

201522002B

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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
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 -----	13
坂井隆敏	
2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討 -----	37
志田(齊藤)静夏	
2. 効率的・網羅的な分析法の開発 -----	67
志田(齊藤)静夏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	135
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	139

I. 総合研究報告

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、種々の検討を実施した。得られた結果から、安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値が得られない場合の主な原因等について考察し、精確な分析値を得るために留意すべき事項等を取り纏めた。

(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も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。平成 25 年度は、標準添加法における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予備検討を行った。平成 27 年度は、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液を用いて、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)で初期濃度を推定し、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、精確な分析値が得られることが示された。本検討結果を基に、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

飛行時間型質量分析計(LC-TOF-MS 及び GC-TOF-MS)を用いた効率的・網羅的な残留農薬等一斉分析について検討を行った。LC-TOF-MSを用いた残留農薬分析の検討では、LC-TOF-MS測定条件及び定量解析条件を最適化後、151 化合物について玄米及び大豆を対象に 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。その結果、検討農薬の大部分で真度、精度、選択性の目標値を

満たし、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。LC-TOF-MSを用いた残留動物用医薬品分析の検討では、LC-TOF-MS測定条件及び定量解析条件を詳細に検討し、一斉分析に適した条件を確立した後、82化合物について牛肉及び牛乳を対象に1日2併行、5日間の妥当性評価試験を行った。その結果、一部の化合物でイオン化阻害を受けていたものの、マトリックス検量線法で定量した場合、検討化合物の9割以上で真度、精度、選択性の目標値を満たし、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、マトリックス添加標準溶液を用いて、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。その結果、試料中濃度0.005 ppm相当において、検討農薬の大部分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。

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「1. 精確な定量法の確立」及び「2. 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。そこで、食品中の残留分析に適した正確な定量法を確立することを目的として、「(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」及び「(2)標準添加法を用いた精確な定量法の検討」について検討した。

2. 効率的・網羅的な分析法の開発

残留農薬等分析では、高感度且つ高選択的な測定が可能なLC-MS/MS等の四重極型質量分析計が汎用されているが、化合物毎に測定イオンや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く、網羅的な測定が可能である。したがって、TOF-MSを用いた残留農薬等一斉分析法を確立すれば、検査をより効率的かつ網羅的に行うことが可能となり、検査対象農薬等の拡大や検査に要する時間の短縮が期待されるが、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、

LC-TOF-MS 及び GC-TOF-MS を用いた効率的・網羅的な残留農薬等一斉分析について検討を行った。

以下、課題毎にまとめて記載した。

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

A. 研究目的

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した。

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

検討対象農薬等としてスルファジアジン (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 (^{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。

選択した検討対象農薬等及び安定同位体について、LC-MS/MS 測定条件を設定した後、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。

(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

設定した複数の LC-MS/MS 条件下で各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を 5 併行で測定したところ、保持時間については各測定条件において変動が無く、ピーク面積値については全ての検討対象農薬等及び安定同位体において 6 RSD%未満の良好な精度が得られた。また、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間は、使用する測定条件 (移動相中の溶出溶媒の濃度勾配) や安定同位体の種類 (d 標識体と ^{13}C 標識体、標識数) によっては、一致する場合や大きく異なる場合があることが確認された。

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

大きく異なる場合があることが確認された。

D. 考察

使用する測定条件や安定同位体の種類によっては、検討対象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場合もあることが確認された。このことから、検討対象農薬等と安定同位体で測定の際に受ける試料マトリックスの影響の程度が異な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」が大きくこと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、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。

E. 結論

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、種々の検討を実施した。

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

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

A. 研究目的

本研究では、GC-MS/MS を用いた食品中の残留農薬分析において、測定でのマトリックスの影響を補正し、精確な分析値を得る方法として、標準添加法を検討した。平成 25 年度は、標準添加法における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予備検討を行った。平成 27 年度は、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液を用いて、様々な検量点数及び添加濃度で初期濃度を推定し、定量性を比較した。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。

B. 研究方法

通知「農薬等の GC/MS 一斉試験法(農産物)」を一部変更した方法を用いて、各食品のブランク試験溶液を調製した。ブランク試験溶液を用いてマトリックス添加標準溶液を調製し、マトリックス検量線を作成するとともに、測定に対するマトリックスの影響を評価した。また、標準添加法の検討では、ブランク試験溶液を用いて、初期濃度 10 ng/mL の試験溶液(試料中濃度 0.01 ppm 相当)を調製し、これを用いて、標準添加法のための試験溶液(無添加試験溶液、添加試験溶液)を調製した。2 点以上の標準添加法の検討では、無添加試験溶液及び添加試験溶液(2 個以上)を GC-MS/MS に注入し、添加濃度を横軸、ピーク面積を縦軸として、関係線を作成した。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(推定濃度)は、関係線を横軸との交点から求めた。1 点標準添加法の検討では、無添加試験溶液及び添加試験溶液(1 個)を GC-MS/MS に注入し、以下の式で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(推定濃度、 C_{sample})を求めた。

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

(ただし、 C_{added} は添加濃度、 A_{sample} は無添加試験溶液から得られたピーク面積、 $A_{\text{sample+added}}$ は添加試験溶液から得られたピーク面積)
(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. 研究結果及び考察

予備検討として、標準添加法における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。その結果、検量点が 5 点の場合は、標準添加法から求めた濃度は、初期濃度に対して低い濃度となった。一方、初期量と同量(10 ng)を添加して 1 点で求めた場合は、初期濃度により近似した結果が得られたことから、初期濃度に近い 1 点を用いた場合の方が、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ことが示唆された。

更に詳細に検討するために、標準添加法の評価条件について以下の 5 項目について検討した。

①測定妨害の有無について

標準添加法では、定量を妨害するピークが認められる場合は適用できないため、ブランク試験溶液を測定し、妨害を受けない 15 農薬を選択した。

②検量線の直線性と y 切片について

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量線の直線性及び y 切片について確認した。その結果、全ての検討対象農薬で決定係数 r^2 が 0.998 以上となり良好な直線性が得られ、y 切片については評価濃度のピーク面積の -9.9~+7.5% となった。標準添加法を使用する場合、マトリックス検量線の y 切片が評価濃度のピーク面積の ±10% 未満であることが望ましいと考えられることから、今回検討した農薬はすべて評価可能である事を確認した。

③マトリックスの影響の濃度依存性について

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。そこで、農薬の濃度とマトリックスの影響について検討した。その結果、化合物によってはマトリックスの影響の濃度依存性は異なるものの、低濃度ほどマトリックスの影響を受けやすいことが示唆されたことから、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。

④検量点数の影響について

標準添加法で用いる検量点数の推定濃度に対する影響について、マトリックス添加試験溶液を用いて検討した。その結果、推定濃度のばらつきは、検量点の数による大きな違いは認められなかったが、推定濃度については、1 点の場合よりも検量点の数が多い程、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程、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、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。多点での標準添加法を行う際の煩雑さ等を考慮しても残留農薬検査においては1点で標準添加法を行う方がよいと考えられた。

⑤ 添加濃度の影響について

添加濃度の分析値に対する影響について、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倍で最も理論値に近い結果が得られたのに対し、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。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。

以上の検討から、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±10%未満であること。

D. 結論

GC-MS/MSを用いた残留農薬分析に適した標準添加法による簡便且つ高精度な定量法の検討を行った。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した結果、添加濃度を初期濃度の1～4倍として1点標準添加法を行えば、精確な分析値が得られることが示された。また、本検討結果を基に性能評価方法及び基準について提案した。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 効率的・網羅的な分析法の開発

A. 研究目的

LC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討では、平成 25 年度は残留農薬一斉分析に適した LC-TOF-MS 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。平成 26 年度は、確立した条件を用いて、玄米及び大豆を対象に妥当性評価試験を行い、LC-TOF-MS 法の残留農薬一斉分析への適用性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分析の検討では、平成 26 年度は残留動物用医薬品一斉分析に適した LC-TOF-MS 測定条件や定量解析条件を詳細に検討した。平成 27 年度は、確立した条件を用いて、牛肉及び牛乳を対象に妥当性評価試験を行い、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を行った。

GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討では、平成 25 年度は色素の多いほうれんそう及び脂肪の多い玄米、平成 27 年度は酸性夾雑成分の多いオレンジを用いて選択性、ピーク面積の再現性、検出限界等について評価し、GC-TOF-MS 法の残留農薬一斉分析への適用性について検討した。

B. 研究方法

I. LC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

検討には農薬 151 化合物を用いた。試験溶液の調製は、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)を一部変更して、実施にあたっては、ODS ミニカラムからのアセトニトリルの溶出液量を 5 mL から 10 mL に変更し、グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラムの代わりにグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムを使用した。妥当性評価試験は、玄米及び大豆について添加濃度

0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行った。

II. LC-TOF-MS を用いた残留動物用医薬品分析の検討

検討には動物用医薬品 82 化合物を用いた。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)に準じて行った。妥当性評価試験は、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った。

III. GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

検討には農薬 184 化合物を用いた。通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」において、①塩析後、遠心分離(毎分 3000 回転、5 分間)を行い、②ODS ミニカラム精製の追加(溶出溶媒量 5 mL)する変更を行った以外は、試験法に従って試験溶液を調製した。

(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. 研究結果及び考察

I. LC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

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

は、プロダクトイオンスキャン(MS/MS スキャン)測定や、フラグメントイオン及び同位体イオンの測定(MS スキャン)がある。本研究では、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。これらの結果から、定量イオンは 4 eV に測定し、フラグメントイオンは 10~40 eV の範囲で走査して測定を行うこととした。なお、定量イオンとフラグメントイオンは同時に測定を行うことにした。

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。しかしながら、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る場合があり(図 5)、確認方法としては不十分と考えられたことから、確認の際にはプロダクトイオンスキャンや LC-MS/MS での SRM 測定等の他の方法で行う方が良いと考えられた。

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。

確立した条件を用いて玄米及び大豆を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価試験を実施した。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。

II. LC-TOF-MS を用いた残留動物用医薬品分析の検討

動物用医薬品の一斉分析に適した測定条件とするため、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、注入溶媒及び注入量について検討した。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。キャピラリー電圧、コーン電圧、脱溶媒ガス流量及び脱溶媒温度は、農薬について最適化したときと同じ結果が得られた。コリジョンエネルギーは、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 条件のうち注入溶媒(最終試験溶液の溶媒)及び注入量について、ピーク形状、感度、抽出物の溶解性等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(25:75)が、注入量として 2 µL が得られた。

確立した条件で 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。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。

III. GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

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. 結論

I. LC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

残留農薬一斉分析に適した LC-TOF-MS 測定条件及び定量解析条件を確立後、玄米及び大豆を用いて添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行った。その結果、検討農薬の 9 割以上で妥当性評価ガイドラインの真度、精度、選択性の目標値を満たし、一律基準レベルにおいて、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。

II. LC-TOF-MS を用いた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 LC-TOF-MS 測定条件及び定量解析条件を確立後、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。その結果、一部の化合物でイオン化阻害を受けていたものの、マトリックス検量線法で定量した場合、検討化合物の 9 割以上で真度、精度、選択性の目標値を満たし、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。

III. GC-TOF-MS を用いた残留農薬分析の検討

マトリックス添加標準溶液を用いて、ピーク面積の再現性や選択性について検討した結果、試料中濃度 0.005ppm 相当において、検討農薬の約 9 割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。

E. 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)

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).

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

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)

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)

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トランミンの迅速分析法、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)

F. 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

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 25 年度～27 年度 分担研究報告書

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

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、種々の検討を実施した。得られた結果から、安定同位体を用いた内標準法により精確な分析値が得られない場合の主な原因等について考察し、精確な分析値を得るために留意すべき事項等を取り纏めた。

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。

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検討対象農薬等の選択

検討対象農薬等及び対応する安定同位体の選択を行った。化合物の物性等から、一般的な方法では精確な分析値を得ることが比較的困難と考えられる農薬等であること、対応する安定同位体が市販されていることなどを考慮し、検討対象農薬等としてスルファジアジン、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選択した。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としては、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% ギ酸及びアセトニトリル (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 500 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の設定

液体クロマトグラフ (LC) における測定条件を検討した。測定は、汎用的な逆相クロマトグラフィーを選択した。分析カラムは、逆相クロマトグラフィーにおいて一般的に使用されるオクタデシルシリル化シリカゲルが充填されたものを使用した。また、移動相は、高極性移動相として 0.1 vol% ギ酸、低極性移動相としてアセトニトリルを選択した。分析カラムからの溶出は、経時的にアセトニトリル比率を増加させるグラジエント溶出を採用した。なお、逆相クロマトグラフィーにおいては、移動相中の低極性溶媒の比率が高いほど、一般的に分析対象化合物の溶出が早くなることから、本研究では、アセトニトリル比率の増加の勾配が異なる複数のグラジエント条件を設定した。

⑤LC-MS/MS 測定

設定した LC-MS/MS 測定条件を用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、保持時間やピーク面積等を求めた。

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℃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、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℃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。

⑧マトリックス添加標準溶液の定量

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。

⑨試験溶液の定量

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。

⑩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℃

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%

LC 条件①(t:時間(分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₂₀, B=38.5%; t_{20.1}, B=99%; t₂₅, B=99%; t_{25.1}, B=1%; t₄₅, B=1%
(B液の濃度勾配 2.5%/分)

LC 条件②(t:時間(分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₁₃, B=81%; t_{13.1}, B=99%; t₁₈, B=99%; t_{18.1}, B=1%; t₂₈, B=1%
(B液の濃度勾配 10%/分)

流速:0.4 mL/分

注入量:1 μL もしくは 2 μL

・質量分析

MS/MS:Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度:150℃

脱溶媒温度:600℃

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

①MS/MS 条件について

MS/MS 条件の最適化において得られた、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のプリカーサーイオン及びプロダクトイオン、並びにコーン電圧及びコリジョンエネルギーを表 2 に示した。表 2 に示されるように、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において、プリカーサーイオンとしては「プロトン付加イオン」が選択された。プロダクトイオンについては、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のフラグメントが生じ、同様のプロダクトイオンが生成していることが推察された。

②LC-MS/MS 条件について

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 10 ng/mL の混合標準溶液を 5 併行で測定した。LC 条件は、設定した 3 つのグラジエント条件(グラジエント条件①、②及び③)を用いた。その結果、保持時間については、各グラジエント条件下で全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について変動は無いことが確認された。また、ピーク面積値については、各グラジエント条件下で全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について 6 RSD%未満の良好な併行精度が得られた。

③保持時間について

各グラジエント条件における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 3 に示した。表 3 に示されるように、検討対象農薬等と対応する安定同位体では、若干ではあるが保持時間が異なり、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ことが予想された。また、標識数が同じであれば、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が短い、すなわち、¹³C 標識よりも d 標識の方が保持時間が短くなることへの寄与が大きいことが推察された。

検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間に及ぼすグラジエント条件の影響については、表 3 に示されるように、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配増加に伴い、保持時間が短くなる傾向が確認された。更に、グラジエント勾配の増加に伴い、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。

④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は、純度の算出方法は異なるものの、SMXZ-*d*₄(純度 97.4%)、TBZ-*d*₆(純度 98.0%)及びTBZ-¹³C₆(純度97.1%)を除いて、全て純度99%以上のものを使用した。

安定同位体による内標準法を使用する場合、当然ではあるが検体に安定同位体を添加して分析を行う。したがって、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混在していれば、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。本研究では、使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体の標準溶液をそれぞれ測定し、得られたピーク面積値について考察した。なお、前述の通り、設定した LC-MS/MS 条件下で良好な併行精度が得られたことから、測定回数は1回とし、LC 条件はグラジエント条件③を使用した。

表 4 に示されるように、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ほとんど得られず、安定同位体の標準品中には、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。

⑤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。

⑥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 5 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 5 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。

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 6 に示した。表 6 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。

⑦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 7 及び表 8 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 7 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 8 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。

調製した試験溶液中の各検討対象農薬等を、内標準法で定量した場合の回収率を表 9 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。

⑧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。平成 26 年度の結果を表 10 に、平成 27 年度の結果を表 11 に示した。

D. 考察

①MS/MS における測定について

本研究で最適化した MS/MS 条件において、プリカーサーイオンに関しては、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について「プロトン付加イオン」が選択された。また、プロダクトイオンについては、検討対象農薬等の構造、得られたプロダクトイオンの質量数、安定同位体の標識位置や標識数を考慮すると、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のフラグメントが生じ、安定同位体標識の有無により質量数は異なるが、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のプロダクトイオンが得られていることが推察された。なお、検討対象農薬等の構造と得られたプロダクトイオンの