



畜産物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討 -LC/MS/MS編-

株式会社アイスティサイエンス ○谷澤春奈 佐々野僚一

AiSTI SCIENCE

検討内容

■ 脂肪を溶解するアセトン抽出溶媒として使用

融解脂肪を用いた抽出状況の評価を実施

*食品中残留農薬公示試験法の進歩:食衛誌Vol.51, No.6 根本先生の資料p.358を参考

■ 液液分配による脱脂効果の検討

遠心分離によりアセトン層(上層)と試料層(中間層)の間に脂質の層が形成され、脱脂が可能。

■ 固相ミニカラムによる脱脂・精製の検討

・脂質中の大部分を占める脂肪酸を除去するため、

1) PSA, 2) SAX+PSA, 3) GCS(グラファイトカーボン)+PSAを比較

・脂質や低極性成分を除去するため、C18を使用

対象農薬

●極性農薬:64種

製品名	農薬数	濃度
アセフェートなど高極性農薬	64種	2ppm

* 林純薬工業社製の単品農薬を自社でMIX

●ポジティブリスト制 LC/MS対象農薬:145種

製品名	農薬数	濃度
農薬混合標準液 53	29種	10ppm
農薬混合標準液 54	28種	10ppm
農薬混合標準液 58	35種	10ppm
農薬混合標準液 45	19種	10ppm
農薬混合標準液 55	34種	10ppm

*いずれも関東化学社製

合計 209種

前処理フロー

検討①

試料 10g + 水 2mL
— アセトン 10mL

ホモジナイズ

検討②

— NaCl (食塩) 1g
— クエン酸3Na2水和物 1g
— クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
— MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

アセトン層/脂質層/試料層/水層

冷凍 (30分間)

アセトン層を分取

検討③

0.5mL (試料0.5g相当) 分取

— アセトニトリル-トルエン (3/1) 0.5mL

固相SAX-30mg+PSA-30mg (精製)

— 洗液 アセトニトリル-トルエン (3/1) 0.5mL

濃縮・乾固

— メタノール 0.8mL + 水 0.2mL

固相C18-50mg (精製)

— 洗液 メタノール-水 (4/1) 0.9mL

定容 2mL (メタノール-水で定容: 4倍希釈)

LC/MS/MS測定

検討① 融解脂肪を用いた抽出状況の評価

牛脂 2gを加熱して融解

← 農薬添加 ①

再凝固 (冷蔵庫で30分)

← 農薬添加 ②

— アセトン 10mL

ホモジナイズ

— 水 10mL

— 塩類 4種添加

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

冷凍 (30分間)

アセトン層を0.5mL分取

← 農薬添加 ③

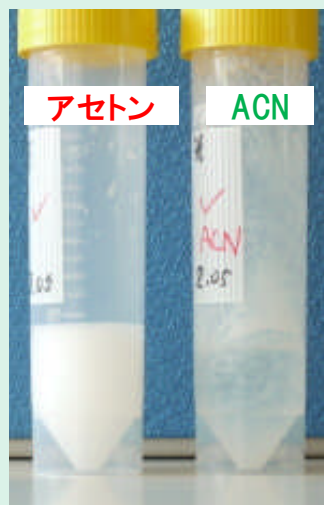
固相抽出

← 農薬添加 ④

LC/MS/MS



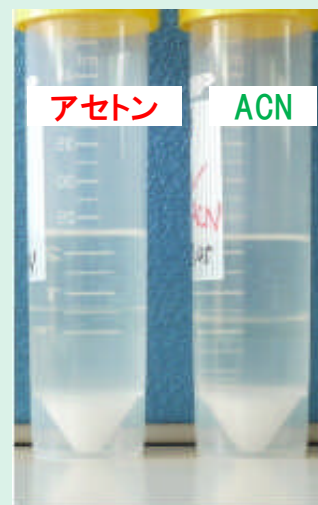
① 振とう後



アセトン: 白濁し混合

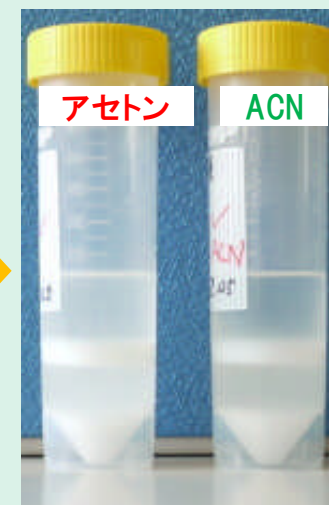
ACN: 脂肪分がPP
チューブ内部表面に
付着

② 遠心分離後



水10mL添加後、遠
心分離の後は、ア
セトンもACNも大差
なし

③ 冷凍後



アセトンもACNも
大差なし

検討①

評価結果

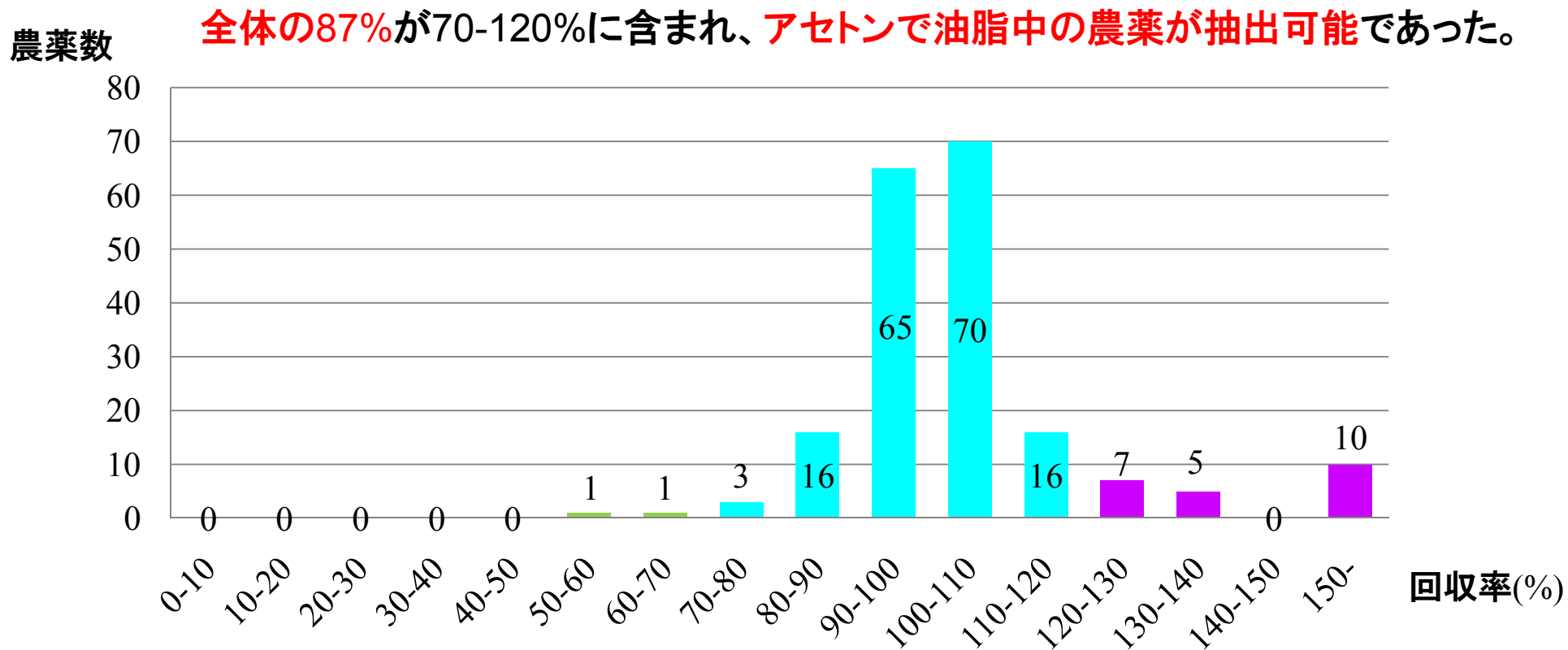
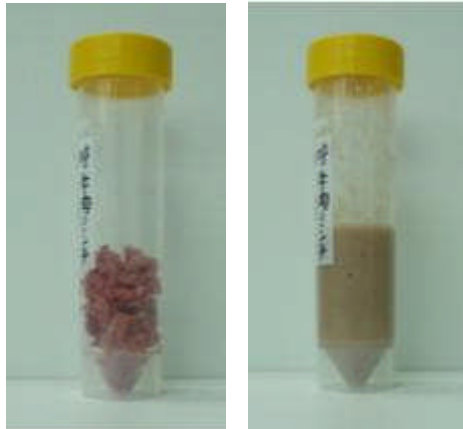


表1. 添加②(再凝固後添加)の回収率を100としたときの、添加①(融解後添加)の回収率分布

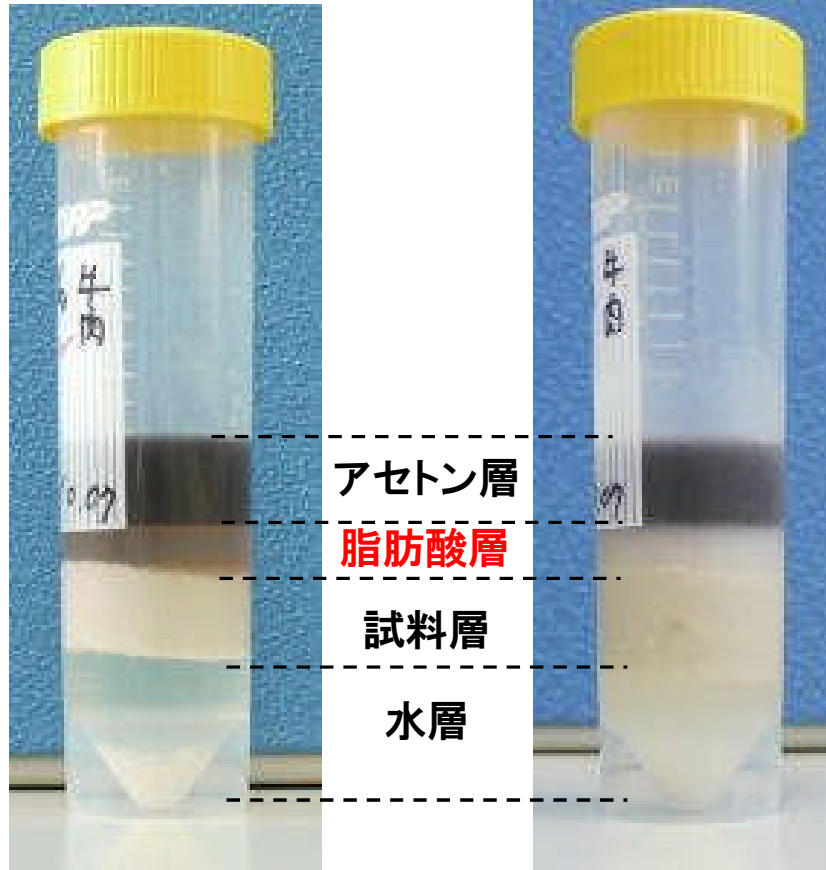
検討② 液液分配時の脱脂効果



牛肉ミンチ



①試料採取 ②ホモジナ
イズ後



③遠心分離後 ④冷凍後

【物性】

アセトン
比重:0.79
融点:-94℃

脂肪酸
パルミチン酸
比重:0.85
融点:63℃
オレイン酸
比重:0.89
融点:13℃

- 遠心分離によりアセトン層の下に脂肪酸層が分離され、この工程で**大部分の脂肪酸を取り除くことができた**

牛肉の成分について

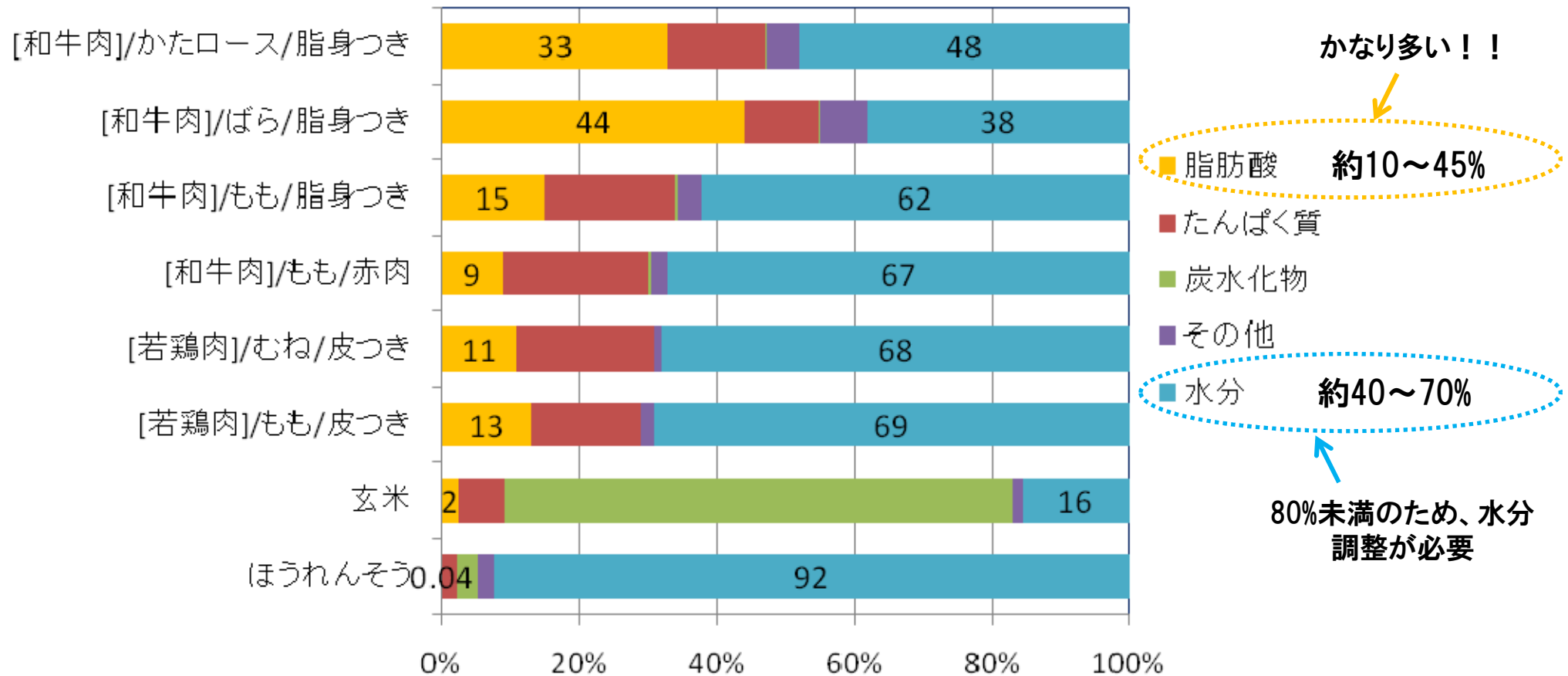
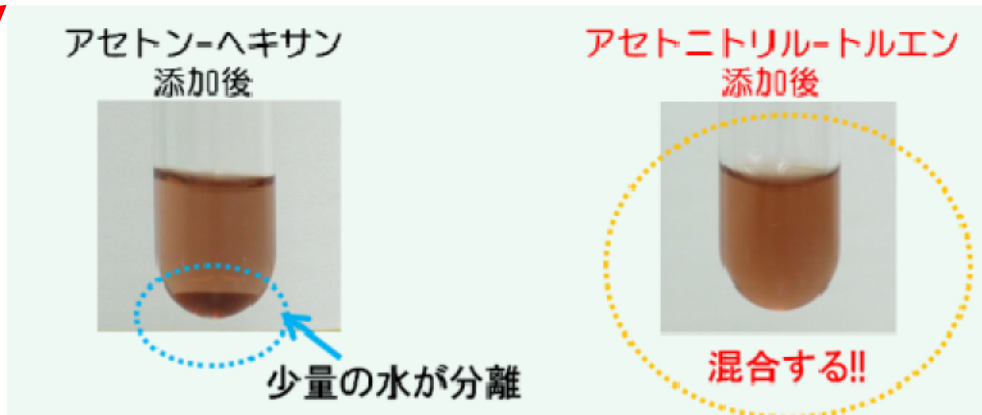


図1. 食品成分比表

検討③ 固相ミニカラムによる精製・脱脂

●アセトニトリル-トルエン (3/1) を用いた理由



●固相の比較

PSA $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
 N-プロピルエチレンジアミン
 一次相互作用：極性・陰イオン交換

SAX $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
 トリメチルアミノプロピル
 一次相互作用：陰イオン交換

GCS
 グラファイトカーボン
 一次相互作用：平面構造、無極性

アセトン層 0.5mL (試料0.5g相当) 分取
 — アセトニトリル-トルエン (3/1) 0.5mL

- ① **PSA-30mg**
- ② **SAX-30mg+PSA-30mg**
- ③ **GCS-20mg+PSA-30mg**

— 洗液 アセトニトリル-トルエン (3/1) 0.5mL

濃縮・乾固

— メタノール 0.8mL + 水 0.2mL

固相C18-50mg (精製)

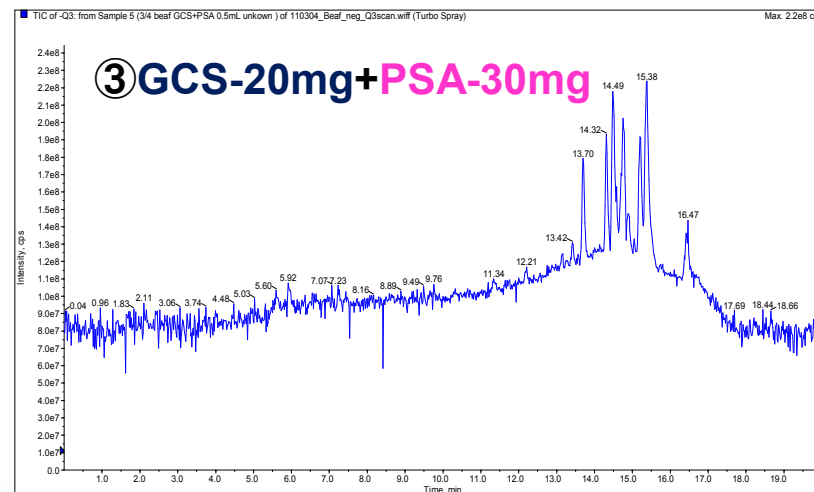
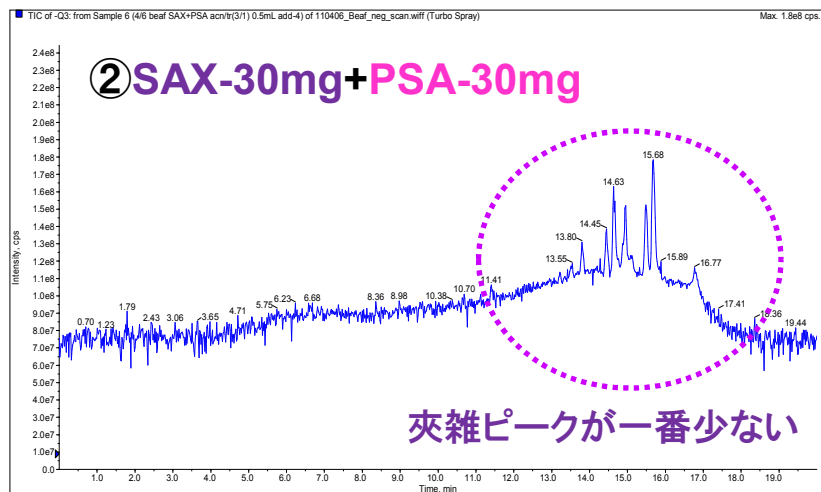
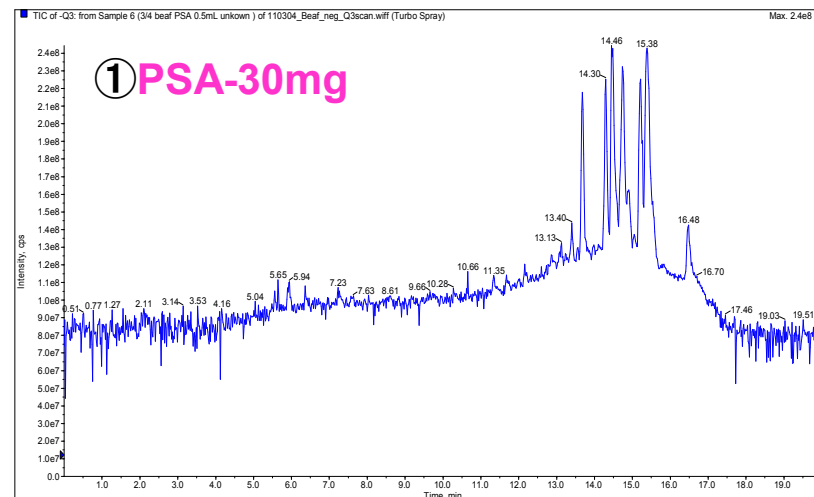
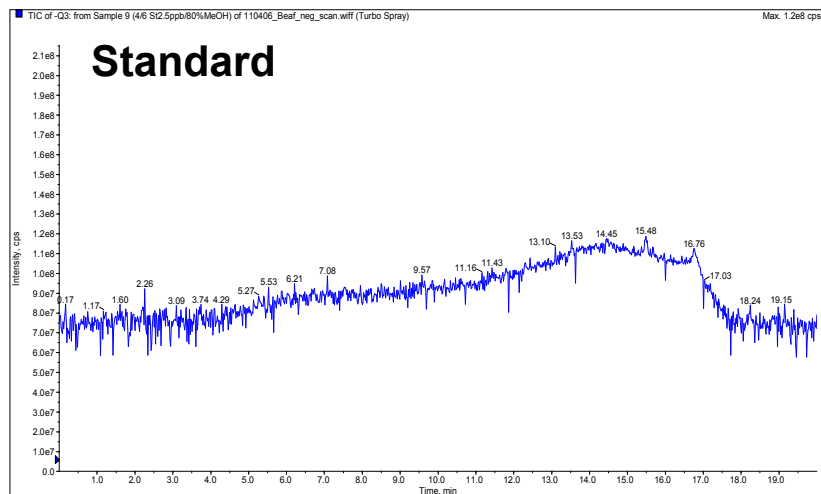
— 洗液 メタノール-水 (4/1) 0.9mL

定容 2mL (メタノール-水で定容)

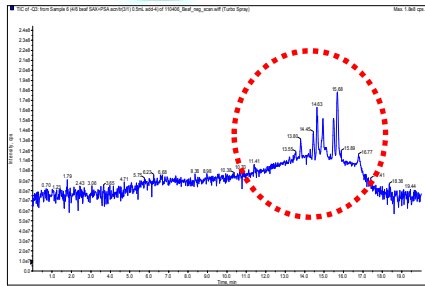
LC/MS/MS測定

Q3-SCANクロマトグラム

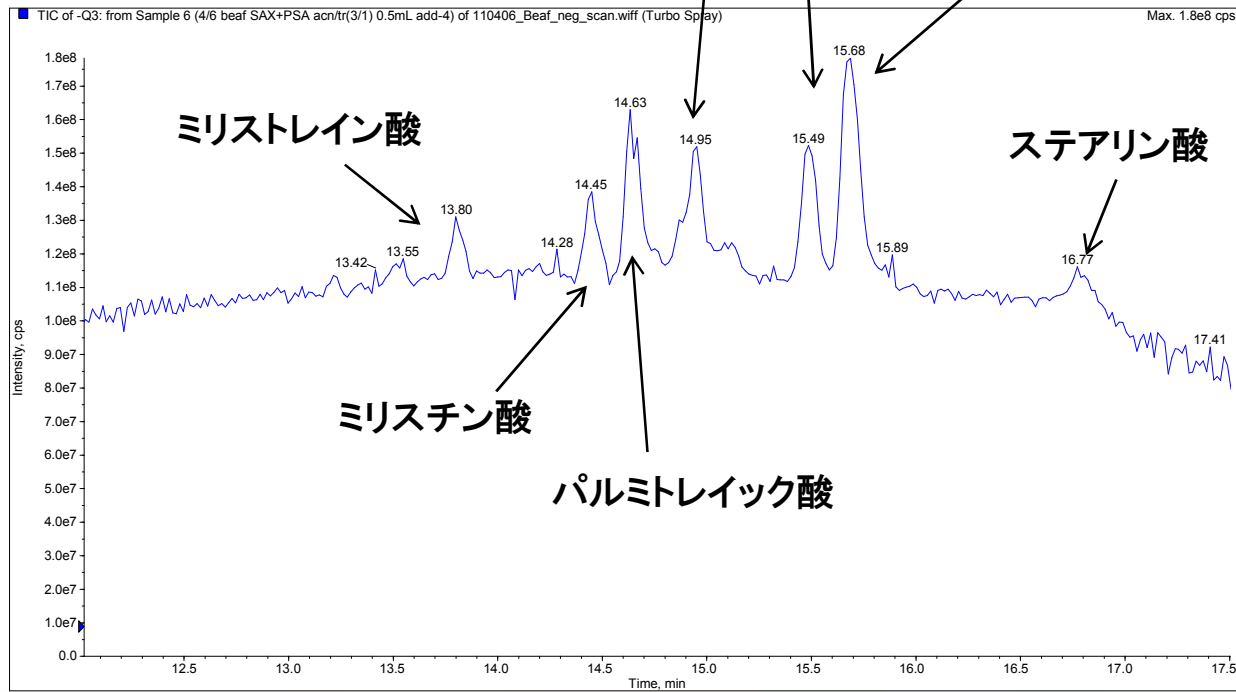
Negative-mode m/z=60-500



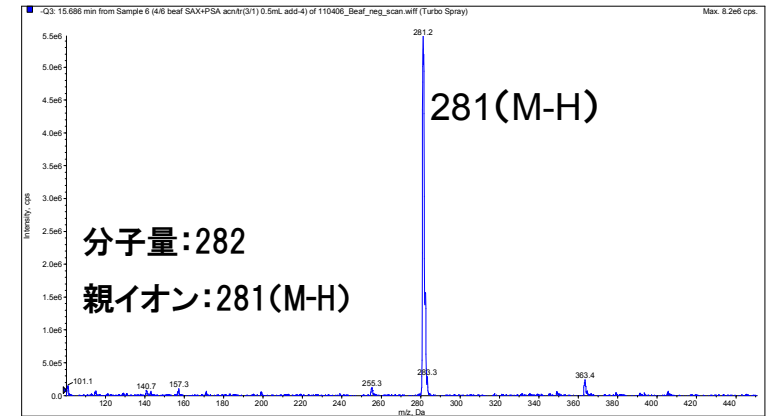
SAX+PSAの Q3-SCANクロマトグラム(Negative-mode)



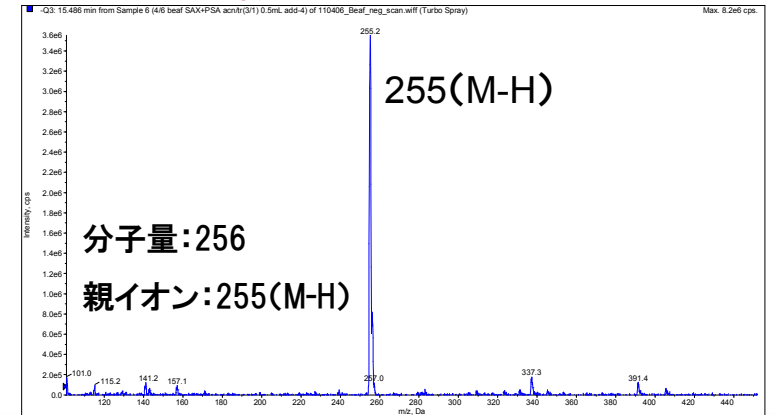
拡大



● オレイン酸のスペクトル



● パルミチン酸のスペクトル



牛肉の脂肪酸について

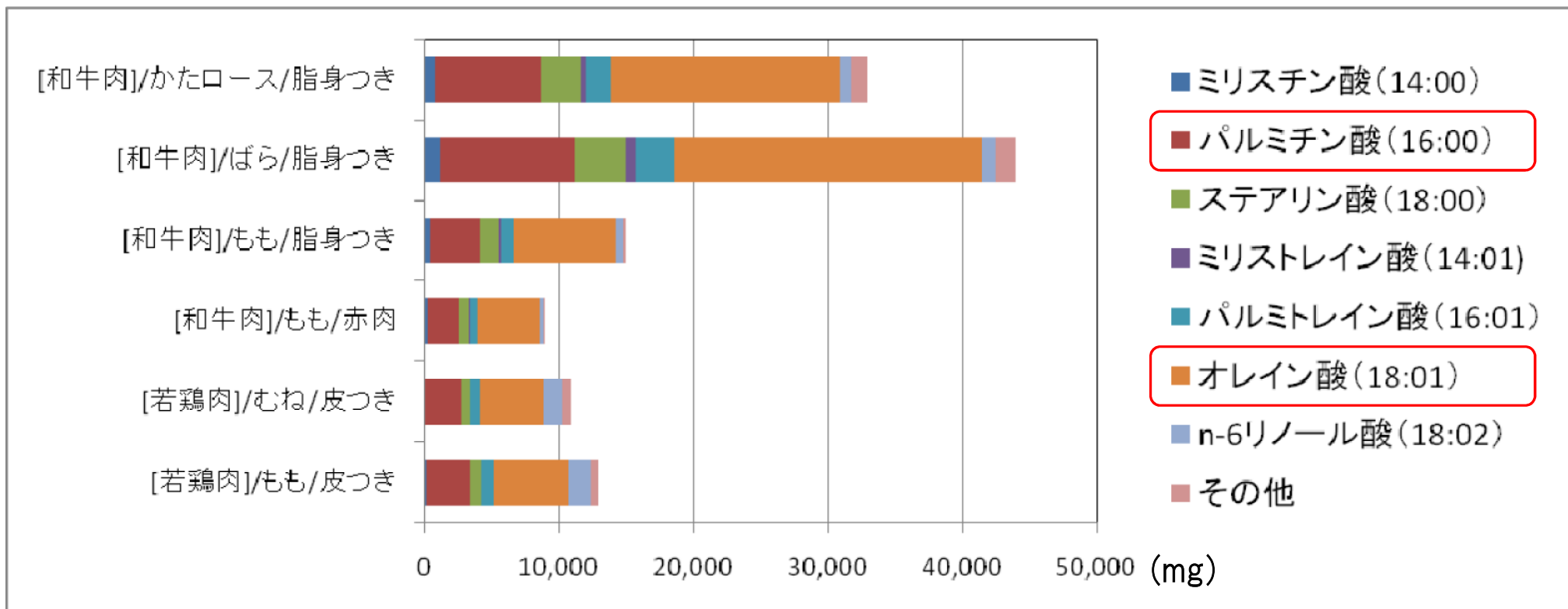


図2. 食品100g中の脂肪酸量

LC/MS/MS測定条件

装置	MS : API 3200 system (AB SCIEX) LC : Prominence (SIMADZU)
分析カラム	L-column2 2.0×150mm 3.0μm (化学物質評価研究機構)
移動相	A : 0.5mM酢酸アンモニウム水溶液 B : 0.5mM酢酸アンモニウム含有メタノール
グラジエント条件	B conc. (%) Pos : 10%→50% (0-1min) →98% (1-17min) →98% (17-23min) →10% (23-30min) Neg : 10%→50% (0-2min) →98% (1-10min) →98% (10-13min) →10% (13-20min)
分析時間	30min (Positive) , 20min (Negative)
流速	0.2mL/min
注入量	5μL
イオン化モード	ESI Positive/Negative
イオンスプレー電圧	5500V (Pos) / -4500V (Neg)
イオンソース温度	350°C
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring) Q3 SCAN (m/z : 60-500) (Negative)

添加回収試験結果①

試料:牛肉ミンチ 試料中添加濃度:0.01ppm (n=5)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)
1	1-Naphthylacetamide	100.5	9.3	98.7	26	Chloridazon	95.8	5.0	103.6	51	Difenoconazole	101.3	6.1	91.1
2	3-Hydroxycarbofuran	94.0	8.6	67.3	27	Chlorimuron-ethyl	68.1	6.3	90.3	52	Diflubenzuron	96.3	2.4	103.1
3	Abamectin	73.5	5.5	94.1	28	Chlorsulfuron	36.9	12.2	82.8	53	Dimethirimol	82.6	7.2	96.1
4	Acephate	83.5	12.8	90.3	29	Chlorxuron	106.8	7.8	97.2	54	Dimethoate	102.5	11.6	87.4
5	Acetamiprid	108.3	5.5	100.3	30	Chromafenozide	107.2	10.5	96.3	55	DimethomorphE	95.7	10.2	100.5
6	Acibenzolar-S-methyl	77.2	7.2	99.5	31	Cinosulfuron	51.7	27.8	89.2	56	DimethomorphZ	111.3	6.8	109.4
7	Aldicarb	112.3	12.3	93.5	32	Clofentezine	89.6	6.6	120.0	57	Dimeton-s-methyl	103.6	16.1	91.8
8	Aldoxycarb	97.1	6.1	92.6	33	Clomeprop	84.6	2.2	90.9	58	Diuron	89.8	6.0	97.9
9	Anilofos	90.3	3.8	98.3	34	Cloquintocet-mexyl	88.0	6.1	99.2	59	Dymuron	110.1	9.9	108.9
10	Aramite	91.7	5.3	94.6	35	Cloransulam-methyl	53.6	29.0	139.1	60	Epoxiconazole	95.3	7.2	95.3
11	atrazine	98.7	7.1	100.2	36	Clothianidin	89.2	11.8	88.8	61	Epoxiconazole	101.3	6.5	110.7
12	Azamethiphos	55.5	18.1	103.9	37	Cumyruon	107.0	6.4	99.3	62	Ethametsulfuron-methyl	40.5	33.8	90.3
13	Azimsulfuron	71.2	17.4	98.9	38	cyanazine	113.2	7.4	103.6	63	Fenamidone	103.3	4.7	105.8
14	Azinphos-methyl	124.5	13.4	103.1	39	Cycloate	72.9	11.5	67.8	64	Fenamiphos	102.8	7.7	97.9
15	Azoxystrobin	98.8	9.5	95.0	40	Cyclosulfamuron	72.4	15.0	103.4	65	Fenbuconazole	95.4	13.6	104.0
16	Bendiocarb	97.6	10.2	95.5	41	Cyflufenamide	103.1	4.5	96.8	66	Fenhexamid	89.3	6.2	108.7
17	Bensulfuron-methyl	65.1	15.2	111.5	42	Cyproconazole-1	112.0	10.3	114.8	67	Fenobucarb	104.5	9.4	103.0
18	Benzofenap	88.8	4.3	96.4	43	Cyproconazole-2	113.5	7.3	115.6	68	Fenoxycarb	105.8	5.4	110.7
19	Bitertanol	97.7	17.0	88.2	44	Cyprodinil	88.7	4.4	104.7	69	Fenpyroximate E	75.3	4.0	95.8
20	Boscalid	102.7	6.3	109.6	45	Daimuron	110.1	9.9	108.9	70	Fenpyroximate Z	75.4	4.9	97.5
21	bromacil	67.5	34.2	82.9	46	DDVP2	72.7	16.3	117.3	71	Fensulfotion	99.0	6.3	95.7
22	Butafenacil	101.0	5.2	98.0	47	Di-allate	75.3	18.0	77.9	72	Ferimzone EandZ	91.0	5.4	96.1
23	Carbaryl	110.5	5.4	104.5	48	Dichlosulam	53.4	20.0	88.4	73	Flazasulfuron	56.6	22.5	117.9
24	Carbofuran	144.0	4.4	113.8	49	Diclomezine	107.6	2.9	114.2	74	Florasulam	60.2	20.0	107.4
25	Carpropamide	98.1	3.5	98.7	50	Diclotopos	104.1	11.5	108.0	75	Fluazifop	0.0	-	93.0

添加回収試験結果②

試料:牛肉ミンチ 試料中添加濃度:0.01ppm (n=5)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)
76	Flufenacet	105.4	7.9	104.4	101	Indoxacarb	96.4	6.8	95.0	126	Norflurazon	98.7	4.2	96.4
77	Flufenoxuron	90.9	4.7	94.0	102	Iodosulfuron-methyl	60.0	17.9	84.7	127	Novaluron	92.8	5.4	86.8
78	Flumetsulam	16.9	55.9	92.7	103	lprovalicarb	103.5	15.4	89.1	128	oxadixyl	107.1	13.4	110.6
79	Fluridon	100.4	5.9	102.6	104	Isoproc carb	103.9	11.4	100.3	129	Oxamyl	108.7	12.8	94.4
80	Fluridone	104.2	6.9	98.0	105	Isoxaflutole	3.6	13.9	95.7	130	Oxaziclomefone	92.9	4.5	101.4
81	Flusilazole	103.6	10.5	87.8	106	Lactofen	109.8	4.5	120.7	131	Oxycarboxin	96.7	14.6	90.1
82	Flutriafol	118.9	6.2	114.9	107	Lenacil	93.8	5.9	96.7	132	Pencycuron	87.1	4.3	95.4
83	Foramsulfuron	13.0	54.6	90.1	108	Linuron	107.7	9.7	106.4	133	Penoxsulam	66.4	14.1	109.5
84	Forchlorfenuron	109.3	3.4	110.9	109	Lufenuron	102.3	10.0	106.2	134	Phenmedipham	103.5	7.0	95.8
85	Fosthiazate	96.7	5.6	94.6	110	Mepanipyrim	78.7	5.5	80.3	135	PhosphamidoneE	102.0	11.0	100.6
86	Furametpyr	102.7	6.7	107.6	111	Mesosulfuron-methyl	57.4	20.5	86.9	136	PhosphamidoneZ	99.6	10.3	103.0
87	Furathiocarb	44.6	9.2	101.1	112	Methabenzthiazuron	97.1	5.5	93.5	137	Primicarb	112.4	6.0	115.4
88	Halosulfuron-methyl	85.7	9.5	104.2	113	Methamidophos	38.1	9.7	47.6	138	Propaquizafop	83.3	1.5	90.5
89	Haloxyfop	0.0	-	102.2	114	Methiocarb	99.3	8.2	93.8	139	propoxur	109.8	10.6	99.2
90	Hexaconazole	91.7	17.6	107.9	115	Methomyl	162.3	9.4	94.1	140	Propoxycarbazone	80.6	8.9	103.7
91	Hexaflumuron	99.4	5.1	87.0	116	Methoxyfenozide	119.8	8.0	113.6	141	Pyraclostrobin	95.1	9.8	95.1
92	hexazinon	100.9	7.2	107.2	117	Metosulam	12.9	51.4	97.8	142	Pyrazolynate	89.0	6.9	91.8
93	Hexythiazox	75.4	3.4	92.1	118	Metsulfuron-methyl	58.9	31.1	115.0	143	Pyrazosulfuron-ethyl	81.6	8.1	90.9
94	Imazalil	86.5	7.8	104.5	119	mevinphosE	104.3	17.8	97.3	144	Pyrifthalid	100.9	5.4	101.8
95	imazamethabenz-methyl	100.0	10.3	95.0	120	mevinphosZ	105.8	12.8	110.3	145	pyroquilon	88.1	8.4	92.1
96	Imazaquin	0.0	-	90.8	121	monocrotophos	99.2	9.6	99.7	146	Quinoclamine	93.2	10.9	90.8
97	Imazosulfuron	87.0	35.6	94.9	122	Monolinuron	91.2	10.8	86.4	147	Quizalofop-ethyl	90.5	4.0	103.9
98	Imibenconazole	134.2	14.9	150.4	123	Myclobutanil	96.0	7.3	100.0	148	Silafluofen	0.0	-	101.6
99	Imidacloprid	95.3	7.9	98.1	124	Naproanilide	104.7	1.8	106.9	149	Simazine	113.2	3.0	114.2
100	Indanofan	97.8	10.2	90.1	125	Naptalam	0.0	-	78.0	150	Simeconazole	99.4	5.8	97.1

添加回収試験結果③

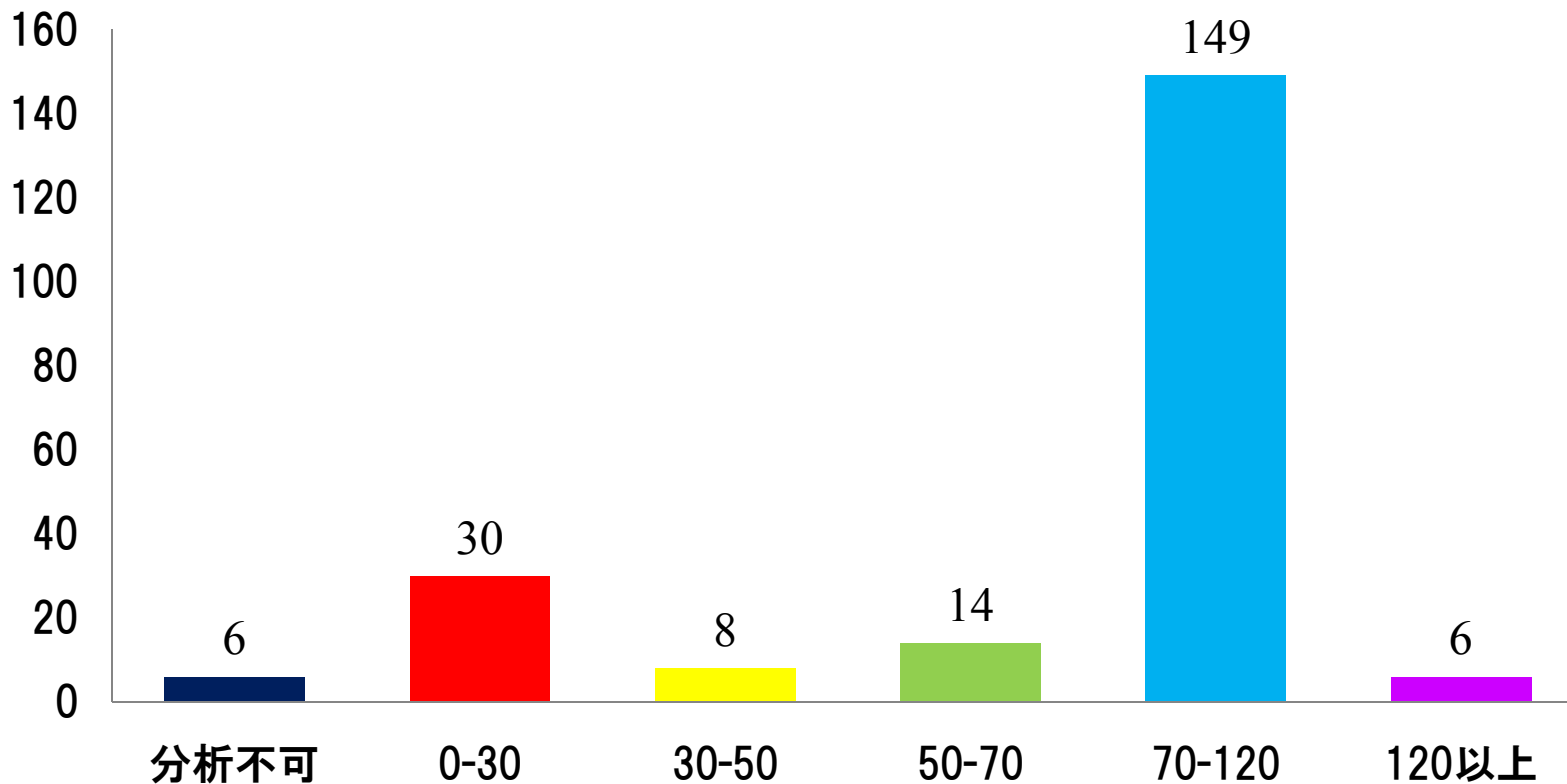
試料:牛肉ミンチ 試料中添加濃度:0.01ppm (n=5)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	spike 回収率 (%)
151	Simetorin	97.4	7.7	103.8	175	Tridemorph Z	0.0	-	98.5	Neg	MCPB	0.0	-	118.7
152	Spinosyn A	3.7	73.3	102.1	176	Trifloxysulfuron	47.8	31.5	114.9	Neg	MCPB (Mecoprop)	0.0	111.7	103.5
153	Spinosyn D	0.9	105.0	95.4	177	Triflumuron	101.5	8.8	97.2	Neg	Methoxyfenozide	100.4	6.0	105.7
154	Spiroxamine-A	12.5	54.5	96.4	178	Trifluzamide	75.2	9.5	88.8	Neg	Naphthaleneacetic acid	0.0	-	123.3
155	Spiroxamine-B	18.3	42.5	108.3	179	Triticonazole	97.8	7.8	100.8	Neg	Naproanilide	94.2	3.2	99.4
156	Sulfentrazone	93.1	10.7	111.2	180	XMC	106.9	13.7	98.7	Neg	Norflurazon	98.1	6.7	106.8
157	Sulfosulfuron	85.2	25.7	95.2						Neg	Oryzalin	101.8	7.0	103.8
158	Tebufenozide	97.4	5.5	89.1	Neg	2-4-D	0.0	-	100.3	Neg	Thidiazuron	82.6	10.1	98.9
159	Tebuthiuron	96.9	9.3	88.6	Neg	2-4-DP (Dichlorprop)	0.0	-	118.9	Neg	Triclopyr	0.0	-	109.8
160	Teflubenzuron	81.4	9.7	97.8	Neg	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.0	-	104.4	Neg	Trifluzamide	105.5	7.1	102.2
161	terbacil	98.3	15.5	109.5	Neg	Acifluorfen	6.6	75.7	133.9					
162	Tetrachlorvinphos	100.6	7.5	101.8	Neg	Bromoxynil	30.2	35.7	105.0		感度が悪くて分析不可			
163	Tetraconazole	108.6	19.0	95.1	Neg	Cloprop	0.0	-	103.9	Pos	carboxin	-	-	-
164	Thiabendazole	93.5	4.9	113.8	Neg	Cyclanilide	6.1	72.1	109.5	Pos	Clofencet	-	-	-
165	Thiacloprid	96.6	4.6	95.0	Neg	Dichlorprop	0.0	-	118.9	Pos	Ethoxysulfuron	-	-	-
166	Thiamethoxam	95.0	13.4	91.1	Neg	Dicloran	98.4	12.4	91.0	Pos	Fenoxaprop-ethyl	-	-	-
167	Thidiazuron	86.6	19.7	89.8	Neg	Dimethipin	121.6	15.2	98.3	Pos	Iprodione	-	-	-
168	Thifensulfuron-methyl	53.2	15.3	103.4	Neg	Fluroxypyr	0.0	-	107.5	Neg	Formothion	-	-	-
169	Thiodicarb	0.0	-	97.8	Neg	Fomesafen	90.0	7.3	98.7					
170	Tralkoxydim	105.3	2.8	112.5	Neg	Gibberellin	0.0	-	101.2					
171	Triadimenol	122.8	12.5	118.5	Neg	Hexaflumuron	102.8	3.1	106.2					
172	Triasulfuron	46.8	19.7	95.5	Neg	loxynil	38.2	26.6	105.7					
173	Tricyclazole	95.7	5.4	107.7	Neg	Lufenuron	97.2	3.6	99.2					
174	Tridemorph E	0.0	-	99.5	Neg	MCPA	0.0	-	109.7					

添加回収試験による回収率分布

牛肉ミンチ 試料中添加濃度:0.01ppm

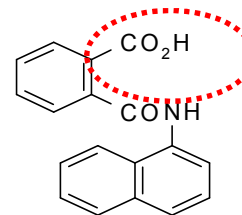
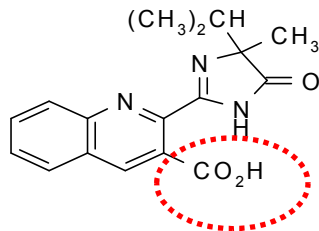
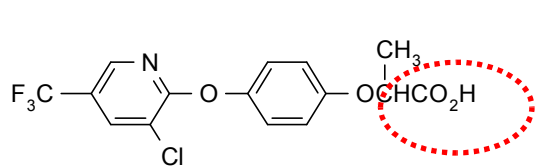
農薬数



回収率(%)

低回収率農薬の原因

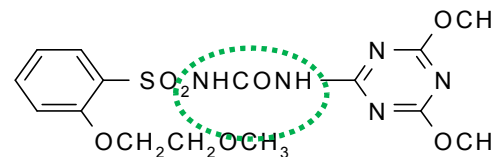
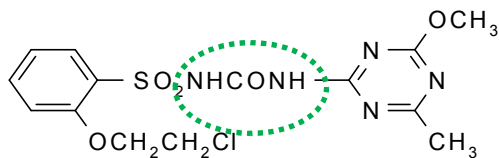
農薬名	LogKow	水溶解度	pKa
Haloxypop	1.34	43.4 mg/l	2.9
Imazaquin	0.34	60-120 mg/l	3.8
Naptalam	0.104 (pH 5), 0.004 (pH 7), -0.036 (pH 9)	200 mg/l	4.6



-COOHを持つ農薬はPSAにトラップされる

●回収率が0%

農薬名	LogKow	水溶解度	pKa
Triasulfuron	1.1 (pH 5.0), -0.59 (pH 6.9), -1.8 (pH 9.0) (25 °C)	32 (pH 5), 815 (pH 7), 13500 (pH 8.4) (mg/l, 25 °C)	4.64 (20 °C)
Trifloxysulfuron	-0.43 (pH 7, 25 °C)	5016 mg/l (pH 7, 25 °C)	4.76 (20 °C)
Cinosulfuron	2.04 (pH 2.1, 25 °C)	120 (pH 5.0), 4000 (pH 6.7), 19 000 (pH 8.1) (mg/l, 25 °C)	4.72



-CONH(酸アミド結合)を持つ農薬はPSAからの溶出が遅い

●回収率が40-50%

まとめ

LC/MS/MSを用いた畜産物(牛肉)中の残留農薬分析を目的とし、脂肪を溶解できるアセトンで抽出後、固相ミニカラムによる精製を行い、高～低極性農薬までを対象とした迅速一斉分析法を検討した。

- アセトンにより抽出される牛肉中の多量の脂肪酸(パルミチン酸やオレイン酸など:約10～40%)の除去の検討を行った。
- 遠心分離によりアセトン層の下に脂肪酸層が分離され、この工程で大部分の脂肪酸を取り除くことができた。
- SAX+PSAをアセトリル-トルエン(3:1)で用いることで、水分分離を起こさず脂肪酸を低減できた。
- pKaを持つような酸性農薬または酸アミド結合を持つような農薬を除いて、全体の7割以上の農薬で、70-120%の良好な回収率を得ることができた。
- スパイク回収率が全体の9割以上で70-120%以内と良好なことから、マトリックスによるイオン化阻害を受けずに精製ができていると推測された。