

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

坂部亮介*¹, 山本謙吾*¹, 大原 望*²

中村健二*², 臼井裕一*³, 野村哲也*³

*¹ 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

*² 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

*³ 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) を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法について、11 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、7 農薬については、すべ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に適合していた。

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

結 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。

令和 5 年度に予定されている「ミニトマト」は, センターの初調査となることから, 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 11 農薬 (以下, 新規対象農薬) について, 厚生労働省通知¹⁾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) に基づき検討を行った。

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」^{2, 3)} (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

ミニトマト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 11 農薬を対象とした。

イソピラザム, イプロジオン, シアントラニリプロール, ジノテフラン, ピリベンカルブ, フェンピラザミン, フルキサメタミド, フルチアニル, フロニカミド, ミルベメクチン, レピメクチン

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

小平にて栽培・収穫し, 新規対象農薬が検出されないことを確認したミニトマト (以下, ブランク試料) を各試験室で試料として用いた。

3.2. 添加濃度

新規対象農薬の中で最も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 : イソピラザム (syn 体および anti 体の混合物) は林純薬工業株式会社, イプロジオン, イプロジオン代謝物, シアントラニリプロール, 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, フルキサメタミド, フルチアニル, フロニカミドおよびレピメクチン (A3 および A4

の混合物)は富士フィルム和光純薬株式会社製の標準品を使用した。各農薬標準品をアセトニトリルで溶解し 500 µg/mL の標準原液を調製した。ジノテフランは林純薬工業株式会社製の標準液 (1000 µg/mL) , ミルベメクチン A3 および A4 は Dr.Ehrenstorfer 製の標準液 (各 10 µg/mL) を使用した。

混合標準液：標準原液を混合し 20 µg/mL のアセトニトリル溶液となるように調製した。

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、ジノテフラン標準液ならびにミルベメクチン A3 および A4 標準液をアセトニトリルで適宜希釈・混合して調製した。

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ー(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 (500 mg/500 mg) をアセトニトリル・トルエン (3:1) 10 mL 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. 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部：島津製作所製 Nexera

MS 部：島津製作所製 LCMS-8045

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, 分析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 分放置した後に抽出を開始した。

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たのち, アセトン・n-ヘキサン (1:1) 混液に溶解し正確に 1 mL 定容したものを試験溶液とした。

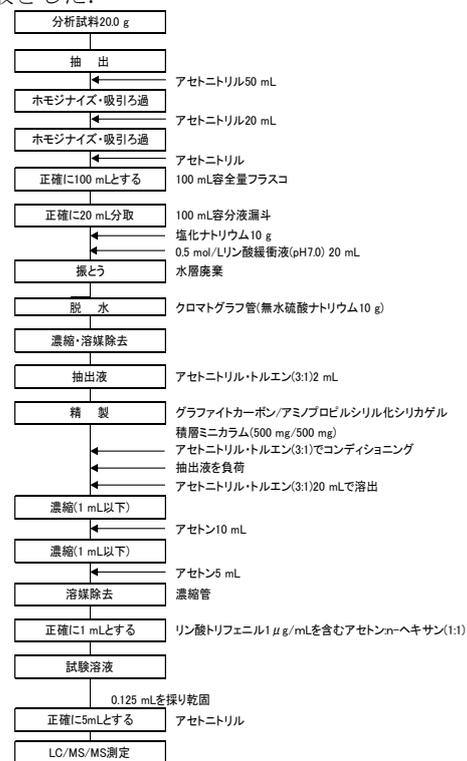


図1. 一斉試験法(野菜)フローチャート

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。

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
イソピラザム	+	360 > 244	360 > 320
イブロジオン	-	328 > 243	330 > 245
イブロジオン代謝物	-	328 > 141	330 > 141
シアントラニリブロール	+	475 > 286	475 > 444
ジノテフラン	+	203 > 129	203 > 114
ピリベンカルブ	+	362 > 239	362 > 207
ピリベンカルブ代謝物	+	362 > 239	362 > 122
フェンピラザミン	+	332 > 230	332 > 189
フルキサメタミド	+	474 > 400	475 > 401
フルチアニル	+	427 > 192	427 > 411
フロニカミド	+	230 > 203	230 > 148
ミルベメクチン A3	+	546 > 511	546 > 147
ミルベメクチン A4	+	560 > 525	560 > 507
レビメクチン A3	+	724 > 510 (小平・神戸) 723 > 509 (横浜)	723 > 153
レビメクチン A4	+	738 > 524 (小平・神戸) 738 > 523 (横浜)	738 > 167

表 2. LC-MS/MS 測定条件

LC/MS名	: 島津製 LCMS-8045
カラム	: Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径 2.1 mm、長さ100 mm、ODS粒径2 μm
流量	: 0.2 mL/min
オープン温度	: 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
イオン化モード	: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, ESI-)
分析モード	: 多重反応モニタリング法 (MRM)
インターフェイス温度	: 200 °C
DL温度	: 150 °C
ネブライザーガス流量	: 3.00 L/min
ヒーティングガス流量	: 10.00 L/min
ヒートブロック温度	: 200 °C
ドライビングガス流量	: 10.00 L/min (小平、横浜)、 5.00L/min (神戸)

表 3. グラジエント条件

時間 (min)	A液:B液 (比)		A液:B液 (比)
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

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、その試験溶液（以下、ブランク試料溶液）を LC-MS/MS で測定して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 (新規対象農薬の中で最も低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値 0.2ppm の 10 分の 1 に相当)、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

ブランク試料溶液を分析したところ、いずれの新規対象農薬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、すべての新規対象農薬

について、0.0005~0.1 μg/mL, または 0.001~0.1 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。イプロジオンおよびミルベメクチンを除く 9 種の新規対象農薬について、目標値を満たした。

9.4. 真度および精度

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。イプロジオン、ジノテフランおよびレピメクチンを除く 8 種の新規対象農薬について、ガイドラインに示された真度および精度の目標値を満たした。

9.5. 空間再現性 (参考)

3 試験室それぞれに行った枝分かかれ試験結果から求めた試験室間の真度 (回収率) および精度 (併行精度および室内精度) を表 8 に示した。

表 5. 直線性の範囲と相関係数

農薬名	小平		横浜		神戸	
	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)
イソピラザム	0.0005-0.1	0.9988	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9986
イプロジオン	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	1.0000	0.001-0.1	1.0000
イプロジオン代謝物	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	1.0000
シアントラニリプロール	0.0005-0.1	0.9981	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9999
ジノテフラン	0.0005-0.1	0.9986	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9982
ピリベンカルブ	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9989
ピリベンカルブ代謝物	0.0005-0.1	0.9995	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9987
フェンピラザミン	0.0005-0.1	0.9983	0.0005-0.1	0.9989	0.0005-0.1	0.9983
フルキサメタミド	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	1.0000	0.0005-0.1	0.9998
フルチアニル	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9998
フロニカミド	0.0005-0.1	0.9981	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	1.0000
ミルベメクチン A3	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999
ミルベメクチン A4	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	1.0000	0.0005-0.1	1.0000
レピメクチン A3	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9995	0.001-0.1	0.9997
レピメクチン A4	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999

表 6. 検出限界および定量限界

農薬名 (目標値)	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソピラザム	0.00005	0.00017	0.00049	0.00017	0.00056	0.00164
イプロジオン	0.00006	0.00104	0.00612	0.00020	0.00346	0.02041
イプロジオン代謝物	0.00004	0.00019	0.00119	0.00015	0.00063	0.00397
シアントラニプロール	0.00011	0.00013	0.00024	0.00038	0.00043	0.00081
ジノテフラン	0.00088	0.00095	0.00163	0.00293	0.00318	0.00543
ピリベンカルブ	0.00061	0.00010	0.00060	0.00204	0.00033	0.00201
ピリベンカルブ代謝物	0.00056	0.00040	0.00161	0.00186	0.00133	0.00538
フェンピラザミン	0.00008	0.00006	0.00096	0.00026	0.00020	0.00321
フルキサメタミド	0.00003	0.00021	0.00144	0.00012	0.00069	0.00479
フルチアニル	0.00016	0.00041	0.00088	0.00053	0.00136	0.00292
フロニカミド	0.00007	0.00013	0.00127	0.00023	0.00043	0.00422
ミルベメクチン A3	0.00275	0.00135	0.01190	0.00916	0.00449	0.03967
ミルベメクチン A4	0.00116	0.00114	0.00537	0.00386	0.00380	0.01790
レピメクチン A3	0.00007	0.00100	0.00491	0.00023	0.00333	0.01637
レピメクチン A4	0.00020	0.00050	0.00209	0.00067	0.00166	0.00696

※目標値を満たさなかった数値を網掛け

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
イソピラザム	小平	101.5	105.3	7.6	3.5	9.6	5.4
	横浜	96.5	96.2	3.3	0.4	3.7	1.4
	神戸	93.9	95.9	9.4	6.3	10.2	6.7
イプロジオン	小平	86.2	103.8	6.8	2.4	9.0	6.8
	横浜	99.2	98.4	6.0	1.4	6.0	1.8
	神戸	98.3	96.7	9.4	5.5	20.3	6.9
イプロジオン代謝物	小平	98.8	99.1	5.3	1.6	6.4	4.0
	横浜	89.2	98.2	7.1	2.1	7.1	2.2
	神戸	97.2	93.1	6.1	6.1	11.2	12.2
シアントラニプロール	小平	94.2	91.9	3.4	5.3	6.8	5.5
	横浜	99.0	97.0	3.3	0.8	3.8	1.9
	神戸	91.4	89.9	5.1	3.6	11.7	7.5
ジノテフラン	小平	77.8	76.7	4.5	1.3	4.5	4.2
	横浜	70.1	74.2	2.5	0.6	5.7	2.1
	神戸	69.4	67.2	5.5	3.2	17.9	6.7
ピリベンカルブ	小平	98.9	99.2	4.4	3.2	5.1	5.1
	横浜	98.8	97.9	1.9	0.6	2.2	0.7
	神戸	97.2	92.3	4.1	4.5	8.7	8.6
ピリベンカルブ代謝物	小平	98.1	97.9	5.8	2.5	14.6	3.8
	横浜	96.2	96.0	1.7	0.7	2.4	1.8
	神戸	93.7	95.0	8.2	2.8	15.1	8.1

フェンピラザミン	小平	95.5	97.9	3.3	3.3	9.1	7.4
	横浜	98.8	98.9	2.9	0.7	2.9	1.8
	神戸	93.3	95.1	4.6	4.3	8.7	6.1
フルキサメタミド	小平	92.9	98.6	10.3	4.5	10.3	5.1
	横浜	100.9	97.6	2.6	2.2	3.7	2.3
	神戸	96.3	92.4	8.6	8.0	10.8	11.6
フルチアニル	小平	99.9	99.7	4.9	2.5	5.0	4.7
	横浜	97.6	97.3	6.0	1.2	6.0	1.6
	神戸	97.7	95.1	5.1	6.1	8.7	9.0
フロニカミド	小平	97.6	99.6	7.4	2.8	7.4	3.6
	横浜	93.3	95.8	4.1	1.1	5.0	1.8
	神戸	84.3	87.9	7.3	3.6	10.0	8.1
ミルベメクチン A3	小平	94.9	102.3	6.0	2.6	8.3	6.0
	横浜	95.6	95.4	1.4	1.3	2.1	2.5
	神戸	95.0	92.9	6.6	4.7	9.2	5.8
ミルベメクチン A4	小平	94.7	99.1	5.7	1.5	6.5	3.9
	横浜	100.9	97.1	1.4	1.1	2.4	2.1
	神戸	89.1	92.4	8.4	3.4	12.6	3.9
レピメクチン A3	小平	99.9	97.4	9.8	9.0	10.7	9.0
	横浜	99.9	99.0	6.9	2.3	9.3	3.3
	神戸	94.6	95.2	27.9	5.7	27.9	11.6
レピメクチン A4	小平	92.1	96.3	3.9	4.1	11.1	6.6
	横浜	99.4	94.7	3.2	2.5	3.4	2.9
	神戸	90.9	91.3	6.5	5.6	8.7	7.3

※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
イソピラザム	97.3	99.1	7.2	4.1	8.7	6.6
イブロジオン	94.5	99.6	7.6	3.5	14.2	6.3
イブロジオン代謝物	95.0	96.8	6.1	3.8	9.1	7.4
シアントラニリプロール	94.8	92.9	4.0	3.7	8.1	6.0
ジノテフラン	72.4	72.7	4.4	1.9	11.4	7.1
ピリベンカルブ	98.3	96.5	3.7	3.1	5.6	6.2
ピリベンカルブ代謝物	96.0	96.3	5.9	2.2	11.6	5.0
フェンピラザミン	95.8	97.3	3.6	3.1	7.3	5.5
フルキサメタミド	96.7	96.1	7.7	5.3	9.0	7.4
フルチアニル	98.4	97.3	5.4	3.8	6.2	5.9
フロニカミド	91.7	94.4	6.4	2.7	9.5	7.1
ミルベメクチン A3	95.1	96.8	5.2	3.2	6.9	6.4
ミルベメクチン A4	94.9	96.2	5.7	2.2	9.1	4.4
レピメクチン A3	98.1	97.2	17.0	6.3	17.0	8.0
レピメクチン A4	94.1	94.1	4.6	4.2	8.7	6.0

10. まとめ

新規対象農薬 11 種類について、LC-MS/MS 測定によるミニトマトの一斉法妥当性評価を行った。この結果、イプロジオン、ジノテフラン、ミルベメクチンおよびレピメクチンを除くイソピラザム、シアントラニリプロール、ピリベンカルブ、フェンピラザミン、フルキサメタミド、フルチアニルおよびフロニカミドの 7 種の農薬は、すべての試験室で妥当性評価のパラメータがガイドラインの目標値に適合した。

イプロジオン、ミルベメクチンおよびレピメクチンは定量限界または低濃度における精度が目標値を満たさなかったが、真度および高濃度における精度は良好な結果が得られていることから、測定機器の感度不足が原因の一つと考えられる。一方、ジノテフランは真度が目標値を下回ったが、精度は問題ないことから、抽出工程においてうまく回収できなかったことが原因の一つと考えられる。

これらの結果から、7 農薬についてミニトマトの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。

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
イソピラザム	○	○	○	○	○	○
イプロジオン	○	○	○	×	×	×
イプロジオン代謝物	○	○	○	○	○	
シアントラニリプロール	○	○	○	○	○	○
ジノテフラン	○	×	○	○	○	×
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	○	○	○	○	○	○
フルキサメタミド	○	○	○	○	○	○
フルチアニル	○	○	○	○	○	○
フロニカミド	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A3	○	○	○	○	×	×
ミルベメクチン A4	○	○	○	○	○	
レピメクチン A3	○	○	×	×	○	×
レピメクチン A4	○	○	○	○	○	