

LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

Validation Study on Simultaneous Method for Pesticide Residues
in Agricultural Products by LC-MS/MS藤田 直希
Naoki FUJITA櫻井 麻里南
Marina SAKURAI山下 未来
Miku YAMASHITA山本 貴美子*
Kimiko YAMAMOTO紙本 佳奈**
Kana KAMIMOTO荻田 幸***
Sachi OGITA安永 恵
Megumi YASUNAGA

要 旨

香川県内に流通している農産物について、LC-MS/MS による残留農薬一斉試験法の妥当性評価を実施した。農産物 20 品目を対象に、農薬成分 117~122 項目について、2 濃度、2 併行 5 日間の枝分かかれ実験を行った。真度、併行精度、室内精度を求めて妥当性評価の目標値と比較した結果、92~115 項目について、目標値を満たした。これにより、広範な食品に適応可能で、一斉に多数の農薬を精度よく分析できる試験法であることが確認できた。

キーワード：残留農薬、QuEChERS 法、妥当性評価、液体クロマトグラフ質量分析計

I はじめに

食品衛生法に基づく規格基準への適合判定を目的として、食品中に残留する農薬等の試験を実施する場合、「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」¹⁾ (以下「ガイドライン」という) によって、試験機関に試験法の妥当性確認が求められている。また、既に妥当性を確認した試験法を変更する場合にも、その変更の内容に応じて、妥当性確認が必要となる。

令和 2 年 3 月に、香川県環境保健研究センターで食品中に残留する農薬等の試験に使用している LC-MS/MS が更新された。これに伴い、当所で実施している残留農薬一斉試験法について、県内に流通している農産物 20 品目を対象に妥当性評価を実施したので報告する。

II 方法

1 試料

県内で多く流通している農産物 20 種類を試料とした。対象農産物：キャベツ、レタス、ほうれん草、ブロッコリー、ねぎ、きゅうり、なす、ピーマン、かぼちゃ、えだまめ、トマト、ばれいしょ、だいこん、にんじん、アスパラガス、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、みかん、バナナ

2 調査対象農薬

表 1 に示す農薬成分を妥当性評価の対象とした。

3 試薬等

(1) 試薬

アセトニトリル、塩化ナトリウム、トルエン、アセトンは残留農薬試験用、クエン酸三ナトリウム二水和物、無水硫酸マグネシウムは特級、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物は一級、試料溶解用のメタノール、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は HPLC 用、移動相のメタノール、ギ酸は LC/MS 用を使用した。

(2) 標準品

a 農薬混合標準液

PL2005 農薬 LC/MS Mix 4、PL2005 農薬 LC/MS Mix 5、PL2005 農薬 LC/MS Mix 6、PL2005 農薬 LC/MS Mix 7 (いずれも林純薬工業株式会社製)、ネオニコチノイド系農薬混合標準液 (富士フィルム和光純薬株式会社製) を用いた。

b 個別農薬標準品

林純薬工業株式会社製、富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。

(3) 精製用ミニカラム

Supelclean ENVI-Carb/NH₂ SPE Tube (500 mg/500 mg/6 mL) (Merck 社製) を用いた。

4 装置及び測定条件

*香川県健康福祉部東讃保健福祉事務所 **香川県健康福祉部中讃保健福祉事務所 ***香川県健康福祉部薬務課

(1) 装置

高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

ACQUITY UPLC H-Class PLUS/Xevo TQD (Waters 社製)

(2) 測定条件

アセフェート、イソキサフルトール代謝産物B、オメトエート、メソミルオキシム、メタミドホスは、測定法2を用いて測定した。これら以外の農薬は測定法1を用いた。MRM条件を表1に示す。

a 測定法1

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×100 mm、粒子径 1.7 μm) (Waters 社製)

移動相: A液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム 0.05%ギ酸水溶液

B液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム 0.05%ギ酸含有メタノール溶液

グラジエント条件:

Time (min)	A液	B液
0.0	90 %	10 %
0.3	90 %	10 %
1.0	70 %	30 %
11.0	1 %	99 %
13.0	90 %	10 %
17.0	90 %	10 % STOP

カラム温度: 40℃ 流速: 0.3 mL/min

注入量: 5 μL デソルベーション温度: 450℃

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

b 測定法2

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm、粒子径 1.8 μm) (Waters 社製)

移動相: A液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム 0.05%ギ酸水溶液

B液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム 0.05%ギ酸含有メタノール溶液

グラジエント条件:

Time (min)	A液	B液
0.0	95 %	5 %
5.0	60 %	40 %
5.1	1 %	99 %
6.0	95 %	5 %
10.0	95 %	5 % STOP

カラム温度: 40℃ 流速: 0.3 mL/min

注入量: 2 μL デソルベーション温度: 550℃

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

5 試験溶液の調製

試験溶液調製のフローチャートを図1に示す。

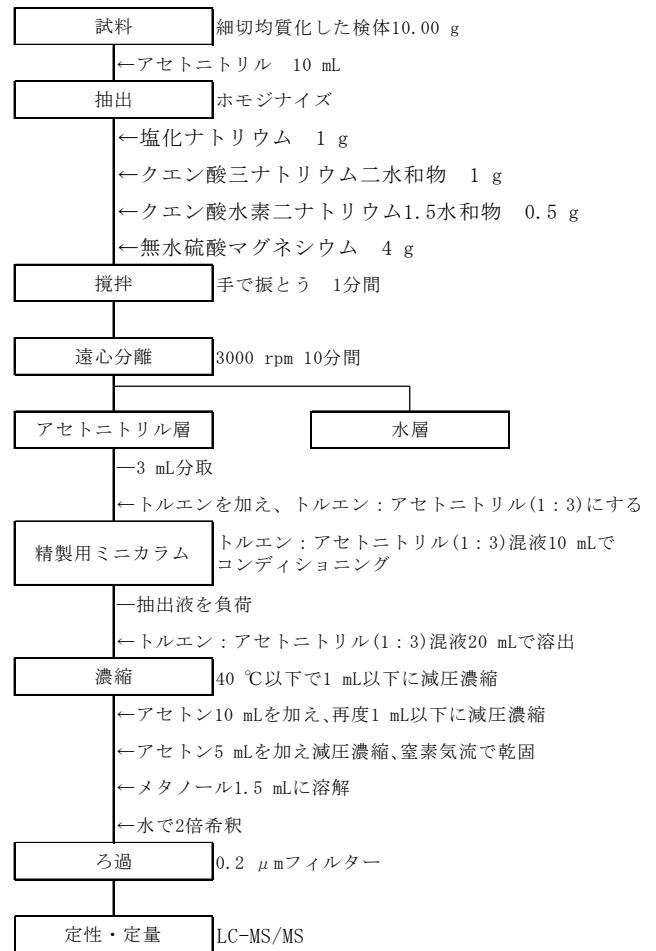


図1 試験法フローチャート

(1) 抽出

細切均質化した試料 10.00 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に秤量した。アセトニトリル 10 mL を加えてホモジナイズし、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g、無水硫酸マグネシウム 4 g を加え、1 分間手で振とうした。毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層 3 mL を分取し、抽出液とした。

(2) 精製

抽出液にトルエン 1 mL を加え、この全量をトルエン:アセトニトリル (1:3) 混液でコンディショニング済みのミニカラムに負荷し、トルエン:アセトニトリル (1:3) 混液 20 mL で溶出した。溶出液を 40 °C 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した後、メタノール 1.5 mL に溶解した。このメタノール溶液を水で 2 倍希釈し、メンブレンフィルター (0.20 μm 以下) でろ過したものを試験溶液とした。

(3) マトリックス標準液

マトリックス効果の大きい農薬項目の定量には、マトリックス溶媒で希釈した標準液を用いた。

6 妥当性評価

ガイドラインに従って、分析者1名、2併行5日間の枝分かれ実験を行い、検量線、選択性、真度、精度（併行精度、室内精度）、定量限界を評価した。添加濃度は0.01 ppm及び0.05 ppmの2濃度とした。一部のネオニコチノイド系農薬（イミダクロプリド、クロチアニジン、チアクロプリド、チアメトキサム）は、混合標準に重複して含まれているため、2倍濃度で実施した（0.02 ppm及び0.10 ppm）。

検量線の R^2 （決定係数）が0.990未満となった場合、その項目は検量線不適合とした。選択性は、ブランク試料をフローチャートに従って分析し、定量を妨害するピークがないことを確認した。真度及び精度の目標値を表2に示す。2濃度とも目標値を満たす場合に、その農薬成分は真度及び精度の目標値を満たしたと評価した。定量限界については、真度及び精度が目標値を満たしている農薬を対象に、添加濃度0.01 ppmピークのS/N比を評価し、10以上であることを目標とした。

表2 真度及び精度の目標値

添加濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.001 < ~ ≤ 0.01	70~120	25>	30>
0.01 < ~ ≤ 0.1	70~120	15>	20>

III 結果および考察

1 検量線

20農産物で延べ2382項目の農薬成分を評価し、54項目（2%）で検量線の R^2 が0.990を下回っていたため、検量線不適合とした。

2 選択性

各ブランク試料を分析した結果、定量を妨害するピークはなかった。

ブランク試料のうち、なすからクロチアニジン0.007 ppm、ピーマンからクロチアニジン0.009 ppm、グレープフルーツからイマザリル0.04 ppmを検出したため、これら3項目は評価対象外とした。

3 真度及び精度

検量線の直線性及び選択性を満たした延べ2325項目について、真度及び精度を評価し、2110項目（91%）が目標値を満たした。真度の分布を表3に示す。目標値を満たした農薬成分数は、キャベツ106項目、レタス106項目、ほうれん草92項目、ブロッコリー108項目、ねぎ108項目、きゅうり110項目、なす100項目、ピーマン112項目、かぼちゃ106項目、えだまめ97項目、トマト115項目、ばれいしょ110項目、だいこん98項目、にんじん111項目、アスパラガス102項目、オレンジ103項目、グレープフルーツ109項目、レモン104項目、みかん113項目、バナナ100項目だった。また、すべての農産物で目標値を満たした農薬成分は76項目だった。

真度及び精度の目標値を満たさない農薬成分延べ215項目中205項目（95%）が2濃度のいずれかで真度不適合だった。真度は2濃度とも目標値を満たすが、精度が不適合となる農薬成分は10項目だった。真度不適合205項目の内訳では、真度70%を下回る農薬成分が198項目（97%）であり、真度120%を上回る農薬成分は少なかった。本試験法で妥当性評価の目標値を満たすには、真度の確保が重要であると考えられた。

4 定量限界

対象の農薬成分は、すべてS/N比が10以上だった。

IV まとめ

農産物20品目について、ガイドラインに従って農薬成分117~122項目の妥当性評価を実施した。真度、併行精度、室内精度を求めて妥当性評価の目標値と比較した結果、農薬成分92~115項目について、目標値を満たした。これにより、広範な食品に適応可能で、一斉に多数の農薬を精度よく分析できる試験法であることが確認できた。

文献

- 1) 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日付食安発第1224第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）

表1 対象農薬及びMRM条件

No.	農薬成分名	ESI	定量イオン (m/z)		CV (V)	CE (V)	No.	農薬成分名	ESI	定量イオン (m/z)		CV (V)	CE (V)
1	XMC	+	180	> 123	19	8	62	チアクロプリド	+	253	> 126	41	20
2	アザメチホス	+	325	> 112	31	35	63	チアクロプリドアミド	+	271	> 126	28	28
3	アシベンゾラリス-メチル	+	211	> 136	45	30	64	チアベンダゾール	+	202	> 175	51	25
4	アジンホスメチル	+	318	> 160	20	8	65	チアメトキサム	+	292	> 211	28	12
5	アセタミプリド	+	223	> 126	34	20	66	チオジカルブ	+	355	> 88	26	16
6	アセフェート	+	184	> 143	17	8	67	テトラクロロピホス	+	365	> 127	32	16
7	アゾキシストロビン	+	404	> 372	28	15	68	テブチウロン	+	229	> 172	36	18
8	アニロホス	+	368	> 199	30	15	69	テブフェノジド	+	353	> 133	19	20
9	アバメクチンB1a	+	891	> 305	24	25	70	テフルベンズロン	+	381	> 158	26	20
10	アラマイト	+	352	> 191	20	15	71	トラルコキシジム	+	330	> 138	31	19
11	アルジカルブ	+	208	> 116	10	7	72	トリチコナゾール	+	318	> 70	40	20
12	アルジカルブスルホキシド*	+	207	> 89	22	14	73	トリデモルフ	+	298	> 57	52	28
13	アルドキシカルブ	+	223	> 86	27	14	74	トリフルムロン	+	359	> 156	31	16
14	イソキサフルトール	+	360	> 251	31	14	75	ナプロアニリド	+	292	> 171	36	15
15	イソキサフルトール代謝産物B**	+	360	> 251	28	14	76	ニテンピラム	+	271	> 126	31	25
16	イソプロカルブ	+	194	> 95	24	14	77	CPF	+	199	> 128	22	18
17	イプロジオン	+	330	> 245	35	15	78	CPMF	+	212	> 126	30	18
18	イプロジオン代謝物	+	330	> 101	36	24	79	ノバルロン	+	493	> 158	36	19
19	イプロバリカルブ	+	321	> 119	28	16	80	ピラクロストロビン	+	388	> 194	31	12
20	イマザリル	+	297	> 69	40	22	81	ピラゾリネート	+	439	> 91	34	42
21	イミダクロプリド	+	256	> 175	34	20	82	ピリフタリド	+	319	> 139	51	25
22	インダノファン	+	341	> 187	21	12	83	ピリミカルブ	+	239	> 72	34	18
23	インドキサカルブ	+	528	> 150	34	22	84	フィプロニル	-	435	> 330	15	14
24	エチオフェンカルブ	+	226	> 107	25	17	85	フェノキサプロップエチル	+	362	> 288	46	20
25	エポキシコナゾール	+	330	> 121	34	22	86	フェノキシカルブ	+	302	> 88	28	20
26	オキサジクロメホン	+	376	> 190	36	15	87	フェノプロカルブ	+	208	> 95	22	14
27	オキサミル	+	237	> 72	21	10	88	フェリムゾンE	+	255	> 91	46	30
28	オキシカルボキシ	+	268	> 175	26	16	89	フェリムゾンZ	+	255	> 91	46	30
29	オメトエート	+	214	> 183	24	12	90	フェンアミドン	+	312	> 92	31	25
30	オリザリン	+	347	> 305	31	14	91	フェンピロキシメートE	+	422	> 366	32	15
31	カルバリル	+	202	> 145	28	22	92	フェンメディファム	+	301	> 168	34	10
32	カルプロバミド	+	334	> 139	31	18	93	ブタフェナシル	+	492	> 180	20	45
33	カルボフラン	+	222	> 165	34	16	94	フラチオカルブ	+	383	> 195	31	18
34	3-ヒドロキシカルボフラン**	+	238	> 163	34	12	95	フラメトピル	+	334	> 157	36	30
35	キサロホップエチル	+	373	> 299	40	18	96	フルフェナセット	+	364	> 194	22	11
36	キシリルカルブ	+	180	> 123	20	10	97	フルフェノクスロン	+	489	> 158	40	22
37	クミルロン	+	303	> 185	46	15	98	フルリドン	+	330	> 310	66	30
38	クロキントセットメキシル	+	336	> 238	30	16	99	プロパキサホップ	+	444	> 100	36	20
39	クロチアニジン	+	250	> 169	24	12	100	プロボキスル	+	210	> 111	21	16
40	クロフェンテジン	+	303	> 138	28	22	101	ヘキサフルムロン	+	461	> 158	19	25
41	クロマフェノジド	+	395	> 175	16	22	102	ヘキシチアゾクス	+	353	> 228	30	14
42	クロメプロップ	+	324	> 120	41	20	103	ペンシクロン	+	329	> 125	40	25
43	クロリダゾン	+	222	> 77	56	30	104	ベンゾフェナップ	+	431	> 105	46	28
44	クロロクスロン	+	291	> 72	41	25	105	ベンダイオカルブ	+	224	> 167	26	8
45	シアゾファミド	+	325	> 108	26	20	106	ペントキサゾン	+	354	> 286	28	14
46	ジウロン	+	233	> 72	34	18	107	ボスカリド	+	343	> 307	41	20
47	シクロエート	+	216	> 83	32	18	108	メソミル	+	163	> 88	26	10
48	シクロプロトリン	+	499	> 181	26	36	109	メソミルオキシム**	+	106	> 58	28	12
49	ジノテフラン	+	203	> 129	25	10	110	メタベンズチアズロン	+	222	> 165	30	16
50	シフルフェナミド	+	413	> 295	36	15	111	メタミドホス	+	142	> 94	28	13
51	ジフルベンズロン	+	311	> 158	34	12	112	メチオカルブ	+	226	> 169	28	10
52	シプロジニル	+	226	> 93	56	33	113	メチオカルブスルホキシド	+	242	> 185	26	14
53	シメコナゾール	+	294	> 70	32	20	114	メチオカルブスルホン	+	258	> 122	31	19
54	ジメチリモール	+	201	> 71	46	30	115	メトキシフェノジド	+	369	> 149	34	18
55	ジメトモルフ1	+	388	> 301	41	20	116	メトルカルブ	+	166	> 109	20	12
56	ジメトモルフ2	+	388	> 301	41	20	117	メパニピリム	+	224	> 106	46	25
57	シラフルオフェン	+	426	> 287	10	10	118	メパニピリムプロパノール体**	+	244	> 200	50	16
58	スピノサドA	+	733	> 142	56	31	119	モノリニューロン	+	215	> 126	34	22
59	スピノサドD	+	747	> 142	51	31	120	ラクトフェン	+	479	> 223	20	35
60	ダイアレート	+	270	> 86	29	15	121	リニューロン	+	249	> 160	31	18
61	ダイムロン	+	269	> 151	30	10	122	ルフェヌロン	-	509	> 175	27	40

CV:コーン電圧, CE:コリジョンエネルギー

*:農産物10品目で実施

**:農産物8品目で実施

表3 真度の分布

	キャベツ		レタス		ほうれん草		ブロッコリー		ねぎ	
	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm
<50%	2	2	2	2	10	8	2	1	1	4
<70%	1	4	2	4	11	11	4	4	5	5
70-120%	110	107	109	107	93	95	108	109	113	111
120%<	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
150%<	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

	きゅうり		なす		ピーマン		かぼちゃ		えだまめ	
	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm
<50%	2	2	8	7	1	2	4	7	6	6
<70%	1	3	7	6	4	2	5	3	12	11
70-120%	113	111	100	102	114	115	108	107	97	98
120%<	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
150%<	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

	トマト		ばれいしょ		だいこん		にんじん		アスパラガス	
	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm
<50%	2	2	3	4	11	10	1	1	5	6
<70%	3	3	6	3	3	2	0	2	4	3
70-120%	115	115	110	112	98	100	113	111	105	104
120%<	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
150%<	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	オレンジ		グレープフルーツ		レモン		みかん		バナナ	
	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm
<50%	4	4	1	1	3	5	2	3	3	6
<70%	5	7	1	3	8	8	4	3	3	7
70-120%	110	108	111	109	108	106	114	114	108	101
120%<	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150%<	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0