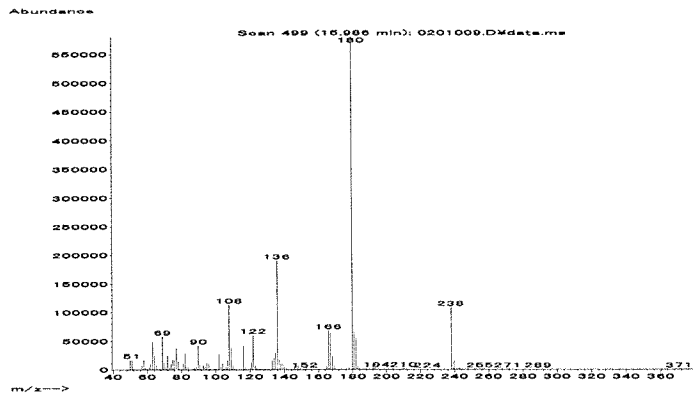


マススペクトル



検量線

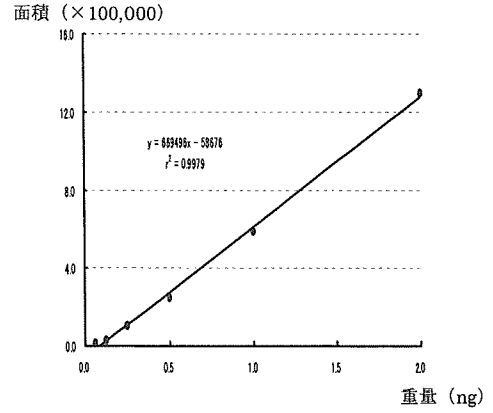
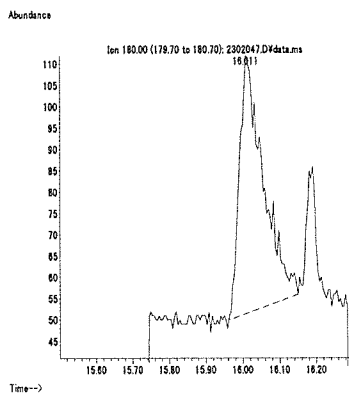
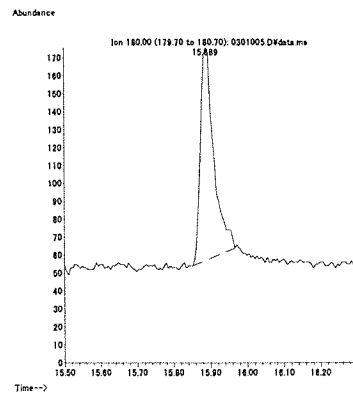


図 1. マススペクトルおよび検量線 (TCMTB)

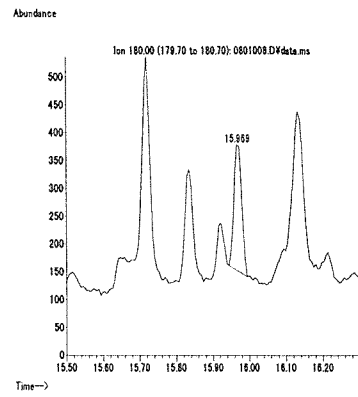
最小検出量評価 (0.04 ng)



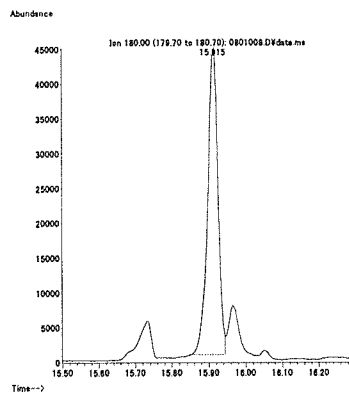
標準品 (0.125 ng)



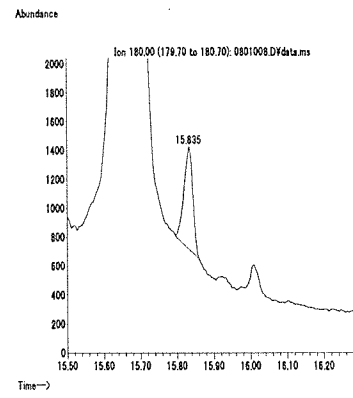
筋肉 (0.01 mg/kg 添加)



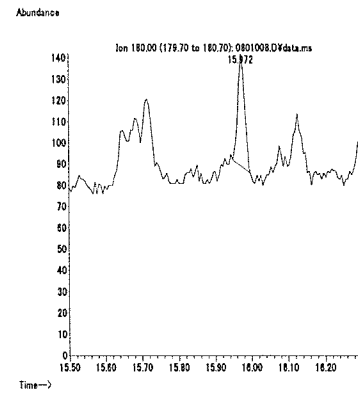
脂肪 (0.01 mg/kg 添加)



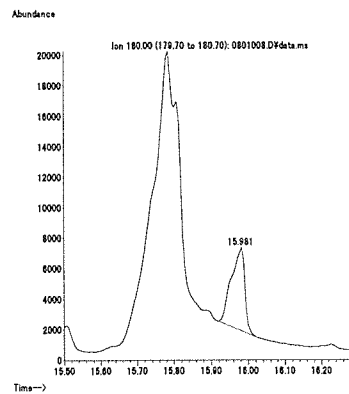
肝臓 (0.01 mg/kg 添加)



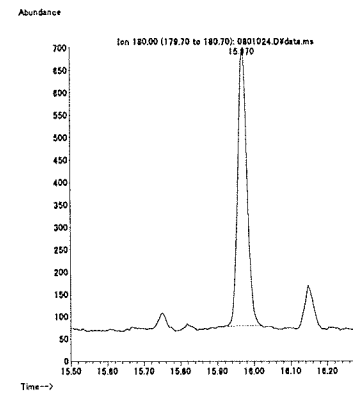
うなぎ (0.01 mg/kg 添加)



えび (0.01 mg/kg 添加)



牛乳 (0.01 mg/kg 添加)



卵 (0.1 mg/kg 添加)

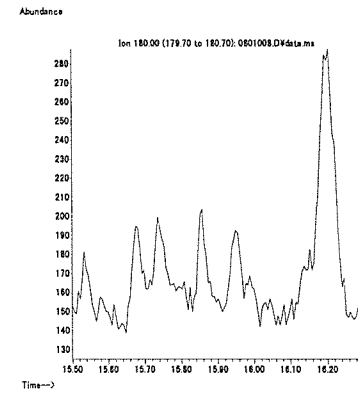
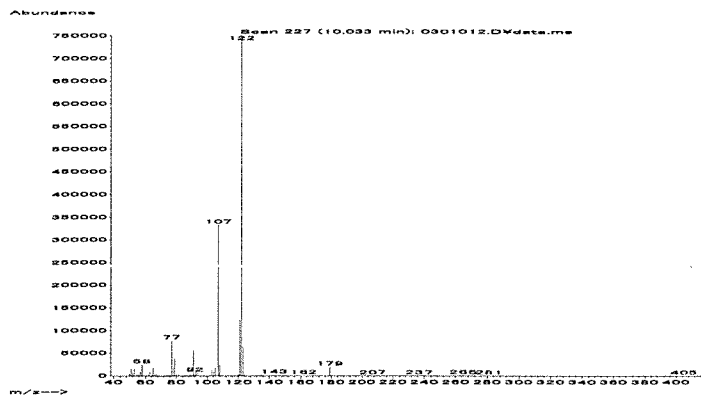


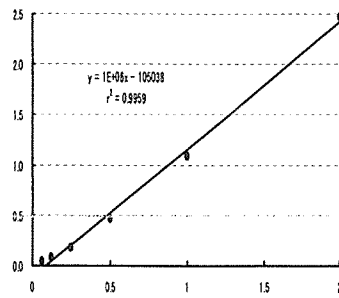
図 2. 最小検出量評価, 標準品, 回収試料のマスクロマトグラム (TCMTB)

マススペクトル



検量線

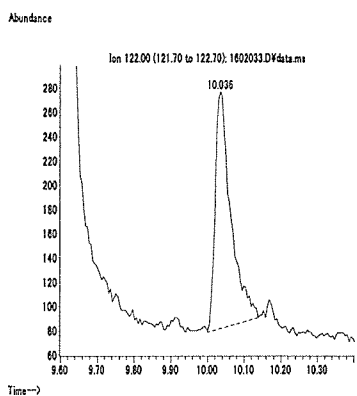
面積 (×1,000,000)



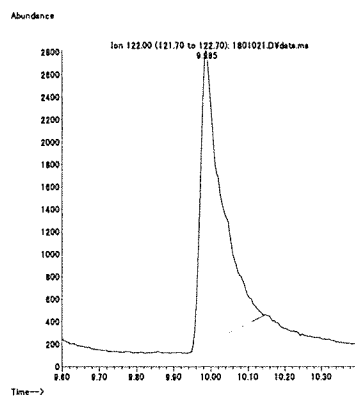
重量 (ng)

図 1. マススペクトルおよび検量線 (XMC)

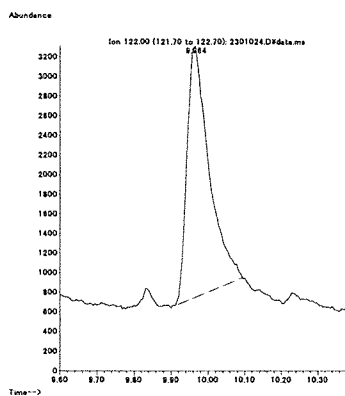
最小検出量評価 (0.01 ng)



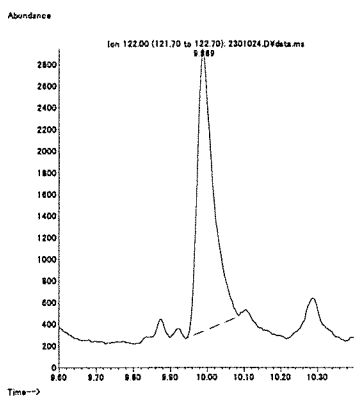
標準品 (0.125 ng)



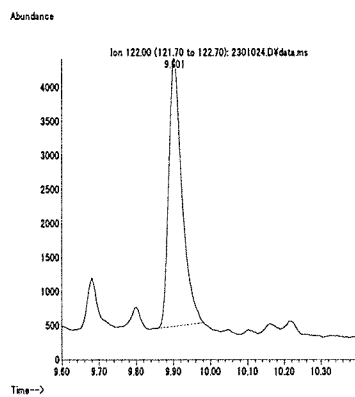
筋肉 (0.01 mg/kg 添加)



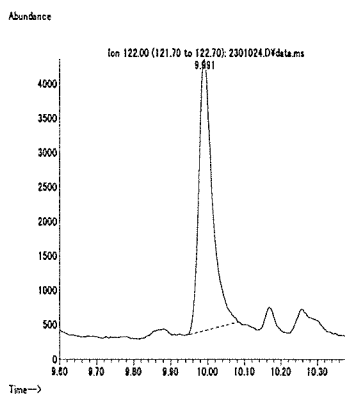
脂肪 (0.01 mg/kg 添加)



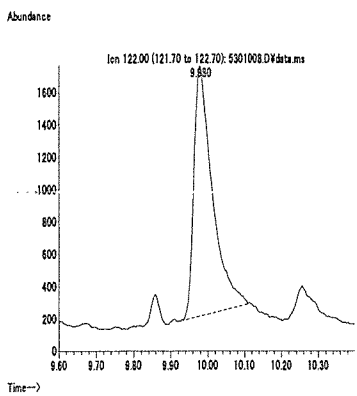
肝臓 (0.01 mg/kg 添加)



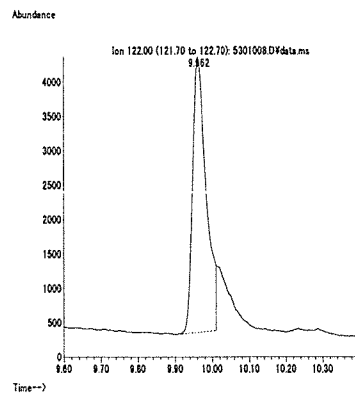
うなぎ (0.01 mg/kg 添加)



えび (0.01 mg/kg 添加)



牛乳 (0.01 mg/kg 添加)



卵 (0.01 mg/kg 添加)

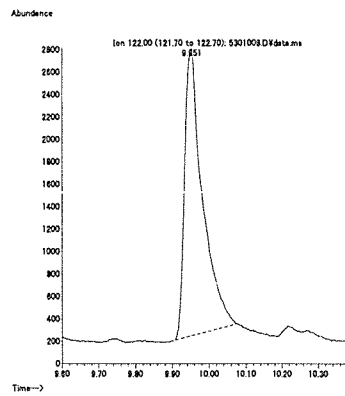


図 2. 最小検出量評価, 標準品, 回収試料のマスクロマトグラム (XMC)

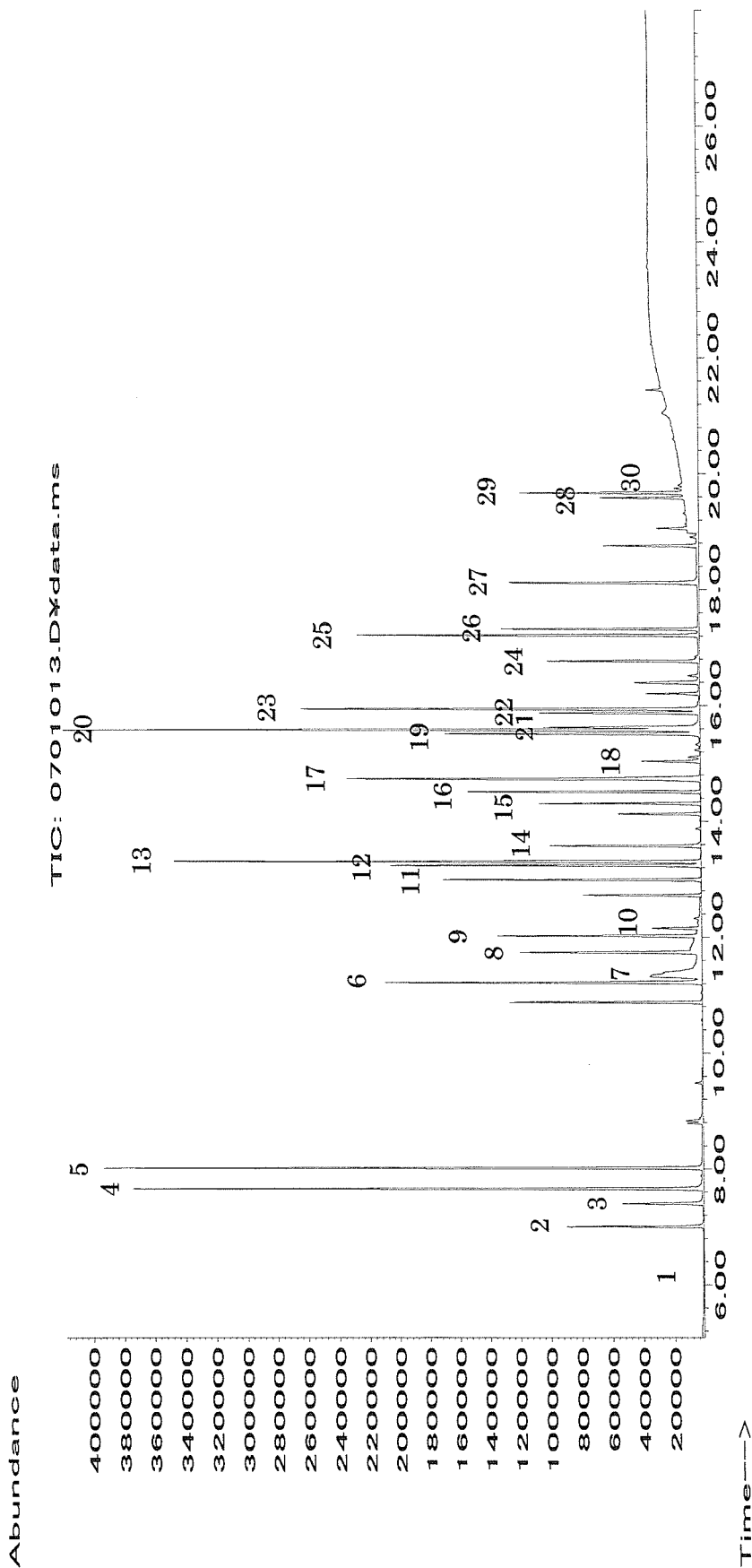


図 3. 混合標準溶液のトータルイオンクロマトグラムの例

グループ I-A (20 µg)

- 1:4-アミノピリジン, 2:アリドクロール, 3:ニコスルフロン, 4:ジクロロベンニル, 5:ジフェニル, 6:モノクロトホス, 7:ペンシクロン, 8:ジクロラン, 9:プロパジン, 10:ジオキサチオン,
- 11:ペノキサコール, 12:ジクロロフェンチオン, 13:プロモプチド, 14:アシベンゾラル-S-メチル, 15:チアゾピル, 16:ニトロタールイソプロピル, 17:ジフェナミド, 18:ホスチアゼート,
- 19:キノメチオナート, 20:フェノチオカルブ, 21:バミドチオン, 22:TCMTB, 23:ナプロパミド, 24:フルフェンピルエチル, 25:フルアクリピリム, 26:イソキサジフェンエチル,
- 27:オキシカルボキシ, 28:ラクトフェン, 29:アイオキシニル, 30:フロラスタム

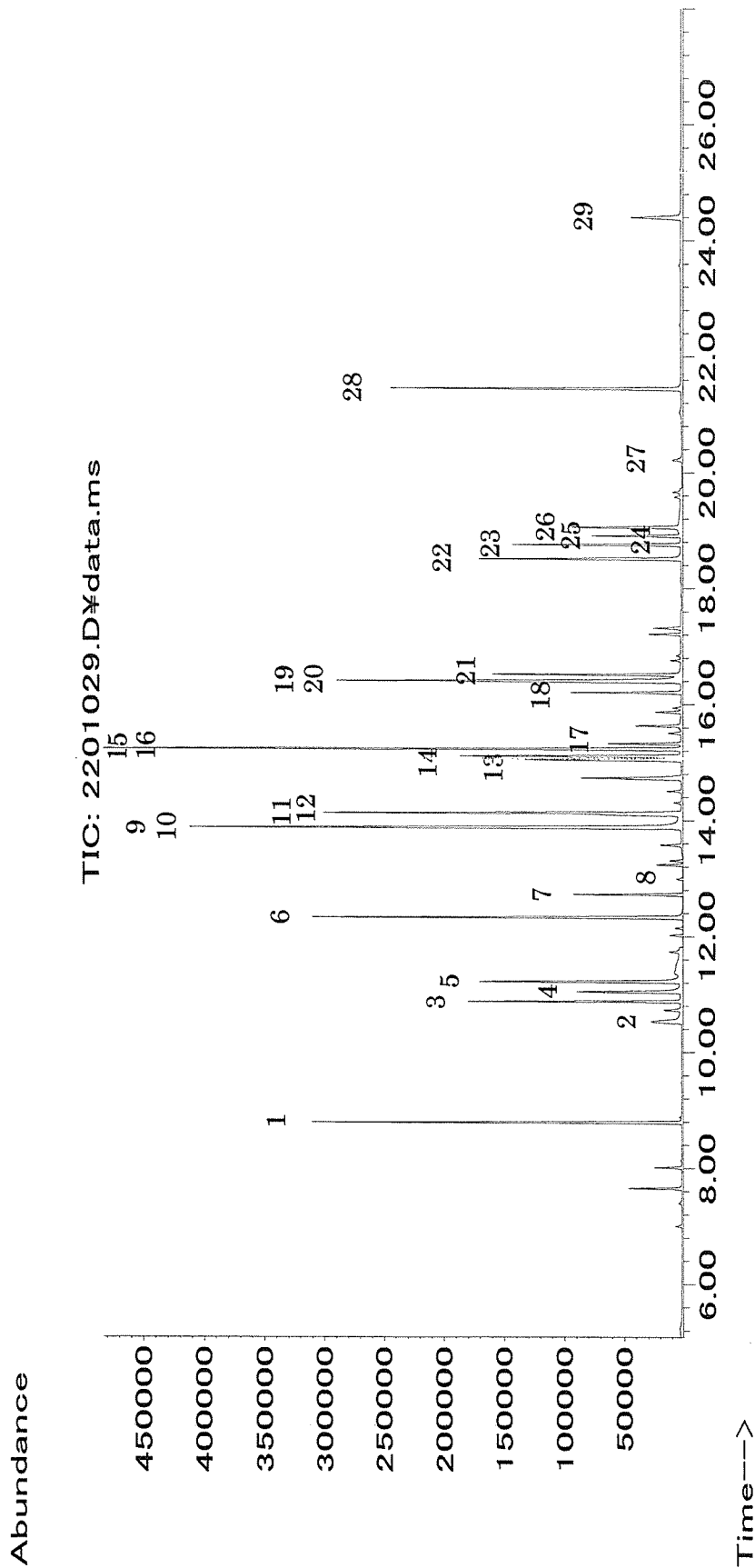


図 3. 混合標準溶液のトータルイオンクロマトグラムの例 (続き)

グループ 1-B (20 µg)

1: ペブレート, 2: アラニカルブ, 3: フルオメツロン, 4: クロルプロファミ, 5: メタベンズチアズロン, 6: ピロキロン, 7: ジクロン, 8: イサノホス, 9: トリネキサパックエチル,

10: 2-(1-ナフチル)アセタミド, 11: プロベナゾール, 12: ジクロフルアニド, 13: エチクロゼート, 14: トリルアルアニド, 15: キナルホス, 16: ジメビペレート, 17: ホルペット,

18: イプロバリカルブ, 19: メタミトロン, 20: アザコナゾール, 21: イソキサチオン, 22: フェノキシカルブ, 23: テブフェンピラド, 24: ベンジルアデニン, 25: テトララジホン, 26: アニロホス,

27: オリザリン, 28: エトフェンプロックス, 29: シニドンエチル

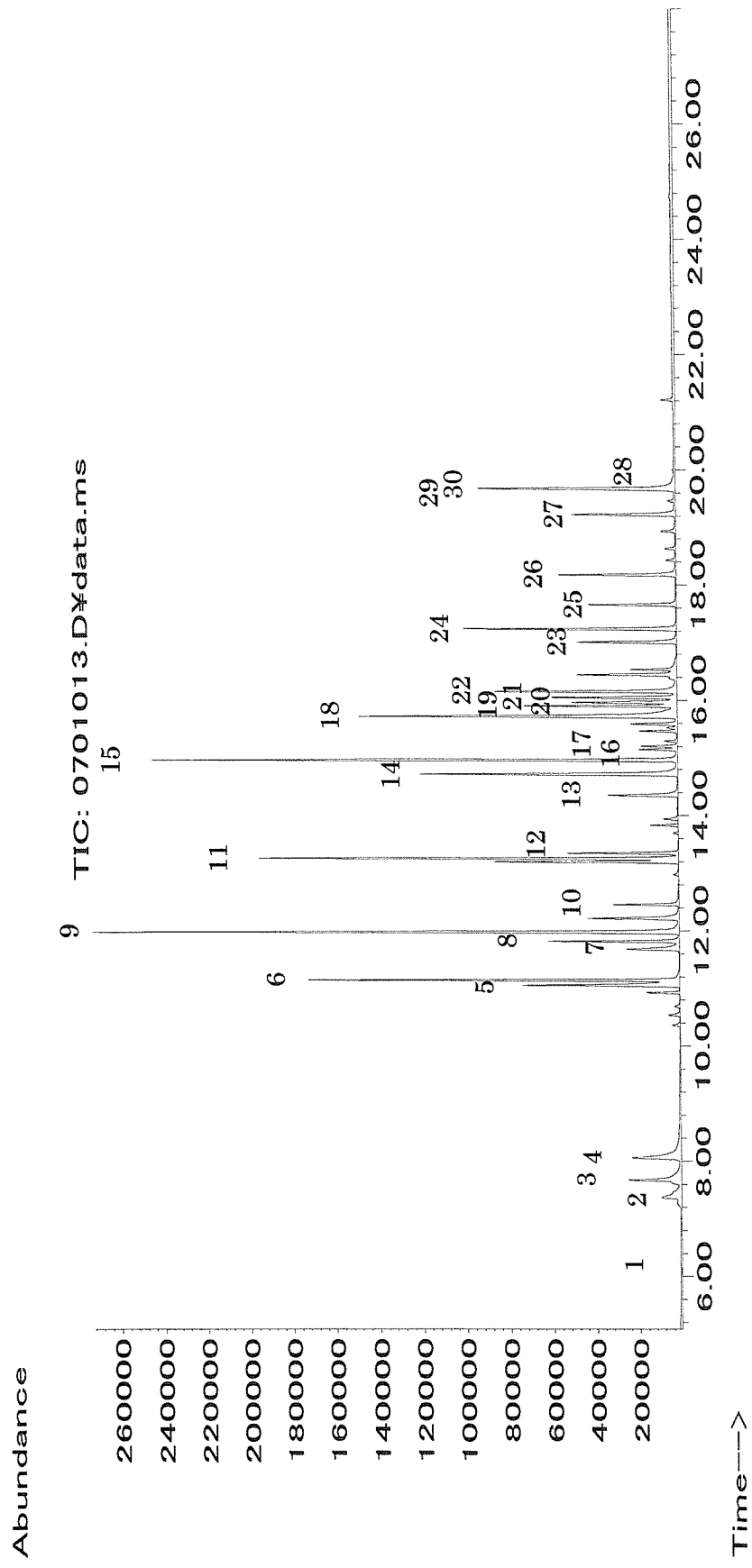


図 3. 混合標準溶液のトータルイオンクロマトグラムの例 (続き)

グループ 2-A (20 µg)

- 1: ヒメキサゾール, 2: アジメスルプロン, 3: ジクロルミド, 4: プロバモカルブ, 5: ジクロトホス, 6: ベンフルラリン, 7: フルオルイミド, 8: フリラゾール, 9: クロマン, 10: ホスファミド, 11: ジメテナミド, 12: アセトクロール, 13: シアナジン, 14: プロモホス, 15: フサライド, 16: ジメタメトリン, 17: アニラジン, 18: メパニピリム, 19: ブタミホス, 20: ヘキサコナゾール, 21: メトミノストロビン[E], 22: ウニコナゾールP, 23: オキサジキシル, 24: スルプロホス, 25: ピラフルフェンエチル, 26: ギキサミド, 27: ホサロン, 28: トラルコキシジム, 29: ナプロアニリド, 30: アクリナトリン

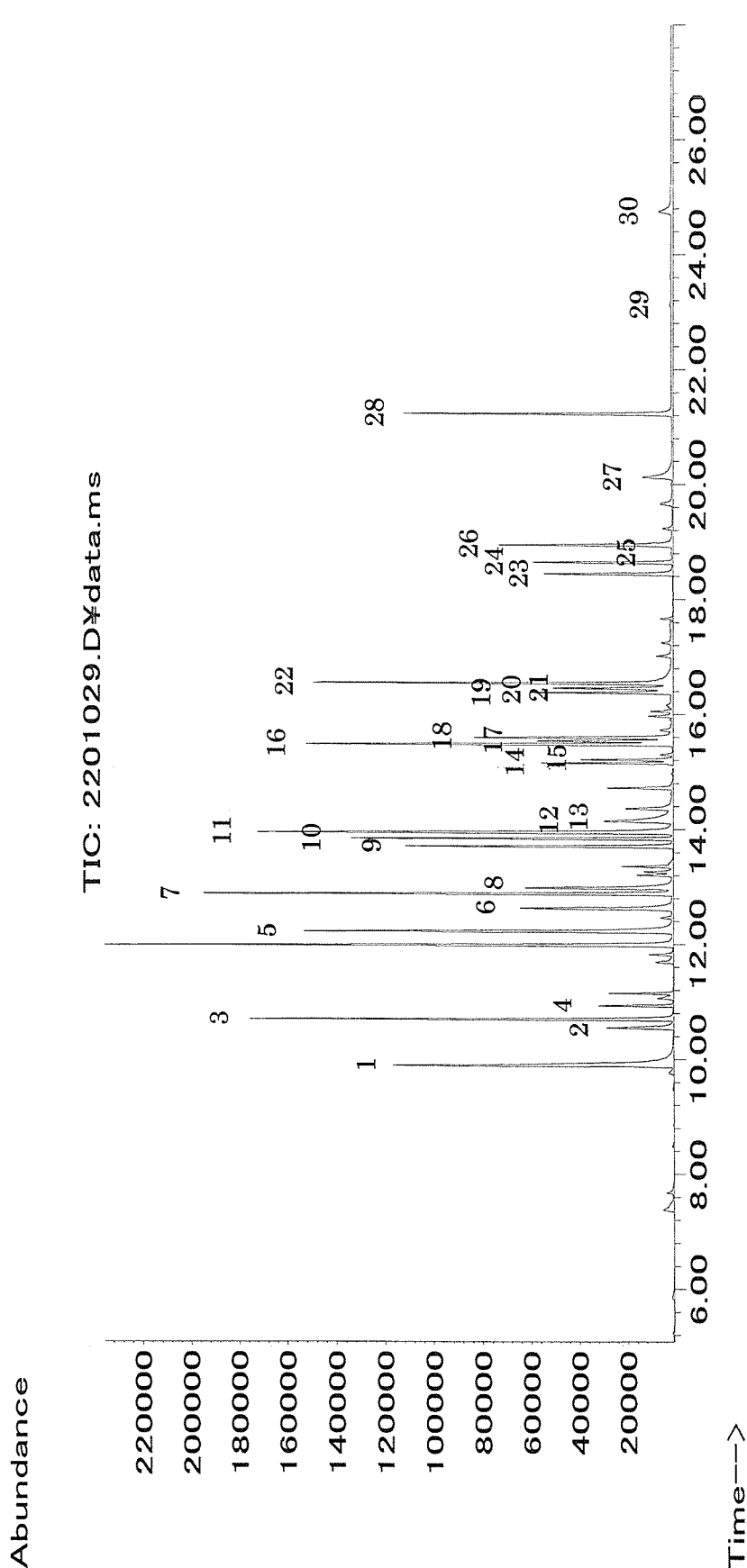


図 3. 混合標準溶液のトータルイオンクロマトグラムの例 (続き)

グループ 2-B (20 µg)

- 1:クロムプロップ, 2:XMC, 3:デメトン-S-メチル, 4:シクロエート, 5:エタルフルラリン, 6:シアノホス, 7:ターバシル, 8:イプロペンホス, 9:ホルモチオン, 10:フェンクローホス,
- 11:ジチオピル, 12:メチオカルブ, 13:メタンゾール, 14:キノクラミン, 15:メカルバム, 16:フェントエート, 17:プロモホスエチル, 18:プロパホス, 19:パクロブトラゾール, 20:ズピリメート,
- 21:イマザメタベンズメチルエステル, 22:メトミノストロビン[2], 23:シフルフェナミド, 24:ピリダフェンチオン, 25:ピペロホス, 26:フルスルファミド, 27:ナブタラム,
- 28:ハルフェンプロックス, 29:ジクロスラム, 30:フルチアセットメチル

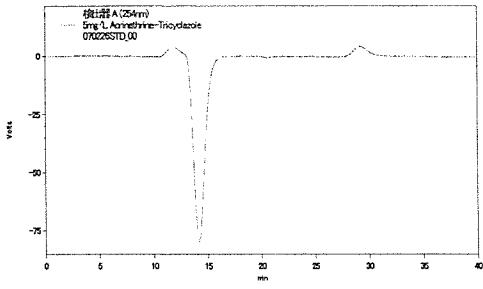
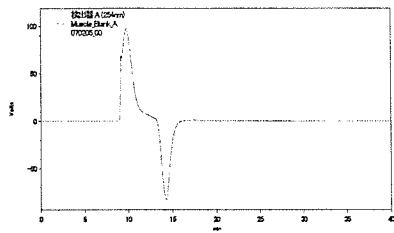
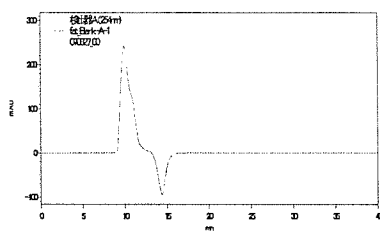


図 4. アクリナトリン及びトリシクラゾールの GPC クロマトグラム
筋肉

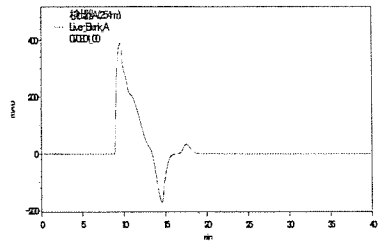
脂肪



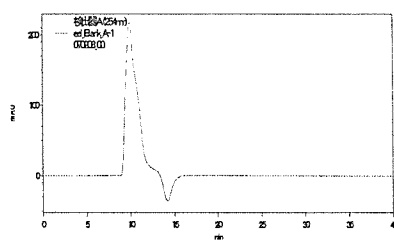
肝臓



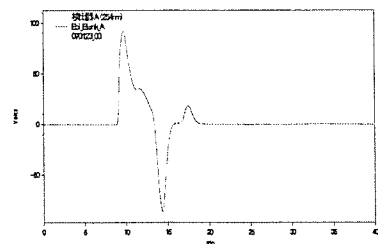
うなぎ



えび



牛乳



卵

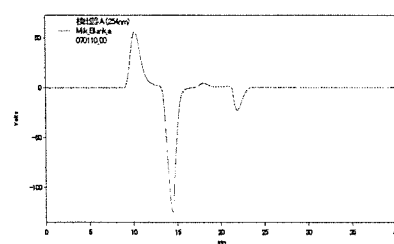
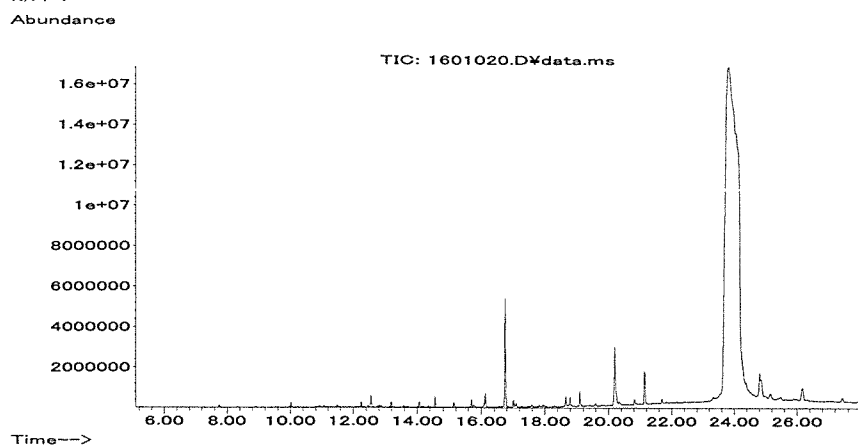
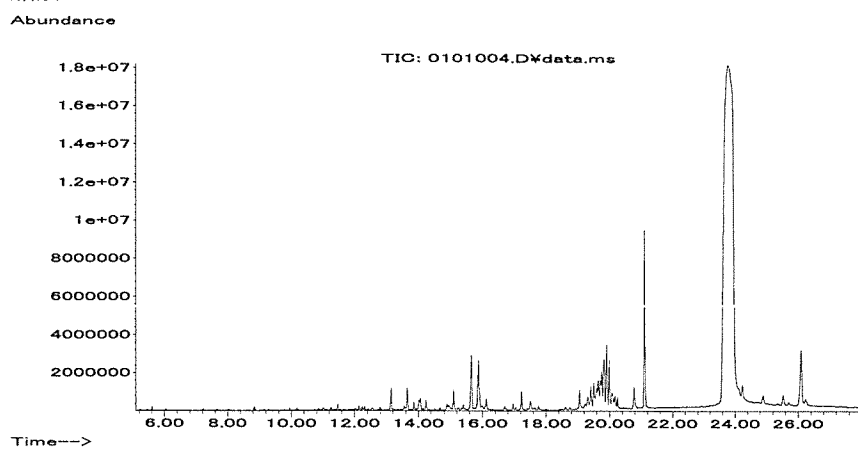


図 5. ブランク試料の GPC クロマトグラム

筋肉



脂肪



肝臓

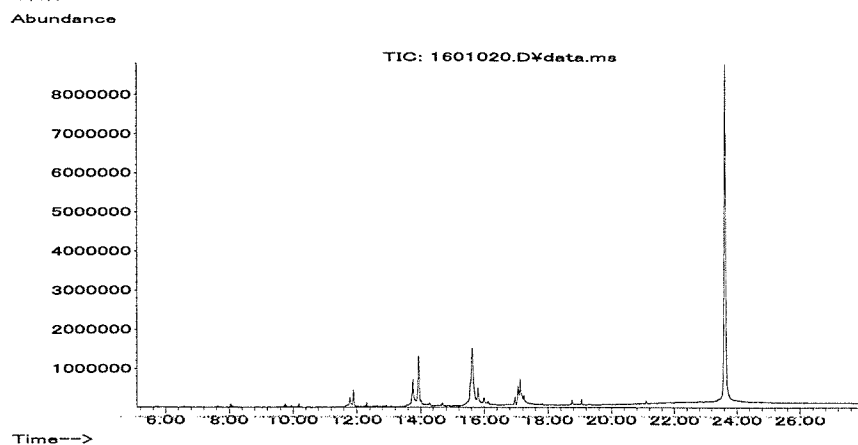
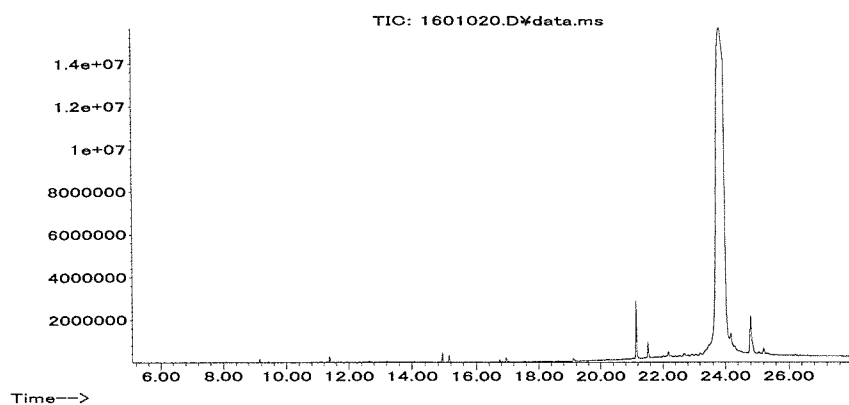


図 6. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラムの場合

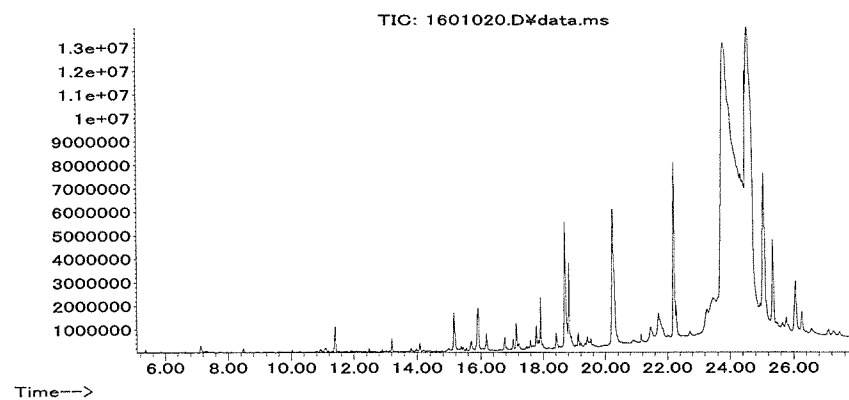
うなぎ

Abundance



えび

Abundance



牛乳

Abundance

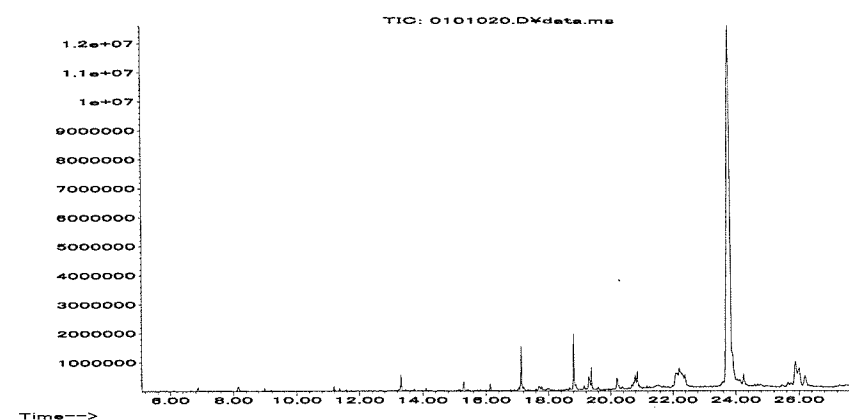


図 6. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム の例 (続き)

卵

Abundance

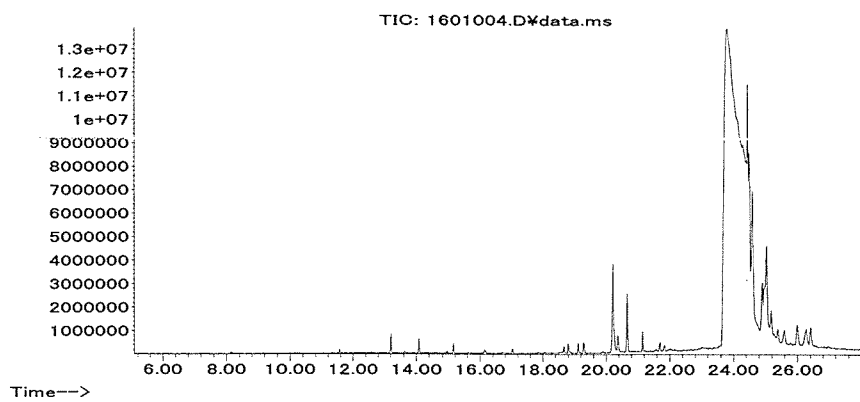
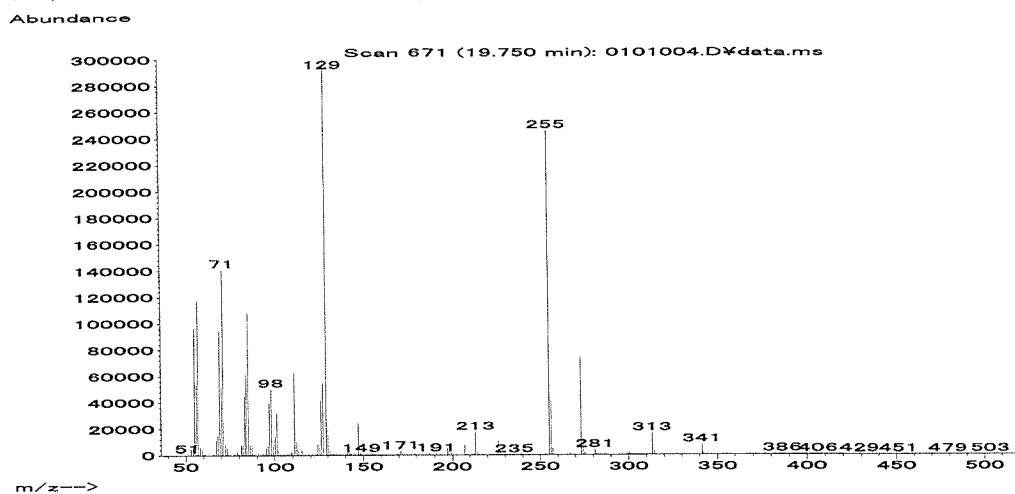
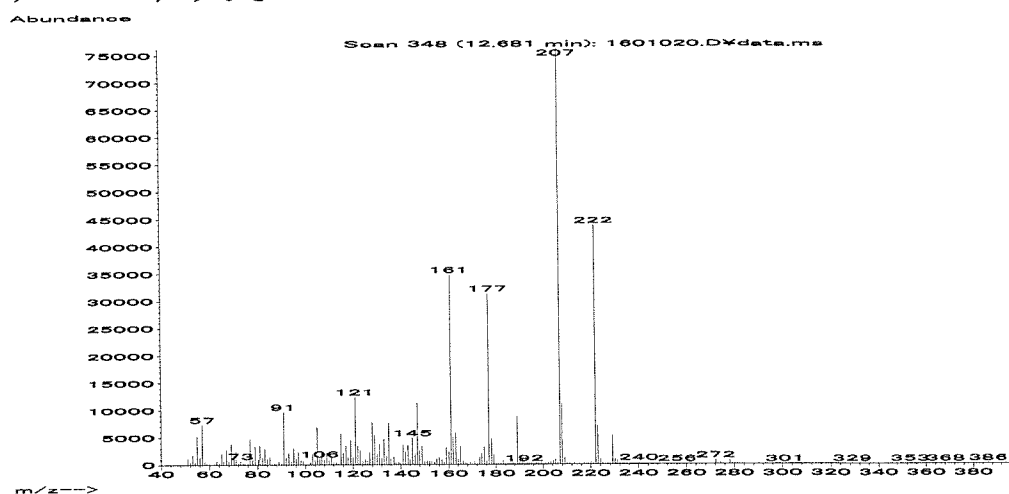


図 6. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム の例 (続き)

アイオキシニルオクタノエート／牛の脂肪



ターバシル／うなぎ



パクロブトラゾール／牛の脂肪

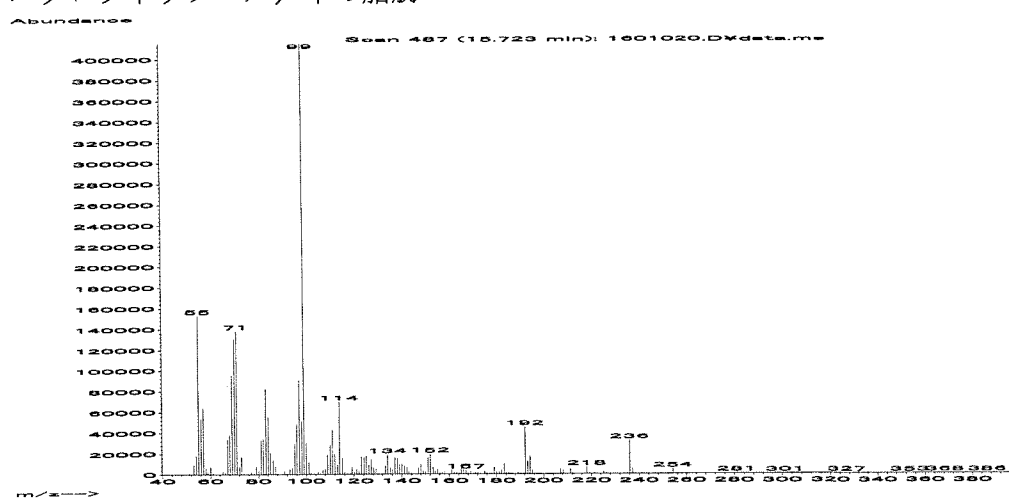
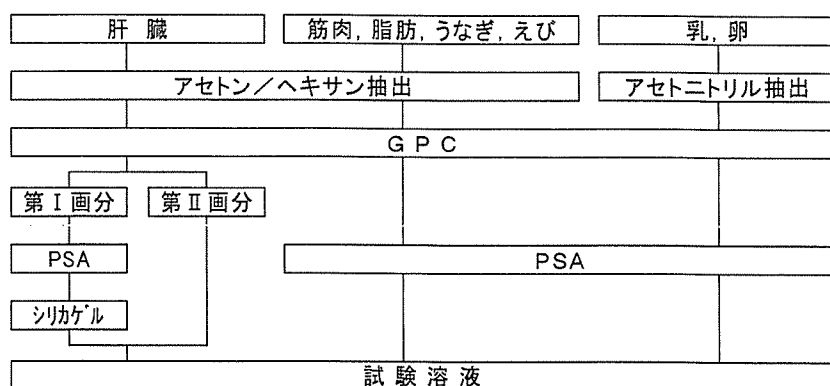
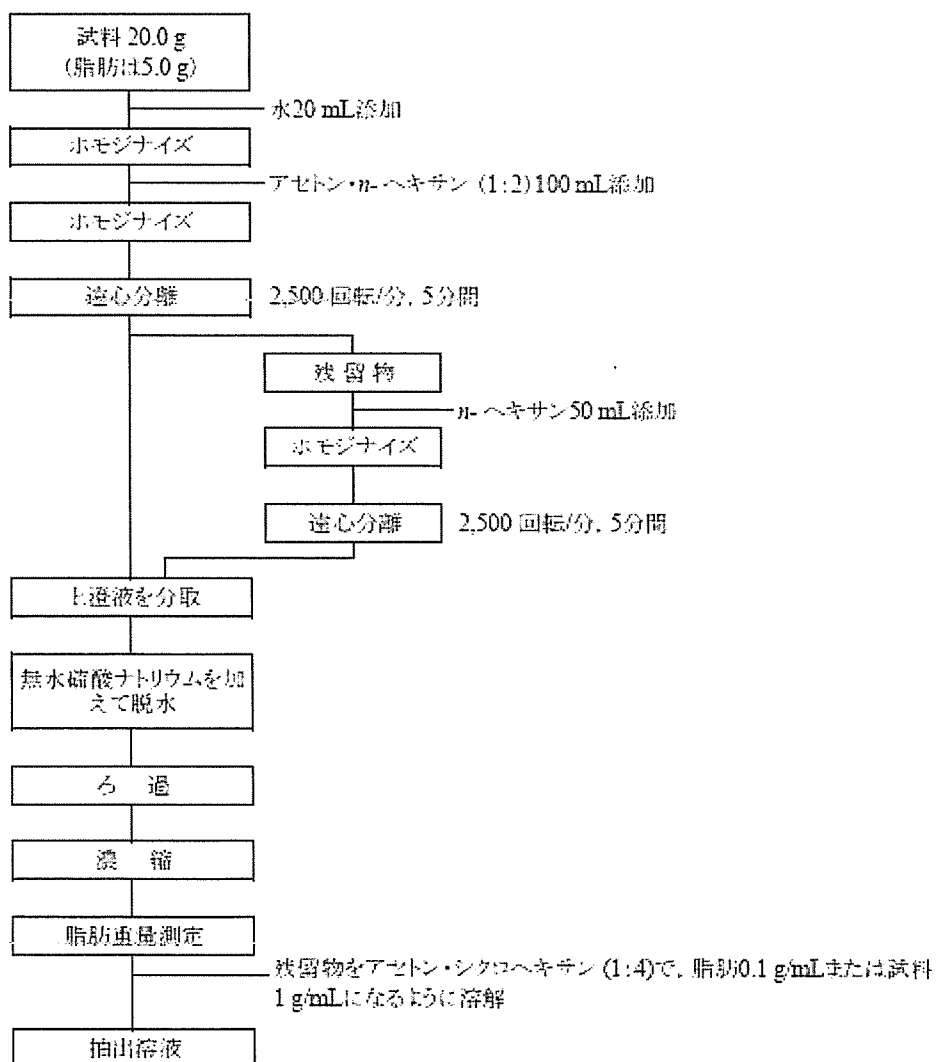


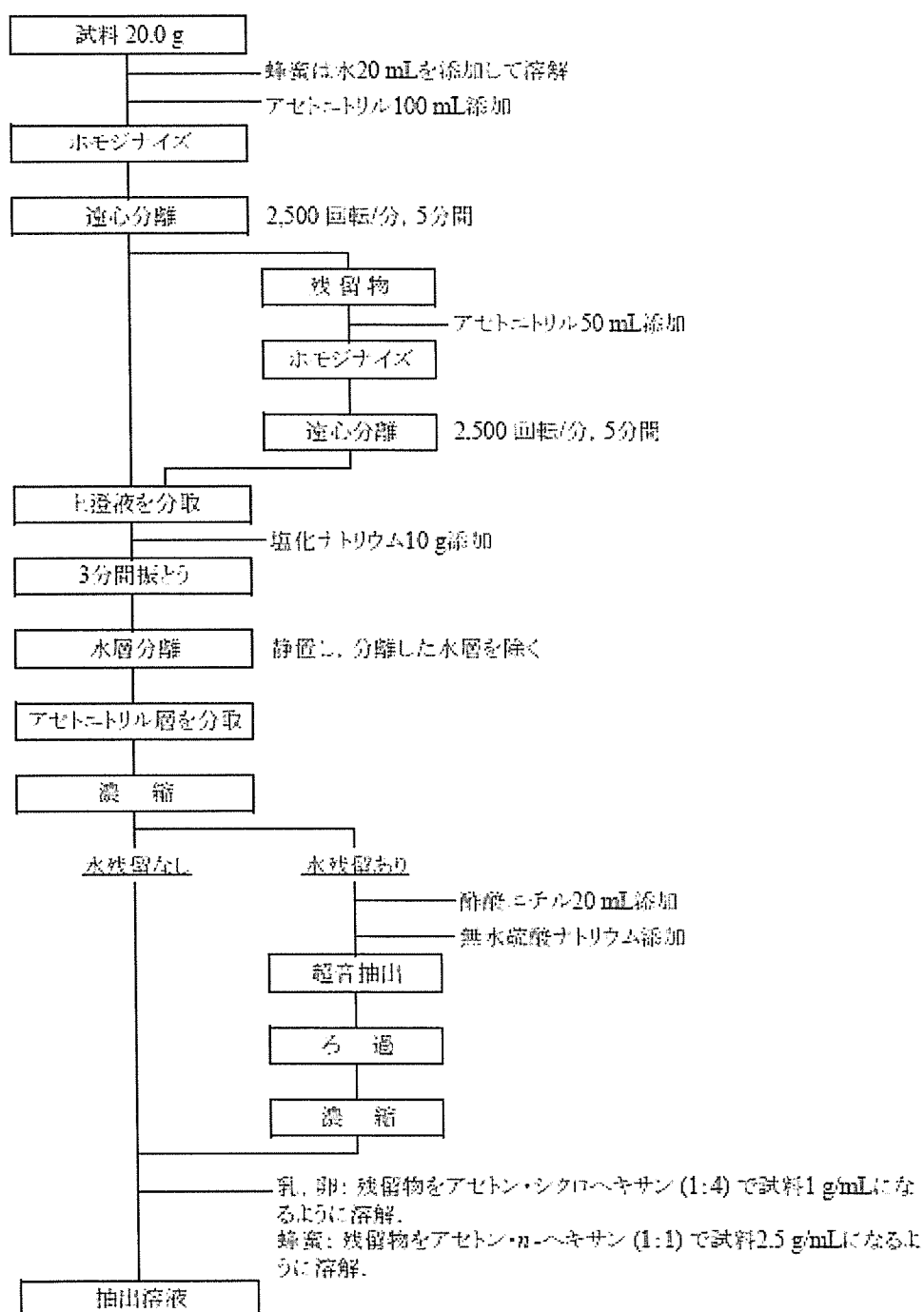
図 7. 妨害ピークの保持時間におけるマススペクトル



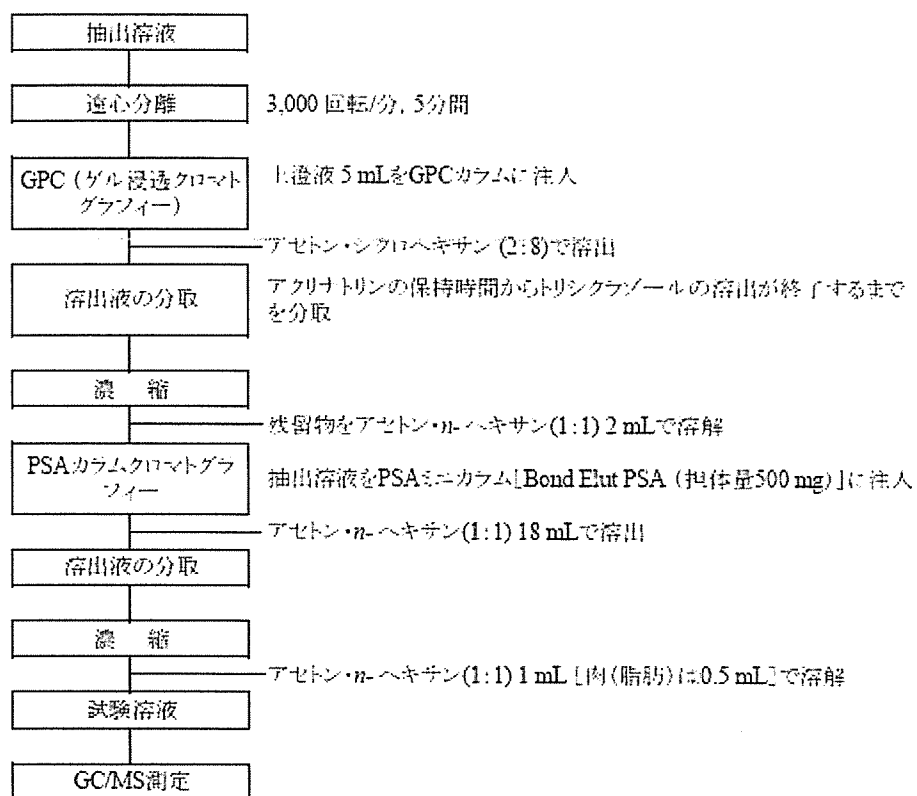
付図 1. GC/MS による通知一斉分析法（畜水産品）の概要



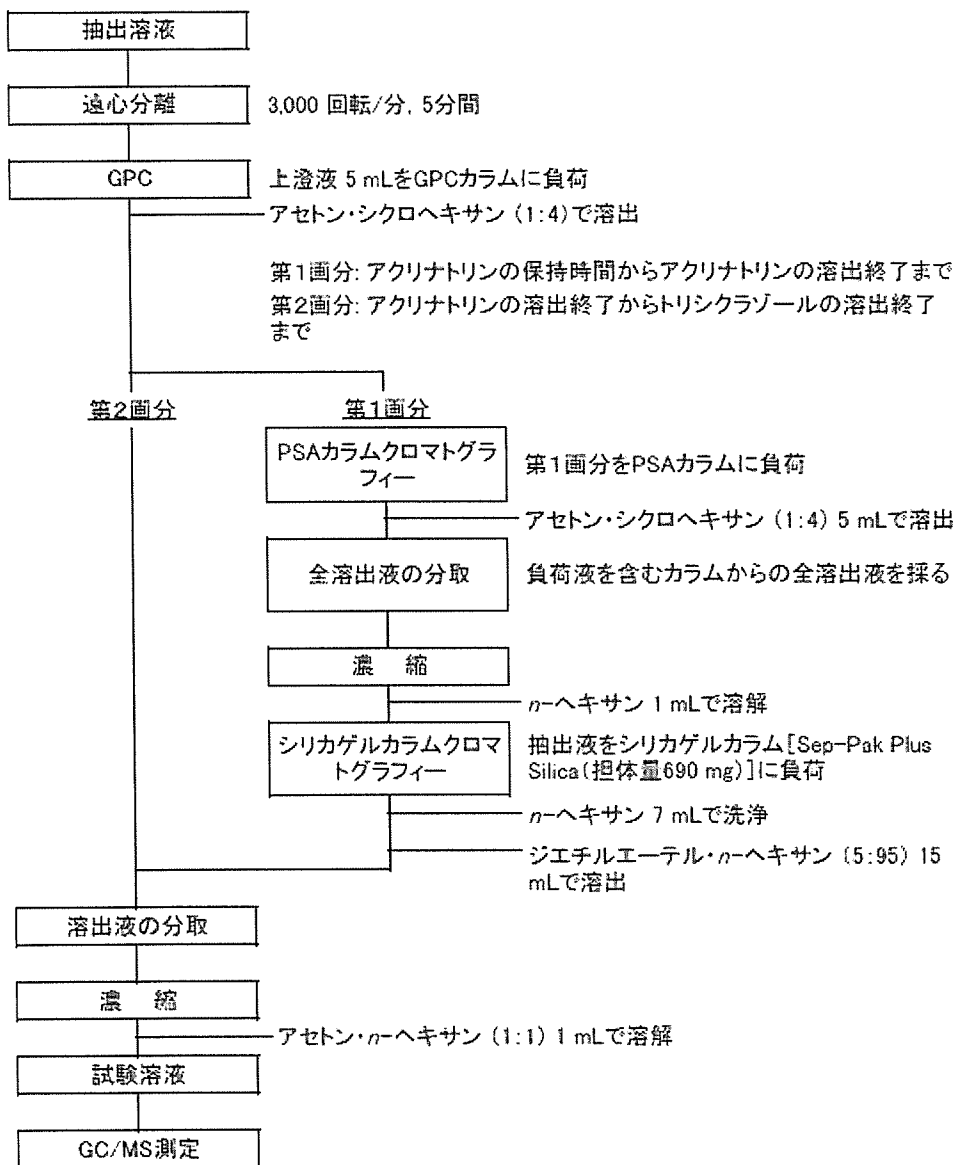
付図 2. 筋肉, 脂肪, 肝臓及び魚介類の抽出工程の概要



付図 3. 乳及び卵の抽出工程の概要



付図 4. 精製及び定量工程の概要（肝臓を除く）



付図 5. 肝臓の精製及び定量工程の概要

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

Ⅱ. 分担研究報告書

食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究

2.2 畜水産食品中残留農薬分析法の開発：LC/MS

分担研究者 小田中芳次
（財団法人 残留農薬研究所）

Ⅱ. 分担研究報告書

食品中に残留する農薬等のリスク管理手法の精密化に関する研究:

2.2 畜水産食品中残留農薬分析法の開発:LC/MS

分担研究者 小田中芳次 財団法人 残留農薬研究所 化学部残留第1研究室長

研究要旨

畜水産食品に残留基準の設定されていない約 200 種農薬成分の分析法を開発する一環として、既存情報から LC 測定の適用事例があるものと、測定方法が確認出来なかったもの総計 121 種農薬成分について、厚生労働省通知の試験法(「LC/MS による農薬の一斉試験法(畜水産物)」)に準拠した条件による LC/MS 測定の適用を検討した。その結果、明瞭なマススペクトルが得られなかったもの、感度の低いものあるいは試薬由来の夾雑物ピークの影響を受けるもの等を除き、85 成分が測定可能であると判断された。また、これらの成分について、一斉試験法への適用を検討したところ、抽出段階(アセトン・n-ヘキサンによる抽出)で多くの農薬成分(43/85)が水層に留まり、有機層に抽出されないことが確認された。

研究協力者

藤田真弘 残留農薬研究所化学部残留第 1
研究室主任研究員

浜野浩子 残留農薬研究所化学部残留第 1
研究室

市川千種 残留農薬研究所化学部残留第 1
研究室

長田拓也 残留農薬研究所化学部残留第 1
研究室

検査対象とすることが困難な状況にあり、その試験法の開発が急務となっている。本研究の目的は、食の安全を確保するため、上記の一律基準が適用される農薬のうち LC 分析に適したものの約 120 種について、それらの試験法を開発することである。初年度である平成 18 年度は、対象農薬の分析に必要な基礎情報を収集する他、一斉試験法(「LC/MS による農薬の一斉試験法(畜水産物)」)における測定条件の適用性の確認ならびに抽出段階における損失の確認を実施した。

A. 研究目的

ポジティブリスト制度の下で約 270 種の農薬については畜水産食品にも残留基準が定められており、その分析法も概ね公示されているが、基準を定めず、一律基準が適用される約 200 種の農薬については試験法が提示されていない(平成 18 年 4 月 1 日時点)。このため、それらの農薬については

B. 研究方法

1. 検討対象成分

畜水産物に暫定基準値が設定されていない農薬で一斉試験法の適用性が未検証の 197 種の内、既存情報から LC 測定の適用

事例があるものと、測定方法が確認出来なかったもの総計 121 種農薬成分を検討対象成分とした（別表 1 参照）。

2. 検討概要

検討対象農薬の一斉試験法（畜水産物）への適用性を検討するため、対象農薬の LC/MS におけるマススペクトル、検出感度に関するデータを採取し、測定条件の適用性を確認した。また、測定することが可能であると判断された成分について、抽出段階における損失を確認した。

3. 農薬標準品

検討対象とした農薬標準品の入手先、およびその純度または溶液濃度は別表 1 にまとめて示す。

4. 試薬

一般試薬および有機溶媒は特級品またはそれに準ずる等級のもの、または残留農薬試験用のものを使用した。水は、日本ミリポア・リミテッド製の Milli-Q 純水製造装置で調製した高純度水を用いた。

イソキサフルトール分析用標準品、Dr. Ehrenstorfer 製。

5. 装置

電子天秤：AG245 型、PG4002-S 型他（メトラー・トレド製）。ホモジナイザー：ポリトロン（Kinematica 製）。遠心分離機：KUBOTA 7930（株式会社久保田製作所製）。1100 LC-MSD システム（Agilent Technologies 製，1100 シリーズ LC/MSD.SL，ChemStation ワークステーション）

6. 標準溶液の調製

表 1 に示した各標準品 50 mg 相当量を、それぞれ別々の 50 mL 容のメスフラスコに量り取り、アセトンまたはアセトニトリルに溶解し定容として 1000 mg/L の各標準原液を調製した（溶液として入手した標準品を除く、別表 1 参照）。これらの標準原液の一定量を 50 mL 容のメスフラスコに量り取り、アセトニトリルで希釈して各成分 10 mg/L 濃度の混合標準溶液を調製した。

7. 分析操作（抽出法）

分析操作（抽出法および測定法）は一斉試験法（畜水産物）に従った。分析工程の概要を付図 1 に示す。抽出操作の詳細を以降に記す。

7.1. 添加回収用試料（空回収）試料の調製

精製水 20.0 g をナス型フラスコに量りとり、第 6 項で調製した 10 mg/L 濃度の各混合標準溶液 1.0 mL を添加し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した。これを抽出段階における損失確認のためのコントロール回収試料とした。

7.2. 抽出（抽出段階における損失確認）

試料（水約 20mL：7.1.項参照）に水 20 mL を加え、ホモジナイズした後、アセトン及び *n*-ヘキサン（1:2, v/v）混液 100 mL を加え、さらにホモジナイズした後、1000 × *g*（2500 rpm）で 5 分間遠心分離し、有機層を分取した。残留物（水層）に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、1000 × *g* で 5 分間遠心分離した。得られた有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加

えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液をアセトン及び*n*-ヘキサン（1:2, v/v）混液で200 mL定容とし、そのうちの4 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、メタノール2 mLに溶解した（有機層検液）。残りの水層についてもメタノールで100 mL定容とした（水層検液）。

7.3. LC/MS の操作条件

7.3.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：XTerra MS C18 (Waters 製), 内径 2.1 mm, 長さ 150 m, 粒径 3.5 μm。流速：0.2 mL/min。注入量：5 μL。カラム温度：40℃。溶離液，グラジエント条件：下記参照。

Solvent A： 5 m mol/L 酢酸アンモニウム 含有水

Solvent B： 5 m mol/L 酢酸アンモニウム 含有メタノール

time(min)	A(%)	B(%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95
30	85	15

7.3.2. 質量分析計

イオン化方式：エレクトロスプレー (ESI), 正イオンモード。乾燥ガス温度：350℃。乾燥ガス流量：12 L/min。ネブライザー圧力：50 psi。イオン導入電圧：3000 V。フラグメンタ電圧：50~250V。定量測定

モード：選択イオン検出法 (SIM, 各農薬成分の定量イオンは表 2 を参照)

7.4. 回収率の算出

試料溶液を第7.3項の操作条件のLC/MSに注入して、ピーク面積を測定した。また、第6項の混合標準溶液をメタノールで希釈して調製した0.1 mg/Lの標準溶液を同様に測定し、そのピーク面積との比較により各農薬成分の添加濃度に対する回収率を算出した。

8. LC/MS 測定

8.1. マススペクトルの確認

検討対象とした121種農薬成分の個別標準溶液（10 mg/L）を調製し、フローインジェクションによるスキャン測定を行い、各分析対象成分のマススペクトルを得た。これに基づき、各分析対象成分の定量イオンを設定し、第7.3項の操作条件のLC/MSに注入した。その際、注入溶液には保持時間の指標としてイソキサフルトール標準品を混合し、各分析対象成分の相対保持時間を次式により求めた（表 2）。

$$\text{相対保持時間} = \frac{\text{ターゲットの保持時間}(\text{min})}{\text{イソキサフルトール保持時間}(\text{min})}$$

8.2. 最小検出量の算出

最小検出量評価用の各標準溶液は、各農薬成分の検出感度に応じて、S/N<10 となるように標準溶液を適切に希釈（0.0001~0.1 μg/mL）して使用した。各農薬成分のモニタリングイオンのノイズ幅（N：ベースラインノイズの最大値と最小値の差の2/5）及び各農薬成分のピーク高さ（S：ベ

ースラインの中央値からピークトップまで)から最小検出量(S/N=3)および測定限界(S/N=10)を求めた。

C. 研究結果

1.LC/MS 測定

1.1. MS スペクトル

畜水産物に基準値が設定されていない農薬で一斉試験法による適用性が未検証の197種および測定法別の既存情報^{1,2)}を別表1にまとめた。その内、LCもしくはLC/MS測定の適用事例があるもの、GCもしくはGC/MSによる測定方法が確認出来なかったもの、これら総計121種農薬成分を本研究の検討対象とした(表1)。

検討対象とした121種について、5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有の水/メタノール下フローインジェクションにてLC/MSでスキャン測定した結果、アラニカルブ、イミノクタジン、塩酸ホルメタネート、エンドタール、クロゾリネート、クロロエトキシホス、ジオキサチオン、シクロプロトリン、ジクロン、ジチアノン、ジノカップ、2,6-ジフルオロ安息香酸、ジベレリン、シラフルオフェン、ゾキサミド、トリルフルアニド、フェンクロルホス、フサライド、フマル酸オキシポコナゾール、フルスルファミド、ヘキサフルムロン、ベンゾビシクロン、ホルペット、メタアルデヒド、メタゾール、ラクトフェンおよびDBEDCの27成分については、MSスペクトルが不明瞭であったため、測定困難であると判断して、本年度の調査対象から除外した。検討対象94成分について、第7.3項の条件でLC/MS測定を行い、各成分の保持時間を確認した(表2)。

1.2. LC/MS 測定条件

各農薬成分の保持時間、保持指標、モニタリーオン、最小検出量及び測定限界のLC/MS測定情報は、表2にまとめた。アニラジン、ジクロスラム、ジクロルミド、チフェンスルフロメチル、ニコチン、ヒメキサゾール、フルオルイミド、ペブレートおよびリムスフロンの9成分については、低感度あるいは試薬に由来する夾雑物ピークの影響などの要因により定量が困難であると判断された。これらの成分については、本年度の検討対象からは除外することとし、以降の検討対象は85成分とした。85種の農薬成分は、MS測定モード(ポジティブ/ネガティブ)および適切な同時測定イオン数を考慮して、4グループに分けて測定した。各成分のMSスペクトルを図1に示した。

1.3. 最小検出量

最小検出量を求める際に使用した各農薬成分のマスキロマトグラムを図2に、算出した各農薬成分の最小検出量および測定限界を表2に示す。

対象85成分の機器の検出感度から予測した測定限界(5 μ L注入, S/N=10)は、0.025 ng以下が65成分、0.025~0.05 ngが10成分、0.05 ng以上が10成分であった(表4)。本試験における定量限界は0.01 mg/kgと設定する為、試料量、希釈率、注入量からの計算上、分析法の要求感度は測定限界(最小検出量)として0.025 ngとなる。