

3)液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた食品中の残留農薬迅速分析法の検討 (第2報)

福島 孝兵 増永 ミキ 宮原 喜子 飛野 敏明

要 旨

前報¹⁾で、はくさい試料において、35%含水アセトニトリルで抽出し、試料 1g 当たり 5 倍に希釈し、試験溶液とすることで 203 農薬成分中 197 農薬成分について 70~120%の良好な回収率が得られたことを報告した。測定対象農薬成分を 332 農薬成分に増加させるとともに、試料によっては夾雑物 (以下、マトリックスと記す)の影響で測定が困難なものがあつたため、マトリックス効果の検証及び希釈倍率の検討を行った。また、平成 19 年 11 月 15 日に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²⁾(以下、ガイドラインと記す)が厚生労働省から示された。これに準拠する方法で、当所の試験法の妥当性評価(以下、バリデーションと記す)を行った。

キーワード : LC/MS/MS, マトリックス, バリデーション

はじめに

近年、食の安全への関心が高まり、熊本県では平成 17 年 4 月から「熊本県食の安全安心条例」が施行され、平成 18 年 6 月から農産物等の生産段階における出荷前検査を開始した。検査結果が判明するまで出荷を止めるため、迅速な検査が要求される。そのような背景から、抽出法は 35%含水アセトニトリルで抽出し、希釈するのみで試験溶液とする希釈法を採用したが、5 倍希釈相当では農作物の種類によっては、測定困難なものもあつた。そこで、今回マトリックス効果の検証及び希釈倍率の検討を行った。

また、平成 18 年 5 月 29 日にポジティブリスト制度が施行され、一斉分析あるいは確認用として、LC/MS(MS)の導入が必要不可欠となっている。すでに、様々な LC/MS(MS)による農薬等の多成分一斉分析法が報告されている³⁾⁻⁶⁾が、当所のような単に希釈のみで測定する方法の報告はない。農薬等の試験法については、各試験機関それぞれが創意工夫し、多種多様であるため、試験室間バリデーションは難しく、単一試験室によるバリデーションガイドラインが通知されることとなった。今回、それに準拠する方法でバリデーションを行ったので、併せて報告する。

実験方法

1 試薬

標準品 : 表 3 に示す農薬(和光(株)製、関東化学(株)製、林純薬(株)Dr.Ehrerenstorfer 社製、Riedel-deHaen 社製)

混合標準 : 各標準を秤量し、メタノール、アセトンに溶解し、1000mg/ あるいは 100mg/ を調製した。これらを混合し、メタノールで 500 μ g/ になるよう調整した。検量線用は、適宜 35%含水アセトニトリルで希釈した。

その他の試薬:残留農薬試験用、HPLC 用、特級を用いた。

2 装置及び分析条件

1)高速液体クロマトグラフ(以下、HPLC と記す)

HPLC 装置:Waters 社製 Waters2795

分析カラム:Waters 社製 Symmetry shield(4.6 \times 100, 3.5 μ m), 注入量:20 μ , カラム温度:40 , 移動相:A 液(水), B 液(メタノール), C 液(500mM 酢酸アンモニウム), D 液(0.5%ギ酸), グラジエント条件を表 1 に示す。

表1. グラジエント条件(左:メソッド1, 右:メソッド2)

time	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)	D液 (%)	流速 (ml/min)	time	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)	D液 (%)	流速 (ml/min)
0	92	0	0	8	0.2	0	98	0	1	1	0.2
1	92	0	0	8	0.2	1	98	0	1	1	0.2
1.01	31	60	1	1	0.2	1.01	38	60	1	1	0.2
15	0	98	1	1	0.2	9	8	90	1	1	0.2
28	0	98	1	1	0.2	19	8	90	1	1	0.2
28.01	92	0	0	8	0.53	21	0	98	1	1	0.2
47	92	0	0	8	0.53	25	0	98	1	1	0.2
						25.01	98	0	1	1	0.53
						47	98	0	1	1	0.53

2) タンデム型質量分析計(以下, MS/MSと記す)

MS/MS 装置: Waters 社製 Quattro Premier
 イオン化法: ESI, 分析モード: MRM(ポジティブ・ネガティブ同時測定), Capillary: 3.45(-2.8) kV, Source Temperature: 120, Desolvation Temperature: 350, Cone Gass Flow: 50 /h, Desolvation Gass Flow: 1000 /h

3 マトリックス効果の検証及び希釈倍率の検討

1) 試料

かぼちゃ, グレープフルーツ, 日本なし

2) 試験溶液の調製

図1の希釈法分析フローに従い操作を行い, 各試料5及び10倍希釈相当抽出液を調製した。

3) マトリックス効果の検証

各試料5及び10倍希釈相当抽出液で調製した332農薬成分混合標準1, 10ng/m³及び溶媒のみで調製した混合標準1, 10ng/m³を5回ずつ測定し, 各試料各希釈液で調整した混合標準の各農薬成分面積(n5平均値)の、溶媒のみで調整した混合標準の各農薬成分面積(n5平均値)に対する比(%)を求めた。

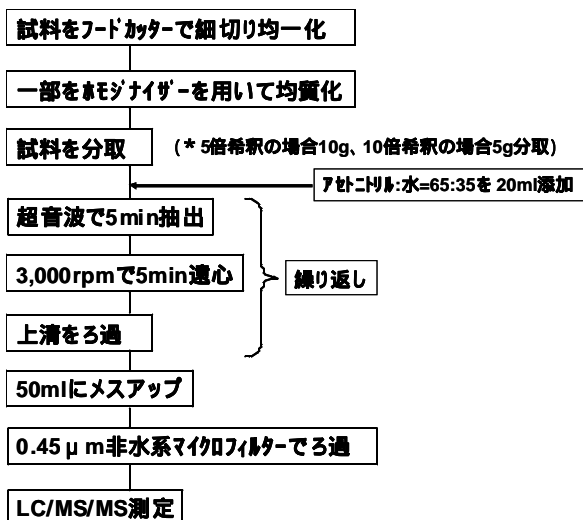


図1. 希釈法分析フロー

4 バリデーション

1) 試料

りんご, ほうれんそう

2) 添加回収試験

試料に, 332 農薬成分が 10 及び 50ng/g になるように添加し, 枝分かれ実験により室内精度を評価した。りんごについては 2 名でそれぞれ添加試料を 1 日 2 回 3 日間, ほうれんそうについては 3 名でそれぞれ添加試料を 1 日 2 回 2 日間分析した。

3) 試験溶液の調製

各試料 5g を秤量し, 332 農薬成分混合標準を添加し混合後 30 分放置した。35%含水アセトニトリル 20m を加え, 10 分間超音波抽出後, 3000rpm で 5 分間遠心分離し, ろ過した。残渣に再度 35%含水アセトニトリル 20m を加え, 同様の操作を行い, ろ液を合わせ 50m に定容し, 試験溶液とした。

5 農薬が検出された検体による定量値比較

1) 試料

トマト(検出された農薬:チアクロプリド, ノバルロンフェンピロキシメート), しょうが(検出された農薬:メソミル, エトフェンプロックス, トリフルミゾール)

2) 定量値比較

各試料を希釈法(10倍)と厚生労働省から示されている LC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)⁷⁾(以下通知法)で分析し, 定量値を比較した。

6 検量線

標準溶液を試験溶液で希釈し 0.1, 0.5, 1, 5, 25ppb の 5 点調製し, マトリックス一致標準液とした。

結果及び考察

1 マトリックス効果の検証及び希釈倍率の検討

LC/MS(MS)の分析では, マトリックスの影響により, イオン化増強や抑制が見られ, 目的物質の定量精度が低下する可能性がある³⁾。当所においては対策としてマトリックス一致標準液で検量線を作製している。通常検査を実施していく中で, 前報の希釈法(5倍)では, かぼちゃ, グレープフルーツにおいて, 多くの農薬成分の検量線で良好な相関係数を得ることができず, 測定が困難であった。この条件ではマトリックス効果を受けないと考えられる農薬成分(溶媒のみの標準面積に対するマトリックス添加標準面積の比が 90~110%のもの)数を表 2 に示す。5 倍希釈相当抽出液で 10 及び 1ng/m³ に調整したものでは, 332 農薬成分なかぼちゃで 186 及び 123 成分, グレープフルーツで 129 及び 125 成分, ほぼ問題なく測定できた日本なしで 206 及び 184 成分であった。

かぼちゃでは, マトリックス効果を受ける農薬成分が

10ng/m に比べ 1ng/m で大幅に増加した。グレープフルーツでは、約 6 割の農薬成分がマトリックス効果を受けて

表2. 溶媒のみで調整した標準の面積に対する比が 90~110%の農薬成分数(332成分中)

農産物名	希釈倍率	10 ppb	1 ppb
かぼちゃ	5 倍希釈	1 8 6	1 2 3
	10 倍希釈	2 2 7	1 8 4
グレープフルーツ	5 倍希釈	1 2 9	1 2 5
	10 倍希釈	1 6 9	1 5 1
なし	5 倍希釈	2 0 6	1 8 4
	10 倍希釈	2 2 6	2 1 0

おり、その強さもかぼちゃ、日本なしに比べ大きかった。さらに、大部分の農薬成分は 10 及び 1ng/m それぞれで受けるマトリックス効果は正・負及び強さとも同じであったが、一部アセタミプリドやジメトエート等正・負が逆転するもの(図 2)やフェンメディファム等 1ng/m でのみマトリックス効果を受けるものが見られた。

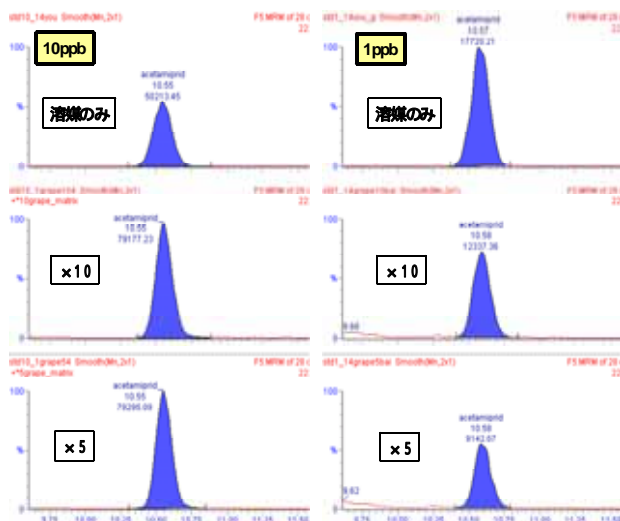


図2. 10ng/m , 1ng/m でマトリックス効果が正・負逆転する例(アセタミプリド)

これらの原因のため、マトリックス一致検量線で良好な相関係数を得ることができなかつたと考えられる。10 倍希釈相当抽出液で 10 及び 1ng/m に調整したものでは、かぼちゃについては、マトリックス効果を受けない農薬成分が約 40 及び 60 増加し、日本なしと同程度になった。さらにマトリックス効果は、5 倍希釈に比べ低減されるものが多かった。グレープフルーツについては、約 40 及び 25 増加したが、まだ影響が強い。受けるマトリックス効果の程度が 5 倍と変わらないものも多々あった。さらに希釈する必要があるが、定量下限値が上がるため、一律

基準(10ppb)の 1/2 を担保できなくなる。今の分析条件では感度的に 10 倍希釈がある程度の限界である。

これらの結果から、通常検査は希釈法(10 倍)で行うこととし、マトリックス効果が強い農産物についてのみさらに希釈することとした。

2 バリデーション

試験結果を表 3 に示す。ガイドラインにおける各濃度毎の真度(回収率)及び精度の目標値(表 4)に満たなかつた農薬成分は、共通したのものとして、もともと感度が良くない MCPAethylster やオリザリン、メタミトロン、ネガティブモードで測定する MCPB やトリクロピル、スルホニル尿素系除草剤であるフラザスルフロン、ピリミスルフロンメチル等であり、バラツキが大きかった。光・水に不安定なジアフェンチウロンは、回収率・精度共に悪かつた。ほうれんそうにおいては、極性の低いア

表4. ガイドラインにおける各濃度毎の真度(回収率)及び精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤0.001	5	70~120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤0.01	5	70~120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤0.1	5	70~120	15 >	20 >
0.1 <	5	70~120	10 >	15 >

セキノシル、キノメチオネート、ピオレスメトリンの回収率が良い時と低い時があり、室内精度が大きくなる結果となった。併行精度は良好であり、その原因を推定することができなかつた。ネガティブモードで測定するアイオキシニルやアシベンゾラル酸、シクラリド等は、回収率が高い時があつた。ネガティブモードは、バックグラウンドが少なく SN 比は良いが、レスポンス自体は小さいため、マトリックスの影響をより受けてしまうことが考えられる。また、チオジカルブは一部の作物中で酸化分解等され⁸⁾、ほうれんそうではチオジカルブの分解物であるメソミルが加算され回収率が高くなることが報告されている⁴⁾。報告と同様の結果となった。

目標値を満たす農薬成分数は、全 332 農薬成分中、りんごでは 10ng/g 濃度で 298、50ng/g 濃度で 312、ほうれんそうでは 10ng/g 濃度で 277、50ng/g 濃度で 297 であつた。まだ、2 種類の農作物による評価だが、良好な結果が得られた。

本試験法は、迅速かつ簡便で、一定の精度を有するものであると考えられる。また、抽出された農薬成分は精製や濃縮操作等で損失することがなく、より多成分の農薬使用実態を把握するうえでも、本法は非常に有用な食

品中の残留農薬多成分一斉迅速分析法である。

ただし、スクリーニング試験法としての位置付けであり、基準値の1/2を超える場合は、厚生労働省から示された試験法⁷⁾で再試験を行うこととしている。

3 農薬が検出された検体による定量値比較

実際に農薬が検出された試料における通知法と希釈法(10倍)による定量値を比較した(表5)結果、トマトのチアクロプリドで通知法に比べ、希釈法の定量値が約3割低かったが、他の5農薬は希釈法の回収率が高い分弱冠高いが、ほぼ一致したと言える。また、RSDも非常に良好であった。

表5. 農薬が検出された試料における通知法と希釈法(10倍)による定量値比較

農産物名	農薬名	通知法			希釈法(x10)		
		平均(ppb)	RSD(%)	回収率(%)	平均(ppb)	RSD(%)	回収率(%)
トマト	チアクロプリド	10.1	2.1	88.8	6.7	3.7	100.2
	ノバルロン	9.7	5.1	86.0	11.4	4.4	97.0
	フェンピロキシメト	21.6	5.1	88.4	25.2	10.2	97.2
しょうが	メソミル	101.0	1.2	84.8	115.5	1.8	96.4
	エトフェンプロックス	80.4	1.1	95.8	85.8	2.9	95.4
	トリフルミゾール	53.1	0.8	88.8	57.8	1.7	94.4

まとめ

希釈法(5倍)では、検量線で良好な相関係数を得ることができなかったカボチャ、グレープフルーツ及びほぼ良好な検量線を得ることができた日本なしについてマトリックス効果を検証した結果、マトリックス効果を受けないと考えられる農薬成分は、5倍希釈相当抽出液で10及び1ng/mに調整したものでは、332農薬成分中かぼちゃで186及び123成分、グレープフルーツで129及び125成分、日本なしで206及び184成分であった。日本なしと比較し、かぼちゃでは1ng/mでマトリックス効果を受けない農薬成分が激減した。グレープフルーツでは、マトリックス効果を受けない農薬成分が約4割であり、その程度も大きかった。また、10及び1ng/mのそれぞれでマトリックス効果の正・負が逆転するものもあった。10倍希釈相当抽出液で10及び1ng/mに調整したものは、かぼちゃについては、マトリックス効果を受けない農薬成分が5倍に比べ約40及び60増加し、日本

なしと同程度になった。グレープフルーツについては、約40及び25増加した。これらの結果と定量下限値を考慮し、希釈法(10倍)を採用することとした。

また、ガイドラインに準拠しバリデーションを行った結果、目標値を満たす農薬成分は全332農薬成分中りんごでは10ng/g濃度で298、50ng/g濃度で312、ほうれんそうでは10ng/g濃度で277、50ng/g濃度で297であった。

さらに、実際に農薬が検出された検体で通知法と希釈法(10倍)で定量値を比較した結果、トマトのチアクロプリドで通知法に比べ、希釈法の定量値が約3割低かったが、他の5農薬はほぼ一致し、RSD(%)も非常に良好であった。

これらの結果から、本試験法(希釈法(10倍))は、迅速かつ簡便で、一定の精度を有するものであり、より多成分の農薬使用実態を把握するうえでも、有用な食品中の残留農薬多成分一斉迅速分析法であると考えられる。

参考文献

- 1) 西名武士, 村川弘, 福島孝兵, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, **35**, 51~56(2005)
- 2) 「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ついて」(平成19年11月15日付け食安発第1115001号)
- 3) Klein J., Alder I.: JAOAC Int., **86**, 1015~1037(2003)
- 4) Tanizawa H., Shima M., Ikehara C., Kobata M., Sato M.: S-hokuhin Eiseigaku zasshi(J.Food Hyg.Soc.Japan), **46**, 185~197(2005).
- 5) Rie I., Kunihiko T., Masakazu H.: Shokuhin Eiseigaku zasshi(J.Food Hyg.Soc.Japan), **47**, 201~212(2006)
- 6) Eriko H., Hiroko K., Takashi S., Akira S., Satoru T., Takashi K.: Shokuhin Eiseigaku zasshi(J.Food Hyg.Soc.Japan), **47**, 137~145(2006)
- 7) 「食品中に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 8) Nagayama T., Kobayashi M., Shiota H., Morino M., Ito M., Tamura Y.: Shokuhin Eiseigaku zasshi(J.Food Hyg.Soc.Japan), **35**, 470~478(1994).