

# 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

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)  
平成 26 年度 総括研究報告書

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) 及びトリメトプリム (TMP)、並びにこれらの重水素 (d) 標識及び炭素  $^{13}\text{C}$  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- $d_9$  及び TMP- $^{13}\text{C}_3$  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

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 ~ 3500 V の範囲 (コーン電圧 20 V、コリジョンエネルギー 5 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 5 eV) について、コリジョンエネルギーは 0 ~ 50 eV 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、脱溶媒ガス ( $\text{N}_2$ ) 流量は 700 ~ 1100 L/h の範囲 (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) について、脱溶媒温度は 350 ~ 550 の範囲 (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) 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 ~ 3  $\mu\text{L}$  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 (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 5 回繰り返し測定し、抽出質量幅 5、10 及び 20 mDa 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。

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 0.01 ppm 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 (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。

塩析の際、振とう後、遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間) を行った。

ODS ミニカラム精製の溶出溶媒量を 5 mL とした。

グラファイトカーボン/ $\text{NH}_2$  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

### 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。

### 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、<sup>13</sup>C 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。

### 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 <sup>13</sup>C 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

### 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(N<sub>2</sub>)流量 800 L/h、脱溶媒温度 450 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。

### 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

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。

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。

<sup>13</sup>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。

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<sup>13</sup>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

### 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。

### 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

#### 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。

#### 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