

QuEChERS 法を用いた蜂蜜および玄米中 ネオニコチノイド系農薬等の一斉分析法の検討

平井知里・山岸 浩

Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey and Brown Rice by QuEChERS

Chisato HIRAI, Hiroshi YAMAGISHI

ネオニコチノイド系農薬等の検査体制の整備ならびに県内に流通する蜂蜜および玄米の残留実態調査を目的として、ネオニコチノイド系農薬および代謝物等 16 化合物の一斉分析法を検討した。QuEChERS 法を用いた前処理法について検討した結果、欧州で広く用いられている European Committee for Standardization Standard Method EN 15662 (以下、EN 法) を抽出法とし、マトリックス検量線を用いて定量することにより良好な結果が得られた。

1. はじめに

ネオニコチノイド系農薬はクロロニコチニル系殺虫剤の総称で、天然の殺虫剤といわれる「ニコチン」からその名が付けられたものである。有機リン系農薬の代替農薬として 1990 年代半ばから使われ始めた農薬であるが、近年ミツバチなど花粉媒介昆虫への毒性が問題視されている¹⁻⁴⁾。EU 諸国では、ミツバチへの危害を防止するためクロチアニジンなど 3 種類のネオニコチノイド系農薬とフェニルピラゾール系農薬フィプロニルに対し、使用規制が開始されている。ネオニコチノイド系農薬はヒトへの毒性は比較的低いとされているが、近年の研究で、一部のネオニコチノイド系農薬が哺乳類の神経系に影響を与える可能性があるとの報告⁵⁾がなされており、欧州ではこれらの農薬の ADI、ARfD を見直す動きもある。

ネオニコチノイド系農薬は、その浸透性・残効性の高さから日本でも多用されており、同農薬との関連が疑われるミツバチへい死やアキアカネ減少などが各地で報告されている⁶⁻¹⁰⁾。ヒトが口にする食品中の残留についても消費者の関心が高まっており、ネオニコチノイド系農薬分析の必要性が増している。

そこで、本県においてもネオニコチノイド系農薬等の検査体制を整え、県内に流通する食品中の残留実態を把握することを目的として、ネオニコチノイド系農薬等の一斉分析法を検討することとした。検討には、ミツバチへい死との関連が深い蜂蜜および玄米を試料として用いた。

今回、QuEChERS 法を用いた前処理法について検討した結果、欧州で広く用いられている EN 法を抽出に用いることにより良好な結果が得られ、検討した試験法について妥当性評価を行ったので報告する。

2. 方法

2. 1 対象農薬

アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアクロプリドアミド、チアメトキサム、ニテンピラム、CPMA、CPMF、CPF、エチプロール、フィプロニル、フロニカミド、TFNA および TFNG の計 16 化合物

2. 2 内部標準物質

アセタミプリド-d3、イミダクロプリド-d4、クロチアニジン-d3 およびチアメトキサム-d3

2. 3 標準品および標準溶液

農薬標準原液：和光純薬工業㈱の残留農薬試験用標準品を各々アセトニトリルまたはメタノールに溶解して 100 μ g/mL の標準原液を調製した。

農薬混合標準溶液：各農薬標準原液を混合し、メタノールで 1 μ g/mL に調製した。

内部標準原液：Sigma-Aldrich Japan 社の分析用標準品をアセトニトリルに溶解して 100 μ g/mL に調製した。

内部標準混合溶液：各内部標準原液を混合し、アセトニトリルで 1 μ g/mL に調製した。

検量線用標準溶液：農薬混合標準溶液（各 1 μ g/mL）をメタノール・水（1:1）混液またはマトリックス溶液で適宜希釈し、0.5~25ng/mL の検量線用標準溶液を調製した。

2. 4 試薬等

試薬はそれぞれ以下の製品を用いた。特に記載のないものは、下記 2 社の特級または残留農薬分析用グレードを用いた。

関東化学㈱：0.1vol% ぎ酸-蒸留水（高速液体クロマトグラフィー用）、ぎ酸（高速液体クロマトグラフィー用）

和光純薬工業㈱：クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物（和光一級）、クエン酸三ナトリウム二水和物（試薬特級）、無水硫酸マグネシウム（試薬特級）、酢酸（試薬特級）、無水酢酸ナトリウム（試薬特級）、1mol/L 酢酸アンモニウム（高速液体クロマトグラフィー用）、メタノール（LC/MS 用）、超純水（LC/MS 用）

水：Milli-Q Reference 超純水装置（メルク㈱）により精製したものを用いた。

ミニカラム：㈱アイスティサイエンス製 C18-30mg、C18-50mg、PSA-30mg を用いた。

セラミックホモジナイザ：アジレント・テクノロジー㈱製セラミックホモジナイザ（50mL チューブ用）を用いた。

2. 5 試料

蜂蜜：県内産アカシア蜜を用いた。

玄米：平成 7 年に県内で生産されたコシヒカリを、粉碎後、冷凍保存（-30℃）したものを用いた。

2. 6 装置および測定条件

タンデム型質量分析計：AB SCIEX 3200QTRAP

HPLC 装置：(株)島津製作所 LC 20A

その他、測定条件等の詳細を表 1 および表 2 に示した。

LC 移動相溶媒は、TFNA など酸性化合物について感度良く定量するため酸性条件とした。

また、対象化合物の MRM 条件について、3200QTRAP の最適化プログラムを用いて 48 モニターイオンを決定し、

真空部の条件を最適化した。Positive/Negative 両モードでの検出が可能な化合物については、両モードでモニターイオンを設定した。また、塩素原子には安定同位体として塩素 35 (存在比 76%) と塩素 37 (存在比 24%) が存在することから、分子内に塩素原子を含む化合物の一部について、塩素 37 含有化合物のモニターイオンを設定した。

以上の測定条件で、農薬混合標準溶液を分析し得られたクロマトグラムを図 1 に示した。

表 1 装置および測定条件

機器	パラメータ	設定値
LC	機器	LC20A(島津)
	カラム	TSKgel ODS-100V 3 μm (2.0mmI.D. × 150mm)
	移動相A	0.1%ギ酸水溶液
	移動相B	0.1%ギ酸含有メタノール
	グラジエント条件	B: 10%(0min)-10%(1min)-40%(6min)-65%(12min)-95%(15min)-95%(20min)-Stop(20.1min)
	平衡化	7min
	流速	0.2mL/min
	カラム温度	40°C
	サンプル温度	4°C
	注入量(μL)	5 μL
MS/MS	機器	3200QTRAP LC/MS/MS(ABサイエックス)
	イオン化法	ESI (+)/(-)
	プローブ電圧	5500/-4000(V)
	イオンソース温度	500(°C)
	カーテンガス	30psi
	ネブライズガス GS1	50psi
	ターボガス GS2	80psi

表 2 MRM トランジション

No.	化合物名	RT (min)	Q1(m/z)	Q3(m/z)	No.	化合物名	RT (min)	Q1(m/z)	Q3(m/z)
(Positive)									
1	アセタミプリド_1 *※1	11.5	223	126	31	TFNA_1 *	8.9	192	148
2	アセタミプリド_2		223	99	32	TFNA_2		192	98
3	アセタミプリド_3 (³⁷ Cl)		225	128	33	TFNG_1	8.4	249	203
4	イミダクロプリド_1 *	10.6	256	209	34	TFNG_2		249	148
5	イミダクロプリド_2		256	175					
6	クロチアニジン_1	10.8	250	132					
7	クロチアニジン_2		250	169	35	クロチアニジン_1 *	10.8	248	58
8	ジノテフラン_1 *	7.3	203	129	36	クロチアニジン_2		248	165
9	ジノテフラン_2		203	87	37	クロチアニジン_3 (³⁷ Cl)		250	58
10	チアクロプリド_1 *	12.5	253	126	38	フィプロニル_1 *	17.9	435	330
11	チアクロプリド_2		253	99	39	フィプロニル_2		435	250
12	チアクロプリド_3 (³⁷ Cl)		255	128	40	フィプロニル_3 (³⁷ Cl)		437	332
13	チアクロプリドアミド_1 *	10.5	271	126	41	エチプロール_1	17.1	395	330
14	チアクロプリドアミド_2		271	228	42	エチプロール_2		395	331
15	チアメキサム_1 *	9.2	292	211	43	フロニカミド_1	9.0	228	81
16	チアメキサム_2		292	181	44	フロニカミド_2		228	146
17	ニテンピラム_1 *	7.9	271	126	45	TFNA_1	8.9	190	146
18	ニテンピラム_2		271	237	46	TFNA_2		190	69
19	フィプロニル_1	17.9	437	368	47	TFNG_1 *	8.4	247	146
20	フィプロニル_2		437	255	48	TFNG_2		247	163
21	CPF_1 *	11.4	199	128					
22	CPF_2		199	126					
23	CPMA_1 *	7.9	256	126	49	内部標準(Positive) チアメキサム_d3	9.2	295	214
24	CPMA_2		256	176	50	イミダクロプリド_d4	10.6	260	213
25	CPMF_1 *	6.4	212	126	51	アセタミプリド_d3	11.5	226	126
26	CPMF_2		212	99					
27	エチプロール_1 *	17.1	397	351					
28	エチプロール_2		397	255	52	内部標準(Negative) クロチアニジン_d3	10.8	251	58
29	フロニカミド_1 *	9.0	230	203					
30	フロニカミド_2		230	148					

※1 * : 定量に用いたイオン

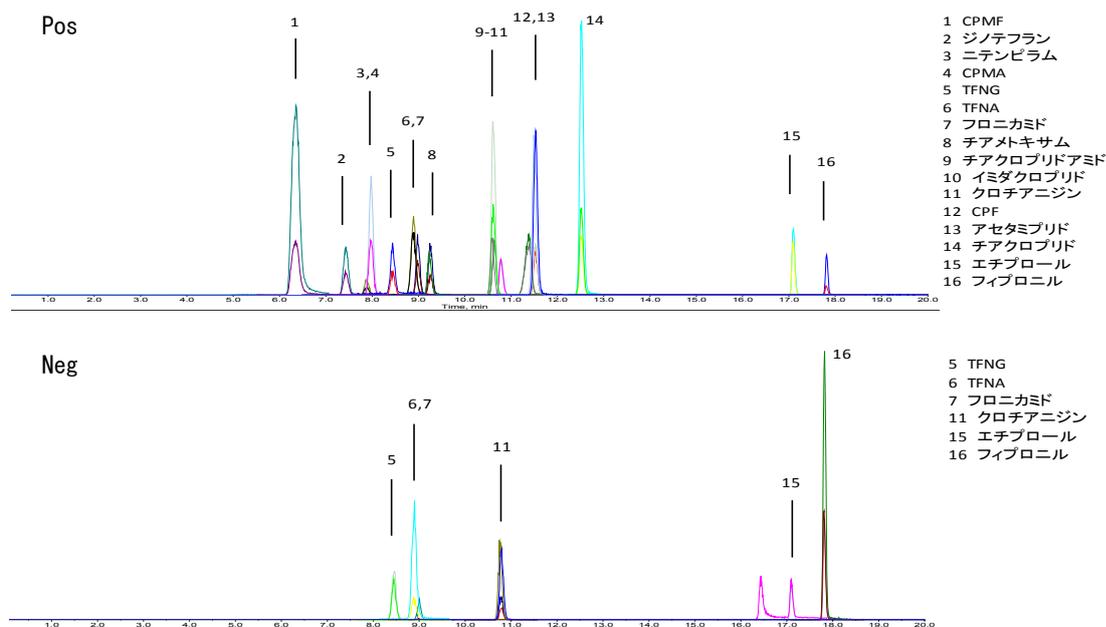


図1 MRM クロマトグラム

2. 7 試験溶液の調製および定量

蜂蜜は試料 5g に水 10mL を加えて、下記の抽出操作を行った。

玄米は均一に粉砕した試料 5g に水 10mL を加えて 30 分間放置後、下記の抽出操作を行った。

①QuEChERS 抽出液の検討：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図 2 の方法により、試験溶液を調製した。抽出操作は、EN 法、AOAC Official Method 2007.01 (以下、AOAC 法) およびアセトニトリル/リン酸緩衝液 (pH7) による抽出法 (以下、比較法) の 3 種類の方法を検討した。(表 3)

精製は、アイスティサイエンス(株)が開発した STQ 法¹¹⁾ を参考に、抽出操作で得られたアセトニトリル層 1mL を、C18-30mg、PSA-30mg および C18-50mg 固相カートリッジで精製した。

得られた試験溶液および検量線用標準溶液 (溶媒標準溶液) を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

②マトリックス検量線による定量：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図 3 の方法により、試験溶液を調製した。得られた試験溶液およびマトリックス標準溶液を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

③試験法の妥当性評価：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図 4 の方法により、試験溶液を調製した。得られた試験溶液およびマトリックス標準溶液を各 1mL 取り、内部標準混合溶液 (各 1 μ g/mL) を 25 μ L 添加した後、LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から内部標準法により定量した。

表 3 抽出操作の概要

	EN法	AOAC法	比較法
抽出溶媒	MeCN	1%酢酸/MeCN	MeCN
抽出方法	+水30min静置、 +MeCN1min振とう、 +塩1min振とう	+水30min静置、 +1%酢酸/MeCN、 塩1min振とう	+リン酸緩衝液30min 静置、+MeCN振とう、 +塩1min振とう
塩	無水MgSO ₄ NaCl クエン酸水素2Na クエン酸3Na	無水MgSO ₄ 無水酢酸Na	無水MgSO ₄ NaCl
pH [*]	3.3-3.5	5.6-5.8	4.0-4.2

※水ブランク試料における遠心後水層の実測値

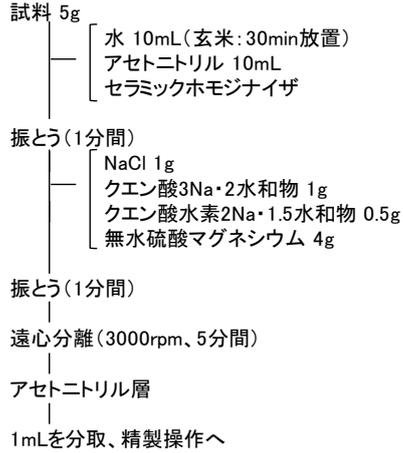
2. 8 添加回収試験

①QuEChERS 抽出液の検討：試料中濃度で 0.1ppm になるよう添加した水、蜂蜜および玄米について 2 併行で試験を行い、回収率を求めた。

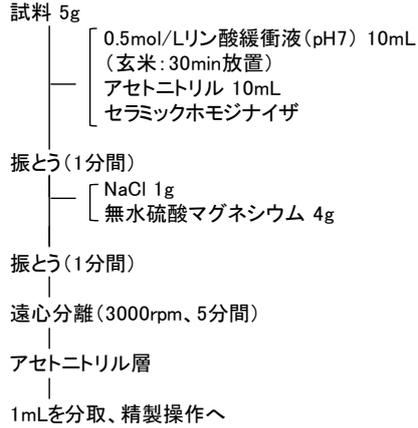
②マトリックス検量線による定量：試料中濃度で 0.01ppm および 0.1ppm になるよう添加した蜂蜜および玄米について 2 併行で試験を行い、回収率を求めた。

③試験法の妥当性評価：試料中濃度で 0.01ppm および 0.1ppm になるよう添加した蜂蜜および玄米について、分析者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間の繰り返し試験を行った。得られた結果から選択性、定量限界、真度、併行精度および室内精度を求め、厚生労働省から通知された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」¹²⁾ (以下、ガイドライン) に基づいて評価した。

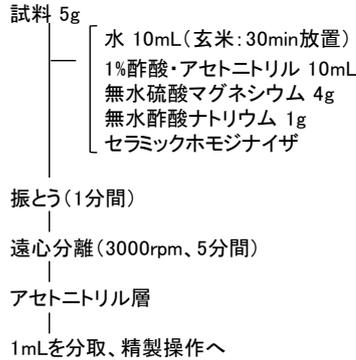
(抽出操作: EN法)



(抽出操作: 比較法)



(抽出操作: AOAC法)



(精製操作)

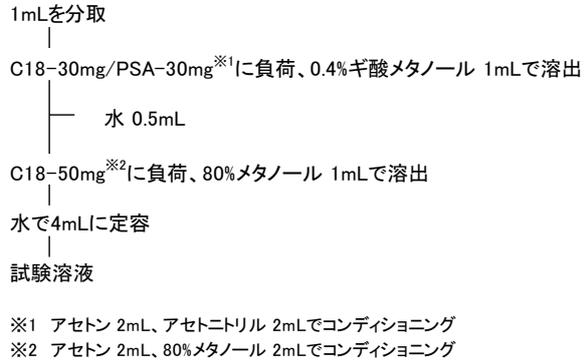


図2 試験溶液の調製方法(1)

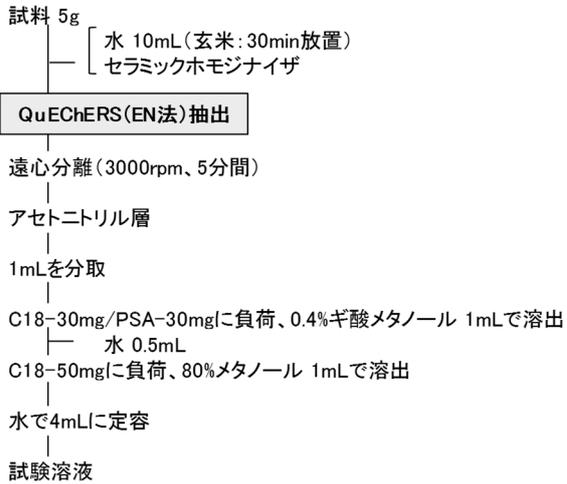


図3 試験溶液の調製方法(2)

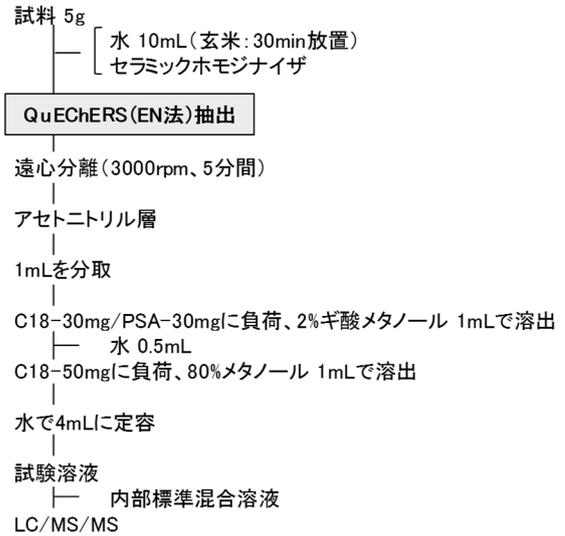


図4 試験溶液の調製方法(3)

3. 結果および考察

3.1 QuEChERS 抽出液の検討

QuEChERS 法は 2003 年に Anastassiades らのグループによって開発されたもので、ポリプロピレン製遠心管の中でアセトニトリル抽出、塩析、脱水を同時に行い、遠心分離して得られた抽出液を分散固相抽出により精製する簡便迅速な方法である¹³⁾。その後改良が加えられ、現在では EN 法および AOAC 法の 2 種類のメソッドが広く用いられている^{14,15)}。

今回は、抽出液の検討として、2 種類の改良 QuEChERS 法および比較法の 3 種類の方法で添加回収試験を行った。

その結果、水については、抽出法に EN 法を用いた場合に全ての化合物で良好な回収率を得た (表 4)。AOAC 法と比較法では、酸性化合物である TFNA および TFNG の回収率が低くなった。これは、抽出液の pH や使用した塩の種類が影響したと考えられる。水を試料として 3 種類の抽出法で振とう抽出を行い、遠心分離後の水層の pH を確認したところ、EN 法における当該 pH は 3.5 まで低下しており、他の二つの方法に比べ、より酸性側に傾いていた (表 3)。TFNA 等の酸性化合物は、pH の低下によりアセトニトリル層への分配率が向上すると推測され、このことが EN 法において酸性化合物の回収率が良好であった要因ではないかと考えている。

実試料については、水での結果に比べ回収率は全体的に低く、70%を下回る化合物が増加した。EN 法の結果のみを見ても、蜂蜜で 3 化合物、玄米で 6 化合物が 70%を下回った。各ブランク試料から得られた試験溶液に標準溶液を添加してマトリックス効果の有無を確認したところ、化合物によっては溶媒標準溶液で得られるピーク面積の 6 割程度までレスポンスが低下するものもあった。水に添加した試料では、水溶性の高い CPMA や TFNA を除きほとんどの化合物が 90%以上回収されていることから、実試料で回収率が低下した要因は、試料由来のマトリックスによるイオン化抑制にあると考えられた。

そこで抽出法については EN 法を採用することとし、次に、マトリックスの影響を補正するため、マトリックス検量線を用いて定量することとした。

3.2 マトリックス検量線による定量

蜂蜜および玄米のブランク試料を試験方法に従って操作して得たマトリックス溶液で混合標準溶液を希釈し、それぞれ 0.5~25ng/ μ L の検量線用標準溶液を調製した。このマトリックス標準溶液を用いて、添加試料から得られた試験溶液を絶対検量線法で定量した。

その結果、溶媒標準溶液による定量において低回収率であった化合物の回収率が改善し、ほとんどの化合物について良好な回収率を得ることができた (表 5)。16 化合物中 14 化合物について、蜂蜜および玄米のいずれの試料においても回収率は 70~120%の範囲内となり、CPMA と TFNA の 2 化合物についても、6~7 割程度を回収することができた。

CPMA と TFNA はともに水溶性の高い酸性化合物であり、アセトニトリル/水分配時に水層に残留することが回収率低下の要因と考えられた。また、TFNA および TFNG については、PSA 固相から十分に溶出できていない可能性が考えられた。そこで、精製に用いるギ酸メタノールのギ酸濃度について検討したところ、ギ酸濃度を 0.4%から 2%に変更することにより、若干の回収率向上が見られた。

(図 5)

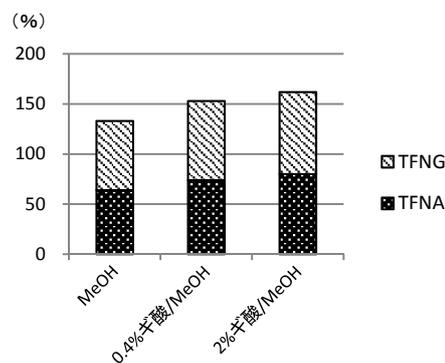


図 5 ギ酸濃度による酸性化合物の回収率の変化 (試料: 水)

表 4 抽出法検討結果 (回収率)

(単位%, n=2、添加濃度: 0.1ppm)

Compound	水			蜂蜜			玄米		
	EN法	AOAC法	比較法	EN法	AOAC法	比較法	EN法	AOAC法	比較法
Acetamidrid	96	90	96	84	82	82	72	72	71
CPF	92	90	97	92	90	89	78	77	78
CPMA	75	77	77	53	57	53	52	58	55
CPMF	100	94	100	100	92	101	89	93	96
Dinotefuran	101	97	100	91	87	98	72	71	75
Ethiprole (Neg)	90	84	88	99	94	96	71	71	77
Flonicamid	98	96	101	98	98	100	81	79	80
Imidacloprid	89	87	97	69	64	71	53	53	51
Nitenpyram	98	90	94	85	79	90	76	71	76
Thiacloprid amide	95	91	101	93	87	91	82	81	80
Thiacloprid	98	93	99	80	81	82	66	65	66
Thiamethoxam	98	94	98	73	70	77	57	59	57
Clothianidin (Neg)	99	94	94	98	92	94	63	59	61
Fipronil (Neg)	92	87	91	101	97	99	95	89	96
TFNA	80	34	69	68	11	43	59	22	43
TFNG (Neg)	93	32	83	91	14	63	79	20	67

3. 3 試験法の妥当性評価

試験法の妥当性評価は、試験機関において農薬等の試験法を採用する際に、分析結果の信頼性を保証するため、国のガイドラインに基づき実施するものである。ブランク試料および添加試料について繰り返し試験を実施し、選択性、真度、精度および定量限界を評価する。当センターで使用している質量分析計はイオン源の極性切り替えによるPos/Neg同時測定には対応しておらず、またLC部の耐圧性能が低く分析時間を一定程度必要とすることから、定量精度を向上するためには、質量分析計の感度変動によるバラツキや夾雑成分によるマトリックス効果を低減することが重要と思われた。そこで、これまでの検討結果から、抽出法にはEN法を用い、定量法にはマトリックス検量線を用いた内部標準法を用いて、試験法の妥当性評価を実施することとした。

内部標準物質には、ネオニコチノイド系農薬の安定同位体標識化合物として入手可能であったアセタミプリド-d3等4化合物を用いた。対象化合物の保持時間や感度、マトリックス効果の傾向から、それぞれの物性に近いものを内部標準物質として割り当て検量線を確認したところ、全ての化合物について0.5-25ng/mLの範囲でR²>0.999の直線性が得られた。

蜂蜜および玄米を試料として、分析者1名が1日2併行5日間の繰り返し試験を行った。その結果、いずれの試料についても、CPMAを除く15化合物が選択性、定量限界、真度および精度においてガイドラインの目標値を満たした(表6)。

CPMAについては、真度は40~60%であった。また、CPMFはガイドラインの目標値は満たしたものの、真度は100%を上回った。CPMAおよびCPMFはニテンピラムの代謝物であり、CPMAはアセトン等の有機溶媒中で加温されることにより容易にCPMFへ変化することが知られている^{16,17)}。このことから、CPMAの回収率が低下したのは、水溶性が高いことによる抽出時のロスに加え、精製中にCPMAがCPMFへ変化したためではないかと考えられた。そこで、CPMAのみを玄米に添加しCPMAおよびCPMFの回収率を確認したところ、2割程度がCPMFへ変化していた(表7)。この結果から、先に実施した妥当性評価の結果においても、CPMFの真度にCPMAから変化したCPMFが上乗せされている可能性が高いと考えられた。

以上の結果から、試験結果の取り扱いにおいては、CPMAだけでなく目標値を満たしたCPMFについても参考値とし、今回検討した一斉試験法で試験可能な対象化合物は、CPMAおよびCPMFを除いた14化合物とすることが適切と考えている。

表7 CPMA添加回収試験結果

Compound	玄米	
	CPMA	0.1ppm添加
CPMA	70	
CPMF	17	
CPF	ND	

表5 マトリックス検量線による定量結果

(単位%、n=2)

Compound	蜂蜜		玄米	
	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm
Acetamidrid	107	87	81	98
CPF	85	86	94	98
CPMA	74	63	62	74
CPMF	104	88	102	100
Dinotefuran	104	95	81	94
Ethiprole (Neg)	95	99	106	104
Flonicamid	109	91	96	102
Imidacloprid	101	87	96	94
Nitenpyram	94	88	95	96
Thiacloprid amide	100	86	88	97
Thiacloprid	104	88	101	102
Thiamethoxam	105	88	88	95
Clothianidin (Neg)	100	95	102	100
Fipronil (Neg)	102	104	106	107
TFNA	76	71	66	71
TFNG (Neg)	90	90	86	88

表6 妥当性評価結果

		蜂蜜						選択性	定量限界
Compound	※1 評価	0.01 ppm			0.1 ppm				
		併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)		
Acetamidrid	×	1.8	7.7	96.5	2.6	5.7	92.9	○	○
CPF		4.4	5.1	94.9	2.2	6.6	90.2	○	○
CPMA		6.5	23.1	46.5	3.6	14.7	56.0	○	○
CPMF		2.9	8.1	114.0	2.7	7.5	103.4	○	○
Dinotefuran		2.3	8.3	89.0	2.9	5.1	91.4	○	○
Ethiprole (Pos)		3.8	10.0	90.8	3.3	4.6	89.3	○	○
Fonicamid (Pos)		3.2	8.0	101.4	1.9	8.6	92.0	○	○
Imidacloprid		2.6	8.9	94.9	4.8	6.7	92.3	○	○
Nitenpyram		9.4	17.0	91.1	4.7	8.0	93.9	○	○
Thiacloprid amide		4.0	8.9	94.5	3.0	6.6	91.0	○	○
Thiacloprid		2.4	9.1	96.2	3.4	5.5	91.5	○	○
Thiamethoxam		4.6	11.3	93.8	3.9	6.4	93.4	○	○
Clothianidin (Neg)		4.2	10.4	94.5	3.2	6.1	92.7	○	○
Fipronil (Neg)		1.4	8.7	92.2	2.3	5.2	93.8	○	○
TFNA		4.3	8.1	85.4	2.2	7.1	73.3	○	○
TFNG (Neg)		4.4	8.9	86.7	3.4	10.8	81.7	○	○

		玄米						選択性	定量限界
Compound	※1 評価	0.01 ppm			0.1 ppm				
		併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)		
Acetamidrid	×	1.7	2.0	97.2	1.2	1.9	97.0	○	○
CPF		3.2	3.4	99.0	1.7	2.1	93.8	○	○
CPMA		3.0	10.1	55.6	3.2	5.3	58.6	○	○
CPMF		2.0	3.2	118.1	2.4	2.8	107.7	○	○
Dinotefuran		3.3	5.0	93.0	3.1	3.2	94.9	○	○
Ethiprole (Pos)		3.2	3.2	95.4	1.7	3.2	91.7	○	○
Fonicamid (Pos)		3.3	5.2	106.4	3.9	3.9	98.8	○	○
Imidacloprid		5.3	5.3	99.9	2.9	3.1	96.2	○	○
Nitenpyram		4.6	4.6	98.1	1.6	4.4	95.6	○	○
Thiacloprid amide		4.4	4.8	97.7	1.2	2.9	93.0	○	○
Thiacloprid		1.9	4.1	102.6	1.2	1.3	97.1	○	○
Thiamethoxam		2.4	4.1	101.4	3.0	3.0	95.6	○	○
Clothianidin (Neg)		2.0	2.5	96.0	1.8	1.8	95.3	○	○
Fipronil (Neg)		3.1	3.3	97.7	1.9	3.0	99.8	○	○
TFNA		3.1	4.5	85.6	3.0	3.3	76.4	○	○
TFNG (Neg)		3.2	4.8	85.4	1.7	3.6	81.6	○	○

※1 評価は全ての性能パラメーターが目標値に適合したものを無印、いずれかの性能パラメーターが目標値に適合しなかったものを×とした。

4. まとめ

ネオニコチノイド系農薬等の検査体制の整備および県内に流通する蜂蜜および玄米の残留実態調査を目的として、ネオニコチノイド系農薬および代謝物等 16 化合物の一斉分析法を検討した。EN 法およびマトリックス検量線を用いた内部標準法で定量することにより、2 代謝物を除く 14 化合物について試験法の妥当性が確認され、本一斉分析法を用いることにより、蜂蜜および玄米中ネオニコチノイド系農薬等の迅速、簡便かつ精度の良い定量が可能となった。

今後は、開発した一斉分析法を用いて県内に流通する蜂蜜および玄米の残留実態調査を進める予定である。

参考文献

- 1) Henry M et al.: A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, **336**(6079), 348-350, (2012)
- 2) Whitehorn PR et al.: Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science*, **336**(6079), 351-352, (2012)
- 3) Goulson D: An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides. *Journal of Applied Ecology*, **50**, 977-987, (2013)
- 4) UNEP(2010)-UNEP Emerging Issues: Global Honey Bee Colony Disorder and Other Threats to Insect Pollinators.
http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global_Bee_Colony_Disorder_and_Threats_insect_pollinators.pdf
- 5) Kimura-Kuroda J et al.: Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. *PloS One*, **7**(2), e32432, (2012)
- 6) (独)農研機構 畜産草地研究所: 夏期に北日本水田地帯で発生が見られる巣箱周辺でのミツバチ斃死の原因について (2014.7.18 公表)
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nilgs/053347.html
- 7) 農林水産省: 平成 26 年度蜜蜂被害事例調査の結果と今後の対策について (2015.6 月公表)
http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_mitubati/honeybee_survey.html
- 8) 農林水産省: 農薬による蜜蜂の危害を防止するための我が国の取組 (2015.9 月改訂)
http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_mitubati/index.html
- 9) 国立環境研究所: 実験水田を用いた農薬の生物多様性への影響評価～浸透移行性殺虫剤がもたらすトンボへの影響～ (2016.3.16 公表)
https://www.nies.go.jp/whatsnew/2016/20160316/20160316_2.html
- 10) Kasai A et al.: Fipronil application on rice paddy fields reduces densities of common skimmer and scarlet skimmer. *Scientific Reports*, **6**, DOI: 10.1038/srep23055, (2016)
- 11) 谷澤春奈, 佐々野僚一, 大関由利子: LC/MS/MS を用いた残留農薬の多成分迅速一斉分析法の検討, 第 95 回食品衛生学会学術講演会講演要旨集, P39, A-21 (2008)
- 12) 厚生労働省: 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日付食安発 1224 第 1 号)
- 13) Anastassiades M et al.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, **86**, 412-431 (2003)
- 14) European Committee for Standardization: Standard Method EN 15662
<https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>
- 15) Association of Analytical Communities: AOAC 2007.01
<http://www.aoac.org/>
- 16) 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 柿本芳久, 田中雄三, 柴田正: 農産物中のネオニコチノイド系殺虫剤ニテンピラム及びその代謝物の分析, 食品衛生学雑誌, **39**, 127-134, (1998)
- 17) 小林裕子: 液体クロマトグラフィー/質量分析及び液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による残留農薬分析, 分析化学, **58**(12), 985-997, (2009)

透析および固相抽出による食品中の保存料および甘味料の分析

澤崎加奈恵・平井知里・山岸 浩

Analysis of the preservatives and sweeteners in food by the dialysis method and the solid phase extraction method

Kanae SAWAZAKI, Chisato HIRAI, Hiroshi YAMAGISHI

食品中の 8 種類の保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸イソブチル）および 2 種類の甘味料（サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム）の試験溶液調製を同時に行う方法について検討した。粉碎均一化した試料を 10%塩化ナトリウム-0.01mol/L 塩酸とともに透析膜に移し、透析外液として 70%メタノールを使い 24 時間透析した。得られた透析外液は Oasis HLB で精製し、HPLC で測定した。添加回収試験を行ったところ、回収率は 83.0~102.2%であった。また、定量限界は、アセスルファムカリウムが 30 μ g/g、その他の化合物が 20 μ g/g であった。本法は、簡便に 8 種類の保存料と 2 種類の甘味料を同時に抽出・精製できる方法であり、様々な試料の一斉処理に有用であると考えられる。

1. はじめに

指定添加物の保存料および甘味料には、食品衛生法により使用基準が定められているものもあり、毎年行政検査が行われている¹⁾。

食品中の保存料の分析には、一般的に水蒸気蒸留-高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法^{2,4)}が使われているが、留液を得るのに時間がかかる上、一度に処理できる検体数も少ない。また、装置を構成する器具の種類も多く、洗浄操作が煩雑といった欠点がある。さらに、粕谷ら⁵⁾の報告にあるように、高タンパク食品および高脂肪食品については、水蒸気蒸留法では低回収率であるため、これらの食品については、通知法²⁾では溶媒抽出-HPLC 法を用いるとされており、また、衛生試験法・注解³⁾および食品衛生検査指針⁴⁾では、試料をメタノール・水(1:1)混液でホモジナイズし、遠心後の上澄液で水蒸気蒸留を行う旨の注解が追加されているが、いずれも操作が煩雑であり、加工食品の外観から成分組成を見極めることも困難である。

一方、甘味料の分析には、透析抽出-HPLC 法^{3,4,6-9)}または溶媒抽出-HPLC 法⁴⁾が用いられている。このうち透析抽出法は、透析に時間を要するが、操作が簡便で、一度に多数の試料を処理できる。また、汎用的な器具で一連の操作を行える利点がある⁹⁾。

行政検査においては、同時に複数の検査を行わなければならない状況にあることから、同時に複数の添加物を検査する方法の確立が望まれる。そこで、透析法を応用し、食品中の保存料および甘味料の試験溶液を同時に調製する方法を検討したので報告する。

2. 方法

2. 1 試料

福井県内に流通している保存料および甘味料表示のないハム、みそ、しょう油、漬物、清涼飲料水、マーガリン、ジャムを用いた。

2. 2 対象化合物

安息香酸(BA)、ソルビン酸(SoA)、デヒドロ酢酸(DHA)、パラオキシ安息香酸エチル(PHBA-Et)、パラオキシ安息香酸プロピル(PHBA-Pr)、パラオキシ安息香酸イソプロピル(PHBA-iPr)、パラオキシ安息香酸ブチル(PHBA-Bu)、パラオキシ安息香酸イソブチル(PHBA-iBu)、サッカリンナトリウム(SA)およびアセスルファムカリウム(AK)について検討した。

2. 3 試薬等

標準品：BA、SoA、PHBA-Et、PHBA-Bu、SA、AK は和光純薬工業(株)製を用いた。DHA は関東化学(株)製を用いた。PHBA-Pr、PHBA-iPr、PHBA-iBu は東京化成工業(株)製を用いた。

BA,SoA,DHA 混合標準原液：BA、SoA、DHA の各標準品をそれぞれ 200mg 量り、メタノールに溶かし正確に 100mL とした。

PHBA エステル類混合標準原液：PHBA-Et、PHBA-Pr、PHBA-iPr、PHBA-Bu、PHBA-iBu の各標準品をそれぞれ 200mg 量り、メタノールを加えて正確に 100mL とした。

SA,AK 混合標準原液：SA 二水和物を 235mg と AK を 200mg 量り、水を加えて正確に 100mL とした。

各標準溶液：各混合標準原液をメタノールで希釈し、1~20 μ g/mL の範囲で検量線用標準溶液を調製した。

透析内液用溶液：塩化ナトリウム 100g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1,000mL とした。

透析外液用溶液：70%メタノールを用いた。

その他の試薬：HPLC 用、特級等を用いた。

透析膜：Viskase 社製透析用セルロースチューブ 36/32 (透過分子量 14,000、孔径 50Å)を用いた。

ミニカラム：Waters 製 Oasis HLB (60mg)を用いた。あらかじめメタノール 3mL および水 3mL で洗浄して使用した。

メンブランフィルター：Merck Millipore 社製 Millex-LG (孔径 0.20 μ m)を用いた。

2. 4 装置

HPLC 装置：(株)島津製作所製 Nexera XR

2. 5 測定条件

(1) BA, SoA, DHA

分析カラム：TSKgel ODS-80T_M (4.6mmI.D.×150mm 粒子径 5 μm)、移動相：0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)・メタノール・アセトニトリル (60：20：20)、カラム温度：40℃、流速：0.5mL/min、注入量：15 μL、検出波長：230nm (BA)、260nm (SoA)、310nm (DHA)

(2) PHBA エステル類

分析カラム：TSKgel ODS-80T_M (4.6mmI.D.×150mm、粒子径 5 μm)、移動相：水・0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)・メタノール (37：5：58)、カラム温度：40℃、流速：0.5mL/min、注入量：15 μL、検出波長：260nm

(3) SA, AK

分析カラム：YMC-Pack NH2 (4.6mmI.D.×150mm、粒子径 5 μm)、ガードカラム：YMC-Guardpack NH2 (4.0mmI.D.×10mm、粒子径 5 μm)、移動相：1%リン酸・メタノール (40：60)、カラム温度：40℃、流速：1.0mL/min、注入量：20 μL、検出波長：210nm (SA)、230nm (AK)

2. 6 試験溶液の調製

2. 6. 1 透析

液状のものはそのまま、固形状のものはフードプロセッサーで均一化し、その約 10g を精密に量り、透析内液用溶液 20mL を用いて透析膜に移した後、空気を出来るだけ追い出して透析膜の上端をひもで縛り、200mL のメスシリンダーに入れ、透析外液用溶液で 200mL とした。このメスシリンダーを時々揺り動かしながら室温で 24 時間透析した。

2. 6. 2 精製

透析後、得られた透析外液のうち 5mL を 0.1mol/L リン酸で希釈して、全量を 20mL とし混和した。この 2mL をミニカラムに負荷し、水 3mL で洗浄後、メタノールで溶出して 4mL とし、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

3. 結果および考察

3. 1 抽出

3. 1. 1 透析

甘味料の試験溶液調製法である透析法は、簡便で一度に多数の検体を処理できる特長がある点、汎用的な器具で一連の操作を行える点、さらに、甘味料試験は保存料試験との重複検体数も多い点に着目し、この透析法を保存料の試験溶液調製に応用することを検討した。粕谷ら⁵⁾は、透析用溶液にメタノール・水 (8：2) を用いることで、PHBA エステル類の透析用溶液への移行率が高まり、良好な回収率が得られることを報告している。これを参考に、透析外液用溶液にメタノール-水混合液を用いることとし、粕谷らの報告において、水蒸気蒸留法での PHBA エステル類の回収率が不良とされている高タンパク・高脂肪食品のハムを試料として、透析外液用溶液の最適メタノール濃度について検討した。

その結果、表 1 に示すように、メタノール濃度が増えるにしたがって PHBA エステル類の回収率が上昇し、70% メタノールで最良になった。

これより、透析外液用溶液を 70%メタノールとし、他の食品についても回収率を確認したところ、表 2 に示すように、DHA および PHBA エステル類についてはいずれの食品においても良好な回収率が得られた。しかし、ハム、みそ、しょう油、漬物の BA、およびしょう油の SoA では、標準液の保持時間よりも早く溶出し、クロマトグラム上で同定できなかった。また、図 1 に示すように、SA および AK は、ピーク形状が崩れ、正確な濃度を求めることができなかった。

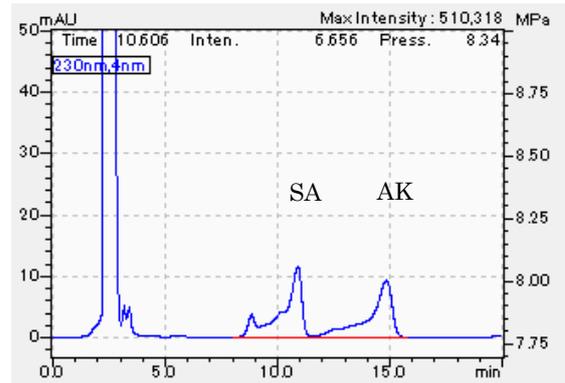


図 1 SA および AK の透析外液のクロマトグラム (食品試料：ハム)

表 1 メタノール濃度と PHBA エステル類の回収率 (%) の関係

メタノール濃度	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu
0%	51.6	40.5	36.1	23.7	22.4
20%	59.1	49.2	45.2	32.6	31.0
40%	74.3	68.5	65.2	55.3	53.5
60%	80.6	77.1	75.0	68.0	66.7
70%	100.4	99.4	98.9	96.5	97.3
80%	94.3	84.8	87.2	76.9	78.8
90%	68.9	55.7	58.6	46.5	47.9
100%	79.1	68.0	70.2	60.1	61.9

添加量：200 μg/g

表 2 透析外液用溶液を 70%メタノールとした場合の回収率 (%)

食品試料	BA	SoA	DHA	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu	SA	AK
ハム	-	97.9±0.2	97.3±0.4	99.2±0.2	97.9±0.2	97.4±0.3	94.6±0.6	94.8±0.5	-	-
みそ	-	96.8±0.9	91.2±0.5	92.2±0.8	92.1±0.9	91.0±0.9	83.6±1.3	81.4±1.4	-	-
しょう油	-	-	90.6±0.5	98.8±0.3	98.9±0.2	99.3±0.2	97.7±0.3	99.3±0.3	-	-
漬物	-	99.1±0.2	98.8±0.4	100.9±0.3	100.3±0.2	100.8±0.2	99.4±0.3	100.5±0.5	-	-
清涼飲料水	100.8±0.6	100.8±0.6	100.7±0.5	100.7±0.2	100.4±0.2	100.7±0.4	99.4±0.3	100.8±0.3	-	-
マーガリン	93.0±0.4	98.4±0.2	90.6±0.4	100.7±0.9	98.4±1.0	97.0±1.0	92.3±0.9	91.3±0.8	-	-
ジャム	100.7±0.7	99.6±0.8	99.8±0.6	99.5±0.4	98.3±0.5	98.8±0.4	98.2±0.5	99.0±0.5	-	-

Mean±S.D., n=3, 添加量: 200 µg/g

3. 1. 2 SA および AK におけるピーク形状不良の原因検証

SA および AK において、透析後の透析外液から得られたクロマトグラムのピーク形状が崩れた原因の検証を行った。

(1)標品のみを用いた透析

食品試料の代わりに水を用い、最終試験溶液中濃度が 10 µg/mL になるように添加した標品のみを含む溶液について透析を行い、得られた透析外液におけるピーク形状およびピーク面積値を確認した。得られたクロマトグラムは、図 1 と同様に、目的化合物のピークにショルダーが見られるものの、それらのピーク面積値は 10 µg/mL 標準液のピーク面積値とほぼ合致した (図 2)。また、各ピークの UV 吸収スペクトルはいずれも、標準液の UV 吸収スペクトルと一致していた。このことから、透析後の試料溶液には添加した分の目的化合物は含まれていると考えられた。なお、標品のみを用いた透析におけるピーク形状不良の原因については、増田ら¹⁰⁾が報告しているように、透析内液用溶液中の塩化物イオンの影響が考えられた。

(2)マトリックス添加試験

標準液にマトリックスを添加することにより、マトリックスの影響について検証を行った。マトリックスとしては、食品試料にみそを用いて透析して得られた透析外液を用いた。添加するマトリックスの比率を変えてピーク形状を

確認したところ、図 3 に示すようにマトリックスの比率が高くなるにつれ、目的化合物のピーク形状は崩れていった。

以上の検証結果から、目的化合物の透析は行われているが、透析内液用溶液中の塩化物イオンや食品中の夾雑イオンと目的化合物がカラムとの相互作用において競合し、そのことによりピーク形状の崩れを引き起こしていることが推定された。

3. 1. 3 BA および SoA の溶出時間のずれの原因検証

一部の食品試料において、BA および SoA がカラムから溶出する時間が標品より早くなった原因について、前項と同様に、前項の(1)および(2)の検証を行った。

その結果、(1)標品のみを用いた透析の検証については、標準液よりも溶出が早まることはなく、回収率もほぼ 100%であり、透析後の試料溶液には添加した分の目的化合物が含まれていることが確認できた。

また、(2)マトリックス添加試験の検証については、図 4 に示すように、マトリックスの比率が高くなるにつれて、BA および SoA がカラムから溶出する時間は早くなった。

これらのことから、BA および SoA についても、SA および AK と同様に、目的化合物の透析は行われているが、食品中の夾雑物と目的化合物がカラムとの相互作用において競合することにより、本来の溶出時間より早く溶出することが推定された。

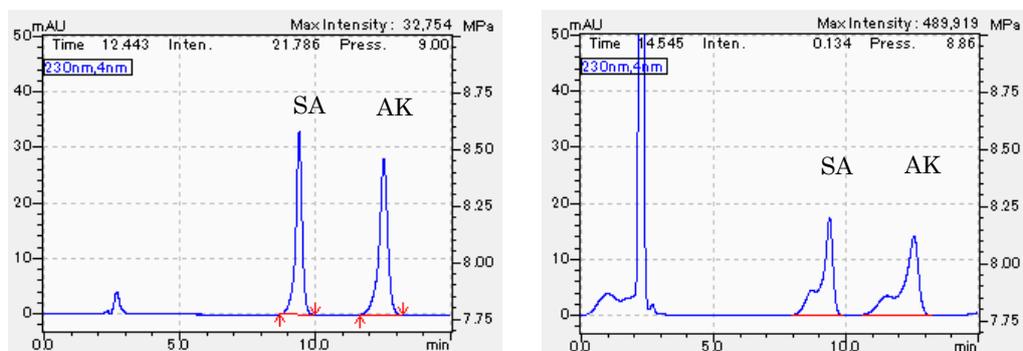


図 2 10 µg/mL 標準液 (左) と標品のみを含む溶液について透析して得られた透析外液 (右) のクロマトグラム

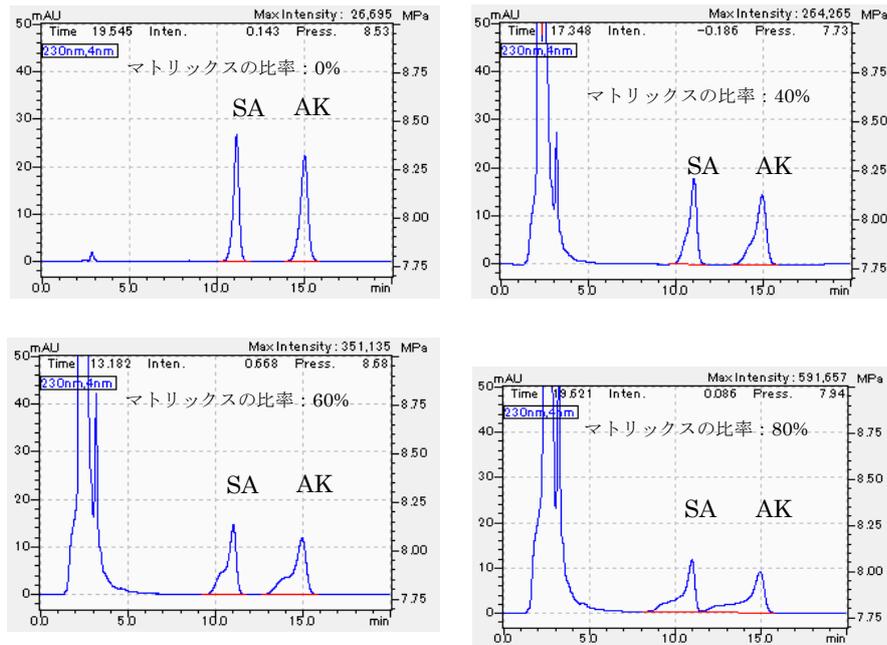


図3 添加するマトリックスの比率の変化に伴うSAおよびAKのピーク形状の変化

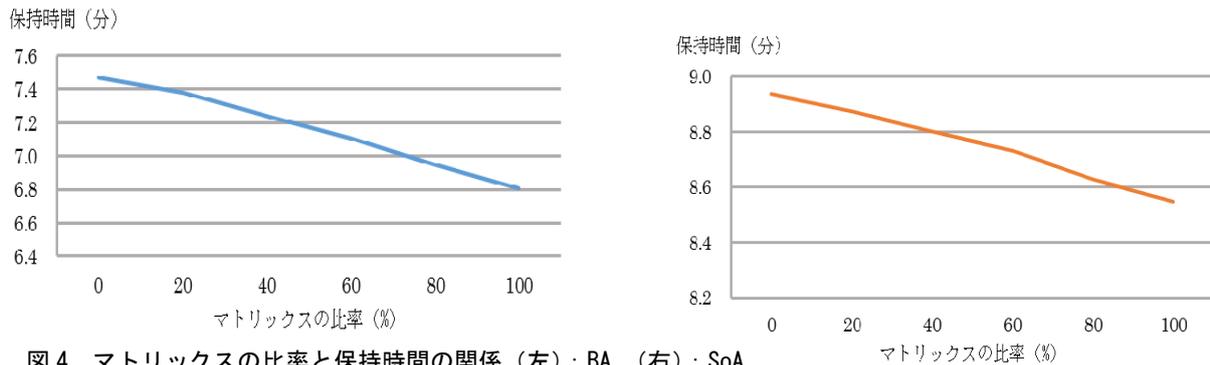


図4 マトリックスの比率と保持時間の関係 (左) : BA、(右) : SoA

3.2 精製

一部の目的化合物について、ピーク形状が崩れたり、本来の溶出時間より早く溶出してしまったりした原因として、得られた透析外液中に含まれる夾雑物の影響が考えられたため、ミニカラムを用いた精製を検討した。

粕谷ら⁵⁾は保存料のサリチル酸も対象化合物として分析しており、発酵食品において、保持時間の早いサリチル酸と夾雑ピークの分離が十分でないことから、透析外液についてミニカラムを用いた精製を行っている。この報告を参考に、Oasis HLBを用いた精製を検討した。Oasis HLBは、ジビニルベンゼンとビニルピロリドンの共重合体であることから、ジビニルベンゼンによる π 電子効果とビニルピロリドンによる極性化合物保持能により、一般的な逆相固相に比べて、負荷試料の希釈率を低く抑えることができると考えられる。得られた透析外液を0.1mol/Lリン酸で4倍希釈し負荷したところ、親水性のSAおよびAKを含む全ての化合物を保持できた。粕谷らの報告では、洗浄溶媒に水、続いてメタノール・水(1:1)混液を使用しているが、メタノール・水(1:1)混液での洗浄では、保存料

は溶出しなかったものの、SAおよびAKが溶出してしまい、メタノールの比率を下げてこれらの化合物は溶出してしまった。一方、負荷および水洗浄で溶出した溶液のクロマトグラムを確認したところ、夾雑物の多くは、これらの溶液のクロマトグラムに見られ、負荷および水洗浄の段階で、大半の夾雑物については除去されたと考えられた。そのため、ミニカラムの洗浄は水のみで行うこととした。

また、ミニカラムの洗浄後、メタノールで溶出したところ、3mLで全ての化合物のほぼ全量を溶出できた。従って、メタノールで溶出し4mLとすることとした。

3.3 添加回収試験

7種類の試料(ハム、みそ、しょう油、漬物、清涼飲料水、マーガリン、ジャム)に各保存料および甘味料を200 μ g/gとなるように添加し、本法に従って分析したところ、回収率は表3のようになり、全ての化合物において83.0~102.2%の良好な回収率を示した。

透析法のみでは保持時間のずれが生じたBAおよびSoAについては、Oasis HLBによる精製を行うことにより、

表 3 Oasis HLB で精製後の添加回収率(%)

食品試料	BA	SoA	DHA	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu	SA	AK
ハム	98.9±0.4	97.5±0.2	97.9±0.7	96.7±0.4	97.6±0.3	97.4±0.4	94.0±0.2	93.5±0.4	89.1±1.2	90.3±1.7
みそ	98.0±0.1	96.9±0.8	92.1±0.5	94.7±0.3	95.8±0.7	95.6±0.7	84.3±1.6	83.0±1.3	93.1±0.4	94.8±0.7
しょう油	97.8±0.4	99.9±0.3	96.0±1.0	98.6±0.6	100.7±0.5	101.6±0.6	97.1±0.6	100.6±1.0	96.7±0.6	98.3±0.6
漬物	100.7±0.7	98.9±0.6	99.2±0.9	99.5±0.7	101.2±0.6	101.5±0.8	97.6±0.6	100.5±1.1	96.2±1.3	98.3±1.1
清涼飲料水	101.8±1.3	101.5±1.4	102.2±1.0	99.8±1.1	101.1±1.0	101.3±1.0	98.3±1.6	100.7±1.3	96.1±1.5	97.0±2.6
マーガリン	92.1±1.3	97.1±1.3	91.4±1.1	99.6±1.6	97.6±1.7	96.3±1.6	91.5±1.6	89.6±1.2	92.1±4.0	99.9±4.2
ジャム	100.2±0.5	99.0±0.6	100.3±0.9	99.2±0.3	98.4±0.4	98.9±0.4	97.8±0.2	97.6±0.3	87.8±2.4	91.3±0.6

Mean±S.D., n=3, 添加量:200 µg/g

表 4 水蒸気蒸留法との比較

	水蒸気蒸留法				本法			
	BA		SoA		BA		SoA	
	濃度 (g/kg)	RSD (%)						
しょう油	0.54	0.5	N.D.	—	0.55	0.6	N.D.	—
漬物	N.D.	—	0.71	0.3	N.D.	—	0.74	0.7
ドライソーセージ	N.D.	—	0.61	1.5	N.D.	—	0.64	0.4
かまぼこ	N.D.	—	1.23	2.3	N.D.	—	1.37	0.6

n=3

本来の溶出時間で溶出されるようになった。また、SA および AK についても、ピーク形状不良が解消された。

なお、定量下限値は AK が 30 µg/g、その他の化合物が 20 µg/g であった。

3. 4 水蒸気蒸留法との比較

保存料表示のある 4 種類の食品（しょう油、漬物、ドライソーセージ、かまぼこ）を試料とし、本法と水蒸気蒸留法との比較を行った。なお、水蒸気蒸留法は通知法²⁾に準じた。表 4 に示したように、全ての試料について、本法と水蒸気蒸留法のいずれにおいても、表示どおりに各保存料が検出された。本法の測定値は、水蒸気蒸留法の測定値に対して 100.7~111.9%となり、ほぼ同等の値を示した。

4. まとめ

8 種類の保存料および 2 種類の甘味料の試験溶液を同時に調製する方法を検討した。

透析外液に 70%メタノールを用いることにより PHBA エステル類で良好な抽出率が得られた。

一部の目的化合物については、クロマトグラム上でのピーク形状の崩れや保持時間のずれが生じたが、これは、得られた透析外液中の夾雑物の影響により、目的化合物のカラムへの保持が妨げられたためと推定された。

Oasis HLB による精製を行うことにより、ピーク形状の崩れや保持時間のずれは解消され、全ての化合物について 83.0~102.2%の良好な回収率が得られた。

参考文献

- 1) 鶴田小百合他：固相抽出—LC-MS/MS 法による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の一斉分析，食品衛生学雑誌，**54**，204-212(2013)
- 2) 医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：「食品中の食品添加物分析法」の改正について，食安基発 0528 第 4 号，平成 22 年 5 月 28 日
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015，金原出版，東京(2015)
- 4) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003，日本食品衛生協会，東京(2003)
- 5) 粕谷陽子他：透析法を応用した食品中の保存料の一斉分析，東京都健康安全研究センター年報，**54**，104-108(2003)
- 6) 守安貴子他：食品中のアセスルファム K，サッカリン及びアスパルテームの分析法，衛生化学，**37**，97-102(1991)
- 7) 守安貴子他：HPLC による食品中のアセスルファム K，サッカリン及びアスパルテームの分析法，食品衛生学雑誌，**37**，91-96(1996)
- 8) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知：食品中のアセスルファムカリウム分析法について，食基発第 58 号，平成 13 年 12 月 28 日
- 9) 岡山明子他：高速液体クロマトグラフ法による食品中の 8 種の保存料及びサッカリンナトリウムの一斉分析法，日本食品化学学会誌，**5**，153-158(1998)
- 10) 増田治樹他：シリカゲル NH₂ カラムを用いた甘味料一斉分析法における透析液の組成が与える影響について，姫路市環境衛生研究所報，**23**，60-64(2015)

最終処分場を安全に利用するための観測井ガスモニタリング

田中宏和・山崎慶子・中村大充

Monitoring of Gas Concentration in Wells to Confirm Safety at a Industrial Controlled Landfill

Hirokazu TANAKA, Keiko YAMAZAKI, Masamitsu NAKAMURA

最終処分場の跡地を安全に有効活用する上で、安定化に伴うガスの発生状態を把握することが重要である。しかし、最終処分場全体のガスフラックス調査には多大な費用と労力を要する。そこで、埋立地の観測井に蓋を被せて密閉し、内部に滞留するガス濃度を携帯型ガス濃度測定機でモニタリングする方法の有効性を検証した。その結果、観測井内滞留ガス濃度は、保有水水位の変動や水温の影響を受けることが判明した。また、本方法により埋立地内部で発生する微量のガスを容易に検知できることが確認された。

埋立廃棄物組成を図1に、深さと埋立時期を表1に示した。

1. はじめに

一般廃棄物の最終処分場及び産業廃棄物の最終処分場に係る技術上の基準を定める省令（昭和52年3月14日総理府・厚生省令第1号）の中で、管理型最終処分場からの発生ガスは、保有水水質や温度とともに廃止基準として採用されており、安定化を判断するための重要な指標である。また、処分場跡地を利用する場合、埋立地内部から発生する有機物分解由来の二酸化炭素やメタンは、酸欠や爆発事故等の原因となる可能性がある。そのため、処分場の適正かつ安全な管理のためには、埋立地のガス発生状態を把握することが重要である。しかし、埋立地全体を対象としたチャンバー法等による調査は多大な費用、労力および時間を要する。さらに、低濃度ガス分析は実験室レベルの高感度分析機器が必要であり、処分場管理者が日常的に行うモニタリング手法としては採用しにくい。そこで、本稿では蓋（キャップ）をした観測井管内に滞留するガスを携帯型ガス濃度測定機で直接測定する方法により、発生ガスのモニタリングを試みた。そして、得られた結果について、保有水水位や水温、埋立開始からの経過期間との関係性を評価した。

2. 処分場情報と調査方法

2.1 試験対象処分場埋立地の概要

調査を実施した管理型最終処分場は、北陸地方の海岸に近い平坦地にある掘り込み式の処分場で、埋立時期が異なる全6区画の埋立地が隣接している。それぞれの区画の、

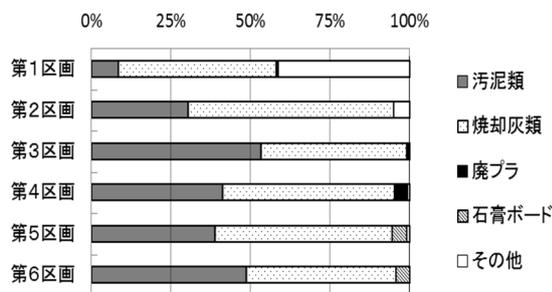


図1 埋立廃棄物の重量組成

2.2 観測井の構造等

観測井は、2009年12月に実施したボーリング調査の削孔を利用し、第1～5区画に設置した。ボーリングの掘削径は116mmとし、そこに内径65mmの耐熱性硬質ポリ塩化ビニル管を入れ、その周囲に井底から深度1mまでは3号硅砂を、その上部から地表まではベントナイトペレットを充填した。

観測井の構造を図2に示す。地表は井戸の周囲0.5m四方をセメンチングした。塩化ビニル管については、底部から深度1mまでは開孔率10%の有孔管を用い、その周りに60メッシュのポリ塩化ビニリデン製ネットを二重に巻き付けてスクリーンとした。深度1mから地上1mの立ち上がり部は無孔管とし、底部と最上部にはキャップを取り付けた。観測井の深さは第1区画が3m、それ以外の区画は5mとした。最上部のキャップにはシリコンチューブを取り付け、ピンチコックの開閉により、キャップを開放せずに観測井内の滞留ガスを採取できる構造とした。測定時以外は観測井内部に大気が入らないように管理した。

2.3 観測井滞留ガス濃度・放出ガス量および水位・水温の調査方法

観測井内滞留ガスは、シリコンチューブに携帯型ガス濃度測定機（Geotechnical Instruments製GA2000PSCO）を接続し、メタン、二酸化炭素および酸素を測定した。吸引速度は約0.4L/分とし、指示値が安定した約1分後の値を記録した。その後キャップを開け、観測井に延長管を設置し、観測井のガス流速と温度を微風速計（KANOMAX製CLIMOMASTER MODEL6533）で測定して放出ガス

表1 各埋立区画の容量と埋立時期

(2015年3月現在)					
区画	面積 (m ²)	容積 (m ³)	深さ (m)	埋立開始	埋立終了
第1区画	3,750	9,730	3.5	1982年12月	1988年3月
第2区画	3,750	13,275	6.0	1988年3月	1990年9月
第3区画	7,800	31,950	6.0	1990年9月	1995年5月
第4区画	7,800	31,950	6.0	1995年6月	2000年12月
第5区画	11,790	52,650	6.0	2001年1月	2009年5月
第6区画	11,790	52,650	6.0	2008年3月	—

量の計測を試みた。観測井の水位と水温はロープ式水位計（アルファ光学製 WL100TYPE3B）で測定した。水温は井底から約 0.3m 上部で測定した。これらの測定は毎月 1 回の頻度で行い、本稿では 2010 年 2 月から 2015 年 4 月までの結果について評価した。

3. 結果と考察

3. 1 観測井からのガス放出量と孔内温度

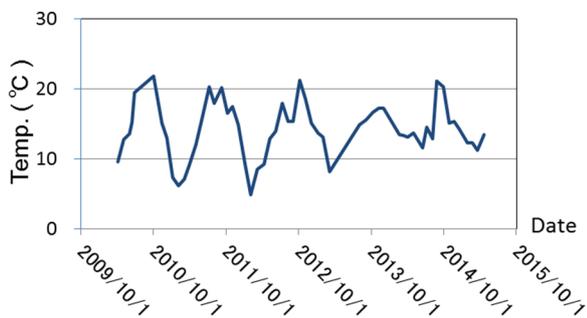
ガス抜き管の孔内ガス濃度の深度分布や温度は、有機物分解の状況や大気の影響を反映していることが報告されている。しかし本調査においては、観測井内部のガス流速を機器の測定可能下限値（0.05m/s）以上で計測できた調査日は僅かであり、最大でも 0.13m/s であった。このようにガス放出量が少ないことに加え、観測井内の滞留水水位が高かったため、大気の影響を受けやすく、ガス温度の計測ができなかった。

また、浸出水水温からも埋立地内部の発熱状態や安定化挙動を把握できることが報告されている²⁾。第 3 区画の観測井内の滞留水の温度変化を図 3 に示した。年により僅かな差はあるが、夏は高温に、冬は低温になる季節変動がみられた。このことは、調査対象処分場における発熱量が小さく、滞留水についても地上温度の影響を受けていることを示している。

3. 2 観測井内滞留ガス組成

観測井内に溜まった滞留水は、観測井周辺の保有水の状態を反映している。各区画の保有水水位と観測井内滞留ガス濃度を各区画別に図 4～8 に示した。測定した 3 種類の滞留ガス濃度は調査日によって増減し、連続的な濃度上昇や下降挙動はみられない。計測されたメタンの最高値は 90.9%、二酸化炭素は 19.0% であり、最低値はともに 0.0% であった。酸素は最高値が 21.9%、最低値が 0.4% であった。

第 1 区画から第 4 区画に関しては、メタンと二酸化炭素濃度が高くなると酸素濃度が低下した。水位測定等の調査時にはキャップを外すため、観測井内部は大気で置換される。しかし、観測井にキャップを被せて大気との接触ができない状態になると、埋立層の有機物分解由来のメタンや二酸化炭素が次第に観測井内に入り込み、次第に大気と置換して、酸素の分圧を低下させる。第 5 区画については、二酸化炭素濃度が低いいため、明確な関連性は確認できなかったが、メタンと酸素の間には他区画と同様な関係があっ



第3区画

図3 第3区画観測井戸内の滞留水水温の変化

た。これらのことから、第 1 区画から第 4 区画では好気性分解と嫌気性分解由来のガスが、第 5 区画では嫌気性分解由来のガスが観測井内に滞留しやすいことが示唆された。

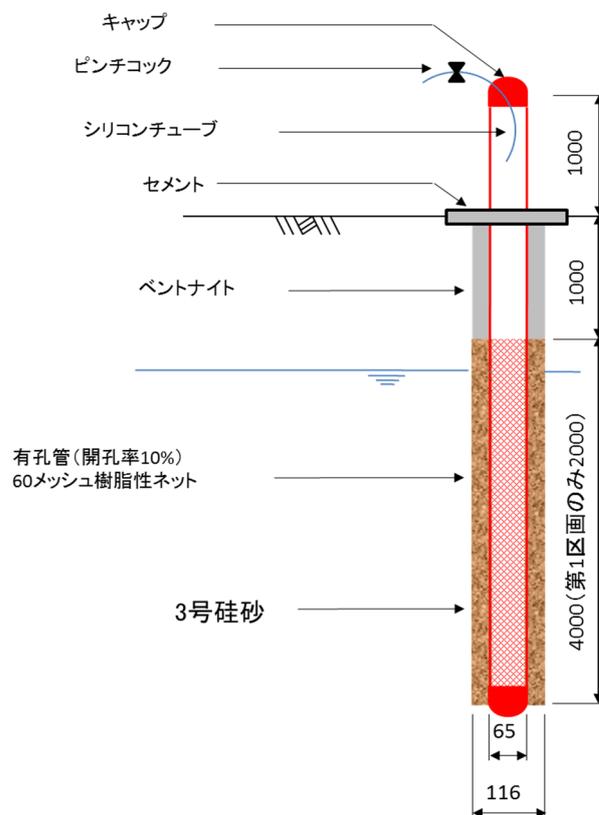


図2 観測井の構造

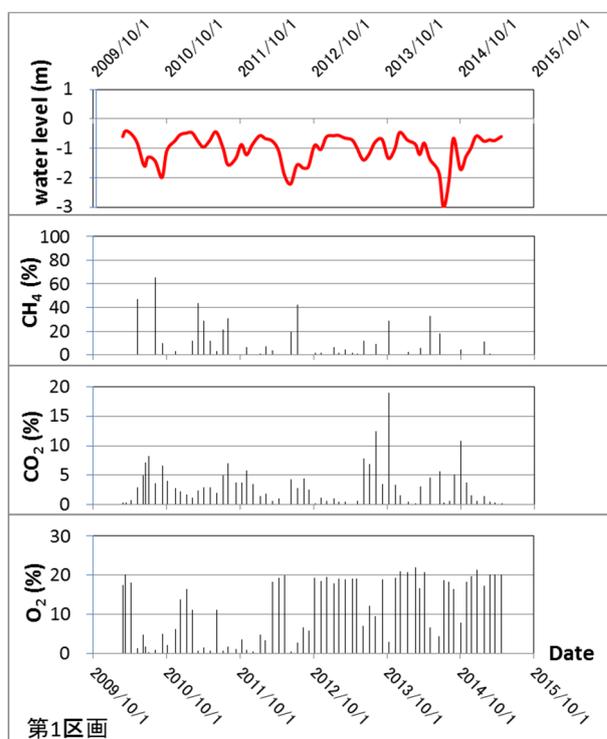


図4 第1区画の保有水水位と観測井滞留ガス濃度

3. 3 保有水水位とメタン濃度の関係

保有水水位が低いときに、メタン濃度が高くなる傾向がみられた(図4~8)。特に、第4区画の2013年3月から10月の期間と第5区画の2013年4月から10月の期間においては、一時的に集排水設備の排水量を増やして保有水水位を通常の運用範囲よりも低下させた。その期間のメタン濃度が顕著に高値を示していることが分かる。

第4区画について、メタンが検出された調査日のみを抽出し、保有水水位とメタン濃度の関係を図9に示した。また、直線近似して得られる決定係数を併せて記した。保有水の水位が低下すると、メタン濃度が上昇する関係がみられる。

湿原における調査事例において、地下水水面下の気相率は10%程度であり、気泡中には高濃度のメタンを含有し、大

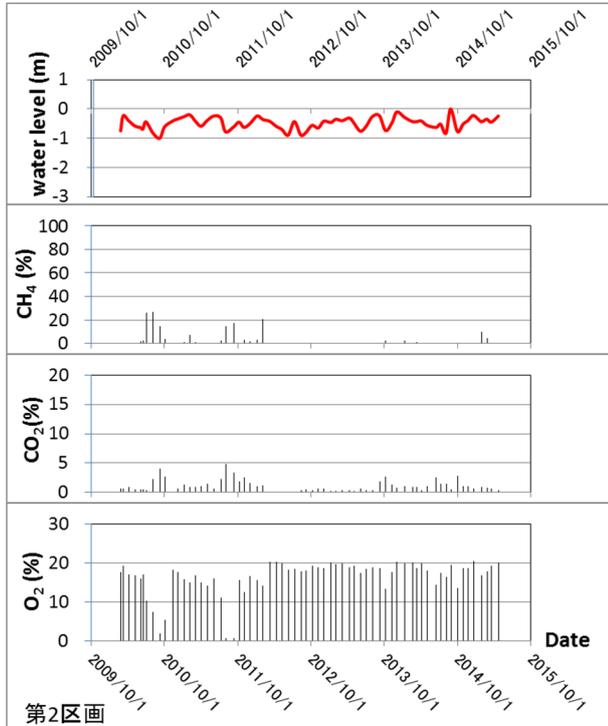


図5 第2区画の保有水水位と観測井滞留ガス濃度

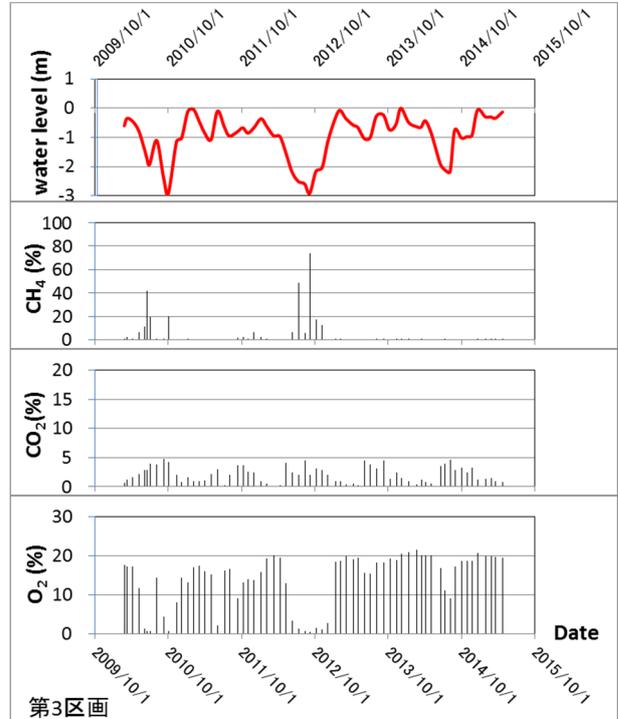


図6 第3区画の保有水水位と観測井滞留ガス濃度

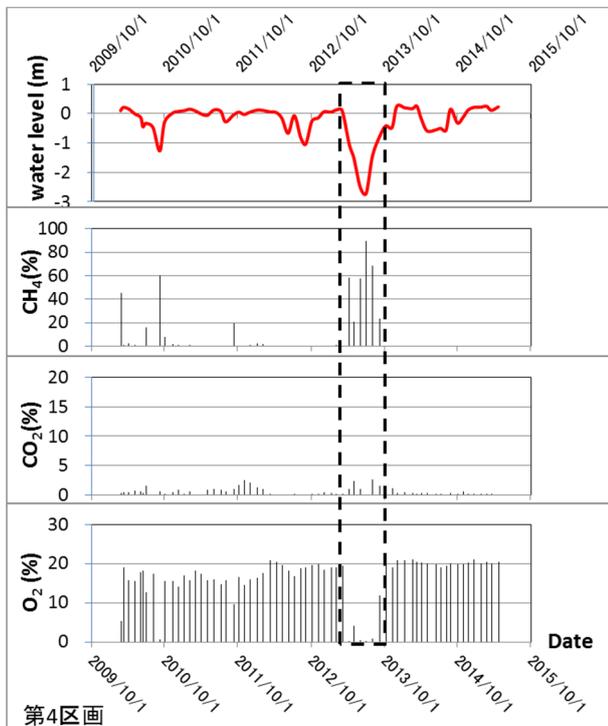


図7 第4区画の保有水水位と観測井滞留ガス濃度

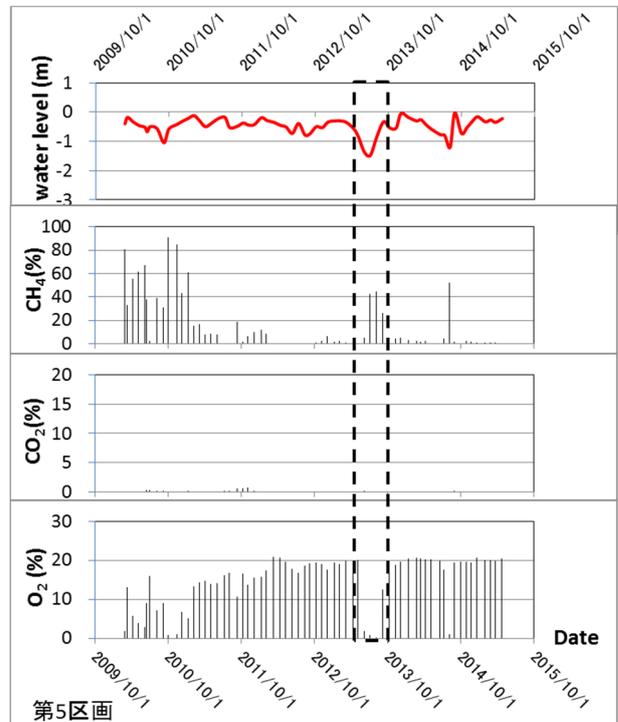


図8 第5区画の保有水水位と観測井滞留ガス濃度

気圧低下により気泡が大気中へ放出されることが報告されている³⁾。湿原内の地層と同様に管理型最終処分場埋立層内にも多量の有機物が存在する。そのため、有機物分解で生じたガスの一部が気泡状で埋立物の間隙等に留まり、保有水水位が低下した際に留まっているガスが大気中に放出されるメカニズムが考えられた。このように考えると、メタンは保有水の長期的な水位低下に伴って排出されるため、地表面のガスフラックス調査での検知が難しい⁴⁾。しかし、本調査で用いた観測方法では、放出ガスが観測井戸内に貯留されて高濃度になるため、検知することが可能である。

3. 4 水温と二酸化炭素の関係

図4～7において、メタン濃度が低く、二酸化炭素濃度が高い調査日が複数みられる。また、第3区画における2011年以降の二酸化炭素濃度は、春から夏にかけて上昇し、秋から冬にかけて低下する変動パターンがみられた(図6)。

第3区画における観測井滞留水の水温と二酸化炭素濃度の関係を図10に示した。また、直線近似して得られる決定係数を併せて記した。水温上昇に伴い、二酸化炭素濃度が上昇する傾向がみられる。一方、同様な検討をメタンについても実施したが、相関は確認されなかった。

二酸化炭素はメタンに比べて水への溶解度が高く、保有水中に溶解しやすい特性がある。そのため、水温上昇に伴い溶解度が低下すると、保有水中に溶存可能な二酸化炭素量は減少し、気相中に放出される量が増加する。このように、メタンとは異なり、二酸化炭素には保有水の溶解度の変化に伴う大気放出メカニズムが存在する。

3. 5 経過期間が滞留ガス濃度に及ぼす影響

図4～8において埋立区画別に比較すると、メタンが第5区画に次いで第1区画で頻繁に検出されている。この原因は、保有水水位変動が激しいためである。また、二酸化炭素については、第5区画ではほとんど検出されず、経過期間の長い、古い区画において、検出頻度と濃度が高い傾向がみられる。これは、埋立層内部の雰囲気気嫌性が好気性から好気性に次第に移行することにより、有機物の好気性分解由来の二酸化炭素量が増加するためと考えられる。ただし、第3区画に比べて第2区画の二酸化炭素濃度が低い理由は、第2区画の保有水水位変動が他区画に比べて特小さいためと推察された。

以上の結果から、観測井内滞留ガス濃度は埋立地の安定化状態を反映している。しかし、観測井内の滞留ガス濃度は保有水水位変動や水温の影響を受けるため、有機物分解の活性度や、大気への放出ガス組成を直接的に反映していない。筆者らと共同研究している国立環境研究所の調査結果によれば、地表面ガスフラックスが大きいのは第5区画の一部のみであり、全体的にはメタンフラックス比は小さく、好気性分解が優占して進行していることを確認している⁴⁾。第1区画から第4区画の観測井で検出されたメタンは、酸素が供給されにくい埋立層内で進行する嫌気性分解由来と推察されるが、実際の埋立層では最終覆土等でのメタン酸化反応により二酸化炭素に酸化される⁴⁾。しかしながら、埋立層内の安定化が最も進行している第1区画においてもメタンが発生していることは事実であり、このような情報は埋立地の安全性を確保するために重要な情報である。

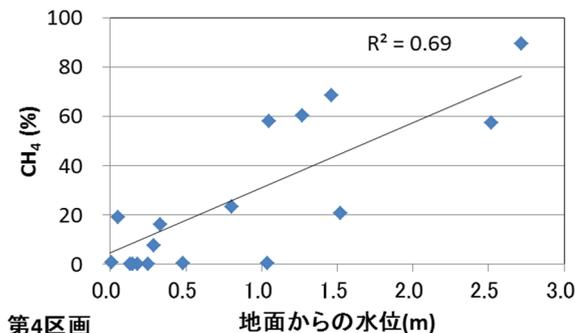


図9 第4区画観測井滞留水位とメタン濃度

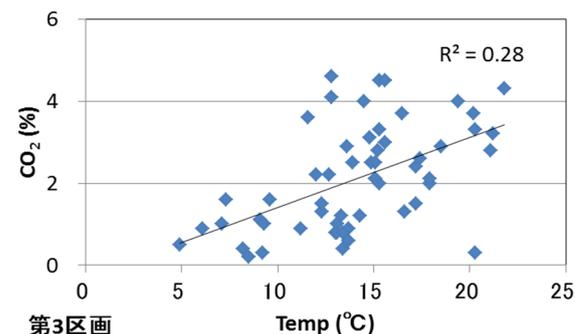


図10 第3区画観測井滞留水温と二酸化炭素濃度

4. まとめ

管理型最終処分場埋立地に設置した観測井内部に滞留するメタンと二酸化炭素濃度は、保有水水位低下時に高値を示した。その原因として、保有水に浸漬した埋立層内では有機物分解で発生したガスが気泡状で存在し、水位低下時に大気中に放出されるメカニズムが示唆された。また、二酸化炭素については保有水水温が高いと濃度が上昇する傾向がみられ、溶解度低下による放出メカニズムの存在が示唆された。

観測井内滞留ガスの種類や検出頻度は安定化による有機物の好気・嫌気性分解を反映するが、保有水水位変動や水温の影響を強く受ける。そのため、今回検討した方法は廃止基準のガス発生量評価に十分とはいえない。しかしながら、本手法は簡便であり、多くのデータを蓄積することにより安定化状態の概要を把握することが可能である。さらに微量の発生ガスを現場で検知できるため、処分場の安全性を確保するための手法として有効であると考えられる。

謝辞

本研究は、特別電源所在県科学技術振興事業「跡地利用された最終処分場における安定化に関する研究」の一環として実施した。調査に御協力いただきました関係者の方々に深謝します。

参考文献

1) 吉田英樹：準好気性廃棄物最終処分場に設置されたガス

抜き管内の温度・埋立ガス成分調査, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会講演集,409~410(2015)

2) 柳瀬龍二,平田修,松藤康司,小山田謙二,石田眞滋: 浸出水の水温と水質を用いた埋立地の安定化の判定手法に関する研究, 廃棄物資源循環学会論文誌,**22(5)**,298~305(2011)

3)常田岳志,宮崎毅,溝口勝: 泥炭地湿原におけるメタンバブルの存在,挙動とその役割,農業土木学会誌,**74(7)**,595~598(2006)

4)佐藤昌宏,山田正人,石垣智基,遠藤和人,田中宏和: 埋立地における地中ガスのメタン比および地表面ガスフラックスの経年変化,廃棄物資源循環学会 平成26年春の研究発表会,P035(2014)

<http://jsmcwm.or.jp/wp-content/uploads/2013/02/P023-P044.pdf> (平成28年4月26日 閲覧)