妥当性評価

LC-MS/MSによる青果物，玄米，ウーロン茶中残留農薬の一斉分析

(平成26年6月6日受理)

並河幹夫 柴田さよ 塩見哲生 中川智之 伴創一郎
富田陽子 瀬村俊亮 中尾好絵 伴埜行則* 川上雅弘

Simultaneous Analysis of Residual Pesticides in Fruit, Vegetables,
Brown Rice, and Oolong Tea by LC-MS/MS

Mikio NAMIKAWA, Sayo SHIBATA, Tetsuo SHIOMI, Tomoyuki NAKAGAWA, Soichiro BAN,
Yoko TOMITA, Shunsuke SEMURA, Yoshie NAKAO, Yukinori BANNO* and Masahiro KAWAKAMI

Kyoto City Institute of Health and Environmental Science:
Nakagyo-ku, Kyoto 604-8845, Japan;

* Corresponding author

According to "The validity evaluation guideline of the testing methodology on the residual pesticides in food" of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, we carried out validity evaluation of a simultaneous analysis method for residual pesticides in various products with the QuEChERS method using a C18 mini column and/or an EnviCarb/PSA mini column for purification. Multi-ingredient simultaneous analysis with high sensitivity in a short time was achieved with LC-MS/MS. Validation was achieved for 269 pesticides among 302 pesticides in eight kinds of fruit, vegetables, and brown rice and 204 pesticides among 233 pesticides in oolong tea. Finally, 151 pesticides in oolong tea and from 234 to 259 pesticides in fruit, vegetables, and brown rice met the values specified in the guideline.

(Received June 6, 2014)

Key words: 残留農薬 residual pesticides; 妥当性評価 validity evaluation; 多成分一斉分析 multi-ingredient simultaneous analysis; QuEChERS法 QuEChERS method; 液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

付録資料: 付録資料 (付録表S1 (マトリクス標準液と溶媒標準液の回収率の比較) およびS2 (成分ごとの妥当性評価結果)) はJ-STAGEの日本食品衛生学雑誌 (<http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.55.279>) で閲覧できる.

はじめに

平成18年5月に導入された、ポジティブリスト制度を受けて、当研究所では、残留農薬一斉分析の前処理方法として、2003年にAnastassiadesらから発表されたQuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 法による抽出方法と、厚労省の示す通知法を組み合わせる方法を採用している^{1)~6)}.

また、平成23年8月より、それまで使用してきたイオントラップ型のLC-MSに代わり、タンデム型質量分析計を備えた(株)島津製作所製LCMS-8030を導入した。その結果、測定感度の上昇および対象農薬成分の溶出時間帯前後のみをデータ採取するSynchronized Multiple Reaction

Monitoring測定による多成分の一斉分析が可能になり、分析時間の大幅な短縮が実現された。

現在、残留農薬一斉分析法については、平成19年11月の厚生労働省通知 (通知の一部が平成22年12月に改正) により「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」*¹⁾ (以下、ガイドラインと記す。) が示され、このガイドラインの基準に適合している試験法であることを、各分析機関が評価することが求められている。そこで今回、当所の採用している前処理法でLCMS-8030を使って、オレンジ、リンゴ、キャベツ、ほうれんそう、にんじん、さつまいも、しいたけ、枝豆の8種類の青果

* 連絡先 ybanno@city.kyoto.jp
京都市衛生環境研究所: 〒604-8845 京都市中京区壬生東高田町1-20

*¹⁾ 厚生労働省通知「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、食安発1224第1号および「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について」平成19年11月15日、食安発第1115001号

物、玄米およびウーロン茶を対象に、ガイドラインに従い妥当性評価を行ったので、結果を報告する。測定成分は、Table 1に示した302成分を対象とした。

実験方法

1. 試料

京都市中央卸売市場第一市場に流通していた、青果物および玄米と、市内量販店に流通していたウーロン茶を添加回収試験用試料とした。

青果物については、細切後フードカッターを用いてペースト状になるよう均一化した約1 kgを冷凍保存した。玄米、ウーロン茶については、粉碎機を用いて粉碎後、425 μ mの標準網ふるいを通して均一化した約200 g（ウーロン茶は約100 g）を冷凍保存した。冷凍保存した試料を試験直前に解凍後、均一化し、サンプリングしたものをブランク試料とした。

2. 試薬および標準品

農薬標準品：関東化学(株)製、和光純薬工業(株)製、林純薬工業(株)製、Dr. Ehrenstorfer社製、Sigma-Aldrich社製の残留農薬分析用標準品を用いた。

標準溶液：関東化学(株)製農薬混合溶液45, 53, 54, 55, 56, 57, 58各10 μ g/mLを用いた。

標準原液および混合標準溶液：標準溶液に含まれないものについては、農薬標準品からメタノールまたはアセトニトリルで1,000 μ g/mL溶液を調製した後、メタノールで希釈、混合して10 μ g/mL混合標準溶液を調製した。

前処理には、アセトニトリル、トルエン、アセトン、メタノールおよびヘキサンは関東化学(株)製、和光純薬工業(株)製、(株)ナカライテスク製の残留農薬試験用を、トリエチルアミンは(株)ナカライテスク製の特級を、無水硫酸マグネシウムは和光純薬工業(株)製の特級を、クエン酸水素二ナトリウム1.5水和物およびクエン酸三ナトリウム2水和物は関東化学(株)製の特級を、塩化ナトリウムは関東化学(株)製の残留農薬試験用を用いた。

ポジティブリスト制度におけるLC/MSの一斉試験法I測定農薬^{*2}（以下、I法農薬と記す。）については、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにAgilent Technologies社製のMega Bond Elut C18 (1 g/6 mL)を、活性炭／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムにSUPELCO社製のEnvicarbII/PSA (500 mg/500 mg/6 mL)を、シリカゲルミニカラムにAgilent Technologies社製のMega Bond Elut SI (1 g/6 mL)を用いた。一斉試験法II測定農薬^{*3}（以下、II法農薬と記す。）については、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

にAgilent Technologies社製のBond Elut C18 (500 mg/6 mL)を、シリカゲルミニカラムにSUPELCO社製のDiscovery SPE DSC-Si (500 mg/6 mL)を用いた。

移動相には、メタノールおよび蒸留水は関東化学(株)製のLC/MS用を、酢酸アンモニウムはFluka社製のLC/MS用を、ギ酸は和光純薬工業(株)製のLC/MS用を用いた。

3. 装置

高速ホモジナイザー：IKAジャパン(株)製ULTRA-TURRAX T25

LC：(株)島津製作所製Nexera

MS：(株)島津製作所製LCMS-8030

4. 分析条件

カラム：(株)島津製作所製Shim-pack FC-ODS (2 mm i.d.×150 mm, 3 μ m)

カラム温度：40℃

移動相：A液 10 mmol/L酢酸アンモニウム+0.1%ギ酸水溶液

B液 メタノール

グラジエント条件：B液15%→40% (1 min→3.5 min)→50% (6 min)→55% (8 min)→95% (17.5 min→30 min)→15% (30 min→40 min)

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μ L

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

脱溶媒管 (Desolvation Line; DL) 温度：250℃

ネブライザーガス流量：1.5 L/min

ヒートブロック温度：400℃

5. 試験溶液の調製

抽出操作および試験溶液の精製は、Fig. 1に示すフローチャートに従って行った。青果物は細切試料10 g、玄米は試料5 gに水5 gを加えて30分間静置したもの、ウーロン茶は2.5 gに水7.5 gを加えて30分間静置したものを用いた。標準溶液を添加し、30分間静置した後、アセトニトリル10 mLを加え、高速ホモジナイザーで1分間かくはん抽出した。ここに、無水硫酸マグネシウム4 g、塩化ナトリウム1 g、クエン酸三ナトリウム2水和物1 gおよびクエン酸水素二ナトリウム1.5水和物0.5 gを加え、1分間激しく振とうした後、4,000 rpmで5分間遠心分離した。

I法農薬については、アセトニトリル10 mLでコンディショニングしたMega Bond Elut C18 (1 g/6 mL) カラムに、遠心分離後のアセトニトリル層1 mLを負荷し、アセトニトリル15 mLで溶出した。溶出液を窒素気流下で約5 mLまで濃縮し、アセトニトリル-トルエン (3:1) 混液10 mLでコンディショニングしたEnvicarbII/PSA (500 mg/500 mg/6 mL) カラムに負荷後、アセトニトリル-トルエン (3:1) 混液15 mLで溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した後、メタノール1 mL（玄米は0.5 mL）で定容し、試験溶液（1 g試料/mL）とした。

ただし、ウーロン茶についてはEnvicarbII/PSA (500 mg/500 mg/6 mL) カラム溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した

^{*2} LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/3-002.html>

^{*3} LC/MSによる農薬等の一斉試験法II（農産物）
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/3-003.html>

Table 1. MS/MS parameters of each pesticide

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (m/z)	Product	
						Target ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
2,4-D (2,4-PA)	II		11.46	—	219.20	161.00	125.10
2,4-DB	II		15.70	—	247.25	161.05	125.15
3-Hydroxycarbofuran	I	B	6.10	+	255.30	163.15	181.15
4-Chlorophenoxyacetic acid	II		8.97	—	185.30	127.10	35.15
Abamectin B1a	I	A	20.06	+	890.60	305.30	567.55
Acetamiprid	I	B	6.11	+	223.20	126.05	56.10
Acibenzolar- <i>S</i> -methyl	I	A	15.22	+	211.10	136.00	69.05
Acifluorfen	II		13.93	—	360.20	316.10	195.00
Acrinathrin	I	B	19.70	+	559.05	208.05	181.00
Aldicarb	I	A	8.57	+	208.20	116.10	89.10
Aldoxycarb (Aldicarb sulfone)	I	A	3.66	+	240.20	86.10	148.10
Ametryn	I	B	14.39	+	228.30	186.15	96.10
Anilofos	I	A	16.76	+	368.10	199.05	125.15
Aramite	I	A	18.68	+	352.25	191.30	57.25
Asibenzolar-acid	II		5.48	—	179.25	107.10	135.10
Azaconazole	I	B	13.37	+	300.10	158.95	230.95
Azamethiphos	I	A	9.81	+	325.05	183.05	112.05
Azimsulfuron	II		12.42	+	425.20	182.15	139.10
Azinphos-methyl	I	A	13.83	+	318.05	132.15	160.25
Azoxystrobin	I	A	14.06	+	404.25	372.20	344.20
Barban	I	B	15.16	+	275.15	258.00	178.00
Benalaxyl	I	B	17.01	+	326.25	148.20	91.20
Bendiocarb	I	A	10.53	+	224.20	167.10	109.10
Benfuracarb	I	B	18.27	+	411.30	195.10	190.15
Bensulfuron-methyl	II		13.68	+	411.25	149.20	91.25
Bensulide	I	B	16.27	+	398.10	158.10	218.10
Benzofenap	I	A	18.22	+	431.15	105.25	119.20
Bifenazate	I	B	15.50	+	301.25	198.25	170.15
Bifenox	I	B	17.67	+	358.95	310.00	342.00
Bifenthrin	I	B	21.18	+	440.10	181.15	166.15
Bitertanol	I	B	17.30	+	338.25	99.15	70.15
Boscalid	I	A	14.71	+	343.10	307.10	140.05
Bromacil	I	B	10.55	+	261.05	205.00	188.00
Bromoxynil	II		11.81	—	274.05	79.10	
Bupirimate	I	B	16.33	+	317.25	108.00	166.05
Buprofezin	I	B	18.70	+	306.25	201.05	57.10
Butachlor	I	B	18.92	+	312.25	238.05	57.15
Butafenacil	I	A	15.49	+	492.15	331.05	180.15
Carbaryl (NAC)	I	A	11.41	+	202.20	145.10	127.10
Carbendazim	I	B	5.71	+	192.20	160.10	132.10
Carbetamide	I	B	9.45	+	237.25	118.15	72.15
Carbofuran	I	A	10.60	+	222.25	165.15	123.10
Carbosulfan	I	B	20.65	+	381.30	118.15	160.20
Carfentrazone-ethyl	I	B	16.62	+	429.15	346.15	366.15
Carpropamid	I	A	16.92	+	336.10	139.10	103.10
Chlorfluazuron	I	B	19.58	+	540.05	383.20	158.30
Chloridazon	I	A	6.50	+	222.15	92.10	104.10
Chlorimuron-ethyl	II		14.76	+	415.15	186.20	185.15
Chloroxuron	I	A	15.49	+	291.20	72.10	164.25
Chlorpropham	I	B	15.31	+	231.20	172.00	153.95
Chlorpyrifos	I	B	19.29	+	349.85	197.90	97.00
Chlorsulfuron	II		10.76	+	358.15	141.25	167.25
Chlorthiophos	I	B	19.57	+	361.05	304.90	191.90
Chromafenozide	I	A	15.57	+	395.30	175.15	339.25
Cinosulfuron	II		9.18	+	414.25	183.20	83.20
Clodinafopacid	II		14.15	—	310.25	238.15	218.15
Clodinafop-propargyl	I	B	16.59	+	350.15	266.25	238.15
Clofencet	II		9.74	+	279.20	261.10	166.15
Clofentezine	I	A	17.82	+	303.10	138.05	102.10
Clomeprop	I	A	18.66	+	324.15	120.25	203.15

Table 1. Continued

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (m/z)	Product	
						Target ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
Cloprop	II		11.26	—	199.25	127.10	35.20
Cloquintocet-mexyl	I	A	18.78	+	336.20	238.10	192.05
Cloransulam-methyl	II		11.18	+	430.15	398.25	370.15
Clothianidin	I	A	5.31	+	250.10	169.10	132.05
Coumaphos	I	B	17.03	+	362.95	227.00	306.95
CPF	I	B	6.29	+	199.20	128.10	126.05
Cumyluron	I	A	15.38	+	303.20	185.10	125.10
Cyazofamid	I	B	15.93	+	325.10	108.05	261.10
Cyclanilide	II		14.78	—	272.20	160.10	228.10
Cycloate	I	A	18.12	+	216.25	83.10	154.15
Cyclosulfamuron	II		15.42	+	422.25	261.20	218.20
Cyflufenamid	I	A	17.21	+	413.20	295.15	241.10
Cymoxanil	I	B	7.22	+	199.20	128.10	111.10
Cypermethrin (I, II, III, IV)	I	B	19.67	+	433.00	191.00	416.10
			19.74				
Cyproconazole (I, II)	II		15.09	+	292.25	70.25	125.20
			15.58				
Cyprodinil	I	A	17.27	+	226.30	93.10	108.10
Demeton- <i>S</i> -methyl sulfoxide	I	B	10.54	+	263.10	109.05	169.05
Desmedipham	I	B	13.36	+	318.20	182.15	136.10
Diafenthiuron-urea	I	B	19.00	+	369.35	229.25	271.25
Diallate (<i>E, Z</i>)	I	A	18.29	+	270.15	86.25	109.10
Diazinon	I	B	17.21	+	305.20	169.00	153.05
Dichlocymet (RR, SR)	I	B	15.89	+	313.15	173.05	137.05
			16.26				
Dichlofluanid	I	B	15.74	+	349.90	223.95	123.05
Dichlorprop	II		13.53	—	233.20	161.05	125.10
Diclobutrazol	I	B	16.64	+	328.20	70.05	159.00
Diclomezine	II		16.27	+	255.20	141.10	123.10
Diclosulam	II		11.75	+	406.10	161.00	378.00
Diethofencarb	I	B	14.32	+	268.25	226.10	124.00
Difenoconazole (I, II)	I	B	17.67	+	406.15	251.05	188.15
Difenzoquat-methylsulfate	I	B	6.97	+	249.30	77.10	130.10
Diflubenzuron	I	A	16.28	+	311.10	158.10	141.05
Dimepiperate	I	B	18.18	+	264.25	146.05	119.10
Dimethametryn	I	B	16.76	+	256.10	186.05	68.05
Dimethirimol	I	A	10.67	+	210.30	71.10	140.15
Dimethoate	I	B	6.34	+	229.95	198.90	124.95
Dimetomorph (<i>E, Z</i>)	I	A	14.41	+	388.25	301.15	165.15
			14.93				
Diniconazol	I	B	17.65	+	326.05	70.05	159.00
Disulfoton	I	B	17.81	+	275.10	89.05	61.05
Disulfoton-sulfone	I	B	12.51	+	307.15	96.90	153.00
Diuron (DCMU)	I	A	13.33	+	233.10	72.10	160.00
Dymron (Daimuron)	I	A	15.27	+	269.25	151.15	91.10
Epoxiconazole	I	A	15.99	+	330.15	121.25	101.25
Ethametsulfuron-methyl	II		11.62	+	411.25	196.25	168.25
Ethiofencarb	I	B	11.94	+	226.20	107.00	77.00
Ethofenprox	I	B	21.26	+	393.90	177.10	359.20
Ethoprophos	I	B	16.09	+	243.15	172.95	130.90
Ethoxysulfuron	II		14.93	+	399.20	261.10	218.10
Ethychlozate	I	B	13.97	+	239.15	165.05	111.05
Ethychlozate-CIA	II		9.61	+	211.20	165.10	111.05
Etoxazole	I	B	19.38	+	360.30	141.05	304.15
Etrifos	I	B	17.09	+	292.95	125.00	265.05
Famoxadone	I	B	16.94	+	392.20	331.20	93.10
Fenamidone	I	A	14.58	+	312.20	92.10	236.15
Fenbuconazole	I	B	16.02	+	337.20	70.10	125.00
Fenhexamid	II		15.70	+	302.20	97.15	55.15
Fenobucarb	I	A	14.27	+	208.25	95.10	152.10

Table 1. Continued

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (m/z)	Product	
						Target ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
Fenoxanil	I	B	16.32	+	329.20	302.15	86.15
Fenoxaprop-ethyl	I	A	18.36	+	362.15	288.20	121.25
Fenoxycarb	I	A	16.42	+	302.20	88.10	116.15
Fenpropathrin	I	B	19.41	+	367.25	125.10	350.20
Fenpropimorph	I	B	15.35	+	304.40	147.15	132.15
Fenpyroximate (<i>E</i> , <i>Z</i>)	I	A	19.72	+	422.30	366.20	135.10
Fenthion	I	B	17.09	+	278.90	169.05	247.00
Ferimzone (<i>E</i>)	I	A	14.11	+	255.30	91.10	132.15
Ferimzone (<i>Z</i>)	I	A	14.61	+	255.30	91.10	132.15
Fipronil	I	B	16.19	—	435.00	329.95	250.05
Flamprop-methyl	I	B	15.31	+	336.15	105.20	77.20
Flazasulfuron	II		13.43	+	408.15	182.15	83.10
Florasuram	II		7.92	+	360.20	129.10	109.10
Fluazifop	II		14.04	+	328.20	282.15	91.10
Fluazuron	I	B	18.88	+	506.05	158.30	141.25
Fludioxonil	I	B	14.78	—	247.10	180.05	126.10
Flufenacet	I	A	15.82	+	364.15	152.20	194.35
Flufenoxuron	I	A	19.10	+	489.05	158.25	141.20
Flumetsulam	II		5.31	+	326.15	129.20	109.20
Flumioxazin	I	B	11.36	+	387.35	167.15	79.20
Fluometuron	I	B	12.13	+	233.15	72.10	46.15
Fluquinconazole	I	B	15.63	+	376.10	108.10	349.10
Fluridone	I	A	13.82	+	330.25	309.20	259.25
Fluroxypyr	II		8.35	—	253.20	195.10	35.25
Flutoranil	I	B	14.93	+	324.20	262.05	242.00
Fluvalinate (I, II)	I	B	20.02	+	502.95	208.00	181.00
Fomesafen	II		13.77	—	437.20	195.05	222.10
Foramsulfuron	II		11.23	+	453.25	182.25	139.20
Forchlorfenuron	II		13.03	+	248.20	129.10	93.10
Fosthiazate	I	B	12.08	+	284.10	104.10	228.10
Furametpyr	I	A	12.60	+	334.25	157.15	290.25
Furathiocarb	I	A	18.44	+	383.25	195.10	252.15
Furilazole	I	B	12.49	+	220.10	83.10	65.15
Halosulfuron-methyl	II		14.87	—	433.20	252.10	154.15
Haloxypop	II		15.97	—	360.25	288.15	196.05
Hexaconazole	I	B	17.23	+	314.15	70.20	159.10
Hexaflumuron	I	A	17.76	—	459.10	439.05	175.05
Hexythiazox	I	A	19.13	+	353.25	228.10	168.25
Imazalil	I	A	12.99	+	297.15	159.05	255.10
Imazamox	II		6.17	+	306.35	69.15	41.15
Imazapic	II		6.78	+	276.30	69.15	41.15
Imazapyr	II		4.80	+	262.25	69.20	217.25
Imazaquin	II		9.92	+	312.25	69.20	41.20
Imazosulfuron	II		14.49	+	413.15	153.10	156.25
Imibenconazole	I	B	18.66	+	411.10	125.10	171.10
Imibenconazole-debenzyl	I	B	10.60	+	271.15	70.10	174.05
Imidacloprid	I	A	5.04	+	256.15	209.15	175.20
Indanofan	I	A	16.03	+	341.20	175.15	187.15
Indoxacarb	I	A	17.58	+	528.15	150.15	203.10
Iodosulfuron-methyl	II		12.91	+	508.10	167.15	56.25
Ioxynil	II		13.14	—	370.00	127.00	215.00
Iprobenphos	I	B	16.64	+	289.15	91.20	205.15
Iprovalicarb	I	A	15.67	+	321.35	119.20	203.20
Isofenphos	I	B	17.41	+	346.05	245.00	216.95
Isofenphos-oxon	I	B	15.53	+	330.25	229.20	201.10
Isoprothiolane	I	B	15.17	+	291.15	231.00	188.95
Isouron	I	B	11.23	+	212.25	72.10	167.10
Isoxaflutole	I	A	12.98	+	360.15	251.15	144.10
Isoxathion-oxon	I	B	14.69	+	298.05	242.00	270.00
Kresoxim-methyl	I	B	16.78	+	314.20	267.15	116.10

Table 1. Continued

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product	
						Target ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)
Lactofen	I	A	18.34	+	479.20	344.05	223.05
Lenacil	I	B	12.93	+	235.20	153.05	136.00
Linuron	I	A	14.50	+	249.10	160.00	182.10
Lufenuron	I	A	18.54	—	509.10	339.10	175.15
Malathion	I	B	15.08	+	331.15	127.05	99.00
MCPA (MCP)	II		12.27	—	199.25	141.10	35.05
MCPB	II		15.85	—	227.30	141.10	35.20
Mecoprop + Mecoprop-P	II		14.03	—	213.30	141.15	35.15
Mefenacet	I	B	15.49	+	299.05	148.05	120.05
Mefenoxam	I	B	13.05	+	280.30	220.20	45.10
Mefenpyr-diethyl	I	B	17.21	+	373.15	327.10	160.10
Mepanipirim-metabolite	I	B	13.06	+	244.25	226.10	200.10
Mepanipirim	I	A	16.06	+	224.15	106.10	77.10
Mercaptodimetur-sulfoxide	I	B	5.44	+	242.00	185.00	122.00
Mesosulfuron-methyl	II		12.30	+	504.20	182.15	139.10
Metalaxyl	I	B	13.06	+	279.50	220.10	192.15
Metamitron	I	B	6.31	+	203.25	42.10	175.15
Methabenzthiazuron	I	A	12.90	+	222.20	165.10	150.05
Methamidophos	I	B	3.10	+	142.15	94.00	125.00
Methidathion	I	B	13.63	+	303.05	144.95	85.00
Methiocarb	I	A	14.62	+	226.25	169.10	121.10
Methomyl	I	A	4.13	+	163.20	88.05	106.05
Methoxyfenozide	I	A	15.08	+	369.30	149.10	91.15
Metosulam	II		10.72	+	418.15	175.15	140.20
Metsulfuron-methyl	II		9.92	+	382.20	167.10	77.15
Mevinphos (<i>E</i> , <i>Z</i>)	I	B	6.13	+	225.15	127.05	193.10
Milbemectin-A3	I	B	20.19	+	511.40	95.15	113.20
Milbemectin-A4	I	B	20.71	+	525.40	109.15	127.20
Monocrotophos	I	B	4.33	+	241.00	224.05	127.00
Monolinuron	I	A	11.92	+	215.15	126.05	148.10
Naproanilide	I	A	16.38	+	292.25	171.25	120.25
Napropamide	I	B	16.08	+	272.25	129.30	58.20
Naptalam	II		10.29	+	292.20	144.10	149.10
Nicosulfuron	II		9.85	+	411.25	182.25	106.20
Novalron	I	A	17.78	+	493.10	158.10	141.05
Omethoate	I	B	3.46	+	214.15	125.05	109.05
Oxabetrinil	I	B	14.37	+	233.15	147.10	87.10
Oxadixyl	I	B	8.91	+	279.25	219.10	133.10
Oxamyl	I	A	3.71	+	237.20	72.10	90.10
Oxaziclomefone	I	A	18.30	+	376.20	190.15	161.10
Oxycarboxin	I	A	7.17	+	268.15	175.05	147.00
Pacrobutrazole	I	B	14.98	+	294.25	70.20	125.20
Penconazole	I	B	16.80	+	284.15	70.10	158.95
Pencycuron	I	A	17.51	+	329.25	125.20	89.20
Pendimethalin	I	B	19.43	+	282.25	212.05	43.10
Penoxsulam	II		11.46	+	484.20	195.15	194.15
Permethrin-1	I	B	20.50	+	408.05	183.05	355.20
Permethrin-2	I	B	20.97	+	408.05	183.05	355.20
Phenmedipham	I	A	13.58	+	318.20	168.10	136.10
Phenthoate	I	B	16.61	+	321.15	247.00	79.05
Phoxim	I	B	17.33	+	299.15	129.20	97.00
Picolinafen	I	B	18.69	+	377.20	238.10	145.05
Piperonyl-butoxide	I	B	18.92	+	356.15	177.05	119.10
Pirimicarb	I	A	11.48	+	239.25	72.10	182.20
Primisulfuron-methyl	II		14.79	+	469.15	254.20	199.15
Prochloraz	I	B	17.36	+	376.15	308.15	70.20
Profenofos	I	B	18.46	+	391.65	374.90	304.85
Promecarb	I	B	15.02	+	208.25	151.10	109.05
Prometryn	I	B	15.82	+	242.30	158.10	200.15
Propachlor	I	B	13.12	+	212.00	170.00	94.05

Table 1. Continued

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product	
						Target ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)
Propamocarb	I	B	3.63	+	189.30	102.10	74.05
Propaquizafop	I	A	18.66	+	444.25	100.15	299.10
Propargite	I	B	19.31	+	368.10	231.20	57.15
Propetamphos	I	B	15.39	+	282.00	138.00	156.05
Propiconazole (I, II)	I	B	17.10	+	342.20	69.15	159.00
Propoxycarbazon	II		8.19	+	421.20	180.15	138.05
Prosulfuron	II		14.07	+	420.20	141.15	167.10
Pyraclofos	I	B	17.33	+	361.15	257.05	138.05
Pyraclostrobin	I	A	17.21	+	388.20	194.10	163.10
Pyrazolynate	I	A	17.48	+	439.10	91.15	173.00
Pyrazophos	I	B	17.53	+	374.20	222.15	194.10
Pyrazosulfuron-ethyl	II		15.41	+	415.25	182.25	139.20
Pyrazoxyfen	I	B	16.93	+	403.15	91.20	105.20
PyrethrinII	I	B	17.89	+	372.85	161.05	133.15
Pyridaben	I	B	20.14	+	365.05	147.15	309.10
Pyrifeno- <i>E</i>	I	B	16.31	+	295.15	93.10	66.05
Pyrifeno- <i>Z</i>	I	B	15.78	+	295.15	93.05	67.15
Pyriftalid	I	A	13.99	+	319.20	139.10	179.05
Pyrimethanil	I	B	14.95	+	200.30	107.10	82.10
Pyriproxyfen	I	B	19.17	+	322.25	96.00	78.05
Quinclorac	II		6.70	+	242.10	224.05	161.00
Quinoxifen	I	B	19.43	+	308.10	196.90	161.95
Quizalofop-ethyl	I	A	18.49	+	373.20	299.10	255.10
Sethoxydim	I	B	18.73	+	328.30	178.15	180.15
Silafluofen	I	A	23.06	+	426.30	287.15	168.10
Simeconazole	I	A	15.76	+	294.20	70.10	135.10
Spinosyn A	I	A	17.26	+	732.60	142.20	98.25
Spinosyn D	I	A	17.91	+	746.60	142.20	98.25
Sulfentrazone	II		11.07	—	385.25	307.15	306.20
Sulfosulfuron	II		13.49	+	471.15	211.25	261.20
Tebuconazol	I	B	16.79	+	308.25	70.05	124.95
Tebufenozide	I	A	16.30	+	353.35	133.20	297.35
Tebufenpyrad	I	B	18.58	+	334.30	117.10	145.10
Tebuthiuron	I	A	10.88	+	229.25	172.15	116.10
Tepraloxydim	I	B	15.63	+	342.30	250.20	166.15
Tepraloxydim-DMP	I	B	9.00	+	245.30	213.15	117.10
Tetrachlorvinphos (CVMP)	I	A	16.50	+	366.95	127.15	206.00
Tetraconazole	I	B	15.77	+	371.95	159.00	70.10
Thiabendazole	I	A	7.20	+	202.20	175.10	131.15
Thiacloprid	I	A	7.20	+	253.15	126.10	90.15
Thiamethoxam	I	A	4.17	+	292.10	211.10	181.10
Thiazopyr	I	B	16.70	+	396.75	60.90	377.10
Thidiazuron	II		10.32	+	221.20	102.05	30.15
Thifensulfuron-methyl	II		9.52	+	388.15	167.25	205.20
Thifluzamide	I	B	16.00	+	526.90	148.05	486.85
Thiodicarb	I	A	11.74	+	355.15	88.15	108.10
Tolfenpyrad	I	B	18.74	+	384.30	197.15	145.05
Tolyfluanid	I	B	16.76	+	364.10	237.95	137.00
TralkoxydimII	I	A	19.34	+	330.30	138.10	284.20
Triadimefon	I	B	15.26	+	294.20	69.10	197.05
Triadimenol (I, II)	I	B	14.92	+	296.20	70.10	99.10
			15.51				
Triasulfuron	II		9.72	+	402.15	167.20	141.20
Tribuphos	I	B	20.18	+	315.25	57.20	169.15
Triclopyr	II		12.97	—	254.20	196.05	218.10
Tridemorph (I, II)	I	A	17.01	+	298.50	43.10	57.15
			17.70				
Trifloxystrobin	I		17.81	+	409.25	186.20	145.15
Trifloxysulfuron	II		12.49	+	438.15	182.15	83.15
Triflumizole	I	B	18.08	+	346.20	73.15	278.15

Table 1. Continued

Pesticide	I or II ^{a)}	Grouping ^{b)}	RT ^{c)} (min)	MRM trace			
				ESI	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product	
						Target ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)
Triflumizole metabolite	I	B	10.39	+	295.20	73.15	215.05
Triflumuron	I	A	17.15	+	359.10	156.05	139.05
Triflusulfuron-methyl	II		14.56	+	493.25	264.20	96.25
Triforine (I, II)	I	B	13.47 13.86	+	435.00	389.95	98.15
Trinaxapac-ethyl	II		13.39	+	253.25	69.15	207.15
Trinexapac	II		8.86	+	225.20	69.10	41.15
Triticonazole	I	A	15.75	+	318.20	70.10	125.10
Vamidothion	I	B	5.89	+	288.15	146.05	118.05

^{a)} I or II: Extracted by method I or II, respectively

^{b)} Grouping: Group A or group B of pesticides extracted by method I

^{c)} RT: Retention time

後、アセトン-ヘキサン (3:17) 4 mLに溶解した。その溶液をアセトン-ヘキサン (3:17) でコンディショニングしたMega Bond Elut SI (1 g/6 mL) に全量負荷し、アセトン-ヘキサン (3:17) 20 mLで溶出した⁷⁾。次いで、溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した後、メタノール0.5 mLで定容し、ウーロン茶の試験溶液 (0.5 g 試料/mL) とした。

II法農薬については、遠心分離後、アセトニトリル層1 mLをアセトニトリル10 mLでコンディショニングしたBond Elut C18 (500 mg/6 mL) カラムに負荷し、アセトニトリル15 mLで溶出した。次いで、溶出液を窒素気流下で濃縮乾固し、アセトン-ヘキサン-トリエチルアミン (20:80:0.5) 2 mLに溶解させた。溶出液をメタノール5 mL、アセトン5 mL、ヘキサン10 mLでコンディショニングしたDiscovery SPE DSC-Si (500 mg/6 mL) カラムに負荷した後、アセトン-ヘキサン-トリエチルアミン (20:80:0.5) 10 mLでカラムを洗浄した。その後、アセトン-メタノール (1:1) 15 mLで溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した後、メタノール1 mLで定容し、これを試験溶液 (1 g 試料/mL) とした。

ただし、ウーロン茶については、このII法農薬の抽出を行ったところ、試験溶液の着色と沈殿物を生じたため、精製が不十分であると判断し、対象から除いた。

6. 妥当性評価

調製した混合標準液を、添加量が試料1 gに対し、0.1 µgおよび0.01 µgになるように添加した。青果物については試料10 gに対し、10 µg/mLを0.1 mLおよび1 µg/mLを0.1 mL添加し、玄米については試料5 gに対し、5 µg/mLを0.1 mLおよび0.5 µg/mLを0.1 mL添加し、ウーロン茶については試料2.5 gに対し、2.5 µg/mLを0.1 mLおよび0.25 µg/mLを0.1 mL添加した。

枝分かれ試験については、実施者1名が、同一の添加試料を1日1回 (2併行)、5日間実施する方法で行い、10回定量し、得られた定量値の平均値から添加濃度に対する回

収率を求めた。

各農薬の定量は、ピーク面積を用い、マトリクス検量線法で行った。

I法農薬については関東化学(株)製農薬混合溶液を5種類使用しているが、同じ成分が含まれている混合溶液がありすべてを混合できないため、2組のグループに分け試験を行った。

各成分の抽出方法、I法農薬のグループ分け、リテンションタイムおよびイオン化条件はTable 1に示した。

添加濃度が0.01 µg/gの試験溶液から得られるピークと、ブランク試料の試験溶液で調製した0.01 µg/mL標準溶液から得られるピークのS/N比が10以上であることを確認した。

0.01 µg/mL標準溶液のS/N比が10未満になった、1-ナフタレン酢酸、ジベレリン、オリザリンおよびテフルベンズロンについては、妥当性評価の対象から除外した。

ブランク試料において、評価の対象となる農薬のピーク面積が一律基準濃度の1/3以上になった以下の成分については、評価から除外した。オレンジのマラチオン、チアベンダゾールおよびイマザリル、リンゴのシベルメトリンおよびフェンプロパトリン、枝豆のイミダクロプリド、フルアジホップおよびピテルタノール、ウーロン茶のトルフェンピラド、プロフェノホスおよびフルフェノクスロン。

結果および考察

添加濃度が0.1 µg/gの試験溶液における、試料のブランク試験溶液で調製した標準溶液 (以下、マトリクス標準溶液と記す) と溶媒で調製した標準溶液 (以下、溶媒標準溶液と記す) の回収率を比較し、Table S1に示した。マトリクス標準溶液から得られたMSクロマトグラムのピーク面積 (以下、MSエリアと記す) が標準溶液より小さくなる成分と大きくなる成分があり、マトリクス効果によるイオン化抑制および促進⁸⁾の影響を受けており、すべての試料でマトリクス標準溶液に比べ溶媒標準溶液の回収率が目

Fig. 1. Extraction procedure

標値から外れている成分が多くなった。添加濃度が0.1 µg/gのマトリクス標準液および溶媒標準溶液で求めた作物別の回収率分布の成分数をTable 2にまとめた。70~120%の範囲に入った成分数の差が最も大きかった試料はオレンジ

であった。オレンジはI法農薬の試験溶液には着色が見られなかったが、II法農薬の最終試験溶液には成分由来による色素の残留が顕著に見られ、試験溶液からもマトリクス成分の影響が大きいと判断できた。その他の試料でもII

Table 2. Comparison of matrix effects in sample extracts

Sample		Mean (%)				
		>50	50–70	70–120	120–150	<150
Orange	Solvent ^{a)}	47	67	165	12	8
	MTX ^{b)}	15	19	265	0	0
Apple	Solvent ^{a)}	21	29	223	20	7
	MTX ^{b)}	12	20	268	0	0
Cabbage	Solvent ^{a)}	28	37	211	17	9
	MTX ^{b)}	15	26	261	0	0
Spinach	Solvent ^{a)}	32	35	197	17	21
	MTX ^{b)}	20	19	263	0	0
Carrot	Solvent ^{a)}	28	43	196	12	23
	MTX ^{b)}	17	16	269	0	0
Sweet potato	Solvent ^{a)}	34	38	196	15	19
	MTX ^{b)}	22	19	261	0	0
Shiitake mushroom	Solvent ^{a)}	37	43	199	17	6
	MTX ^{b)}	21	14	267	0	0
Green soybeans	Solvent ^{a)}	55	68	168	4	4
	MTX ^{b)}	23	25	251	0	0
Unpolished rice	Solvent ^{a)}	33	39	201	17	12
	MTX ^{b)}	18	20	263	1	0
Oolong tea	Solvent ^{a)}	85	36	110	1	1
	MTX ^{b)}	55	13	165	0	0

All solutions were fortified at 0.1 µg/g

^{a)} Solvent: Extraction solvent standard solution

^{b)} MTX: Matrix-matched standard solution

Table 3. Numbers of pesticides validated

Sample	Fortified (µg/g)		
	0.01	0.1	0.01 & 0.1
Orange	256/302 (85%)	259/302 (86%)	246/302 (81%)
Apple	263/302 (87%)	268/302 (89%)	259/302 (86%)
Cabbage	257/302 (85%)	260/302 (86%)	250/302 (83%)
Spinach	260/302 (86%)	263/302 (87%)	250/302 (83%)
Carrot	259/302 (86%)	268/302 (89%)	254/302 (84%)
Sweet potato	251/302 (83%)	254/302 (84%)	240/302 (79%)
Shiitake mushroom	256/302 (85%)	260/302 (86%)	249/302 (82%)
Green soybeans	248/302 (82%)	250/302 (83%)	234/302 (77%)
Unpolished rice	254/302 (84%)	258/302 (85%)	248/302 (82%)
Oolong tea	151/233 (65%)	163/233 (70%)	151/233 (65%)

Numbers positive/numbers tested (ratio)

法農薬の最終試験溶液は色素の残留が見られた。I法農薬の試験溶液の色素は除去できていたが、マトリクスの影響を受ける成分は多かった。そのため、今回はマトリクス効果を排除するため、マトリクス標準溶液と、添加回収試験溶液との比較で妥当性評価を行った。

作物別妥当性評価の集計結果をTable 3に示した。青果物では302成分中234～259成分が、両濃度でガイドラインの目標値を満たした。玄米は302成分中248成分、ウーロン茶は233成分中151成分の農薬が、両濃度でガイドラインの目標値を満たした。また、Table S2に成分ごとの

妥当性評価結果を示した。すべての試料で目標値を満たさなかった成分がベンフラカルブなど16成分あった。また、クロメプロップ、プロバクロール、ピラゾリネートおよびピラゾホスは、ウーロン茶のみが目標値を満たした。

II法農薬の測定では試験溶液による機器の汚れから測定中の感度変化も見られた。妥当性評価を行うには多数の試料を連続して測定する必要があるが、分析の開始当初と終了直前の標準液を比較すると、MSエリアが上昇していた成分が多く見られた。測定数にもよるが、44サンプルを連続して測定したところ、0.01 µg/mLでは、68成分中32

成分, 0.1 µg/mLでは, 22成分が150%以上に上昇しており, 測定感度に影響を与えていることが分かった. 分析条件に, 溶媒のみの測定をスケジュールの間に追加する, あるいはグラジエント設定でメタノール比率の高い時間を長くする操作を試みたが, 効果は見られなかった. マトリクス効果と連続測定による感度変化の2つの影響を排除するため, サロゲート物質を用いた内部標準法の導入⁹⁾や精製法を改良する必要があると考える.

当所の残留農薬検査は, 輸入作物を含め, 作物種, 産地, 採取時期が多種多様であり, 時には品種改良された新しい作物も対象とする. 違反品を発見した場合, 広く流通する前に回収命令等の行政措置を講じる必要があり, 検査の正確性のもとより迅速性も要求される. さらに, 毎年行われる検査員の人事異動の影響を最小に抑えるために, 煩雑なデータ処理を簡略化することや, なるべく習熟度の差が出ない試験法を導入することが必要である. 今回用いた前処理法は, 作業工程数が少なく, 作業効率に優れており, 作業員1名が2併行で, 抽出から最終検液に至るまでの作業を約7時間で行うことが可能であり, この検討した試験法は, これらの要件を十分に満たすものであった.

今回の妥当性評価は, ガイドラインに基づき, 試料特性に応じた分類分けに従い作物種を選択したが, 作物それぞれのマトリクス成分は未知数であり, できるだけ多くの作物種について個別に妥当性評価を行うべきであると考え.

文 献

- 1) 永井雄太郎. QuEChERSを見直してみよう. 日本農薬学会誌, **37**, 362–371 (2012).
- 2) Saka, M. Residue analysis of pesticides in food. Chromatography, **33**, 157–166 (2012).
- 3) Takamiya, M., Nishiyama, K., Kamakura, A., Nakamura, A., Takamura, N., Nishimori, K. Validation of multi-residue method of pesticides in agricultural products by automatic preparation equipment. Kochi-ken Eisei Kenkyusyo Nenpo, **57**, 47–64 (2011).
- 4) Watanabe, M., Ueno, E., Inoue, T., Ohno, H., Ikai, Y., Morishita, T., Oshima, H., Hayashi, R. Simultaneous determination of pesticide residues in agricultural products by LC-MS/MS, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), **54**, 14–24 (2012).
- 5) Takatori, S., Yamamoto, H., Fukui, N., Yamaguchi, S., Kitagawa, Y., Kakimoto, Y., Osakada, M., Okihashi, M., Kajiya, K., Obana, H. Validation study on a rapid multi-residue method for determination of pesticide residues in vegetables and fruits by LC-MS/MS, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), **54**, 237–249 (2013).
- 6) Ban, S., Namikawa, M., Deguchi, F., Wada, Y., Orito, T., Banno, Y., Kawakami, M. Validation on simultaneous determination of pesticide residues in agricultural products by modified QuEChERS method. Kyoto-shi Eiseikogai Kenkyusyo Nenpo, **76**, 75–88 (2010).
- 7) 岩屋あまね, 下堂園栄子, 福司山郁恵, 榎元清美, 佐久間弘匡. 茶の残留農薬一斉分析における精製法の検討. 鹿児島県環境保健センター所報, **11**, 102–108 (2012).
- 8) Mochizuki, N. Problems on LC-MS/MS analysis to ensure food safety. Yakugaku Zasshi, **131**, 1019–1025 (2011).
- 9) Ueno, E. Application of surrogate for pesticide residues analysis in foods., Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **49**, J309–J313 (2008).