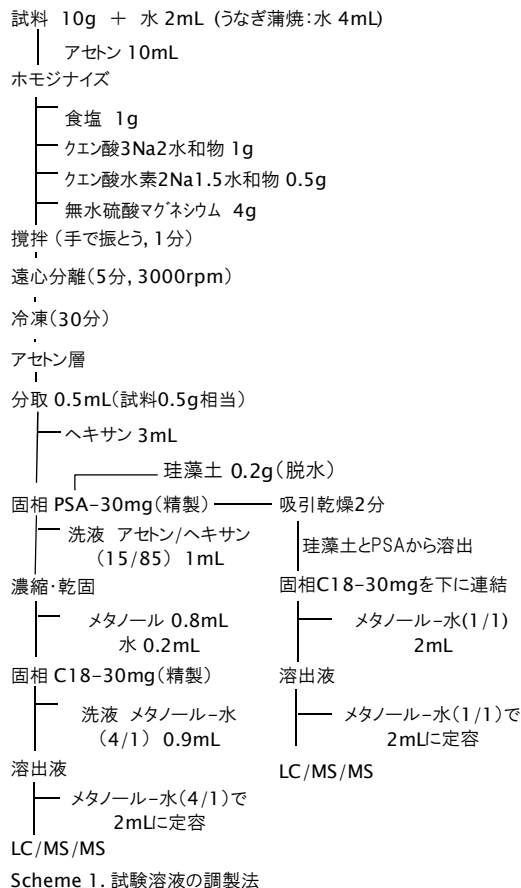


# 畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法の検討 - LC/MS/MS 編 -

○小西賢治 1), 栢木春奈 1), 佐々野僚一 1), 石井里枝 2)  
1)株式会社アイスティサイエンス, 2)埼玉県衛生研究所

【目的】畜水産物は夾雑成分に脂肪酸を多量に含んでおり、いかに精製効果を上げるかが前処理における課題となってくる。本研究では精製効果向上を目的として、抽出には前回<sup>1)</sup>同様、アセトンを用い、固相にPSAを選択し、溶出溶媒としてアセトン-ヘキサン混合溶媒を使用した。また、抽出液中に微量に含まれる水分を珪藻土に保持させ、メタノール-水で溶出させて添加回収試験を行なったので報告する。

【方法】1.試料：牛肉ミンチ，うなぎ蒲焼他，2.対象農薬：アセフェートなどの高極性農薬約60成分(林純薬社製)，農薬混合標準液



53,54,58,45,55 (関東化学社製) の約140成分, 添加濃度: 試料中濃度0.01ppm, 3.固相カートリッジ: Smart-SPE PSA-30,C18-30(アイスティサイエンス社製)

## 4.測定条件

装置	MS:API3200 (AB SCIEX) LC:Prominence (SHIMADZU)
カラム	L-column2 (粒径3μm, φ2.1×150mm) (化評研)
移動相	A液 0.5mM酢酸アンモニウム水溶液 B液 0.5mM酢酸アンモニウム含有メタノール
分析時間	メソッド①30分(Pos+), メソッド②20分(Neg-)
流速	0.2mL/min, 注入量 5μL
イオン化モード	ESI(+)(-)
測定モード	MRM

## 【結果と考察】

### 1. 溶媒による精製効果

PSAをアセトン-ヘキサン混合溶媒で用いることにより、SCANクロマトグラム上で脂肪酸除去効果の向上が確認できた。また、濃縮時間も短く、操作性が向上した。

### 2. 珪藻土による保持

珪藻土は水分を保持する性質を持っている。そこでアセトン抽出液中に微量に含まれる水分を保持させた。水分とともに高極性農薬も保持されたが、メタノール-水で溶出可能であった。

### 3. 添加回収試験

今回検討した農薬のうち、約75%が70 - 120%の範囲内で良好な回収率が得られた。また前回、結果が芳しくなかった酸性農薬についても良好な回収率が得られた。

【参考文献】1) 谷澤ら, 日本食品衛生学会第101回学術講演会要旨集



# 畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法の検討 -LC/MS/MS編-

○小西賢治<sup>1)</sup> 栢木春奈<sup>1)</sup> 佐々野僚一<sup>1)</sup> 石井里枝<sup>2)</sup>

1)株式会社アイスティサイエンス

2)埼玉県衛生研究所

AiSTI SCIENCE

## 背景と目的

- 畜水産物には脂質、脂肪酸が多く含まれているため、前処理によるこれらの除去が課題となる。
- アセトンによる油脂中の農薬の抽出が可能であったことから、抽出溶媒にアセトンを用いて一斉分析法の検討を行った。

参考文献：谷澤ら, 第101回日本食品衛生学会学術講演会要旨集

- PSAの精製効果を高めるためにアセトニトリル-トルエンの代わりにアセトン-ヘキサンを精製溶媒として選択

# 検討内容

## 畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法の検討

### ① PSAによる精製効果の比較

- ・ A) アセトン-ヘキサン、B) アセトニトリル-トルエンを比較

### ② アセトン抽出液中の微量な水分の対策

- ・ 水分保持の目的で珪藻土と無水硫酸Mgを比較

### ③ 畜水産物への添加回収試験による本法の評価

- ・ 畜産物4作物（牛肉ミンチ、豚肉ミンチ、鶏肉ミンチ、鶏レバー）
- ・ 水産物2作物（ウナギ蒲焼、ブリ切り身）

# 畜水産物の成分について

畜水産物には脂質、脂肪酸が多く含まれているため、前処理によるこれらの除去が課題となる。

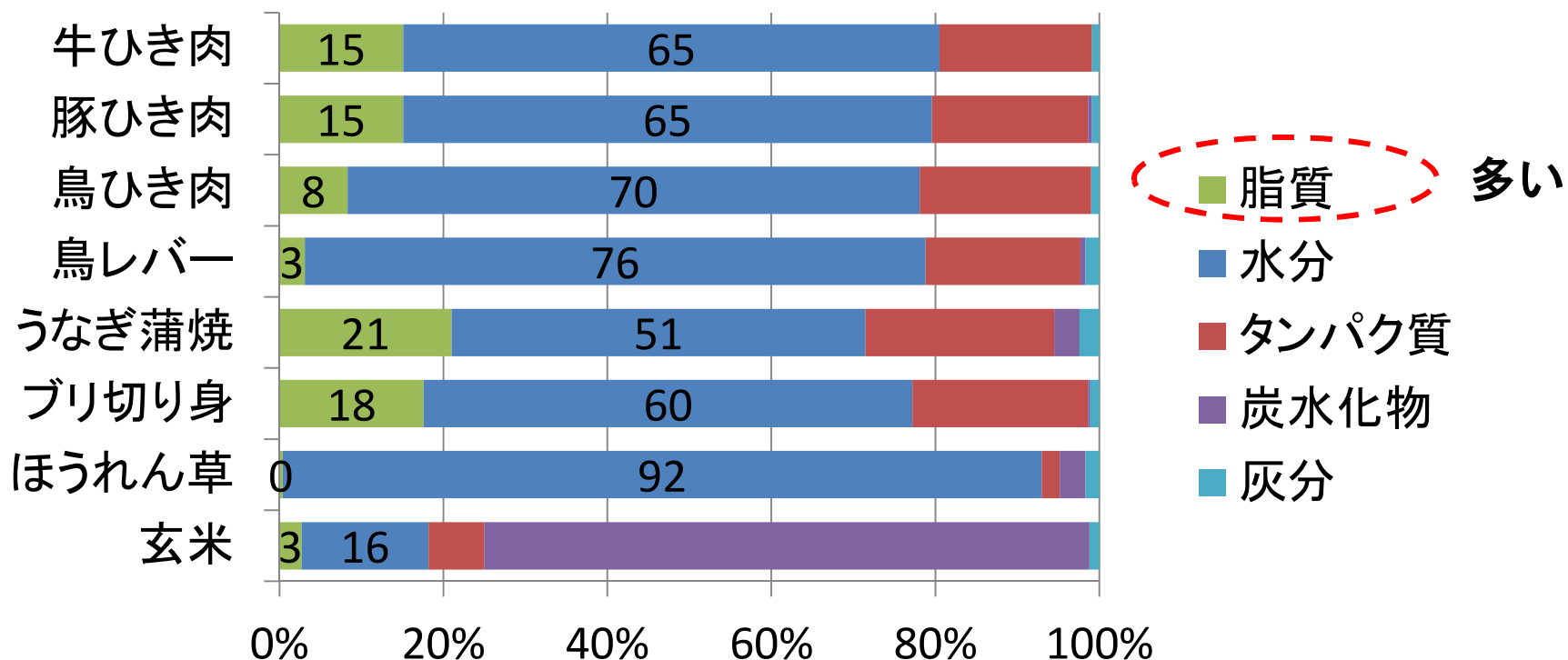


図1. 食品成分表

# 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(抽出)

試料 10g + **水 2mL**  
 — アセトン 10mL

← 試料中の水分量が80%以上になるように調整する。 冷凍前

ホモジナイズ

— 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  
 MgSO<sub>4</sub> (無水硫酸マグネシウム) 4g

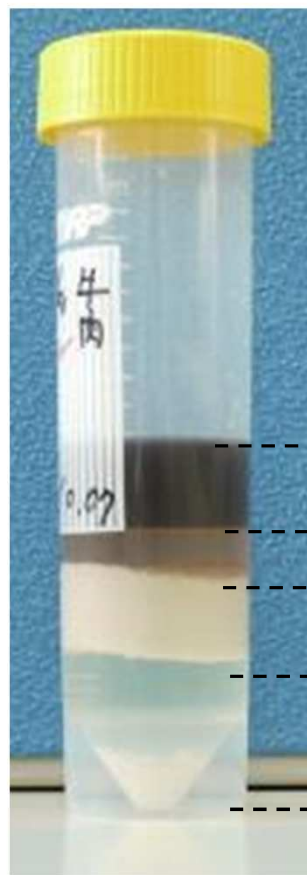
攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

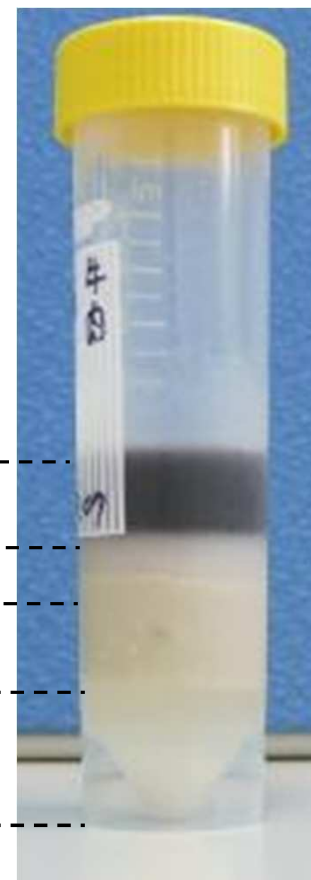
アセトン層 / 脂肪層 / 試料層 / 水層

冷凍 (30分間)

アセトン層を分取



冷凍後



アセトン層

脂肪層

試料層

水層

# 前処理フロー(精製)

検討①

アセトン抽出液0.5 mL (試料0.5 g相当) 分取

ヘキサン 3 mL

検討②

珪藻土 0.2 g

固相PSA-30 mg (精製)

洗液 アセトン-ヘキサン (15/85) 1 mL

濃縮・乾固

メタノール 0.8mL + 水 0.2mL

固相C18-50 mg (精製)

洗液 メタノール-水 (4/1) 0.9 mL

定容 2 mL (メタノール-水 (4/1) : 4倍希釈)

LC/MS/MS測定 (分画①)

珪藻土

PSA-30 mg



吸引乾燥 1分間

固相C18-50 mgを連結 (精製)

溶出 メタノール-水 (1/1) 2 mL

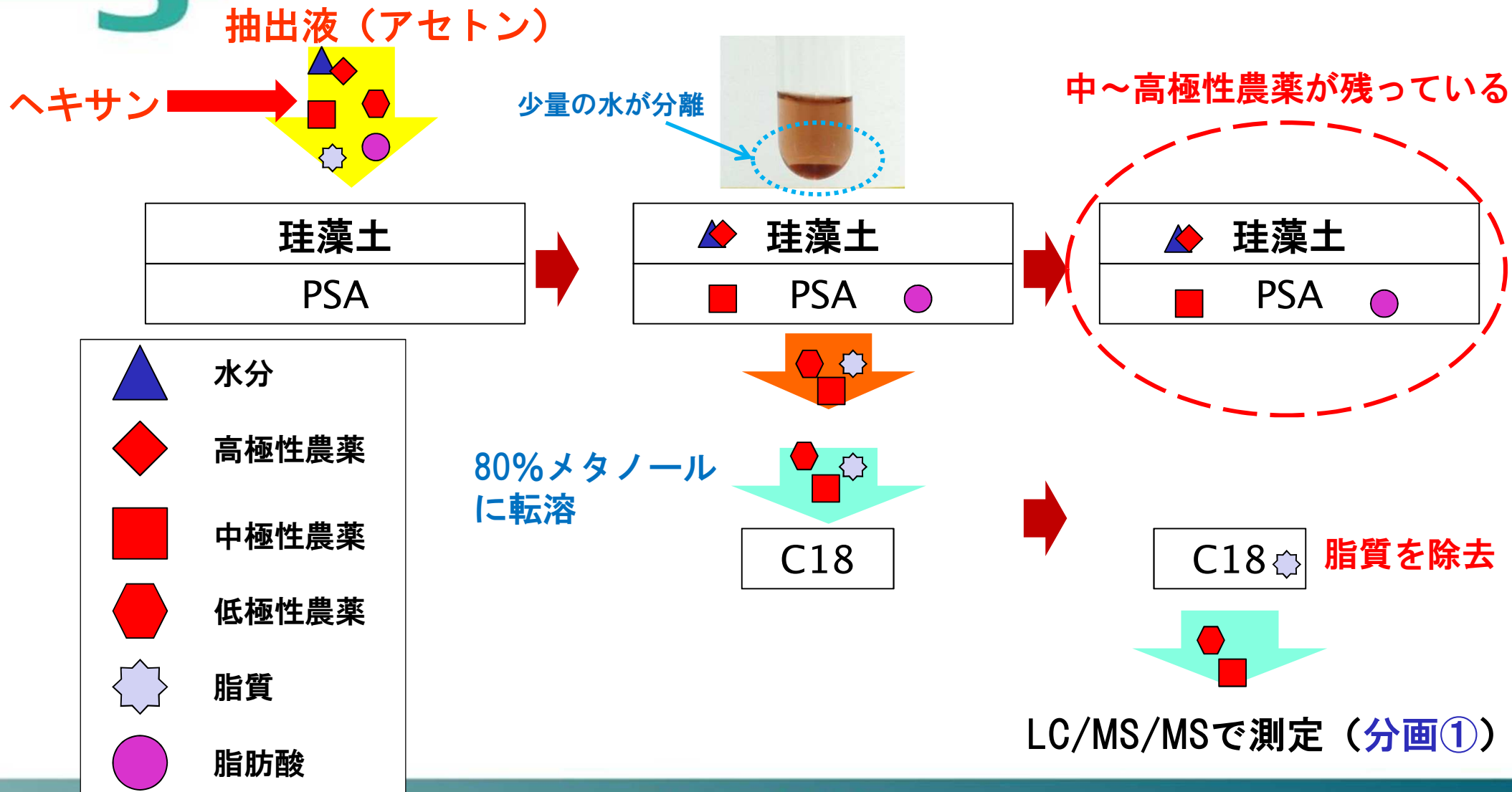
定容 2 mL (メタノール-水 (1/1) : 4倍希釈)

LC/MS/MS測定 (分画②)

※鳥レバーのみPSA-30 mgを2連結して使用



# 精製イメージ①




# 精製イメージ②

50%メタノール/水

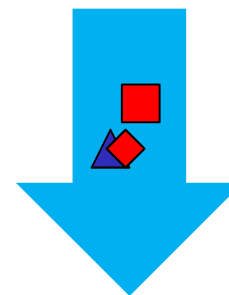


	珪藻土
	PSA
	C18









	珪藻土
	PSA
	C18 

PSAにC18 を連結



脂肪酸を除去

LC/MS/MSで測定 (分画②)

	水分
	高極性農薬
	中極性農薬
	低極性農薬
	脂質
	脂肪酸

# 検討① PSAによる精製効果の比較

## アセトン-ヘキサン選択の理由

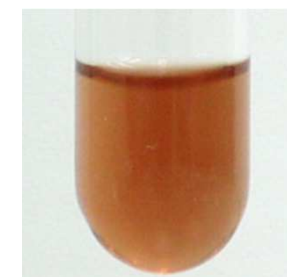
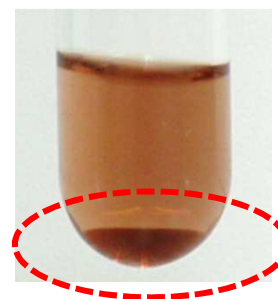
アセトン抽出液0.5 mL (試料0.5 g相当) 分取

- A ヘキサン 2mL
- B アセトニトリル-トルエン (3/1) 0.5mL
- 無水硫酸Mg 0.3 g(脱水)
- 固相PSA-30 mg (精製) 分画②へ
- A-①アセトン-ヘキサン (15/85) 1mL
- A-②アセトン-ヘキサン (30/70) 1mL
- B-③アセトニトリル-トルエン (3/1) 1.5mL
- 濃縮・乾固
- メタノール 0.8mL + 水 0.2mL
- 固相C18-50 mg (精製)
- 洗液 メタノール-水 (4/1) 0.9 mL
- 定容 2 mL (メタノール-水 (4/1) : 4倍希釈)
- LC/MS/MS測定 (分画①)

### 比較

- A) ヘキサン添加
- B) アセトニトリル-トルエン添加

ヘキサン添加後      アセトニトリル-トルエン添加後



水分が分離

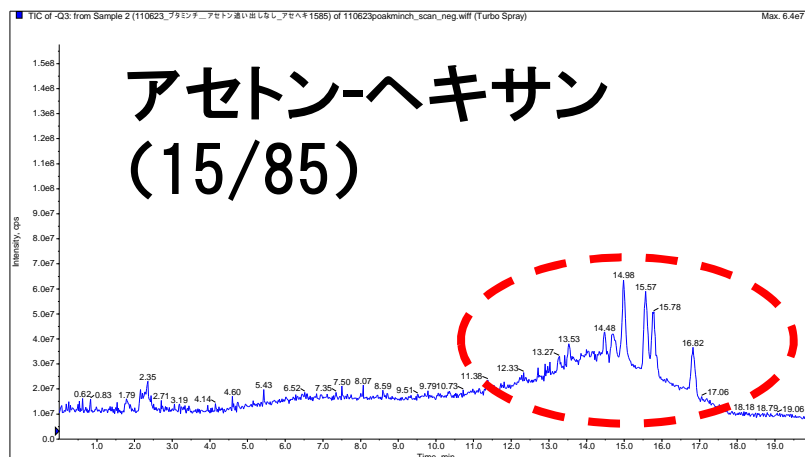
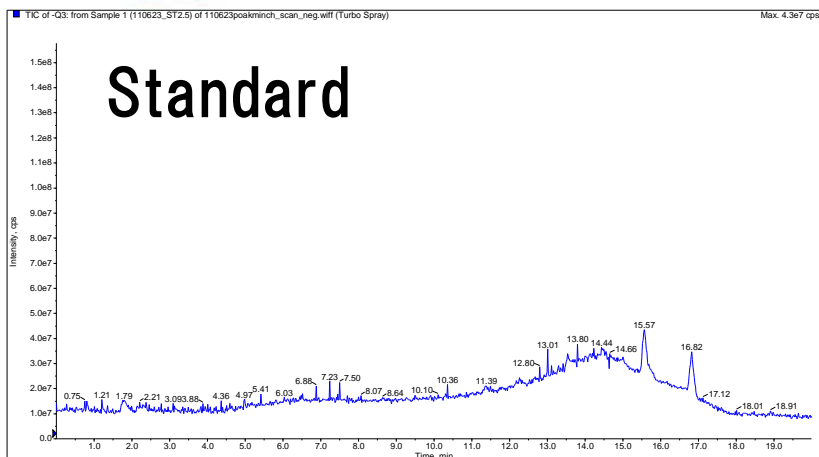


無水硫酸Mgで脱水

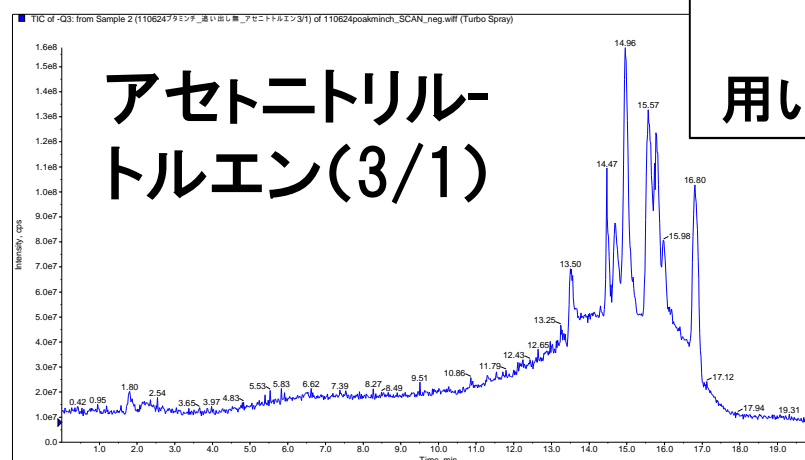
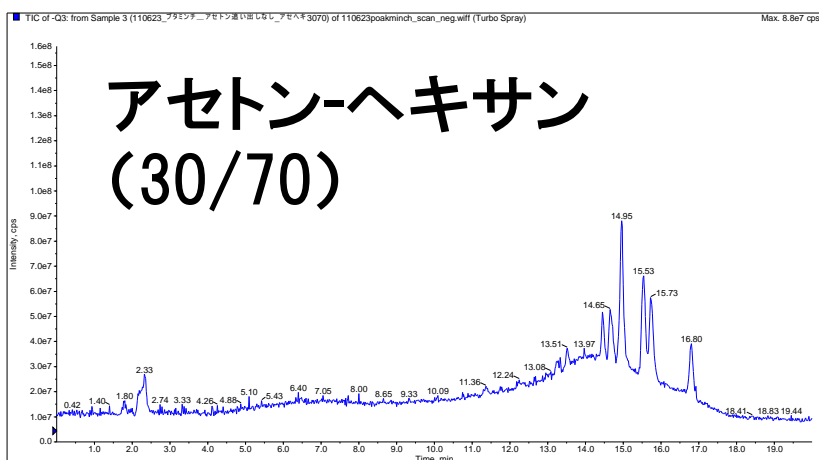
# Q3-SCANクロマトグラム

Negative mode(m/z=60-500)

試料：豚肉ミンチ



**Good !**  
 夾雑ピークが  
 一番少ない



しかし…  
**無水硫酸Mgを  
 用いると回収率が低下**

## 検討② アセトン抽出液中の微量水分の対策

アセトン抽出液0.5 mL (試料0.5 g相当) 分取

ヘキサン 3 mL

無水硫酸Mg 0.3 g or 珪藻土 0.2 g

固相PSA-30 mg (精製)

吸引乾燥 1分間

洗液 アセトン-ヘキサン (15/85) 1 mL

固相C18-50 mgを連結 (精製)

濃縮・乾固

溶出 メタノール-水 (1/1) 2 mL

メタノール 0.8mL + 水 0.2mL

固相C18-50 mg (精製)

定容 2 mL (メタノール-水 (1/1) : 4倍希釈)

洗液 メタノール-水 (4/1) 0.9 mL

LC/MS/MS測定 (分画②)

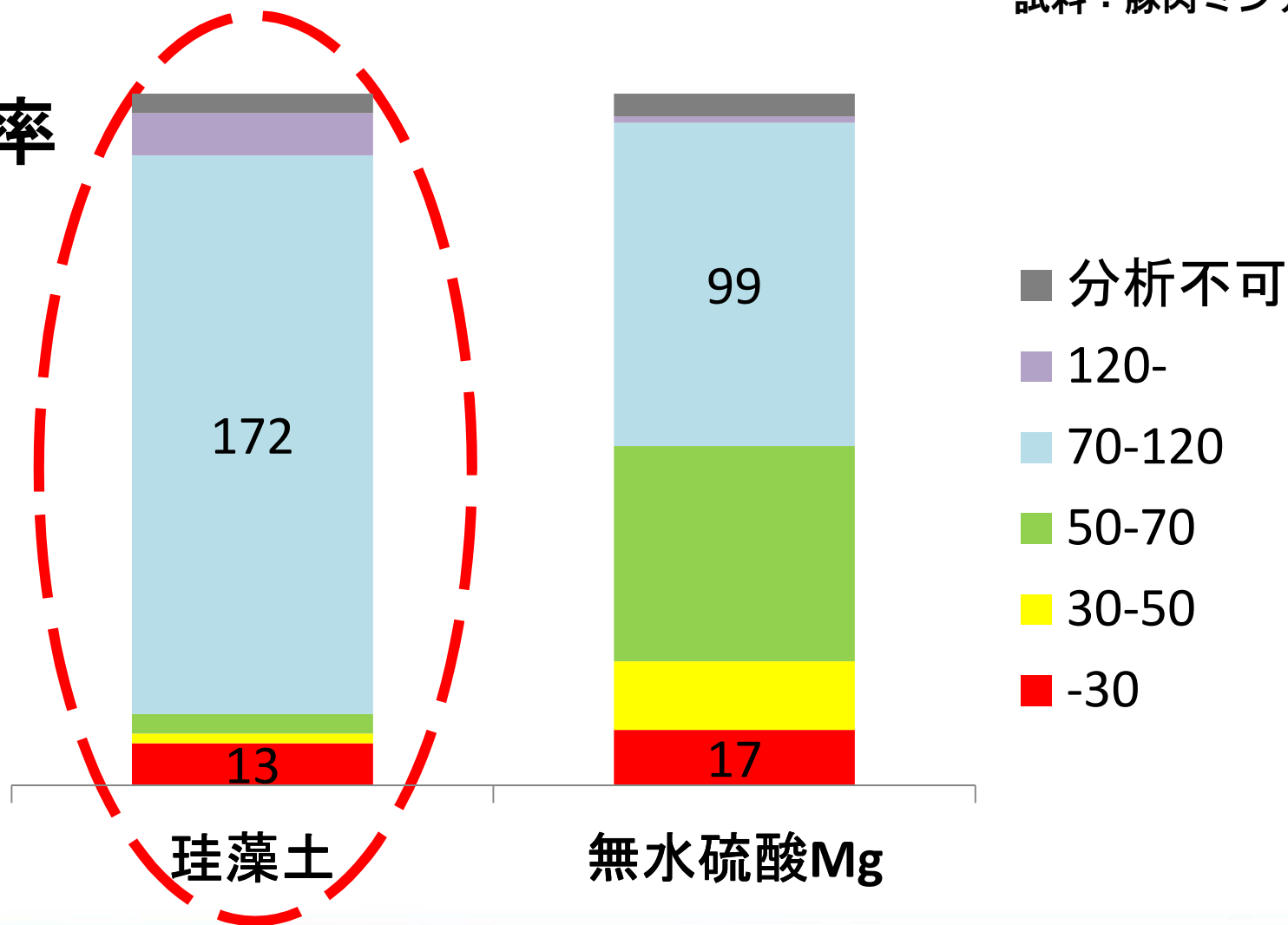
定容 2 mL (メタノール-水 (4/1) : 4倍希釈)

LC/MS/MS測定 (分画①)

## 検討② 回収率

試料：豚肉ミンチ

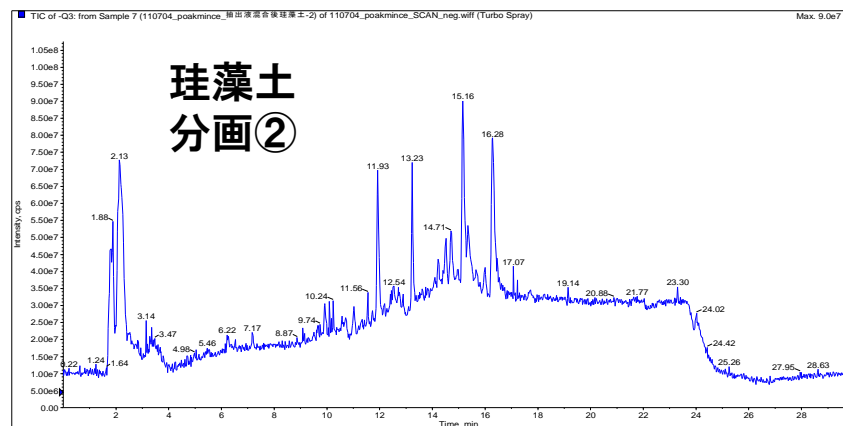
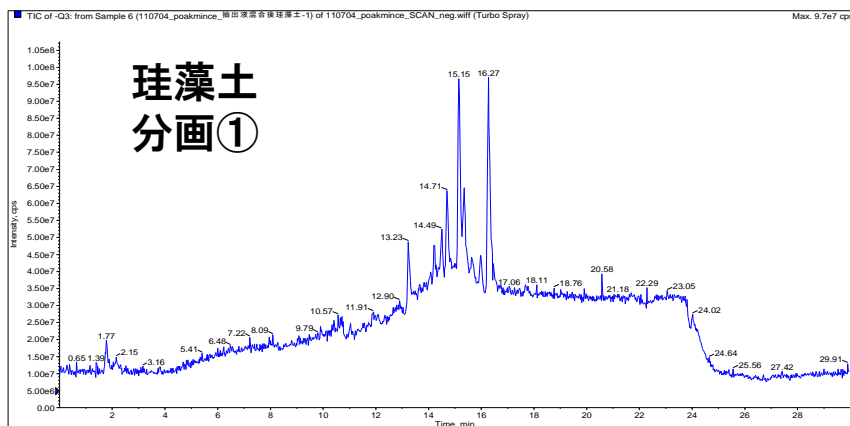
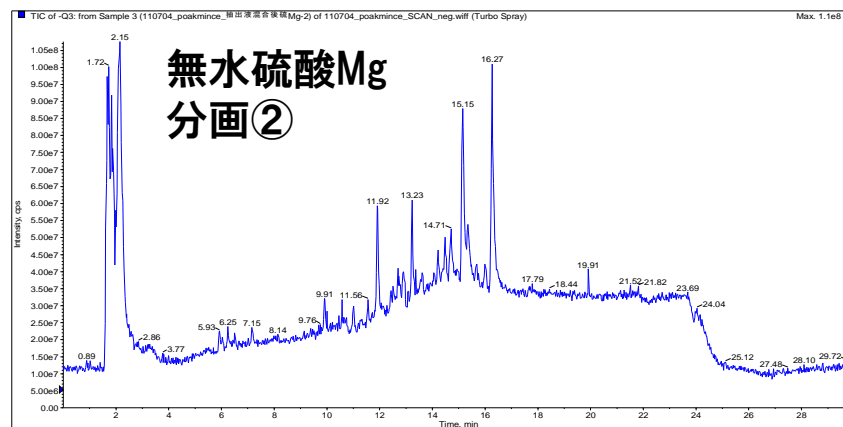
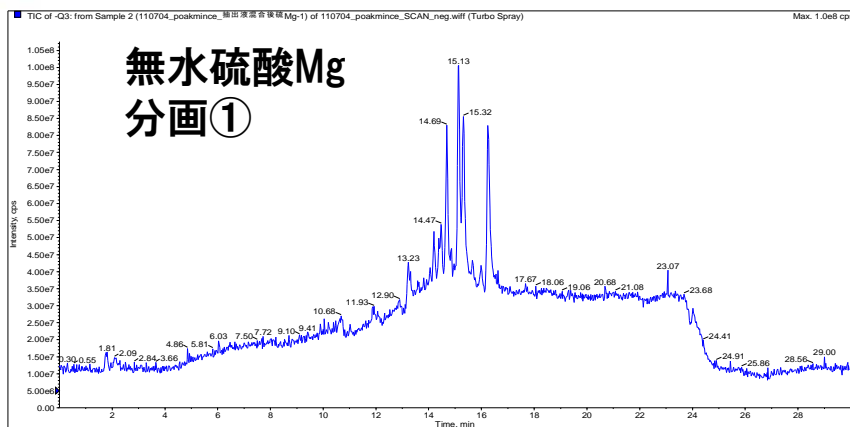
高い回収率



# Q3-SCANクロマトグラム

Negative mode(m/z=60-500)

試料：豚肉ミンチ



珪藻土と無水硫酸Mgで、大きな違いは見られなかった

# 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：0.01 ppm (n=3)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)
1	1-Naphthylacetamide	89.8	1.1	26	Carpropamide	91.7	9.0	51	Diclomezine	83.1	3.4
2	3-Hydroxycarbofuran	80.0	11.2	27	Chloridazon	90.3	7.0	52	Diclopos	93.4	8.3
3	Abamectin	53.6	14.3	28	Chlorimuron-ethyl	111.5	14.3	53	Difenoconazole	95.5	2.7
4	Acephate	62.5	10.9	29	Chlorsulfuron	91.2	16.3	54	Diflubenzuron	93.7	1.9
5	Acetamiprid	90.8	6.5	30	Chlorxuron	98.4	3.1	55	Dimethirimol	81.8	6.8
6	Acibenzolar-S-methyl	121.5	8.9	31	Chromafenozide	109.1	5.7	56	Dimethoate	103.7	3.9
7	Aldicarb	98.3	9.6	32	Cinosulfuron	97.9	6.9	57	DimethomorphE	93.4	3.8
8	Aldoxycarb	72.8	4.9	33	Clofencet	-	-	58	DimethomorphZ	89.3	8.7
9	Anilofos	96.7	3.4	34	Clofentezine	78.7	11.4	59	Dimeton-s-methyl	100.7	6.3
10	Aramite	94.6	7.8	35	Clomeprop	77.6	7.7	60	Diuron	88.5	10.8
11	atrazine	99.8	4.6	36	Cloquintocet-mexyl	82.9	6.3	61	Dymuron	102.6	6.6
12	Azamethiphos	26.5	32.1	37	Cloransulam-methyl	1.9	173.2	62	Epoxiconazole	100.2	1.6
13	Azimsulfuron	96.0	6.3	38	Clothianidin	64.5	14.7	63	Epoxiconazole	94.7	1.7
14	Azinphos-methyl	98.6	16.3	39	Cumyruon	93.1	10.0	64	Ethametsulfuron-methyl	102.6	4.4
15	Azoxystrobin	100.5	5.0	40	cyanazine	94.0	0.7	65	Ethoxysulfuron	-	-
16	Bendiocarb	105.6	11.5	41	Cycloate	67.8	6.4	66	Fenamidone	96.1	10.2
17	Bensulfuron-methyl	107.3	5.8	42	Cyclosulfamuron	103.7	7.6	67	Fenamiphos	99.6	1.7
18	Benzofenap	89.3	5.1	43	Cyflufenamide	99.9	4.2	68	Fenbuconazole	92.7	1.4
19	Bitertanol	110.4	1.5	44	Cyproconazole-1	87.1	2.2	69	Fenhexamid	94.7	3.7
20	Boscalid	94.7	4.6	45	Cyproconazole-2	95.4	7.7	70	Fenobucarb	102.8	6.7
21	bromacil	-	-	46	Cyprodinil	87.6	3.6	71	Fenoxaprop-ethyl	-	-
22	Butafenacil	98.4	9.0	47	Daimuron	102.6	6.6	72	Fenoxycarb	104.1	2.4
23	Carbaryl	103.3	8.3	48	DDVP2	81.8	10.5	73	Fenpyroximate E	80.0	7.7
24	Carbofuran	131.2	9.4	49	Di-allate	91.4	6.1	74	Fenpyroximate Z	79.0	8.1
25	carboxin	-	-	50	Dichlosulam	6.3	57.8	75	Fensulfthion	100.1	6.6



# 添加回収試験結果②

試料：牛肉ミンチ

試料中添加濃度：0.01 ppm (n=3)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)
76	Ferimzone EandZ	90.1	3.9	101	Imazosulfuron	-	-	126	monocrotophos	87.0	12.5
77	Flazasulfuron	105.6	7.1	102	Imibenconazole	74.2	9.9	127	Monolinuron	92.2	7.6
78	Florasulam	85.8	5.8	103	Imidacloprid	86.4	4.8	128	Myclobutanil	110.0	4.6
79	Fluazifop	93.7	7.4	104	Indanofan	81.1	9.0	129	Naproanilide	98.9	5.6
80	Flufenacet	92.0	5.4	105	Indoxacarb	102.3	8.4	130	Naptalam	54.0	8.4
81	Flufenoxuron	90.2	4.3	106	Iodosulfuron-methyl	90.3	9.0	131	Norflurazon	102.3	0.6
82	Flumetsulam	71.1	8.4	107	Iprodione	-	-	132	Novaluron	100.9	3.7
83	Fluridon	99.7	4.7	108	Iprovalicarb	102.1	6.5	133	oxadixyl	99.9	6.3
84	Fluridone	98.1	3.4	109	Isoprocarb	105.8	1.2	134	Oxamyl	81.4	5.3
85	Flusilazole	99.3	5.5	110	Isoxaflutole	7.2	34.7	135	Oxaziclomefone	82.3	0.9
86	Flutriafol	111.7	6.6	111	Lactofen	97.9	5.4	136	Oxycarboxin	83.3	3.1
87	Foramsulfuron	97.8	6.2	112	Lenacil	94.9	1.5	137	Pencycuron	86.3	3.6
88	Forchlorfenuron	81.3	8.9	113	Linuron	88.0	9.0	138	Penoxsulam	104.4	3.0
89	Fosthiazate	105.1	9.0	114	Lufenuron	90.0	6.2	139	Phenmedipham	129.4	2.9
90	Furametpyr	95.6	7.0	115	Mepanipyrim	91.9	7.9	140	PhosphamidoneE	103.3	8.3
91	Furathiocarb	34.7	5.9	116	Mesosulfuron-methyl	92.4	10.0	141	PhosphamidoneZ	107.7	3.3
92	Halosulfuron-methyl	95.6	0.9	117	Methabenzthiazuron	91.3	7.7	142	Primicarb	101.4	2.4
93	Haloxyfop	95.5	7.8	118	Methamidophos	27.6	14.8	143	Propaquizafop	89.3	4.2
94	Hexaconazole	100.9	6.3	119	Methiocarb	102.5	7.6	144	propoxur	104.7	7.2
95	Hexaflumuron	82.9	10.4	120	Methomyl	175.6	3.4	145	Propoxycarbazone	86.3	11.9
96	hexazinon	97.3	0.7	121	Methoxyfenozide	102.9	6.5	146	Pyraclostrobin	96.0	5.4
97	Hexythiazox	76.1	9.0	122	Metosulam	79.8	10.3	147	Pyrazolynate	198.0	6.8
98	Imazalil	85.3	5.9	123	Metsulfuron-methyl	95.9	2.9	148	Pyrazosulfuron-ethyl	103.1	7.8
99	imazamethabenz-methyl	100.0	1.6	124	mevinphosE	105.1	7.6	149	Pyriftalid	99.7	7.9
100	Imazaquin	80.6	3.5	125	mevinphosZ	108.9	2.7	150	pyroquilon	89.9	1.4

# 添加回収試験結果③

試料：牛肉ミンチ

試料中添加濃度：0.01 ppm (n=3)

No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)	No.	農薬名	平均 回収率 (%)	RSD (%)
151	Quinoclamine	83.1	5.7	176	Triadimenol	85.5	30.3	Neg	Hexaflumuron	93.7	19.8
152	Quizalofop-ethyl	76.3	5.3	177	Triasulfuron	105.5	8.3	Neg	Ioxynil	71.3	4.7
153	Silafluofen	6.6	38.7	178	Tricyclazole	83.4	0.4	Neg	Lufenuron	97.6	2.5
154	Simazine	88.2	9.9	179	Tridemorph E	19.5	23.2	Neg	MCPA	89.7	4.1
155	Simeconazole	97.6	6.1	180	Tridemorph Z	18.4	25.1	Neg	MCPB	97.3	5.2
156	Simetorin	101.5	3.4	181	Trifloxysulfuron	92.7	12.5	Neg	MCPP (Mecoprop)	99.5	7.5
157	Spinosyn A	8.5	32.2	182	Triflumuron	94.5	7.2	Neg	Methoxyfenozide	108.3	2.2
158	Spinosyn D	3.8	33.0	183	Trifluzamide	98.8	1.6	Neg	Naphthaleneacetic acid	-	-
159	Spiroxamine-A	20.8	35.0	184	Triticonazole	90.0	3.5	Neg	Naproanilide	92.2	4.7
160	Spiroxamine-B	20.8	35.0	185	XMC	103.1	4.9	Neg	Norflurazon	117.3	4.3
161	Sulfentrazone	97.0	9.9					Neg	Oryzalin	95.3	2.9
162	Sulfosulfuron	95.3	6.8	Neg	2-4-D	84.3	6.0	Neg	Thidiazuron	76.2	3.5
163	Tebufenozide	98.7	8.6	Neg	2-4-DP (Dichlorprop)	103.5	7.4	Neg	Triclopyr	86.9	15.1
164	Tebuthiuron	101.7	5.2	Neg	4-Chlorophenoxyacetic	80.5	4.5	Neg	Trifluzamide	100.7	1.0
165	Teflubenzuron	85.0	12.4	Neg	Acifluorfen	88.9	24.4				
166	terbacil	-	-	Neg	Bromoxynil	84.9	5.0				
167	Tetrachlorvinphos	89.9	4.1	Neg	Cloprop	94.1	2.7				
168	Tetraconazole	94.9	21.7	Neg	Cyclanilide	88.4	6.0				
169	Thiabendazole	75.2	3.7	Neg	Dichlorprop	103.5	7.4				
170	Thiacloprid	95.6	1.1	Neg	Dicloran	-	-				
171	Thiamethoxam	76.9	8.6	Neg	Dimethipin	82.9	2.4				
172	Thidiazuron	60.9	9.5	Neg	Fluroxypyr	85.3	6.9				
173	Thifensulfuron-methyl	95.2	9.7	Neg	Fomesafen	100.1	2.7				
174	Thiodicarb	-	-	Neg	Formothion	-	-				
175	Tralkoxydim	83.6	9.4	Neg	Gibberellin	89.8	17.0				

- ・ 約85%の農薬で、70 - 120%の範囲内の良好な回収率が得られた。
- ・ その内、ほとんどの農薬がRSDが20%未満であった。
- ・ 酸性農薬の回収率が向上した。

# 添加回収試験による回収率分布

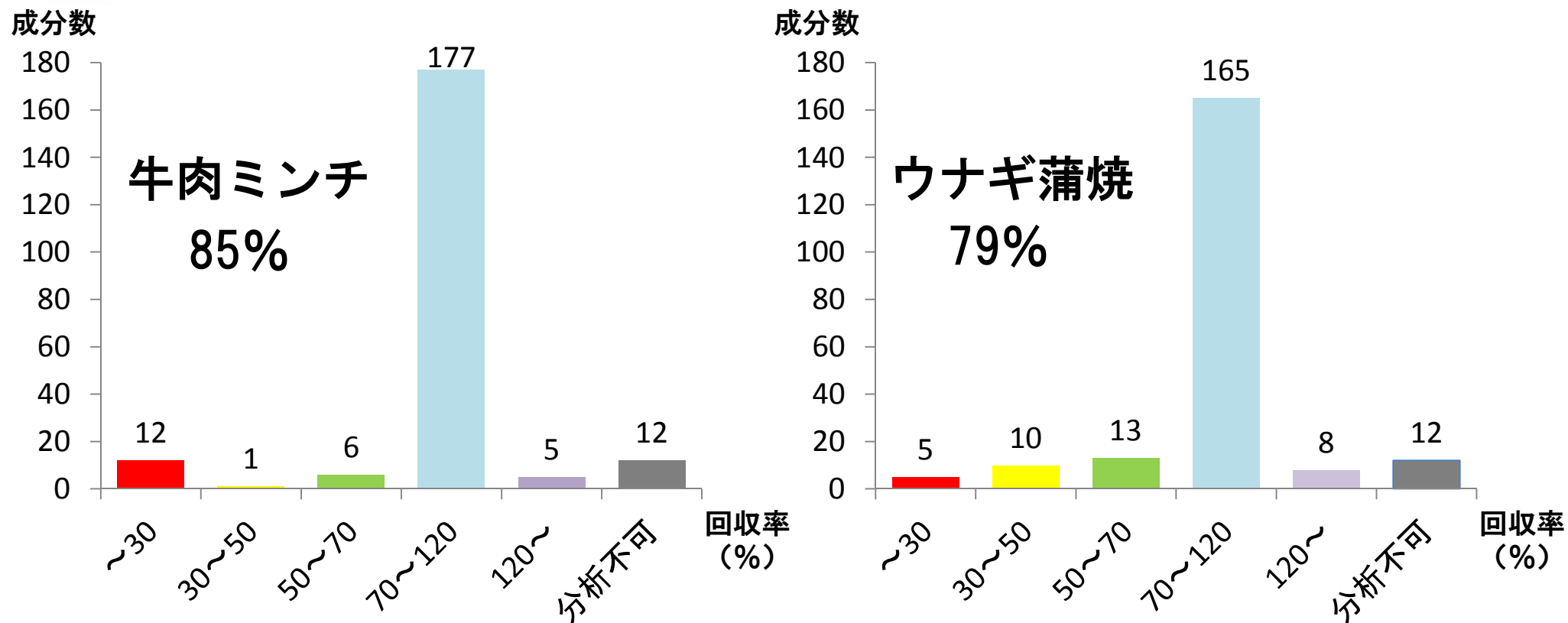


図2. 回収率分布 試料中添加濃度：0.01 ppm (n=3)

# 添加回収試験による回収率分布

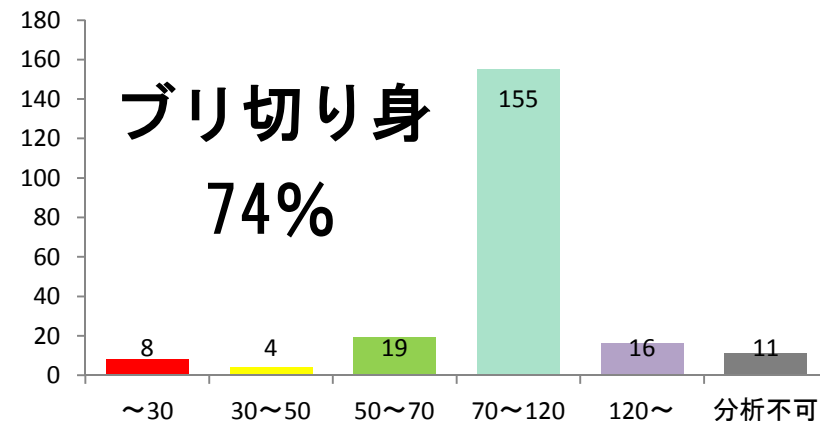
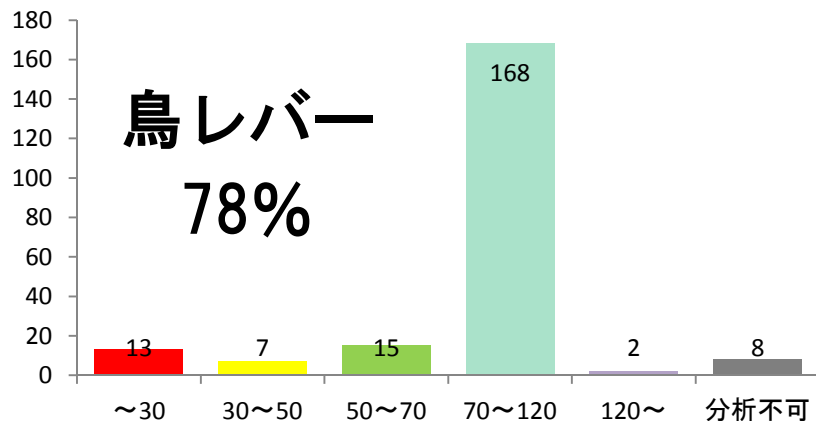
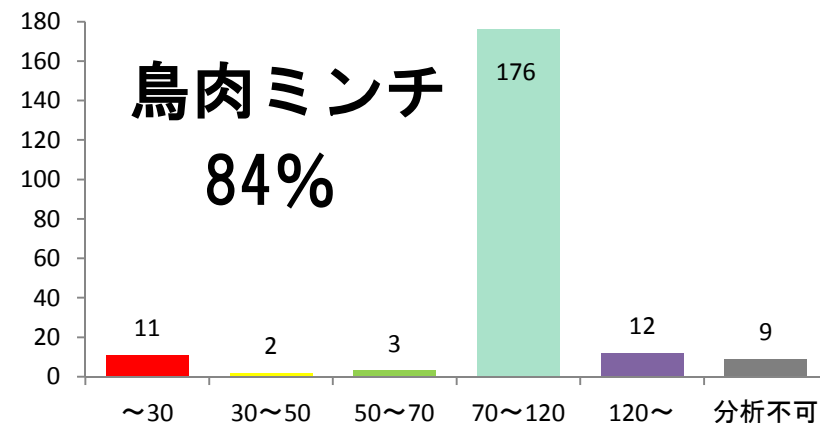
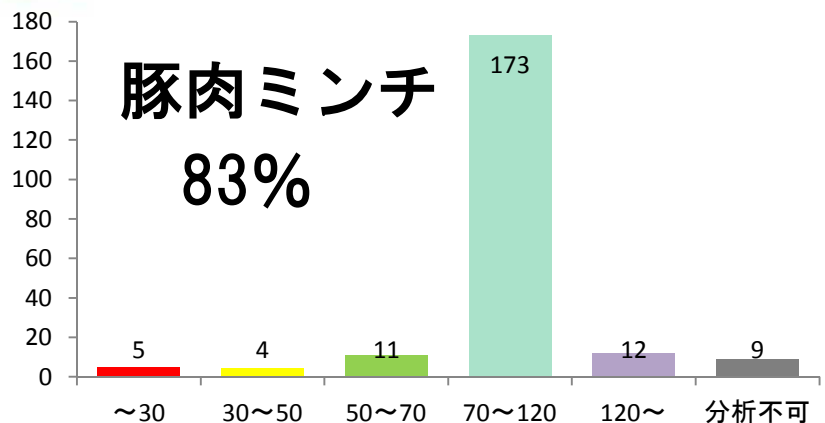


図3. 回収率分布 試料中添加濃度：0.01 ppm

## 結果

LC/MS/MSを用いて畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法を検討した。

- PSAをアセトン-ヘキサン（15/85）で用いることにより、精製効果が向上した。
- 珪藻土に水分を保持させることで、ほとんどの極性農薬と前報では回収率の低かった酸性農薬も回収できた。
- 牛ミンチ、うなぎ蒲焼、豚ミンチ、鳥ミンチ、鳥レバー、ブリ切り身において良好な回収率が得られた。

## 今後の課題

LC/MS/MS測定において . . .

- 測定に時間がかかる
- 解析に時間がかかる
- 使用する移動相（溶媒量）が増える



**最終試験液を一本化**