

市販キットを用いた GC-MS/MS による残留農薬の 迅速スクリーニング法の検討

Examination of Rapid Screening Method for Residual Pesticides
by GC-MS/MS Using a Commercially Available Kit

竹脇優太郎 岡部 亮 青柳 光敏
平間 祐志 西村 一彦

Yutaro TAKEWAKI, Ryo OKABE, Mitsutoshi AOYAGI, Yuji HIRAMA and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : pesticide residue (残留農薬) ; validation (妥当性評価) ; Spinach (ほうれんそう) ; rapid screening method (迅速スクリーニング法) ; commercially available kit (市販キット)

緒 言

農産物には、その生産性の向上を目的として様々な農薬が使われていること、また、過去に食品中に高濃度の農薬が混入していた事案が発生^{1,2)}したことなどから、食品中の残留農薬に対する消費者の安心・安全意識は高い。そのため、北海道の食の安心・安全を担保するために、当所は食品中の残留農薬検査を実施している。検査では、当所で開発した分析法³⁾を使用しているが、近年、検査の省力化や迅速化に着眼した残留農薬検査一斉分析用キットも市販されている。これらのキットは、抽出工程で Quechers 法⁴⁾の操作法を採用し、抽出液を固相抽出法により精製するというものがほとんどであるが、小スケール、濃縮操作が不要などの工夫がされており、検査の効率化を図るうえで有効な手法のひとつと考えられる。また、今回検討に用いたキットは、ミニカラムを用いた精製において、目的化合物の溶出に遠心操作を行うことで、多検体を同時に処理できるといった特徴を持つ。これら市販キットの多くは、アセフェート及びメタミドホスなどの高極性農薬を LC-MS/MS で測定する方法としている。しかし、これら農薬は GC-MS/MS でも測定可能であることから、道内の LC-MS/MS を所有していない機関でも対応可能なように試験溶液調製法の改良を検討した。加えて、改良した試験法について妥当性評価⁵⁾を実施したところ、一定の知見が得られたので、以下に報告する。

方 法

1. 試料

試験品は道内小売店で購入した。ほうれんそうは、赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去し、ブロッコリーは、

葉を除去したものをフードプロセッサーで細切均一化し、試料とした。

2. 対象化合物

検討対象とした農薬 151 成分を表 1 に示した。

3. 試薬

農薬混合標準原液：富士フィルム和光純薬(株)製残留農薬混合標準液 PL-1-2、PL-2-1、PL-3-3、PL-4-2、PL-5-1、PL-6-3、PL-11-2 及び PL-12-1 を農薬混合標準原液とした。

農薬標準品及び農薬標準原液：上記富士フィルム和光純薬(株)製の各農薬混合標準液に含まれていない農薬の標準品は、関東化学(株)、林純薬工業(株)、富士フィルム和光純薬(株)及び Sigma-Aldrich 社製残留農薬試験用単成分標準品を用いた。各農薬の標準原液 (500 mg/L) は、農薬標準品 25 mg を精ひょうし、アセトンに溶解して調製した。

農薬混合標準溶液：各農薬混合標準原液及び農薬標準原液を混合した後、アセトンで希釈し、1 mg/L の濃度としたものを農薬混合標準溶液とした。添加回収試験用農薬混合標準溶液は農薬混合標準溶液を 0.2 mg/L となるように、検量線作成用農薬混合標準溶液は農薬混合標準溶液を 0.02、0.03、0.04、0.05 及び 0.06 mg/L となるようにアセトンでそれぞれ適宜希釈し、調製した。

残留農薬一斉分析用キット (以下、キットとする)：三浦工業(株)製 SPEEDIA 残留農薬分析膜精製キットを使用した。

固相抽出カラム：Bond Elut-C 18 (200 mg、3 mL、Agilent technologies 社製、以下 C 18 ミニカラムとする)、Sep-Pak Plus AC-2 (Waters 社製、以下 AC-2 ミニカラムとする)を使用した。

表1 市販キットを用いた GC-MS/MS 迅速スクリーニング法による妥当性評価試験結果

No	品目名	分析対象化合物名	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	定量イオン		確認イオン		ほうれんそう		
				Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
1	BHC	α -BHC	219	183	8	145	20	81.7	8.3	6.5
2		β -BHC	219	183	8	145	20	76.0	7.3	7.4
3		γ -BHC	219	183	8	145	20	81.6	11.9	9.8
4		δ -BHC	219	183	8	145	20	101.3	10.1	10.1
5	DDT	p,p'-DDD	235	165	24	199	14	70.4	7.7	8.6
6		p,p'-DDE	246	176	30	211	22	67.6	4.4	9.7
7		o,p'-DDT	235	165	24	199	14	74.9	9.3	7.9
8		p,p'-DDT	235	165	24	199	14	81.0	11.6	10.0
9	EPN	EPN	169	141	8	77	22	76.7	8.7	8.1
10	アセトクロール	アセトクロール	223	132	22	147	8	75.0	8.1	9.1
11	アセフェート	アセフェート	136	94	14	119	8	46.5	26.0	20.5
12	アトラジン	アトラジン	215	58	14	200	6	59.6	9.9	11.2
13	アラクロール	アラクロール	188	160	8	132	18	77.0	8.5	7.8
14	アルドリン及びディルドリン	アルドリン	263	193	34	203	26	68.3	7.1	9.7
15		ディルドリン	277	241	8	170	43	75.6	5.4	9.6
16	イサゾホス	イサゾホス	257	162	4	119	26	75.9	4.7	8.6
17	イソキサチオン	イソキサチオン	313	177	3	130	20	76.1	13.9	13.9
18	イソフェンホス	イソフェンホス	213	121	14	185	6	74.5	7.2	8.1
19		イソフェンホスオキソン	229	201	10	121	26	66.5	8.1	7.8
20	イソプロカルブ	イソプロカルブ	136	121	8	103	22	79.8	8.9	8.5
21	イソプロチオラン	イソプロチオラン	290	118	12	204	0	75.3	11.6	13.2
22	イプロベンホス	イプロベンホス	204	91	8	122	14	73.1	6.5	8.4
23	ウニコナゾールP	ウニコナゾールP	234	165	6	216	12	70.3	8.1	9.3
24	エスプロカルブ	エスプロカルブ	222	91	20	162	2	73.8	7.6	8.2
25	エチオン	エチオン	231	175	12	185	12	74.4	7.6	9.0
26	エディフェンホス	エディフェンホス	310	173	12	109	26	97.4	10.3	10.9
27	エトフェンブロックス	エトフェンブロックス	163	135	10	107	18	70.8	7.7	8.8
28	エトフメセート	エトフメセート	286	207	4	161	16	78.2	9.6	9.3
29	エトプロホス	エトプロホス	200	158	6	114	14	74.4	7.4	8.4
30	エトリムホス	エトリムホス	292	181	6	153	24	76.9	9.6	9.3
31	エンドリン	エンドリン	263	191	30	193	38	72.6	6.5	8.5
32	オキサジアゾン	オキサジアゾン	258	175	4	112	28	76.5	7.9	10.2
33	オキサジキシル	オキサジキシル	163	132	8	117	24	61.6	10.5	12.6
34	オメトエート	オメトエート	156	110	8	141	4	52.7	23.7	22.8
35	カズサホス	カズサホス	159	97	18	131	8	73.0	7.5	8.0
36	カフェンストロール	カフェンストロール	188	82	22	119	20	157.0	122.2	308.0
37	キナルホス	キナルホス	157	129	14	102	24	73.4	6.6	10.6
38	キノキシフェン	キノキシフェン	237	208	28	182	28	62.8	8.7	9.1
39	クレソキシメチル	クレソキシメチル	206	116	2	131	14	73.7	10.5	10.5
40	クロルタールジメチル	クロルタールジメチル	301	223	26	273	14	74.3	8.2	9.8
41	クロルデン	cis-クロルデン	373	337	10	264	10	71.6	10.8	10.9
42		trans-クロルデン	373	337	10	264	10	73.5	11.7	14.5
43	クロルピリホス	クロルピリホス	314	258	14	286	8	74.7	7.8	9.2
44	クロルピリホスメチル	クロルピリホスメチル	286	93	22	271	14	79.2	8.9	7.7
45	クロルフェナビル	クロルフェナビル	247	227	16	200	34	71.3	21.2	16.6
46	クロルフェンビンホス	(E)-クロルフェンビンホス	323	267	14	295	6	70.7	10.9	13.0
47		(Z)-クロルフェンビンホス	323	267	14	295	6	73.3	6.4	8.9
48	クロルプロファム	クロルプロファム	213	171	2	127	14	76.5	7.9	8.8
49	サリチオン	サリチオン	216	201	10	183	10	77.1	7.1	8.1
50	シアナジン	シアナジン	240	225	6	172	14	70.9	14.9	26.1
51	シアノフェンホス	シアノフェンホス	303	141	12	169	4	75.9	10.0	10.8
52	シアノホス	シアノホス	243	109	14	116	4	78.7	10.1	8.3
53	ジエトフェンカルブ	ジエトフェンカルブ	267	225	6	196	14	74.3	8.8	8.9
54	ジクロシメット	ジクロシメット	277	221	14	155	26	75.4	6.7	11.4
55	ジクロフェンチオン	ジクロフェンチオン	279	223	16	251	8	73.7	6.3	8.3
56	ジクロロボス及びナレド	ジクロロボス及びナレド	185	93	12	109	14	61.9	7.4	10.0
57	ジスルホトン	ジスルホトン	186	97	16	153	6	71.7	8.8	11.7
58		ジスルホトンスルホン	213	125	10	153	6	115.2	21.4	23.5
59	シハロトリン	シハロトリン	197	161	3	141	12	84.7	8.0	10.8
60	シハロホップブチル	シハロホップブチル	357	256	8	229	14	73.7	7.6	10.0
61	ジフェノコナゾール	ジフェノコナゾール	323	265	16	202	28	73.7	8.4	9.2
62	シフルトリン	シフルトリン	226	206	12	199	6	105.1	16.6	15.7
63	ジフルフェニカン	ジフルフェニカン	394	266	14	374	4	70.8	9.4	10.9
64	シベルメトリン	シベルメトリン	181	152	32	127	32	82.3	11.6	9.0
65	ジメタメトリン	ジメタメトリン	212	122	12	94	22	64.7	7.5	9.0

表1 市販キットを用いた GC-MS/MS 迅速スクリーニング法による妥当性評価試験結果 (続き)

No	品目名	分析対象化合物名	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	定量イオン		確認イオン		ほうれんそう		
				Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
66	ジメチルビンホス	(E)-ジメチルビンホス	295	109	18	280	16	83.3	12.0	11.4
67		(Z)-ジメチルビンホス	295	109	18	280	16	82.5	10.3	11.2
68	ジメトエート	ジメトエート	125	79	8	47	14	65.9	16.4	18.5
69	シメトリン	シメトリン	213	170	10	185	6	37.2	6.1	22.5
70	スルプロホス	スルプロホス	322	156	8	97	24	71.1	8.8	7.6
71	ダイアジノン	ダイアジノン	304	179	10	162	8	74.8	8.8	11.1
72	チオベンカルブ	チオベンカルブ	257	100	2	72	20	74.3	7.4	14.3
73	チオメトン	チオメトン	125	47	14	79	8	77.0	10.3	15.6
74	テトラコナゾール	テトラコナゾール	336	218	14	204	28	74.4	8.1	9.2
75	テトラジホン	テトラジホン	356	229	12	159	8	72.6	6.8	8.5
76	テニルクロール	テニルクロール	288	141	14	174	8	75.8	9.9	12.5
77	テブコナゾール	テブコナゾール	250	125	22	153	12	70.9	8.5	8.7
78	テフルトリン	テフルトリン	177	127	16	137	16	73.4	6.3	7.7
79	デルタメトリン及びトラロメトリン	デルタメトリン及びトラロメトリン	253	93	16	172	2	124.3	21.6	23.1
80	テルブトリン	テルブトリン	241	185	6	170	14	60.4	7.2	9.5
81	テルブホス	テルブホス	231	175	14	129	26	73.7	6.8	8.5
82	トリアジメノール	トリアジメノール	168	70	10	112	4	69.5	6.0	5.4
83	トリアレート	トリアレート	268	226	14	184	20	73.1	7.5	8.4
84	トリブホス	トリブホス	258	147	10	202	4	75.3	11.5	13.5
85	トリフルラリン	トリフルラリン	306	264	8	206	14	75.5	7.2	7.5
86	トリフロキシストロビン	トリフロキシストロビン	222	162	10	190	4	75.0	6.8	7.7
87	トルクロホスメチル	トルクロホスメチル	265	250	14	93	28	76.3	6.4	7.7
88	ナブロパミド	ナブロパミド	128	72	6	57	12	75.3	4.9	9.4
89	ニトロタールイソプロビル	ニトロタールイソプロビル	254	212	10	165	22	76.3	3.7	7.2
90	バラチオン	バラチオン	291	109	10	137	6	74.8	9.1	8.2
91	バラチオンメチル	バラチオンメチル	263	109	12	136	8	82.5	10.7	8.8
92	ビテルタノール	ビテルタノール	170	141	22	115	36	73.1	9.7	10.6
93	ビフェントリン	ビフェントリン	181	166	12	153	8	69.7	7.6	8.5
94	ビラクロホス	ビラクロホス	360	194	14	139	14	90.0	14.0	14.6
95	ビラゾホス	ビラゾホス	221	193	8	149	14	77.0	9.8	9.9
96	ビラフルフェンエチル	ビラフルフェンエチル	412	349	16	307	24	74.2	7.4	9.0
97	ビリダフェンチオン	ビリダフェンチオン	340	199	8	109	22	76.9	11.1	10.1
98	ビリダベン	ビリダベン	147	117	22	132	12	71.7	7.3	9.3
99	ビリブチカルブ	ビリブチカルブ	165	108	10	93	24	72.4	7.4	8.0
100	ビリミホスメチル	ビリミホスメチル	305	180	4	290	12	77.0	7.8	14.2
101	ビリメタニル	ビリメタニル	198	118	38	183	14	53.8	9.7	8.8
102	ピロキロン	ピロキロン	173	130	24	117	22	49.3	11.9	11.9
103	ピンクロゾリン	ピンクロゾリン	285	212	12	178	14	73.7	8.1	9.1
104	フィプロニル	フィプロニル	367	213	30	255	22	75.8	7.1	6.8
105	フェナミホス	フェナミホス	303	195	8	154	18	65.4	10.9	9.1
106	フェニトロチオン	フェニトロチオン	277	260	6	109	14	78.3	12.0	10.1
107	フェンクロルホス	フェンクロルホス	285	270	16	93	24	78.5	9.9	8.7
108	フェンスルホチオン	フェンスルホチオン	293	125	12	153	8	65.8	9.4	9.8
109	フェントエート	フェントエート	274	125	20	246	6	78.4	9.3	8.6
110	フェンバレレート	フェンバレレート	419	225	6	167	7	83.7	18.5	16.7
111	フェンブコナゾール	フェンブコナゾール	198	129	6	102	30	73.9	9.4	10.5
112	フェンブパトリン	フェンブパトリン	265	210	12	172	14	74.5	8.4	9.2
113	ブタクロール	ブタクロール	188	160	6	146	14	74.9	13.5	10.9
114	ブタミホス	ブタミホス	286	202	14	185	30	74.0	6.8	7.5
115	ブプロフェジン	ブプロフェジン	172	57	14	131	6	68.3	9.9	8.1
116	フルシトリネート	フルシトリネート	199	157	10	107	22	85.6	7.8	10.2
117	フルシラゾール	フルシラゾール	233	165	20	152	20	72.8	8.0	8.7
118	フルトラニル	フルトラニル	173	145	14	95	26	75.3	7.1	9.8
119	フルトリアホール	フルトリアホール	219	123	14	95	28	54.4	11.2	12.6
120	フルバリネート	フルバリネート	250	55	20	200	20	440.9	74.0	74.3
121	プレチラクロール	プレチラクロール	262	202	8	174	18	75.4	9.0	10.3
122	プロシミドン	プロシミドン	283	96	6	255	12	75.5	9.7	8.7
123	プロチオホス	プロチオホス	309	239	16	281	10	73.5	6.4	7.4
124	プロバホス	プロバホス	304	140	26	220	14	70.8	7.3	9.0
125	プロピコナゾール	プロピコナゾール	259	69	10	191	8	73.0	7.9	9.4
126	プロフェノホス	プロフェノホス	337	267	14	309	6	80.2	8.3	9.5
127	プロマシル	プロマシル	205	188	14	162	14	48.6	10.3	14.1
128	プロメトリン	プロメトリン	241	199	6	58	14	60.3	10.1	15.0
129	プロモホス	プロモホス	331	316	16	286	28	79.0	12.5	11.2
130	プロモホスエチル	プロモホスエチル	359	303	16	331	10	73.5	6.3	7.5

表1 市販キットを用いた GC-MS/MS 迅速スクリーニング法による妥当性評価試験結果（続き）

No	品目名	分析対象化合物名	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	定量イオン		確認イオン		ほうれんそう		
				Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
131	ヘキサコナゾール	ヘキサコナゾール	214	159	22	172	15	68.9	8.6	10.8
132	ベナラキシル	ベナラキシル	148	105	16	133	14	77.7	7.3	9.8
133	ヘプタクロル	ヘプタクロル	272	237	20	117	32	72.1	7.9	8.0
134		ヘプタクロル-endo-エボキシド	353	253	21	289	11	66.9	8.1	10.3
135		ヘプタクロル-exo-エボキシド	353	263	14	282	12	74.7	10.7	12.8
136	ベルメトリン	ベルメトリン	183	168	12	165	14	72.3	8.4	11.9
137	ペンディメタリン	ペンディメタリン	252	162	10	191	8	72.2	8.3	8.9
138	ベンフレセート	ベンフレセート	163	121	4	135	6	75.4	7.8	9.5
139	ホサロン	ホサロン	182	111	14	138	8	85.6	9.6	10.2
140	ホスチアゼート	ホスチアゼート	195	103	4	60	20	72.2	8.9	8.6
141	ホスメット	ホスメット	160	133	12	77	28	100.9	32.5	30.7
142	ホルモチオン	ホルモチオン	224	125	18	155	7	51.5	22.0	43.2
143	ホレート	ホレート	260	75	8	231	4	71.9	5.4	9.5
144	マラチオン	マラチオン	173	99	16	127	4	84.7	12.3	10.6
145	メタミドホス	メタミドホス	141	95	6	126	4	55.0	23.4	21.8
146	メチダチオン	メチダチオン	145	85	4	58	14	86.2	14.3	11.3
147	メトラクロール	メトラクロール	238	162	12	133	30	76.5	7.9	8.6
148	メフェナセツト	メフェナセツト	192	136	14	109	36	74.7	7.4	8.7
149	メメンビルジエチル	メメンビルジエチル	299	253	10	227	12	74.8	7.8	9.5
150	モノクロトホス	モノクロトホス	127	109	10	95	16	57.4	14.7	12.2
151	レナシル	レナシル	153	136	14	110	16	47.3	11.0	14.3

4. 分析装置及び測定条件

1) 装置

フードプロセッサ：大阪ケミカル(株)製 Force Mill FM-1 を使用した。

振とう機：タイテック(株)製 SR-2 w を使用した。

GC-MS/MS：Agilent Technologies 社製 7000 D GC/MS Triple Quad システムを使用した。

2) GC-MS/MS 分析条件

分析カラム：Agilent Technologies 社製 DB-5 MS (0.25 μ m, 0.25 mm i.d.×30 m)

カラム温度：50℃ (1 min)→25℃/min→125℃ (0 min)→10℃/min→310℃ (17.5 min)

注入口温度：250℃

Aux-2 温度：290℃

キャリアーガス：ヘリウム (1.2 mL/min)

注入法：スプリットレス

注入量：2 μ L

イオン化法：EI (電子イオン化法)

イオン源温度：320℃

測定モード：多重反応モニタリング (MRM)

各農薬の測定イオンは、表1に示した。

5. 試験溶液調製法

試験溶液調製法を図1に示した。試料 10 g を量り採り、アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間激しく振とうした。クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g、塩化ナトリウム 1 g 及び硫酸マグネシウム（無水）4 g を加え、1 分間振とうした後、遠心分離 (2,280×g, 10 min) し、上層のアセトニトリル層を抽出液とした。抽出液 2 mL をアセトニトリル 2 mL で

コンデショニングした C 18 ミニカラムに負荷した後、アセトニトリル 2 mL を注入し、全溶出液を採取した。これをロータリーエバポレーターを用いて 40℃ 以下で濃縮した後、アセトニトリルで 2 mL とし、水 2.4 mL と混合したものを 15 mL 遠沈管 (PP 製) にセットした吸着カートリッジへ全量負荷し、遠心 (700×g, 5 min) した。吸着カートリッジ流出液を 1 mL 以下に減圧下濃縮した後、水 20 mL を加えて混合した。この溶液を AC-2 ミニカラムに負荷し、窒素を通気して AC-2 ミニカラムを乾燥した後、アセトン 3.5 mL でバックフラッシュ溶出した。脱水・精製カートリッジ上方に先の吸着カートリッジをセットした後、AC-2 ミニカラム溶出液を吸着カートリッジに注入し、遠心 (30×g, 3 min) した。引き続き、吸着カートリッジにアセトニトリルエン (3:1) 混液 3.5 mL を注入して遠心 (30×g, 3 min) する操作を 3 回繰り返し、カートリッジから得られた溶出液を合わせて減圧下濃縮した後、窒素気流下溶媒を除去し、アセトンで 1 mL としたものを試験溶液とした。

6. 定 量

検量線作成用農薬混合標準溶液と農薬無添加の各ブランク試験溶液を等量混合し、0.01、0.015、0.02、0.025 及び 0.03 mg/L のマトリックス添加標準溶液を調製した。これらを GC-MS/MS に 2 μ L 注入し、得られたクロマトグラムピーク面積により検量線を作成した。また、試験溶液を等量のアセトンと混合して GC-MS/MS 測定用試験溶液を調製し、GC-MS/MS に 2 μ L 注入して得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により各農薬の回収率を算出した。

試料	10.0 g （添加試料の場合は、添加回収試験用農薬標準溶液を添加後、30分間放置）
抽出	アセトニトリル 10 mL 振とう 1分間 クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g クエン酸水素二ナトリウム1.5水和物 0.5 g 塩化ナトリウム 1 g 硫酸マグネシウム（無水） 4 g 振とう 1分間 遠心分離（2,280×g、10分間） アセトニトリル層を採る（抽出液とする）
精製	C18ミニカラム（200 mg） カラムをアセトニトリル 2 mLでコンディショニング 抽出液 2 mLを負荷 アセトニトリル 2 mLで溶出（負荷液及び溶出液を採る） 減圧下濃縮（1 mL以下） アセトニトリルで 2 mLに定容後、水 2.4 mLを加え、混和 吸着カートリッジ（キット） 溶液を全量移し入れる 遠心分離（700×g、5 分間） 流出液（高極性農薬） 減圧下濃縮し、アセトニトリルを除去 水 20 mL添加 AC-2ミニカラム 溶液を負荷 窒素を通気して乾燥 アセトン 3.5 mL（バックフラッシュ溶出） 吸着+脱水・精製カートリッジ（キット） 吸着カートリッジを 脱水・精製カートリッジにセット 溶出液を注入 遠心分離（30×g、3分間） アセトン-トルエン（3：1）混液 3.5 mL 遠心分離（30×g、3分間） 減圧下濃縮 窒素気流下、溶媒除去 アセトン 1 mLで定容 } 3回繰り返す
GC-MS/MS試験溶液	

図1 市販キットの GC-MS/MS 残留農薬一斉分析改良法

7. 添加回収試験（妥当性評価）

試料に対して0.01 mg/kgとなるように添加回収試験用農薬標準溶液を添加し、30分間放置した後、5. 試験溶液調製法により試験溶液を調製した。回収試験はガイドラインの実施方法⁵⁾に従って実施者1名で1日2併行を5日間行い、選択性、真度、精度（併行精度及び室内精度）及び定量限界について評価を行った。

結果及び考察

1. キットによる検査対象農薬の回収確認

ブロッコリー試料に添加回収試験用農薬混合標準溶液を添加（ $n=5$ ）し、キットのGC-MS/MS試験溶液調製法（図2）に従い、試験溶液を調製したところ、高極性農薬であるアセフェート及びメタミドホス（以下、高極性農薬）はほとんど回収されなかった。また、有機塩素系農薬16化合物の回収率は62～76%であり、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たさない70%未満のものが6化合物認められた。そこで、これら農薬の回収率向上を検討するため、試験溶液調製法の各工程における高極性農薬及び有機塩素系農薬の回収率を確認することとした。検討には、ほうれんそう及びブロッコリー各試料を用い、試料に各農薬を添加した後、抽出、膜ろ過カートリッジ精製、吸着カートリッジ精製及び脱水・精製カートリッジ精製の各工程まで実施した時の回収率を確認した。高極性農薬の回収率は、抽出後で94%以上、膜ろ過カートリッジ精製後でおおむね85%以上を示していたが、吸着カートリッジ精製後は約20%と低く、吸着カートリッジに高極性農薬が保持されていないと考えられた。そこで、吸着カートリッジ流出液中の高極性農薬を分析したところ、回収率70%相当の含有が認められた。一方、有機塩素系農薬は、抽出後において90%以上の回収率を示していたが、膜ろ過カートリッジ精製後に60%台となる農薬が一部あることが確認された。これらの結果を踏まえて、高極性農薬は吸着カートリッジ精製、有機塩素系農薬は膜ろ過カートリッジ精製についての改良を検討した。

2. 高極性農薬分析のための改良法の検討

吸着カートリッジ流出液中の高極性農薬を回収する方法として、食品中のアセフェート、メタミドホス等の分析で報告例のある活性炭固相ミニカラムAC-2ミニカラム⁶⁾を検討した。

最初にAC-2ミニカラムに対する高極性農薬の保持状況を確認した。流出液をそのままAC-2ミニカラムに負荷した場合、高極性農薬はAC-2ミニカラムに保持されなかった。流出液はアセトニトリル2 mLと水2.4 mLの混液であり、アセトニトリル含量が45%と高いことから、高極性農薬がAC-2ミニカラムに保持されるアセトニトリル比率について検討した。その結果、アセトニトリルが水に0.5%以上含まれると保持されないことが確認された。そこで、流出液をエバポレーターで1 mL以下まで濃縮することで、溶液中のアセトニトリルをおおむね除去した後、

水20 mLを加える操作とした。

次に、AC-2ミニカラムからの溶出を検討した。溶出溶媒としてアセトン3.5 mLを用いて各農薬を溶出することが可能であれば、溶出液をそのまま吸着カートリッジ及び吸着・脱水カートリッジ（以下、吸着+脱水・精製カートリッジ）の溶出溶媒として使用できると考え、溶出状況を確認した。高極性農薬を添加した流出液をエバポレーターにより1 mL以下まで濃縮した後、水を20 mL加えた。この溶液をAC-2ミニカラムに負荷し、窒素を通気して乾燥した後、アセトン3.5 mLでバックフラッシュ溶出したところ、93%以上の回収率が得られた。以上の結果から、吸着カートリッジ流出液中の高極性農薬をAC-2ミニカラムにより回収することとし、AC-2ミニカラム溶出液を吸着+脱水・精製カートリッジの溶出溶媒として使用することとした。

続いて、AC-2ミニカラム溶出液を用いて吸着+脱水・精製カートリッジからの高極性農薬の回収を検討した。高極性農薬を添加したAC-2ミニカラムのアセトン溶出液3.5 mLを吸着+脱水・精製カートリッジに注入し、引き続きアセトン：トルエン（3：1）混液3.5 mLを注入して得られた試験溶液を測定したところ、メタミドホスは約80%の回収率が得られたが、アセフェートは60%未満であった。アセフェートが低回収率であった原因として、吸着+脱水・精製カートリッジから完全に溶出していない可能性が考えられた。そこで、アセトン：トルエン（3：1）混液3.5 mLによる溶出を繰り返した結果、2回で良好な回収が得られたが、カートリッジのロット間差を考慮し、3回繰り返すことにした。

以上の検討結果から、高極性農薬分析のための改良として、吸着カートリッジに保持されなかった高極性農薬をAC-2ミニカラムで回収し、吸着カートリッジに保持された農薬とともに吸着+脱水・精製カートリッジにより精製する方法を構築した。

3. 有機塩素系農薬分析のための改良法の検討

キットでは、膜ろ過カートリッジ精製時にアセトニトリル抽出液2 mLと水2.4 mLを混合している。本操作により抽出液中の低極性化合物を不溶物とし、膜ろ過により除去していると考えられた。キット販売会社が公表しているデータ⁷⁻⁹⁾において、DDT類（ pp' -DDD、 pp' -DDE、 op' -DDT及び pp' -DDT）の回収率で70%未満のものは、ほうれんそうでは pp' -DDEなど3化合物であるのに対し、りんごでは pp' -DDEのみであった。また、ほうれんそう及び緑茶の pp' -DDE回収率は各々58%及び50%であるのに対し、りんごは67%であったことから、葉緑素が少ない試料では良好な結果が得られているが、葉緑素が多いために多い試料では、析出した葉緑素に低極性農薬である有機塩素系農薬の一部が取り込まれ、回収率の低下が生じたと推測した。そこで、膜ろ過カートリッジに変えて、当所の残留農薬検査³⁾で低極性夾雑物除去に使用しているC18ミニカラムによる精製を試みた。有機塩素系農薬を添加したほ

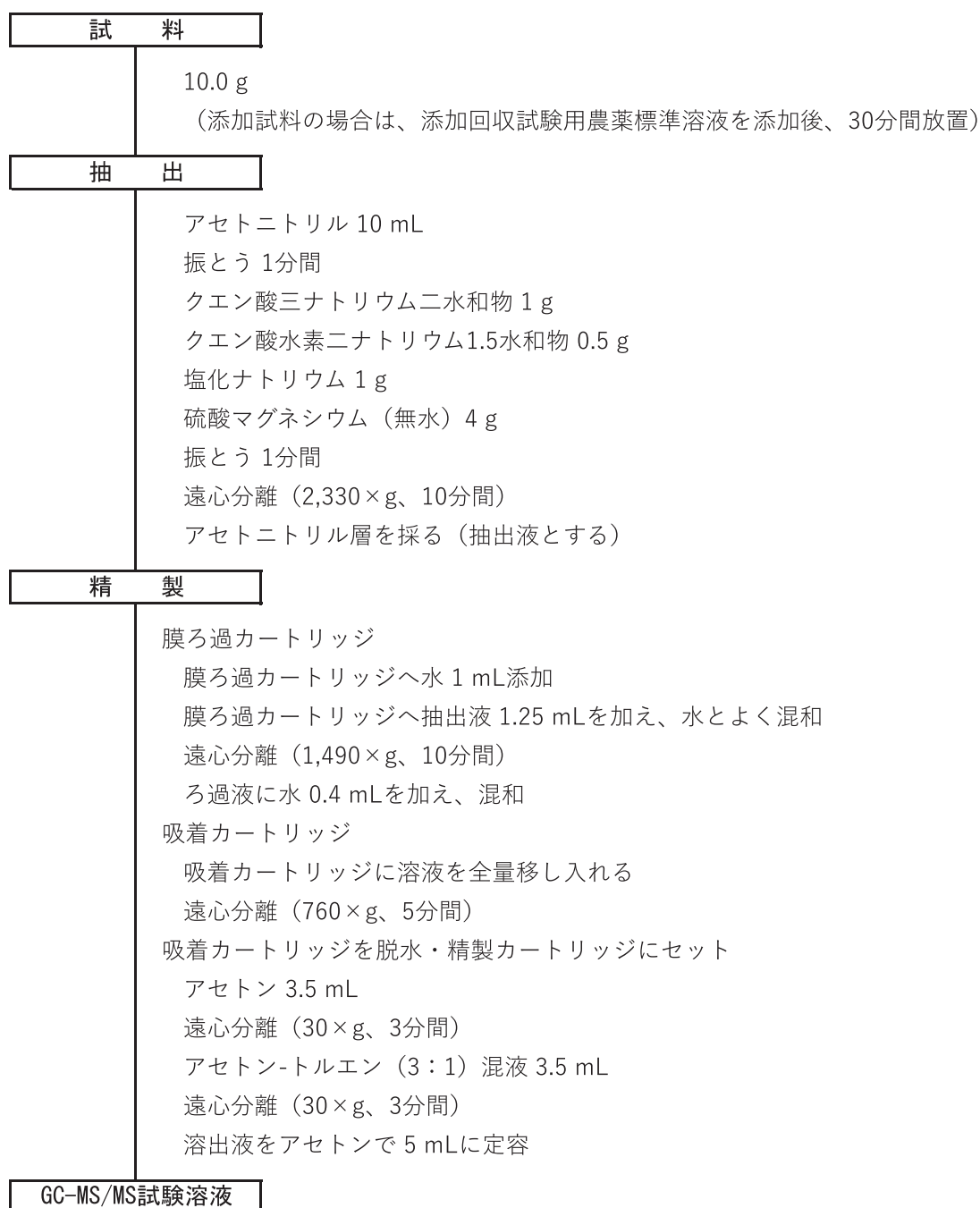


図2 市販キットの GC-MS/MS 残留農薬一斉分析法

うれんそう試料のアセトニトリル抽出液 2 mL を C 18 ミニカラムに負荷し、引き続きアセトニトリル 2 mL を注入して、全溶出液を採ったところ、有機塩素系農薬はほぼ 100% 回収された。以上の結果から、葉緑素の多い試料については、膜ろ過カートリッジに変えて C 18 ミニカラムによる精製を行うこととした。

4. 妥当性評価

今回改良した試験法（図1）について、農薬の残留基準値への適合判定を行う試験法として有用かどうかを妥当性評価ガイドライン⁵⁾に従い評価した。試料としてほうれんそうを用い、添加濃度は、食品衛生法第 13 条第 3 項に基

づき「人の健康を損なう恐れのない量」として定められている一律基準濃度（0.01 mg/kg）とした。結果を表 1 に示した。農薬 151 成分について、性能パラメータである選択性、真度、併行精度及び室内精度を評価したところ、選択性については、各農薬成分の定量を妨害するピークは認められなかった。また、その他の性能パラメータにおいても、118 成分が真度 70%～120%、併行精度 25% 未満及び室内精度 30% 未満の目標値を満たした。目標値を満たさなかった農薬のうち、カフェンストロールは真度が 157%、フルバリネートは 441% と高い値を示し、また、併行精度及び室内精度についても目標値を大きく上回った。この原

文 献

因として、これら農薬の検量線に直線性が認められなかったことが挙げられた。また、シメトリンの真度は37.2%であったが、この原因については不明であった。次に、改良法をスクリーニング試験法としたときの評価を検討した。厚生労働省からの事務連絡「加工食品に高濃度に含まれる農薬等の迅速分析法について」¹⁰⁾で示されている試験法は、残留農薬基準の適合判定を行う試験法ではないため、スクリーニング試験法と考えることができる。本事務連絡は、運用に当たって試験法について性能評価の実施を求めており、測定する添加試料は3個以上、回収率は50~200%及び併行精度は30%未満と目標値を設定している。これをスクリーニング試験法の目標値として改良法(図1)について性能評価を実施したところ、142化合物が目標値を満たしていた。高極性農薬の真度は、アセフェート46%、メタミドホス55%と低く、実試料ではいずれも妥当性評価ガイドラインの目標値を満足しなかったものの、メタミドホスはスクリーニング試験法としての目標値を満たしていた。また、有機塩素系農薬は、16化合物中13化合物が妥当性評価ガイドラインの目標値を、16化合物すべてがスクリーニング試験法の目標値を満たしていた。なお、0.01 mg/Lのマトリックス添加標準溶液(試料中0.005 mg/kg相当)を測定したところ、すべての農薬でS/N $\geq$ 10であったことから、本改良法の定量下限値を0.01 mg/kgとした。

今回、検査の効率化を目的として、市販のキットを用いたGC-MS/MSによる食品中の残留農薬一斉試験法の検討を行った。試験溶液調製法は、キット付属の試験法を一部改良して構築した。本改良法は、当所で用いている一斉試験法と比較して小スケールでの試験溶液調製が可能であることから、試験溶液調製に要する時間が半減し、使用する溶媒量も半分以下であった。そのため、検査の省力化及び迅速化を図ることができ、スクリーニング法として有用な試験法といえる。今回報告した試験法は、葉緑素の多い農産物を対象としたものとなった。葉緑素が少ない農産物に対しては、今後、減圧濃縮操作が不要な膜ろ過カートリッジを用いたスクリーニング法も含めた検討を行い、性能評価を実施する予定である。

最後に、キットの使用に対して有用な助言をいただきました三浦工業(株)岡本みなみ氏、小賀吉昭氏ならびに愛媛大学農学研究科教授川嶋文人氏に感謝いたします。

- 1) 厚生労働省ホームページ：中国産冷凍餃子の原因とする薬物中毒事案について ―行政及び事業者等の対応の検証と改善策―, <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/china-gyoza/dl/01.pdf> (確認：2021年7月14日)
- 2) 厚生労働省ホームページ：農薬(マラチオン)を検出した冷凍食品への対応について, <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000041453.pdf> (確認：2021年7月14日)
- 3) 柿本洋一郎, 岡部 亮, 久保田晶子, 渡邊涼太, 青柳光敏：農産加工食品の残留農薬試験に係る検査品目の拡充について, 道衛研所報, 69, 13-38 (2019)
- 4) Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. J. AOAC Int., 86(2), 412-431 (2003)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発1224第1号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」, 平成22年12月24日
- 6) 鈴木恵子, 矢野公一：LC/MSによるアセフェート, オメトエート, メタミドホス同時分析法, 札幌市衛生研究所報, 35, 66-70 (2008)
- 7) 三浦工業(株)ホームページ：SPEEDIAによるハウレンソウ中の残留農薬の多成分一斉分析(GC・LC対象農薬同時前処理メソッド), https://www.miuraz.co.jp/e_science/resource?path=e_science/upload/doc/SPEEDIA/TR-NRS-P04.pdf (確認：2021年7月14日)
- 8) 三浦工業(株)ホームページ：SPEEDIAによるリンゴ中の残留農薬の多成分一斉分析(GC・LC対象農薬同時前処理メソッド), https://www.miuraz.co.jp/e_science/resource?path=e_science/upload/doc/SPEEDIA/TR-NRS-P04.pdf (確認：2021年7月14日)
- 9) 三浦工業(株)ホームページ：SPEEDIAによる緑茶中の残留農薬の多成分一斉分析(GC・LC対象農薬同時前処理メソッド), https://www.miuraz.co.jp/e_science/resource?path=e_science/upload/doc/SPEEDIA/TR-NRS-P12.pdf (確認：2021年7月14日)
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」, 平成25年3月26日