

## LC/MS/MS を用いた農産物中残留農薬の一斉分析

西川 徹、本村 秀章、川口 喜之

## Simultaneous Analysis of the Pesticide Residue in Agricultural Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Toru NISHIKAWA, Hideaki MOTOMURA, and Yoshiyuki KAWAGUTI

Analytical method by liquid chromatography/tandem mass for simultaneous determination of pesticides in agricultural products (potato, tomato, green onion, and spinach) was studied. Mass spectral acquisition was done by applying multiple reaction monitoring (MRM). The pesticides were investigated by the method for simultaneous determination using LC/MS which follows the official method. In brief, the samples were prepared extracted by acetonitrile, purified by partition using phosphate buffer and ENVI-carb/LCNH2 (500mg/500mg, 6mL). The pesticides were separated by reversed-phase LC using Mightsil RP-18GP column (3 $\mu$ m, 2.1mm $\times$ 150mm) and determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry. The quantitative limits were range from 0.1 pg to 15 pg, respectively. The recoveries rates of pesticides after added to be 0.1 $\mu$ g/ml were almost 60 ~ 120 %, respectively. We demonstrated that this method is suited to determine pesticides in agricultural products.

Key words: Liquid chromatography/tandem mass, Simultaneous determination, Pesticide residues, Agricultural products

キーワード: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析、一斉分析、残留農薬、農産物

## はじめに

平成18年5月29日からのポジティブリスト制導入に伴い、多くの農薬を効率的な検査方法の確立は必要不可欠である。当センターの農産物中の残留農薬調査においては、平成18年度よりGC/MSによる一斉分析法でスクリーニングを行い、農薬が検出された場合は更にGC/MS (SCAN)またはGCで確認を行う方法を主として用いており<sup>1)</sup>、平成19年よりGC/MSを用いて120種類の農薬について一斉分析で検査を行っている。

更にポジティブリスト制に対応するため、平成19年よりGC/MSで分析が困難なLC対象農薬についても一斉分析の検討を開始した。そこで今回、37種類の農薬についてLC-MS/MSによる分析を検討したので報告する。

## 調査方法

## 1. 試料及び試薬

## (1) 試料

添加回収実験には県内産のばれいしよ、トマト、ねぎ、ほうれん草を使用した。

## (2) 検査対象農薬

農薬混合標準溶液 44(関東化学(株)製, 10ppm)を用いた(Table 1)。これをメタノールで希釈して10mlとし、標準原液とした(2ppm)。

## (3) 試薬

蒸留水、メタノールは関東化学(株)製のLC/MS用を用い、アセトニトリル、アセトン及びトルエンは残留農薬分析用(5000倍濃縮品)を使用した。

塩化ナトリウムは残留農薬分析用を、その他の試薬は特級品を用いた。

精製カラムは ENVI-Carb/LCNH2(500mg/500mg, 6mL, SUPELCO社製)を用いた。

## 2. 分析装置及び条件

## (1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

高速液体クロマトグラフには(株)島津製作所製LC-VPシステムを使用し、分析カラムは関東化学(株)製 Mightsil RP-18GP (2.0mm i.d. $\times$ 150mm、粒子径3 $\mu$ m)を用いた。カラム温度は40 $^{\circ}$ Cとし、移動相はA液に5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液、B液に5mmol/L酢酸アンモニウム含有メタノールを用い、B液(%): 15(0min) $\rightarrow$ 40(1min) $\rightarrow$

40 (3.5min) → 50 (6min) → 55 (8min) → 95 (17.5-30min) でグラジエント分析を行い、次の分析までは 10 分間平衡化した。また、流速は 0.2 ml / min、試料注入量は 5µl とした。

(2) 質量分析装置

アプライドバイオシステムズ社製 API2000 を用いた。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブ及び

Table1. Retention time and compound-specific ESI-MS/MS parameters.

Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP <sup>※1</sup> (V)	CE <sup>※2</sup> (V)	LOD <sup>※3</sup> (pg)
アザメチホス Azamethiphos	10.55	324.9	112	66	51	0.8
アジンホスメチル Azinphos-methyl	14.4	318	136	41	33	0.8
アニロホス Anilofos	17.57	368	125	61	41	0.7
アバメクチン B1a AbamectinB1a	21.18	890.5	305	36	35	5
イソキサフルトール Isoxaflutole	19.57	359.8	261.9	91	21	0.6
イプロバリカルブ Iprobacarb	16.41	320.9	119.1	56	23	0.9
イミダクロプリド Imidacloprid	15.44	256	91.3	66	43	5
インドキサカルブ Indoxacarb	18.5	527.9	150	76	31	5
オキシカルボキシシン Oxycarboxin	7.88	267.9	175.2	61	19	2.4
オリザリン Oryzalin	16.69	344.81	77.8	-91	-74	2.8
キザロホップエチル Quizalofop-ethyl	19.23	373	255	81	43	3.6
Cloquintocet-1-methyl-hexyl ester	19.57	335.9	179 (192)	51	47	0.4
クロチアニジン Clothianidin	6.06	248	58	-61	-22	1.5
クロマフェノジド Chromafenozide	16.3	395	175.1	76	21	0.8
クロメプロップ Clomeprop	10.54	324.8	183	61	21	0.6
クロリダゾン Chloridazon	7.08	222	77	86	55	6
シフルフェナミド Cyflufenamid	18.03	413	91.2	81	55	3
シメコナゾール Simeconazole	16.63	294	70	61	39	1.7
ジメチリモール Dimethirimol	13.16	210.1	71.2 (140.1)	51	47	0.5
チアクロプリド Thiachloprid	7.94	253	126	81	27	0.9
チアベンダゾール Thiabendazole	9.62	202	175.1	101	35	0.9
チアメトキサム Thiamethoxam	5.13	292	181	71	33	7.5
トラルコキシジム Tralkoxydime	13.7 (16.2)	327.97	253.9	-76	-36	0.6
ナプロアニリド Naproanilide	17.04	292	120	56	29	0.2
ピラゾレート Pyrazolate	18.22	439	91	91	55	1.5
ピリフタリド Pyrifthalid	14.61	318.86	139.2	76	39	1.4
フェノキシカルブ Fenoxycarb	17.18	302	88	96	29	1.1
フェリムゾン(E) Ferimzone	15.28	255.014	132.2	46	29	0.1
フェリムゾン(Z) Ferimzone	15.29	255.014	91.2	41	45	0.8
フェンメディファム Phenmedipham	14.4	301	136	101	29	1.1
ブタフェナシル Butafenacil	16.31	492	180	21	59	0.5
フラチオカルブ Furathiocarb	19.25	382.9	167 (195)	76	35	1.8
ベンゾフェナップ Benzofenap	18.95	431	105	91	45	2.9
ミルベメクチン A3 MilbemectinA3	21.22	546.3	511	11	17	15
ミルベメクチン A4 MilbemectinA4	21.8	560.1	524.8	11	17	15
メキシフェノジド Methoxyfenozide	15.8	369	149.1	76	21	2.4
ラクトフェン Lactofen	19.26	479	343.9	61	29	1.1

※1: Declustering Potential,

※2: Collision Energy

※3: Limit of Detection

ネガティブイオン化法により行った。ポジティブモードではイオンスプレー電圧は5.0kV、イオン源温度は500°Cに設定し、ネガティブモードではイオンスプレー電圧は4.5kV、イオン源温度は500°Cに設定した。

また標準溶液をメタノール:5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液の(1:1)溶液で希釈し、0.5~1.0ppmの濃度で各農薬のトランジションを検計した。

### 3. 分析方法

厚生労働省通知法「LC/MSによる農薬等の一斉分析法(農産物)」<sup>2)</sup>に準じて行った。すなわち、それぞれ均一化した試料20gにアセトニトリル50mLを加えホモジナイズした後、遠心分離(2,500rpm, 5min)し上清を分取した。残った残渣に、アセトニトリル20mLを加え同様に操作した。得られた上清を合わせ、アセトニトリルを加え正確に100mLとした。

抽出液20mLを採り、塩化ナトリウム10g及び0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)20mLを加え、10min振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。野菜・果実の場合は、アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水し、無水硫酸ナトリウムはろ過で除き、ろ液を40°C以下で濃縮、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物はアセトニトリル:トルエン(3:1)混液2mLに溶かした。

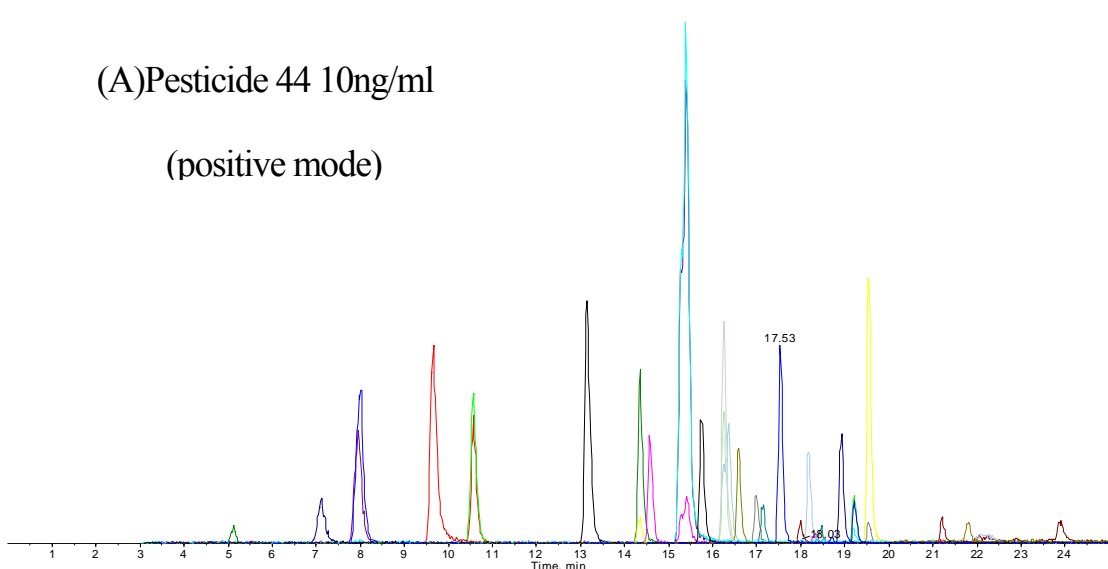
あらかじめアセトニトリル:トルエン(3:1)混液10mLでコンディショニングしたENVI-Carb/LCNH2に上記抽出液を負荷し、さらにアセトニトリル:トルエン(3:1)混液20mLを負荷、全溶出液を40°C以下で濃縮した。これにアセトン10mLを加え1mL以下に濃縮し、再度アセトン5mLを加えて濃縮、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物はメタノールに溶かし、4mLに定容した。これを試験溶液とし、LC-MS/MSにより測定した。なお、検量線は0.01~0.2ppmの範囲で作成した。

$6.0 \times 10^4$

(A)Pesticide 44 10ng/ml

(positive mode)

cps



450

(B)Pesticide44 10ng/ml

(negative mode)

cps

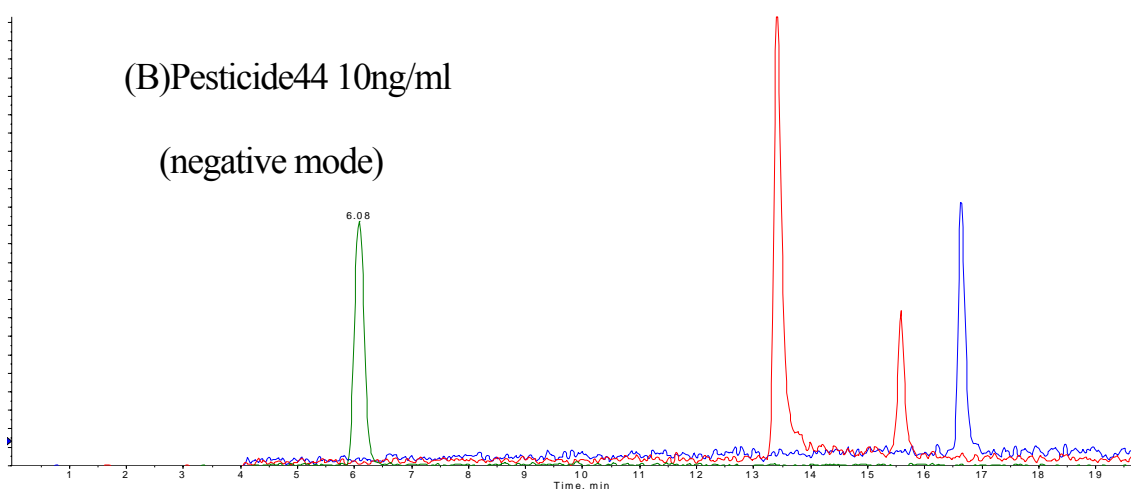


Figure.1 The chromatogram of pesticides mixed standard in positive mode (A) and negative mode (B) by LC-MS/MS

#### 4. 添加回収実験

添加量は2 $\mu$ g (最終試験液:0.1 $\mu$ g/ml)とし、3の分析方法を用いてn=3で回収実験を行った。なお、いずれも添加してから30分経過後分析を開始した。同時に各サンプルのブランク溶液に標準溶液を添加し、マトリックス効果についても見当を行った。

### 結果と考察

#### 1. 分析条件の検討

##### (1) 液体クロマトグラフ条件の検討

通知法において分析カラムは3~3.5 $\mu$ mのODS系カラムが例として示されているため、第一選択としてこれに当てはまるカラムを検討したところ、Mightysil RP-18GP (2.0mm i.d.×150mm、粒子径3 $\mu$ m、関東化学株)がピーク形状及び分離も比較的良好であったためカラムはMightysil RP-18 GPを選択した(Figure1)。

移動相についてアセトニトリルとメタノールを検討したところ、アセトニトリルではピーク形状は良かったが、ミルベメクチンA3とA4、ラクトフェンなどのピークが検出されなかった。メタノールでは混合標準液に含まれる全ての成分が溶出されたので、移動相には5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液と5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液含有メタノールを用い、通知法に従ったグラジエントにより分析を行った。本移動相でも分離やピーク形状は良好であったが、トラルコキシジムに関してはピークが2本溶出したため、2つのピーク面積の和により定量を行った。1回の分析時間は30分としたが、機器を安定させる為にA液の割合を85%にして10分間安定化した後、次のサンプルの分析を行った。

##### (2) 質量分析計の条件の検討

化合物ごとの条件についてはTable1に示した。イオン化はESIによるポジティブイオン化とネガティブイオン化によって行い、イオンスプレー電圧やイオン源温度等のイオンソースのパラメーターは、感度の低いミルベメクチンの感度が最大になるようフローインジェクションアナリシス(FIA)により最適な条件を決定した。また化合物ごとの最適条件については、インフュージョンポンプを用いたMRM法により決定した。

ポジティブイオン化ではアバメクチン B1a、ブタフェナシル、ミルベメクチン類、ラクトフェンについてはアンモニア付加体[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>を親イオンとして選択し、それ以外はプロトン付加体[M+H]<sup>+</sup>を親イオンとした。

オリザリン、クロチアニジン及びトラルコキシジムはネガティブイオン化の方が高感度であったため、これら3種についてはプロトン脱離体[M-H]<sup>-</sup>を親イオンとした。

今回の検討により、ポジティブモードで34成分、ネガティブモードで3成分の一斉分析が可能になり、その検出下限値(LOD, S/N=3)は0.1pg~15pgと高感度であった。また、0.01ppmにおける繰り返し測定においても再現性が確認され、キャリアオーバーなどの問題もなかった。クロマトグラム上に一部のサンプルからピークが確認されたが、定量を阻害するような妨害ピークはみられなかった。

#### 2. 回収試験

回収試験の結果についてTable2に示す。ほとんどの農薬で回収率は70%~120%と良好であった。また、変動係数(CV)もほとんどにおいて10%以下であり、再現性も確認された。

LC/MS/MSで分析を行なう際、試料由来のマトリックス成分がイオン化を促進または抑制し、定量を阻害することが知られている。そこで、本法により調製したブランク溶液に0.05ppmになるように標準を添加した時のイオン強度と、同濃度での標準溶液のみのイオン強度について比較した。サンプル毎に注目すると、バレイシヨにおいてアジンホスメチル、ピラゾレート、フェンメディファムで120%を超えたが、これらのサンプルはイオン化が促進されていることが確認された。標準添加法による定量結果においてはアジンホスメチル97.2%、ピラゾレート78.7%、フェンメディファム94.3%と良好であった。ほうれん草においてはアバメクチン B1a69.4%、クロチアニジン69.7%、ミルベメクチン A3で54.5%、ミルベメクチン A4で69.2%と70%を下回る結果であった。トマトにおいては回収率こそ70%~120%であったが、多くの農薬でイオンサプレッションが確認された。ほうれん草の最終サンプルは完全に色素の除去が出来ていなかったため、これらのマトリックスがイオンサプレッションを引き起こしている可能性が考えられる。標準添加法による定量結果ではアバメクチン B1a78.9%、クロチアニジン94.0%、ミルベメクチン A3で85.1%、ミルベメクチン A4で89.6%であった。一方で青ネギにおいては大きなマトリックス効果は見られなかった。以上より、回収率が70%~120%にならない農薬を定量する際にはサンプルの希釈や精製の追加などのマトリックス効果を減らす方法の検討が必要である。また青ネギのジメチリモールにおいては回収率58%と低かったが特にマトリックス効果はみられなかった。しかしながら、CV値が6.1%とそれほどばらついていないこと、ジメチリモールの検出下限値は1ppbよりも低いことからスクリーニングとしては適用可能と考えられる。

Table 2. The recovery rates of pesticide from each agricultural products.

Compound	Recovery (%)							
	バレイショ	CV	トマト	CV	ネギ	CV	ホウレン草	CV
アザメチホス Azamethiphos	91.8	3.3	71.3	10.7	93.0	8.8	68.9	4.0
アジンホスメチル Azinphos-methyl	93.0	7.2	102.3	2.5	88.2	3.2	84.7	5.0
アニロホス Anilofos	89.5	2.8	92.4	1.7	86.0	4.0	87.9	2.6
アバメクチン B1a AbamectinB1a	111.7	1.0	80.5	15.6	92.2	10.1	69.4	8.3
イソキサフルトール Isoxaflutole	97.4	4.5	109.0	6.4	86.6	0.7	86.8	2.7
イプロバリカルブ Iprobaticarb	88.7	6.6	93.1	0.8	87.4	1.6	87.1	0.9
イミダクロプリド Imidacloprid	75.4	6.9	83.5	1.9	83.9	5.5	80.9	1.5
インドキサカルブ Indoxacarb	105.3	3.3	116.3	13.2	84.4	2.2	74.1	0.8
オキシカルボキシ Oxycarboxin	87.1	2.0	74.2	7.0	80.1	6.9	80.2	5.8
オリザリン Oryzalin	84.0	2.9	96.0	1.5	80.6	3.0	77.2	4.2
キザロホップエチル Quizalofop-ethyl	82.4	2.5	92.0	0.7	86.1	2.4	87.0	3.2
Cloquintocet-1-methyl-hexyl ester	100.2	4.6	102.0	2.0	86.8	2.0	83.4	2.0
クロチアニジン Clothianidin	84.8	2.4	88.0	7.4	72.1	1.8	69.7	1.1
クロマフェノジド Chromafenozide	89.5	7.4	90.4	1.3	94.1	2.0	86.3	1.9
クロメプロップ Clomeprop	95.4	2.5	74.0	8.3	94.3	8.1	70.9	4.2
クロリダゾン Chloridazon	94.9	4.6	88.0	7.4	89.0	0.7	83.3	2.4
シフルフェナミド Cyflufenamid	102.9	2.8	98.3	1.0	90.2	4.1	87.0	6.8
シメコナゾール Simeconazole	89.4	3.6	90.7	0.8	88.1	6.1	83.3	0.1
ジメチリモール Dimethirimol	68.9	10.6	85.0	0.6	58.1	6.1	76.8	2.7
チアクロプリド Thiacloprid	94.9	4.3	88.9	4.6	89.3	0.3	81.3	2.8
チアベンダゾール Thiabendazole	85.8	4.9	91.1	1.3	68.9	16.8	79.5	7.5
チアメキサム Thiamethoxam	93.0	5.1	101.2	9.9	76.1	2.4	75.8	4.1
トラルコキシジム Tralkoxydime	78.6	7.9	79.3	9.8	73.5	1.3	74.8	3.6
ナプロアニリド Naproanilide	90.4	1.1	90.0	0.5	86.3	2.6	86.1	1.8
ピラゾレート Pyrazolate	133.0	3.4	74.0	9.6	77.3	12.7	65.8	6.0
ピリフタリド Pyrifthalid	94.3	3.1	96.2	2.1	85.7	5.1	82.1	3.6
フェノキシカルブ Fenoxycarb	86.9	7.2	94.0	2.0	86.4	9.4	87.7	2.7
フェリムゾン(E) Ferimzone	72.4	0.8	82.4	1.1	82.7	5.2	81.4	2.3
フェリムゾン(Z) Ferimzone	74.1	0.9	84.8	5.7	82.2	3.9	83.4	2.8
フェンメディファム Phenmedipham	126.3	5.2	95.4	4.4	87.9	1.6	85.8	9.9
ブタフェナシル Butafenacil	89.6	5.4	84.5	1.4	86.8	1.7	86.7	1.9
フラチオカルブ Furathiocarb	95.1	2.0	97.5	2.2	85.3	0.8	83.6	2.0
ベンゾフェナップ Benzofenap	93.8	4.2	94.3	2.5	84.3	3.6	83.7	0.4
ミルベメクチン A3 MilbemectinA3	94.5	4.4	114.3	8.3	77.5	1.6	54.5	2.3
ミルベメクチン A4 MilbemectinA4	101.4	5.3	66.2	7.4	82.7	3.0	69.2	2.0
メトキシフェノジド Methoxyfenozide	94.1	2.7	87.1	1.9	80.3	2.5	89.3	3.1
ラクトフェン Lactofen	111.7	1.4	79.5	9.4	84.7	2.4	94.5	1.2

## まとめ

厚生労働省通知法に準じた方法により、LC- MS/MS において 37 農薬の分析を検討したところ、ポジティブモードとネガティブモードの両方において全てにおいて 0.01ppm よりも高感度で検出することが可能であった。バレイショ、トマト、青ネギ、ほうれん草における添加回収試験についても一農薬を除き、ほとんどの農薬で回収率 70%~120%であり、これにあてはまらなかった一部の農薬についても標準添加法を用いた定量結果では回収率は良好であった。

今後検査対象農薬を随時追加し、行政における残留農薬検査や危機管理対策に役立てていきたい。

## 参考文献

- 1) 本村秀章, 他: 農産物中の残留農薬(第2報), 長崎県衛生公害研究所報, 52, 24~31(2006)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知”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(一部改正)”平成 17 年 11 月 29 日, 食安発第 1129002 号