

201522002A

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 27 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 28(2016)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	
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 -----	11
坂井隆敏	
2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討 -----	23
志田(齊藤)静夏	
2. 効率的・網羅的な分析法の開発 -----	51
志田(齊藤)静夏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	119
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	123

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

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、牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量した。得られた結果から、内標準法を用いて精確に分析値を補正する場合に留意すべき事項等について取り纏めた。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

残留農薬検査において実施可能な簡便かつ高精度な標準添加法による定量法について検討した。検量点の数及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討するため、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液(10 ng/mL)を用いて、様々な検量点数(1~6点)及び添加濃度(初期濃度の 0.25、0.5、1、2、4 及び 8 倍)で濃度を推定し、定量性を比較した。その結果、添加濃度を初期濃度の 1~4 倍として 1 点標準添加法で定量を行うことにより、良好な結果が得られた。本検討結果を基に、残留農薬分析における標準添加法の性能評価方法及び評価基準について提案した。

2. 効率的・網羅的な分析法の開発

LC-TOF-MS 及び GC-TOF-MS を用いた残留農薬等一斉分析について検討を行った。LC-TOF-MS を用いた残留動物用医薬品一斉分析の検討では、82 化合物について、牛肉及び牛乳を対象に添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法で定量した結果、添加濃度 0.1 ppm では牛肉 71 化合物(検討化合物の 87%)、牛乳 72 化合物(検討化合物の 88%)で妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値

を満たした。添加濃度 0.01 ppm では、測定感度が得られなかった 4 化合物及び牛肉試料中に含有が認められた 2 化合物を除いた牛肉 76 化合物、牛乳 78 化合物を評価対象化合物とした。このうち、牛肉 54 化合物(検討化合物の 71%)、牛乳 65 化合物(検討化合物の 83%)で真度・精度の目標値を満たした。マトリックス添加標準溶液を用いた絶対検量線法で定量した場合は、添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm とともに検討化合物の 9 割以上で真度・精度の目標値を満たした。検討した全ての化合物において選択性に問題はなかった。これらの結果から、一部の化合物においてイオン化阻害が見られたものの、検討化合物の大部分で LC-TOF-MS 法を残留動物用医薬品一斉分析へ適用可能であることが示された。GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討では、オレンジのマトリックス標準溶液を用いて、184 農薬について選択性、ピーク面積の再現性、検出限界等について評価した。抽出質量幅を 50 mDa に設定した場合、試料中濃度 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、2 農薬(bifenox 及び cyfluthrin)で測定感度が不足したものの、その他の 182 農薬(検討農薬の約 99%)では良好な結果が得られた。また、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。今後、性能評価試験を行い、妥当性が示されれば、GC-TOF-MS 法を定量分析に十分用いることが可能であると考えられた。

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)

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、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した。

平成 27 年度は、1) 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、LC-MS/MS 測定における分析値を内標準法で精確に補正する際に考慮すべき条件等を明らかにすることを目的として、牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、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) 標

準添加法を用いた精確な定量法の検討では、従来法のように、既知濃度の分析対象化合物を添加した試験溶液を複数調製・測定することなく、残留農薬検査においても実施可能な簡便且つ高精度な方法について GC-MS/MS を用いて検討した。また、本検討結果を基に、残留農薬分析における標準添加法の性能評価方法及び評価基準を提案した。

(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、LC-TOF-MS 及び GC-TOF-MS を用いた残留農薬等一斉分析について検討を行った。LC-TOF-MS 法の残留動物用医薬品一斉分析への適用性検討では、平成 27 年度は、昨年度確立した測定条件及び解析条件を用いて、牛肉及び牛乳を対象に添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、試験法の妥当性を評価した。また、GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討では、平成 27 年度は酸性夾雑成分の多いオレンジのマトリックス標準溶液を用いて、選択性、ピーク面積の再現性、検出限界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の検討

検討対象農薬等は、平成 25 及び 26 年度と同様、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) を選択した。また、これらに対応する安定同位体として、重水素 (d) 標識もしくは炭素 13 (¹³C) 標識された、SDZ-*d*₄、SDZ-¹³C₆、SMXZ-*d*₄、SMXZ-¹³C₆、TBZ-*d*₆、TBZ-¹³C₆、TMP-*d*₃、TMP-¹³C₃、TMP-*d*₉ を用いた。

検討対象農薬等及び安定同位体について、マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液を調製し、各検討対象農薬等の保持時間、ピーク面積値、回収率等を求めた。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

15 農薬 (有機塩素系殺虫剤 : aldrin、 α -BHC、有機リン系殺虫剤 : chlorfenvinphos、chlorpyrifos、coumaphos、diazinon、dimethoate、fenitrothion、isoxathion、phosmet、ピレスロイド系殺虫剤 : cypermethrin、permethrin、チオカーバメイト系除草剤 : pyributicarb、thiobencarb、及びトリアゾール系殺菌剤 : tetraconazole) のマトリックス添加標準溶液 (10 ng/mL) を調製し、GC-MS/MS 用いて測定した結果から、様々な検量点数 (1~6 点) 及び添加濃度 (初期濃度の 0.25、0.5、1、2、4 及び 8 倍) で濃度を推定し、定量性を比較した。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

LC-TOF-MS 法の残留動物用医薬品一斉分析への適用性検討では、牛肉及び牛乳を対象に添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、試験法の妥当性を評価した。試験溶液を調製は、通知の HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物) の改良法 (LC/MS 法) に準じて行い、昨年度確立した LC-TOF-MS 測定条件及び解析条件を用いて定量した。

GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討では、オレンジのマトリックス標準溶液を調製して、

GC-TOF-MS で測定し、選択性、ピーク面積の再現性、検出限界等について評価した。オレンジのブランク試験溶液の調製は、通知「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」において、以下の①及び②を変更した以外は試験法に従って実施した。①塩析後、遠心分離(毎分 3000 回転、5 分間)を行った。②ODS ミニカラム精製を追加し、溶出溶媒量は 5 mL とした。

(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

マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液を測定し、安定同位体を用いた内標準法で定量した場合であっても、食品・測定条件・安定同位体の組み合わせによっては、得られる回収率が理論値(100%の近似値)と大きく異なる場合があることが確認された。

また、「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値×100 の値」を算出し、検討対象農薬等の値と安定同位体の値を比較したところ、食品・測定条件・安定同位体の組み合わせによっては、2 つの値が大きく異なる場合があることが確認された。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

標準添加法は、マトリックス検量線が直線であり、且つ、原点付近を通らなければ適用できないことから、茶のマトリックス添加標準溶液を用いて、検討に用いた15農薬のマトリックス検量線について、茶のマトリックス添加標準溶液を用いて評価したところ、全ての農薬で決定係数 r^2 が 0.998 以上とな

り良好な直線性が得られた。また、y 切片は、評価濃度である 10 ng/mL の標準溶液のピーク面積の-9.9~+7.5%となり、検討した農薬はすべて±10%未満であった。

マトリックスの影響が濃度によって異なる場合、標準添加法を適用すると、精確な分析値が得られない可能性がある。そのため、マトリックスの測定への影響と農薬の濃度との関係について 2~200 ng/mL の範囲で検討したところ、化合物により影響を受ける程度は異なるものの、低濃度ほどマトリックスの影響が大きかった。

標準添加法では、全濃度域にわたって不確かさが同程度で直線性が良好であれば、範囲が広く、検量点の数が多いほど、推定値の精確さは向上するとされている。そこで、標準添加法で用いる検量点の数の分析値への影響を、検量点の数を1~6点として検討した。その結果、ばらつき(標準偏差、SD)は、検量点の数による大きな違いは認められなかったが、検量点の数が多い程、理論値からのずれが大きくなった。本検討の結果、食品中の残留農薬分析においては、検量点の数が増加しても精確さは向上せず、1点の方が理論値に近くなることが示された。

標準添加法で用いる添加濃度の分析値に対する影響について、茶のマトリックス添加標準溶液を用いて、添加濃度を初期濃度(10 ng/mL)の1/4~8倍濃度として初期濃度を推定した。その結果、添加濃度が初期濃度の1~4倍で最も理論値(10 ng/mL)に近かった。一方、添加濃度が初期濃度の1/4倍及び1/2の場合には、理論値からのずれ及びばらつきが大きく、また、8倍濃度の場合には、ばらつきは小さいものの、検討農薬の多くで理論値よりも大きい値となった。オレンジ及び玄米のマトリックス添加標準溶液を用いた検討でも同様の結果が得られた。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-TOF-MS 法の検討

LC-TOF-MS 法の残留動物用医薬品一斉分析への適用性について検討するため、82 化合物について、牛肉及び牛乳を対象に添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。試料調製方法は、通知試験法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」を改良した方法で行った。なお、最終試験溶液をアセトニトリルで調製したところ、ピークが割れるなどの問題があったことから、最適な調製溶媒について最も影響を受けやすかった dicyclanil を用いて検討した。その結果、ピーク形状、感度、抽出物の溶解性等からアセトニトリル/0.1 vol%ギ酸(25:75)を選択した。評価対象化合物(添加濃度 0.1 ppm:82 化合物、添加濃度 0.01 ppm:牛肉 76 化合物及び牛乳 78 化合物)について、真度、精度及び選択性について評価した。選択性については、検討した全ての化合物で問題はなかった。真度及び精度については、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしたのは、溶媒標準溶液で定量した場合には、添加濃度 0.1 ppm では、牛肉 71 化合物、牛乳 72 化合物であり、添加濃度 0.01 ppm では、牛肉 54 化合物、牛乳 65 化合物であった。一方、マトリックス検量線法で定量した場合は、添加濃度 0.1 ppm では、牛肉 80 化合物、牛乳 79 化合物、添加濃度 0.01 ppm では、牛肉 70 化合物、牛乳 70 化合物で目標値を満たした。

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、184 農薬について選択性、ピーク面積の再現性、検出限界及び定量限界を評価した。試料中濃度 0.005 ppm 相当のオレンジのマトリックス標準溶液を用いて、最適な抽出質量幅(10~100 mDa)について検討し、選択性及びピーク面積の再現性について評価した。選択性につい

ては、抽出質量幅 10~50 mDa では、定量を妨害するピークは観測されなかったが、100 mD では妨害ピークが認められた。ピーク面積の再現性については、RSD 10%未満の良好な結果が得られたのは、抽出質量幅 10、20 及び 50 mDa では、それぞれ 173 農薬、181 農薬及び 182 農薬であった。試料中濃度 0.005 ppm (bifenox 及び cyfluthrin は 0.05 ppm) のオレンジのマトリックス標準溶液の繰り返し測定(抽出質量幅 50 mDa)のピーク面積値の 3σ 値から検出限界(LOD)を、 10σ 値から定量限界(LOQ)を算出した。その結果、bifenox 及び cyfluthrin を除き、検出限界は 2 ppb 未満、定量限界は 10 ppb 未満であった。bifenox 及び cyfluthrin の検出限界はそれぞれ 19 及び 17 ppb、定量限界は 63 及び 56 ppb であった。

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の検討

マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液を調製・測定し、得られた回収率や「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値×100の値」などについて比較・考察した。その結果、安定同位体を用いた内標準法で定量した場合であっても、食品・測定条件・安定同位体の組み合わせによっては、良好な回収率(理論値は 100%の近似値)が得られず、このような場合には検討対象農薬等と安定同位体で得られる「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値×100の値」が大きくなることが示された。算出した値は測定の際の試料マトリックスの影響の程度であるため、この値が異なる場合には、測定の際の試料マトリックスの影響が異なり、測定の際に受ける試料マトリックスの影響が異なり、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ず、結果として良好な補正回収率が得られないことが推察された。

本研究における結果及び考察から、安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るためには、①分析対象農薬等の測定値に影響を及ぼさない安定同位体及び添加濃度の選択、②分析対象農薬等と同等の試料マトリックスの影響を受ける安定同位体及び測定条件の選択、③分析対象農薬等と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ることの確認が必要と考えられた。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

本検討で用いた 15 農薬のマトリックス検量線について評価したところ、全ての農薬で決定係数 r^2 が 0.998 以上、且つ、 y 切片が評価濃度に対して $\pm 10\%$ 未満であったことから、標準添加法を適用可能であると判断された。

マトリックスの測定への影響と農薬の濃度との関係について検討した結果、化合物によってはマトリックスの影響が濃度によって大きく異なる場合があることから、標準添加法で定量する際は、初期濃度付近の狭い濃度範囲で適用するのがよいと考えられた。

標準添加法で用いる検量点の数の分析値への影響を検討した結果、検量点の数が多いため、理論値からのずれが大きくなった。これは、高濃度ではマトリックスの影響を受けにくく、低濃度よりも濃度に対するピーク面積の比が小さいことが原因と考えられた。一般に、標準添加法では検量点の数が多いため、推定値の精確さが向上するとされているが、本検討の結果、検量点の数が増加しても精確さは向上せず、1 点の方が理論値に近くなることが示された。多点での標準添加法を行う場合の煩雑さ等も考慮すると、食品中の残留農薬分析においては、1 点で標準添加法を行う方がよいと考えられた。

標準添加法で用いる添加濃度の分析値に対する影響について検討した結果、添加濃度が初期濃度よりも低い(1 倍未満)場合、測定の誤差によって関係線が大きく振れ、ばらつきが大きくなり、一方、高濃度(8 倍)の場合にはマトリックスの影響を受けにくく、関係線の傾きが小さくなるのが原因と考えられた。以上の検討から、添加濃度を初期濃度 1 ~ 4 倍程度として 1 点標準添加法を行うことにより精確な分析値が得られた。残留農薬分析においては、濃度によってマトリックスの影響が大きく異なる化合物/食品もあることから、添加濃度は初期濃度の 1~2 倍程度が望ましいと考えられる。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-TOF-MS 法の検討

LC-TOF-MS 法の残留動物用医薬品一斉分析への適用性について検討するために、82 化合物について、牛肉及び牛乳を対象に妥当性評価試験を行った。真度及び精度について、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしたのは、添加濃度 0.01 ppm では、溶媒検量線を用いて定量した場合は検討化合物の 70%以上であったのに対して、マトリックス検量線を用いた場合には、検討化合物の 90%以上であった。これらの結果から、溶媒検量線で定量した場合に真度の目標値を満たさない化合物が多かった主な原因はイオン化阻害であると考えられた。

2) LC-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、184 農薬について選択性、ピーク面積の再現性、検出限界及び定量限界を評価した。その結果から、定量する際は、抽出質量幅を選択性及びピーク面積の再現性が良い 20~50 mDa に設定するのが良いと考えられた。これは、平成 25 年度に行ったほうれんそう及び玄米を用いた検討結果と同じであった。また、オレンジのマトリ

ックス標準溶液の測定結果から、大部分の化合物で、LOD は 2 ppb 未満、LOQ は 10ppb 未満であった。

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の検討

牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、絶対検量線法及び内標準法で求めた回収率の違いなどから、精確な分析値を得るために留意すべき事項等を考察した。

使用する測定条件、安定同位体の種類や添加濃度などによっては、安定同位体を用いた内標準法により定量した場合であっても、精確な分析値が得られない場合があることが明示された。安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るためには、①分析対象化合物の測定値に影響を及ぼさない安定同位体及び添加濃度の選択、②分析対象化合物と同等の試料マトリックスの影響を受ける安定同位体及び LC 条件の選択、③分析対象化合物と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ることの確認が必要であると考えられた。

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

GC-MS (MS) を用いて 1 点標準添加法で定量を行う際の性能評価方法及び評価基準について以下のように提案する。

① 性能評価方法

各試料溶液から一定量の溶液を 2 個採取し、1 個に既知濃度の標準溶液、もう 1 個に同量の溶媒を加え、それぞれ添加試験溶液及び無添加試験溶液とし、GC-MS/MS で測定する。無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度 (C_{sample}) を式 (1) から求める。

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{added}} \times A_{\text{sample}} / (A_{\text{sample+added}} - A_{\text{sample}}) \quad (1)$$

(C_{added} : 添加濃度、 A_{sample} : 無添加試験溶液から得られたピーク面積、 $A_{\text{sample+added}}$: 添加試験溶液から得られたピーク面積)

添加濃度は、評価濃度の 1~2 倍程度とする。各化合物について、(2) の性能パラメーターを求め、それぞれの評価基準に適合していることを確認する。

② 評価基準

i) 選択性

ブランク試料を試験法に従って試験し、定量を妨害するピークがないことを確認する。妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積が評価濃度の標準溶液から得られるピークの面積の 1/100 未満であること。

ii) 真度、併行精度及び室内精度

妥当性評価ガイドラインの目標値を満たすこと。

iii) 定量限界

無添加試験溶液から得られるピークは $S/N \geq 10$ であること。

iv) 検量線

マトリックス検量線の決定係数 (r^2) が 0.990 以上であり、原点を通るか、y 切片の絶対値が評価濃度のマトリックス添加標準溶液から得られるピークの面積の $\pm 10\%$ 未満であること。

(2) 効率的・網羅的な分析法の開発

1) LC-TOF-MS 法の検討

LC-TOF-MS 法の残留動物用医薬品一斉分析への適用性について検討するため、82 化合物について、牛肉及び牛乳を対象に添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm で妥当性評価試験を行った。その結果、マトリックス検量線法で定量した場合、添加濃度 0.1 及び 0.01 ppm とともに検討化合物の 9 割以上で真度・精度の目標値を満たし、選択性に問題はなかった。これらの結果から検討化合物の大部分で

LC-TOF-MS 法を残留動物用医薬品一斉分析へ適用可能であることが示された。今後、基準値濃度において妥当性が示されれば、LC-TOF-MS 法を基準値判定にも用いることが可能であると考えられた。

2) GC-TOF-MS 法の検討

オレンジのマトリックス標準溶液を用いて、選択性、ピーク面積の再現性、検出限界等について検討した。その結果、抽出質量幅 50 mDa に設定した場合、試料中濃度 0.005 ppm 相当において、検討農薬の約 99% で良好な結果が得られた。今後、性能評価試験を行い、妥当性が示されれば、GC-TOF-MS 法を定量分析に十分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

Shida, S., Nemoto, S., and Matsuda, R.,
Simultaneous determination of acidic pesticides in vegetables and fruits by liquid chromatography-

tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **50**, 151-162 (2015).

Saito-Shida, S., Nemoto, S., and Teshima, R.,
Multiresidue determination of pesticides in tea by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **50**, 760-776 (2015).

2. 学会発表

志田(齊藤)静夏、根本 了、手島玲子:野菜・果実中の酸性農薬一斉分析法の検討、日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会(2015.5)

志田(齊藤)静夏、根本 了、手島玲子、穠山浩:加工食品中の殺鼠剤テトラメチレンジスルホテトラミンの迅速分析法、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会(2015.12)

志田(齊藤)静夏、根本 了、手島玲子、穠山浩:GC-TOF-MS を用いた残留農薬一斉分析の検討、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会(2015.12)

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

- 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

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

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

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、牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量した。得られた結果から、内標準法を用いて精確に分析値を補正する場合に留意すべき事項等について取り纏めた。

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、検討対象農薬等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。

平成 27 年度は、LC-MS/MS 測定における分析値を内標準法で精確に補正する際に考慮すべき条件等を明らかにすることを目的として、牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、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 及び 26 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トプリムを用いた。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 及び 26 年度と同様、重水素(d)標識もしくは炭素 13(¹³C)標識された、SDZ-*d*₄、SDZ-¹³C₆、SMXZ-*d*₄、SMXZ-¹³C₆、TBZ-*d*₆、TBZ-¹³C₆、TMP-*d*₃、TMP-¹³C₃、TMP-*d*₉を選択して用いた。

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(4:1)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、コー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、0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液の濃度勾配が異なる 2 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、マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験で得られた試験溶液を測定し、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、各溶液中の各検討対象農薬等の濃度及び回収率を求めた。

⑥試験溶液の調製

添加回収試験における試験溶液は、以下に示す方法により調製した。

均一化した試料(牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ)10.0 g を採り、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を 5 ppb 相当となるよう添加した。はちみつの場合は、水 10 mL に溶解した後、各検

討対象農薬等及び対応する安定同位体を添加した。攪拌後、室温で 30 分間放置した。次いで、*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 30 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 10 mL (試料 1.00 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、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液(4:1)混液 1 mL を加えて溶解し、*n*-ヘキサン 0.5 mL を加えて振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を除去したものを試験溶液とした。

⑦定量

試験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 0.00125 mg/L、0.0025 mg/L、0.00375 mg/L、0.005 mg/L、0.00625 mg/L 及び 0.0075 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、試験溶液を 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 0.005 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、試験

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、本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)

LC 条件①(t:時間(分))

t_0 , B=1%; t_5 , B=1%; t_{20} , B=38.5%; $t_{20.1}$, B=99%; t_{25} , B=99%; $t_{25.1}$, B=1%; t_{45} , B=1% (B液の濃度勾配 2.5%/分)

LC 条件②(t:時間(分))

t_0 , B=1%; t_5 , B=1%; t_{13} , B=81%; $t_{13.1}$, B=99%; t_{18} , B=99%; $t_{18.1}$, B=1%; t_{28} , B=1% (B液の濃度勾配 10%/分)

流速: 0.4 mL/分

注入量: 2 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絶対検量線法による回収率

調製した試験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 1 に示した。

表 1 に示される通り、絶対検量線法で定量した場合には、特に はちみつ試料において低回収率であった。また、同一の試験溶液を測定した場合であっても、使用する LC 条件により回収率が異なることが明示された。

③内標準法による回収率

内標準法で定量した場合の回収率を表 2 に示した。

d 標識体を用いた内標準法により回収率を求めた場合、絶対検量線法によるものよりも良好な回収率が得られたが、はちみつ試料における TMP のように、一部の試料と分析対象化合物の組み合わせにおいては良好な回収率が得られない場合があることも明らかとなった。

一方、¹³C 標識体を用いた内標準法により回収率を求めた場合には、検討した全ての試料と分析対象化合物の組み合わせにおいて概ね良好な回収率が得られた。

④測定の際の試料マトリックスの影響

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、溶媒標準溶液におけるピーク面積値とマトリックス添加標準溶液におけるピーク

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、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。得られた値を表 3 に示した。表 3 に示される通り、算出された値は、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていないと考えられる値 (100 の近似値) と大きく異なるものもあり、試料と検討対象農薬等の組み合わせによっては、測定の際に試料マトリックスの影響を大きく受けていることが推察された。

D. 考察

①絶対検量線法による回収率について

絶対検量線法により定量した場合には、特に はちみつ試料及び牛の肝臓試料において良好な回収率が得られなかった。絶対検量線法において良好な回収率が得られない原因としては、各分析操作における損失(抽出効率が悪い、濃縮操作における揮散や分解など)、もしくは測定の際の試料マトリックスの影響が考えられる。得られた回収率と $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値を比較した場合、これらの値は概ね一致することから、絶対検量線法による定量において良好な回収率が得られなかった主な原因としては、測定の際の試料マトリックスの影響によるものと推察された。ただし、はちみつ試料においては、 $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値よりも回収率が低いことから、濃縮操作中の分解などにより実際の回収率が低下している可能性もあることが推察された。

②内標準法による回収率について

内標準法により定量した場合、絶対検量線法よりも良好な回収率が得られた。

ただし、d 標識体を用いた内標準法の場合、はち

みつ試料における TMP などのように、一部の試料と検討対象農薬等の組み合わせにおいては良好な回収率が得られない場合もあることが確認された。

良好な回収率(補正回収率)が得られない原因を調査するため、マトリックス添加標準溶液を調製し、 $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値を算出した。得られた値を比較・考察した結果、良好な補正回収率が得られない場合には、検討対象農薬等(本体)で得られる値と安定同位体で得られる値が大きく異なることが示された。算出した値($PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値)は、測定の際の試料マトリックスの影響の程度であるため、この値が検討対象農薬等(本体)と安定同位体で異なる場合には、測定の際に受ける試料マトリックスの影響が異なり、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ず、結果として良好な補正回収率が得られないことが推察された。

言い換えれば、分析対象化合物と対応する安定同位体のマトリックス添加標準溶液を調製・測定し、これらの試料マトリックスの影響の程度が同等であれば、測定の際の試料マトリックスの影響については精確な補正が可能であると考えられた。

また、一部の試料と検討対象農薬等の組み合わせにおいては、絶対検量線法による回収率と $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値が異なり、分析操作中の損失等が推察されたが、内標準法、特に ^{13}C 標識体を用いた内標準法による補正回収率は良好であった。一般的には、分析法を開発する上で、著しく回収率が低下する条件(抽出溶媒、濃縮条件、ミニカラム精製条件など)は選択しないと考えられるため、分析操作中の損失等が分析値に与える影響はそれ程大きくないと予想されるが、安定同位体を用いた内標準法により、分析操作中の損失等も補正可能であることが推察された。

③安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るために留意すべき事項

平成 25~27 年度の検討結果から、安定同位体を用いた内標準法で定量した場合であっても、精確な分析値が得られない場合があることが示された。安定同位体を用いた内標準法で精確な分析値が得られない主な原因としては、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正できていない事が考えられた。言い換えれば、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正できれば、精確な分析値が得られる可能性が高いと考えられた。

本研究における検討結果から、安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るために留意すべき事項等について、以下に取り纏めた。

・使用する安定同位体の純度及び添加濃度

まず、使用する予定の安定同位体を LC-MS(/MS)で測定し、安定同位体の不純物等が分析対象化合物の分析値に影響を及ぼさないことを確認する。安定同位体の添加濃度については、分析対象化合物と対応する安定同位体が相互に影響し合わない適切な濃度を選択する(当該分析対象化合物の当該食品における残留基準値と同濃度が望ましいと考えられる)。

・使用する安定同位体の種類及び LC 条件

使用する予定の安定同位体を LC-MS(/MS)で測定し、分析対象化合物と対応する安定同位体の保持時間が一致、もしくは出来る限り近接するような安定同位体及び LC 条件を選択する。

・測定の際の試料マトリックスの影響の確認

マトリックス添加標準溶液を調製・測定し、「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値 $\times 100$ の値」が、分析対象化合物と安定同位体で同等であることを確認する。

E. 結論

本年度は、牛の脂肪・肝臓・乳及びはちみつ試料を用いて添加回収試験を行い、絶対検量線法及び内標準法で求めた回収率の違いなどから、精確な分析値を得るために留意すべき事項等を考察した。

使用する測定条件、安定同位体の種類や添加濃度などによっては、安定同位体を用いた内標準法により定量した場合であっても、精確な分析値が得られない場合があることが明示された。安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るためには、①分析対象化合物の測定値に影響を及ぼさない安定同位体及び添加濃度の選択、②分析対象化合物と同等の試料マトリックスの影響を

受ける安定同位体及びLC条件の選択、③分析対象化合物と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ることの確認が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 絶対検量線法による回収率

(a) LC 条件①、(b) LC 条件②

(a)

	回収率 (%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ	91	108	88	30
SMZ	92	103	78	38
TBZ	102	106	86	55
TMP	106	109	99	45

(b)

	回収率 (%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ	84	99	76	23
SMZ	87	99	67	31
TBZ	100	96	68	39
TMP	104	76	53	34

表 2 内標準法による回収率

(a) d 標識体使用・LC 条件①、(b) d 標識体使用、LC 条件②、
 (c) ^{13}C 標識体使用・LC 条件①、(d) ^{13}C 標識体使用・LC 条件②

(a)

	回収率(%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ(SDZ- d_4 使用)	101	86	101	102
SMZ(SMZ- d_4 使用)	102	99	100	103
TBZ(TBZ- d_6 使用)	100	101	99	102
TMP(TMP- d_3 使用)	101	102	104	118
TMP(TMP- d_9 使用)	111	96	106	136

(b)

	回収率(%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ(SDZ- d_4 使用)	100	103	103	106
SMZ(SMZ- d_4 使用)	101	101	107	113
TBZ(TBZ- d_6 使用)	100	109	98	100
TMP(TMP- d_3 使用)	101	84	69	71
TMP(TMP- d_9 使用)	147	128	98	107

(c)

	回収率(%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ(SDZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	102	98	99	102
SMZ(SMZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	101	101	102	109
TBZ(TBZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	101	101	101	103
TMP(TMP- $^{13}\text{C}_3$ 使用)	103	103	104	106

(d)

	回収率(%)			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ(SDZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	100	100	98	105
SMZ(SMZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	100	99	102	111
TBZ(TBZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	95	101	104	100
TMP(TMP- $^{13}\text{C}_3$ 使用)	104	106	104	108