

LC/MS/MS による農作物中の残留農薬の一斉分析法の検討(その 2)

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。このため、食品中の残留農薬分析において、多くの農薬を効率的に分析することが求められている。

N-メチルカーバメイト系農薬については、当所では、HPLC-ポストカラム蛍光法^{1),2)}により 16 農薬について分析を行っている。しかし、この方法では、柑橘類等の農産物等については、きょう雑物が多く、再精製を行う必要がある。転溶溶媒にジクロロメタンを用いており、環境への影響と健康被害が懸念される。また、アルジカルブスルホキシドの取扱について通知³⁾されるなど、代謝体についても分析することが必要とされているが、代謝物も含めると多成分となり、HPLC ポストカラム蛍光法では、ピークの分離が困難である。

前報⁴⁾では、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、43 農薬について一斉分析法を検討し、その結果を報告したところであるが、今回、引き続き、N-メチルカーバメイト系農薬等 28 農薬について、LC/MS/MS による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、ばれいしょおよびいちごを試料とした。

2 検査対象農薬

(1)N-メチルカーバメイト系農薬

HPLC-ポストカラム蛍光法^{1),2)}により分析を行ってきた N-メチルカーバメイト系 16 農薬(ルーチン分析項目)およびその代謝物 6 農薬(新規検討項目)を分析対象農薬とした。

(2)市内産農産物で使用率の高い農薬

当所では、農薬使用履歴の明らかな市内産の農作物については、一斉分析項目に加えて、使用農薬の個別分析も実施している。HPLC 個別分析項目の中で、使用率が高い 6 農薬(アセタミプリド、トリフルミゾールおよび代謝物、フェンプロキシメート E 体および Z 体、フルフェノクスロン)を分析対象農薬とした。

1 試薬

標準品: 和光純薬工業(株)製, 林純薬工業(株)製および Riedel-de Haen 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)

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。

2 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

3 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 酢酸アンモニウムメタノール・蒸留水(5:95), B 液; 5mmol/l 酢酸アンモニウムメタノール・蒸留水(95:5)

グラジエント条件は表 1 に示した。

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

Polarity: Positive

表 1 HPLC グラジエント条件

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0	80	20
15	50	50
20	20	80
22	5	95
30	5	95
32	80	20
33	stop	

Curtain Gas(psi) : 40
Ion Source Gas1(psi) : 80
Ion Source Gas2(psi) : 30
IonSpray Voltage(V) : 5500
Temperature() : 400
Collision Gas : 4
Entrance Potential (V) :10
Resolution Q1 : Unit
Resolution Q3 : Unit
Dwell Time (msec) : 50~250
化合物ごとの測定条件は表 2 に示した。

4 試験溶液の調製

前報⁴⁾に準じて行った。

5 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

前報⁴⁾のグラジエント条件で分析を行ったところ、MPMC と XMC のピークが重なってしまった。MPMC は XMC の異性体であるため、定量、定性ともに、同じイオンを測定するため、ピークを十分に分離する必要がある。そこで、MPMC と XMC のピークが分離するグラジエント条件に変更した(表 1)。

(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で行い、MRM 法で測定した。

モニターイオン数が多いため、測定は 6Period に分割し、Dwell Time は 50msec 以上とした。

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にはアルジカルブを用い FIA(Flow Injection Analysis) によって行った。

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 2 に示した。

2 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、すべての農薬の定量限界(S/N 10)が 0.01 µg/g 以下であった。

定性用モニターイオンでも、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=0.9997 以上)が得られた。

3 試料中のマトリクス成分の影響

試料中のマトリクス成分の影響を検証するため、4 農産物のマトリクス標準液(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 3 に示した。

溶媒標準液に対してマトリクス標準液のピーク面積が最も減少したのは、キャベツのエチオフェンカルブスルホキシド(80.2%)であった。溶媒標準液に比べ、マトリクス標準液のピーク面積が最も増加したのは、いちごのフルフェノクスロン(110.5%)であった。

試料中のマトリ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。

4 添加回収試験

4 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=3~5)。回収率の平均値および変動係数を表 4 に示した。

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 23 農薬であった。

3 農産物で平均回収率が 70%~120%、変動係数が 20% 以内の農薬は、25 農薬であった。

エチオフェンカルブは 3 農産物で平均回収率が 30% 以下、エチオフェンカルブスルホキシドは同じ 3 農産物で平均回収率が 150% 以上であり、スルホキシド体への代謝が推察された。

4 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、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) 福田裕 他:高速液体クロマトグラフィーによる新規残留農薬分析法の検討, 広島市衛研年報, 14, 33-45(1995)
- 2) 佐々木珠生 他:高速液体クロマトグラフィーによる新規残留農薬分析法の検討(その 2), 広島市衛研年報, 15, 33-43(1996)
- 3) 厚生労働省通知食安発第 0809004 号, 平成 19 年 8 月 9 日
- 4) 広島市衛研年報, 26, 67-72(2007)

表2 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)	DP	定量条件			定性条件		
						Q3(m/z)	CE	CXP	Q3(m/z)	CE	CXP
アルジ ⁺ カルブ ⁺ スルホキチ ⁺	206.3	3.96	1	207.1	51	132.0	11	8	89.1	21	8
アルジ ⁺ カルブ ⁺ スルホン [*]	222.3	4.31		223.1	61	148.1	15	12	86.1	21	6
オキサミル	219.3	4.67		237.0	41	72.1	29	12	90.1	13	8
メソミル	162.2	5.55		162.9	41	88.1	13	8	106.1	15	8
エチオフェンカルブ ⁺ スルホン	257.3	7.59	2	258.1	61	107.1	29	8	201.1	11	14
エチオフェンカルブ ⁺ スルホキチ ⁺	241.3	8.22		241.9	51	107.1	25	8	184.9	13	16
メチオカルブ ⁺ スルホキチ ⁺	241.3	9.43		241.9	56	185.0	21	14	122.2	39	12
アセタミ ⁺ リト ⁺	222.7	10.02		223.0	66	126.1	29	12	90.0	47	16
メチオカルブ ⁺ スルホン	257.3	11.23		258.1	66	122.2	31	10	201.0	13	18
アルジ ⁺ カルブ ⁺	190.3	13.46	3	208.1	31	116.1	11	8	89.1	23	8
MTMC	165.2	15.21		166.0	51	109.1	17	10	94.1	43	18
PHC	209.2	17.22	4	210.1	51	111.1	25	8	168.1	13	14
ヘ ⁺ ンダ ⁺ イオカルブ ⁺	223.2	17.52		224.1	56	167.1	15	14	109.0	25	8
カルボ ⁺ フラン	221.3	17.54		222.1	56	165.0	19	16	123.2	33	12
アミノカルブ ⁺	208.3	17.63		209.1	46	152.1	21	16	137.0	35	12
カルバ ⁺ リル	201.2	19.03		219.0	31	145.1	19	10	127.2	51	10
MPMC	179.2	19.25		180.1	51	123.2	17	10	108.1	37	8
エチオフェンカルブ ⁺	225.3	19.71		226.1	51	107.1	25	8	164.0	13	12
XMC	179.2	19.90		180.1	51	123.2	15	10	108.1	37	8
チオジ ⁺ カルブ ⁺	354.5	20.74		355.1	66	88.1	29	8	108.0	23	6
イソ ⁺ ロカルブ ⁺	193.2	21.05		194.0	61	95.2	25	6	137.0	15	10
フェノ ⁺ カルブ ⁺	207.3	22.82	5	208.1	61	95.2	23	8	152.1	13	14
メチオカルブ ⁺	225.3	23.14		226.1	56	169.1	13	16	121.2	25	10
トリフルミゾ ⁺ ール代謝物	294.7	24.06		295.0	76	214.8	35	22	176.0	35	16
トリフルミゾ ⁺ ール	345.7	25.89	6	346.0	41	278.0	17	20	73.1	27	6
フェン ⁺ ピ ⁺ ロキシメ ⁺ ト(Z体)	421.5	26.41		422.2	76	366.1	21	10	213.9	43	14
フルフェノクスロン	488.8	26.63		489.1	91	158.0	29	16	140.9	73	10
フェン ⁺ ピ ⁺ ロキシメ ⁺ ト(E体)	421.5	27.12		422.2	106	366.1	21	28	138.1	45	8

DP : Declustering Potential(V) CE : Collision Energy(V) CXP : Collision Cell Exit Potential(V)

表3 試料中のマトリックス成分の影響

農薬名	マトリックス標準液 / 溶媒標準液 (面積値) (%) [*]			
	ほうれんそう	キャベツ	ばれいしょ	いちご
アルジ [®] カルブ [®] スルホキッド [®]	99.6	92.8	99.4	101.2
アルジ [®] カルブ [®] スルホン [*]	99.4	96.2	101.8	100.0
オキサミル	100.9	98.3	101.5	101.6
メソミル	100.4	97.8	100.6	99.7
エチオフェンカルブ [®] スルホン	100.4	98.6	101.2	103.1
エチオフェンカルブ [®] スルホキッド [®]	99.3	80.2	99.4	102.4
メチオカルブ [®] スルホキッド [®]	100.2	98.2	102.3	102.9
アセタミフ [®] リド [®]	100.1	97.4	100.1	175.3
メチオカルブ [®] スルホン	99.1	83.5	105.3	106.7
アルジ [®] カルブ [®]	101.0	98.2	99.6	100.4
MTMC	100.7	100.2	101.9	101.6
PHC	98.8	100.3	100.3	103.2
ヘ [®] ンダ [®] イオカルブ [®]	99.9	99.9	100.5	102.1
カルボ [®] フラン	101.0	99.0	99.5	101.6
アミノカルブ [®]	100.9	99.0	100.0	101.0
カルバ [®] リル	101.1	99.4	102.3	98.8
MPMC	100.4	100.3	100.6	100.5
エチオフェンカルブ [®]	101.3	98.0	102.3	101.5
XMC	100.6	99.6	102.7	100.3
チオジ [®] カルブ [®]	101.3	98.7	103.0	103.2
イソフ [®] ロカルブ [®]	102.5	98.9	103.0	101.7
フェノフ [®] カルブ [®]	100.7	100.8	102.2	100.1
メチオカルブ [®]	100.7	99.3	100.7	101.2
トリフルミゾ [®] ール代謝物	102.5	100.2	102.0	102.0
トリフルミゾ [®] ール	82.6	82.7	93.7	87.8
フェンビ [®] ロキシメート(Z体)	100.3	100.1	101.0	102.5
フルフェノクスロン	105.1	103.3	105.0	110.5
フェンビ [®] ロキシメート(E体)	100.9	97.9	99.9	98.9

* : 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 4 添加回収試験結果

農薬名	回収率 (%) *							
	ほうれんそう (n=4)		キャベツ (n=3)		ばれいしょ (n=3)		いちご (n=5)	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
アルシ [®] カルブ スルホキチ [®]	104.2	1.3	84.2	3.3	93.9	0.2	115.2	10.2
アルシ [®] カルブ スルホン [*]	101.4	2.1	100.3	4.0	103.8	3.3	98.4	1.8
オキサミル	98.9	1.7	96.7	4.0	96.3	1.8	97.1	1.7
メソミル	102.5	1.4	97.2	3.5	95.0	1.8	96.0	1.5
エチオフェンカルブ [®] スルホン	102.6	1.3	99.7	2.7	104.5	2.8	103.1	1.5
エチオフェンカルブ [®] スルホキチ [®]	183.8	6.0	101.6	4.0	157.9	10.6	189.8	12.0
メチオカルブ [®] スルホキチ [®]	98.0	1.5	94.7	5.0	97.8	0.6	108.0	3.0
アセタミフ [®] リト [®]	99.0	1.3	100.3	3.7	97.9	2.3	93.0	9.8
メチオカルブ [®] スルホン	101.3	1.9	83.8	4.4	100.5	1.8	221.1	10.4
アルシ [®] カルブ	62.0	3.0	96.9	4.3	78.6	7.6	41.0	17.3
MTMC	67.0	3.4	95.6	4.0	81.8	9.8	83.5	3.3
PHC	91.3	3.4	100.8	3.1	94.6	2.1	96.5	1.2
ヘ [®] ンダ [®] イオカルブ [®]	97.0	0.7	105.1	4.4	97.4	2.1	99.7	1.4
カルボ [®] フラン	100.4	1.3	101.9	2.9	98.4	0.9	100.7	2.5
アミノカルブ [®]	92.0	1.2	96.5	3.1	87.6	2.1	76.1	1.8
カルバ [®] リル	103.9	1.5	105.5	3.2	101.0	2.0	99.4	1.9
MPMC	87.1	3.5	101.5	4.0	95.7	4.0	93.5	1.5
エチオフェンカルブ [®]	5.5	3.7	75.6	4.1	28.8	12.6	4.3	7.9
XMC	82.7	3.6	101.4	4.5	94.7	5.8	94.0	2.3
チオン [®] カルブ	91.7	2.5	98.2	3.6	99.7	2.0	93.8	2.2
イソフ [®] ロカルブ [®]	78.0	3.4	101.6	4.0	91.5	7.1	90.6	2.2
フェノフ [®] カルブ [®]	85.8	3.4	103.1	3.0	95.3	5.2	94.7	1.0
メチオカルブ [®]	102.0	1.1	103.5	3.8	100.0	1.5	103.4	2.1
トリフルミゾ [®] -ル代謝物	102.2	2.2	104.8	2.2	98.6	3.5	79.8	4.6
トリフルミゾ [®] -ル	80.8	1.3	82.7	3.8	87.0	3.1	79.9	6.3
フェンピ [®] ロキシメ-ト(Z体)	105.7	1.3	106.0	2.6	103.6	1.5	100.2	1.9
フルフェノクスロン	107.1	2.7	107.9	3.3	104.9	2.8	108.6	3.9
フェンピ [®] ロキシメ-ト(E体)	79.9	5.1	76.4	3.3	75.0	3.2	80.4	6.7

* : 添加濃度は0.1 µg/g