

LC-MS/MS による農産物中の残留農薬の一斉分析(2009)

小西友彦 ・ 中村正規

福岡市保健環境研究所保健科学課

Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Agricultural Products by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry(2009)

Tomohiko KONISHI , Masanori NAKAMURA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

残留基準値が設定されている 70 化合物 (58 農薬) について、当所で開発した LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法への適用を検討した。試験溶液の調製は試料をアセトニトリルで抽出し、濃縮乾固後、5 倍希釈相当のメタノールに溶解して行った。この方法で玄米、大豆、ほうれんそう、オレンジおよび茶の 5 種の作物について添加回収試験を行い、定量限界および回収率を求めた。その結果、試料由来のマトリックス成分により回収率への影響が見られたが、5 種の作物において一律基準 0.01ppm の確認が可能で、50~130%の回収率が得られた 46 化合物 (40 農薬) について、本分析法は適用可能で簡易かつ迅速なスクリーニング試験法として有効であると考えられた。

Key Words : 液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 LC-MS/MS,
残留農薬 pesticide residues, 一斉分析 simultaneous determination, 農産物 agricultural products

1 はじめに

平成 18 年 5 月に食品中に残留する農薬等にポジティブリスト制度が導入され、残留基準が設定された農薬数も大幅に増加した。これに伴い厚生労働省は、効率的に検査が実施できるようガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-MS) や液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS) による、農薬等の一斉試験法¹⁾ (以下「通知法」とする) を通知した。しかし、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (農産物)」では、試料をアセトニトリルで抽出し、酸性条件下で塩析した後、カートリッジカラムを用いた精製を行い、試験溶液を調製するため、前処理に長時間を要する。このため、著者らは LC-MS に比べて選択性や相対感度が高く得られる液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、簡易かつ迅速に分析する方法を開発してきた²⁻³⁾。

今回は残留基準値が設定されている 70 化合物 (58 農薬) について、既報の一斉分析法が適用可能であるか検討した。

2 実験方法

2.1 試料

市販の玄米、大豆、ほうれんそう、オレンジおよび茶を用いた。

2.2 試薬等

標準品：表 1 に示したとおり、残留基準値が設定されている 58 農薬と代謝物等残留基準の対象物質 12 を含む 70 化合物について、林純薬工業 (株) または関東化学 (株) 製を使用した。

標準原液：各標準品 2 mg を精秤し、100 mg/L とする

ようにアセトニトリルまたはメタノールで溶解し調製した。

標準溶液：各標準原液を混合しメタノールで1 mg/L となるように希釈し、さらにメタノールで適宜希釈し調製した。

0.2 μm フィルター：アドバンテック東洋（株）製 DISMIC-13HP。

ろ紙：アドバンテック東洋（株）製 No.5A。

その他の試薬：特級品あるいは HPLC 用。

2.3 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1200 シリーズ。

質量分析計：Applied Biosystems 社製 4000 Q TRAP。

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 POLYTRON PT3100。

高速窒素濃縮装置：Zymark 社製 TurboVap LV。

2.4 測定条件

LC-MS/MS 条件は表 2 および表 3 に示した。

2.5 試験溶液の調製

2.5.1 玄米および大豆

試料 10 g に水 20 mL を加え、15 分間放置した後アセ

トニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過し、ろ液を合わせた。ろ液をアセトニトリルで 100 mL に定容した後 2 mL を分取し、高速窒素濃縮装置を用いて 40°C で溶媒を除去した後メタノール 1 mL に溶解した。この溶液を 0.2 μm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.5.2 ほうれんそうおよびオレンジ

試料 20 g にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過し、ろ液を合わせた。ろ液をアセトニトリルで 100 mL に定容した後 2 mL を分取し、高速窒素濃縮装置を用いて 40°C で溶媒を除去した後メタノール 2 mL に溶解した。この溶液を 0.2 μm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.5.3 茶

試料 5 g に水 20 mL を加え、15 分間放置した後アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズ後ろ過し、ろ液を合わせた。ろ液をアセトニトリルで 100 mL に定容した後 2 mL を分取し、高速窒素濃縮装置を用いて 40°C で溶媒を除去した後メタノール 5 mL に溶解した。この溶液を 0.2 μm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

表 1 分析対象農薬

農薬名*	主な用途	化合物数（農薬数）
アバメクチン（アベルメクチン B1a, アベルメクチン B1b）, アルジカルブ（アルジカルブ, アルジカルブスルホキシド, アルジカルブスルホン）, <u>イミダクロプリド</u> , <u>エチプロール</u> , <u>クロチアニジン</u> , <u>クロフェンテジン</u> , <u>シクロプロトリン</u> , <u>ジノテフラン</u> , <u>シラフルオフェン</u> , <u>チアクロプリド</u> , <u>チアメトキサム</u> , <u>メソミル</u> （メソミル, メソミルオキシム）, <u>テブフェノジド</u> , トリフルムロン, <u>ノバルロン</u> , <u>フィプロニル</u> , <u>フェノプカルブ</u> , <u>ブプロフェジン</u> , <u>フルフェノクスロン</u> , <u>ヘキシチアゾクス</u> , <u>メトキシフェノジド</u> , <u>ルフェヌロン</u>	殺虫剤	26(22)
イソキサフルトール, <u>オキサミル</u> , <u>オリザリン</u> , <u>オキサジクロメホン</u> , <u>キザロホップエチル</u> （キザロホップエチル, キザロホップ, キザロホップ-p-テフリル）, <u>クロメプロップ</u> , <u>クロロクスロン</u> , <u>シクロエート</u> , <u>ピリフタリド</u> , <u>フェントラザミド</u> （フェントラザミド, CPT）, <u>フェンメディファム</u> , <u>フサライド</u> , <u>プロバキザホップ</u> , <u>ベンダゾン</u> , <u>メタベンズチアズロン</u> , <u>ラクトフェン</u>	除草剤	19(16)
<u>アシベンゾラルSメチル</u> （アシベンゾラルSメチル, アシベンゾラル酸）, <u>アズキシストロビン</u> , <u>イプロバリカルブ</u> , <u>エポキシコナゾール</u> , <u>オリサストロビン</u> （オリサストロビン, オリサストロビン代謝物）, <u>カルプロパミド</u> , <u>シフルフェナミド</u> , <u>シプロジニル</u> , <u>ジメチリモール</u> , <u>トリチコナゾール</u> , <u>バリダマイシン</u> , <u>ピロキロン</u> , <u>フェリムゾン</u> （フェリムゾンE, フェリムゾンZ）, <u>フェンアミドン</u> , <u>フラメトピル</u> （フラメトピル, フラメトピル代謝物）, <u>プロクロラズ</u> （プロクロラズ, 2,4,6-トリクロロフェノール）, <u>プロベナゾール</u> , <u>ボスカリド</u>	殺菌剤	23(18)
クロキントセットメキシル	薬害軽減剤	1(1)
<u>メタアルデヒド</u>	軟体動物駆除剤	1(1)

*下線があるものは国内で登録がある農薬を示す（平成 21 年 6 月現在）。

表2 LC-MS/MS 条件

分析カラム	XTerra MS C18 (Waters 社製) (50 mm×2.1 mm i. d., 3.5 μm)	
カラム温度	40°C	
移動相	A液: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム B液: アセトニトリル	
移動相流量	0.2 mL/min	
グラジエント条件	0% B(0 min)→0% B(1 min)→ 90% B(25 min)→90% B(30 min)→ 0% B(30 min)→0% B(45 min)	
注入量	5 μL	
イオン化	ESI (ポジティブ測定) (ネガティブ測定)	
イオンスプレー電圧	5,500 V	-4,500 V
イオンソース温度	500°C	550°C

3 実験結果および考察

3.1 LC-MS/MS 条件の検討

カラムおよび移動相は、通知法に記載があり LC-MS で一般的に使用されている、ODS カラムおよび酢酸アンモニウムを用いて検討を行った。質量分析計の条件のうち、イオンスプレー電圧およびイオンソース温度などの条件については、既報⁴⁾ のとおり設定した。

バリダマイシンと 2,4,6-トリフェニルフェノールは分析カラムに保持せず、フェリムゾンは E 体と Z 体の分離ができず測定できなかったが他の 66 化合物の測定は可能であった。

表3 各化合物の測定条件

No.	化合物名	MW	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE	No.	化合物名	MW	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE
1	アシベンゾラルSメチル	210.0	211.0	139.8	71	37	36	フェンアミドン	311.1	312.1	92.1	81	41
2	アゾキシストロビン	403.1	404.1	372.2	86	21	37	フェンメディファム	300.1	301.1	136.1	76	31
3	アベルメクチンB1a	874.5	890.5	305.2	56	37	38	フルフェノクスロン	488.0	489.0	158.1	86	31
4	アベルメクチンB1b	858.5	876.5	291.1	61	33	39	プロバキザホップ	443.1	444.1	100.0	96	27
5	アルジカルブ	190.1	208.1	116.1	36	13	40	ヘキシチアゾクス	352.1	353.1	228.0	76	23
6	アルジカルブスルホキシド	206.1	207.1	116.1	36	13	41	ボスカリド	342.0	343.1	307.1	91	31
7	アルジカルブスルホン	222.1	240.2	86.1	46	31	42	メタベンズチアズロン	221.1	222.1	165.1	61	25
8	イソキサフルトール	359.0	360.1	251.0	81	23	43	メトキシフェノジド	368.2	369.2	149.1	61	25
9	イプロバリカルブ	320.2	321.2	119.1	46	31	44	ラクトフェン	461.1	479.1	344.0	61	21
10	イミダクロプリド	255.1	256.1	209.0	71	25	45	アシベンゾラル酸	180.0	-178.9	-106.9	-22	-9
11	エボキシコナゾール	329.1	330.1	121.0	81	33	46	オリザリン	346.1	-345.0	-46.0	-95	-56
12	オキサミル	219.1	237.1	72.0	41	29	47	ルフェヌロン	510.0	-508.9	-338.8	-65	-16
13	カルプロパミド	333.1	336.0	139.0	76	31	48	エチプロール	396.0	397.1	357.1	91	31
14	キザロホップエチル	372.1	373.3	299.1	86	29	49	オキサジクロメホン	375.1	376.1	190.2	61	23
15	キザロホップ	344.1	345.1	299.1	86	29	50	オリサストロビン	391.2	392.2	205.2	66	23
16	キザロホップ-p-テフルル	428.1	429.2	298.9	96	33	51	オリサストロビン代謝物	391.2	392.3	205.2	66	23
17	クロキントセットメキシル	335.1	336.1	192.1	86	41	52	シクロプロトリン	481.1	499.1	499.1	71	11
18	クロフェンテジン	302.0	303.1	138.1	71	23	53	ジノテフラン	202.1	203.1	129.2	51	19
19	クロメプロップ	323.1	324.1	203.0	66	25	54	バリダマイシン	497.2	498.3	178.2	81	41
20	クロロクスロン	290.1	291.2	72.1	96	47	55	ピロキロン	173.1	174.1	132.2	1	35
21	シクロエート	215.1	216.2	154.2	56	21	56	フェリムゾン(E)	254.2	255.2	132.2	56	31
22	シフルフェナミド	412.1	413.1	295.1	76	23	57	フェリムゾン(Z)	254.2	255.2	90.9	91	47
23	シプロジニル	225.1	226.1	108.1	101	39	58	フェントラザミド	349.1	350.1	197.2	71	13
24	ジメチリモール	209.2	210.2	71.2	81	49	59	ブプロフェジン	305.2	306.2	201.2	51	19
25	シラフルオフェン	408.2	426.2	287.1	56	17	60	フラメトビル	333.1	334.2	157.3	91	43
26	チアクロプリド	212.0	253.1	126.0	81	31	61	プロクロラズ	375.0	378.1	310.0	51	19
27	チアメトキサム	291.0	292.1	181.1	71	33	62	プロベナゾール	223.0	224.0	41.2	66	27
28	メソミル	162.1	163.1	88.0	51	15	63	ベンダズン	240.1	241.1	224.1	36	13
29	メソミルオキシム	105.0	106.1	58.1	51	21	64	メタアルデヒド	176.1	194.1	62.1	31	13
30	テブフェノジド	352.2	353.3	133.1	56	29	65	クロチアニジン	249.0	-247.9	-58.0	-55	-26
31	トリチコナゾール	317.1	318.2	70.1	76	41	66	フィプロニル	435.9	-435.0	-329.9	-65	-20
32	トリフルムロン	358.0	359.0	156.1	71	25	67	C P T	196.0	-195.0	-42.1	-30	-16
33	ノバルロン	492.0	493.0	158.0	96	31	68	フサライド	269.9	-271.0	-242.7	-50	-18
34	ピリフタリド	318.1	319.1	139.0	91	43	69	フラメトビル代謝物	349.1	-348.1	-128.9	-90	-30
35	フェノブカルブ	207.1	208.2	95.0	61	23	70	2,4,6-トリクロロフェノール	195.9	-196.9	-59.1	-60	-11

MW : 単一同位体による分子量(C1=35)

DP : Declustering potential (V)

CE : Collision Energy (eV)

表5 マトリックス標準溶液と標準溶液のピーク面積比

No.	化合物名	マトリックス標準液/標準液(%) *					平均値
		玄米	大豆	ほうれんそう	オレンジ	茶	
1	アシベンゾラルSメチル	117	84.5	85.0	106	0.0	98.4
2	アゾキシストロビン	103	103	103	101	89.5	100
3	アベルメクチンB1a	130	86.0	84.0	88.5	96.0	96.9
4	アベルメクチンB1b	116	112	81.5	165	214	138
5	アルジカルブ	89.0	104	113	111	108	105
6	アルジカルブスルホキシド	110	112	108	110	104	109
7	アルジカルブスルホン	111	108	111	113	116	112
8	イソキサフルトール	98.5	83.0	94.5	77.0	100	90.7
9	イプロバリカルブ	118	103	114	105	106	109
10	イミダクロプリド	91.0	113	108	76.2	44.5	86.7
11	エボキシコナゾール	81.0	103	106	91.0	86.5	93.6
12	オキサミル	116	102	113	102	103	107
13	カルプロバミド	82.5	93.5	102	100	110	97.8
14	キザロホップエチル	75.5	88.5	102	103	96.0	93.2
15	キザロホップ	83.5	103	108	84.0	89.5	93.7
16	キザロホップ-p-テフリル	47.6	107	103	101	120	95.9
17	クロキントセツトメキシル	101	112	111	111	118	110
18	クロフェンテジン	65.0	73.0	97.0	78.0	98.0	82.2
19	クロメプロップ	73.0	99.5	85.0	86.0	123	93.3
20	クロロクスロン	105	108	115	95.5	114	107
21	シクロエート	108	102	104	114	93.0	104
22	シフルフェナミド	74.5	82.5	100	84.0	87.0	85.7
23	シプロジニル	91.0	104	108	107	107	103
24	ジメチリモール	107	103	107	103	107	105
25	シラフルオフェン	57.0	58.0	55.5	53.0	67.5	58.2
26	チアクロプリド	90.0	95.5	101	81.0	75.0	88.6
27	チアメトキサム	89.0	102	106	55.5	127	96.2
28	メソミル	114	98.0	109	84.5	80.5	97.3
29	メソミルオキシム	103	104	113	108	114	108
30	テブフェノジド	92.5	109	116	72.0	115	100
31	トリチコナゾール	98.5	108	107	90.0	104	101
32	トリフルムロン	83.5	79.0	98.5	102	107	94.1
33	ノバルロン	84.0	85.5	93.5	65.5	68.5	79.4
34	ピリフタリド	100	105	120	108	110	109
35	フェノブカルブ	97.5	106	107	107	107	105
36	フェンアミドン	85.5	104	112	97.5	74.5	94.8
37	フェンメディファム	101	93.0	110	105	106	103
38	フルフェノクスロン	96.5	82.5	90.5	93.0	109	94.4
39	プロバキサホップ	91.0	89.0	97.0	103	101	96.3
40	ヘキシチアゾクス	70.0	89.0	81.0	24.8	78.5	68.7
41	ボスカリド	83.0	105	113	109	102	102
42	メタベンズチアズロン	93.0	115	107	82.5	114	102
43	メトキシフェノジド	111	101	109	64.0	101	97.5
44	ラクトフェン	95.0	74.5	83.5	91.0	92.5	87.3
45	アシベンゾラル酸	128	101	100	100	72.5	100
46	オリザリン	110	98.0	86.0	95.0	83.0	94.4
47	ルフェヌロン	142	105	98.0	117	93.5	111
48	エチプロール	89.0	102	121	100	100	102
49	オキサジクロメホン	106	91.0	104	108	103	102
50	オリサストロビン	103	92.5	103	102	93.5	98.9
51	オリサストロビン代謝物	103	106	114	98.0	111.5	106
52	シクロプロトリン	505	260	34.5	66.0	3740	921
53	ジノテフラン	100	110	113	100	81.5	101
54	バリダマイシン	-	-	-	-	-	-
55	ピロキロン	99.5	101	111	95.0	81.0	97.6
56	フェリムゾン (E)	-	-	-	-	-	-
57	フェリムゾン (Z)	-	-	-	-	-	-
58	フェントラザミド	64.5	105	99.0	107	115	98.3
59	ブプロフェジン	105	95.5	95.5	95.5	105	99.4
60	フラメトビル	100	112	120	110	109	110
61	プロクロラズ	83.5	99.5	106	91.5	107	97.6
62	プロベナゾール	90.0	-	23.7	110	43.5	66.8
63	ベンダゾン	90.5	2.4	24.3	97.5	56.0	54.1
64	メタアルデヒド	101	105	116	110	110	108
65	クロチアニジン	100	96.0	76.0	64.0	58.0	78.8
66	フィプロニル	112	102	110	116	109	110
67	C P T	107	98.5	99.5	116	59.5	96.2
68	フサライド	110	104	114	118	108	111
69	フラメトビル代謝物	98.0	105	96.0	1.6	84.0	76.9
70	2,4,6-トリクロロフェノール	-	-	-	-	-	-
70%以上120%以下の化合物数		58	62	61	57	54	

* () 書きの内容については表4と同様。

について 0.01 µg/g の添加回収試験を実施した。

添加回収試験結果および玄米に添加した標準品のピーク高さから得られた定量限界を表 4 に示した。なお、5 種の作物で定量下限が 0.01ppm が得られた化合物では、定量に支障を与えるような妨害ピークはみられなかった。

定量限界については、全ての作物で 0.01 µg/g を満足したものは 52 化合物で相対標準偏差(RSD)はおおむね 20% 未満であった。

全ての作物で 0.01ppm の定量下限が得られ、国で示された妥当性評価の適正範囲⁵⁾である 70~120%の回収率が得られた化合物数は作物別に 39~58 であった。当所のスクリーニング試験法に用いている 50~130%の回収率が全ての作物で得られた化合物数は 46 化合物 (40 農薬) であった。回収率が低下した原因について、試料中のマトリックスがイオン化に影響を及ぼしたことが考えられたため、標準品未添加の 5 種の作物を本法にしたがって抽出し、濃縮乾固した後 0.1 µg/mL の標準溶液を 1mL 加えてマトリックス標準溶液を作製し、標準溶液とのピーク面積比を算出した。その結果を表 5 に示したが、作物ごとにピーク面積比が 70~120%で影響が見られない化合物数は作物別で 54~62 で、一部の化合物ではマトリックスの影響を受けていた。農薬が検出された際にはマトリックス標準液での定量を行うことでより正確な定量値を得ることができた。

これらのことから、本法は塩析やカラム処理による精製工程がないため、マトリックスの影響を受ける化合物が一部に見られるが、簡易かつ迅速に分析できることから、一律基準の確認が可能で、回収率が 50%以上の 46 化合物 (40 農薬) について、スクリーニング試験として適用可能で、農薬の多成分分析法としても有効であると考えられた。

文献

- 1)厚生労働省通知食安発第 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について、平成 17 年 1 月 24 日
- 2)小西友彦, 赤木浩一, 畑野和広：LC/MS/MS による農産物中の残留農薬の一斉分析, 福岡市保健環境研究所報, 31, 99~105, 2006
- 3)小西友彦, 中村正規：LC-MS/MS による農産物中の残留農薬の一斉分析(2008), 福岡市保健環境研究所報, 34, 105~109, 2009
- 4)小西友彦, 中村正規, 内山賢二：福岡市におけるマーケットバスケット調査方式による食品中の残留農薬の一日摂取量調査(2008), 福岡市保健環境研究所報, 34, 87~94, 2009
- 5)厚生労働省通知食安発第 1115001 号：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