

[ノート]

食肉中のオキサベトリニル, トリチコナゾール, フェノトリン,
フルフェナセットおよびプロメトリンにおける
残留農薬一斉分析法の適用性

松岡 智郁* 秋山 由美 三橋 隆夫

Application of Multi-residue Analytical Method for Oxabetrinil,
Triticonazole, Phenothrin, Flufenacet and Prometryn
in Meat Products

Tomofumi MATSUOKA*, Yumi AKIYAMA and Takao MITSUHASHI

*Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

The applicability of multi-residue analytical method for 5 pesticides (oxabetrinil, triticonazole, phenothrin, flufenacet and prometryn) in meat products was verified. Validation tests were performed on beef, chicken and pork muscles fortified at 0.01 and 0.10 $\mu\text{g/g}$ in accordance with the guideline of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. All pesticides were confirmed to have limits of quantitation of 0.01 $\mu\text{g/g}$, and found to conform to the guideline (recovery: 70-120%, repeatability: <15%, intermediate precision: <20%) in all muscles. These results show that this method is useful as a routine analysis for these 5 pesticides.

I はじめに

ポジティブリスト制度による残留農薬等の規制が2006年5月より施行され、農産物のみならず畜水産物に対しても多数農薬の残留基準値が定められた。これに伴い、厚生労働省より「GC/MSおよびLC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）」（以下、通知法とする）が通知され¹⁾、また、地方衛生研究所をはじめとする国内の検査機関から畜水産物中の残留農薬多成分一斉分析法が報告されるようになった²⁻⁴⁾。我々は食肉中に残留する幅広い極性の農薬を高感度に測定できるスクリーニング法を開発し⁵⁾、基準値が設定されている187成分（代

謝物を含む）について国産食肉中の残留農薬検査に適用してきた。また、厚生労働省より示された「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」⁶⁾（以下、ガイドラインとする）に従って妥当性評価を行い、スクリーニング法の信頼性確保に努めてきた⁷⁾。

兵庫県が推進する食の安全安心の確保には、さらなる検査体制の強化が必要であり、そのためには分析対象項目の拡大が要求される。今回、拡大を検討した5成分（オキサベトリニル、トリチコナゾール、フェノトリン、フルフェナセットおよびプロメトリン）は、とうもろこしや小麦、水稻等の栽培時に除草剤や殺菌剤、薬害軽減剤として、また貯蔵時の殺虫剤として国内外で広く使用されている。これらが不適切に使用されると、飼料を介して家畜動物に残留する可能性があるため、日常的な監視が必要である。そこで、これら5成分についてスクリーニング法の適用性をガイドラインに従って検討したとこ

健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究センター
健康科学研究センター
健康科学部 松岡 智郁

る、すべてに適用できたので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

平成20～22年に兵庫県内で市販されていた国産の牛、鶏および豚の筋肉部位を用いた。

2. 試薬および試液

農薬標準品：オキサベトリニルおよびフェノトリンは Dr. Ehrenstorfer GmbH 製を、トリチコナゾールは林純薬工業(株)製を、フルフェナセトおよびプロメトリンは関東化学(株)製を用いた。これらの構造式および各筋肉における残留基準値を Fig.1 に示した。各農薬 25mg を精秤後、アセトンで溶解し、全量を 100mL とした（標準原液：0.25mg/mL）。これらをアセトンで希釈して添加回収実験用の標準混合溶液を、さらにアセトン-*n*-ヘキサン（1:1）溶液で用時希釈して GC/MS 分析用標準溶液を調製した。また、GC/MS 分析用標準溶液をアセトニトリルに置換したものを LC/MS 分析用標準溶液として使用した。

内標準品：トリフェニルリン酸（以下、TPP とする）は和光純薬工業(株)を、エチルフェニルウレア（以下、EPU とする）は Frinton Laboratories Inc.社製を用いた。それぞれ 25mg を精秤後、アセトンで溶解して 0.25mg/mL の内標準原液を調製した。この内標準原液を希釈して、TPP が 5μg/mL、EPU が 10μg/mL となるよう混合内標準溶液を調製した。

アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、シクロヘキサンおよび *n*-ヘキサンは和光純薬工業(株)または関東化学(株)製の残留農薬試験用を用いた。アセトニトリルは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用を、その他の試薬は特級品を用いた。

固相抽出用ミニカラム：PSA ミニカラムは Isolute PSA (500mg, 6mL, Biotage 社製) を用い、アセトン-シクロヘキサン（1:3）溶液 10mL でコンディショニングした。シリカゲルミニカラムは Sep-Pak Vac RC Silica (500mg, 12mL, Waters 社製) を用い、*n*-ヘキサン 10mL でコンディショニングした。

3. 装置および測定条件

GPC 装置：GL Sciences 社製 G-Prep GPC8100

GC/MS 装置：Agilent 社製 6890N 型ガスクロマトグラフおよび 5973inert 型質量分析計

LC/MS 装置：Agilent 社製 1100 型液体クロマトグラフおよび質量分析計 (SL)

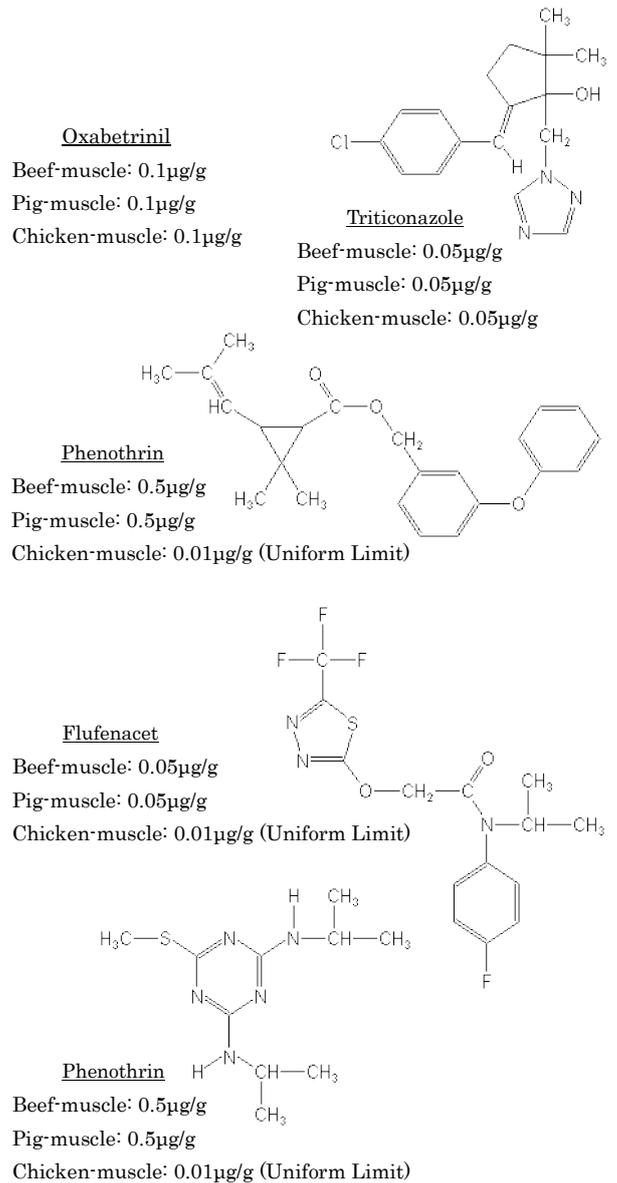


Fig.1 Structural formulas and maximum residue limits of 3 kinds of muscles for 5 pesticides.

測定条件は既報に従った⁵⁾。ただし、LC/MS 用分析カラムは Ascentis Express C18 (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm; Sigma-Aldrich) を用いた。

4. 試験溶液の調製

既報に従い⁵⁾、Fig. 2 に示す手順で行った。

5. 妥当性評価

ガイドラインに従い⁶⁾、下記の 3 項目が目標値等に適合しているかを評価した。

1) 定量限界

5 成分の残留基準値の中には一律基準値 (0.01μg/g) を含むものがあるため、全ての農薬に対して 0.01μg/g

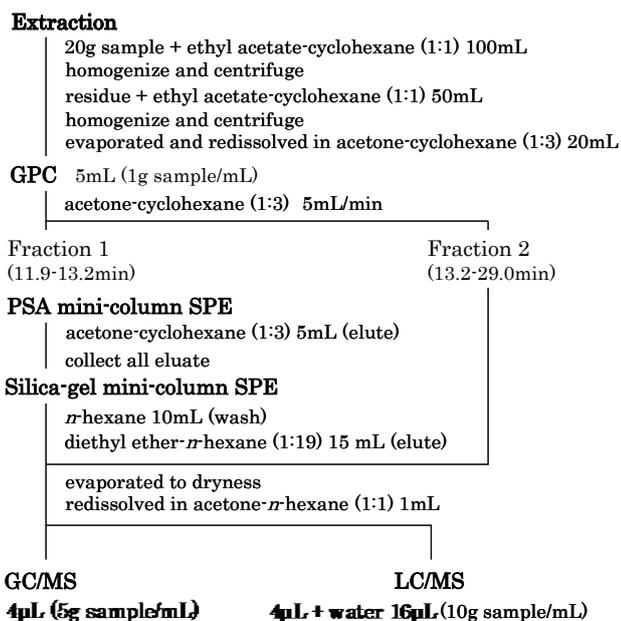


Fig.2 Sample preparation method for pesticides in meat products

を定量限界とした。各ブランク試料に添加した 0.01μg/g 相当の各農薬ピークが S/N ≥ 10 であることを確認した。

1) 選択性

ブランク試料を分析し、定量を妨害するピークの有無を確認した。妨害ピークを認めた場合は、そのピーク面積が定量限界 (0.01μg/g) に相当するピーク面積の 1/3 未満であることを確認した。

2) 真度 (回収率) および精度

0.01μg/g および 0.10μg/g 相当を添加した試料につ

いて、分析者 1 名が 1 日に 2 試行、5 日間の枝分かれ実験 ($n=10$) を実施、もしくは分析者 2 名がそれぞれに 1 日に 2 試行、3 日間の枝分かれ実験 ($n=12$) を実施した。標準溶液は溶媒標準溶液およびマトリックス標準溶液を用いた。得られた結果 (真度) を一元配置分散分析により解析し、併行精度および室内精度を算出した。これらの値が各濃度における目標値に適合しているかを確認した。

III 結果および考察

1. 妥当性評価

1) 定量限界

今回検討した 5 成分全てが GC/MS で感度良く測定できた。またトリチコナゾール、フルフェナセットおよびプロメトリンについては LC/MS の正イオン化モードでも測定が可能であった。それらの保持時間、モニターイオンおよび検出限界値を Table 1 に示した。

定量限界については全試料において、ブランク試料に添加した 0.01μg/g 相当の各ピークが全て S/N ≥ 10 であることを確認でき、一律基準を判断する分析が可能であることがわかった。

2) 選択性

プロメトリンは GC/MS において m/z 241.1 のイオンが最も感度よく観測できたが、牛-筋肉において妨害ピークを認めたため、確認用イオンである m/z 184.1 で定量を行った。鶏-筋肉および豚-筋肉では妨害ピークの影響を受けることなく m/z 241.1 での測定が可能であった。

Table 1 GC/MS and LC/MS parameters and LOD

Pesticide	Parameters			LOD (ng)
	Retention time (min)	Monitor ion Target	Qualifier	
GC/MS				
Oxabetrinil	15.27	73.1	103.0	0.057
Prometryn	17.30	241.1	184.1	0.005
Flufenacet	19.77	151.0	210.9	0.004
IS (Triphenylphosphate)	28.25	326.1	170.0	
Phenothrin 1 ^{a)}	29.99	123.1	183.1	
Phenothrin 2 ^{a)}	30.15	123.1	183.1	0.005
Triticonazole	30.15	235.1	299.1	0.011
LC/MS (Positive ionization mode)				
		(Frag.100V)	(Frag.200V)	
Triticonazole	10.20	318.0	70.2	0.021
Prometryn	10.94	242.1	242.1	0.005
Flufenacet	11.91	364.0	152.0	0.022
IS (Triphenylphosphate)	12.89	327.1	327.1	

a): Standard is a mixture of isomers.

IS: Internal standard. Frag.: Fragmentor voltage.

LOD: Limits of Detection defined by S/N ≥ 3.

0.02 and 0.04 ng is equivalent to 0.001 μg/g in meat product by GC/MS and LC/MS, respectively.

その他の農薬は全試料において、定量限界に相当するピーク面積の 1/3 を超す妨害ピークは GC/MS と LC/MS の両方で認められず、良好な結果が得られた。

3) 真度および精度

ガイドラインにおける 0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.10 $\mu\text{g/g}$ 添加時の真度および精度の目標値を Table 2 に示した。また、各試料における枝分かれ実験の結果を Table 3 および Table 4 に示した。

フルフェナセットは GC/MS 分析において、牛および豚-筋肉のマトリックスの影響により感度が低下した。このため溶媒標準溶液での真度が 53.0~67.3%と

低く、室内精度も 9.9~15.9%とばらつきが大きくなった。一方、マトリックス標準溶液で算出すると、真度は 88.7~108.1%と改善され、全試料においてガイドラインの目標値を満たすことができた。また、LC/MS ではマトリックスの影響は小さく、溶媒標準溶液での真度が 80.4~104.7%、室内精度が 6.7~10.3%と良好な結果を得ることができた。その他の農薬は溶媒標準溶液での真度が 88.6~119.3%、併行精度が 0.7~8.0%、室内精度が 1.4~10.9%と全試料においてガイドラインの目標値を満足しており、本分析法を適用できることが確認できた。

Table 2 Acceptance criteria for recovery and precision

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	number of trials	Mean recovery (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)
0.01	≥ 5	70-120	< 25	< 30
0.10	≥ 5	70-120	< 15	< 20

Table 3 Validation results for 5 pesticides (solvent standard)

Pesticide	Beef ($n=12$)			Chicken ($n=10$)			Pork ($n=12$)		
	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)
(fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$)									
<u>GC/MS</u>									
Flufenacet	<u>57.6</u>	7.5	11.4	85.4	4.4	9.7	<u>57.9</u>	6.0	15.5
Oxabetrinil	97.6	1.1	2.5	110.2	4.3	7.2	113.6	2.0	6.5
Phenothrin	98.9	1.4	1.4	103.8	3.4	5.1	88.6	4.5	4.5
Prometryn	93.9	0.7	1.9	109.2	3.8	4.2	94.3	5.7	9.3
Triticonazole	111.0	1.4	5.1	117.6	3.2	6.0	100.8	3.6	4.8
<u>LC/MS</u>									
Flufenacet	85.7	6.4	10.3	98.5	5.5	6.7	88.9	8.5	10.1
Prometryn	95.3	6.1	6.1	103.9	4.4	9.5	98.0	4.3	8.6
Triticonazole	90.3	4.0	7.2	102.2	4.4	10.9	89.9	6.1	7.4
(fortified at 0.10 $\mu\text{g/g}$)									
<u>GC/MS</u>									
Flufenacet	<u>67.3</u>	7.2	9.9	80.5	2.4	5.5	<u>53.0</u>	12.7	15.9
Oxabetrinil	106.1	3.3	4.0	98.4	5.4	6.7	100.9	4.5	6.1
Phenothrin	91.2	4.8	5.1	107.6	3.3	3.7	102.1	2.7	5.1
Prometryn	99.9	6.2	7.6	98.7	3.6	7.6	94.3	2.2	6.5
Triticonazole	107.2	2.9	7.7	104.9	3.5	6.8	119.3	4.5	8.5
<u>LC/MS</u>									
Flufenacet	80.4	5.5	7.8	104.7	4.7	7.0	98.7	4.9	6.8
Prometryn	94.8	4.2	6.2	101.0	3.3	5.5	95.5	2.4	3.9
Triticonazole	101.6	8.0	8.0	108.5	4.4	8.3	103.6	5.2	9.2

a): Recoveries were calculated with solvent standard.

Bold and italic font with underline: The results didn't meet the acceptance criteria of guideline.

Inter. precision: Intermediate precision.

Table 4 Validation results for 5 pesticides (matrix standard)

Pesticide	Beef (<i>n</i> =12)			Chicken (<i>n</i> =10)			Pork (<i>n</i> =12)		
	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)	Mean recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD %)	Inter. precision (RSD %)
(fortified at 0.01 µg/g)									
<u>GC/MS</u>									
Flufenacet	88.7	7.1	8.6	95.2	3.3	10.2	108.1	4.9	10.7
Oxabetrinil	94.8	3.2	7.6	99.3	3.9	5.8	93.3	2.0	6.0
Phenothrin	95.3	5.0	5.0	98.4	2.9	4.4	99.8	3.8	6.6
Prometryn	101.5	5.3	5.6	111.0	4.0	6.5	91.4	4.6	8.7
Triticonazole	98.4	2.8	4.5	103.8	3.6	4.4	91.6	2.7	13.0
<u>LC/MS</u>									
Flufenacet	90.2	6.2	7.5	99.0	5.5	7.2	96.4	8.0	11.9
Prometryn	92.6	6.1	6.1	99.4	4.8	9.9	90.2	4.3	4.3
Triticonazole	83.5	4.0	6.2	102.4	4.5	10.1	95.6	6.1	6.8
(fortified at 0.10 µg/g)									
<u>GC/MS</u>									
Flufenacet	98.3	7.8	11.0	96.3	2.6	5.1	105.6	13.4	19.0
Oxabetrinil	92.1	1.1	2.3	99.8	5.3	5.3	86.3	4.2	5.5
Phenothrin	95.9	1.4	1.8	104.8	3.3	4.5	99.2	2.7	4.0
Prometryn	98.5	0.7	1.9	107.6	3.5	3.9	93.1	2.2	4.4
Triticonazole	104.2	1.4	8.2	97.1	3.5	6.6	96.0	4.1	12.9
<u>LC/MS</u>									
Flufenacet	84.3	5.4	5.9	106.8	8.2	10.1	99.4	4.8	5.3
Prometryn	92.8	4.4	4.4	102.9	4.7	7.1	99.4	2.4	4.2
Triticonazole	94.4	7.9	8.3	105.3	4.1	8.8	108.1	5.2	6.0

a): Recoveries were calculated with matrix standard.
Inter. precision: Intermediate precision.

今回検討した農薬は全て通知法の対象項目として含まれているが、その検証は牛（筋肉、脂肪、肝臓）、サケおよびエビで行われ、鶏肉および豚肉については行われていない。また、添加濃度については0.10µg/gの1濃度で行われたものである⁸⁾。従って、今回、ガイドラインに基づいて行った3種筋肉の妥当性評価の結果は本分析法の有用性を証明するものである。

2. マトリックス効果

マトリックスの影響を調べるために、マトリックス効果を下記の式より求め、結果をTable 5に示した。

$$\text{マトリックス効果} = \frac{\text{マトリックス標準溶液により算出した真度}}{\text{溶媒標準溶液により算出した真度}}$$

マトリックス効果の値が1より大きい場合はマトリックスによる分解やイオン化抑制等、負のマトリックス効果を意味する。一方で、マトリックス効果の値が1より小さい場合はマトリックスによりGC注入口等での農薬の吸着抑制やイオン化促進等、正のマトリックス効果を意味する。妥当性評価の結果でも述べたとおり、GC/MS分析においてフルフェナセットはマトリックスの共存に

よる感度低下が生じ、マトリックス効果の値が1.11～1.99と高値になった。その他の農薬は全試料において1.00±0.20に収まり、マトリックスの影響は小さかった。特にLC/MSでは1.00±0.08以内とマトリックスの影響は非常に小さく、正確なデータが得られることがわかった。

IV 結論

食肉に基準値が設定されている農薬5成分（オキサベトリニル、トリチコナゾール、フェノトリン、フルフェナセットおよびプロメトリン）に既に開発した一斉分析法を適用することができた。妥当性評価は厚生労働省より示された試験法の妥当性評価ガイドラインに従って行い、5成分全てが3種筋肉（牛、鶏および豚）においてガイドラインの条件を満たす結果が得られた。また、GC/MSとLC/MSを併用することでマトリックスの影響を補完することができ、より信頼性の高いデータが得られることがわかった。今後は、一律基準で規制される農薬を含めて一斉分析法の適用性を幅広く検討し、日常検査に役立てていきたい。

Table 5 Matrix effect value in each meat product

Pesticide	Beef		Chicken		Pork	
	0.01 µg/g	0.10 µg/g	0.01 µg/g	0.10 µg/g	0.01 µg/g	0.10 µg/g
<u>GC/MS</u>						
Flufenacet	1.54	1.46	1.11	1.20	1.87	1.99
Oxabetrinil	0.97	0.87	0.90	1.01	0.82	0.86
Phenothrin	0.96	1.05	0.95	0.97	1.13	0.97
Prometryn	1.08	0.99	1.02	1.09	0.97	0.99
Triticonazole	0.89	0.97	0.88	0.93	0.91	0.81
<u>LC/MS</u>						
Flufenacet	1.05	1.05	1.00	1.02	1.08	1.01
Prometryn	0.97	0.98	0.96	1.02	0.92	1.04
Triticonazole	0.92	0.93	1.00	0.97	1.06	1.04

Matrix effect value: Recoveries calculated with matrix standard / that with solvent standard.

文 献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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について，平成17年1月24日，食安発第0124001号，別添（最終改正：平成22年10月28日）
- 上野英二，椋島由佳，大島晴美，大野勉：NCIモード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析．食衛誌，**49**，390-398（2008）
- 柴田雅久ら：第46回全国衛生化学技術協議年會講演集，p.70-71（2009），岩手
- 佐想善勇ら：第47回全国衛生化学技術協議年會講演集，p.44-45（2010），兵庫
- 松岡智郁，秋山由美，三橋隆夫：GPC およびミニカラム精製を用いた食肉中残留農薬スクリーニング法．食衛誌，**50**，97-107（2009）
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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について，平成19年11月15日，食安発第1115001号
- Matsuoka, T., Akiyama, Y. and Mitsuhashi, T. : Validation of multi-residue method for determination of pesticides in meat products using official guideline of analytical methods in Japan. *J. Pestic. Sci.*, **31**, 73-78（2011）
- 厚生労働省：農産物対象のGC/MS一斉分析法及びLC/MS一斉分析法，並びに畜水産物対象のGC/MS一斉分析法及びLC/MS一斉分析法の平成17年度検討結果，平成18年12月27日