

LC/MS/MS を用いた作物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討

株式会社アイスティサイエンス

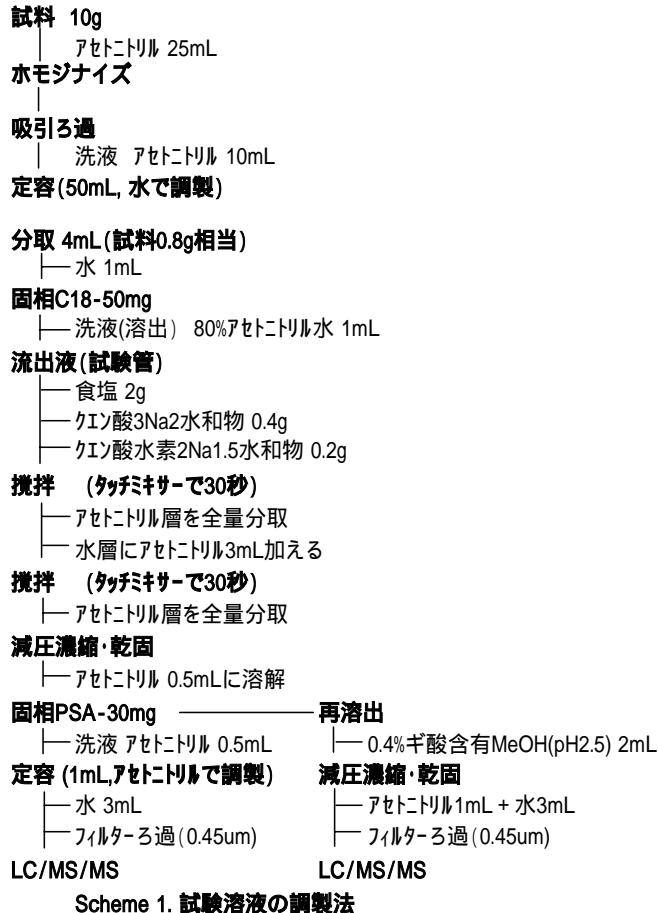
谷澤春奈 佐々野僚一

【目的】ポジティブリスト制の導入から早や一年が経ち、基準値設定農薬数の大幅な増加から、食品中の残留農薬分析においては、GC/MS と LC/MS/MS を用いた多成分一斉分析がほぼ定着し、中でもより効率的な迅速一斉分析が求められている。今回、LC/MS/MS を用いて前処理法を中心に通知法 LC 法 法(一斉分析法)に挙げた農薬(新たに追加された農薬は除く)と一部の高極性農薬を対象として、より効率的な方法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

【方法】1. 対象農薬:ポジティブリスト制度 LC/MS 対象 37 種(農薬混合標準液 44)、19 種(農薬混合標準液 45)、GC/MS 対象 50 種(農薬混合標準液 22)の内 4 種(アセフェート,メタドホス,カルバリル,フェノプロパ) (関東化学社製)、固相カートリッジ:SAIKA-SPE(アイスティサイエンス社製)

2. 試料:ほうれん草、他

3. 試料調製



Scheme 1. 試験溶液の調製法

4. 測定条件

装置	MS:API3200 Q TRAP (Applied Biosystems) LC:Prominence HT (SHIMADZU)
カラム	L-column (粒径5 μ m, ϕ 2.1 \times 150mm)
移動相	A液 5mM酢酸アンモニウム水溶液 B液 5mM酢酸アンモニウム含有メタノール
分析時間	メソッド 30分(Pos+),メソッド 30分(Neg-)
流速	0.2mL/min
注入量	10 μ L
イオン化モード	ESI(+)(-)
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring)

【結果と考察】

1.前処理法の効率化:高~低極性農薬や中性、酸性、塩基性農薬など多岐にわたる分析対象農薬を1つの方法でより効率良く分析するため、精製も含めて下記の検討を行った。

緩衝液としてリン酸緩衝液(pH7)とクエン酸緩衝液(pH5~5.5)を比較した結果、リン酸緩衝液では酸性農薬が解離し水層へ移行するためアセトニトリル層での回収率が低下した。一方クエン酸緩衝液はややpHが酸性寄りになるため酸性農薬の水層への移行を抑制でき、他の農薬と共にアセトニトリル層への回収が可能となった。

精製として、まずC18ミカラムを用い低極性の植物成分やクロロフィル、高級脂肪酸エステル類を除去し、次に液液分配により極性の高い植物成分や糖類、水を除去した。最後にアニオン交換/極性カラムであるPSAを用いて高級脂肪酸や色素を除去した。またC18へ負荷する際、試料を水で希釈し溶媒濃度を下げ、一度カラムに保持させた後、少量の80%アセトニトリル水で溶出することで、効率良く低極性の夾雑成分を除去できた。

2.添加回収試験:ほうれん草を用いて試料中濃度0.1ppmでの添加回収試験(n=5)を行った結果、60成分中54成分は70~120%以内の良好な回収率が得られ、RSDもほぼ10%未満に抑えることができた。また高極性農薬であるアセフェート、メタドホスも60%以上の回収率が得られた。今回の前処理法は、高~低極性や中性、酸性、塩基性農薬など幅広い農薬を一度に効率良く分析することができ、機器測定におけるマトリックス効果も低減できた。今後さらに農薬を追加し、複雑なマトリックスを用いて実践的な検討を行う予定である。



LC/MS/MSを用いた作物中残留農薬の 迅速一斉分析法の検討

株式会社アイスティサイエンス
谷澤春奈 佐々野僚一

検討事項

【前処理法について】

高・中・低極性および酸性・中性・塩基性農薬の同時分析

→ 逆相モードでの固相抽出(固相への保持) 液液分配

→ リン酸緩衝液(pH7)とクエン酸緩衝液(pH5 ~ 5.5)の比較

感度向上(一律基準:試料中0.01ppmの分析)

→ 分取量(試料量)の増量による分析感度の向上

精製方法

→ 固相ミニカラム(C18, PSA)の使用

→ 液液分配による水溶性夾雑物の除去

変更点

タッチミキサーによる攪拌 手による振とう

理由: タッチミキサーでは攪拌が不十分で、アセトニトリル層のDRYUP時に食塩を含んだ水が残る場合があったため

PSA精製での溶媒変更

*アセトニトリル アセトン:ヘキサン(1:1)

理由: 食塩が確実に溶解しないようにするため
アセトニトリルより精製効果が高いため

*0.4%ギ酸メタノール 0.4%ギ酸アセトニトリル

理由: 食塩が確実に溶解しないようにするため

測定時の試料溶媒の変更 25%アセトニトリル 50%メタノール

理由: アセフェート、メタドホスのピーク形状改善のため

前処理フロー

分取後の分析時間: 30分/1検体

抽出法

試料 10g
 ↓
 アセトニトリル 25 mL
 ホモジナイズ
 ↓
 吸引ろ過
 ↓
 洗液 アセトニトリル 10 mL
 ↓
 るろ過液
 ↓
 定容 (50 mL, 水で調整)

分取 4mL (試料 0.8 g 相当)

水 1 mL

SAIKA-SPE

C18 (50mg) 洗液 (溶出) 80%アセトニトリル水 1mL

流出液 (試験管)

食塩 2g, **クイン酸 3Na_2 水和物** 0.4g, **クイン酸水素 $2\text{Na}1.5$ 水和物** 0.2g

アセトニトリル 4mL

ダイアジノンd体 2ppm/アセトニトリル 20 μ L 添加 (指標)

撈拌 (手で振とう, 1min)

アセトニトリル層を全量分取

減圧濃縮・乾固

アセトン:ヘキサン (1:1) 1mL に溶解

SAIKA-SPE

PSA (30mg)

洗液 アセトン:ヘキサン (1:1) 1mL

減圧濃縮・乾固

メタノール 1mL + 水 1mL

LC/MS/MS

再溶出

0.4%ギ酸含有アセトニトリル (pH2.5) 1mL

減圧濃縮・乾固

メタノール 1mL + 水 1mL

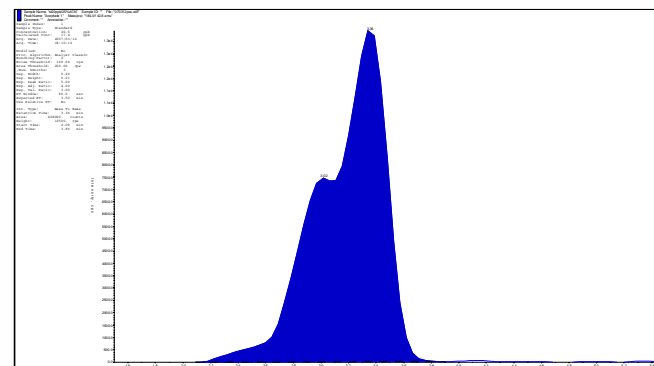
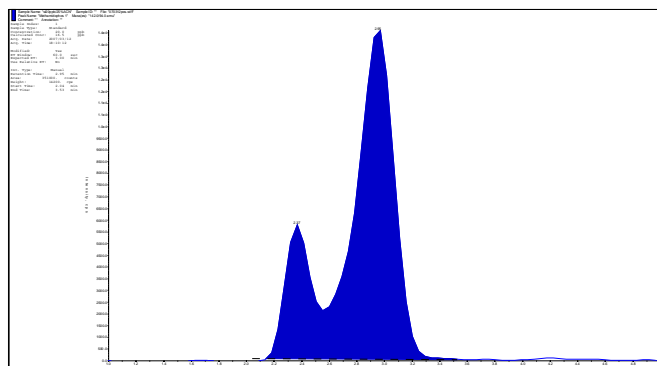
LC/MS/MS

ピーク形状の改善

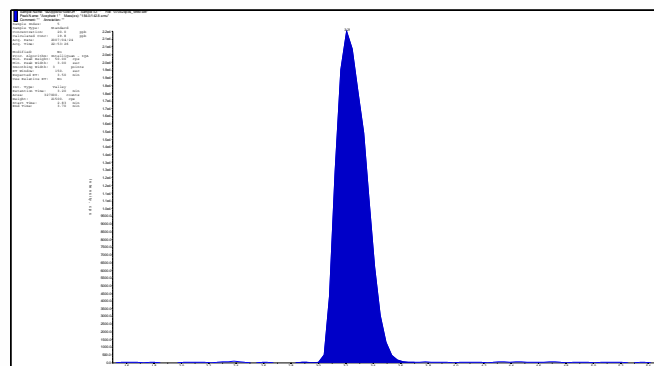
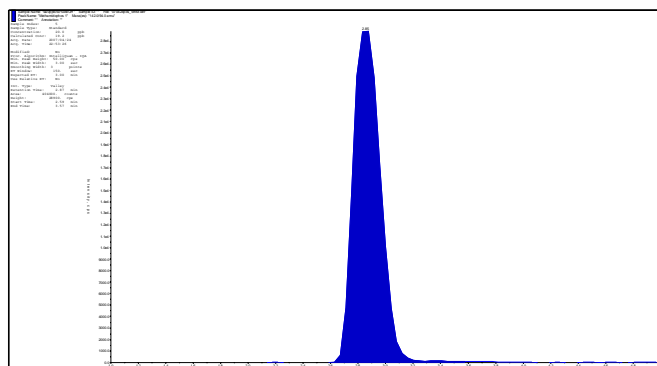
methamidophos

acephate

25%アセトニトリル
10uL注入



50%メタノール
5uL注入



緩衝液の比較

農薬名	官能基	pKa	LogPow	RT(min)	回収率(%)	
					クエン酸Buffer pH5 ~ 5.5	リン酸Buffer pH7
4-CPA	COOH	3.56	-	8.4	64.5	33.5
Mecoprop	COOH	3.78	0.64	12.1	82.0	43.5
Triclopyl	COOH	3.97	-	11.7	87.5	56.0
Ioxynil	OH	3.96	0.89 (unstated) , 3.43 (unionised)	10.6	68.5	59.5
Flumetsulam	-	4.6	-0.68	5.8	78.0	62.5
Cloprop	COOH	-	-	9.5	93.5	63.5
Fluroxypyr	-	2.94	-1.24	6.9	74.5	65.5
Forchlorfenyuron	-	-	3.2	13.7	79.5	65.5
Haloxypop	COOH	2.9	1.34 (unstated)	14.7	80.0	66.5
Cloransulam-methyl	NHSO ₂	4.81	1.12 (pH5) , -0.365 (pH7)	11.2	82.0	68.5
1-naphtharen-acid	-	-	-	9.3	86.0	72.0
Fomesafen	NHSO ₂	2.83	< 2.2 (pH4-10)	14.0	82.5	72.5
Diclosulam	NHSO ₂	4	0.85 (pH7)	11.6	94.5	78.5
Bromoxynil	OH	3.86	2.8 (unionised)	8.7	95.5	81.0

* 通知法 法の農薬の内、今回分析した18農薬はすべてクエン酸Bufferで60%以上アセトリル層へ移行することが確認できた。

1.分取 & 精製

分取 4mL (試料 0.8 g 相当)

— 水 1mL

SAIKA-SPE
C18-50 (精製)

— 洗液 (溶出) 80%アセトニル水 1 mL

流出液



試験液 4 mL 分取 + 水 1 mL



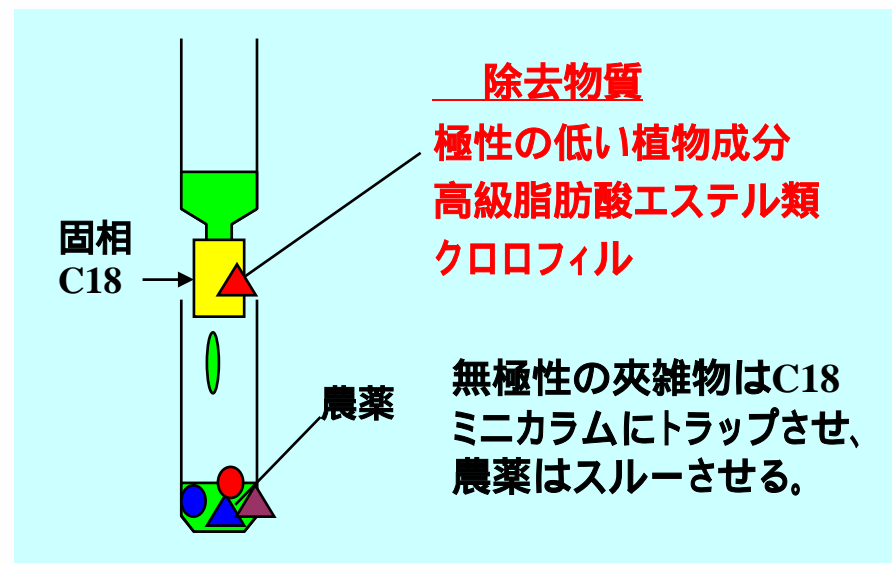
C18-50mg に通液



C18 (精製後)



流出液



2.液液分配

流出液(試験管)

食塩 2g

クイン酸3Na2水和物 0.4g, クイン酸水素2Na1.5水和物 0.2g

アセトニトリル 4mL

ダイアジノンd体 2ppm/アセトニトリル 20 μL添加(指標)

攪拌(手で振とう, 1分)

アセトニトリル層(上清)を全量分取

減圧濃縮・乾固



振とう中



振とう後

1. 試料に食塩とクイン酸Buffer (pH5~5.5)を加え液液分配

食塩
クイン酸Buffer (pH5)

クイン酸BufferによりpHを5付近に調整し、酸性農薬の解離を抑制する。

2. アセトニトリル層を全量分取(上層)

無極性農薬 + 極性農薬
除去物質
水溶性の高い植物成分
糖類
水

塩析効果により農薬をアセトニトリル層へ移行させ、水溶性成分や水を除去する。

3.精製

アセトン:ヘキサン(1:1)1mLに溶解

SAIKA-SPE
PSA-30(精製)

洗液 アセトン:ヘキサン(1:1)1mL

減圧濃縮・乾固

メタノール1mL + 水1mL

LC/MS/MS

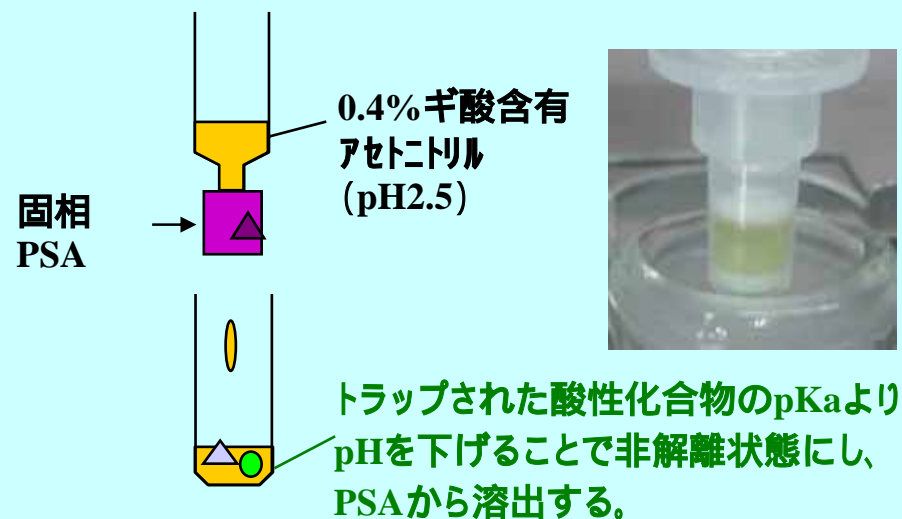
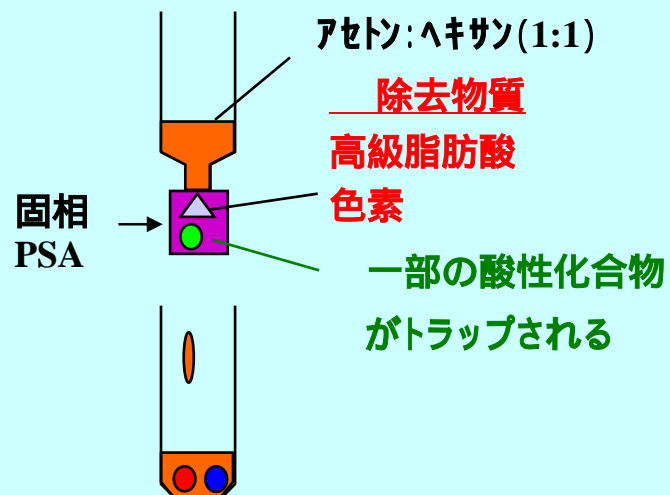
再溶出

0.4%ギ酸含有アセトニトリル(pH2.5) 1mL

減圧濃縮・乾固

メタノール1mL + 水1mL

LC/MS/MS



測定条件

装置	MS: 3200Q TRAP [®] system (Applied Biosystems) LC: ProminenceHT (SIMADZU)
分析カラム	L-column 粒径5 μ m, 2.1 \times 150mm (化学物質評価研究機構)
移動相	A: 5mM酢酸アンモニウム水溶液 B: 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. (%); メソッド 共通 20%(0-1min) 95%(1-17min) 95%(17-23min) 20%(23-30min)
分析時間	メソッド 30分 (Positive +), メソッド 30分 (Negative -)
流速	0.2mL/min
注入量	5 μ L
イオン化モード	ESI Positive/Negative
イオンスプレー電圧	5500V/-4500V
イオンソース温度	350
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
モニターイオン	各成分ごとに、定量/定性用として2つずつ測定

添加回収試験-再現性試験-(ほうれん草)

メソッド positive n=5, (%)

農薬名	回収率	RSD	spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	spike 回収率
1 Abamectin	71.2	19.3	100.5	24 Furathiocarb	85.6	5.8	105.0
2 Acephate	66.4	5.5	94.5	25 Haloxypop	76.6	14.3	98.5
3 Anilofos	92.5	7.4	91.5	26 Imazaquin	80.6	5.4	109.0
4 Azamethiphos	93.6	6.3	95.5	27 Imidacloprid	93.5	8.5	103.5
5 Azinphos-methyl	94.3	3.3	105.5	28 Indoxacarb	79.1	4.9	88.5
6 Benzofenap	92.3	5.5	101.0	29 Iprovalicarb	99.2	5.4	115.5
7 Butafenacil	81.2	9.1	99.0	30 Isoxaflutole	85.3	10.3	107.0
8 Carbaryl	85.1	7.6	94.0	31 Lactofen	86.6	7.1	97.5
9 Chloridazon	87.5	9.8	95.0	32 Methamidophos	64.0	3.6	97.5
10 Chromafenozide	91.8	5.7	108.5	33 Methoxyfenozide	92.0	5.2	97.5
11 Clomeprop	70.3	7.7	79.0	34 MilbemectinA3	70.9	21.9	97.0
12 Cloquintocet-mexyl	83.1	6.5	99.5	35 MilbemectinA4	117.6	21.0	177.0
13 Cloransulam-methyl	117.1	14.1	141.0	36 Naproanilide	80.7	2.7	88.0
14 Clothianidin	77.9	9.4	79.5	37 Oxycarboxin	84.5	5.7	104.0
15 Cyflufenamide	77.9	8.3	88.0	38 Phenmedipham	82.8	7.0	93.5
16 Dichlosulam	91.5	6.1	98.5	39 Pyrazolynate	82.7	4.5	91.5
17 Dimethirimol	78.4	1.9	96.0	40 Pyrifthalid	91.2	7.5	100.5
18 Fenobucarb	83.8	4.8	99.5	41 Simeconazole	78.9	5.8	85.0
19 Fenoxycarb	87.0	8.5	107.0	42 Thiabendazole	60.7	14.3	103.5
20 Ferimzone E	79.2	3.7	105.0	43 Thiacloprid	87.9	8.5	108.0
21 Ferimzone Z	73.9	4.0	95.5	44 Thiamethoxam	82.4	4.8	83.0
22 Flumetsulam	92.6	7.4	104.5	45 Tralkoxydim(Isomer1and2)	83.0	5.4	72.5
23 Forchlorfenuron	65.3	6.7	84.5	46 Diazinon-d	89.9	12.7	-

* 分取液に各農薬を試料中濃度0.05ppmとなるように添加し、本法に従い分析を行ったときのそれぞれの添加回収率(%)

添加回収試験-再現性試験-(ほうれん草)

メソッド negative n=5, (%)

農薬名	回収率	RSD	spike回収率
1 1-naphthaleneacetic acid	118.8	10.3	118.5
2 4-CPA	62.7	7.1	95.0
3 Acifluorfen	5.4	51.6	52.5
4 Bromoxynil	93.5	8.0	89.0
5 Cloprop	93.6	5.4	113.0
6 Dichlorprop	101.0	5.9	127.0
7 Fluroxypyr	65.9	33.4	127.5
8 Fomesafen	20.2	9.2	19.6
9 Ioxynil	82.1	12.2	95.5
10 MCPB	87.2	15.0	125.5
11 MCPP	60.2	9.2	66.5
12 Naproanilide	84.9	5.6	95.0
13 oryzalin	80.8	2.6	99.0
14 Thidiazuron	69.5	10.1	105.5
15 Triclopyr	77.9	19.9	53.5

* 分取液に各農薬を試料中濃度0.05ppmとなるように添加し、本法に従い分析を行ったときのそれぞれの添加回収率(%)

作物別添加回収試験

メソッド positive n=1, (%)

農薬名	ニンジン		ピーマン		農薬名	ニンジン		ピーマン	
	回収率	spike回収率	回収率	spike回収率		回収率	spike回収率	回収率	spike回収率
1 Abamectin	114.0	67.0	59.0	59.0	24 Furathiocarb	88.2	98.0	84.8	91.5
2 Acephate	61.3	93.0	61.6	94.0	25 Haloxyfop	73.5	104.5	60.0	96.0
3 Anilofos	84.2	86.5	78.1	84.5	26 Imazaquin	75.0	87.0	63.0	85.5
4 Azamethiphos	89.8	97.5	86.5	87.5	27 Imidacloprid	95.4	87.5	89.0	92.0
5 Azinphos-methyl	94.5	99.5	91.0	92.5	28 Indoxacarb	95.0	101.5	73.4	83.5
6 Benzofenap	101.0	101.5	87.3	93.5	29 Iprovalicarb	95.9	101.0	82.2	94.5
7 Butafenacil	80.2	100.0	87.5	84.0	30 Isoxaflutole	91.6	99.0	73.2	88.0
8 Carbaryl	83.5	99.0	71.0	95.0	31 Lactofen	90.5	102.5	79.0	93.0
9 Chloridazon	85.6	110.0	83.0	92.0	32 Methamidophos	50.8	99.0	55.7	97.5
10 Chromafenozide	89.5	92.0	87.7	84.5	33 Methoxyfenozide	87.5	101.5	68.5	88.0
11 Clomeprop	91.5	83.0	93.0	93.0	34 MilbemectinA3	77.0	92.0	80.0	73.0
12 Cloquintocet-mexyl	86.0	97.0	86.5	86.5	35 MilbemectinA4	60.5	81.5	87.6	89.0
13 Cloransulam-methyl	94.5	104.0	81.5	75.0	36 Naproanilide	85.5	96.0	91.0	103.0
14 Clothianidin	77.5	101.5	78.5	90.0	37 Oxycarboxin	80.5	91.0	69.5	86.0
15 Cyflufenamide	73.5	86.5	80.0	89.0	38 Phenmedipham	84.5	98.5	85.1	96.5
16 Dichlosulam	72.1	95.5	78.0	86.5	39 Pyrazolynate	88.7	88.5	80.5	89.5
17 Dimethirimol	96.5	103.5	75.0	101.5	40 Pyrifthalid	85.0	100.0	78.5	84.0
18 Fenobucarb	96.4	107.0	86.2	100.5	41 Simeconazole	83.4	98.0	85.5	101.0
19 Fenoxycarb	89.0	105.0	82.9	91.5	42 Thiabendazole	88.3	105.5	84.0	95.0
20 Ferimzone E	90.6	100.5	73.3	100.0	43 Thiacloprid	86.5	101.0	90.2	93.0
21 Ferimzone Z	82.2	96.5	64.4	89.5	44 Thiamethoxam	79.9	90.0	80.5	79.0
22 Flumetsulam	90.8	101.5	79.0	98.0	45 Tralkoxydim	103.6	86.5	95.0	82.5
23 Forchlorfenuron	77.5	97.5	81.4	86.5	46 Diazinon-d	82.0	-	87.0	-

* 分取液に各農薬を試料中濃度0.05ppmとなるように添加し、本法に従い分析を行ったときのそれぞれの添加回収率(%)

作物別添加回収試験

メソッド negative n=1, (%)

		ニンジン		ピーマン	
		回収率	spike回収率	回収率	spike回収率
1	1-naphthaleneacetic acid	78.0	107.0	84.9	117.0
2	4-CPA	72.0	117.0	49.4	156.5
3	Acifluorfen	17.2	74.0	17.2	101.5
4	Bromoxynil	77.0	94.0	66.5	80.0
5	Cloprop	73.0	81.0	52.0	102.5
6	Dichlorprop	52.5	86.0	58.5	108.5
7	Fluroxypyr	46.4	101.5	33.3	83.5
8	Fomesafen	95.5	88.0	84.5	89.0
9	Ioxynil	61.0	78.0	49.7	88.5
10	MCPB	75.0	84.0	107.5	97.0
11	MCPP	79.0	108.5	71.5	122.5
12	Naproanilide	102.1	93.5	91.5	93.5
13	Oryzalin	96.0	97.5	87.7	82.0
14	Thidiazuron	86.2	97.5	81.2	106.0
15	Triclopyr	60.0	79.0	33.7	94.0

* 分取液に各農薬を試料中濃度0.05ppmとなるように添加し、本法に従い分析を行ったときのそれぞれの添加回収率(%)

まとめ

- 液液分配時にクエン酸緩衝液 (pH5 ~ 5.5) を用いることにより、高 ~ 低極性、および酸性・中性・塩基性農薬まで幅広い対象成分を、同時にアセトニトリル層へ移行させることができた。
- 分取量の増量 (試料0.8g相当) により、ミルベメクチンとアバメクチン、1-ナフタレン酢酸を除きすべての農薬の測定限界が一律基準 (0.01ppm) を十分満たすことができた。
- 分取後の前処理時間は一人で行った場合、1検体あたり30分であった。
- ほうれん草を用いた添加回収試験 (n=5) では、50成分/60成分が回収率70% ~ 120%以内、回収率が50%未満の農薬は2成分のみと良好であった。また、RSDも56成分/60成分は20%未満であり、ポジティブモードの農薬はRSDがほぼ10%未満と良好であった。ネガティブモードはややバラツキが大きかった。

今後の検討課題

- 再現性 (特にネガティブモード) の向上
 測定条件なのか？ サンプル由来なのか？
 食塩が再現性に関与しているのか？
- 液液分配時の各成分の最適なアセトニトリル:水の比率
- クエン酸Bufferを液体で使用 (濃度の最適化)
- 分析対象農薬数の拡大
- 複雑なマトリックスでの検討
- 外部精度管理 (FAPAS等)

謝辞

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社
吉田義之様 大関由利子様

関東化学株式会社
佐々木久郎様 竹田津研様