

LC/MS/MS 法による農産物中残留農薬一斉分析法の妥当性評価

金行 良隆 佐々木 珠生 恋田 和憲* 光野 幸一

農産物の代表的作物の一つであるほうれんそうについて、LC/MS/MS 法による残留農薬一斉分析法の妥当性評価を行った。「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」に基づき、当所で検査している LC/MS/MS 項目 64 農薬について、添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.1 $\mu\text{g/g}$ の 2 濃度により妥当性評価を行ったところ、60 農薬について検査可能であった。

キーワード：LC/MS/MS, 残留農薬, 妥当性評価

はじめに

当所では農畜水産物中の残留農薬や動物用医薬品等の試験を行っており、分析法の改良や精度管理に取り組んでいる¹⁾⁻³⁾ところであるが、平成 22 年に出された厚生労働省通知⁴⁾により、これらの試験方法について、妥当性評価を行う必要が生じた。これを受けて平成 25 年 12 月 13 日以降は、妥当性評価が完了していない試験方法による結果を正式な結果とすることは問題が生じる可能性があるため、当所でも対応しているところである。

このたび、ほうれんそうについて残留農薬 (LC/MS/MS 項目) の妥当性評価を行ったので報告する。

方 法

1 妥当性評価対象試料

「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」⁵⁾ (以下「ガイドライン」と称する。)により、代表的な農作物の一つとしてほうれんそうを妥当性評価対象試料とした。

添加回収試験に際しては、後述の混合標準液ならびにこれを 10 倍希釈したものを試料に添加し、30 分静置後、試験に供した。

2 試薬

標準原液は、林純薬工業株式会社製 PL2005 農薬 LC/MS Mix の I および 4~7 ならびに Dr. Ehrenstorfer 社製キザロホップ-p-テフリル標準原液 (10ng/ μl) を使用した。上記以外の対象項目の標準品は、林純薬工業株式会社製および関東化学株式会社製を用いた。これらの標準品をアセトニトリルに溶解させて標準原液を調製した。

これらの標準原液を混合し、各成分 2 $\mu\text{g/ml}$ の混合標準液を調製した。

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-ブロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは、SUPELCO 社製 ENVI™-Carb II /PSA (500/500mg, 6ml) の上部に無水硫酸マグネシウムを積層し、さらにその上に無水硫酸ナトリウムを積層したフリット付きリザーバーを連結し、あらかじめアセトニトリル-トルエン (3:1) 混液 10ml でコンディショニングして使用した。

アセトニトリル, トルエン, アセトン, 塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を使用した。メタノールは LC/MS 用を, 無水硫酸マグネシウムは特級を使用した。

3 装置

高速液体クロマトグラフ装置は、株式会社島津製作所製 Prominence を使用した。また、質量分析装置は、株式会社エービー・サイエックス製 API-4000 を使用した。

4 測定条件

1 検体の測定につき、それぞれグラジエント条件の異なるポジティブモード測定 2 回とネガティブモード測定 1 回の計 3 回の測定を行った。

(1) HPLC 条件

カラム：Ascentis Express C18 (10cm $\times$ 2.1mm, 2.7 μm , SUPELCO 社製)

ガードカラム：Ascentis Express C18 (0.5cm $\times$ 2.1mm, 2.7 μm , SUPELCO 社製)

移動相 A 液：5mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル-ミリ Q 水 (5:95)

移動相 B 液：5mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル-ミリ Q 水 (95:5)

流速：0.2ml/min

*：退職

カラム温度：40℃

注入量：5μl

グラジエント条件(ポジティブモード測定 1)：

時間(分)	0	1	3.5	6	8	17.5	35	36
A 液(%)	90	60	60	50	45	5	5	90
B 液(%)	10	40	40	50	55	95	95	10

グラジエント条件(ポジティブモード測定 2)：

時間(分)	0	15	20	22	30	32
A 液(%)	80	50	20	5	5	80
B 液(%)	20	50	80	95	95	20

グラジエント条件(ネガティブモード測定)：

時間(分)	0	1	3.5	6	8	17.5	32	33
A 液(%)	90	60	60	50	45	5	5	90
B 液(%)	10	40	40	50	55	95	95	10

(2) MS/MS 条件

スキャンタイプ：MRM

イオン化法：ESI

測定ごとの条件：

	ポジ 1	ポジ 2	ネガ
Period	1	2	1
Curtain Gas	20	20	40
Ion Source Gas1	80	80	80
Ion Source Gas2	30	60	30
Ion Spray Voltage	4000	4500	5500
Temperature	400	500	400
Collision Gas	4	6	4
Entrance Potential	10	10	10
Resolution Q1	Unit	Low	Unit
Resolution Q3	Unit	Low	Unit
Dwell Time (msec)	10	250	15

上記のポジティブモード測定 1 では、ピリオドを 2 つに分けて測定している。表 1(次頁)に対象農薬ごとの測定条件を示す。ボスカリド、トリデモルフ、トラルコキシジムについては、2 つピークが得られるため、番号を付けて区別している。

5 試験溶液の調製

試料 10g にアセトニトリル 20ml を加えて混合後、塩化ナトリウム 1g および無水硫酸マグネシウム 4g を加えて 10 分間振とうした。2800rpm で 5 分間遠心分離後、上層 8ml を ENVI™-Carb II/PSA カラムに負荷し、アセトニトリル-トルエン (3:1) 混液 30ml で溶出した。溶出液を 40℃で 1ml 以下に減圧濃縮後、アセトン 10ml を加えて 40℃で減圧乾固し、残留物をアセトン 2ml に溶解した。この液の 0.5ml を分取し、窒素ガスを吹き付けることにより乾固した後、残留物をメタノール 1ml

に溶解したもの(ただし 0.1μg/g の添加回収試験試料については測定値を検量線の範囲内に収めるためメタノール 2ml に溶解したものを)を試験溶液とした。図 1 に分析方法のフローチャートを示す。

試料 10g

↓←アセトニトリル 20ml

混合

↓←塩化ナトリウム 1g

↓←無水硫酸マグネシウム 4g

10 分間振とう後、遠心分離(2800rpm, 5 分間)

↓

上層 8ml を分取して

ENVI™-Carb II/PSA カラムに負荷

↓

アセトニトリル-トルエン(3:1)混液 30ml で溶出

↓

溶出液

↓

1ml 以下に減圧濃縮(40℃)

↓←アセトン 10ml

減圧乾固(40℃)

↓

残留物をアセトン 2ml に溶解

↓

溶解液

↓

0.5ml 分取後、窒素ガスを吹き付けて乾固

↓

残留物をメタノールに溶解

↓

試験溶液

↓

LC/MS/MS により測定

図 1 分析方法のフローチャート

6 検量線の作成

混合標準液をメタノールで希釈して 0.005～0.07μg/ml の検量線用標準液を調製した。それぞれ LC/MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。

7 枝分かれ試験

枝分かれ試験は、実施者 1 名が、同一の添加試料を 1 日 2 回(2 併行)、5 日間実施する実験計画で行った。

表 1 MS/MS 条件

農薬名	保持時間 (分)	Period Q1 (m/z)	定量条件				定性条件			
			Q3 (m/z)	DP	CE	CXP	Q3 (m/z)	DP	CE	CXP
チアメトキサム	4.4	292	211	61	17	14	181	61	29	10
イミダクロプリト	4.8	256	209	56	27	14	175	56	31	18
クロチアニシン	4.9	250	169	51	19	16	132	51	21	8
クロリダゾン	5.4	222	92	86	37	16	65	86	57	0
オキシカルボキシ	5.7	268	175	61	21	12	147	61	35	10
チアクロプリト	5.8	253	126	66	29	8	73	66	83	6
チアベンダゾール	7.2	202	175	71	37	12	131	71	47	10
アサメチホス	8.4	325	183	51	23	12	112	51	55	10
シメチリモール	10.9	210	71	66	51	4	140	66	31	12
フラメトピル	11.4	334	157	71	47	10	290	71	27	14
イソキサフルトール	12.0	360	251	46	23	18	360	46	5	26
フェンメテイファム	12.9	301	168	71	13	12	136	71	31	10
アジンホスメチル	12.7	318	160	56	13	10	132	56	22	8
ヒリフタリト	13.0	319	139	81	41	10	93	81	75	8
フェリムゾン	14.0	255	132	71	31	10	91	71	47	6
クロマフェノシト	15.3	395	175	51	23	12	339	51	11	12
イプロバリカルブ	15.3	321	119	56	29	8	203	56	13	16
クミロン	14.9	303	185	56	19	14	125	56	51	8
ブタフェナシル	15.5	492	331	51	33	24	180	51	61	12
シメコザール	15.5	294	70	71	49	6	73	71	49	12
シアゾファミト	15.6	325	108	46	19	8	261	46	15	18
フェノキシカルブ	16.2	302	116	56	17	8	88	56	31	6
アエロホス	16.7	368	199	76	21	14	125	76	47	10
シフルフェナミト	17.4	413	295	76	23	20	241	76	35	18
ヒラゾリネート	17.5	439	173	76	27	14	91	76	61	6
イントキサカルブ	17.9	528	203	71	55	14	150	71	35	10
ベンゾフェナッフ	18.3	431	105	101	45	10	119	101	31	10
キサロホッフ-p-テフリル	18.4	429	299	86	29	20	85	86	29	14
フラチオカルブ	18.7	383	195	66	29	16	252	66	19	10
ラクトフェン	18.8	479	344	51	21	26	223	51	49	16
クロメクロッフ	18.7	324	203	71	23	16	120	71	31	8
オキサシクロメホン	18.6	376	190	56	25	12	161	56	39	12
キサロホッフエチル	18.6	373	299	71	27	22	271	71	37	18
ペントキサゾン	18.6	354	286	66	17	20	186	66	39	12
クロキントセツトメキシル	19.0	336	238	61	25	16	192	61	41	14
ホスカリト1	14.1	343	307	76	27	22	140	76	31	10
トリテモルフ1	23.5	298	130	116	35	14	98	116	41	6
トリテモルフ2	24.8	343	307	116	27	22	140	116	31	10
オキサミル	2.6	237	72	41	29	12	90	41	13	8
メソミル	3.1	163	88	41	13	8	106	41	15	8
アセタミプリト	6.8	223	126	66	29	12	90	66	47	16
アルシカルブ	10.0	208	116	31	11	8	89	31	23	8
MTMC	24.2	166	109	51	17	10	94	51	43	18
PHC	13.9	210	111	51	25	8	168	51	13	14
アミノカルブ	14.1	209	152	46	21	16	137	46	35	12
ベンタイオカルブ	14.1	224	167	56	15	14	109	56	25	8
カルボフラン	14.2	222	165	56	19	16	123	56	33	12
カルバリル	15.6	219	145	31	19	10	127	31	51	10
MPMC	15.7	180	123	51	17	10	108	51	37	8
XMC	16.4	180	123	51	15	10	108	51	37	8
エチオフェンカルブ	16.5	226	107	51	25	8	164	51	13	12
チオシカルブ	17.6	355	88	66	29	8	108	66	23	6
イソフロカルブ	18.2	194	95	61	25	6	137	61	15	10
フェノフルカルブ	20.8	208	95	61	23	8	152	61	13	14
メチオカルブ	21.1	226	169	56	13	16	121	56	25	10
ホスカリト2	21.6	343	307	76	27	22	140	76	31	10
トリフルミゾール	22.5	346	278	41	17	20	73	41	27	6
フェンヒロキシメートZ	24.9	422	366	76	21	10	214	76	43	14
フルフェノクスロン	25.2	489	158	91	29	16	141	91	73	10
フェンヒロキシメートE	25.6	422	366	106	21	28	138	106	45	8
ヘキシチアゾクス	25.1	354	229	36	25	16	229	36	21	16
メパニヒリム	22.2	224	77	71	63	6	106	71	39	8
ヒリミカルブ	17.1	239	72	51	35	6	182	51	23	14
トラルコキシジム1	10.8	328	254	-65	-32	-23	66	-65	-106	-7
トラルコキシジム2	14.2	328	254	-65	-32	-23	66	-65	-106	-7
メトキシフェノシト	14.7	367	149	-80	-30	-3	105	-80	-46	-17
オリサリン	15.6	345	281	-75	-26	-11	78	-75	-56	-11
ナフロアニト	16.0	290	143	-70	-44	-9	93	-70	-34	-1

表 2 真度(回収率)および精度の結果

農薬名	添加濃度0.01 μ g/g			添加濃度0.1 μ g/g		
	回収率(%)	併行精度(%)	室内精度(%)	回収率(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
チアメトキサム	73.1	4.3	9.8	79.2	2.5	2.5
イミダクロフリト	91.1	2.5	5.3	93.7	1.8	3.1
クロチアニシン	86.0	4.9	10.6	92.4	1.5	1.5
クロリタゾン	91.3	9.9	10.0	91.5	2.7	3.4
オキシカルボキシ	77.7	6.9	10.5	79.4	2.8	5.4
チアクロフリト	90.6	7.7	11.8	92.4	3.9	6.7
チアベンタゾール	82.0	5.7	6.3	81.2	4.1	6.5
アサメチホス	85.3	6.7	10.7	80.7	3.3	6.4
シメチリモール	91.4	7.1	7.7	91.9	1.9	3.3
フラメトピル	102.8	4.5	6.4	95.7	2.5	4.0
イソキサフルトール	89.2	3.7	5.4	82.7	3.2	4.6
フェンメテュファム	97.7	4.1	5.2	93.7	2.2	2.9
アシンホスメチル	95.4	12.3	12.3	100.8	4.2	7.3
ヒリフタリト	97.8	5.4	9.3	95.3	3.0	3.0
フェリムゾン	95.9	7.0	7.0	93.4	2.0	4.0
クロマフェノシト	103.3	3.7	7.6	96.8	2.3	3.5
イプロバリカルブ	100.1	3.8	4.4	96.3	1.3	3.4
クミルロン	99.0	4.6	5.0	96.1	3.0	4.0
ブタフェナシル	100.2	4.9	8.4	97.0	2.2	2.4
シメコナゾール	98.7	4.8	9.0	97.3	2.5	2.7
シアゾファミト	96.4	1.3	3.2	93.5	2.5	5.8
フェノキシカルブ	102.6	3.9	5.3	96.1	2.8	3.8
アエロホス	98.1	2.6	3.4	95.1	1.9	1.9
シフルフェナミト	98.5	2.1	5.0	94.4	1.1	3.7
ヒラゾリネート	74.2	10.8	14.0	70.7	10.6	10.6
イントキサカルブ	91.2	3.0	11.4	90.8	5.3	5.3
ヘンゾフェナップ	97.9	4.1	7.5	92.4	1.0	2.3
キサロホップ-p-テフリル	96.6	5.4	6.5	90.3	3.1	3.3
フラチオカルブ	74.7	3.1	10.9	73.9	1.5	12.1
ラクトフェン	92.8	3.4	4.4	88.7	3.8	7.2
クロメクロップ	88.6	5.9	8.2	87.4	4.9	8.9
オキサシクロメホン	95.5	5.4	6.4	95.1	2.7	3.6
キサロホップエチル	95.2	2.7	4.6	92.1	3.8	5.6
ヘントキサゾン	91.1	5.0	8.0	92.4	5.6	12.0
クロキントセツトメキシ	97.6	4.5	4.6	92.6	1.5	2.5
ホスカリト1	99.9	5.3	5.3	95.3	1.5	4.4
トリテモルフ1	100.1	9.3	9.3	94.1	7.2	7.4
トリテモルフ2	115.3	16.8	18.6	101.6	6.2	8.3
オキサミル	83.0	2.6	3.2	88.2	1.8	2.9
メソミル	156.8	3.3	8.0	147.3	2.2	8.8
アセタミフリト	94.1	4.5	5.1	94.7	1.9	3.8
アルシカルブ	92.3	3.8	8.7	90.1	2.0	4.2
MTMC	92.3	8.7	8.7	90.1	2.1	12.2
PHC	96.8	3.2	5.8	93.1	1.9	3.8
アミノカルブ	91.9	3.7	5.6	90.5	3.1	3.1
ベンタイオカルブ	95.0	3.4	5.2	93.7	1.4	3.0
カルボフラン	118.1	5.5	10.1	112.8	2.4	7.0
カルバリル	95.0	4.3	4.5	93.8	1.8	3.9
MPMC	97.5	3.1	4.2	92.9	1.9	3.4
XMC	98.0	4.7	6.5	92.0	1.6	2.5
エチオフェンカルブ	91.2	5.7	6.9	89.0	4.1	4.2
チオシカルブ	4.1	121.2	144.5	13.4	18.4	95.5
イソプロカルブ	96.7	3.9	4.8	91.9	2.1	4.6
フェノブカルブ	95.1	3.2	4.8	92.8	1.3	3.2
メチオカルブ	92.6	4.5	6.5	93.6	1.7	3.7
ホスカリト2	94.3	7.6	7.6	93.5	3.2	3.4
トリフルミゾール	81.2	3.1	6.2	89.1	3.9	3.9
フェンヒロキシメートZ	68.6	4.4	6.1	79.5	9.5	9.5
フルフェノクスロン	88.1	4.4	21.9	71.0	9.6	15.5
フェンヒロキシメートE	64.3	8.3	8.3	71.3	10.4	11.0
ヘキシチアゾクス	55.9	7.3	8.5	62.0	19.9	19.9
メハニヒリム	90.5	15.4	16.3	95.7	4.6	4.7
ヒリミカルブ	98.4	4.9	4.9	96.3	3.2	3.9
トラルコキシジム1	41.6	5.2	36.8	43.6	11.3	37.7
トラルコキシジム2	61.4	6.6	14.1	67.0	6.5	11.8
メトキシフェノシト	91.6	3.3	5.6	93.6	1.5	3.0
オリザリン	90.5	5.6	7.8	93.1	3.0	3.7
ナプロエニト	96.7	5.4	5.4	95.0	2.0	4.0
メソミル・チオシカルブの平均	80.4	3.0	5.1	80.3	2.0	2.2

結 果 と 考 察

1 選択性

ほうれんそうのブランク試料について分析を行い、定量を妨害するピークの有無を確認したところ、一律基準値 0.01 $\mu\text{g/g}$ に相当する濃度の標準液 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) から得られるピーク面積の 1/3 を超える妨害ピークは見られなかった。

2 真度 (回収率)

ガイドラインにおける真度 (回収率) の目標値は、平均で 70 ~ 120 % である。ブランク試料に 0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.1 $\mu\text{g/g}$ となるように混合標準液を添加し、それぞれの延べ 10 回の試験の平均回収率を求めた。表 2 (前頁) にその結果を示す。

メソミル、チオジカルブ、ヘキシチアゾクス、トラルコキシジムの 4 農薬は、0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.1 $\mu\text{g/g}$ の両方において、目標値 (70 ~ 120%) を満足できなかった。また、フェンピロキシメート Z、フェンピロキシメート E の 2 農薬は、0.1 $\mu\text{g/g}$ においては目標値を満足したものの、0.01 $\mu\text{g/g}$ において目標値を満足できなかった。

この中で、チオジカルブはメソミルに代謝されることから、チオジカルブとメソミルについて、その平均について評価したところ、目標値を満足した。

3 精度

ガイドラインにおける併行精度および室内精度の目標値は、添加濃度 0.1 $\mu\text{g/g}$ の場合が併行精度 15% 未満および室内精度 20% 未満であり、添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ の場合が併行精度 25% 未満および室内精度 30% 未満である。表計算ソフトにより、一元配置分散分析による解析を行い、併行精度および室内精度を算出した。表 2 (前頁) にその結果を示す。

チオジカルブ、ヘキシチアゾクス、トラルコキシジムの 3 農薬は、添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.1 $\mu\text{g/g}$ の一方以上において、目標値のいずれかより大きいばらつきが見られた。

チオジカルブについては、真度 (回収率) の評価

時と同様にメソミルとの平均について評価したところ、目標値を満たした。

4 定量限界

一律基準値 0.01 $\mu\text{g/g}$ に相当する濃度の標準液 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を測定し、感度を確認したところ、得られたピークの S/N 比はガイドラインで示されている 10 以上を満足した。

ま と め

ほうれんそうについて、当所で検査を行っている LC/MS/MS 項目 64 農薬の妥当性評価を行ったところ、60 農薬が検査可能であるという知見が得られた。

なお、フェンピロキシメート Z およびフェンピロキシメート E の 2 農薬については、添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ において真度の目標値を満足していないが、ほうれんそうおよびそれに類した野菜の中に基準値が 0.1 $\mu\text{g/g}$ 未満のものがいないため、添加濃度 0.1 $\mu\text{g/g}$ における目標値を満たしたことをもって検査可能とした。

今後はキャベツ、オレング、りんごについて同様の妥当性評価を行う予定である。

文 献

- 1) 生活科学部：LC/MS/MS による農作物中の残留農薬の一斉分析法の検討，広島市衛生研究所年報，26，67-72，(2007)
- 2) 生活科学部：GC/MS/MS による農作物中の残留農薬の一斉分析法の検討，広島市衛生研究所年報，27，51-55，(2008)
- 3) 生活科学部：LC/MS/MS による農作物中の残留農薬の一斉分析法の検討 (その 2)，広島市衛生研究所年報，28，54-61，(2009)
- 4) 厚生労働省通知，食安発 1224 第 1 号，平成 22 年 12 月 24 日
- 5) 厚生労働省通知，食安発 1115001 号，平成 19 年 11 月 15 日