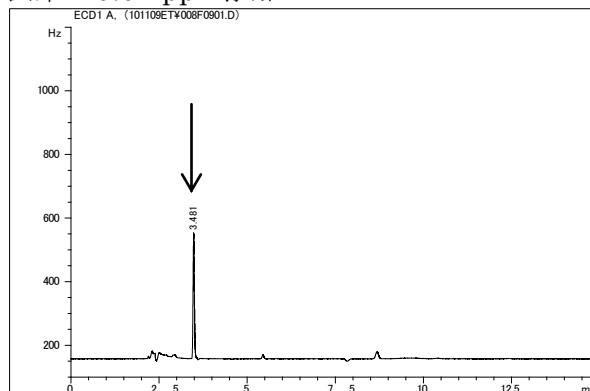


図 3-1-3 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-624)

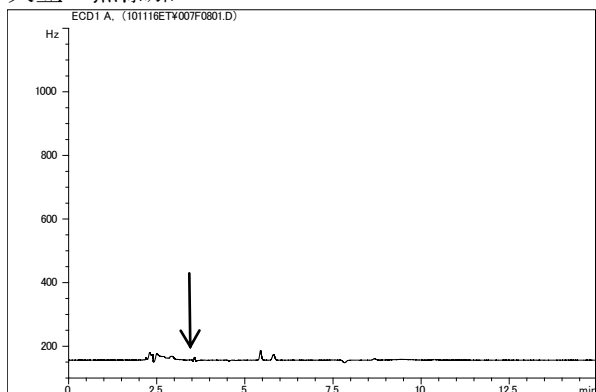
玄米 無添加



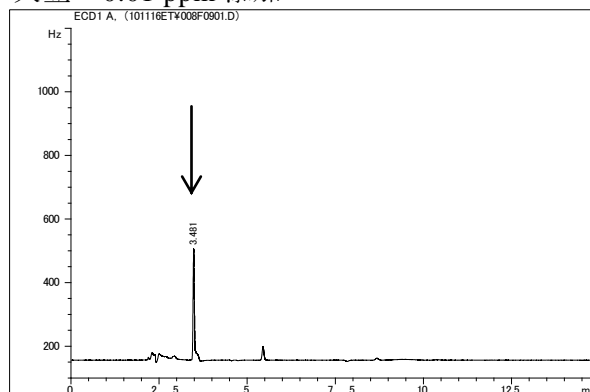
玄米 0.01 ppm添加



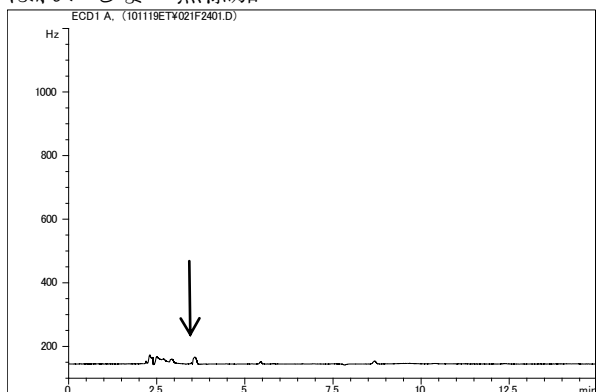
大豆 無添加



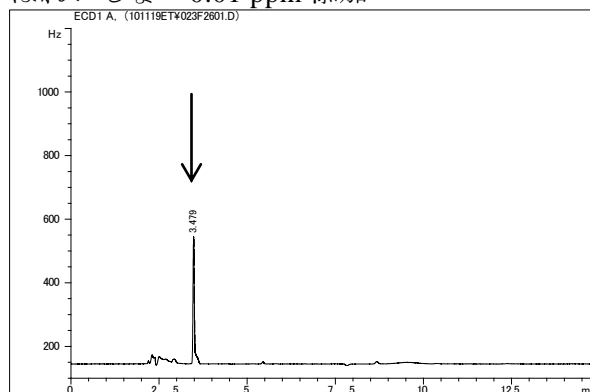
大豆 0.01 ppm添加



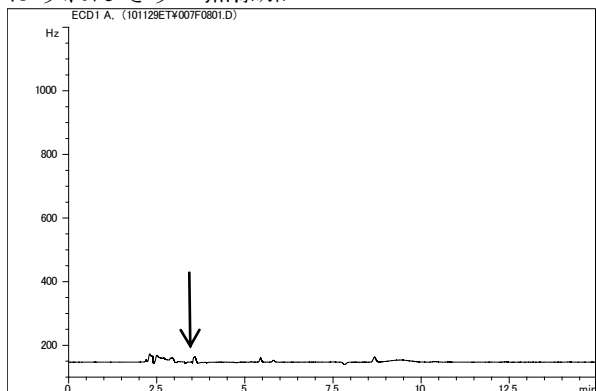
ばれいしょ 無添加



ばれいしょ 0.01 ppm添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm添加

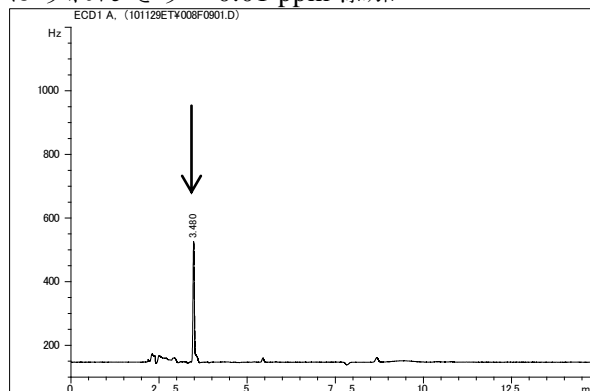
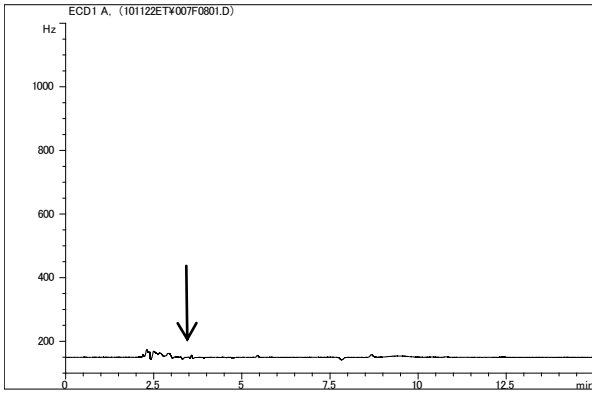
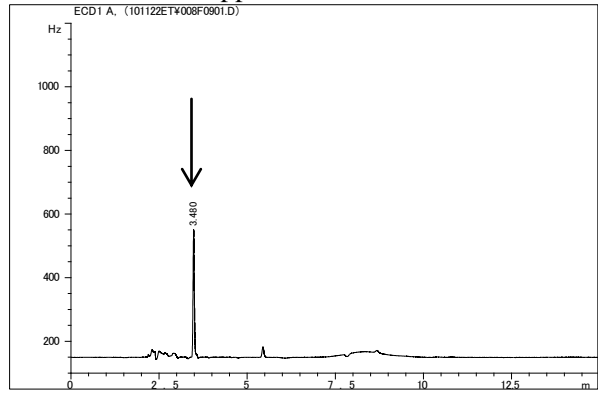


図 3-2-1 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-WAX)

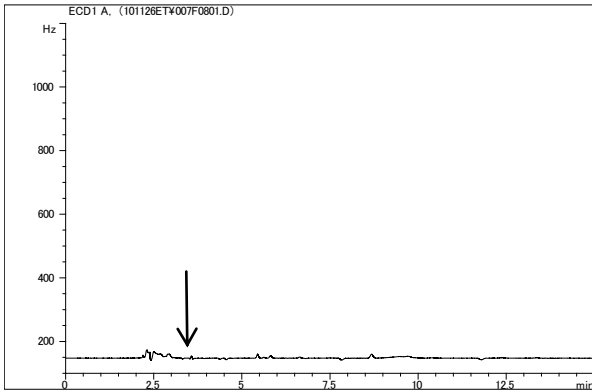
キャベツ 無添加



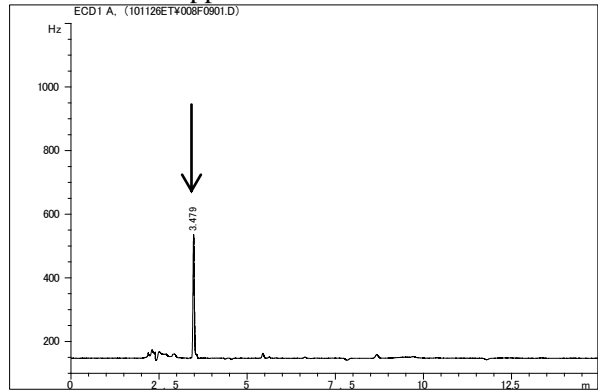
キャベツ 0.01 ppm 添加



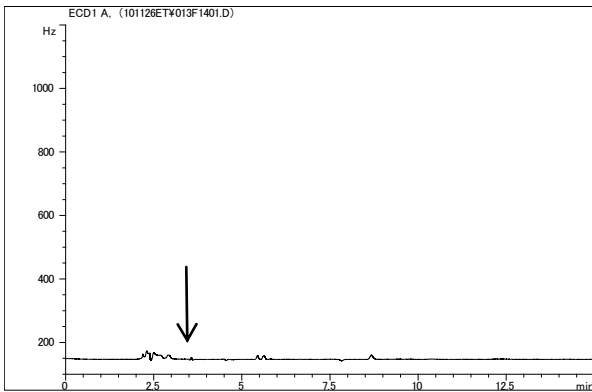
りんご 無添加



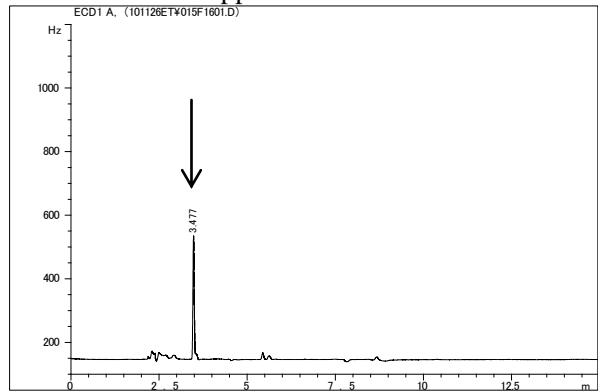
りんご 0.01 ppm 添加



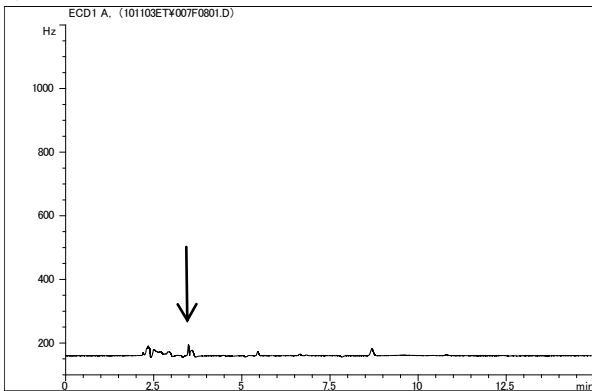
オレンジ 無添加



オレンジ 0.01 ppm 添加



茶 無添加



茶 0.01 ppm 添加

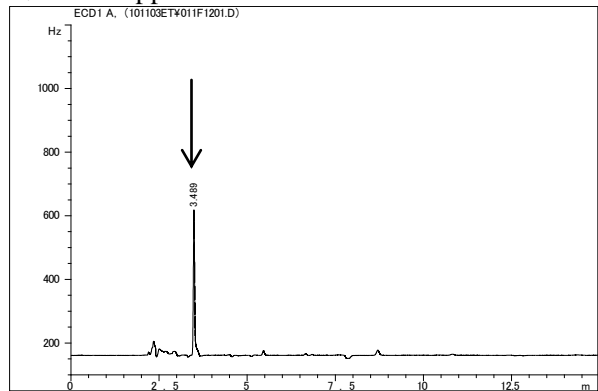
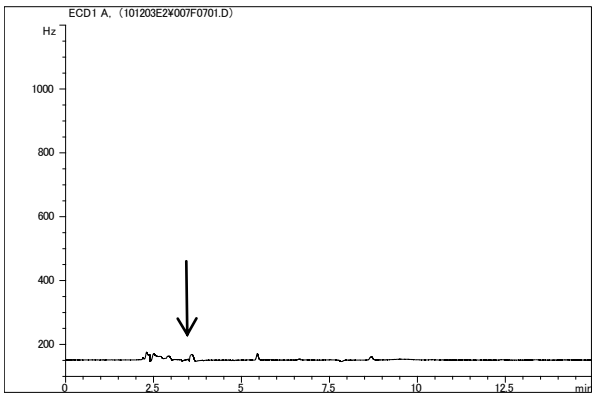
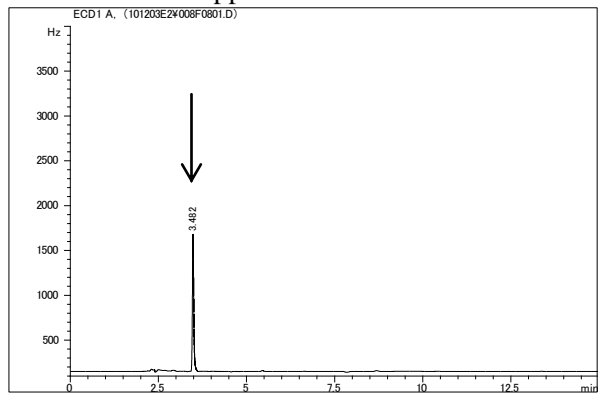


図 3-2-2 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-WAX)

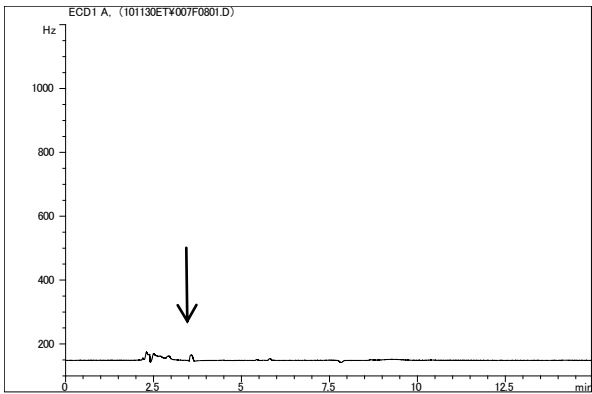
トマト 無添加



トマト 0.05 ppm 添加



くり 無添加



くり 0.5 ppm 添加 (10倍希釈)

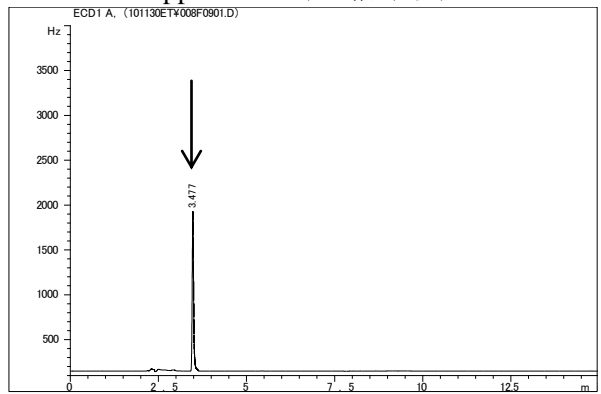


図 3-2-3 ヨウ化メチルの試料のガスクロマトグラム (測定分析カラム DB-WAX)