

I. 総括研究報告

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

研究代表者 根本 了

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

研究代表者 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

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、現在約 800 品目を超える農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性確保のためには、膨大な数の残留農薬等を分析し、精確かつ効率的に分析値を求める必要がある。しかし、食品マトリックスの影響により精確な分析値を得ることが困難な場合がある。その際には安定同位体標識標準品(「安定同位体」と略す。)を用いた内標準法や標準添加法による定量法が提案されているが、その標準的使用法及び評価基準は示されていない。また、現在汎用されている GC-MS(/MS) や LC-MS(/MS) では設定した化合物しか検出できず、かつ装置の制約により何百もの化合物を同時に測定するのは困難である。一方、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)は、化合物毎の条件設定は不要で、同時測定可能な化合物数に制限はないため網羅的な測定が可能であるが、残留農薬等検査への適用例は非常に少ない。そこで本研究では、残留分析に適した「精確な定量法の確立」及び「効率的・網羅的な分析法の開発」の 2 つの課題について検討を行った。

1. 精確な定量法の確立

1) 安定同位体標識標準品による内標準法を用いた精確な定量法の検討

食品中残留農薬等分析における安定同位体標識標準品を用いた内標準法の標準的使用法及び評価基準を確立することを目的として、先ず、検討対象農薬等及び対応する安定同位体を LC-MS/MS で測定した。得られた結果を基に、安定同位体の種類や数、測定条件など、分析値に影響を及ぼす可能性がある因子について基礎的考察を行った。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

残留農薬分析に適した標準添加法を用いた精確な定量法の検討においては、大豆マトリックス標準溶液を用いて検量点数や添加濃度の定量精度に与える影響について評価した。その結果、初期濃度に近い 1 点を複数回繰り返し測定した場合の方が、多数の検量点を用いた場合よりも良好な結果が得られた。

2. 効率的・網羅的な分析法の開発

飛行時間型質量分析計(LC-(Q)TOF-MS、GC-TOF-MS)を用いた効率的・網羅的な分析法の検討を行った。LC-(Q)TOF-MS 法の検討では、残留農薬分析に適した測定条件及び定量解析条件を確立し、フラグメントイオンによる確認方法についても検討した。151 農薬を用いてピーク面積の再現性や検量線の直線性について評価したところ、9 割以上で良好な結果が得られた。GC-TOF-MS 法の検討では、ほうれんそう及び玄米のマトリックス標準溶液を用いて定量条件を確立した。184 農薬について定量性、選択性、検出限界、検量線の直線性について評価したところ、検討農薬の約 9 割で良好な結果が得られた。

研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所

食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、現在約 800 品目を超える農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性確保のためには、膨大な数の残留農薬等を分析し、精確かつ効率的に分析値を求める必要がある。

そこで本研究では、残留分析に適した「精確な定量法の確立」及び「効率的・網羅的な分析法の開発」の 2 つの課題について検討した。

(1) 精確な定量法の確立

分析する食品は多種多様であり、農薬等の中には測定の際に食品由来の夾雑成分の影響を受け易いものや、分析操作中に分解・揮散するものなどもあり、精確な分析値を求めることが困難な場合がある。このような場合に、時間と手間を要する追加精製や分解等の防止処理などの検討を行うことなく、効率的に精確な分析値を求める手法として、安定同位体標識標準品(安定同位体と略す。)を用いた内標準法や標準添加法による定量法が提案されている。しかしながら、現状ではこれら手法を使用するための標準的な方法や評価基準などは示されておらず、また、どの程度まで精確な分析値が得られるかなどの詳細な情報はほとんど無い。

本研究では、1) 安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法及び 2) 標準添加法を用いた精確な定量法について、食品中残留農薬

等分析に適用するための標準的使用方法及び評価方法の確立について検討する。

平成 25 年度は、安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法の検討では、検討対象化合物を液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)で測定し、安定同位体の標識同位体の種類や数、測定条件など、内標準法を適用する上で精確な定量に影響を及ぼす可能性がある因子について考察した。標準添加法を用いた精確な定量法の検討では、マトリックス標準溶液を用いて検量点数や添加濃度の定量精度に与える影響について検討した。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

食品中の残留農薬等の分析では、高感度かつ高選択的な測定が可能な LC-MS/MS や GC-MS/MS 等の四重極型質量分析計が汎用されているが、化合物ごとに測定イオンや MS パラメーターを設定する必要があり、データポイント数の制約により同時に測定可能な化合物数に制限がある等の問題点がある。これに対して、飛行時間型質量分析計(TOFMS)は、化合物毎の条件設定は不要で、同時測定可能な化合物数に制限はないため網羅的な測定が可能であるが、残留農薬等検査への適用例は非常に少ない。

本研究では、TOFMS を用いた方法(LC-(Q)TOF-MS 法及び GC-TOF-MS 法)を残留農薬分析に適用するため、平成 25 年度は残留農薬一斉分析に適した LC-(Q)TOF-MS 及び GC-TOF-MS の測定条件及び定量解析条件を確立し、定量性や選択性等について評価した。

B. 研究方法

(1) 精確な定量法の確立

1) 安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

平成 25 年度は、検討対象農薬等として選択したスルファジアジン (SDZ)、スルファメトキサゾール (SMXZ)、チアベンダゾール (TBZ) 及びトリメトプリム (TMP)、並びにこれらの重水素 (d) 標識及び炭素 13 (^{13}C) 標識安定同位体である SDZ- d_4 、SDZ- $^{13}\text{C}_6$ 、SMXZ- d_4 、SMXZ- $^{13}\text{C}_6$ 、TBZ- d_6 、TBZ- $^{13}\text{C}_6$ 、TMP- d_3 、TMP- $^{13}\text{C}_3$ 及び TMP- d_9 について液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した。得られた測定結果から、安定同位体の標識同位体の種類や数、測定条件など、安定同位体による内標準法を適用する上で精確な定量に影響を及ぼす可能性のある因子について考察した。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法

通知「農薬等の GC-MS 一斉試験法」を一部変更した方法を用いて、大豆マトリックス標準溶液 [0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試料中濃度 0.01 ppm 相当)] を調製した。これを用いて標準添加法における検量点を 5 点 (分析対象化合物の添加量として 0.5、1、1.5、2 及び 3 倍量) 調製し、それぞれ 3 回測定して初期濃度を推定し、検量点数や添加濃度の定量精度に与える影響について検討した。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-QTOF-MS 法の検討

残留農薬の一斉分析に適した TOF-MS 条件 (キャピラリー電圧、コーン電圧及びコリジョンエネルギー) の最適化を、分子量約 200 から 700 の 6 農薬を用いて行った。キャピラリー電圧は 500 ~ 3000 V の範囲 (コーン電圧 20 V 及びコリジョンエネルギー 4 eV) について、コーン電圧は 10 ~ 120 V の範囲 (キャピラリー電圧 1000 V 及びコリジョンエネルギー 4 eV) について、コリジョンエネルギーは 0 ~ 50 V の範囲 (キャピラリー電

圧 1000 V 及びコーン電圧 20 V) について検討した。

LC-QTOF-MS 法を用いた確認方法として、フラグメントイオン及び同位体イオンによる確認方法について、151 農薬を対象に標準溶液 [0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試料中濃度 0.01 ppm 相当)] を用いて検討した。フラグメントイオンによる確認方法の検討では、確認に有効なフラグメントイオンを得るのに適したコリジョンエネルギーについても検討した。

残留農薬の一斉分析に適した抽出質量幅を検討するために、溶媒標準溶液 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 5 回繰り返し測定し、抽出質量幅を 2、5、10 及び 20 mDa に設定してピーク面積の変動を比較した。また、抽出質量幅の選択性に対する影響を評価するために、通知「農薬等の LC-MS 一斉試験法」を一部変更した方法を用いて、キャベツマトリックス標準溶液 (試料中濃度 0.01 ppm 相当) を調製し、151 農薬を対象に妨害ピークの状態を検討した。また、検量線について、151 農薬を対象に、0.001 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲の標準溶液を測定して評価した。

2) GC-TOF-MS 法の検討

184 農薬を対象に、通知「農薬等の GC-MS 一斉試験法」を一部変更した方法を用いて、ほうれんそう及び玄米のマトリックス標準溶液 (試料中濃度 0.005 ppm 及び 0.05 ppm 相当) を調製し、5 回繰り返し測定して、抽出質量幅 (10、20、50 及び 100 mDa) のピーク面積の変動及び選択性に対する影響を検討した。また、試料中濃度 0.005 ppm (低感度の農薬は 0.05 ppm) 相当のマトリックス標準溶液を 5 回測定し、抽出質量幅を 50 mDa に設定してピーク面積を求め、3 値から検出限界 (LOD) 濃度を算出した。また、検量線について、高濃度 (0.025 ~ 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び低濃度 (0.0025 ~ 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の標準溶液を測

定して評価した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に必要としなかった。

C. 研究結果

(1) 精確な定量法の確立

1) 安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間について

設定した LC-MS/MS 測定条件下で各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定した結果、若干ではあるが、検討対象農薬等と対応する安定同位体では異なる保持時間が得られた。安定同位体の方が農薬等よりも若干保持時間が短く、また、安定同位体の標識数の増加に伴い、保持時間はより短くなることが予想された。更に、¹³C 標識安定同位体よりも d 標識安定同位体の方が、保持時間の変動に対する寄与が大きいたことが推察された。

また、アセトニトリル比率の勾配の異なるグラジエント条件で測定した結果、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配の増加に伴い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差はある程度まで小さくなる傾向があることが確認された。

検討対象農薬等のピーク面積値に及ぼす安定同位体中の不純物の影響について

添加する安定同位体中に標識されていない化合物、すなわち分析対象となる農薬等そのものが含まれていれば、最終的に得られる分析対象農薬等の分析値は、実際の値よりも高い値となる。そこで、本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体をそれぞれ測定し、

得られたピーク面積値について考察した。

本研究で使用した安定同位体では、高濃度 (1 µg/mL) の溶液を測定した場合においても、検討対象農薬等の測定イオンに由来するピークは小さく、使用した安定同位体中には、標識されていない化合物、すなわち検討対象農薬等そのものはほとんど含まれていないことが確認された。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法

検量点が 5 点の場合は、検討した 23 化合物はいずれも、決定係数が $r^2 > 0.99$ となり、良好な直線性が得られたが、本回帰式から求めた初期濃度は期待値 (10 ng/mL) よりも低い濃度となった。一方、初期量の 3 倍量の分析対象化合物を添加した 1 点で求めた場合の推定濃度は、5 点の回帰式から求めた場合より期待値に近い値となった。更に、初期量と同量の分析対象化合物を添加した 1 点で求めた場合には、より期待値に近似した値が得られた。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-QTOF-MS 法の検討

農薬は様々な構造や分子量を持つことから、農薬ごとに最適な TOF-MS 条件は異なると予想されるが、TOF-MS 測定では化合物ごとに TOF-MS 条件を設定することは困難である。そのため、LC-TOF-MS を用いて残留農薬の一斉分析を行う際には、幅広い農薬に適した代表的な TOF-MS 条件を設定する必要がある。そこで、TOF-MS 条件として、キャピラリー電圧、コーン電圧及びコリジョンエネルギーの 3 種類のパラメーターについて最適化を行った。その結果、最適な値として、キャピラリー電圧 1000 V、コーン電圧 20 V 及びコリジョンエネルギー 4 eV (定量用) が得られた。

LC-QTOF-MS 法を用いた主な確認方法とし

て、フラグメントイオン及び同位体イオンによる確認方法の検討を行った。検討に当たり、フラグメントイオン測定のためのコリジョンエネルギーの最適化を行ったところ、主なフラグメントイオンのピーク面積は 10~40 eV で最大となるものが多かった。

フラグメントイオン及び同位体イオンを用いた確認方法について検討した結果、検討に用いた 151 農薬のうち 90%以上で一律基準相当濃度において、フラグメントイオンまたは同位体イオンを 1 つ以上検出 ($S/N > 10$) することができた。

抽出質量幅は、選択性及び装置の感度に影響するため、最適な抽出質量幅について検討した。その結果、抽出質量幅 5 mDa 以上では検討農薬の大部分で $RSD < 5\%$ となった。また、キャベツのマトリックス標準溶液の検討から、抽出質量幅が狭いほど選択性は高くなったが、1 mDa まで狭めるとピーク形状に劣化が見られた。 S/N 比を指標に定量性及び選択性が良好な抽出質量幅として 10 mDa を選択した。

検量線の検討から、検討した 151 農薬では 0.002 (又は 0.005) $\mu\text{g/mL}$ から 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度範囲では大部分で良好な直線性が得られた。

2) GC-TOF-MS 法の検討

GC-TOF-MS 法の残留農薬一斉分析への適用性を検討するため、溶媒標準溶液及びマトリックス標準溶液を用いて定量性、選択性、検出限界、検量線の直線性について検討した。

抽出質量幅のピーク面積の再現性及び選択性に与える影響について検討した結果、抽出質量幅を 10 mDa または 20 mDa に設定した場合には、いずれの場合も定量を妨害するピークは観測されず、選択性に問題はなかったが、20 mDa の方がピーク面積の再現性がやや良好であった。抽出質量幅を 50 mDa に設定した場合

には一部の農薬で選択性の低下が認められ、100 mDa に設定した場合には、選択性が低下した農薬が増加し、更に 10 または 20 mDa の場合よりノイズレベルが高くなったことにより感度が低下した農薬が増加した。

検出限界濃度は、ほうれんそうで 2 農薬、玄米で 8 農薬を除き、0.01 ppm 未満であった。

検量線は、高濃度範囲 (0.025 ~ 0.15 $\mu\text{g/mL}$) では検討した全ての農薬で良好な直線性が得られ、低濃度範囲 (0.0025 ~ 0.015 $\mu\text{g/mL}$) でも一部の農薬を除き、良好な直線性が得られた。

D. 考察

(1) 精確な定量法の確立

1) 安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間について

設定した LC-MS/MS 測定条件において各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定した結果、若干ではあるが、検討対象農薬等よりも、対応する安定同位体の方が保持時間が短いことが確認された。また、安定同位体の標識数の増加に伴い、保持時間はより短くなる傾向が確認された。更に、 ^{13}C 標識安定同位体よりも d 標識安定同位体の方が保持時間が短くなる傾向が確認された。

また、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配の増加に伴い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差が小さくなる傾向が確認された。

これらの結果から、使用する安定同位体の標識の種類や標識数、使用する LC 条件によっては、分析対象である農薬等と対応する安定同位体の保持時間が大きく異なる可能性があることが示唆された。

分析対象である農薬等と対応する安定同位体の保持時間が異なる場合、測定の際に受ける試料マトリックスの影響も異なり、結果として補正の精度に大きく影響する可能性があることが推察された。したがって、次年度においては、実際の食品マトリックスの存在下で測定を行い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の違いが、正確な補正にどの程度影響するかについて検討する必要があると考えられた。

検討対象農薬等のピーク面積値に及ぼす安定同位体中の不純物の影響について

本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体の高濃度の標準溶液(1 µg/mL)をそれぞれ測定し、安定同位体中の検討対象農薬等の含有の有無を確認した。その結果、本研究で使用した安定同位体の中で検討対象農薬等そのものに由来するピーク面積値が最も大きかったものは TMP- d_3 であったが、1 µg/mL の TMP 標準溶液の測定で得られたピーク面積値の 0.4%程度であった。その他の安定同位体については、検討対象農薬等そのものに由来するピークはほとんど検出されない、もしくは検出された場合であっても 1 µg/mL の検討対象農薬等標準溶液の測定で得られたピーク面積値の 0.1%未満であった。

仮に、本研究で使用した TMP- d_3 を用いた内標準法で TMP の分析を行い、1 µg/g 相当の TMP- d_3 を添加したとすると、検体中の実際の TMP 濃度が 10 ng/g であった場合には、添加した TMP- d_3 由来の TMP が加算され、分析値としては 13 ng/g 程度の値が得られることとなる。

したがって、安定同位体による内標準法を使用する場合には、予め、使用する安定同位体中の分析対象農薬等の有無、含まれる場合にはどの程度含まれるかを確認し、検体中の実際の分析対象農薬等の濃度に影響が無い濃度の安定

同位体を添加することが重要であると考えられた。

2) 標準添加法を用いた正確な定量法

標準添加法における検量点数(1~5点)及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討した結果、初期濃度に近い1点を複数回繰り返し測定した場合の方が、多数の検量点を用いた場合よりも良好な結果が得られると考えられたことから、今後様々な食品で確認する予定である。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-TOF-MS 法の検討

農薬の分子量範囲を想定して分子量約 200 から 700 の 6 農薬を用いて、キャピラリー電圧、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを最適化し、残留農薬の一斉分析に適した TOF-MS 条件を確立した。確認条件の検討から、定量イオンはコリジョンエネルギー 4 eV で測定し、確認のためのフラグメントイオンは 10~40 eV の範囲で走査して測定する条件を見だし、定量イオンとフラグメントイオンを同時に測定することにより、定量と確認を同時に行うことが可能であった。しかしながら、確認のためのフラグメントイオンの測定では、同じ部分構造を有する農薬同士の保持時間が近接していると、フラグメントイオンが重なり、確認が不十分となる場合があったことから、確認の際には、必要に応じてより選択性が高いと考えられる MS/MS 測定等と組み合わせる方が良いと考えられた。

検量線の直線性の範囲は農薬により異なるが、0.1 µg/mL を超える濃度では、検討農薬のほとんどでシグナルが飽和してしまうため、試験溶液を希釈して測定する必要があると考えられた。

2) GC-TOF-MS 法の検討

抽出質量幅のピーク面積の再現性及び選択

性に与える影響についての検討から、ピーク面積の再現性や選択性が良く、且つ、S/N 比も良好であった抽出質量幅 20 ~ 50 mDa を定量に用いるのが良いと考えられた。また、試料中 0.005 ppm 相当濃度(一律基準の 1/2 濃度)において、検討した大部分の農薬において良好なピーク面積再現性及び選択性が得られ、また、検量線も良好な直線性が得られたことから、GC-TOF-MS 法は残留農薬一斉分析法の測定法として適用可能であると考えられた。

E. 結論

(1) 精確な定量法の確立

1) 安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

平成 25 年度は、検討対象農薬等及び対応する安定同位体を LC-MS/MS で測定し、得られた結果を基に、安定同位体を用いた内標準法を使用した際に、分析結果に影響を及ぼし得る条件や因子等について考察した。平成 26 年度は、実際の試料マトリックスの存在下で測定を行い、本年度に得られた知見を基に、安定同位体を用いた内標準法を使用して精確な分析値を得るために必要な条件等を明らかにする予定である。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法

大豆マトリックス標準溶液を用いて検量点数及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討した。今後、様々な食品を用いて検討し、残留農薬検査において実施可能な標準的な方法を確立するとともに、その性能評価基準について検討する予定である。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-TOF-MS 法の検討

残留農薬一斉分析に適した LC-QTOF-MS 測定条件(キャピラリー電圧、コーン電圧及びコリ

ジョンエネルギー)や定量解析条件を確立した。今後、農薬及び動物用医薬品を対象に LC-TOF-MS を用いて妥当性評価試験を行い、LC-TOF-MS 法の一斉分析への適用性について検討を行う予定である。

2) GC-TOF-MS 法の検討

ほうれんそう及び玄米のマトリックス標準溶液を用いて、ピーク面積の再現性や選択性について検討した結果、試料中 0.005 ppm 相当(一律基準の 1/2 濃度、試験溶液の濃縮倍率 試料 2 g 相当/mL)においても、検討農薬の約 9 割で良好な結果が得られた。また、検量線も 0.0025 ~ 0.015 µg/mL 及び 0.025 ~ 0.15 µg/mL の範囲で、検討農薬の大部分で良好な直線性が得られた。これらの結果から、GC-TOF-MS を用いて妥当性評価試験を行い、妥当性が示されれば、スクリーニングのみならず、基準値判定にも GC-TOF-MS 法を用いることが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MS を用いた茶熱湯浸出液中の残留農薬一斉分析法、日本食品化学学会誌、**20**(3)、221-225(2013)

2. 学会発表

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子、手島玲子:超臨界流体抽出及び GC-MS/MS を用いた野菜・果実中の残留農薬一斉分析の検討、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会(2013.11)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子、手島玲子:

LC-MS/MS を用いた茶熱湯浸出液中の残留農薬一斉分析法、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会(2013.11)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子、手島玲子：
LC-QTOF-MS を用いた野菜・果実中の残留農

薬一斉分析の検討、第 106 回日本食品衛生学会学術講演会(2013.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし