

個別試験法対象農薬の通知一斉試験法及び QuEChERS 法への 適用性の検討

【食品衛生室】

岩永千歳・福田麻衣・居藏岳志・増川正敏・山根一城

1 はじめに

平成18年に施行されたポジティブリスト制度により、原則、食品中に残留するすべての農薬について残留基準が設定された。これに対応するため、流通食品の監視を目的に県が実施する収去検査における検査対象農薬は、県内で使用されている農薬の出荷量を基に選定することとしている。

現在、当所では、厚生労働省の通知一斉試験法「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」、「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I及びII(農産物)」(以下、通知一斉試験法I及びII)により、300項目程度を分析するに至っている。

しかし、県内に出荷される農薬の中には、厚生労働省通知の個別試験法のみ適用されており、一斉試験法での適用がまだ検討されていない項目もある。

個別試験法は旧告示試験法を引き継いでおり、GC又はHPLCを用いた試験法が中心となっている。この試験法は、煩雑な抽出操作や誘導体化といった時間を要する前処理を特徴とし、同時に分析できる項目も1~数農薬と少ないことから、ポジティブリスト制度の中で効率的に検査を実施していく上では不向きである。

そこで、個別試験法のみ規定されている農薬について、GC又はHPLCに比べ幅広い物質の測定が可能なLC/MS/MSを用いた一斉試験法の適用性を厚生労働省通知「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」に準拠し検討を行った。さらに、食品からの農薬抽出精製方法として近年注目されている、迅速性に優れたQuEChERS法¹⁾を用いたLC/MS/MS一斉分析法の検討も行ったので報告する。

2 調査方法

1) 試料

分析対象食品は農産物とし、農産物の成分特性から表1に示す分類ごとに実際に収去検査で試験品となる

農産物を試料とした。

表1 検討に用いた試料

分類	試料名
穀類	玄米
デンプンを多く含むもの	ながいも
葉緑素を多く含むもの	ブロッコリー
イオウ化合物を含むもの	大根
果実	柿

2) 対象農薬

個別試験法が通知されているものから、表2に示した9種類の農薬を対象とした。

3) 試薬及び標準品

通知一斉試験法での精製カラムはスペルコ社製ENVI-Carb/LC-NH₂(500 mg/500 mg/6 ml)、QuEChERS法ではスペルコ社製Citrate Extraction Tube及びPSA SPE Clean Up Tube 1を使用した。標準品は和光純薬工業株式会社、林純薬工業株式会社、関東化学株式会社製のものを使用した。

4) 試験方法

通知一斉試験法は厚生労働省の通知に従い、QuEChERS法はキットに示された方法に従い試料溶液を調製しLC/MS/MSによる測定に供した。LC/MS/MSの測定条件は表2及び表3に示した。

それぞれの試験法における添加回収試験では、対象農薬の標準溶液(メタノール溶液)を添加し試料中濃度が50 µg/kgとなる試料を調製し、試験に供した。

表2 測定対象農薬のLC/MS/MS測定条件

農薬名	Monoisotopic mass	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	DP ₁	CE ₁	イオン条件
アミトラズ	293.2	294.2	162.9	26	19	[M+H] ⁺
シモキサニル	198.1	199.0	128.0	26	11	[M+H] ⁺
セトキシジム	327.2	328.0	282.0	41	15	[M+H] ⁺
チオファネートメチル	342.0	343.2	151.0	51	23	[M+H] ⁺
トリフルミゾール	345.1	346.2	277.8	36	15	[M+H] ⁺
フェントラザミド	349.1	350.0	197.0	26	11	[M+H] ⁺
プロクロラズ	375.0	376.0	308.1	41	17	[M+H] ⁺
ベンゾピシクロン	446.0	447.0	257.0	81	35	[M+H] ⁺
チアジニル	267.0	266.0	71.0	-51	-30	[M-H] ⁻

¹ DP : Declustering Potential(V) CE : Collision Energy(V)

表3 LC/MS/MS測定条件

HPLC条件	装置	Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Inc.)
	カラム	分析カラム : X Bridge C18 (150 mm × 2.1 mm i.d. 3 μm) ガードカラム : X Bridge C18 (10 mm × 2.1 mm i.d. 3 μm)
	移動相	A) 5 mmol/L 酢酸アンモニウム/水 B) 5 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール
	グラジエント条件	0分(A:B 85:15) 1分(A:B 60:40) 3.5分(60:40) 6分(50:50) 8分(45:55) 17.5分(5:95) 30分(5:95) 30.1分(85:15) 45分(85:15)
	流速	0.2 ml/分
	カラム温度	40
	注入量	5 μL
MS/MS条件	装置	API 3000 TMLC/MS/MS system (Applied Biosystems Corp.)
	イオン化方式	ESI (+), (-)
	測定方法	MRM
	Ion Spray voltage	(+) 3500, (-) -3500
	Ion Source temp	(+) 400, (-) 350

3 結果及び考察

1) LC/MS/MSによる測定条件の検討

HPLCの測定条件は、これまで使用してきた通知一斉試験法の条件で行った。質量分析計の測定条件は、設定パラメータを変動させながら標準溶液を測定することによって、プロトン付加イオンから生じるフラグメントイオンの中で最も検出ピーク強度が大きいイオンをプロダクトイオンとし、その最適な測定条件を選択した。得られた測定条件は表2及び表3に示す。チアジニルは、プロトン付加イオン、プロトン脱離イオンともに検出されたが、プロトン脱離イオンの検出感度が高かったことから陰イオンを測定することとした。

2) LC/MS/MSによる定量限界値と検量線

LC/MS/MSによる定量限界はSN=10とし、その濃度を表4に示した。いずれの農薬も個別試験法による定量下限値を下回る濃度まで定量可能であった。1

~ 100ppb の範囲で検量線を作成したところ、 $r=0.9954 \sim 0.9999$ と良好な直線性を示した。QuEChERS法では、10~100ppbの範囲でマトリクス添加検量線を作成したところ、 $r=0.9979 \sim 0.9999$ であり直線性は良好であった。

3) 通知一斉試験法とQuEChERS法の選択性

各試料の通知一斉試験法とQuEChERS法による試験溶液を測定し、各農薬が検出される保持時間に測定妨害となる試験品に由来するピークの有無を確認することにより、試験方法と試験品マトリクスの組み合わせによる選択性を確認した。なお、玄米、ながいも、ブロッコリーに関しては、フェントラザミド、プロクロラズ、チオファネートメチル、トリフルミゾールのみ選択性を確認した。例として図1に玄米中のプロクロラズのクロマトグラムを示す。なお、図1中の下向きの矢印はプロクロラズの保持時間を表す。いずれの農薬においても、通知一斉試

験法 と QuEChERS 法ともに妨害ピークは検出されず、選択性に問題はなかった。

表4 測定対象農薬の個別試験法とLC/MS/MSの比較

農薬名	LCMSMSによる定量限界 (mg/kg)	個別試験の測定方法	個別試験法による定量限界 (mg/kg) ¹
アミトラズ	0.0006	GC-FTD,GC-NPD,GC/MS	0.01
シモキサニル	0.003	HPLC-UV	0.05
セトキシジム	0.004	HPLC-UV	0.01
チオファネートメチル	0.0003	HPLC-FL,LC/MS	0.01 ²
トリフルミゾール	0.0002	HPLC-UV	0.05
フェントラザミド	0.0003	GC-FTD,GC-NPD,GC/MS	0.01
プロクロラズ	0.0007	GC-ECD,GC/MS	0.01
ベンゾピシクロン	0.0004	HPLC-UV,LC/MS	0.01
チアジニル	0.0002	HPLC-UV,LC/MS	0.01

- 1 農産物対象とした場合
2 カルベンダジムとして

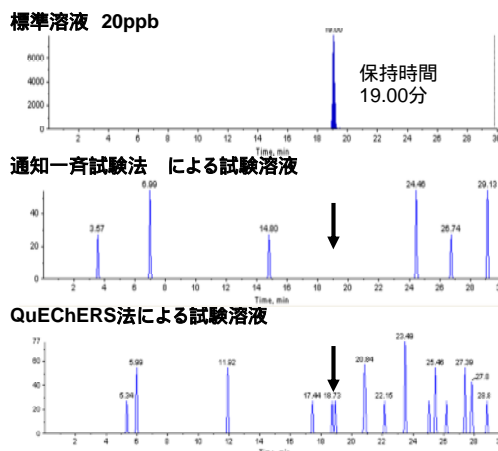


図1. 玄米中のプロクロラズのクロマトグラム

4) 添加回収試験結果

添加回収試験 (n=3) を行い、相対標準偏差、回収率により各試験法の精度、真度を確認した。添加回収試験結果は表5のとおりである。回収率の評価は、厚生労働省通知「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」において目標とされる回収率(70 - 120%)に従った。プロクロラズ、トリフルミゾール、セトキシジム、チアジニルについては、通知一斉試験法 と QuEChERS 法のいずれについても目標値を満たした。チオファネートメチルとアミトラズ、フェントラザミドは QuEChERS 法で良好な回収率を示す一方で、通知一斉

試験法 では回収率が低かった。フェントラザミドは玄米の通知一斉試験法 のみ回収率が低く、ベンゾピシクロンは柿の QuEChERS 法のみ良好な結果が得られるなど、作物によって結果が異なり、マトリクスの影響を受ける可能性が考えられた。

精度の評価は、妥当性評価ガイドラインにおいて目標とされる相対標準偏差(RSD)5%以下に従った。回収率の目標値を満たした試験項目は相対標準偏差の目標値も満たした。通知一斉試験法、QuEChERS 法ともにはばつきの少ない試験が可能であると考えられた。

表5 添加回収試験結果(上表:通知一斉試験法、下表:QuEChERS法)

農薬名	玄米		ながいも		ブロッコリー		大根		柿	
	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)
フェントラザミド	4.2	44.5	5.7	89.9	1.7	92.6	1.2	96.0	1.7	90.5
プロクロラズ	12.0	90.9	9.0	84.6	2.6	87.5	14.9	72.0	4.8	75.8
チオファネートメチル	4.6	22.5	10.9	16.5	0.0	0.0	51.5	11.6	24.0	31.4
トリフルミゾール	5.9	91.6	7.7	95.0	4.2	85.9	4.5	100.4	8.1	94.7
アミトラズ	-	-	-	-	-	-	15.5	15.5	58.3	28.1
ベンゾピシクロン	-	-	-	-	-	-	5.5	31.5	7.8	41.0
シモキサニル	-	-	-	-	-	-	14.5	67.4	8.9	70.3
セトキシジム	-	-	-	-	-	-	10.2	82.8	2.1	83.0
チアジニル	-	-	-	-	-	-	1.7	97.0	3.1	92.2

農薬名	玄米		ながいも		ブロッコリー		大根		柿	
	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)
フェントラザミド	3.8	104.6	3.2	105.9	5.5	89.4	6.0	101.7	3.2	111.5
プロクロラズ	1.4	110.4	14.2	97.8	3.3	95.6	4.6	98.8	4.4	99.9
チオファネートメチル	5.6	123.5	6.9	100.4	5.2	107.3	4.4	106.2	6.3	102.9
トリフルミゾール	4.8	101.5	3.8	98.1	3.2	92.9	4.6	105.1	5.2	109.9
アミトラズ	-	-	-	-	-	-	11.0	110.8	3.7	283.1
ベンゾピシクロン	-	-	-	-	-	-	38.3	20.4	9.9	91.8
シモキサニル	-	-	-	-	-	-	2.7	62.1	7.3	111.7
セトキシジム	-	-	-	-	-	-	3.3	103.5	8.1	97.6
チアジニル	-	-	-	-	-	-	4.0	108.5	2.2	101.8

4 まとめ

現在、厚生労働省通知では個別試験法のみ適用されている農薬でも、通知一斉試験法 及び QuEChERS 法で、良好な結果が得られるものがあった。迅速な分析が求められた場合、QuEChERS 法による分析は有効であると考えられる。今後さらに妥当性を評価するためのデータを蓄積していく予定である。

5 参考文献

- 1) Anastassiades et al, Journal of AOAC International, 86(2), (2003)