

残留農薬検査における液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) の感度変動事例について

徳島県立保健製薬環境センター

中村 哲也・富永 智子・岩佐 智佳

Sensitivity Fluctuation in Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) during Pesticide Residue Analysis

Tetsuya NAKAMURA, Tomoko TOMINAGA and Chika IWASA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

ポジティブリスト制度により、残留農薬等の分析項目は大幅に増加し、測定機器には高い感度と選択性が求められる。本研究は、当センターにおける液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）の使用状況を後方視的に調査し、測定感度の経時的な変動を評価することを目的とした。調査対象は、当センターで実施された残留農薬検査における、農薬標準液の測定データ（35 化合物、各 0.05 µg/mL）とした。調査期間は、2018 年 4 月から 2018 年 12 月とし、期間内に LC-MS/MS の修繕が実施された。修繕前後における農薬標準液の感度は、35 化合物中、21 化合物で統計学的有意差が認められた。感度変動の要因として、修繕時のカラム交換が挙げられるが、標準液の安定性など、他の要因も考慮される。検査の信頼性を確保するためには、当該検査のみならず、経時的な変動や、標準液の安定性を再評価する必要性が示唆された。

Key words : 残留農薬 pesticide residue, 液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 liquid chromatograph tandem mass spectrometer, 感度変動 sensitivity fluctuation

I はじめに

ポジティブリスト制度¹⁾は、一定量以上の農薬等が残留する食品の販売等を原則として禁止する制度として、2006年に施行された。ポジティブリスト制度下において、残留農薬等の分析項目は大幅に増加し、多成分一斉分析法が必要とされており、ガスクロマトグラフ・質量分析計、ならびに、LC-MS/MSを用いた一斉分析法が厚生労働省から通知されている²⁾。

検査機関においては、Good Laboratory Practiceに基づく業務管理が求められる。機器分析については、日常的に機器の状態を把握する必要がある。繰り返して使用する場合、その感度変動にも留意する必要がある。これまでに、LC-MS/MSを用いた定量分析については、マトリックス効果によるイオン

化抑制に基づく感度低下が知られている³⁾。しかし、機器の使用実態や、経時的な感度変動については、あまり報告されていない。

本県における食品中の残留農薬検査は、「徳島県食品衛生監視指導計画」に基づき実施され、当センターでは、主に農産物、農産物加工品を対象とした残留農薬検査を通年実施している。本研究は、当センターにおけるLC-MS/MSの使用状況を後方視的に調査し、測定感度の経時的な変動を評価することを目的とした。

II 方法

1 調査期間、対象農薬

当センターで実施された残留農薬検査における、LC-

MS/MS の測定データを後方視的に調査した。調査対象期間は、2018 年 4 月から 2018 年 12 月とした。ただし、測定中にエラーが生じ、再測定されたデータは除外した。LC-MS/MS の修繕は、2018 年 8 月中旬から 9 月上旬にかけて実施され、ロータリーポンプとカラムが新品に交換された。

LC-MS/MS による分析対象農薬は、35 化合物である（表 1）。

2 試薬類

（1）農薬標準品

残留農薬試験用として、富士フイルム和光純薬工業株式会社、関東化学株式会社、Dr. Ehrenstorfer 社、Sigma-Aldrich 社から市販されているものを用いた。

（2）溶媒

標準原液の調製及び希釈には、関東化学株式会社のアセトン（残留農薬試験用）、ヘキサン（残留農薬試験用）、メタノール（高速液体クロマトグラフィー用）を用いた。

（3）器具

標準原液及び混合標準液の調製には、ガラス製のメスフラスコとパスツールピペットを使用した。検量線用混合標準液の調製には、褐色試験管（容量 10 mL）を使用した。なお、ガラス製器具は、使用前にヘキサンで洗浄し、乾燥させてから用いた。パスツールピペット専用ピペッターとして、ACURA 835（Socorex 社）を使用した。測定用バイアルは、ガラス製の透明バイアル（容量 2 mL）を使用した。標準原液及び混合標準液の保存には、有機溶媒保存瓶（褐色ガラス製、内栓付、容量 20-50 mL）を用いた。

3 農薬標準液の調製、保存条件

農薬標準品をそれぞれアセトン（ピメトロジンは、メタノール）に溶解し、1,000 µg/mL（テフルベンズロン、ジフルベンズロンは 200 µg/mL）の標準原液を調製した。各標準原液を 0.5 mL ずつ（テフルベンズロン、ジフルベンズロンは各 2.5 mL）混合した後、アセトンで 50 mL に定容し、各成分 10 µg/mL の混合標準液を調製した。この混合標準液の溶媒をメタノールに置換した後、検量線用混合標準液として、0.005、0.01、0.02、0.05 µg/mL の濃度に調製した。標準原液、混合標準液ともに、褐色の保存瓶に入れ、冷蔵庫（9℃以下）で保管した。標準原液は、年度当初に調製した。混合標準液は、検体受け入れ前に適宜調製した。検量線用混合標準液は、測定日当日に調製した。

4 分析条件

検体の前処理は、先行研究⁴⁾に準じた一斉分析法を標準作業書で規定し、運用した。検体と検量線用混合標準液は、同一シーケンスで測定した。検体及び検量線用混合標準液の測定前後には、ブランクとしてメタノールを測定した。

（1）装置

LC 部：資生堂社製 NANOSPACE SI-2

MS 部：サーモエレクトロン株式会社製 TSQ Quantum Ultra

（2）測定条件

【LC 部】

カラム：CAPCELL PACK C18 AQ（2.0 mm I.D.×150 mm，粒子径 5 µm）

カラム温度：40℃

移動相：（A）10 mM 酢酸アンモニウム水溶液，（B）メタノール

グラジエント A:B（%）：95:5（0 min）→（15 min）→5:95（10 min）→（0.1 min）→95:5（9.9 min）

流速：0.20 mL/min

注入量：5 µL

【MS 部】

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法

イオンスプレー電圧：3000 V（+）/2500 V（-）

コリジョンガス圧：1.0 mTorr

Sheath Gas Pressure：60 mTorr

Aux Gas Pressure：15 mTorr（+），5 mTorr（-）

Capillary Temperature：300℃

測定モード：Selected Reaction Monitoring（SRM），モニターイオン，コリジョンエネルギー（表 1）

5 評価項目

（1）農薬標準液調製後の経過

測定日、標準原液調製日から測定日までの経過日数、混合標準液調製日から測定日までの経過日数を調査した。測定日から昇順に測定番号を付記した。

（2）農薬標準液の経時的感度変動比

検量線用混合標準液 0.05 µg/mL のピーク面積の経時的な変動を評価した。感度変動比は、次式で算出した。

感度変動比 = 各測定番号のピーク面積 / 測定番号 1 のピーク面積

（3）修繕前後における農薬標準液の感度変動

修繕前後における検量線用混合標準液 0.05 µg/mL のピーク面積の中央値を比較した。統計学的検定は、データが正規分布に従っていない場合にも使用可能な、Mann-Whitney の U 検定を用い、統計学的有意水準は 5%とした。解析ソフトは、EZR を用いた⁵⁾。

表1 分析対象農薬及び測定条件

農薬化合物	ブレイカーサ	定量プロダ	コリジョン
	ーイオン (<i>m/z</i>)	クトイオン (<i>m/z</i>)	エネルギー (eV)
アセフェート	184.0	143.0	10
メソミル	163.0	88.0	11
チアメトキサム	291.9	211.0	14
ピメトロジン	218.0	105.0	18
クロチアニジン	250.0	169.0	15
イミダクロプリド	256.0	209.0	21
アセタミプリド	223.0	126.0	20
シモキサニル	216.1	128.1	12
カルバリル	202.0	145.0	11
チオジカルブ	355.0	108.0	15
ジウロン	233.0	72.2	25
フェノブカルブ	225.2	95.1	20
アゾキシストロビン	404.0	372.1	15
リニュロン	249.0	160.0	17
ジメトモルフ	388.0	301.0	20
トリフルミゾール代謝物	295.0	215.0	20
クロマフェノジド	395.2	175.0	16
メバニピリム	224.2	106.1	21
シアゾファミド	325.0	108.0	14
ジフルベンズロン	311.0	158.0	15
テブフェノジド	353.2	133.1	17
アラニカルブ	400.0	150.0	18
ベンシクロン	329.2	125.0	32
インドキサカルブ	528.0	203.0	35
トリフルミゾール	346.0	278.0	11
フェンビロキシメート	422.2	366.1	15
スピノシン A	732.5	142.0	32
スピノシン D	746.5	142.0	32
シラフルオフェン	426.2	287.1	16
フルスルファミド	412.8	170.8	36
イプロジオン	328.0	243.0	19
テフルベンズロン	379.0	195.9	21
ルフェスロン	509.0	325.8	16
フルフェノクスロン	487.0	303.9	17
クロルフルアズロン	538.0	517.8	16

Ⅲ 結果

1 農薬標準液調製後の経過

調査期間中、106 検体を受け入れ、14 回に分けて残留農薬検査が実施された。ただし、2018 年 6 月 12 日測定分は、測定中にエラーが生じたため、調査対象から除外した。従って、本研究における調査対象を、測定番号 1～13 とした（表 2）。

標準原液は、2018 年 4 月 6 日に調製された。標準原液調製日から測定日までの経過日数は、最小 14 日、最大 256 日であった。混合標準液調製日から測定日までの経過日数は、最小 1 日、最大 20 日であった。測定番号 1～7 は修繕前、測定番号 8～13 は修繕後に測定された。

表 2 農薬標準液調製後の経過

測定 番号	測定日	標準原液 調製後（日）	混合標準液 調製後（日）
1	2018/4/20	14	11
2	2018/4/25	19	16
3	2018/5/17	41	3
4	2018/5/30	54	16
5	2018/6/19	74	11
6	2018/7/18	103	6
7	2018/8/7	123	4
8	2018/9/12	159	1
9	2018/10/10	187	5
10	2018/10/23	200	18
11	2018/11/6	214	5
12	2018/12/4	242	6
13	2018/12/18	256	20

2 農薬標準液の経時的感度変動比

検量線用混合標準液 0.05 µg/mL のピーク面積の経時的な感度変動比を示した（表 3）。ジフルベンズロン及びイプロジオンは、修繕後、大幅に感度上昇し、それぞれ最大 18.17、68.61 倍まで上昇した。一方、テブフェノジド及びフルスルファミドは、修繕後、大幅に感度低下し、それぞれ最小 0.06、0.03 倍まで低下した。

3 修繕前後における農薬標準液の感度変動

修繕前後における検量線用混合標準液 0.05 µg/mL のピーク面積の中央値を比較した（表 4）。35 化合物のうち、21 化合物で統計学的有意に感度変動が認められた。有意差が認められた 21 化合物のうち、19 化合物で感度上昇、2 化合物で感度低下が認められた。14 化合物については有意差が認められなかったが、8 化合物で感度上昇、6 化合物で感度低下の傾向を示した。

表3 農薬標準液の経時的感度変動比

	各測定番号における感度変動比 ^{a)}													最大	最小
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
アセフェート	1.00	1.12	0.91	1.06	1.08	1.00	1.03	1.36	1.61	1.68	2.42	1.95	1.95	2.42	0.91
メソミル	1.00	1.03	1.15	1.31	1.25	1.17	1.20	1.35	1.25	1.30	1.49	1.39	1.48	1.49	1.00
チアメトキサム	1.00	0.88	1.14	1.19	1.11	1.30	1.09	3.38	1.48	1.91	1.63	1.57	1.50	3.38	0.88
ピメトロジン	1.00	1.00	1.52	1.92	2.17	2.36	2.27	0.43	1.10	1.30	1.34	1.45	1.54	2.36	0.43
クロチアニジン	1.00	0.98	0.85	0.95	1.13	1.17	1.23	1.21	1.36	1.41	2.06	1.72	1.62	2.06	0.85
イミダクロプリド	1.00	1.07	0.92	1.10	1.20	1.36	1.29	1.43	1.55	1.63	2.03	1.77	1.56	2.03	0.92
アセタミプリド	1.00	1.06	0.99	1.17	1.18	1.15	1.11	1.40	1.37	1.49	1.84	1.55	1.59	1.84	0.99
シモキサニル	1.00	1.13	1.30	1.26	1.53	1.39	1.39	1.04	1.17	1.30	1.58	1.69	1.56	1.69	1.00
カルバリル	1.00	0.95	1.12	1.29	1.25	1.32	1.00	1.22	1.37	1.30	1.38	1.46	1.40	1.46	0.95
チオジカルブ	1.00	1.01	0.84	1.02	1.23	1.42	1.47	1.44	1.35	1.31	1.84	1.59	1.66	1.84	0.84
ジウロン	1.00	1.00	0.90	1.12	1.17	1.14	1.21	1.10	1.28	1.29	1.74	1.43	1.50	1.74	0.90
フェノブカルブ	1.00	1.02	1.05	1.18	1.16	1.21	1.20	3.03	3.07	1.13	3.43	1.30	1.35	3.43	1.00
アゾキシストロビン	1.00	1.00	1.33	1.43	1.02	1.18	1.10	0.33	0.37	1.06	0.43	1.29	1.25	1.43	0.33
リニュロン	1.00	0.85	0.94	0.96	1.13	1.20	1.23	0.93	1.00	1.19	1.38	1.37	1.38	1.38	0.85
ジメトモルフ	1.00	1.47	1.61	1.19	0.88	0.92	1.27	1.23	1.14	1.73	1.19	1.23	1.27	1.73	0.88
トリフルミゾール代謝物	1.00	0.93	1.00	1.22	1.14	1.23	1.29	1.03	1.02	1.05	1.26	1.17	1.25	1.29	0.93
クロマフェノジド	1.00	0.94	0.96	1.06	1.13	1.14	1.17	1.00	1.05	1.17	1.30	1.25	1.30	1.30	0.94
メパニピリム	1.00	0.87	1.07	1.18	1.19	1.22	1.22	1.06	1.07	1.03	1.08	1.17	1.25	1.25	0.87
シアゾファミド	1.00	0.86	0.79	0.91	1.11	1.14	1.10	0.97	1.01	1.11	1.47	1.11	1.20	1.47	0.79
ジフルベンズロン	1.00	0.99	0.88	0.99	1.20	1.24	1.23	12.90	13.38	16.04	18.17	17.31	18.10	18.17	0.88
デブフェノジド	1.00	0.92	0.85	0.96	1.00	0.98	1.03	0.06	0.07	0.07	0.09	0.08	0.09	1.03	0.06
アラニカルブ	1.00	1.09	1.25	1.42	1.13	1.36	1.16	1.08	1.14	1.08	1.15	1.34	1.30	1.42	1.00
ベンシクロン	1.00	0.97	1.07	1.21	1.11	1.18	1.21	1.17	1.07	1.08	1.00	1.24	1.34	1.34	0.97
インドキサカルブ	1.00	0.79	0.81	0.89	1.04	0.97	1.10	1.22	0.91	1.01	1.37	1.05	1.09	1.37	0.79
トリフルミゾール	1.00	0.87	0.93	1.03	1.05	1.08	1.09	0.91	0.95	0.97	1.29	1.10	1.05	1.29	0.87
フェンピロキシメート	1.00	0.96	0.71	0.86	0.90	1.08	0.91	1.33	1.27	1.42	1.68	1.44	1.49	1.68	0.71
スピノシン A	1.00	0.83	0.64	0.86	1.00	1.03	0.98	0.94	1.18	1.16	0.97	1.52	1.57	1.57	0.64
スピノシン D	1.00	0.81	0.48	0.69	0.92	0.87	0.93	0.91	1.04	1.09	1.12	1.23	1.38	1.38	0.48
シラフルオフェン	1.00	0.91	0.82	0.77	0.94	1.03	0.89	1.22	1.16	1.21	1.55	1.32	1.41	1.55	0.77
フルスルファミド	1.00	0.82	0.69	0.95	1.03	0.82	0.90	0.07	0.05	0.03	0.05	0.05	0.06	1.03	0.03
イプロジオン	1.00	0.63	0.67	1.04	0.88	0.92	0.56	68.61	60.46	48.38	64.50	56.78	60.88	68.61	0.56
デフルベンズロン	1.00	0.83	0.73	0.89	0.87	0.87	0.82	1.23	0.93	0.91	1.24	0.91	0.99	1.24	0.73
ルフエスロン	1.00	0.83	0.72	0.81	0.87	0.86	0.87	1.13	0.92	0.96	1.23	1.00	1.15	1.23	0.72
フルフェノクスロン	1.00	0.87	1.06	0.87	0.80	0.91	0.89	1.36	0.94	1.05	1.27	1.05	1.30	1.36	0.80
クロルフルアズロン	1.00	0.82	0.74	0.90	0.87	0.90	0.87	1.45	1.10	1.04	1.46	1.18	1.29	1.46	0.74

a) : 測定番号 1～7 は修繕前, 測定番号 8～13 は修繕後に測定された。感度変動比は、各測定番号のピーク面積を測定番号 1 のピーク面積で除して求めた。

表4 修繕前後における農薬標準液の感度変動

	修繕前 (n=7)	修繕後 (n=6)	p 値
アセフェート	1,398,846	2,466,703	0.001*
メソミル	1,558,635	1,831,850	0.008*
チアメトキサム	876,145	1,259,132	0.001*
ピメトロジン	5,414,418	3,709,907	0.18
クロチアニジン	1,026,914	1,555,146	0.002*
イミダクロプリド	919,966	1,329,717	0.001*
アセタミプリド	2,896,889	3,949,540	0.001*
シモキサニル	650,182	715,528	0.37
カルバリル	1,950,172	2,390,595	0.01*
チオジカルブ	575,943	854,929	0.02*
ジウロン	1,219,290	1,472,656	0.01*
フェノブカルブ	5,451,027	10,297,172	0.01*
アゾキシストロビン	13,863,005	9,393,042	0.30
リニュロン	762,637	976,150	0.23
ジメトモルフ	3,255,290	3,363,854	0.53
トリフルミゾール代謝物	558,359	546,970	0.63
クロマフェノジド	18,301,364	21,000,724	0.10
メバニピリム	1,278,494	1,167,651	0.84
シアゾファミド	2,850,150	3,170,197	0.14
ジフルベンズロン	918,891	15,319,705	0.001*
テブフェノジド	14,287,639	1,101,577	0.001*
アラニカルブ	1,053,591	1,038,910	0.73
ペンシクロン	10,413,489	10,536,773	0.73
インドキサカルブ	537,984	593,073	0.07
トリフルミゾール	8,862,268	8,685,818	0.84
フェンビロキシメート	10,160,147	16,019,583	0.001*
スピノシン A	5,284,718	6,278,372	0.07
スピノシン D	988,124	1,263,020	0.008*
シラフルオフェン	5,927,931	8,240,998	0.001*
フルスルファミド	650,677	38,917	0.001*
イプロジオン	29,683	2,044,152	0.001*
テフルベンズロン	254,158	280,506	0.01*
ルフェスロン	322,510	400,549	0.008*
フルフェノクスロン	43,342	56,798	0.01*
クロルフルアズロン	625,055	885,352	0.001*

修繕前後におけるピーク面積の中央値を比較した。

* : p < 0.05

IV 考察

今回、当センターにおける残留農薬検査について、LC-

MS/MSの測定感度を経時的に評価した。その結果、カラム交換を含む修繕後、多くの化合物で測定感度の上昇が認められた。一方、大幅な感度低下が認められた化合物もあった。

農薬標準液の感度変動の要因として、機器に起因することが考えられる。残留農薬検査では、夾雑物等によるカラム、イオン源、質量分析管への汚れの吸着が起こりうる。当センターでは、機械器具保守管理標準作業書の規定に基づき、指定業者による定期点検を年1回行い、イオン化部・質量分析ユニットの分解、部品洗浄又は交換を実施している。今回の修繕は、定期点検とは異なり、ロータリーポンプ及びカラム交換が行われた。感度変動の主な要因として、カラムを新品に交換したことが挙げられる。本研究では、修繕後に多くの化合物で測定感度の上昇が認められた。一方、大幅な感度低下が認められた化合物もあり、化合物によって異なる結果となった。カラムの使用状況や、化合物の物性に起因すると思われるが、詳細な機序の特定には至っていない。なお、先行研究においても、農薬混合標準液の測定データを用いて、成分ごとのピーク面積の変動を観察した結果、その変動率が大きかったことが報告されている⁶⁾。

感度変動に係る別の要因として、標準液の安定性が挙げられる。標準液の安定性については、一般論として、6か月程度保存(5℃以下)しても問題はないとされる一方、頻繁に使用する標準液は2週間～1か月を保存期間として、それ以上は保存しないようにするとの記述もあり、一定の見解はない⁷⁾。当センターでは、標準原液の使用期限を1年間、混合標準液の使用期限は、標準原液を希釈後、概ね2～3週間としている。本研究では、標準原液は調製後、最大256日まで、混合標準液は、調製後、1日から20日の範囲で使用されたことが確認された。標準液の安定性については、当センターにおける先行研究⁸⁾を参考に、使用期限設定がなされている。しかし、先行研究で対象とした農薬標準品と、本研究で対象としたものは完全に一致しておらず、実運用可能なレベルでの検証はなされていない。他県では、農薬標準原液(濃度1,000 µg/mL、冷凍保存)の安定性を検証し、有効期限を1年間と設定されている⁹⁾。感度変動に関する要因から、標準液の安定性を除外するためには、科学的根拠をもって保存期間を設定する必要がある。検査結果の信頼性を向上させるため、標準液の安定性についても、更に検討を要すると考えられる。

本研究の限界として、単一施設での研究であること、後方視的に測定データのみを扱った研究デザインであることが挙げられる。本研究における農薬標準液は、実際の検体と同一シーケンスで測定された。このため、農薬標準液のみを測定する実験とは異なり、感度に影響する様々な因子を全て考慮できていない可能性がある。例えば、混合標準液の希釈には、

パスツールピペット専用ピペッターを用いたが、手技により採取量に誤差が生じていたことが考えられる。今後、新たに試験を計画する場合、採取誤差確認試験⁸⁾の実施の検討が必要である。

V 結論

当センターで実施された残留農薬検査における、LC-MS/MS の経時的な感度変動事例を示した。検査の信頼性を確保するためには、当該検査のみならず、経時的な感度変動や、標準液の安定性等について再評価する必要性が示唆された。

参考文献

- 1) 厚生労働省：食品中の残留農薬等,
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/zanryu/index.html (2019年9月19日現在)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001 号：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法、平成 17 年 1 月 24 日 (2005)
- 3) 望月直樹：食の安全における LC-MS/MS 分析の問題点, 薬学雑誌, **131**(7), 1019-1025 (2011)
- 4) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 他：固相抽出法を用いた農産物中残留農薬の GC/MS による多成分一斉分析, 食品衛生学雑誌, **37**(6), 351-362 (1996)
- 5) Y Kanda : Investigation of the freely available easy-to-use software ‘ EZR ’ for medical statistics, Bone Marrow Transplantation, **48**, 452-458 (2013)
- 6) 生活衛生部門：残留農薬の一斉分析におけるデータ解析の客観性確保について, 京都市衛生公害研究所年報, **76** (2010)
- 7) 日本農薬学会発行：残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ 改訂 4 版 2018, **46**, 株式会社城北印刷所, 東京 (2018)
- 8) 堤泰造, 浅川和宏, 湯浅智子, 他：残留農薬検査における業務管理について(その1)農薬標準品の管理状況, 徳島県保健環境センター年報, **24**, 3-7 (2006)
- 9) 湯谷亜衣, 米澤友紀子, 田邊奈都子, 他：試験精度向上に向けた農薬、動物用医薬品標準原液の安定性評価, 鳥取県衛生環境研究所報, **57**, 65-73 (2016)