

LC/MS/MS による農作物中の残留農薬の一斉分析法の検討

生活科学部

はじめに

平成 18 年 5 月 29 日よりポジティブリスト制が施行され,新たに多くの農薬等について残留基準が設定された(約 800 種類,農薬は 516 種類)。このため,食品中の残留農薬分析において,多くの農薬を分析することが求められている。

当所では,現在 GC/MS,GC-FPD および HPLC-ポストカラム蛍光法を用いて 150 農薬について分析を行っている。今回,高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて,新たに 43 農薬について一斉分析法を検討したので報告する。

方法

1 試料

ほうれんそう,キャベツ,さといも,いよかんおよびいちごを試料とした。

2 試薬

標準品:和光純薬工業(株)製,林純薬工業(株)製,関東化学(株)製,Dr.Ehrenstorfer 社製および Riedel-de Ha n 社製を用いた。

標準原液:各標準品 10mg をアセトニトリルに溶かし 50ml とした(200 µg/ml)。

混合標準液:各標準原液を混合しアセトニトリルで 1 µg/ml となるように調製した。

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム:ENVI-Carb/LC-NH₂カラム(500mg/500mg,6ml,Supelco 社製)に無水硫酸マグネシウム 500mg を積層し,あらかじめアセトニトリルおよびトルエン(3:1)混液 10ml でコンディショニング後,使用した。

その他の試薬:高速液体クロマトグラフ用,残留農薬試験用または特級品を用いた。

3 装置

高速液体クロマトグラフ:島津製 Prominence

質量分析装置:Applied Biosystems 社製 API4000

4 測定条件

(1) HPLC 条件

カラム:Xterra MS C18(2.1 × 150mm, 3.5 µm)(Waters 製)

移動相:A 液;5mmol/l 酢酸アンモニウム アセトニトリル・蒸留水(5:95),B 液;5mmol/l 酢酸アンモニウム アセトニトリル・蒸留水(95:5)

グラジエント条件:

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0	85	10
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95
32	5	10

流速:0.2 ml/min

カラム温度:40

注入量:5 µl

(2) MS/MS 条件

Scan Type:MRM

Ion Source:ESI

Period ごとの条件:

Polarity	Positive			Negative
	1	2	3	1
Period				
Curtain Gas	40	30	20	20
Ion Source Gas1	50	80	80	80
Ion Source Gas2	80	30	60	30
IonSpray Voltage	5000	4000	4500	-4500
Temperature	500	400	500	400
Collision Gas	4	4	6	4
Entrance Potential	10	10	10	-10
Resolution Q1	Unit	Unit	Low	Unit
Resolution Q3	Unit	Unit	Low	Unit
Dwell Time (msec)	100	30	180	30

化合物ごとの測定条件は表 1 に示した。

5 試験溶液の調製

試料 10g にアセトニトリル 10ml を加え,混和後,無水硫酸マグネシウム 4g および塩化ナトリウム 1g を加え 5 分間振とうした。2800rpm で 10 分間遠心分離した後,上層 2ml を ENVI-Carb/LC-NH₂カラムに負荷し,アセトニトリルおよびトルエン(3:1)混液 30ml で溶出した。溶出液を 40 で 1ml 以下に濃縮し,アセトン 10ml を加え 40 で溶媒を留去した。残留物をメタノール 2ml に溶解したものを試験溶液とした。

分析方法のフローチャートを図 1 に示した。

表1 MS/MS 条件および保持時間

農薬等名	分子量	保持時間 (分)	Per- iod	Q1 (m/z)	定量条件				定性条件			
					Q3(m/z)	DP	CE	CXP	Q3(m/z)	DP	CE	CXP
チアメトキサム	291	5.84	1	292	211	61	17	14	181	61	29	10
イミダクロプリド	255	6.52		256	209	56	27	14	175	56	31	18
クロチアジソン	249	6.64		250	169	51	19	16	132	51	21	8
クロリダゾン	221	7.47		222	92	86	37	16	65	86	57	0
オキシカルホキシ	267	7.89		268	175	61	21	12	147	61	35	10
チアクロプリド	252	8.26		253	126	66	29	8	73	66	83	6
チアベンダゾール	201	10.3		202	175	71	37	12	131	71	47	10
アザメチホス	324	10.6		325	183	51	23	12	112	51	55	10
ジメチモール	209	13.2	2	210	71	66	51	4	140	66	31	12
フラメトール	334	13.6		334	157	71	47	10	290	71	27	14
イソキサフルトール	359	14.0		360	251	46	23	18	360	36	5	26
フェンメチファム	300	14.9		301	168	71	13	12	136	71	31	10
アジノホスメチル	317	14.9		318	160	56	13	10	132	56	22	8
ピリフタリド	318	15.2		319	139	81	41	10	93	81	75	8
フェリムゾンE	254	16.0		255	132	71	31	10	91	71	47	6
フェリムゾンZ	254	16.0		255	132	76	29	10	91	76	47	6
クロマフェニジド	394	17.0		395	175	51	23	12	339	51	11	12
イプロバリカルブ	320	16.9		321	119	56	29	8	203	56	13	16
ケミルロン	303	16.6		303	185	56	19	14	125	56	51	8
ブタフェナシル	474	16.9		492	331	51	33	24	180	51	61	12
シメコナゾール	293	17.1		294	70	71	49	6	73	71	49	12
シアゾファミド	324	17.4		325	108	46	19	8	261	46	15	18
フェノキシカルブ	301	17.9		302	116	56	17	8	88	56	31	6
アニコホス	367	18.2		368	199	76	21	14	125	76	47	10
シフルフェナミド	412	18.8		413	295	76	23	20	241	76	35	18
ピラゾリネート	438	19.0		439	173	76	27	14	91	76	61	6
インドキサカルブ	527	19.3		528	203	71	55	14	150	71	35	10
ベンゾフェナップ	430	19.8		431	105	101	45	10	119	101	31	10
キサロホップ-pテフリル	429	19.7		429	299	86	29	20	85	86	29	14
フラチオカルブ	382	20.1		383	195	66	29	16	252	66	19	10
ラクトフェン	461	20.2		479	344	51	21	26	223	51	49	16
クロメプロップ	323	20.2		324	203	71	23	16	120	71	31	8
オキサジクロメホン	376	19.9		376	190	56	25	12	161	56	39	12
キサロホップエチル	373	19.9		373	299	71	27	22	271	76	37	18
ヘントキサゾン	354	20.0		354	286	66	17	20	186	66	39	12
クロキントセツトメキシル	335	20.4		336	238	61	25	16	192	61	41	14
ミルハメクチンA3	528	22.2	3	551	240	126	49	16	337	126	40	25
アヘルメクチンB1a	872	22.3		891	305	80	37	22	568	80	22	16
ミルハメクチンA4	542	22.9		565	240	156	51	16	337	156	41	28
トリデモルフ1	297	24.7		298	130	116	35	14	98	116	41	6
トリデモルフ2	297	25.9		298	130	116	35	14	98	116	41	6
トラルコキシジム1	329	13.8	1	328	254	-65	-32	-23	-66	-65	-10	-7
トラルコキシジム2	329	16.2		328	254	-65	-32	-23	-66	-65	-10	-7
メキシフェノジド	368	16.4		367	149	-80	-30	-3	-105	-80	-46	-17
オリザリン	346	17.2		345	281	-75	-26	-11	-78	-75	-56	-11
ナプロアニリド	291	17.7		290	143	-70	-44	-9	-93	-70	-34	-1

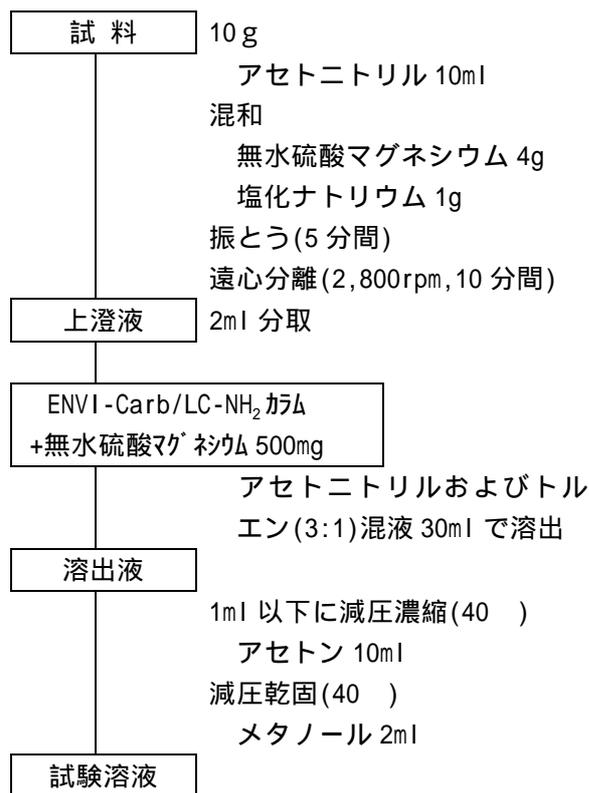


図1 分析方法のフローチャート

6 検量線の作成

混合標準液をメタノールで希釈して 0.01 ~ 0.15 µg/ml の検量線用標準液を調製した。それぞれ LC/MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。

結果と考察

1 LC/MS/MS 分析条件の検討

(1) LC 条件

カラムは Xterra MS C18 を用い、移動相およびグラジエント条件は通知法¹⁾に従い、5mmol/L 酢酸アンモニウムを添加した水 - アセトニトリル系でグラジエント分析を行ったところ、ピーク形状は良好であった。

(2) MS/MS 条件

イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブモードまたはネガティブモードで行い、MRM 法で測定した。

モニターイオン数が多いため、ポジティブモードの測定は 3Period に分けた。また、ポジティブモードとネガティブモードの切り替えには最低 0.7 秒、往復で 1.4 秒かかるので、ポジティブモードとネガティブモードの測定は別々に行った。

これらにより、データのポイント数が増加し定量性が向上した。

アナライザー部の各種パラメータの最適化はインフュージョンポンプを用いて、成分毎に行った。

イオンソースの各種パラメータの最適化は FIA (Flow Injection Analysis) によって行った。ポジティブモードの Period2 の最適化にはアジンホスメチルを用い、Period3 の最適化には ミルベメクチン A4 を用いた。その他のパラメータは初期値を用いた。

各農薬の MS/MS のモニターイオンおよび各パラメータを表 1 に示した。

2 抽出操作

当所では試料にアセトニトリルおよび塩化ナトリウムを加えて振とう抽出を行ってきた。最近、QuEChERS 法と呼ばれる迅速・簡便な方法が、広まってきているが、この方法ではアセトニトリル、塩化ナトリウムおよび無水硫酸マグネシウムを加えて振とう抽出している。ほうれんそうについて両抽出法を用いて添加回収試験を行ったところ、無水硫酸マグネシウムを加える抽出法の方が、回収率が良好であった。

3 精製操作

各農薬 1 µg を ENVI-Carb/LC-NH₂ カラムに負荷し、溶出液の分画を行った。アセトニトリルおよびトルエン (3:1) 混液 10ml ずつ 3 画分を分取した。ほとんどの農薬が 20ml で溶出したが、チアベンダゾール、ジメチリモール、クロメプロップ、クロキントセットメキシルおよびトラルコキシジムは画分 3 にも溶出した。これらのことから溶出液の量は 30ml とすることとした。

4 定量限界および検量線の直線性

定量用モニターイオンでは、ミルベメクチン A4 の定量限界 (S/N 10) は 0.02 µg/g であったが、その他の農薬の定量限界は 0.01 µg/g 以下であった。

定性用モニターイオンでは、すべての農薬の検出限界 (S/N 3) が 0.01 µg/g 以下であった。

定量用モニターイオンを用いた検量線は、すべての農薬について 0.01 ~ 0.15 µg/ml の範囲で良好な直線性 (r=0.995 以上) が得られた。

5 試料中のマトリックス成分の影響

試料中のマトリックス成分の影響を検証するため、5 農産物のマトリックス標準液 (0.1 µg/ml) と溶媒標準液 (0.1 µg/ml) の面積値 (n=2) を比較した。その結果を表 2 に示した。

キャベツではチアメトキサムが 49.4% であっ

表2 試料中のマトリックス成分の影響

農薬等名	マトリックス標準液 / 溶媒標準液 (%) [*]				
	ほうれんそう	キャベツ	さといも	いよかん	いちご
チアメトキサム	100.5	49.4	99.5	95.1	101.0
イミダクロプリド	102.8	83.5	100.7	98.0	100.5
クロチアジン	100.2	82.2	101.3	95.5	101.7
クロリダゾン	100.5	98.7	100.6	101.0	106.0
オキシカルボキシ	101.5	88.1	101.8	101.4	103.3
チアクロプリド	104.7	92.2	101.4	96.6	102.5
チアヘンダゾール	97.8	100.5	95.4	97.7	99.2
アザメチホス	103.5	104.5	182.6	102.3	104.4
ジメチモール	98.6	98.5	99.1	97.9	101.1
フラメピル	104.4	101.8	100.9	96.7	101.8
イソキサフルトール	109.8	94.8	104.4	100.5	95.0
フェンメチファム	105.2	102.4	101.0	103.5	102.5
アジンホスメチル	75.4	104.8	102.7	93.2	130.3
ピリタリド	101.5	99.5	101.0	98.5	107.7
フェリムジン(E,Z)	101.5	100.5	99.5	96.3	101.5
クロマフェニジド	102.2	99.8	98.0	52.5	102.7
イプロバリカルブ	100.0	101.5	98.1	47.6	103.1
クミルロン	100.8	102.0	102.9	45.6	101.6
ブタフェナシル	101.4	99.5	96.7	56.5	99.8
シメコナゾール	102.5	101.0	99.0	76.8	102.1
シアゾファミト	104.1	98.6	100.9	85.7	103.0
フェノキシカルブ	104.2	99.5	103.4	75.9	102.6
アニコホス	102.9	101.5	100.9	86.0	100.2
シフルフェナミト	100.3	102.1	100.0	100.5	99.4
ピラゾリネート	101.9	99.5	100.5	99.5	102.6
イントキサカルブ	103.6	101.0	100.4	103.4	99.4
ヘンゾフェナップ	104.4	99.0	97.3	103.5	103.5
キサロホップ-p-テフリル	105.2	98.4	97.6	103.7	101.2
フラチオカルブ	102.9	102.5	100.8	102.9	104.2
ラクトフェン	108.0	103.4	102.0	104.7	103.9
クロメプロップ	107.1	102.4	101.5	104.9	99.0
オキサジクロメホン	102.5	101.9	97.0	102.8	101.8
キサロホップエチル	103.0	102.0	100.0	103.0	104.2
ヘントキサゾン	117.1	96.2	99.3	102.5	106.8
クロキントセツトメキシル	101.2	100.2	104.9	101.9	101.4
ミルバメクチンA3	92.5	86.4	81.5	84.0	92.8
アベルメクチンB1a	100.8	97.8	107.1	125.2	96.2
ミルバメクチンA4	90.1	83.0	76.8	81.7	87.5
トリテモルフ1,2	101.4	102.2	100.9	102.1	105.1
トラルコキシジム1,2	107.6	101.7	97.2	96.1	105.2
メトキシフェニジド	97.0	97.6	98.0	95.1	106.2
オリザリン	106.6	100.8	101.3	89.7	95.0
ナプロアリド	109.2	113.6	106.8	80.0	97.4

* : 数値は n=2 の平均値 , マトリックス標準液および溶媒標準液の濃度は 0.1 μg/ml

表3 添加回収試験結果

農薬等名	回収率(%)*									
	ほうれんそう		キャベツ		さといも		いよかん		いちご	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
チアトキサム	96.4	3.2	51.4	2.0	94.3	4.1	91.5	0.9	99.1	2.5
イミダクロプリド	97.8	3.1	87.3	1.5	99.0	4.4	96.1	1.2	95.5	3.2
クロチアニジン	97.6	1.1	84.8	1.2	98.0	3.7	92.0	0.4	96.8	1.5
クロリダゾン	97.0	1.6	98.3	0.9	98.8	3.9	99.1	1.7	100.4	2.9
オキシカルホキソン	95.8	1.4	86.6	1.8	93.2	3.6	96.3	1.3	93.0	2.6
チアクロプリド	100.1	0.8	96.9	1.8	100.2	4.3	92.3	4.8	100.7	2.0
チアヘンダゾール	70.5	1.2	84.7	7.8	80.7	12.7	74.4	3.4	47.5	9.3
アザメチホス	102.7	3.9	102.0	7.8	99.7	3.4	98.2	1.5	105.0	4.0
ジメチルモール	92.6	3.7	94.3	2.6	93.9	4.9	83.4	0.4	96.0	3.5
フラマトピル	95.8	3.4	100.1	1.5	97.4	5.2	94.4	5.2	104.0	1.7
イソキサフルトール	97.3	4.1	71.1	6.7	100.6	9.4	101.2	3.7	90.6	6.2
フェンメトイファム	100.4	4.1	105.0	3.6	97.9	4.3	103.0	1.0	105.3	2.1
アジンホスメチル	124.0	1.5	105.3	5.7	106.3	3.2	97.4	6.5	104.7	14.7
ピリフタリド	102.0	3.2	104.0	4.4	105.7	4.0	102.3	4.2	106.7	1.5
フェリムゾン(E,Z)	97.4	2.4	101.4	2.4	104.9	8.9	92.2	2.0	98.2	5.8
クロマフェノジド	99.0	7.0	103.2	5.9	101.5	4.4	48.6	1.8	109.3	4.0
イプロバリカルブ	101.6	7.1	102.8	3.8	101.0	4.3	44.7	1.0	103.7	1.5
ケミルロン	100.1	4.4	105.0	2.6	102.0	2.6	41.9	1.5	110.0	1.0
ブタフェナシル	103.0	9.0	105.3	1.5	102.5	6.2	54.1	0.6	97.3	2.8
シメコナゾール	102.2	2.8	100.5	2.7	100.8	3.0	75.2	0.9	104.3	0.6
シアゾファミド	105.0	4.0	108.0	2.6	106.7	4.2	88.0	1.2	108.7	0.6
フェノキシカルブ	102.3	5.6	104.7	2.1	105.0	3.6	74.8	1.7	105.7	2.9
アニコホス	100.5	5.2	106.7	1.2	104.2	4.0	84.7	1.6	104.7	1.2
シフルフェナミド	99.6	10.5	106.7	0.6	100.7	6.7	106.0	2.0	103.1	3.3
ピラゾリネート	94.5	7.5	80.6	20.5	82.8	3.3	96.2	3.5	95.5	11.1
インドキサカルブ	101.3	9.6	103.0	4.4	103.1	8.1	107.7	1.5	102.3	2.2
ヘンゾフェナップ	97.7	6.5	102.7	1.2	100.7	6.7	104.0	2.0	104.7	2.3
キサロホップ-p-テフリル	102.1	8.4	100.4	1.1	103.6	6.0	104.1	4.2	102.1	4.1
フラチオカルブ	94.7	6.1	104.7	1.2	98.1	4.8	106.3	1.2	106.7	5.1
ラクトフェン	98.9	7.7	108.7	2.1	105.5	6.2	108.3	1.5	108.3	2.1
クロメプロップ	103.6	5.2	105.3	3.5	104.9	5.5	105.7	3.8	104.7	4.0
オキサジクロメホン	98.4	6.3	106.3	0.6	101.8	6.4	104.3	0.6	104.0	1.7
キサロホップエチル	100.9	6.4	106.3	0.6	104.3	3.8	106.0	3.6	105.0	3.6
ヘントキサゾン	108.3	12.7	119.0	1.0	112.3	4.2	111.3	7.5	102.5	11.9
クロキントセツトメキシル	94.1	9.0	105.0	1.7	106.3	4.6	103.0	1.7	101.7	1.5
ミルハメクチンA3	97.2	1.4	87.4	1.8	86.8	3.2	83.4	4.0	88.6	1.8
アベルメクチンB1a	87.0	12.5	103.0	18.1	143.0	31.2	123.0	18.1	154.4	55.0
ミルハメクチンA4	83.9	8.6	92.6	1.9	84.6	4.3	82.6	5.5	85.5	2.7
トリテモルフ1,2	87.3	3.5	89.1	4.6	97.3	7.9	98.6	5.1	97.6	0.9
トラルコキシジム1,2	80.9	6.2	66.8	10.2	82.0	11.0	74.3	4.9	72.7	2.5
メキシフェノジド	112.7	4.7	112.0	7.5	107.3	4.0	84.3	1.6	104.3	5.1
オリザリン	109.7	7.2	103.7	5.1	99.8	8.9	84.7	2.5	96.8	1.9
ナプロアニリド	104.0	3.6	108.3	4.9	111.0	7.0	71.5	0.8	103.3	1.2

* : n=3, 添加濃度は 0.1 μg/g

た。いよかんではクロマフェノジドが 52.5%, イプロバリカルブが 47.6%, クミルロンが 45.6%, ブタフェナシルが 56.5%, アベルメクチン B1a が 125.2%であった。

試料中のマトリックスによりイオン化が抑制または促進されている可能性が推察された。

6 添加回収試験

5農産物に各農薬を 0.1 µg/g 添加して回収試験を行った(n=3)。フェリムゾン, トリデモルフおよびトラルコキシジムの回収率は異性体のピーク面積の和で算出した。回収率の平均値を表 3 に示した。

5農産物で平均回収率が 70% ~ 120% ,変動係数が 20%以内の農薬は 35 農薬であった。

4農産物で平均回収率が 70% ~ 120% ,変動係数が 20%以内の農薬は, 42 農薬であった。

アベルメクチン B1a は 3 農産物で平均回収率が 120%以上 2 農産物で変動係数が 20%以上であった。

5 農産物で, 定量を妨害するようなピークはなく, 選択的に定量をすることができた。

ま と め

LC/MS/MS による一斉分析法について検討したところ, 42 農薬についてほぼ良好な結果が得られた。本法は残留分析法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省通知食安発第 1129002 号, 平成 17 年 11 月 29 日
- 2) M.Anastassiades et al. J.AOAC Int.86,412-431