

# 残留農薬分析業務における分析法の検討

## LC-MS/MS を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

坂部亮介\*<sup>1</sup>，篠田隆祥\*<sup>1</sup>，友成真菜\*<sup>1</sup>，岸田繁二\*<sup>2</sup>

小塚健志\*<sup>3</sup>，塚田政範\*<sup>3</sup>，野村哲也\*<sup>3</sup>，竹村浩一\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所

\*<sup>3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法について、5 農薬を対象とし、厚生労働省通知の「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、3 試験室において妥当性評価を行った。その結果、4 農薬については、全ての試験室において、妥当性評価の性能パラメータがガイドラインに示された目標値等に適合していた。

Keywords：残留農薬，きゅうり，妥当性評価，液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

### 緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬実態調査課（以下、センター）では、農林水産省の指示に基づき、国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況について調査を行っている。農産物に使用される農薬は、作物や栽培地域によって異なることから、調査においては、農薬を効率よく分析することが重要である。

今回、令和3年度に予定されているきゅうりの調査（厚生労働省通知<sup>1)</sup>の「GC/MS・LC/MSによる農薬等の一斉試験法（野菜・果実類）」（以下、一斉法）において調査対象農薬の拡大と分析の効率化を図るため、センターの分析対象としていない5農薬（以下、新規対象農薬）について検討を行った。

試験法については、抽出および精製は一斉法に準じ、測定はLC-MS/MSに変更した。

妥当性は「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」<sup>2,3)</sup>（以下、ガイドライン）に基づき、試験室毎に評価した。

### 材料および方法

#### 1. 試験室

以下の3試験室で実施した。

- ・農薬検査部農薬実態調査課（以下、小平）
- ・横浜事務所農薬実態調査課（以下、横浜）
- ・神戸センター農薬実態調査課（以下、神戸）

#### 2. 新規対象農薬

きゅうりに使用されている農薬を事前調査し、使用実績のある次の5農薬を対象とした。

エタボキサム，ピリベンカルブ，フェンピラザミン，フルチアニル，ミルベメクチン

#### 3. 試料および添加濃度

##### 3.1. 試料

新規対象農薬が検出されていない国産きゅうり（以下、ブランク試料）を用いた。小平にて粉碎した3種類の試料を、各試験室1種類ずつ使用した。

##### 3.2. 添加濃度

新規対象農薬の中で最も基準値の低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値に相当する0.2 mg/kg（以下、高濃度）およびその10分の1にあたる0.02 mg/kg（以下、低濃度）の2濃度とした。

#### 4. 試薬および器具

##### 4.1. 標準品

農薬標準品：エタボキサム，ピリベンカルブ，ピリベンカルブ代謝物 B，ミルベメクチン A3 およびミルベメクチン A4 は林純薬工業株式会社，フェンピラザミンおよびフルチアニルは富士フイルム和光純薬株式会社製の粉末標準品をそれぞれ使用した。

混合標準液:エタボキサムおよびフェンピラザミンをアセトン,その他の粉末標準品をアセトニトリルにそれぞれ溶解して 500 µg/mL の標準溶液を調製後, これらを混合し, 20 µg/mL となるようアセトニトリルで希釈した。

添加回収試験用標準液および検量線用標準液:混合標準液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した。

#### 4.2. 試薬

アセトニトリル(残留農薬試験用および液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), アセトン(残留農薬試験用), トルエン(残留農薬試験用), n-ヘキサン(残留農薬試験用), メタノール(液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), 塩化ナトリウム(残留農薬試験用), リン酸トリフェニル(1級), リン酸水素二カリウム(特級), リン酸二水素カリウム(特級), 無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用), 酢酸アンモニウム溶液(高速液体クロマトグラフィ(HPLC)用)およびケイソウ土(セライト545)を使用した。水は超純水製造装置(Merck Millipore製)で製造した超純水または超純水(LC/MS用)を使用した。

#### 4.3. 調製試薬

0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0):リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り,水約 500 mL に溶解し, 1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH 7.0 に調製した後, 水を加えて 1 L とした。

#### 4.4. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

#### 4.5. 固相抽出ミニカラム

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(以下,グラファイトカーボンミニカラム)は, Sigma-Aldrich 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500mg/500 mg) をアセトニトリル・トルエン (3:1) 10mL でコンディショニングしたものを用いた。

### 5. 装置

#### 5.1. ホモジナイザー

日本精機製作所製 エースホモジナイザー

#### 5.2. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部: Waters 製 ACQUITY UPLC System

(小平, 神戸, 横浜)

MS 部: Waters 製 Premier XE (小平, 神戸)

: Waters 製 ACQUITY TQD (横浜)

### 6. 前処理方法

#### 6.1. 抽出

図1の分析法フローチャートに従い, 試料から農薬をアセトニトリルで抽出し, 抽出液に塩化ナトリウムおよび 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて振とうしたのち, 水層を分離除去した。

添加回収試験は, ホモジナイザー用容器に採取した試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分放置した後抽出を開始した。

#### 6.2. 精製

無水硫酸ナトリウムを用いて脱水したアセトニトリル層をグラファイトカーボンミニカラムで精製し, リン酸トリフェニル 1 µg/mL を含むアセトン・n-ヘキサン (1:1) 混液に溶解したものを試験溶液とした。

#### 6.3. LC-MS/MS 測定用試験溶液

試験溶液 0.125 mL から溶媒を除去し, 残留物をアセトニトリルで 5 mL としたものを LC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

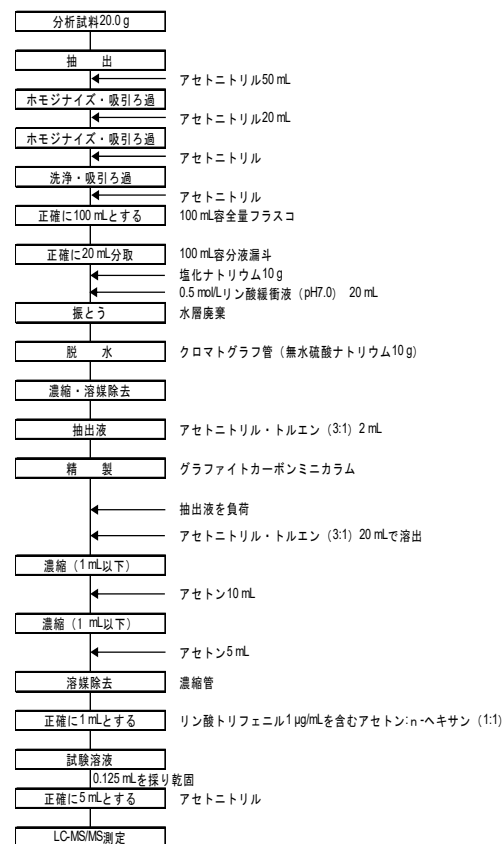


図1. LC-MS/MSによる一斉試験法(野菜・果実類)フローチャート

## 7. 測定条件

LC-MS/MS による測定イオンおよび測定条件は、表1から表3のとおりとした。

表1. LC-MS/MS 測定イオン

農薬名	測定モード	モニターイオン	モニターイオン
		(定量) m/z	(定性) m/z
エタボキサム	+	321 > 200	321 > 183
ピリベンカルブ	+	362 > 207	362 > 239
ピリベンカルブ代謝物	+	362 > 207	362 > 239
フェンピラザミン	+	332 > 230	332 > 189
フルチアニル	+	427 > 411 (小平・神戸) 427 > 192 (横浜)	427 > 192 (小平・神戸) 427 > 132 (横浜)
ミルベメクチン A3	+	546 > 511	511 > 113 (小平・神戸) 546 > 113 (横浜)
ミルベメクチン A4	+	560 > 525	525 > 507 (小平) 560 > 507 (横浜) 525 > 109 (神戸)

表2. LC-MS/MS 測定条件

LC部	: Waters製 ACQUITY UPLC System
MS部	: Waters製 Premier XE (小平, 神戸) ACQUITY TQD (横浜)
カラム	: Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 2 μm
流量	: 0.2 mL/min (小平, 横浜) 0.353 mL/min (神戸)
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 2 μL
移動相 A液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
B液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール 溶液 (グラジエント条件: 表3)
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI +)
測定法	: 多重反応モニタリング法 (MRM)
イオン源温度	: 120 °C
脱溶媒ガス温度	: 250 °C
脱溶媒ガス流量	: 900 L/hr

表3. グラジエント条件

	時間 (min)	A液:B液 (比)	
		A液:B液 (比)	A液:B液 (比)
小平 横浜	0 ~ 0.51	85:15	→ 60:40
	~ 2.17		60:40
	~ 3.85	60:40	→ 50:50
	~ 5.17	50:50	→ 45:55
	~ 11.51	45:55	→ 5:95
	~ 17.65		5:95
神戸	0 ~ 0.29	85:15	→ 60:40
	~ 1.23		60:40
	~ 2.18	60:40	→ 50:50
	~ 2.93	50:50	→ 45:55
	~ 6.52	45:55	→ 5:95
	~ 8.52		5:95

## 8. 妥当性評価

### 8.1. 枝分かれ試験

ガイドラインに示された実験例に基づき、各試験室において低濃度および高濃度の添加回収試験をそれぞれ2併行で、異なる実施日または実施者で5回繰り返した。

### 8.2. 選択性の確認

ブランク試料を6. 前処理方法に従って調製した試験溶液 (以下、ブランク試料溶液) について、LC-MS/MS で測定し、新規対象農薬の定量を妨害するピークの有無を確認した。

### 8.3. 検量線の直線性の確認

新規対象農薬を混合した検量線用標準溶液 (0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 μg/mL) 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検量線を作成した。各対象農薬の検量線について、相関係数 (r) が 0.995 以上であることをもって、検量線の直線性を確認した。

### 8.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界の目標値を 0.02 mg/kg, 検出限界の目標値を 0.01 mg/kg とした。

各試験室において、標準溶液を測定して得られたピークの高さ(S)とピーク近傍のノイズ(N)の高さから S/N 比 3 相当および 10 相当の濃度を求め、試料中濃度換算したものをそれぞれ検出限界および定量限界とした。

### 8.5. 真度および精度の確認

ガイドラインに従い、低濃度は真度 (回収率) が 70~120 %, 併行精度が 15 %未満, 室内精度が 20 %未満, 高濃度は真度が 70~120 %, 併行精度が 10 %未満, 室内精度が 15 %未満を目標値 (表4参照) とした。

表4. ガイドラインに示された真度および精度の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD %)	室内精度 (RSD %)
≤0.001	70~120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤0.01	70~120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤0.1	70~120	15 >	20 >
0.1 <	70~120	10 >	15 >

## 結果および考察

### 9. 妥当性評価結果

新規対象農薬について、ガイドラインに定められた選択性、真度、精度、定量限界に加え、検出限界および検量線の直線性の評価を行った。

#### 9.1. 選択性

ブランク試料の分析を行ったところ、いずれの新規対象農薬においても定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題がないことを確認した。

#### 9.2. 検量線の直線性

各試験室で作成した検量線の相関係数 (r) は表 5 に示すとおりであり、全ての新規対象農薬について、0.0005~0.1 µg/mL の範囲で直線性 (相関係数 (r) が 0.995 以上) が確認された。

#### 9.3. 検出限界および定量限界

各試験室の検出限界および定量限界の結果を表 6 に示した。新規対象農薬について、目標値を

満たしていたことから、検出限界を 0.01 mg/kg、定量限界を 0.02 mg/kg とした。

#### 9.4. 真度および精度

新規対象農薬について、各試験室の真度 (回収率) の平均値および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表 7 に示した。エタボキサムを除く 4 種の新規対象農薬については、ガイドラインの目標値 (表 4) を満たした。

#### 9.5. 室間再現性 (参考)

新規対象農薬について、全ての結果 (3 試験室それぞれにおいて 1 回当たり 2 併行、異なる実施日または異なる実施者で 5 回繰り返しの枝分かれ試験) から求めた真度 (回収率) および精度 (併行精度および室間精度) を表 8 に示した。この結果についてもエタボキサムを除く 4 種の新規対象農薬でガイドラインの目標値 (表 4) を満たした。

表 5. 直線性の範囲と相関係数

農薬名	直線性の範囲 (µg/mL)	相関係数 (r)		
		小平	横浜	神戸
エタボキサム	0.0005-0.1	0.9959	0.9993	0.9996
ピリベンカルブ	0.0005-0.1	0.9999	0.9999	0.9993
ピリベンカルブ代謝物	0.0005-0.1	0.9997	0.9999	0.9999
フェンピラザミン	0.0005-0.1	0.9998	0.9998	1.0000
フルチアニル	0.0005-0.1	0.9997	1.0000	0.9999
ミルベメクチン A3	0.0005-0.1	0.9989	0.9999	1.0000
ミルベメクチン A4	0.0005-0.1	0.9991	0.9997	1.0000

表 6. 検出限界および定量限界

農薬名	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
エタボキサム	0.00040	0.00007	0.00026	0.00132	0.00023	0.00086
ピリベンカルブ	0.00076	0.00010	0.00033	0.00252	0.00032	0.00110
ピリベンカルブ代謝物	0.00080	0.00032	0.00026	0.00266	0.00106	0.00086
フェンピラザミン	0.00028	0.00019	0.00015	0.00094	0.00064	0.00051
フルチアニル	0.00150	0.00027	0.00037	0.00498	0.00091	0.00123
ミルベメクチン A3	0.00208	0.00102	0.00370	0.00693	0.00339	0.01235
ミルベメクチン A4	0.00145	0.00113	0.00218	0.00483	0.00375	0.00726

表 7. 新規対象農薬の回収率, 併行精度および室内精度

農薬名		回収率 (%) n=10		併行精度 RSD (%)		室内精度 RSD (%)	
		低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
エタボキサム	小平	38.0	37.4	5.1	7.0	50.4	44.8
	横浜	53.7	41.9	4.7	7.1	26.7	27.9
	神戸	70.1	69.1	7.8	9.4	22.1	16.2
ピリベンカルブ	小平	99.6	96.8	3.0	1.3	4.0	5.8
	横浜	101.1	99.1	3.9	0.6	3.9	2.2
	神戸	93.8	94.5	5.5	6.8	5.5	6.8
ピリベンカルブ代謝物	小平	98.0	97.7	3.5	3.1	4.8	6.2
	横浜	102.3	97.2	6.4	2.0	6.4	2.4
	神戸	95.9	93.5	4.9	5.5	7.0	5.7
フェンピラザミン	小平	96.8	96.8	2.7	0.7	5.6	5.7
	横浜	96.6	102.8	3.7	1.5	4.2	1.6
	神戸	92.7	95.3	2.5	7.5	4.4	7.5
フルチアニル	小平	96.6	97.6	2.9	1.1	6.0	6.2
	横浜	96.4	96.3	4.0	1.6	4.0	2.1
	神戸	94.9	94.8	4.2	5.9	4.4	5.9
ミルベメクチン A3	小平	93.0	93.3	2.8	2.5	12.5	7.0
	横浜	94.7	87.9	3.5	2.1	4.0	3.6
	神戸	90.1	89.6	7.2	6.4	8.4	6.4
ミルベメクチン A4	小平	105.1	93.6	2.1	1.4	8.2	5.9
	横浜	100.9	90.8	5.4	3.0	10.2	3.0
	神戸	93.6	89.9	5.2	6.9	10.9	6.9

※表 4 の目標値を満たさなかった数値を網掛け

表 8. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度

農薬名	回収率 (%) n=30		併行精度 RSD (%)		室間精度 RSD (%)	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
エタボキサム	53.9	49.5	6.8	8.9	37.9	38.7
ピリベンカルブ	98.2	96.8	4.2	3.9	5.3	5.2
ピリベンカルブ代謝物	98.7	96.1	5.1	3.8	6.2	5.2
フェンピラザミン	95.3	98.3	3.0	4.3	4.9	5.9
フルチアニル	96.0	96.3	3.7	3.6	4.5	4.9
ミルベメクチン A3	92.6	90.2	4.8	4.1	8.7	6.0
ミルベメクチン A4	99.9	91.4	4.4	4.3	10.4	5.3

※表 4 の目標値を満たさなかった数値を網掛け

## 10. まとめ

新規対象農薬 5 種類について, LC-MS/MS 測定による一斉法(きゅうり)の妥当性評価を行った。この結果, エタボキサムを除く 4 種の農薬は, 全ての試験室で妥当性評価のパラメータが目標値等に適合した。エタボキサムは光により変質するおそれがあることが報告されており<sup>5)</sup>, 目標値等に適合しなかった原因として, 標準液中または抽出工程における分解の影響が考えられる。

これらの結果から, 4 農薬について一斉法による分析が可能であることが確認された。(表 9)

### 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬, 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。

- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について, 平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号。
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：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関する質疑応答集 (Q&A) について, 平成 23 年 12 月 8 日付け食安基発 1208 第 1 号。
- 4) JIS K 0136 : 2015, 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則。
- 5) 富士フィルム和光純薬, エタボキサム標準品安全データシート  
<https://labchem-wako.fujifilm.com/sds/W01W01-05-0847JGHEJP.pdf> (2021 年 10 月時点)

表 9. 結果のまとめ

農薬名	選択性	真度	精度 (併行)	精度 (室内)	定量限界	判定
エタボキサム	○	×	○	×	○	×
ピリベンカルブ	○	○	○	○	○	○
ピリベンカルブ代謝物	○	○	○	○	○	○
フェンピラザミン	○	○	○	○	○	○
フルチアニル	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A3	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A4	○	○	○	○	○	○