

残留農薬分析業務における分析法の検討

米穀における調査対象農薬追加のための一斉試験法Ⅱ（農産物）の妥当性検証

佐々木秀幸*¹，守山智章*¹，青山吉一*²，野村哲也*²，山田篤司*³，鈴木徹也*³

*¹独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

*²独) 農林水産消費安全技術センター 神戸センター

*³独) 農林水産消費安全技術センター 本部横浜事務所

「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）」の米穀において妥当性の確認を行っていない10農薬について、厚生労働省の「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試験室において分析の妥当性を確認した。その結果、すべての試験室において、妥当性評価の分析性能パラメータが、ガイドラインに示されたそれぞれの目標値に適合していた。

Keywords：残留農薬，米穀，妥当性評価ガイドライン，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では、「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」¹⁾の別添 第2章一斉試験法（以下、通知一斉法）の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」および「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」に対応した「農薬実態調査課 GC/MS・LC/MSによる農薬等の一斉試験法（米穀・麦類・大豆）手順書」（以下、一斉試験法（米穀等））により米穀の農薬を分析している。

米穀における調査対象農薬追加を目的として、通知一斉法の「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）」（以下、一斉試験法Ⅱ（農産物））で分析対象とされる10農薬について、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下、LC/MS/MS）を用いて新たに分析法を検証した。検証法は「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）に基づく、試験室毎のシングルラボバリデーションとした。

材料および方法

1. 検証を行った試験室

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）
- ・ 本部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. 対象農薬

MCPA，MCPB，アジムスルフロン，イマゾスルフロン，エトキシスルフロン，シクロスルファミロン，ハロスルフロンメチル，ピラゾスルフロンエチル，ペノキススラムおよびベンスルフロンメチルの10農薬。

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

農薬の使用履歴が明らかな国内産米穀（玄米）とし、3試験室で同一の試料を用いた。

3.2. 添加濃度

一律基準である0.01 mg/kg（以下、低濃度）およびその10倍にあたる0.1 mg/kg（以下、高濃度）の2濃度とした。

4. 試薬等

4.1. 標準品

農薬標準品：農薬混合標準溶液 PL16-2（和光純

薬工業株式会社製、各 20 µg/mL アセトニトリル溶液)を使用した。農薬混合標準溶液に含まれない MCPB は、農薬標準品(和光純薬工業株式会社製)をアセトニトリルで溶解して 500 µg/mL の標準原液を調製し、さらにアセトニトリルで希釈して 20 µg/mL 標準溶液とした。

混合標準液:農薬混合標準溶液 PL16-2 と MCPB 標準溶液を混合し、アセトニトリルで希釈して 1 µg/mL の混合標準液とした。

添加回収試験用標準液:混合標準液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した。

検量線用標準液:混合標準液をメタノールに溶媒置換し、メタノー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)、n-ヘキサン(残留農薬試験用)、メタノール(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)、塩化ナトリウム(残留農薬試験用)、トリエチルアミン(特級)、塩酸(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。

4.3. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

4.4. シリカゲルミニカラム

Waters 製 Sep-Pak Vac Silica (500 mg)

4.5. オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

Waters 製 Sep-Pak Vac C18 (1 g)

4.6. 水

超純水製造装置(ミリポア製)を使用した。

4.7. ロータリーエバポレーター

BÜCHI 製 R-200, R210

4.8. 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 ACCQUITY TQD (横浜)

5. 前処理方法

5.1. 抽出

図1の米穀における一斉試験法Ⅱ(農産物)前処理フローに従い水を加え膨潤させた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 0.01 mol/L 塩酸を加えて振とうした後、水層を分離除去した。添加回収試験は、試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分程度放置した後に抽出を開始した。

5.2. 精製

アセトニトリル層をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、脱水した後、シリカゲルミニカラムで精製し、メタノールに溶解したものを試験溶液とした。

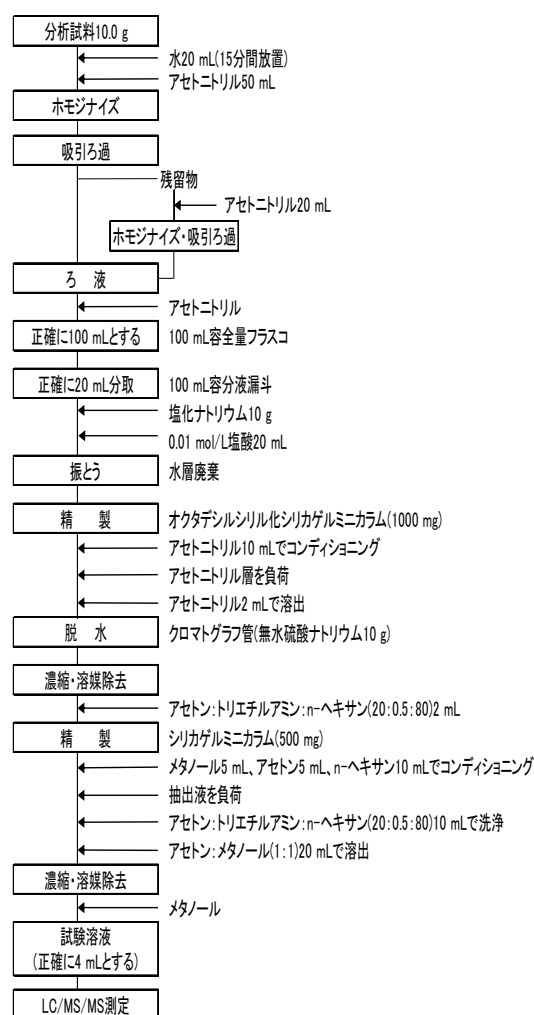


図1. 米穀における一斉試験法Ⅱ(農産物)前処理フロー

6. 測定条件

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

表 1-1. LC/MS/MS 測定イオン

農薬名	測定モード	モニターイオン (定量) m/z	モニターイオン (定性) m/z
MCPA	—	199>141	201>143
MCPB	—	227>141	229>143
アジメスルフロ	+	425>182	425>139
イマゾスルフロ	+	413>153	413>156
エトキシスルフロ	+	399>261	399>218
シクロスファミロン	—	420>265	420>78
ハロスフロメチル	+	435>182	435>83
ピラゾスルフロエチル	+	415>182	415>83
ベノキスラム	+	484>195	484>164
ベンスフロメチル	+	411>149	411>182

表 1-2. LC/MS/MS 測定条件

カラム	: Wako 製 Wakopak Ultra C18-2 2.1 mm i. d. × 100 mm, 2 μm
流量	: 0.353 mL/min
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 1-3)
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, 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	: 400°C
脱溶媒ガス流量	: 800 L/hr

表 1-3. グラジエント条件

時間 (min)	A 液:B 液 (比)		A 液:B 液 (比)
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
~ 10			5:95

7. 試験法の妥当性評価方法

7.1. 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 回繰り返す。

7.2. 選択性の確認

あらかじめ検証の対象となる農薬を含まないことを確認した試料 (以下、ブランク試料) の試験溶液を作製し、LC/MS/MS で測定して定量を妨害するピークの有無を確認する。

7.3. 検量線の直線性の確認

0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 μg/mL の検量線用標準液を調製する。これらの標準液を 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、0.002 μg/mL から順次、測定濃度を大きくして、0.1 μg/mL まで相関係数 (r) が 0.995 以上を維持していることを確認する。

7.4. 検出限界および定量限界の確認

検出限界の目標値は 0.005 mg/kg、定量限界の目標値は 0.01 mg/kg とする。標準液を測定しピークの高さ (S) とピークの近傍 (ピークに対して、前後にピークの半値幅の 10 倍程度の範囲) のノイズ (N) の高さから S/N 比 3 相当の濃度を求めて試料中濃度に換算したものを検出限界とした。同様に S/N 比 10 相当の濃度を求めて試料中濃度に換算したものを定量限界とした。検出限界および定量限界の算出式を以下に示す。

- 検出限界 = $3 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$
- 定量限界 = $10 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$

7.5. 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 25% 未満、室内精度が 30% 未満、高濃度は真度 (回収率) が 70~120%、併行精度が 15% 未満、室内精度が 20% 未満を目標値とする。

表 2. 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 >

8. 結果および考察

8.1. 妥当性評価の結果

8.1.1. 選択性

ブランク試料には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。

8.1.2. 検量線の直線性

各試験室の検量線の直線性の結果を表3に示した。すべての農薬について、0.002~0.1 µg/mLの範囲で高い直線性（相関係数（r）が0.999以上）を有しており、相関係数（r）が0.995以上であることを確認した。

表3. 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
MCPA	0.002-0.1	0.9999	1.0000	0.9998
MCPB	0.002-0.1	0.9996	0.9995	0.9981
アジメスルフロ	0.002-0.1	0.9996	1.0000	0.9998
イマゾスルフロ	0.002-0.1	0.9991	0.9997	0.9994
エトキシスルフロ	0.002-0.1	0.9994	0.9999	0.9999
シクロスルファミロン	0.002-0.1	0.9993	0.9987	0.9996
ハロスルフロメチル	0.002-0.1	0.9993	0.9995	0.9999
ピラゾスルフロエチル	0.002-0.1	0.9999	0.9999	1.0000
ペノキスラム	0.002-0.1	0.9991	0.9999	0.9999
ペンスルフロメチル	0.002-0.1	0.9995	0.9997	0.9993

8.1.3. 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4に示した。いずれも目標値を満たしていた。

8.1.4. 真度および精度

各試験室の真度（回収率）および精度（併行精度および室内精度）の結果を表5に示した。

真度は、回収率がいずれもガイドラインに示された目標値70~120%の範囲内であった。

併行精度および室内精度は、いずれもガイドラインに示された目標値を満たしていた。

8.1.5. 空間再現精度の結果

参考として各試験室における5回繰り返しの併行測定結果の平均値（各試験室5個のデータ）について、真度（回収率）および精度（併行精度および室内精度）の結果を表6に示した。この結果も、ガイドラインの目標値をすべて満たしていた。

表4. 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
MCPA	0.00059	0.00023	0.00042	0.00194	0.00075	0.00138
MCPB	0.00075	0.00019	0.00058	0.00250	0.00064	0.00193
アジメスルフロ	0.00017	0.00002	0.00012	0.00057	0.00007	0.00038
イマゾスルフロ	0.00012	0.00004	0.00006	0.00038	0.00012	0.00018
エトキシスルフロ	0.00007	0.00001	0.00004	0.00023	0.00003	0.00011
シクロスルファミロン	0.00076	0.00037	0.00031	0.00253	0.00122	0.00101
ハロスルフロメチル	0.00009	0.00002	0.00004	0.00030	0.00005	0.00011
ピラゾスルフロエチル	0.00010	0.00001	0.00004	0.00031	0.00002	0.00011
ペノキスラム	0.00011	0.00001	0.00004	0.00035	0.00003	0.00011
ペンスルフロメチル	0.00004	0.00007	0.00004	0.00013	0.00023	0.00011

表 5. 回収率, 併行精度および室内精度

農薬名	試験室	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
MCPA	小平	77.8	93.3	7.7	4.3	7.9	6.6
	横浜	82.1	86.1	7.5	4.7	7.9	6.6
	神戸	79.6	77.9	12.1	3.1	12.1	6.0
MCPB	小平	89.4	91.3	10.4	3.4	11.1	5.2
	横浜	100.1	87.0	7.8	7.5	8.7	7.6
	神戸	93.5	86.2	8.8	3.6	16.9	7.8
アジムスルフロン	小平	83.2	87.1	4.0	2.9	4.1	4.8
	横浜	96.2	96.3	2.9	2.1	5.9	6.0
	神戸	87.8	91.3	4.2	2.5	9.5	10.4
イマゾスルフロン	小平	79.3	79.2	3.3	6.1	4.6	6.1
	横浜	94.5	94.3	2.9	3.3	4.4	6.4
	神戸	87.1	89.8	4.3	1.9	9.2	6.8
エトキシスルフロン	小平	90.3	92.9	5.8	2.4	5.8	5.4
	横浜	100.7	102.3	3.4	2.5	8.0	5.6
	神戸	90.8	95.5	6.5	2.9	10.9	5.7
シクロスルフアムロン	小平	86.9	86.1	8.0	3.7	8.0	3.7
	横浜	90.4	100.1	9.4	8.0	17.5	9.8
	神戸	93.3	93.0	13.9	5.5	16.1	8.5
ハロスルフロンメチル	小平	83.4	89.2	4.6	4.7	4.6	5.6
	横浜	96.4	99.3	2.2	3.0	5.4	6.2
	神戸	99.9	95.8	4.7	1.9	12.7	5.1
ピラゾスルフロンエチル	小平	80.5	88.4	3.2	3.4	3.3	6.1
	横浜	96.2	98.1	2.6	3.2	6.0	6.0
	神戸	92.9	94.0	2.8	3.1	8.9	6.6
ペノキスラム	小平	99.3	100.0	5.9	4.9	5.9	5.3
	横浜	99.9	101.0	2.0	3.1	4.5	7.3
	神戸	106.5	104.9	4.8	5.1	7.5	5.7
ベンスルフロンメチル	小平	101.2	104.4	2.9	3.4	2.9	4.0
	横浜	111.4	110.6	2.5	2.3	4.9	3.9
	神戸	110.8	107.2	3.9	2.3	6.8	4.7

表 6. 3 試験室の測定結果 (回収率, 併行精度および室間精度)

農薬名	回収率 (%) n=15		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
MCPA	79.8	85.8	6.3	5.8	6.3	10.4
MCPB	94.3	88.2	10.9	5.9	11.3	6.1
アジムスルフロン	89.0	91.6	6.4	7.3	9.4	8.3
イマゾスルフロン	87.0	87.8	6.0	5.7	10.3	10.2
エトキシスルフロン	93.9	96.9	7.4	5.3	9.1	6.9
シクロスルフアムロン	90.2	93.1	12.3	6.7	12.3	9.6
ハロスルフロンメチル	93.2	94.8	8.3	5.2	11.9	7.1
ピラゾスルフロンエチル	89.8	93.5	6.4	5.8	10.8	7.4
ペノキスラム	101.9	101.9	5.2	5.3	6.1	5.4
ベンスルフロンメチル	107.8	107.4	4.7	3.7	6.7	4.4

9. まとめ

一斉試験法Ⅱ（農産物）で分析対象とされる 10 農薬について、試料は米穀（玄米）とし、新たに LC/MS/MS 測定による分析法の検証を実施し、ガイドラインに基づく妥当性評価を行ったところ、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、それぞれの目標値等に適合していることが確認できた。

おわりに

妥当性評価の結果から、すべての試験室において、米穀（玄米）を対象試料とし、LC/MS/MS 測定による一斉試験法Ⅱ（農産物）が 10 農薬の分析法として導入できると考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発第 0124001 号第 2 章一斉試験法（通知試験法）
「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（農産物）」、「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）」
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発 1224 第 1 号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
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知，食安基発 1208 第 1 号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