

200837027A

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

食品中残留農薬等の汚染実態把握と 急性暴露評価に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 静岡県立大学食品栄養科学部 米谷 民雄

平成21(2009)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 食品中残留農薬等の汚染実態把握と急性暴露評価に関する研究 1
米谷民雄

II. 分担研究報告書

1. 食品中残留農薬のスクリーニング分析法の開発 9
根本 了
2. 畜水産食品中残留農薬及び動物用医薬品の包括的分析法の開発 23
坂井隆敏
3. 農産物中残留農薬のGC・LC併用による残留実態解析 33
米谷民雄
4. 残留農薬等の急性暴露評価手法の検討 50
ー残留農薬等暴露推定のための食品摂取量データベースの検討ー
～特に短期暴露量推定について～
吉池信男

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 66

I. 総括研究報告書

食品中残留農薬等の汚染実態把握と急性暴露評価に関する研究

研究代表者 米谷民雄

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)
平成20年度総括研究報告書

食品中残留農薬等の汚染実態把握と急性暴露評価に関する研究

研究代表者 米谷民雄 静岡県立大学・食品栄養科学部 客員教授

研究要旨

①食品中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法の開発を目的として、GC-MS/MS法の残留農薬分析への適用について検討するために、GC-MS/MS測定におけるMS/MS条件の最適化について検討した。食品のブランク試験溶液を用いて、食品中の夾雑成分の影響を受けにくいMS/MS条件の選択法について検討し、従来の標準物質を用いたシグナル強度による方法よりも選択性及び感度において良好なMS/MS条件を求めることができた。今回開発した方法を用いることにより、GC-MS/MS測定における選択性の向上及び高感度化が期待できる。

②畜水産食品に基準が設定されている農薬及び動物用医薬品の包括的一斉分析法を開発するため、昨年度に行った既存の通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)」及び「HPLCによる動物用医薬品の一斉試験法I(畜水産物)」の抽出操作によって得られた結果を基に、様々な食品から広範囲のlog Pow値を有する農薬及び動物用医薬品を抽出し得る抽出方法の構築を検討した。

③農産物およびその加工食品中にどれくらいの種類の農薬が含まれているか、その実態を把握するために、GCおよびLCを併用して一斉分析を実施した。同一食品につき異なる地域・業者からの3製品を混合した試料を調製し、429品目(茶の場合は378品目)を分析した。茶では茶葉中の農薬は熱湯抽出時(飲茶を想定)にはあまり移行してこないことが再確認された。果実では輸入かんきつ類において、イマザリル等の使用が確認された。また、食品加工による農薬の消長を調査する際の対象食品を選択するために、農産物-加工食品の組み合わせについて市販食品の分析を実施したところ、豆腐および関連食品が実際の候補になると考えられた。また、加工食品中から農薬が検出されたが、原材料に戻って適否を判定するために、加工係数を調査しておく必要性が再認識された。

④残留農薬の暴露評価を行うにあたり、短期暴露評価手法の確立が課題となっており、コーデックスにおいても検討されている。この評価手法が確立できれば、残留基準の評価に反映させることにより、食品の安全確保をより確かなものに行うことができる。そこで、昨年度基礎的検討を加えた1年4季節(平日2日と休日1日を含む連続しない3日間)の詳細な摂取量データを基として、メタミドホス・アセフェート、アセタミプリドなどを想定した短期暴露評価のための食品摂取量データベース(n=26,695人・日)を構築した。具体的には、再掲も含めて225の食品グループについて、加工過程における重量変化や材料比等を加味し、1日摂取量を算出した。そして、当該食品グループの摂取者のみと、対象者全てについて、1日当たりおよび体重kg当たりの摂取量分布(1点推定法では97.5パーセンタイル)を求めた。また、算出に必要なユニット重量に関して、データ整備を行った。これらのデータベース等を用いて、各農作物の残留基準値の急性参照用量(ARFD)に対する妥当性の確認作業を進めているところである。

分担研究者

根本 了 (国立医薬品食品衛生研究所)

坂井隆敏 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉池信男 (青森県立保健大学)

研究協力者

山田友紀子 (農林水産省大臣官房審議官 消費・安全局担当)

由田克士 (国立健康・栄養研究所)

A. 研究目的

①「食品中残留農薬のスクリーニング分析法の開発」

食品中残留農薬のより迅速で効率的なスクリーニング分析法を開発するため、測定の効率化・迅速化を目的として、GC・MS/MS法の残留農薬分析への適用について検討した。食品中の残留農薬分析に適した GC・MS/MS法を開発するために、GC・MS/MS測定における MS/MS 条件の最適化検討を行い、食品由来の夾雑成分の影響を受けにくい条件を求める方法について検討した。

②「畜水産食品中残留農薬及び動物用医薬品の包括的分析法の開発」

検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産食品に基準値が設定されている農薬及び動物用医薬品を対象として、これらの包括的一斉分析法の開発を試みる。

③「農産物中残留農薬の GC・LC 併用による残留実態解析」

農薬等のポジティブリスト制度の導入により、基準値が設定された農薬の数が大幅に増加しているため、今後の検査(試験)方針を考える際の資料とするため、どれくらいの種類の農薬が農産物やその加工食品中に残留しているかのデータを収集することにし、GCおよび LC による一斉分析法を用いて、残留農薬を調査した。今年度は、茶について茶葉としての分析と熱湯抽出した飲茶としての分析、ポストハーベスト農薬の使用が考えられる果実や果皮も含めて基準値が設定されている果実の分析、食品加工による農薬の消長を調べる対象食品を選択するための農産物加工食品の組み合わせについての予備調査を実

施した。

④「残留農薬等の急性暴露評価手法の検討」

残留農薬の暴露評価を行うにあたり、短期暴露評価の手法を確立することが課題となっており、コーデックスにおいても検討されている。そこで、短期暴露評価手法の確立を目指した検討を実施する。この評価手法が確立できれば、残留基準の評価に反映させることにより、食品の安全確保をより確かなものに行うことができる。

B. 研究方法

①オキシクロロデンをモデル化合物に用いて、最適な MS/MS 条件 (プリカーサーイオン、プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの組み合わせ) を求める方法について検討した。また、8 食品 (リンゴ、オレンジ、ばれいしょ、キャベツ、ホウレンソウ、玄米、牛(筋肉)及び牛(肝臓)) から調製したブランク試験溶液を用いて、食品由来の夾雑成分の影響を検討した。

②昨年度、logPow 値を参考に、農薬 29 種類、動物薬 25 種類、農薬/動物薬 18 種類を選択し、通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法(畜水産物)」及び「HPLC による動物用医薬品の一斉試験法 I (畜水産物)」の抽出操作を行い、牛の筋肉及び肝臓試料からの回収率 (%) を求めた。今年度は、得られた結果を基に抽出方法に改良を加え、幅広い農薬等を抽出し得る抽出法の確立を試みた。すなわち、農薬試験法改法については、既存の通知試験法の通り、アセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性農薬等を脂肪と共に抽出した後、中～高極性農薬等が移行していると考えられる水層からこれら農薬等の抽出を試みた。動物薬試験法改法については、既存の通知試験法で用いられているアセトニトリル/ヘキサンの代わりに含水アセトニトリル/ヘキサンを用いて抽出を行った。両法において得られた試験溶液 10 μ L を LC-MS に供し、得られたピーク面積から各農薬等の回収率 (%) を求めた。

③同一農産物や加工食品でも、栽培時に使用される農薬が異なることを考え、異なる 3 地

域または3業者からの製品の混合試料を調製し分析を行う方法を採用した。分析は、厚生労働省通知法に準拠した方法で実施した。すなわち、GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)をもとに193成分、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)をもとに185成分、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ(農産物)をもとに51成分の分析を実施した(合計429成分)。なお、茶についてはLC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ(農産物)が適用できないため、対象農薬は378成分であった。茶については通知法に準じた方法で熱湯抽出したものについても、分析を行った。なお、分析委託先では定量限界を0.01 ppmと設定していたが、それ未満でも検出された農薬も参考とするため、一定の基準をクリアしたものもtrace量(tr)検出されたとして農薬情報を収集した(ただし、定量限界の1/10以上検出されるものに限った)。

④1年4季節(平日2日と休日1日を含む連続しない3日間)の詳細な摂取量データを基にして、メタミドホス・アセフェート、アセタミプリドなどを想定した短期暴露評価のための食品摂取量データベース(n=26,695人・日)を構築した。具体的には、再掲も含めて225の食品グループについて、加工過程における重量変化や材料比等を加味し、1日摂取量を算出した。そして、1・6歳、7・14歳、15・19歳、20・64歳、65歳以上、6歳以上(再掲)、全年齢(1歳以上)の7つの年齢カテゴリについて、平均値、標準偏差、5%、10%、25%、50%、75%、90%、95%、97.5%、99%tile値(摂取者のみ、非摂取者を含む全員; g/day及びg/day/BWkg)を算出し、データベース化した。さらに、短期暴露評価実施のプロセス(原則)について、JMPRの1点推定法(“Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed”(FAO, 2002)及びその後のJMPRにおける改変による)を基にデザインした。

C. 研究結果

①最適なMS/MS条件を求める方法について

検討し、以下の手順による方法を開発した。

(i)対象農薬のマススペクトルから、強度が強くなつてきた高質量のフラグメントイオンの中から、食品中の夾雑成分の影響を受けにくいイオンをプリカーサーイオンの候補イオンとして選択する。(ii)各候補プリカーサーイオンについて、ブランク試験溶液のノイズから求めたS/N比を指標として、候補プロダクトイオンごとにコリジョンエネルギーの最適値を求める。(iii)(ii)で求めたMS/MS条件を用いてGC-MS/MS測定を行い、ブランク試験溶液のノイズから求めたS/N比を指標として、最適なMS/MS条件を決定する。

②<農薬試験法>

水層に移行していることが推察されるlog Pow値1.0以下の農薬及び農薬/動物薬、並びに動物薬全般の回収率改善を目的として、これら農薬等を水層から抽出する方法について検討を行った。肝臓試料における回収率の中央値を求めたところ、前年度の農薬試験法においては、農薬:65%、動物薬:4%、農薬/動物薬:54%、全農薬等:21%であったものが、今年度の農薬試験法改法においては、農薬:78%、動物薬:81%、農薬/動物薬:84%、全農薬等:79%となり、水層に移行している農薬等を更に抽出することにより、回収率が改善された。

<動物薬試験法>

アセトニトリルよりも試料と混和し易いと考えられる含水アセトニトリルを用いて抽出を試みた。肝臓における回収率の中央値は、動物薬試験法においては、農薬:62%、動物薬:72%、農薬/動物薬:75%、全農薬等:72%であったものが、動物薬試験法改法においては、農薬:86%、動物薬:77%、農薬/動物薬:78%、全農薬等:80%となり、若干ではあるが回収率が改善された。

③茶葉の産地別の混合試料では、それぞれ2、8、6種の農薬が0.01ppm以上検出された。茶葉からの熱湯抽出を行い分析したところ、0、2、1種の農薬しか定量されなかった。熱湯抽出した場合にもテブコナゾールが定量できたが、移行量は茶葉中の約1/5であった。一方、抹茶混合試料では11農薬と、茶試料

では最多の農薬が定量された。

輸入かんきつ類ではオレンジで2農薬、グレープフルーツで4農薬、レモンで1農薬が定量された。いずれにおいても抗菌剤イマザリルが0.5 ppm以上検出され、グレープフルーツではオルトフェニルフェノールも0.79 ppm検出された。このように、食品添加物に指定されているポストハーベスト農薬が、いずれの混合試料からも検出された。

農産物加工食品の組み合わせでは、大豆・豆腐において、両者ともプロシミドン(殺菌剤)が0.01 ppm以上検出された。豆腐での濃度は大豆の約1/6であった。

その他の加工食品においても、一律基準以上の農薬が検出された食品があった。

④225 食品のグループの摂取量分布を求め、暴露評価に活用することができるようにした。このような摂取量分布のデータを用いて、農作物の残留基準値のARFDに対する妥当性の確認作業を行っているところである。また、今年度、懸案となったメタミドホス・アセフェート及びアセタミプリドの短期暴露評価においては、これらの摂取量データが参照された。

D. 考察

①食品のブランク試験溶液を用いて、食品中の夾雑成分の影響を受けにくいMS/MS条件を選択することにより、従来の標準物質を用いたシグナル強度による方法よりも選択性及び感度において良好なMS/MS条件を求めることができると考えられる。

②農薬試験法改法は、脂肪等を溶解可能なアセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性の農薬等を脂肪等と共に抽出した後、水層に移行した中～高極性農薬等を抽出する方法である。したがって、脂肪含量の高い食品や水分含量の高い食品など、様々な食品に対して適用可能であると推察される。本検討における脱脂は、アセトニトリル/ヘキサン分配のみで行っているが、分子量の小さな農薬等については既存の通知試験法通りにGPC及びミニカラムを用いた脱脂精製を行い、分子量の大きな農薬等についてのみアセトニトリル/ヘ

キサン分配を行うことで、減圧乾固の過程において生じる農薬等の揮散による回収率の低下を抑えることが可能であり、また、より高い脱脂精製効果が得られることが期待される。また、水層からの中～高極性農薬等の抽出は、本検討では塩析により行っているが、水層からアセトン除去した後に塩析を行うことや、ミニカラム等を用いることにより、より効率的に水層からの農薬等の抽出が可能であり、加えて高い精製効果が得られることが期待される。

一方、動物薬試験法改法についても、脂肪等を溶解可能なヘキサンと低～高極性農薬等を抽出することが可能であると考えられる含水アセトニトリルを用いた方法であるため、様々な食品から幅広い農薬等を抽出することが可能であると考えられ、また、回収率についても農薬試験法改法と同等の結果が得られた。しかしながら、本報で用いた検討対象農薬等においては確認されなかったが、水を加えることによって抽出液層の極性が高くなり、低極性農薬等の一部はヘキサン層に移行し易くなっている可能性が高い。加えて、水分含量が高い食品等においては、更に抽出液層の極性が高くなるため、低極性農薬等の更なる回収率の低下や測定値のバラツキなどが危惧される。回収率の低下や測定値のバラツキを抑えるためには、GPC等を用いてヘキサン層中から農薬等を再度抽出する操作を追加する必要があるが、このような抽出操作を加えた場合、抽出の原理や操作・方法等は農薬試験法改法とほとんど同様のものとなる。

よって、本報における抽出法としては、既存の通知試験法として検査機関において実際に用いられており、多くの実績のある農薬試験法をベースとして、水層に移行した中～高極性農薬等の抽出方法を追加したものを採用することとした。

③茶では、各県3製品の混合試料として1検体ずつを分析した結果ではあるが、検出農薬数には大きな差があった。この結果が、県において使用農薬が統一されている結果なのか、他の理由によるのかは不明である。なお、多種の農薬が検出された県の茶試料では、半数

以上の農薬が共通して検出された。同じ茶試料を熱湯抽出した場合には、定量限界以上の濃度で検出された農薬数は最多でも2農薬であった。テブコナゾールは2県の試料で熱湯抽出時にも検出されたが、濃度は茶葉の場合の約1/5であった。茶葉中の農薬は飲茶にはあまり移行しないことが再確認された。

抗菌剤（ポストハーベスト農薬）の使用が考えられた輸入かんきつ類からは、アメリカ産とオーストラリア産に関係なく、イマザリル等が定量限界以上検出された。果皮を含めて分析する果実では多種の農薬が検出されると予想されたが、アボカドからは検出されなかった。

今回の組み合わせでは、大豆・豆腐において唯一、両者で同一の農薬（プロシミドン）が定量限界以上検出された。食品加工時の農薬の消長を調べる際には、豆腐および関連食品が実際の対象食品になると思われる。

いくつかの加工食品から一律基準以上の農薬が検出されたが、各加工食品について原材料の生産で使用される農薬の加工係数を求めておく必要性が再認識された。

④短期暴露評価を行う上で必須の摂取量データと作物残留試験データのうち、前者の検討を行っている。今回、4つの季節で、26,695人・日の摂取量データに基づき、暴露評価を行う基礎を築くことができたことの意義は大きい。しかし、短期暴露量の推定においては、平均値ではなく、摂取者における97.5パーセントイル値を用いる必要があり、長期暴露評価における摂取量平均値と比べて、信頼度の高い値を得るためには、特に摂取頻度が少ない食品（食品群）においては、かなり大きなサンプルサイズを必要とする。来年度は、より拡大された摂取量データベースを用いて、検討を行う予定としている。一方、作物残留試験データについては、わが国においては十分な例数のデータが現時点では無い。今後、より多い作物残留試験データが利用可能となり、作物総摂取量のARFDに対する妥当性に関して、本分担研究課題で構築している摂取量データベースを活用し、確率論的手法（シミュレーション）により検討できることが望

まれる。

E. 結論

①食品のブランク試験溶液のノイズから求めたS/N比を指標とする方法は、シグナル強度を用いた方法よりも、より高い選択性及び感度が期待できるため、食品中の残留農薬分析に適したMS/MS条件を求めるのに有効な方法と考えられる。

②畜水産食品に残留する農薬及び動物用医薬品の包括的一斉分析法の開発を目的として、幅広い農薬等を抽出可能な抽出方法について検討を行った。既存の通知試験法である農薬試験法をベースとして、まずアセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性農薬等を脂肪等と共に抽出後、水層から中～高極性農薬等を抽出することにより、また、既存の動物薬試験法をベースとして、含水アセトン/ヘキサンを用いて抽出を行うことにより、広範囲の農薬等を抽出することが可能であることが明らかとなった。検査機関などにおける使用実績等を考慮して、抽出法としては農薬試験法をベースとした改法を選択し、以降精製法の追加や対象食品及び対象農薬等の追加を行い、最終的な一斉分析法の開発を図る予定である。

③GC/MSおよびLC/MSによる一斉試験法により、農産物や加工食品中に残存している残留農薬の数と種類を、3製品の混合試料を作成して調べた。茶では生産県別に3県の試料を作成したが、茶葉中の残留農薬は熱湯抽出した場合にはあまり移行してこないことが再確認された。また、抹茶（3県の混合試料で、茶葉の3県とは一致しない）においては、最も多種の農薬が検出された。抗菌剤（ポストハーベスト農薬）の使用が考えられた輸入かんきつ類（オレンジ、グレープフルーツ、レモン）では、イマザリル等の使用が確認された。今後、食品加工時の残留農薬の消長を調べる際には、豆腐および関連食品が現実的な対象食品になると思われる。また、加工食品から農薬が検出されたため、原材料に戻って適否を判定するために、原材料の生産で使用される農薬の加工係数が必要なことも再認

識された。

今回の分析では 429 成分（茶の場合は 378 成分）を一斉分析したが、少なくとも国産品の場合は農薬の使用履歴情報を入手し、的確に分析することが重要と考えられた。輸入品の場合も情報入手が必要であるが、情報が入手できない場合には検疫所での一斉分析によるモニタリング検査が重要になるため、より有効なスクリーニング法の開発が望まれる。

④1 年 4 季節（平日 2 日と休日 1 日を含む連続しない 3 日間）の詳細な摂取量データを基として、メタミドホス・アセフェート、アセタミプリドなどを想定した短期暴露評価のための食品摂取量データベース（n=26,695 人・日）を構築した。再掲も含めて 225 の食品グループについて、加工過程における重量変化や材料比等を加味し、1 日摂取量を算出し、1 日当たりの摂取量等の分布（1 点推定法では 97.5 パーセンタイル）を求めた。本摂取量データベース等を用いて、各農作物の残留基準値の ARfD に対する妥当性の確認作業を進めているところであり、そのような目的のために有用な食品摂取量データであると考ええる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

石脇亜紗子、野末みほ、猿倉薫子、藤井絢子、荒井裕介、由田克士、吉池信男：日本人成人における季節変動を考慮した野菜及び果物の摂取量分布の検討。（投稿審査中）

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

II. 分担研究報告書

1. 食品中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

分担研究者 根本 了

食品中残留農薬等の汚染実態把握と急性暴露評価に関する研究
食品中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

分担研究者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法の開発を目的として、GC-MS/MS 法の残留農薬分析への適用について検討するために、GC-MS/MS 測定における MS/MS 条件の最適化について検討した。食品のブランク試験溶液を用いて、食品中の夾雑成分の影響を受けにくい MS/MS 条件の選択法について検討し、従来の標準物質を用いたシグナル強度による方法よりも選択性及び感度において良好な MS/MS 条件を求めることができた。今回開発した方法を用いることにより、GC-MS/MS 測定における選択性の向上及び高感度化が期待できる。

A. 研究目的

食品中残留農薬のより迅速で効率的なスクリーニング分析法を開発するためには、抽出・精製過程に加え、測定効率化、迅速化が必要である。残留農薬分析では GC-MS 法が用いられるが、近年、GC-MS/MS 装置の普及に伴い、GC-MS/MS 法の残留農薬分析への応用について関心が高まってきた。

食品中の残留農薬分析のように夾雑成分が多い試料の分析では、GC-MS を用いたイオン選択検出法(SIM法)による測定が有効であるが、食品あるいは農薬によっては、目的成分のシグナルが夾雑成分により妨害を受け測定が困難な場合がある。一方、MS/MS 測定は、第一段階の質量分離で目的イオン(プリカーサーイオン)と夾雑成分を分離させ、更に第二段階で衝突解離によりプリカーサーイオンから解離イオン(プロダクトイオン)を生成させ、第三段階の質量分離で生成したプロダクトイオンを検出する方式のため、シングルの MS 測定よりも夾雑成分の影響を受けにくい。そのため、GC-MS/MS 法は GC-MS 法よりも選択性が高く、夾雑成分の影響を受けにくいことから、食品中の残留農薬分析に有効であると思われる。

GC-MS/MS 法を残留農薬分析へ適用するためには、農薬毎に MS/MS 条件を設定する必要がある。MS/MS 条件を設定するためには、プリカーサーイオン、プロダクトイオン及び衝突解離エネルギー(コリジョンエネルギー)の適切な組み合わせを求めなければならない。MS/MS 測定は選択性の高い測定法ではあるものの、食品由来の夾雑成分によるピークやノイズが観察される。そこで、GC-MS/MS 測定における MS/MS 条件の最適化検討を行い、食品由来の夾雑成分の影響を受けにくい条件を求めるとの方法について検討した。食品中の残留農薬分析に最適な MS/MS 条件を求めることができれば、GC-MS/MS 測定における選択性の向上及び高感度化が達成でき、残留農薬分析の一層の迅速化・効率化が期待される。

B. 研究方法

1. 試料

市販のリンゴ、オレンジ、ばれいしょ、キャベツ、ハウレンソウ、玄米、牛(筋肉)及び牛(肝臓)を使用した。

2. 試薬及び試液

試薬: 有機溶媒は残留農薬試験用試薬(和

光純薬工業(株)または関東化学(株)を使用した。Mega Bond Elut C18 (1g/6 mL)及びBond Elut Jr. PSA (500 mg)は Varian 社製を使用した。ENVI-Carb/LC-NH₂ (6 mL, 500 mg/500 mg)は Supelco 社製を使用した。Sep-Pak plus Silica (690 mg)は Waters 社製を使用した。セライトは和光純薬工業(株)製のセライト No.545 を使用した。

農薬標準品: オキシクロルデンは Velsicol Chemical Corporation 社製(純度 99.9%)を用いた。

農薬標準原液: 農薬標準品をヘキサンで溶解して 1 mg/mL の濃度に調製し冷凍庫(-30°C)に保存した。検討には農薬標準原液をアセトンまたはヘキサンで適宜希釈した溶液を使用した。

3. 装置

GC-MS/MS: オートサンプラー Combi PAL (CTC Analytics 社製)を接続したガスクロマトグラフ CP-3800 (Varian 社製)及び質量分析計 320-MS Quadrupole MS/MS (Varian 社製)を使用した。

ゲル浸透クロマトグラフ(GPC): 液体クロマトグラフ用ポンプ LC-6A (株島津製作所製)、オートインジェクター SIL-10A (株島津製作所製)、UV 検出器 SPD-6AV (株島津製作所製)、フラクションコレクター FRC-10A (株島津製作所製)、記録計 C-R4A (株島津製作所製)及びシステムコントローラー SCL-10A (株島津製作所製)を使用した。カラムオープンには Model 555 (ジーエルサイエンス製)を使用した。

4. GC-MS/MS 条件

GC 条件: カラム、VF-5ms (長さ 10 m、内径 0.53 mm、膜厚 0.25 µm、Varian 社製)にリストラクター(不活性化キャピラリーカラム: 長さ 15 m、内径 0.25 mm、Agilent 製)を接続;カラムオープン温度、50°C (1.0 min) → 30°C/min → 300 (5.67min)、分析時間=15 min; 注入口温度、250°C; キャリヤーガス、ヘリウム; キャリヤーガス流速、0.9 mL/min; 注入量、2 µL

MS 条件: イオン源温度、240°C; マニホールド温度、40°C; トランスファーライン温度、280°C; イオン化エネルギー、70 eV (EI+モード、フィラメント電流、50 µA); 検出器電圧、オートチューニングでの最適値 (MS/MS 測定ではオートチューニングでの最適値に 400 V を足した値); 質量ピーク幅、Q1 = 0.7 amu (AMD (automated method development)測定及び MS/MS 測定では 1.0 amu) 及び Q3 = 0.7 amu; スキャン範囲、50 ~ 550 amu; コリジョンガス、Ar (ガス圧、2.0 mTorr)

注入方法: パルスドスプリットレス注入 (パルス圧、30 psi; パルス時間、0.6 min; ベント開始時間、0.6 min (注入終了後定流量モード); 注入口ライナー、不活性化処理済みのシングルテーパ付ライナー (少量の不活性化処理済みの石英ウールを充填))

5. GPC 条件

GPC 条件: カラム、CLNpak EV-2000 (内径 20 mm、長さ 300 mm、昭和電工製)に CLNpak EV-G (内径 20 mm、長さ 100 mm、昭和電工製)を接続; 移動相、アセトン・シクロヘキサン (1:4); 流速、5 mL/min; カラム温度、40°C; 注入量、4 mL

分取範囲: アクリナトリン及びトリシクラゾールの混合溶液 (5 mg/L) を移動相で調製し、その 4 mL を GPC に注入して 254 nm でモニターし、あらかじめ分取範囲を確認した。牛(筋肉)では、アクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールの溶出終了までを分取した。牛(肝臓)では、画分 1 (アクリナトリンの保持時間からアクリナトリンの溶出終了まで) 及び画分 2 (アクリナトリンの溶出終了からトリシクラゾールの溶出終了まで) を分取した。

6. ブランク試験溶液の調製

リンゴ、オレンジ、ばれいしよ、キャベツ、ホウレンソウ及び玄米は、通知の GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)(食安発第 1129002 号平成 17 年 11 月 29 日)に従って、牛(筋肉)及び牛(肝臓)は、GC/MS による農薬等の一斉

試験法(畜産物)(食安発第 1129002 号平成 17 年 11 月 29 日)に従って試験溶液を調製した。

8 食品の試験溶液を等量ずつ混合物し、ブランク試験溶液とした。

C. 研究結果及び考察

GC-MS/MS 法を残留農薬分析へ適用するためには、農薬毎に MS/MS 条件を求める必要がある。MS/MS 測定としては、既に LC-MS/MS 法が汎用されているが、LC-MS/MS 法の場合、イオン化には主に ESI 法が用いられているため、生成するフラグメントイオンは分子イオンなど少数である。そのため、MS/MS 条件を求める場合、プリカーサーイオンの候補となるイオンは限定されており、数個のプリカーサーイオンについて、プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの適切な組み合わせを求めれば良い。これに対して GC-MS 法で用いられているイオン化法である EI 法では、多数のフラグメントイオンが生成するため、候補となるプリカーサーイオンが多数存在する。そのため、最適な MS/MS 条件を得るためには、多数の候補プリカーサーイオンについて、プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの適切な組み合わせを検討する必要があり非常に煩雑である。

装置メーカーである Varian 社から、約 300 農薬について約 550 種類の MS/MS 条件(プリカーサーイオン、プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの組み合わせ)が提供されているが、これは標準物質を用いて、シグナル強度を指標にして選択されたものであり、食品中の夾雑成分の妨害等を考慮しておらず、必ずしも食品中の残留農薬分析に適した条件ではない場合がある。

そこで、オキシクロロデン(図 1)をモデル物質に用いて、最適な MS/MS 条件を求める方法について検討した。

1. プリカーサーイオンの検討

一般にプリカーサーイオンの候補イオンとしては、有効なプロダクトイオンが得られるように、で

きるだけ高質量でかつ強度の強いイオンを用いる方が良いと思われる。オキシクロロデンのマススペクトルを図 2 に示したが、高質量のイオンとして m/z 300 以上にもフラグメントイオンが観察されるが、ベースピークは m/z 114.9 であり、強度の強いイオンは m/z 100~200 の範囲に観察された。そのため、オキシクロロデンを含めこれと同様のマススペクトルを示す化合物の場合、高質量でかつ強度の強いイオンという条件を同時に満たすイオンを特定することはできない。そこで、まずマススペクトルの実測データから強度順に候補イオンを絞り込むことにした。その際、ブランク試験溶液の測定を行い、夾雑成分の影響をできるだけ受けにくいフラグメントイオンを選択し、 m/z 388.8、 m/z 386.8、 m/z 238.9、 m/z 236.8、 m/z 186.9、 m/z 184.9、 m/z 116.9 及び m/z 114.9 の 8 イオンをプリカーサーイオンの候補イオンとした。

2. プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの検討

用いた装置では、MS/MS 条件を検討するための AMD モードが用意されている。AMD モードでは、コリジョンエネルギーを切り換えながらプロダクトスキャン測定をすることにより、1 回の測定で複数のコリジョンエネルギーを同時に検討することが可能である。そこで、各候補プリカーサーイオンについて、AMD モードで測定を行い、候補プリカーサーイオンごとにプロダクトイオンとコリジョンエネルギーの最適な組合せについて検討した。なお、検討するコリジョンエネルギーの範囲は -5~-35 eV とし、5 eV 間隔で 7 条件(-5、-10、-15、-20、-25、-30 及び -35 eV)について検討した。

図 3 にオキシクロロデンのプリカーサーイオンの候補イオンの一つである m/z 184.9 を AMD 測定したときの、各コリジョンエネルギーにおけるプロダクトスキャンスペクトルを示した。コリジョンエネルギーの増加とともに高質量側のフラグメントイオンが減少し、低質量のフラグメントイオンが増加する様子が示された。次に候補となるプロ

ダクトイオンを絞り込むために、各コリジョンエネルギーにおける m/z 184.9 のプロダクトスキャンの平均スペクトルを求め図4に示した。図4から m/z 184.9 の主なプロダクトイオンとして、 m/z 184.8、 m/z 156.8、 m/z 148.8、 m/z 120.8、 m/z 116.7 及び m/z 84.8 が観察された。そこで、これら6イオンの強度とコリジョンエネルギーとの関係を求め図5に示した。その結果、強度が最大になるプロダクトイオン/コリジョンエネルギーの組合せは、 m/z 184.8/-5 eV、 m/z 156.8/-10 eV、 m/z 148.8/-5 eV、 m/z 120.8/-10 eV、 m/z 116.7/-20 eV 及び m/z 84.8/-25 eV であった。

一方、図6にはブランク試験溶液を用いてプリカーサーイオンを m/z 184.9 として AMD 測定したとき時の、各コリジョンエネルギーにおけるマスプロマトグラム (m/z 120.8) を示した。食品由来の夾雑成分によるノイズは、コリジョンエネルギーが小さいほど大きく、エネルギーの大きさにより差が見られた。ノイズに差がないのであれば、前述の結果のように、イオン強度のみでプロダクトイオンとコリジョンエネルギーの組み合わせを判断することが可能であるが、実際にはコリジョンエネルギーの大きさによりノイズに差が見られた。そのため、食品由来の夾雑成分の影響を受けにくい MS/MS 条件を求めするためには、ノイズの影響を加味した指標として S/N 比を用いることにより、より適切な結果が得られると考えられた。

そこで、ブランク試験溶液を同一条件で測定し、オキシクロルデンの保持時間付近での各候補プロダクトイオンのマスプロマトグラムから各コリジョンエネルギーにおけるノイズを求め、求めたノイズで対応するプロダクトイオンのイオン強度を除して S/N 比を求めた。図7にはオキシクロルデンの m/z 184.9 をプリカーサーイオンとしたときの、各候補プロダクトイオンの S/N 比とコリジョンエネルギーとの関係を示した。その結果、S/N 比が最大になるプロダクトイオン/コリジョンエネルギーの組合せは、 m/z 184.8/-10 eV、 m/z 156.8/-10 eV、 m/z 148.8/-5 eV、 m/z 120.8/-15 eV、 m/z 116.7/-20 eV 及び m/z 84.8/-25 eV であった。最

適なコリジョンエネルギーについて、イオン強度から求めた場合と S/N 比から求めた場合とでは、 m/z 184.8 及び m/z 120.8 に違いが見られた。原因としては、前述のようにコリジョンエネルギーが小さいほど食品由来の夾雑成分によるノイズが大きかったためと考えられる。

このように、各プロダクトイオンの最適なコリジョンエネルギーを求める方法については、イオン強度を用いる方法と S/N 比を用いる方法とでは違いがあることがわかった。そこで、食品由来の夾雑成分の影響を受けにくい MS/MS 条件を求めするために、ノイズの影響を加味した S/N 比を用いる方法を用いることにした。この方法を用いて、各候補プリカーサーイオンについて最適なプリカーサーイオン、プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーの組合せを求めた結果を表1に示した。なお、検討では未解離のプリカーサーイオンもプロダクトイオンの対象に含めた。また、安定したプロダクトイオンが得られるコリジョンエネルギーを求めるために、プロダクトイオンの S/N 比とコリジョンエネルギーとの関係のグラフからピークトップ付近で変動を受けにくいコリジョンエネルギーを選択した。

3. 最適な MS/MS 条件の検討

得られた53条件の中から最適な MS/MS 条件を求めするためには、すべての MS/MS 条件を用いて同時測定することにより、どの MS/MS 条件が最も食品由来の夾雑成分の影響を受けにくくかつ高感度か比較する必要がある。そこで、オキシクロルデン標準溶液 (1 mg/L) とブランク試験溶液を同一条件で交互に測定して、各 MS/MS 条件におけるオキシクロルデンのピーク高さ及びオキシクロルデンの保持時間付近のブランク試験溶液のノイズを求めるとともに、ピーク高さをノイズで除して S/N 比を求めた (表1)。また、表1にはピーク高さ及び S/N 比の大きな順にそれぞれ順位付けをした結果も示した。

プロダクトイオンに未解離のプリカーサーイオンを指定した場合 (即ちプリカーサーイオン=プ

ロダクトイオンの場合)には、 m/z 388.8 及び m/z 386.8 を除きノイズが大きく、結果として S/N 比が小さくなった。これは、MS/MS 測定であってもプリカーサーイオン=プロダクトイオンの場合は、SIM 測定と同様の測定モードになるため、質量分離が不十分になるためと思われる。よって、一般的には、プロダクトイオンには未解離のプリカーサーイオンは適していないと思われる。しかし、 m/z 388.8 及び m/z 386.8 のように高質量のイオンであれば、夾雑成分のノイズも少なく MS/MS 条件となり得る場合があるため、他に適切な MS/MS 条件がない場合には、高質量の未解離のプリカーサーイオンをプロダクトイオンに用いて検討することも選択肢の一つと考えられた。

表2には S/N 比あるいはピーク高さで並べ替えたときの結果をそれぞれ上位 10 条件について示した。最適な MS/MS 条件を S/N 比から求めた場合とピーク高さから求めた場合とでは、結果に差が見られた。このことから、装置メーカーから提供される MS/MS 条件は、シグナル強度のみを指標にしており、食品中の夾雑成分によるノイズが考慮されていないため、必ずしも食品中の残留農薬分析に最適な MS/MS 条件ではない場合があることが示唆された。

D. 結論

以上の検討から、今回検討した MS/MS 条件を求める方法をまとめると以下のようになる。

①対象農薬のマスペクトルから、強度が強くなるだけ高質量のフラグメントイオンの中から、食品中の夾雑成分の影響を受けにくいイオンをプリカーサーイオンの候補イオンとして選択する。

②各候補プリカーサーイオンについて、AMD 測定を行い、ブランク試験溶液のノイズから求めた S/N 比を指標として、候補プロダクトイオンごとにコリジョンエネルギーの最適値を求める。

③②で求めた MS/MS 条件を用いて、GC-MS/MS 測定を行い、ブランク試験溶液のノイズから求めた S/N 比を指標として、最適な MS/MS 条件を決定する。

食品由来の夾雑成分の影響の検討に用いた食品は 8 食品と限られているものの、食品のブランク試験溶液のノイズから求めた S/N 比を指標とする方法は、シグナル強度を用いた方法よりも、より高い選択性及び感度が期待できるため、食品中の残留農薬分析に適した MS/MS 条件を求めるのに有効な方法と考えられる。

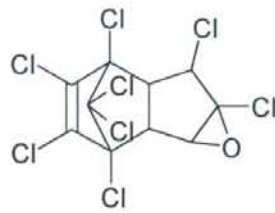


図1 オキシクロルデン

$C_{10}H_4Cl_8O$ (mol. wt. 423.8)

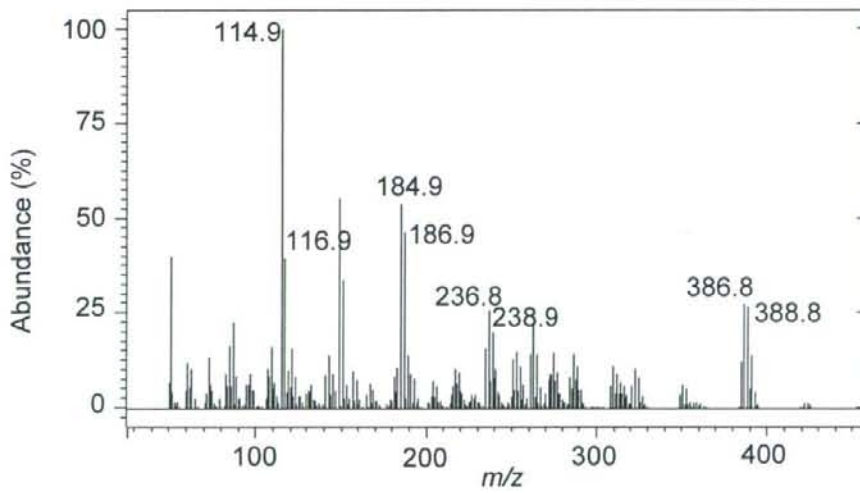


図2 オキシクロルデンのマスペクトル

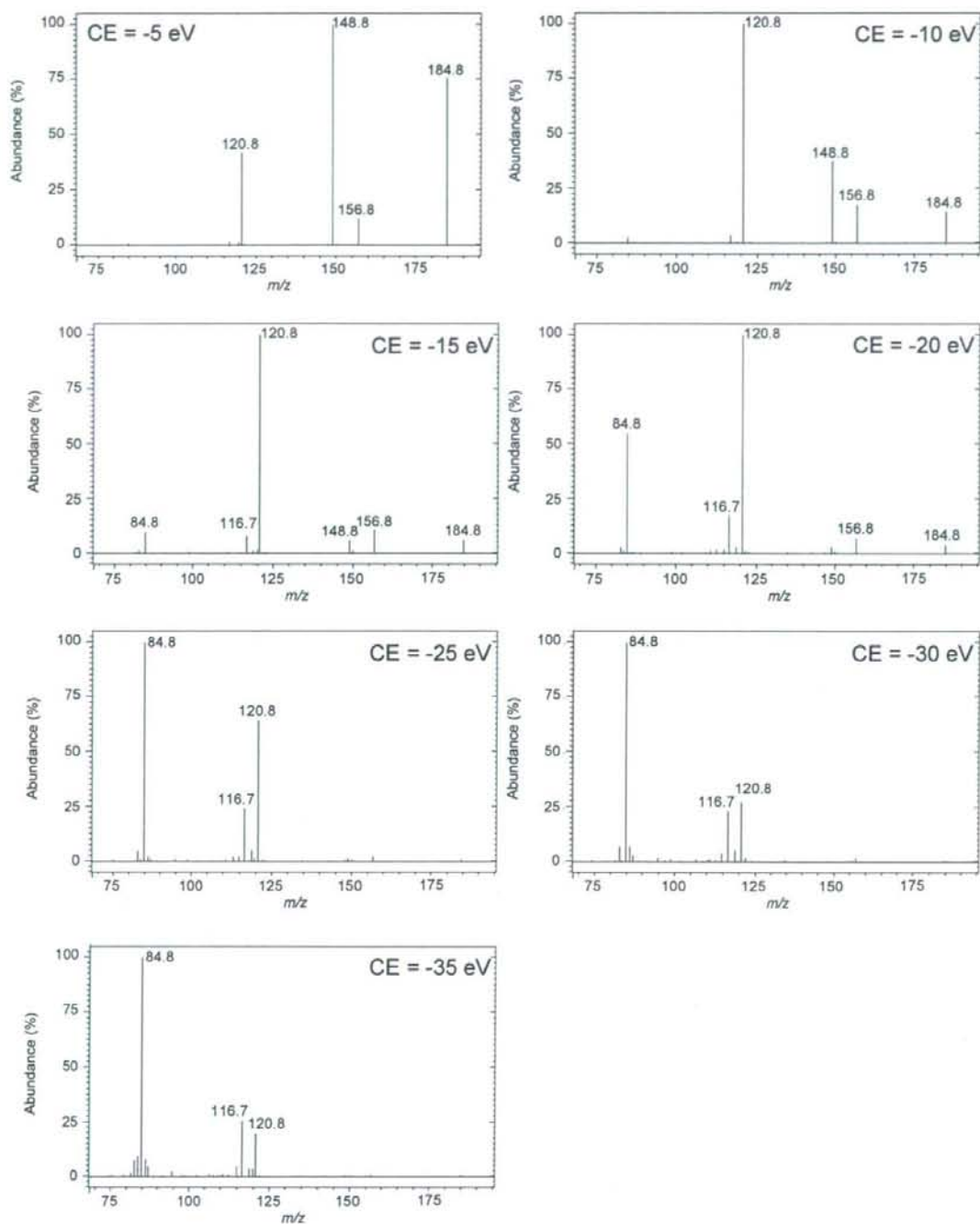


図3 オキスクロルデンの m/z 184.9 の各コリジョンエネルギーにおけるプロダクトスキャン
スペクトル

CE: コリジョンエネルギー

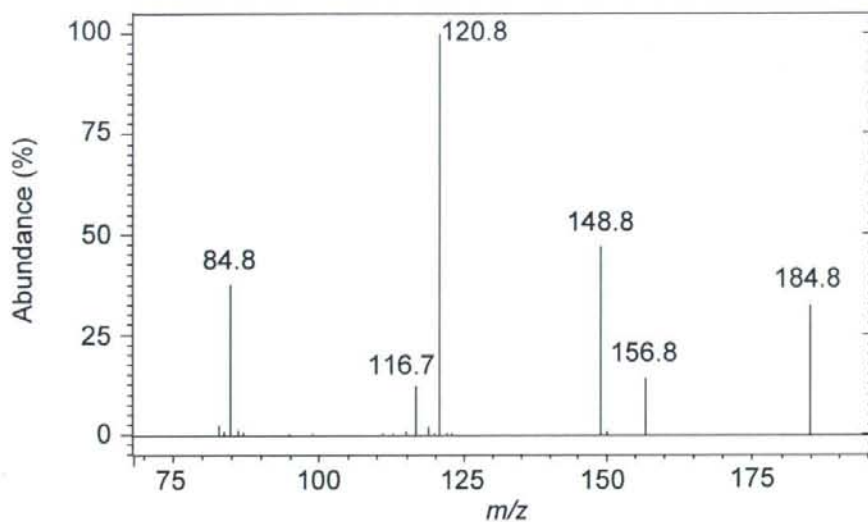


図4 オキシクロルデンの m/z 184.9 のプロダクトスキャンの平均スペクトル

各コリジョンエネルギー(-5、-10、-15、-20、-25、-30 及び-35 eV)におけるプロダクトスキャンの平均スペクトル

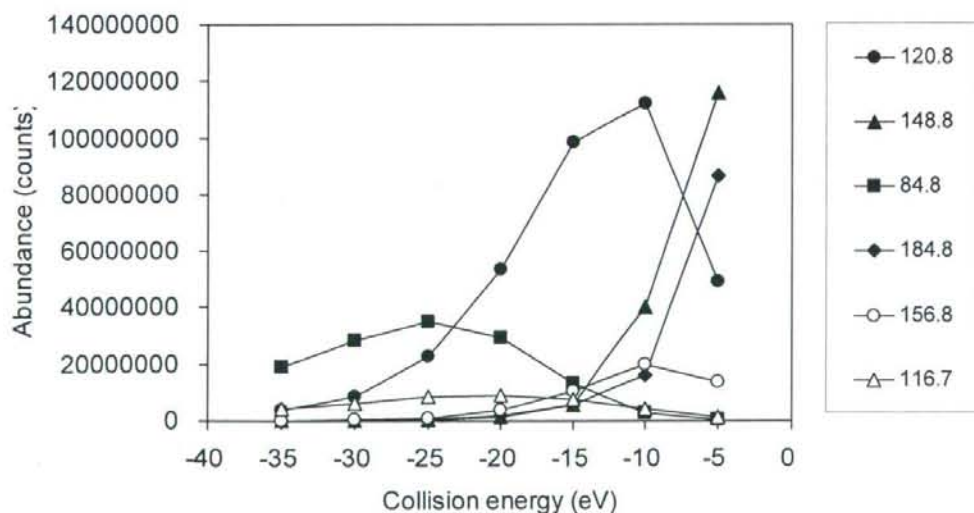


図5 オキシクロルデンの m/z 184.9 をプリカーサーイオンとした時の各のプロダクトイオンの強度とコリジョンエネルギーとの関係

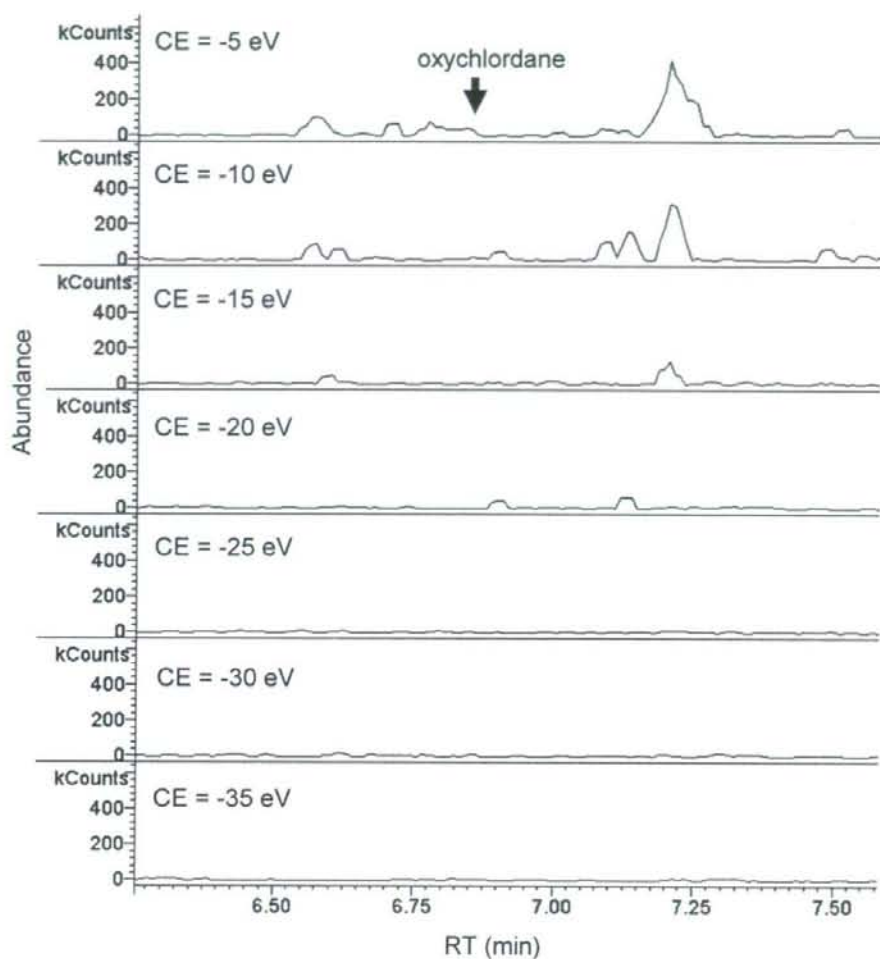


図6 ブランク試験溶液を用いてプリカーサーイオンを m/z 184.9 として AMD 測定を行った時の各コリジョンエネルギーにおけるマスクロマトグラム (m/z 120.8)

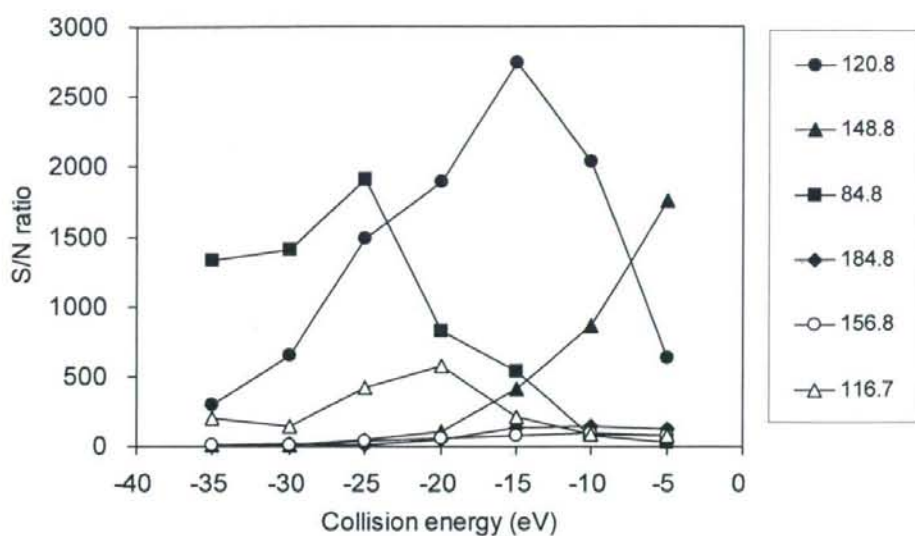


図7 オキシクロルデンの m/z 184.9 をプリカーサーイオンとした時の各プロダクトイオンの S/N 比とコリジョンエネルギーとの関係