

201426015A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

平成 27(2015)年 5 月

目 次

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 -----	1
根本 了	
II. 分担研究報告	
1. 精確な定量法の確立	
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 -----	11
坂井隆敏	
2. 効率的・網羅的な分析法の開発 -----	31
志田(齊藤)静夏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	101
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	105

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 品目の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、これら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

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、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して両者の結果を比較した。得られた結果から、内標準法を用いて測定の際の試料マトリックスの影響を補正する場合に留意すべき条件等について検討及び考察した。

2. 効率的・網羅的な分析法の開発

LC-TOF-MS(液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計)を用いた残留動物用医薬品及び残留農薬の効率的・網羅的な分析法について検討を行った。残留動物用医薬品分析の検討では、89 化合物を用いて、一斉分析に適した TOF-MS 測定条件、LC 条件及び定量解析条件を確立した。確立した測定条件で、ピーク面積の再現性及び検量線の直線性について評価したところ、検討化合物の 9 割以上で良好な結果が得られた。残留農薬分析の検討では、玄米及び大豆を用いて 151 農薬について添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。感度不足などの農薬を除いた評価可能な農薬(約 145 農薬)のうち 9 割以上で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たし、一律基準濃度において、LC-TOF-MS 法を残留農薬一斉分析へ適用可能であることが示された。

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)

志田(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、安定同位体による内標準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 26 年度は、LC-MS/MS 測定の際の試料マトリックスの影響を内標準法で精確に補正する場合に考慮すべき条件等を明らかにすることを目的として、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で得られた結果を比較・考察した。

(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(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。

本研究では、TOF-MS を用いた方法を残留分析に適用するため、平成 26 年度は、LC-TOF-MS を用いた残留動物用医薬品及び残留農薬の効率的・網羅的分析について検討を行った。残留動物用医薬品分析の検討では、残留動物用医薬品の一斉分析に適した TOF-MS 測定条件、LC 条件及び定量解析条件を詳細に検討した。一方、残留農薬分析の検討では、玄米及び大豆を用いて添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行い、LC-TOF-MS 法の一斉分析への適用について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 精確な定量法の確立

安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

平成26年度は、平成25年度と同様の検討対象農薬等であるスルファジアジン(SDZ)、スルファメトキサゾール(SMXZ)、チアベンダゾール(TBZ)及びトリメプリム(TMP)、並びにこれらの重水素(d)標識及び炭素¹³C標識安定同位体であるSDZ-*d*₄、SDZ-¹³C₆、SMXZ-*d*₄、SMXZ-¹³C₆、TBZ-*d*₆、TBZ-¹³C₆、TMP-*d*₃、TMP-*d*₉及びTMP-¹³C₃を用いた。牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を絶対検量線法及び内標準法で定量し、得られた結果を比較することで、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正するために必要な条件等について考察した。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

I. LC-TOF-MS 法による残留動物用医薬品分析の検討

動物用医薬品89化合物を用いて、残留一斉分析に適したLC条件(注入溶媒及び注入量)、TOF-MS測定条件(キャピラリー電圧、コーン電圧、コリジョンエネルギー、脱溶媒ガス流量、脱溶媒温度)及び定量解析条件(抽出質量幅)を詳細に検討した。

TOF-MS測定条件の検討では、キャピラリー電圧は500~3500Vの範囲(コーン電圧20V、コリジョンエネルギー5eV)について、コーン電圧は10~120Vの範囲(キャピラリー電圧1000V及びコリジョンエネルギー5eV)について、コリジョンエネルギーは0~50eVの範囲(キャピラリー電圧1000V及びコーン電圧20V)について、脱溶媒ガス(N₂)流量は700~1100L/hの範囲(キャピラリー電圧1000V、コーン電圧20V、コリジョンエネルギー5eV)について、脱溶媒温度は350~550°Cの範囲(キャピラリー電圧1000

V、コーン電圧20V、コリジョンエネルギー5eV)について検討した。

LC条件の検討では、注入溶媒についてはアセトニトリルと水の混合比率について、注入量は1~3µLについて検討した。

定量解析条件の検討では、溶媒標準溶液(0.1µg/mL)を5回繰り返し測定し、抽出質量幅5、10及び20mDaにおけるピーク面積の変動を比較して、最適な抽出質量幅を求めた。

II. LC-TOF-MS 法による残留農薬一斉分析法の妥当性評価

玄米及び大豆を用いて151農薬について添加濃度0.01ppmで1日2併行、5日間の妥当性評価試験を行った。試験溶液は、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」(食安発第1129002号平成17年11月29日)の穀類、豆類及び種実類の場合において、以下の点を変更した方法を用いて調製した。

- ① 塩析の際、振とう後、遠心分離(毎分3000回転、5分間)を行った。
- ② ODSミニカラム精製の溶出溶媒量を5mLとした。
- ③ グラファイトカーボン/NH₂積層ミニカラム精製をグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム精製に変更した。

(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

安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

①絶対検量線法による回収率

マトリックス添加標準溶液を絶対検量線法で定量した場合、測定の際に試料マトリックスの影響が無ければ、得られる回収率は 100%の近似値となり、回収率が 100%の近似値とならなければ、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていると考えられる。

本研究で調製したマトリックス添加標準溶液を絶対検量線法で定量した場合、検討対象農薬等の種類や測定の際のグラジエント条件によっては、回収率が 100%の近似値とならず、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていることが推察された。

②内標準法による回収率

対応する安定同位体を用いた内標準法により、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正することが出来れば、マトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した場合、得られる回収率は 100%の近似値となることが予想される。

本研究で調製したマトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した場合、¹³C 標識安定同位体を使用した際には、各グラジエント条件下、各検討対象農薬等について 100%に近い回収率が得られた。

一方、d 標識安定同位体を使用した際には、用いるグラジエント条件や検討対象農薬等の種類によっては、回収率が 100%の近似値とならない場合があることが確認され、このような場合には精確な定量値が得られない可能性が高いことが示唆された。なお、グラジエントにおけるアセトニトリル濃度の増加勾配を大きくすることにより、回収率は 100%に近い値となる傾向が確認された。

③保持時間

各グラジエント条件下において、各検討対象農薬等と対応する ¹³C 標識安定同位体の保持時

間はほとんど一致していた。

一方、d 標識安定同位体については、数秒程度ではあるものの、対応する各検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。

(2)効率的・網羅的な分析法の開発

I. LC-TOF-MS 法による残留動物用医薬品分析の検討

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ため、LC-TOF-MS を用いて残留一斉分析を行う際には、幅広い対象化合物に適した代表的な TOF-MS 条件を設定する必要がある。そこで、残留一斉分析に適した測定条件について、動物用医薬品 89 化合物を用いて検討した。

TOF-MS 測定条件の検討から、最適な条件として、キャピラリー電圧 1000 V、コーン電圧 20 V、コリジョンエネルギー 5 eV、脱溶媒ガス (N₂) 流量 800 L/h、脱溶媒温度 450°C が得られた。

LC 条件のうち注入溶媒及び注入量について、ピーク形状を指標に検討したところ、最適な注入溶媒としてアセトニトリル/水 (20:80) が、注入量として 3 μL が得られた。

定量解析条件の検討では、抽出質量幅について、ピーク面積の再現性を指標に検討した。その結果、再現性は抽出質量幅 5 mDa より 10 mDa 及び 20 mDa の方が良好であり、10 mDa 及び 20 mDa では、大きな差は認められなかったことから、抽出質量幅には、より選択性の高い 10 mDa を選択した。

II. LC-TOF-MS 法による残留農薬一斉分析法の妥当性評価

平成 25 年度に求めた残留農薬一斉分析に適した LC-TOF-MS 測定条件を用いて、玄米及び大豆を対象に添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併

行、5 日間の添加回収試験を行った。その結果、検討した 151 農薬のうち、十分な測定感度が得られなかった農薬及び残留が見られた農薬を除いた約 145 農薬のうち、玄米では約 94%、大豆では約 93%の農薬で、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。また、試料マトリックスの測定への影響(溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比)を求めたところ、玄米及び大豆いずれも、検討農薬の9割以上で0.8~1.1となり、大きな影響は認められなかった。なお、用いた玄米試料中に残留が認められた 2 農薬 (ferimzone、tricyclazole)はいずれも基準値未満であった。

D. 考察

(1) 精確な定量法の確立

安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

① 絶対検量線法による回収率

SMXZ については、各グラジエント条件下で 100%に近い回収率が得られたことから、測定の際に試料マトリックスの影響をほとんど受けていないことが示唆された。

SDZ 及び TMP については、使用するグラジエント条件によっては回収率が 80%程度となる場合があり、このような測定条件においては測定の際に試料マトリックスの影響を受け、見かけの回収率が減少していることが示唆された。

TBZ については、使用するグラジエント条件によっては回収率が 70%未満となる場合があり、本研究で用いた検討対象農薬等の中では、測定の際の試料マトリックスの影響が最も大きな化合物であることが推察された。

② 内標準法による回収率

調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を、各検討対象農薬等に対応す

る安定同位体を用いた内標準法で定量した場合、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正出来ていれば、得られる回収率は 100%の近似値となることが予想された。

^{13}C 標識安定同位体を用いた場合には、各検討対象農薬等について、各グラジエント条件下で、100%に近い回収率が得られたことから、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正出来ていることが推察された。

一方、d 標識安定同位体を用いた場合には、使用するグラジエント条件によっては回収率が 100%に近い値とならない検討対象農薬等もあり、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正出来ない場合があることが確認された。このような場合には、実際の検査において内標準法を用いて定量した場合であっても、得られた定量値は実際の濃度とは異なり、偽陰性や疑陽性といった望ましくない結果を与える可能性があると考えられた。

③ 保持時間

各グラジエント条件における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を調査した。その結果、各検討対象農薬等と対応する ^{13}C 標識安定同位体の保持時間はほとんど一致した。一方、d 標識安定同位体は、数秒程度ではあるものの、各検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。また、グラジエントにおけるアセトニトリル濃度の増加勾配を大きくすることにより、若干ではあるが d 標識安定同位体と各検討対象農薬等の保持時間の差を小さくすることが可能であった。

各グラジエント条件における、絶対検量線法及び内標準法を用いて定量した場合の回収率の違いや、保持時間の差などを基に考察すると、アセトニトリルの濃度勾配が小さい場合には検討対象農薬等と試料マトリックス成分の分離は

良いが、各検討対象農薬等と対応するd標識安定同位体も分離され、質量分析の際に受ける試料マトリックスの影響の程度に違いが生じ、結果として、内標準法で定量した場合に精確な定量値が得られない原因となることが推察された。

以上のことから、d標識安定同位体を用いた内標準法により精確な定量値を求めるためには、質量分析における試料マトリックスの影響が大きくなる可能性はあるが、グラジエントにおける溶出溶媒の濃度の増加勾配を出来る限り大きくし、分析対象化合物と対応する安定同位体の保持時間の際が小さい条件で測定する必要があると考えられた。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

I. LC-TOF-MS 法による残留動物用医薬品分析の検討

動物用医薬品で得られた LC-TOF-MS 条件は、平成25年度に農薬を用いて得られた条件と、コリジョンエネルギーの値が若干異なる以外は同じであった。コリジョンエネルギーについては、今回の検討では5 eVを選択したが、農薬を用いた検討では4 eVを選択しており、ほぼ同じ結果が得られた。動物用医薬品では4 eV未満では面積が減少するのに対して、農薬では一部の農薬を除き0~8 eVでピーク面積が最大となったことから、農薬と動物用医薬品の同時測定を行う場合には、5 eVを用いると良いと推察された。

II. LC-TOF-MS 法による残留農薬一斉分析法の妥当性評価

玄米及び大豆を用いた妥当性評価試験(添加濃度 0.01 ppm)の結果、検討農薬の9割以上で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たし、一律基準濃度での評価が可能であることが示されたことから、LC-TOF-MS 法は農産物(穀類・豆

類)の残留農薬一斉分析法として残留農薬検査に活用することが可能であると思われる。また、網羅的な測定ができることから、検討農薬及び農産物を増やして、広範囲の農薬及び農産物に適用できることを確認できれば、検査の効率化・迅速化が期待できる。

E. 結論

(1) 精確な定量法の確立

安定同位体による内標準法を用いた精確な定量法

平成26年度は、牛の肝臓試料から調製したマトリックス添加標準溶液を3つの異なるグラジエント条件下で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して得られた結果を比較・解析することで、内標準法を用いて精確な分析値を得るために必要な条件等を考察した。

平成27年度は、種々の畜水産物を対象として添加回収試験を実施し、内標準法による定量をどの程度まで適用可能であるかを検証する予定である。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

I. LC-TOF-MS 法による残留動物用医薬品分析の検討

残留動物用医薬品一斉分析に適した、TOF-MS 測定条件(キャピラリー電圧、コーン電圧、コリジョンエネルギー、脱溶媒ガス流量、脱溶媒温度)、LC 条件(注入溶媒及び注入量)及び定量解析条件(抽出質量幅)を確立した。今後、一斉分析への適用性について検討を行う予定である。

II. LC-TOF-MS 法による残留農薬一斉分析法の妥当性評価

LC-TOF-MS 法は、一律基準濃度において、

残留農薬一斉分析(農産物:穀類・豆類)へ適用可能であることが示された。

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を用いた茶中の残留農薬一斉分析法～厚生労働省通知一斉試験法の改良～、日本食品化学学会誌、**21**、27-36(2014)

Saito-Shida, S., Nemoto, S., and Matsuda, R.,
Multiresidue analysis of pesticides in vegetables

and fruits by supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Hygiene and Safety Science*, **55**, 142-151 (2014).

2. 学会発表

志田(齊藤)静夏、根本 了、手島玲子:GC-MS/MSを用いた茶中の残留農薬一斉分析法の検討、日本食品化学学会第20回総会・学術大会(2014.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ．分担研究報告

1. 精確な定量法の確立

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

研究分担者 坂井隆敏

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

1. 精確な定量法の確立

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

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

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、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して両者の結果を比較した。得られた結果から、内標準法を用いて測定の際の試料マトリックスの影響を補正する場合に留意すべき条件等について検討及び考察した。

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 820 品目を超える農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性を確保するためには、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。しかしながら、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。

このような場合には、追加精製や分解等の防止処理などの検討を行うが、時間と手間を要する。精製等の操作を追加することなく、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(以下、安定同位体と略す。)による内標準法などの使用が提案されているが、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。

このように、標準的な方法や評価基準などが示されていない中でも、安定同位体による内標準法が使用されている理由としては、分析対象化合物である農薬等と対応する安定同位体は、質量数が異なることを除けば同一の物質であり、安定同位体を使用しさえすれば、どのような場合であっても精確な補正が可能、すなわち、分析対象農薬等の精確な分析値を得ることが可能と考えられているためと思われる。安定同位体による内標準法が使用されている文献等では、添加回収試験において分析対象化合物の補正後の回収率が 100%に近い値となっているものも多く、このような場合には、実際の分析においても内標準法で補正することにより精確な分析値が得られる可能性が高いと考えられる。一方で、添加回収試験における補正回収率が 100%に近い値となっていないものもあり、このような場合には、実際の分析においても精確な分析値が得られない可能性が高いと考えられる。

以上のような理由から、本研究では、安定同

位体による内標準法を食品中残留農薬等分析に適用するに当たり、精確な分析値を得るために必要な標準的使用方法及び評価方法の確立について検討する。

初年度である平成 25 年度は、先ず、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。

平成 26 年度は、LC-MS/MS 測定の際の試料マトリックスの影響を内標準法で精確に補正する場合に考慮すべき条件等を明らかにすることを目的として、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で得られた結果を比較・考察した。

B. 研究方法

①検討対象農薬等及び安定同位体

検討対象農薬等は、平成 25 年度と同様、スルファジミジン、スルファメトキサゾール、チアベンダゾール及びトリメプリムを用いた。なお、これら農薬等は、以降それぞれ SDZ、SMXZ、TBZ 及び TMP と略して記載した。

また、対応する安定同位体についても、平成 25 年度と同様、重水素 (d) 標識もしくは炭素 13 (^{13}C) 標識された、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- $^{13}\text{C}_3$ 、TMP- d_9 を選択して用いた (表 1)。

②標準原液及び標準溶液の調製

選択した検討対象農薬等及び対応する安定同位体について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

(1:1) 混液を用いて希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

③タンデム型質量分析条件の設定

調製した標準溶液を用いて、タンデム型質量分析計 (MS/MS) における測定条件の最適化を行った。すなわち、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の 100 ng/mL 標準溶液をそれぞれフローインジェクション分析で MS/MS に注入し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオン、イオン電圧及びコリジョンエネルギー等の測定パラメーターを最適化した。

④液体クロマトグラフィー測定条件

液体クロマトグラフ (LC) における測定条件は、平成 25 年度に検討・設定した 3 つの条件を使用した。

⑤LC-MS/MS 測定

設定した LC-MS/MS 測定条件を用いて溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液を測定し、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のピーク面積を求めた。

得られたピーク面積から、絶対検量線法及び内標準法により、調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象化合物の濃度を求めた。

⑥マトリックス添加標準溶液の調製

マトリックス添加標準溶液は、以下に示す方法により調製した。

均一化した牛の肝臓試料 10.0 g を採り、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした。無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて再度ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を除去し、アセトニトリル層を採った。残留物に、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズ及び遠心分離後、アセトニトリル層を採り、先に得られたアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリル

を加えて 100 mL に定容した。この 20 mL (試料 2.00 g 相当量) を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。

得られた残留物に、0.02 mg/L の各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を含む標準溶液 1 mL を添加して溶解し、これをマトリックス添加標準溶液とした。

なお、上記の標準溶液の代わりに、0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液 1 mL を加えて溶解したものを、ブランク試験溶液とした。

⑦ 定量

マトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等の定量は、以下の通り行った。

絶対検量線法による定量においては、各検討対象農薬等について 0.01 mg/L、0.015 mg/L、0.02 mg/L、0.025 mg/L 及び 0.03 mg/L の溶媒標準溶液を調製後、それぞれ LC-MS/MS で測定し、得られたピーク面積値から検量線を作成した。次に、マトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で同様に測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値から、溶液中の含有量 (回収率) を求めた。

内標準法による定量においては、上記の絶対検量線法による定量で用いたものと同濃度の溶媒標準溶液に、安定同位体を 0.02 mg/L となるように添加した標準溶液を調製した。それぞれの標準溶液を LC-MS/MS で測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比を算出し、検量線を作成した。次に、マトリックス添加標準溶液を測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比から、溶液中の含有量 (回収率) を求めた。

⑧ 装置及び測定条件

以下に、研究で使用した装置及び測定条件

を示した。

・LC

高速液体クロマトグラフ : Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム : L-column2 ODS (内径 3 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm、化学物質評価研究機構製)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.1 vol% ギ酸 (A 液) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (B 液)

グラジエント条件① (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₃₀, B=63.5%; t_{30.1}, B=99%; t₃₅, B=99%; t_{35.1}, B=1%; t₄₅, B=1%

グラジエント条件② (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₂₅, B=67%; t_{25.1}, B=99%; t₃₀, B=99%; t_{30.1}, B=1%; t₄₀, B=1%

グラジエント条件③ (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₂₀, B=61%; t_{20.1}, B=99%; t₂₅, B=99%; t_{25.1}, B=1%; t₃₅, B=1%

流速 : 0.4 mL/分

注入量 : 1 µL

・質量分析

MS/MS : Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度 : 150°C

脱溶媒温度 : 600°C

窒素ガス流量 : 1000 L/hr

コーンガス流量 : 150 L/hr

キャピラリー電圧 : 1.5 kV

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法 (ポジティブイオンモード)

C. 研究結果

①検量線

調製した標準溶液をLC-MS/MSで測定し、得られたピーク面積値(内標準法の場合は、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比)から検量線を作成したところ、全ての検討対象農薬等について、全てのLC条件下で、決定係数は0.99以上と良好であった。

②ブランク試験溶液の測定

先ず、ブランク試験溶液を調製してLC-MS/MSで測定した。その結果、検討対象農薬等及び対応する安定同位体由来するピーク、並びにこれらの定量を妨害するピークは確認されなかった。

③絶対検量線法による回収率

調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を、絶対検量線法で定量した場合の回収率を表2に示した。

マトリックス添加標準溶液においては、調製後の溶液中で検討対象農薬等が安定に存在し、測定の際に試料マトリックスの影響が無ければ、得られる回収率は100%の近似値となる。

表2に示されるように、検討対象農薬等の種類や測定の際のLC条件によっては、回収率が100%に近い値とならず、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていることが推察された。

④内標準法による回収率

調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を、対応する安定同位体を用いた内標準法で定量した場合の回収率を表3及び表4に示した。

対応する安定同位体を用いた内標準法により、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正することが出来れば、得られる回収率は100%の近似値となる。

表3に示されるように、d標識した安定同位体を用いた場合には、検討対象農薬等の種類や測定の際のLC条件によっては、回収率が100%に近い値とならない場合があることが確認された。一方、表4に示されるように、¹³C標識した安定同位体を用いた場合には、各検討対象農薬等について、各LC条件下で、100%に近い回収率が得られた。

⑤マトリックス添加標準溶液中と溶媒標準溶液中におけるピーク面積

測定の際の試料マトリックスの影響の有無を確認するため、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体について、溶媒標準溶液中におけるピーク面積値とマトリックス添加標準溶液中におけるピーク面積値の比を算出した。

すなわち、マトリックス添加標準溶液を測定して得られたピーク面積値(PA_{Mstd})を、0.02 mg/Lの溶媒標準溶液を測定して得られたピーク面積値(PA_{Sstd})で除し、100を乗じた値($PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値)を算出し、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体が測定の際に受ける試料マトリックスの影響の指標とした。

結果を表5に示した。

⑥保持時間

表6に、各LC条件下における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を示した。

表6に示されるように、各LC条件下において、各検討対象農薬等と対応する¹³C標識安定同位体の保持時間はほとんど一致していた。

一方、d標識体については、数秒程度ではあるものの、対応する各検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。

D. 考察

①検量線

調製した標準溶液を測定して作成した検量線は、絶対検量線法用の検量線及び内標準法用の検量線ともに、全ての検討対象化合物について、全ての LC 条件下で決定係数 0.99 以上と良好であった。このことから、調製したマトリクス添加標準溶液を測定して得られた各検討対象農薬等の定量結果は、概ね信頼性の高い値であると考えられた。

②ブランク試験溶液の測定

ブランク試験溶液を調製して測定した結果、検討対象農薬等及び対応する安定同位体由来するピークは確認されなかった。このことから、本研究で使用した牛の肝臓試料には、検討対象農薬等及び対応する安定同位体は含まれていないことが確認された。また、各検討対象農薬等及び安定同位体のピーク近傍には、これらの定量を妨害するピークは確認されなかった。

以上の結果から、調製したマトリクス添加標準溶液の測定で得られた各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のピークは、全て添加した化合物由来するものと考えられた。

③絶対検量線法による回収率

絶対検量線法により、調製したマトリクス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を定量した結果、表 2 に示される回収率となった。

マトリクス添加標準溶液においては、抽出や精製など、溶液の調製工程における損失が無いため、調製後の溶液中で検討対象農薬等が安定に存在し、且つ測定の際に試料マトリクスの影響が無ければ、得られる回収率は 100% の近似値となる。

SMXZ については、各 LC 条件において 100% に近い回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響をほとんど受けていないことが示

唆された。

SDZ 及び TMP については、グラジエント条件①では 100% に近い回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響をほとんど受けていないことが示唆されたものの、グラジエント条件②及び③では 80% 程度の回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響を受けていることが示唆された。

TBZ については、グラジエント条件①及び③で回収率 80% 程度、グラジエント条件②で回収率 70% 程度となり、本研究で用いた検討対象農薬等の中では、測定の際に受ける試料マトリクスの影響が最も大きいことが示唆された。なお、調製したマトリクス添加標準溶液中で分解等により濃度が減少している可能性も考えられたが、同一のマトリクス添加標準溶液を、グラジエント条件①→②→③の順序で測定しており、回収率がそれぞれ 84%→66%→82% と推移していることから、低回収率が得られた原因は、溶液中での減少によるものではなく、測定の際の試料マトリクスの影響が大きいと考えられた。

④内標準法による回収率

一般的な内標準法は、抽出から測定まで、全ての分析工程において分析対象化合物の濃度を精確に補正可能として使用されていると考えられる。本研究では、まず、測定の際の試料マトリクスの影響を精確に補正可能であるかについて検討することを目的として、マトリクス添加標準溶液を調製、測定した。

内標準法により、調製したマトリクス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を定量した結果、表 3 及び表 4 に示される回収率となった。

内標準法により、測定の際の試料マトリクスの影響を精確に補正可能であれば、得られる回収率は 100% の近似値となるが、d 標識安定同

位体を用いた場合には、グラジエント条件①における TMP (TMP- d_9 使用時、108%)、グラジエント条件②における SDZ (92%)、TBZ (89%) 及び TMP (TMP- d_3 使用時、112%) など、検討対象農薬等の種類やグラジエント条件によっては、回収率が 100%に近い値とならない場合があることが確認された。

このような場合、実際の検査において内標準法を用いて定量した場合であっても、得られた定量値は実際の濃度と異なり、偽陰性や疑陽性といった望ましくない結果を与える可能性があると考えられた。

マトリックス添加標準溶液中の検討対象農薬等を内標準法で定量した場合、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正することができれば、すなわち、検討対象農薬等と対応する安定同位体が同等の試料マトリックスの影響を受けていれば、得られる回収率は 100%に近い値となる。100%に近い回収率が得られない場合もあったことから、検討対象農薬等と対応する安定同位体が同等の試料マトリックスの影響を受けていない場合もあることが推察された。

一方、表 4 に示されるように、 ^{13}C 標識安定同位体を用いた場合には、各検討対象農薬等について、各グラジエント条件下で、100%に近い回収率が得られた。このことから、 ^{13}C 標識安定同位体については、対応する各検討対象農薬等と同等の試料マトリックスの影響を受けていることが推察された。

⑤マトリックス添加標準溶液中と溶媒標準溶液中のピーク面積比

測定の際にどの程度の試料マトリックスの影響を受けているかを確認するために、 $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値を算出した。

各検討対象農薬等及び対応する安定同位体

の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値は、表 5 に示されるとおりであった。

各検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値については、当然のことではあるが、表 2 に示された絶対検量線法による各検討対象農薬等の回収率とほとんど同様の値となった。

各検討対象農薬等に対応する d 標識安定同位体については、グラジエント条件②における SDZ- d_4 (92%)、TBZ- d_6 (73%) 及び TMP- d_3 (77%) など、それぞれ対応する各検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値 (SDZ: 84%、TBZ: 67%及び TMP: 85%) と異なる値が得られた。これらの検討対象農薬等については、マトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した際の回収率が 100%に近い値となっていなかった (SDZ: 92%、TBZ: 89%及び TMP (TMP- d_3 使用時): 112%)。これらの結果から、グラジエント条件等によっては、内標準法を用いても精確な定量値が得られない場合もあり、精確な定量値を得るためには、分析対象化合物と対応する安定同位体が同程度の試料マトリックスの影響を受ける条件下で測定することが必須であると考えられた。

一方、 ^{13}C 標識安定同位体の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値については、グラジエント①における TMP- $^{13}\text{C}_3$ を除いて、検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値と同様の値であった。これらの結果から、TMP- $^{13}\text{C}_3$ を除く ^{13}C 標識安定同位体については、測定の際、対応する検討対象農薬等と同程度の試料マトリックスの影響を受けており、その結果、内標準法で定量した際には 100%に近い回収率が得られたものと推察された。

なお、TMP- $^{13}\text{C}_3$ については、グラジエント条件①において、 $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値が 88%であり、TMP の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値 (97%) と同程度

の値が得られなかったものの、マトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した場合の回収率は 100%に近い値であった。このような結果が得られた原因としては、測定機器の感度変動や測定間における試料マトリックスの影響の違いなどが考えられたが、TMP- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積値と TMP のピーク面積値の減少の程度が同等であったため、内標準法で定量した場合には良好な回収率が得られたものと推察された。

⑥保持時間

各グラジエント条件における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を表 6 に示した。また、マトリックス添加標準溶液の測定における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のクロマトグラムを図 1～図 4 に示した。

表 6 及び図 1～図 4 に示されるように、各グラジエント条件において、各検討対象農薬等と対応する ^{13}C 標識安定同位体の保持時間はほとんど一致していた。これらの結果から、3～6 程度の標識数の ^{13}C 標識安定同位体は、対応する各検討対象農薬等と同時に分析カラムから溶出していることが確認された。これに伴い、質量分析において試料マトリックスの影響があった場合であっても、検討対象農薬等と安定同位体が同等の影響を受けるため、内標準法で定量した場合には試料マトリックスの影響が補正された精確な定量値が得られる可能性が高いと考えられた。

一方、d 標識安定同位体は、数秒程度ではあるが対応する検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。これらの結果から、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体は分析カラムから同時には溶出せず、試料マトリックス成分の溶出時間や量などによっては、質量分析において検討対象農薬等と対応する安定同

位体が同等の影響を受けず、内標準法で定量した場合であっても精確に試料マトリックスの影響を補正できず、精確な定量値が得られない場合もあることが示唆された。

本検討で得られた結果をグラジエント条件ごとに比較すると、溶出溶媒であるアセトニトリルの濃度の増加の勾配が大きくなる程、質量分析における試料マトリックスの影響は増加し、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体の保持時間の差は減少し、内標準法により定量したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等の回収率は 100%に近い値となる傾向が確認された。

アセトニトリル濃度の増加勾配が小さい場合、検討対象農薬等と試料マトリックス成分との分離は良いが、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体も分離され、質量分析における試料マトリックスの影響の程度に違いが生じることが、内標準法で定量した際に精確な定量値が得られない原因となることが推察された。

一方、アセトニトリル濃度の増加勾配が大きい場合、検討対象農薬等と試料マトリックス成分との分離が悪く、質量分析における試料マトリックスの影響は大きくなるが、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体の分離も悪くなるため、質量分析において受ける試料マトリックスの影響の程度が近くなり、結果として内標準法により定量した場合には精確な定量値を得る可能性が高くなると推察された。

以上のことから、d 標識安定同位体を用いた内標準法により定量する場合には、質量分析における試料マトリックスの影響が大きくなる可能性はあるものの、出来る限り溶出溶媒の濃度の増加勾配を大きくし、分析対象化合物と対応する安定同位体の保持時間の差が小さい条件で

測定することが良いと考えられた。

E. 結論

研究初年度である平成 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。本年度は、牛の肝臓試料から調製したマトリックス添加標準溶液を 3 つの異なるグラジエント条件下で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して得られた結果を比較・解析することで、

内標準法を用いて精確な分析値を得るために必要な条件等を考察した。

平成 27 年度は、種々の畜水産物を対象として添加回収試験を実施し、内標準法による定量をどの程度まで適用可能であるかを検証する。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 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

	分子量	記載純度 (%)	純度算出方法	標識位置	標識位置(推定)
SDZ	250.3	99.8	HPLC		
SDZ- <i>d</i> ₄	254.3	99.9	記載無し	記載無し	フェニル基
SDZ- ¹³ C ₆	256.2	99.7	HPLC	フェニル基	
SMXZ	253.3	99.0	HPLC		
SMXZ- <i>d</i> ₄	257.3	97.4	記載無し	記載無し	フェニル基
SMXZ- ¹³ C ₆	259.2	99.3	HPLC	フェニル基	
TBZ	201.3	99.9	GC		
TBZ- <i>d</i> ₆	207.3	98.0	HPLC	記載無し	全てのC-H結合
TBZ- ¹³ C ₆	207.3	97.1	記載無し	フェニル基	
TMP	290.3	100.0	HPLC		
TMP- <i>d</i> ₃	293.3	99.6	atom%D	4-メキシ基	
TMP- ¹³ C ₃	293.3	99.0	記載無し	記載無し	ピリミジン環(4つの炭素の内の3つ)
TMP- <i>d</i> ₉	299.4	99.9	HPLC	3,4,5-トリメキシ基	