

LC/MS/MS を用いた残留農薬の多成分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

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

大関由利子

【目的】中国産冷凍餃子に混入した高濃度メタミドホスによる中毒事件を受けて、食品の安全性が懸念されている中で、生鮮食品だけでなく加工食品中の残留農薬分析の必要性も高まっている。これに伴い分析検体数の大幅な増加が見込まれる中、今まで以上に簡便な迅速分析が必要とされている。今回、LC/MS/MS を用いて前処理法を中心に、通知法一斉分析の LC 法に挙げられた農薬(新たに追加された農薬も一部含む)と GC 法で苦手とする一部の高極性農薬を対象として、濃縮操作のないより簡便な方法を検討したので報告する。

【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)、29 種(農薬混合標準溶液 53)、32 種(農薬混合標準溶液 54)、GC/MS 対象 50 種(農薬混合標準液 22)の内 2 種(アセフェート、メタミドホス)(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

試料 10g

アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

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

無水硫酸マグネシウム 4g

撈拌(手で振とう, 1分)

遠心分離(5分, 3000rpm)

アセトニトリル層を全量分取

定容(10mL, アセトニトリルで調製)

分取 1mL(試料1g相当)

SAIKA-SPE PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有MeOH(pH2.5) 0.5mL

下液

水 0.5mL

SAIKA-SPE C18-30mg

洗液 80% メタノール 0.5mL

定容(4mL, 水で調製)

LC/MS/MS

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	AtlantisT3 (粒径3 μ m, ϕ 2.1 \times 150mm) (Waters)
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 30分(Pos+), メソッド 30分(Neg-)
流速	0.2mL/min, 注入量 5 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 抽出の効率化: 試料ホモジナイズ後に吸引ろ過を行う従来の抽出法は、多検体処理の場合どうしても検体数に比例して時間がかかってしまう。今回、QuEChERS法¹⁾を参考にし、試料ホモジナイズ後に数種の塩を添加し遠心分離を用いること²⁾で、抽出工程の効率化を図った。食塩と無水硫酸 Mg の添加により塩析脱水も同時に行え、またクエン酸塩を用いることで酸性農薬も中性・塩基性農薬と共に一度でアセトニトリル層へ移行できるため、幅広い性質を持つ農薬の同時抽出法としてメリットは大きいと思われる。

固相ミニカラムによる精製³⁾: 抽出液を分取後、PSA ミニカラムを用いてまず高級脂肪酸等の除去を行い、アニオン交換により PSA にトラップされた酸性農薬を 0.4%ギ酸メタノール(pH2.5)で溶出した。下液に水を加え C18ミニカラムを用いることで、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、LC の分析カラム(ODS)へのマトリックス吸着の低減を図った。

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、119成分中84成分が回収率 70~120%以内で RSD もすべて 15%以下と良好な結果が得られた。回収率が 50%未満の農薬は 11成分あり、ほとんどが LogPow4 以上の低極性農薬であり、C18 ミニカラムから溶出されていないことがわかった。溶出溶媒比率や溶出量を変更することで改善できると思われる。

以上より、QuEChERS 法を参考にした抽出法と固相ミニカラムによる精製を組み合わせることで、濃縮操作の無いより簡便な一斉分析法を構築できた。今後は加工食品にも適用できるように検討を行う予定である。

参考文献: 1) <http://www.quechers.com>, 2) Masahiro Okishashi, Food 1 (2007) 101-110, 3) 谷澤ら, 第94回学術講演会要旨P.46



LC/MS/MSを用いた残留農薬の多成分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

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

大関 由利子

AiSTI SCIENCE



検討事項

①抽出の効率化

QuEChERS法および起橋法の抽出を参考

塩析・脱水操作の同時進行、酸性・中性・塩基性農薬の同時抽出

遠心分離の使用（多検体同時処理が可能）

②固相ミニカラムによる精製

バッチ精製（脱着）ではなく、固相ミニカラム精製（分離・分配）により精製効果を高める

③濃縮操作の省略およびコスト削減

エバポレーター（濃縮操作）の不使用

使い捨て容器の使用（ガラス器具の使用を削減）

AiSTI SCIENCE

対象農薬

ポジティブリスト制 LC/MS対象農薬（22のみGC/MS対象）

製品名	農薬数	濃度
農薬混合標準液 44	37種	10ppm
農薬混合標準液 45	19種	10ppm
農薬混合標準液 53（未発売）	29種	10ppm
農薬混合標準液 54（未発売）	32種	10ppm
農薬混合標準液 22 （アセフェート、メタミドホス）	内2種	10ppm

合計 119種

*いずれも関東化学社製

抽出の効率化（通知法と比較）

■通知法（Ⅰ法、Ⅱ法）

試料 20g
 |— アセトニトリル 50mL
 ホモジナイズ
 ★分析時間：40分

吸引ろ過
 |— アセトニトリル 20mLで洗い込み
 定容
 |— アセトニトリルで100mLに定容
 分取 20mL（試料4g相当）
 |— NaCl 10g
 |— Ⅰ法：リン酸緩衝液(pH7) 20mL
 |— Ⅱ法：0.01mol/L 塩酸(pH2) 20mL

液液分配(アセトニトリル/水)
 |— 10分静置後、アセトニトリル層を分取

効率化！

■本法（QuEChERS法と起橋法を参考）

試料 10g
 |— アセトニトリル 10 mL
 ホモジナイズ
 ★分析時間：8分

|— NaCl 1g, MgSO₄ 4g
 |— クエン酸3Na2水和物 1g
 |— クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

攪拌(手で振とう 1分間)
 遠心分離(3000rpm 5分間)

★メリット

- 塩析と脱水(液液分配)を抽出時に同時にできる
- クエン酸塩により酸性農薬を中性、塩基性農薬と一緒にアセトニトリル層へ移行できる(Ⅰ法とⅡ法に分ける必要なし)
- 使い捨て容器の使用により、ガラス器具・分液ロートが不必要



QuEChERS法とAISTI法の比較

■ QuEChERS

① Centrifuge (5min at 3000rpm)
 酸性農薬 (PSAIにトラップされる)を別分析
 ① Option : Acidic pesticides

★ バッチ精製

Mix an aliquot with $MgSO_4$ & PSA/(GCB)

Shake (1 min)

Centrifuge (5min at 3000rpm)

② Option : decompose at pH~4

Acidify extract to pH~5 with 5% formic acid
 (to protect base-sensitive pesticides)

③ Multireidue Analysis
 by GC/MS, LC/MS/MS

精製UP!

■ 本法

分取 1mL (試料 1g 相当)

★ ミニカラム精製①

C18-30mg + PSA-30mg

— 溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL

流出液

— 水 0.5mL

★ ミニカラム精製②

C18-50mg

— 洗液 80%メタノール 1mL

定容(4 mL, 水で調製)

LC/MS/MS

★ メリット

- ミニカラム精製(固相抽出)により、精製効果をUP
- 酸性農薬もPSAから再溶出し、同時分析が可能
- 分析時間は同等(約10分)

AISTI SCIENCE



前処理フロー

抽出 ★ 分析時間: 30分/4検体

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)
 — アセトニトリル 10 mL
 ホモンナイス
 — 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
 — $MgSO_4$ (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)

固相抽出(精製) ★ 分析時間: 10分/4検体

分取 1mL (試料 1g 相当)
 C18-30mg + PSA-30mg
 — 溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL
 流出液
 — 水 0.5mL
 C18-50mg
 — 洗液 80%メタノール 1mL
 定容(4 mL, 水で調製)
 LC/MS/MS

分液ロートによる液液分配や
 エバポレーターなどによる濃縮操作を省略化

AISTI SCIENCE

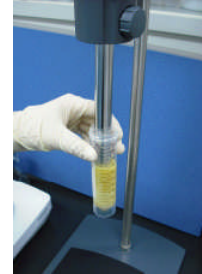
1. 抽出

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)

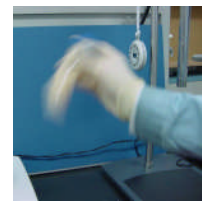
- アセトニトリル 10 mL
 - ホモジナイズ*
 - NaCl 1g
 - クエン酸3Na2水和物 1g
 - クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
 - MgSO₄ 4g
- 攪拌(手で振とう 1分間)



塩 4種類



①ホモジナイズ*



②攪拌

AISTI SCIENCE

2. 塩析・脱水

遠心分離
(3000rpm 5分間)
塩析・脱水

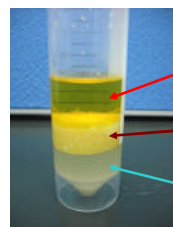


③遠心分離

★ 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。

逆さにしても混ざらない!!



アセトニトリル層
試料層(オレンジ)
水層(pH3)



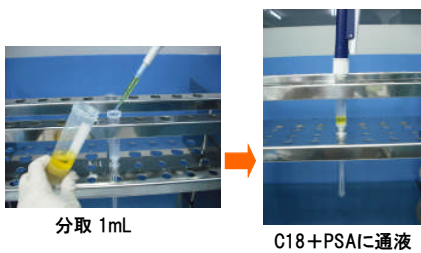
AISTI SCIENCE

3. ミニカラム精製①

分取 1mL (試料 1g 相当)

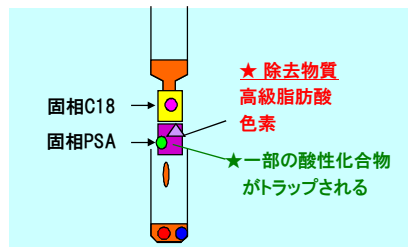
C18-30mg + PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL
流出液



分取 1mL

C18+PSAに通液



- ① C18で低極性の夾雑物を除去し、PSAで脂肪酸や色素等をし、農薬はスルーさせる。
- ② ギ酸メタノールにより、トラップされた酸性化合物のpKaよりpHを下げることで非解離状態にし、PSAから溶出する。



オレンジ

ほうれん草

じゃがいも

AISTI SCIENCE

4. ミニカラム精製②

流出液

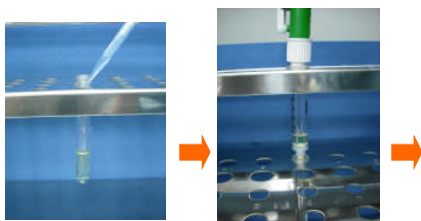
水 0.5mL

C18-50mg

洗液 80%メタノール 1mL

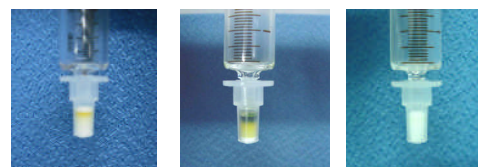
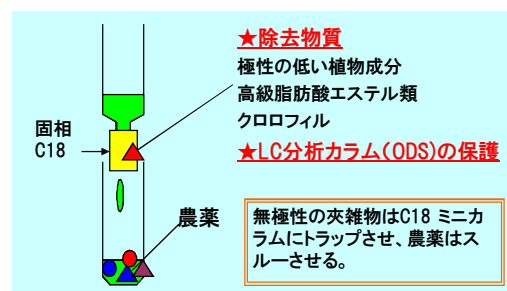
定容(4 mL, 水で調製)

LC/MS/MS



水 0.5mL

C18 50mgに通液



オレンジ

ほうれん草

じゃがいも

AISTI SCIENCE



測定条件

装置	MS : 3200Q TRAP ® system (Applied Biosystems) LC : Prominence (SIMADZU)
分析カラム	Waters Atlantis®T3(ODS) T3 2.0*150mm 3.0 μm
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. (%) ; メソッド①②共通 20% (0-1min) →100% (1-17min) →100% (17-23min) →20% (23-30min)
分析時間	メソッド①30分 (Positive+), メソッド②30分 (Negative-)
流速	0.2mL/min
注入量	5 μL
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)

AISTI SCIENCE



添加回収試験

■ Positive測定

n=5, (%)

農薬名	RT	ほうれん草			じゃがいも			玄米			オレンジ		
		回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率
1 Methamidophos	3.4	60	5	73	64	2	81	64	5	79	70	6	76
2 Acephate	4.0	69	4	84	56	4	84	84	3	92	84	4	93
3 Aldoxycarb	6.3	90	5	100	86	6	104	89	4	96	97	2	97
4 Oxamyl	6.6	90	7	94	90	9	96	86	12	96	82	9	93
5 Flumetsulam	7.5	102	10	110	94	7	123	91	6	88	131	4	136
6 Methomyl	7.6	124	8	87	83	5	106	91	6	90	74	6	75
7 Thiamethoxam	7.9	100	10	102	88	8	99	91	8	93	69	11	96
8 Imidacloprid	9.6	76	6	85	92	10	104	91	5	86	96	10	93
9 Imazaquin	9.8	82	7	95	71	11	96	77	5	86	66	5	82
10 Clothianidin	9.8	72	6	71	97	10	97	87	6	103	71	13	70
11 Chloridazon	10.9	50	5	54	67	16	82	74	6	85	48	8	54
12 Oxycarboxin	11.4	56	5	61	93	7	104	89	4	97	65	10	70
13 Thiachloprid	11.6	52	5	56	78	4	93	62	3	67	50	3	52
14 Aldicarb	12.7	83	12	87	99	12	102	84	11	87	79	6	76
15 Thiabendazole	13.2	67	4	81	83	3	90	78	4	94	842	3	880
16 Cloransulam-methyl	13.3	68	13	79	86	9	90	82	7	88	77	10	76
17 Dichlosulam	13.6	79	2	86	96	3	99	85	7	92	78	5	82
18 Azamethiphos	13.7	86	4	90	102	10	100	90	6	94	57	7	58
19 Thidiazuron	14.0	73	6	81	81	6	96	73	8	86	72	3	76
20 Bendiocarb	14.0	88	8	90	82	7	85	91	2	95	87	5	88
21 Carbofuran	14.1	95	5	100	83	7	98	90	4	93	81	5	86
22 Tebuthiuron	14.5	84	3	92	87	2	94	84	4	91	71	2	73
23 Carbaryl	14.6	89	5	91	90	5	98	91	4	91	74	4	77
24 Thiodicarb	15.0	25	34	91	97	16	97	80	4	90	80	7	91
25 Monolinuron	15.0	91	5	98	89	7	84	90	8	104	92	3	94
26 Primicarb	15.5	89	4	95	88	9	95	89	3	94	84	3	85
27 Dimethirimol	15.6	82	4	90	85	5	92	83	4	98	70	3	77
28 Methabenzthiazuron	15.6	84	5	85	87	8	96	80	6	88	74	6	78
29 Furametpyr	15.6	90	7	93	87	11	103	87	4	89	78	4	79
30 Isoxaflutole	15.8	85	3	90	96	5	103	88	5	88	83	4	98

AISTI SCIENCE

添加回収試験

■ Positive測定 n=5, (%)

農薬名	RT	ほうれん草			じゃがいも			玄米			オレンジ		
		回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率
31 Forchlorfenuron	15.9	84	7	90	87	6	98	84	3	93	78	7	82
32 Diuron	16.0	94	8	104	87	6	90	96	7	94	84	3	94
33 Phenmedipham	16.2	82	4	90	87	5	96	80	7	88	78	7	82
34 Azinphos-methyl	16.3	81	8	74	100	15	102	79	11	86	71	6	85
35 Haloxyfop	16.3	93	9	101	79	4	86	92	10	102	77	5	79
36 Fluridon	16.5	82	5	88	78	3	89	79	5	84	79	3	81
37 Pyrifalid	16.6	81	6	86	90	7	100	84	2	92	63	5	64
38 Azoxystrobin	16.6	88	5	93	82	4	90	88	6	90	82	3	83
39 Fenobucarb	16.7	87	5	90	92	3	100	86	4	90	69	3	69
40 Methiocarb	16.9	89	3	92	87	6	101	88	5	91	60	2	62
41 Fenamidone	16.9	86	8	94	85	5	89	87	6	92	70	8	69
42 Linuron	16.9	93	6	98	84	4	95	86	5	101	90	2	96
43 Acibenzolar-S-methyl	17.0	85	6	107	89	3	97	90	6	93	88	5	87
44 Boscalid	17.1	95	5	87	74	6	75	98	3	106	86	7	85
45 Ferimzone EandZ	17.3	83	4	94	79	2	82	82	3	93	80	2	83
46 Methoxyfenozide	17.4	86	7	95	82	4	89	84	2	87	75	5	85
47 Dymuron	17.5	84	3	84	88	2	95	85	3	80	50	3	49
48 Chlorxuron	17.6	87	7	88	105	5	112	87	3	89	61	2	64
49 Cumyruon	17.7	88	5	88	88	8	102	88	8	89	43	5	43
50 Butafenacil	17.8	93	5	103	87	13	84	94	3	102	58	4	58
51 Mepanipyrim	17.9	87	7	87	75	10	86	83	4	92	51	2	52
52 Flufenacet	17.9	91	3	92	86	5	98	84	5	91	57	3	59
53 Iprovalicarb	17.9	88	4	96	80	4	92	85	4	95	64	4	68
54 Chromafenozide	17.9	88	6	94	93	6	92	84	3	100	73	1	79
55 Simeconazole	17.9	84	4	87	96	5	94	83	7	94	74	2	81
56 Trifluconazole	18.0	92	3	92	84	7	92	92	6	98	86	1	85
57 Cyazoflamid	18.1	94	7	104	67	5	75	88	6	88	83	7	82
58 Epoxiconazole	18.1	88	4	88	79	5	93	88	7	89	89	3	96
59 Indanofan	18.1	86	4	85	78	5	89	86	13	106	98	4	100
60 Naproanilide	18.2	85	5	93	88	6	98	84	11	90	82	6	84

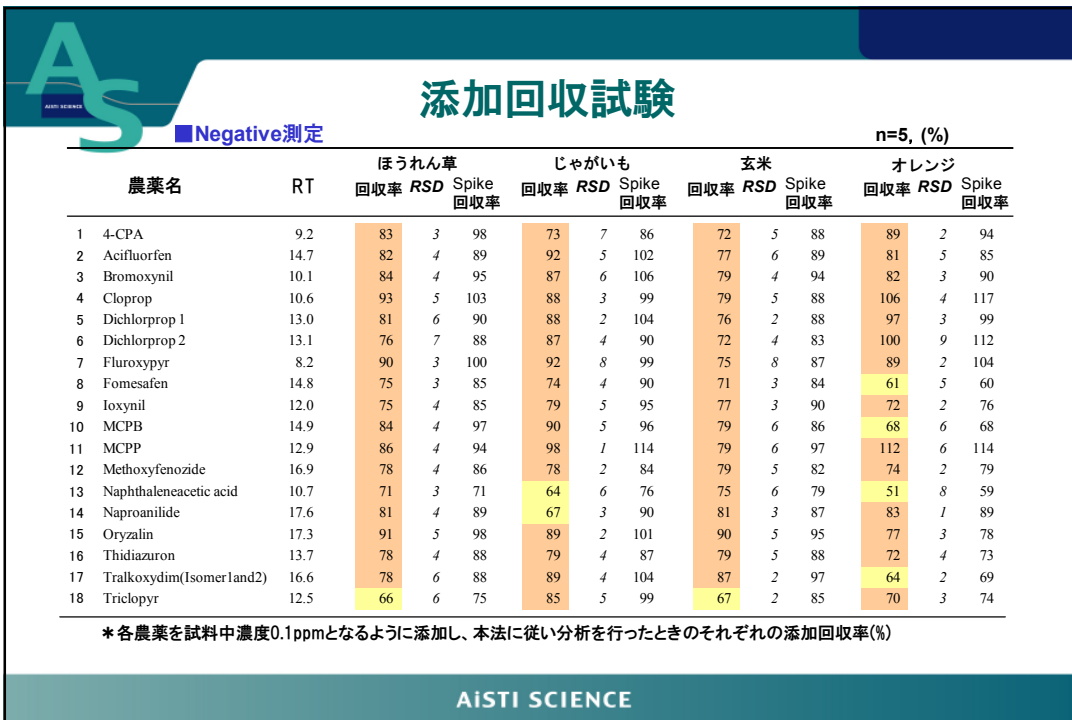
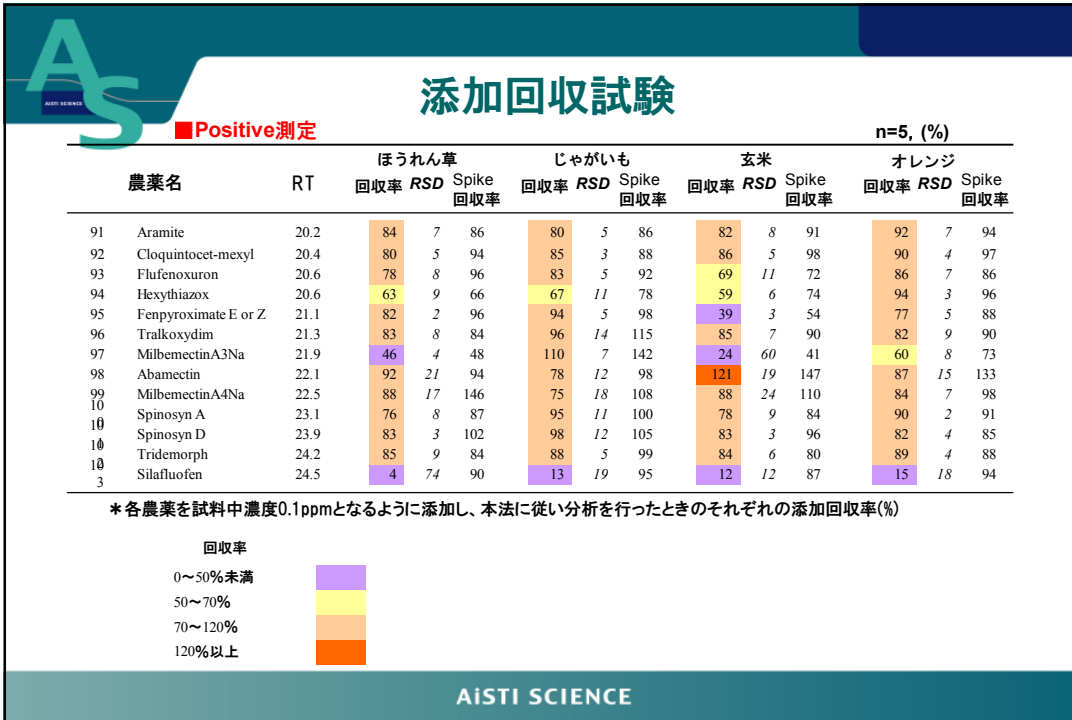
AISTI SCIENCE

添加回収試験

■ Positive測定 n=5, (%)

農薬名	RT	ほうれん草			じゃがいも			玄米			オレンジ		
		回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率	回収率	RSD	Spike 回収率
61 Diflubenzuron	18.2	78	15	108	73	29	101	92	10	102	108	11	119
62 Tebufenozide	18.3	90	10	93	98	4	92	87	9	86	84	4	81
63 Fenoxycarb	18.3	88	11	92	95	7	99	86	7	91	100	6	110
64 Iprodione	18.3	73	16	64	112	23	117	75	31	122	107	29	125
65 Tetrachlorvinphos	18.5	91	5	88	86	2	92	85	8	95	68	4	70
66 Anilofos	18.7	79	4	90	84	5	85	78	5	86	87	3	94
67 Imazalil	18.8	86	5	91	67	7	70	80	5	83	1362	5	1432
68 Cyprodinil	18.9	86	6	98	86	8	94	79	5	90	77	3	84
69 Carpropamide	18.9	92	8	92	88	5	98	92	6	91	94	4	100
70 Triflumuron	19.0	85	9	84	94	7	107	84	6	80	85	4	88
71 Cyflufenamid	19.0	90	5	97	94	6	98	83	5	86	86	7	91
72 Pyraclostrobin	19.0	88	6	94	85	4	91	89	5	91	88	1	91
73 Clofentezine	19.2	94	5	96	75	8	84	87	9	107	91	6	93
74 Penycuron	19.3	84	6	91	87	5	102	83	5	86	88	3	92
75 Indoxacarb	19.3	90	14	101	91	9	96	90	12	80	92	6	104
76 Pyrazolynate	19.3	92	7	94	91	6	96	93	7	103	95	6	97
77 Hexaflumuron	19.5	80	10	80	95	12	125	68	14	76	78	13	82
78 Novaluron	19.6	83	5	106	92	8	100	85	6	106	92	5	96
79 Cycloate	19.7	88	10	84	81	6	86	82	9	98	90	11	88
80 Di-allate	19.8	78	5	94	92	8	106	81	7	100	105	9	111
81 Benzofenap	19.9	83	2	93	87	3	87	76	7	90	85	7	91
82 Pentoxazone	20.0	98	13	86	87	48	142	77	29	64	83	21	66
83 Lactofen	20.0	85	10	106	86	7	83	86	4	97	86	6	88
84 Oxaziclonmefone	20.0	88	1	92	86	2	94	83	3	84	88	4	90
85 Fenoxaprop-ethyl	20.0	89	6	92	103	3	113	87	5	90	92	5	94
86 Furathiocarb	20.1	75	8	87	88	4	94	81	4	94	80	7	90
87 Clomeprop	20.1	76	5	80	99	8	104	76	3	92	87	4	99
88 Teflubenzuron	20.2	79	11	81	83	12	77	84	13	74	81	18	94
89 Lufenuron	20.2	86	3	90	79	9	103	87	12	84	87	9	91

AISTI SCIENCE





回収率分布

作物	ほうれん草	ジャガイモ	玄米	オレンジ
試料中濃度	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm
回収率(%)				
ND, 0-50	4	1	3	3
50-70	9	7	6	19
70-120	105	111	109	94
120-	1	0	1	3
合計	119	119	119	119

(単位:成分)

AISTI SCIENCE



まとめ

- 抽出法をQuEChERS法と起橋法を参考にし、試料ホモジナイズ後に数種の塩を添加し、遠心分離を用いたことにより、従来の吸引ろ過法と比べて抽出行程の大幅な効率化が図れた。
食塩と無水硫酸Mgの添加により塩析・脱水も同時に行え、またクエン酸塩(pH5~5.5)を用いることで酸性農薬も中性・塩基性農薬と同時抽出が可能になった。
- バッチ精製(脱着)ではなく、固相ミニカラム精製(分離・分配)を用いたことで、精製効果が高まり、マトリックス効果の低減が図れた。(spike回収率を参照)
- 代表的な4作物の添加回収試験(n=5)において、119成分中94成分以上が回収率70%~120%以内、回収率が50%未満の農薬は4成分であった。ネガティブモードはすべてRSDが10%未満、ポジティブモードもRSDが20%以上は4成分と良好な結果が得られた。
- QuEChERS法を参考にした抽出法と固相ミニカラムによる精製を組合わせたことで、濃縮操作の無いより簡便で迅速な(40分/4検体)、一斉分析法を構築できた。

AISTI SCIENCE



謝辞

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社様
関東化学株式会社様

参考文献

Michelangelo Anastassides, <http://www.quichers.com>

Masahiro Okihashi, Food 1 (2007) 101-110

永井雄太郎他, 第30回農薬残留分析研究会講演要旨 102-110