

Table 2. Recoveries of 27 Pesticides from Sep-Pak[®] Florisil and Bond Elut[®] PSA

Group	Pesticide	Recovery (%) [*]			
		1 fr.	2 fr.	3 fr.	total
A	Thiabendazole			71.7	71.7
	Carbaryl		89.8		89.8
	Imazaryl			87.4	87.4
	Iprodione		91.6		91.6
	Hexaflumuron			96.8	96.8
	Chlorfluazuon			91.5	91.5
	Ethofenprox	94.5			94.5
B	Imibenconazole Metabolite			103.7	103.7
	Furametypyr		93.5		93.5
	Benfuresate		90.4		90.4
	Pyrazoxyfen		90.8		90.8
	Iprodione Metabolite		96.9		96.9
	Hexythiazox		85.5		85.5
	Silafluofen	94.0			94.0
C	Methabenzthiazuron		97.5		97.5
	Inabenfide			98.7	98.7
	Myclobutanil			87.9	87.9
	Ethobenzanid		100.8		100.8
	Pencycuron		91.8		91.8
	Buprofezin	35.8	56.1		91.9
D	Dymron		93.0		93.0
	Tebufenozide		94.5		94.5
	Clofentezine	89.3			89.3
	Flufenoxuron		14.3	75.1	89.4
E	Diflubenzuron		67.8	20.9	88.7
	Triflumizole		32.8	61.3	94.1
	Fenpyroximate		90.5		90.5

* 1 μ g of each pesticide was used.

* * elute conditions 1 fr.: 15% ether/*n*-hexane 20 mL,
2 fr.:15% acetone/*n*-hexane 20mL, 3 fr.:50% acetone/*n*-hexane 20mL

Table 3. Effect of SFE Pressure and Temperature on Recoveries of Pesticides

Pesticide	Recovery (%) [*]			
	40°C			70°C
	300 kg/cm ²	200 kg/cm ²	150 kg/cm ²	300 kg/cm ²
Methabenzthiazuron	85.0	83.2	80.4	87.3
Iprodione	82.3	80.1	76.1	83.4
Tebufenozide	92.1	86.7	86.3	77.1
Clofentezine	57.8	25.1	0.0	0.0
Pencycuron	88.9	75.9	79.6	68.5
Flufenoxuron	75.2	75.4	63.4	69.8
Fenpyroximate	82.4	80.5	87.0	77.0

* Each pesticide was spiked at 0.5 ppm to apple.

Table 4. Comparison for Recoveries of 27 Pesticides by Packing Manner to SFE

Group	Pesticide	Recovery (% ,mean±S.D.)*			
		Potato		Apple	
		I **	II ***	I	II
A	Thiabendazole	59.7	71.1	43.2	54.9
	Carbaryl	66.8	89.4	87.5	97.0
	Imazaryl	0.0	64.0	54.0	58.1
	Iprodione	104.0	80.0	88.3	82.3
	Hexaflumuron	68.2	77.1	62.1	71.4
	Chlorfluazuon	58.4	73.5	47.8	74.8
	Ethofenprox	78.1	72.0	62.3	81.9
B	Imibenconazole Metabolite	55.9	89.1	91.0	91.0
	Furametypyr	116.9	92.6	78.9	94.4
	Benfuresate	69.1	90.7	74.3	75.6
	Pyrazoxyfen	91.6	98.3	90.7	82.2
	Iprodione Metabolite	89.8	94.7	74.9	79.0
	Hexythiazox	74.4	80.6	78.9	74.0
	Silafluofen	128.9	85.8	0.0	65.9
C	Thiabendazole	20.7	73.0	70.1	56.4
	Methabenzthiazuron	93.0	88.3	90.8	85.3
	Inabenfide	97.0	84.4	81.9	78.5
	Myclobutanil	101.8	93.5	68.9	93.4
	Ethobenzanid	113.6	93.8	61.1	87.5
	Pencycuron	79.4	89.4	77.6	88.7
	Buprofezin	39.1	82.6	67.7	72.1
D	Dymron	87.2	89.0	81.8	85.9
	Tebufenozide	97.1	93.6	92.6	93.1
	Clofentezine	37.5	25.1	0.0	58.4
	Flufenoxuron	69.6	78.0	53.2	75.8
E	Thiabendazole	23.9	47.6	30.2	56.7
	Diflubenzuron	58.4	56.3	50.4	70.4
	Triflumizole	74.7	74.1	40.7	55.4
	Fenpyroximate	80.8	77.3	64.6	81.9

* Each pesticide was spiked at 0.5 ppm to the samples.

** I was primary method that Celite 1g and polymer 1g were added to shredded sample, and completely mixed them were to granular condition.

*** II was improved method that a bit of Celite was added to the sample ultimately furthermore above the process.

Table 5. Recoveries of 27 Pesticides added to Agricultural Products by the Proposed Method

Group	Pesticide	Recovery (% mean±S.D.)*				
		Cucumber	Potato	Apple	Radish	Banana
A	Thiabendazole	75.3±6.7	71.1±0.8	54.9±10.1	63.3±15.5	94.7±33.1
	Carbaryl	83.7±6.1	89.4±7.2	97.0±0.9	87.0±0.2	90.9±0.6
	Imazaryl	58.9±10.5	64.0±15.4	58.1±7.9	49.3±9.9	61.3±2.7
	Iprodione	88.4±6.0	80.0±6.3	82.3±3.3	75.9±5.5	86.0±3.4
	Hexaflumuron	73.9±5.6	77.1±9.4	71.4±5.4	74.0±4.0	83.1±6.4
	Chlorfluazuon	72.5±1.2	73.5±3.3	74.8±7.8	68.9±4.5	84.1±5.9
	Ethofenprox	81.4±4.6	72.0±4.3	81.9±0.2	72.9±8.7	80.1±3.5
	Imibenconazole Metabolite	103.6±4.6	89.1±5.1	91.0±5.8	76.8±10.0	85.3±3.3
	Furametypyr	103.3±10.5	92.6±6.4	94.4±1.1	95.6±5.0	99.2±1.0
	Benfuresate	78.8±15.1	90.7±7.7	75.6±0.5	89.1±5.4	73.9±10.1
B	Pyrazoxyfen	95.9±0.8	98.3±3.9	82.2±0.5	96.8±2.5	85.8±8.5
	Iprodione Metabolite	90.6±3.8	94.7±4.8	79.0±4.1	85.1±4.7	79.7±4.8
	Hexythiazox	72.2±1.4	80.6±8.3	74.0±6.9	77.4±4.7	73.7±6.8
	Silafluofen	73.5±1.5	85.8±3.7	65.9±8.7	75.6±4.7	67.7±9.4
	Thiabendazole	68.8±16.5	73.0±10.2	56.4±3.9	59.9±16.6	38.2±5.0
	Methabenzthiazuron	88.5±5.1	88.3±0.8	85.3±0.9	88.7±4.4	87.2±5.1
	Inabenfide	77.3±5.8	84.4±2.6	78.5±2.1	87.4±3.1	67.3±12.6
	Myclobutanil	85.3±0.4	93.5±3.0	93.4±0.6	88.9±2.9	92.1±7.1
	Ethobenzanid	87.0±0.9	93.8±2.1	87.5±2.1	95.8±0.4	87.3±13.8
	Pencycuron	83.3±3.6	89.4±0.4	88.7±1.3	90.2±1.9	87.2±8.5
C	Buprofezin	64.0±7.2	82.6±10.2	72.1±11.2	68.1±8.9	65.9±0.3
	Dymron	87.5±4.4	89.0±5.1	85.9±4.6	85.0±7.3	94.2±5.5
	Tebufenozide	88.0±2.9	93.6±4.5	93.1±1.5	85.5±8.8	96.0±4.1
	Clotefenczine	66.3±7.6	25.1±11.6	58.4±9.9	—* *	79.3±8.8
	Flufenoxuron	78.3±0.7	78.0±7.4	75.8±3.4	81.2±5.8	79.0±6.3
	Thiabendazole	49.3±30.5	47.6±33.6	56.7±19.8	79.4±6.6	0.0
	Diflufenzuron	69.2±0.6	56.3±3.0	70.4±7.6	57.7±0.2	76.4±13.1
	Triflumizole	71.6±7.0	74.1±0.9	55.4±3.3	65.4±0.7	61.3±6.7
	Fenpyroximate	75.0±6.7	77.3±5.1	81.9±4.3	72.2±2.2	75.3±16.3

* Each pesticide was spiked at 0.5 ppm to the samples .Recovery was average of triplicate determinations

** * Bar mensns unmesurable due to interefring peak.

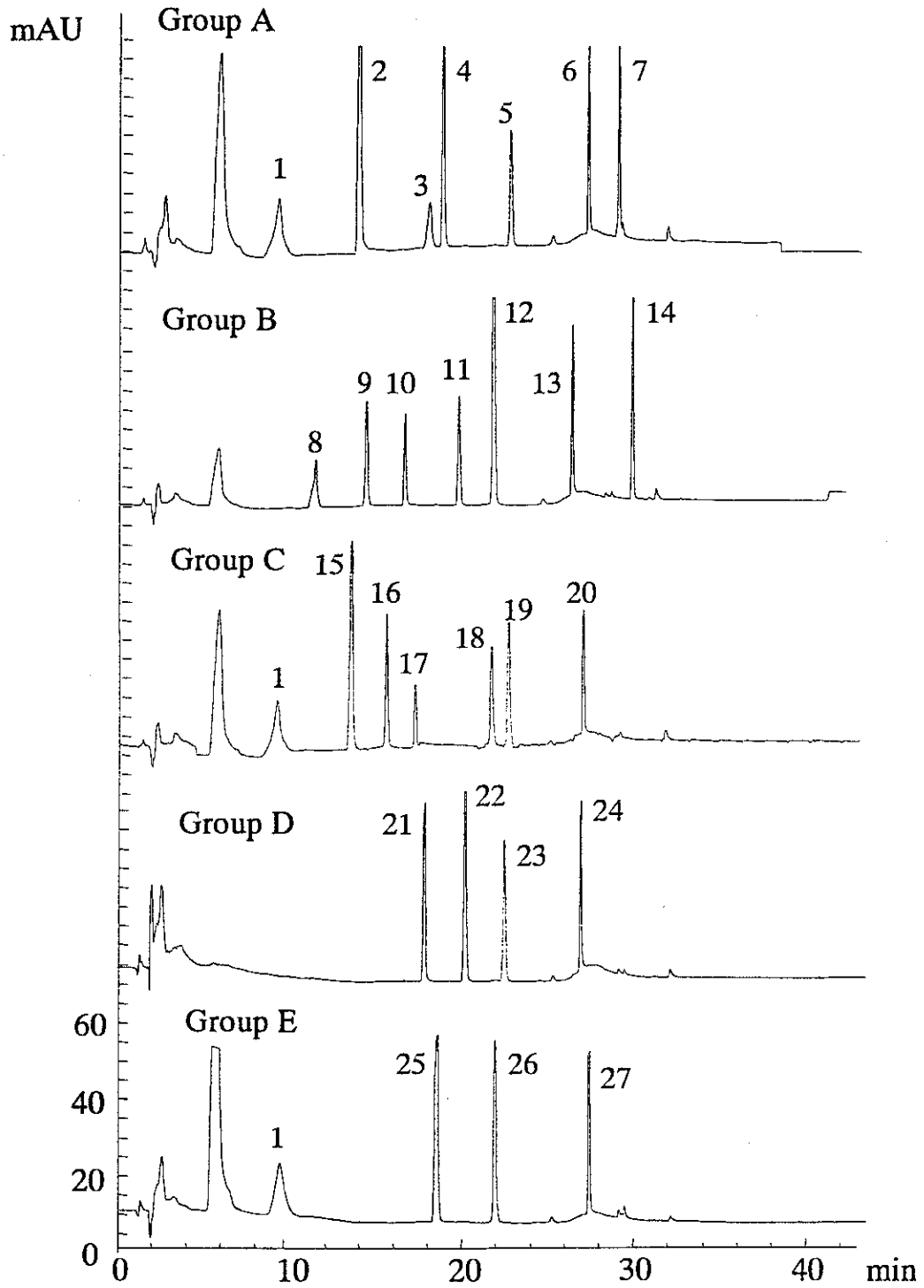


Fig.1. HPLC chromatograms of standard mixture
 Peak numbers were indicated in Table 2.
 0.025 ng of all pesticide were injected.

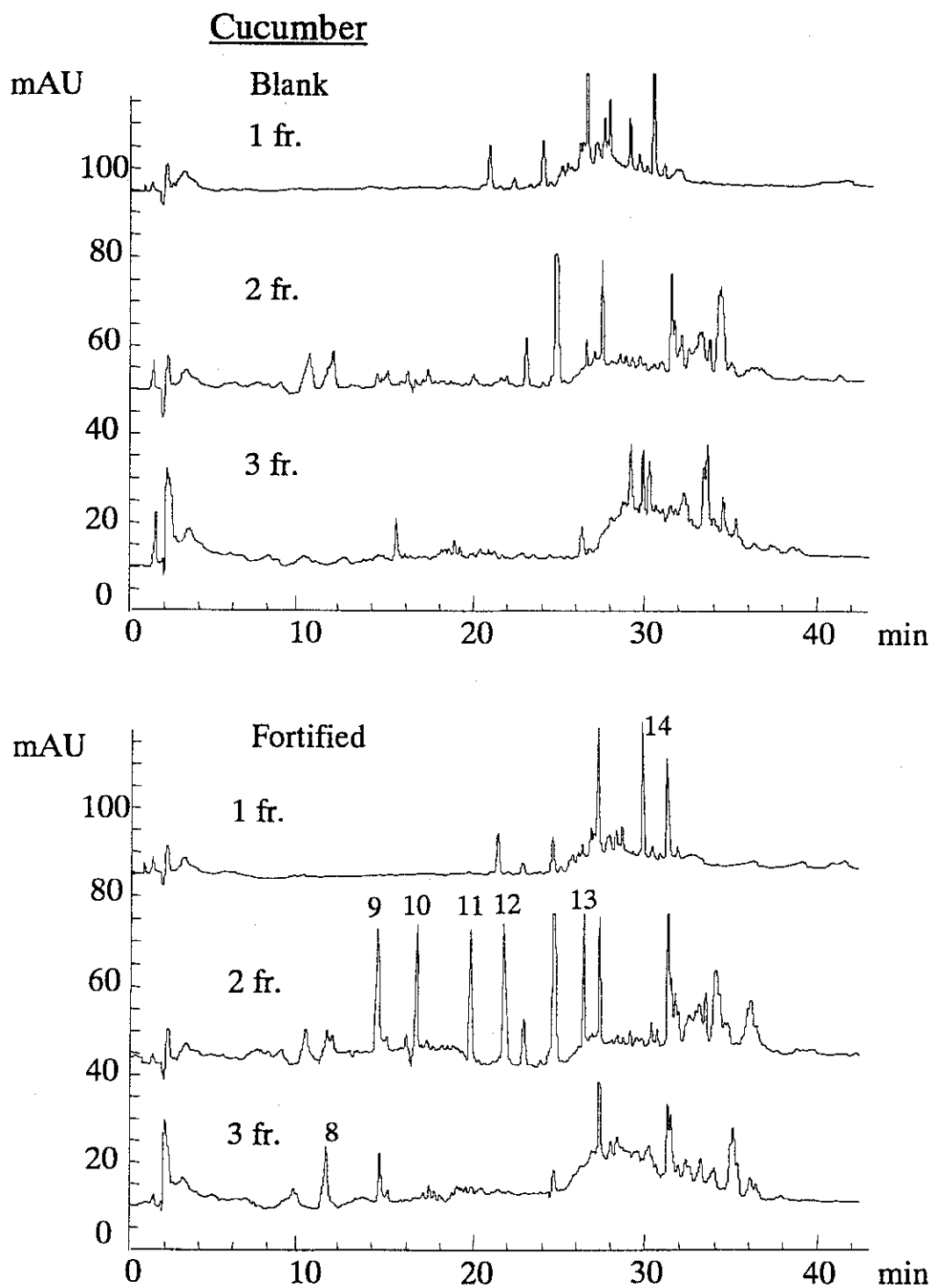


Fig.2. HPLC chromatograms of cucumber blank and sample fortified B
(each pesticide 0.5 ppm)

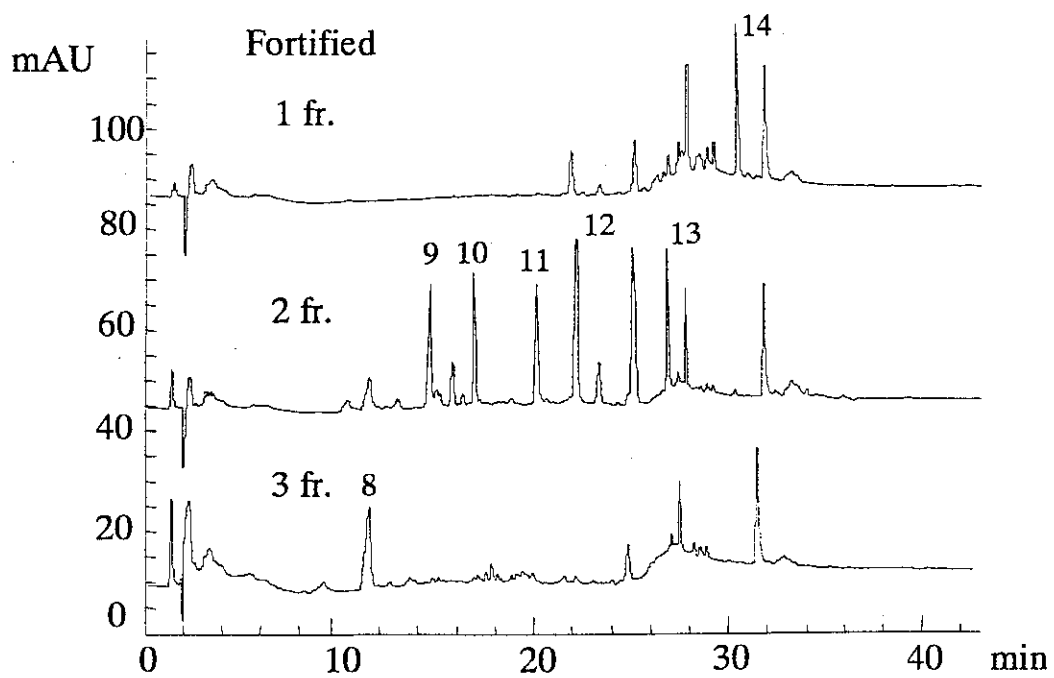
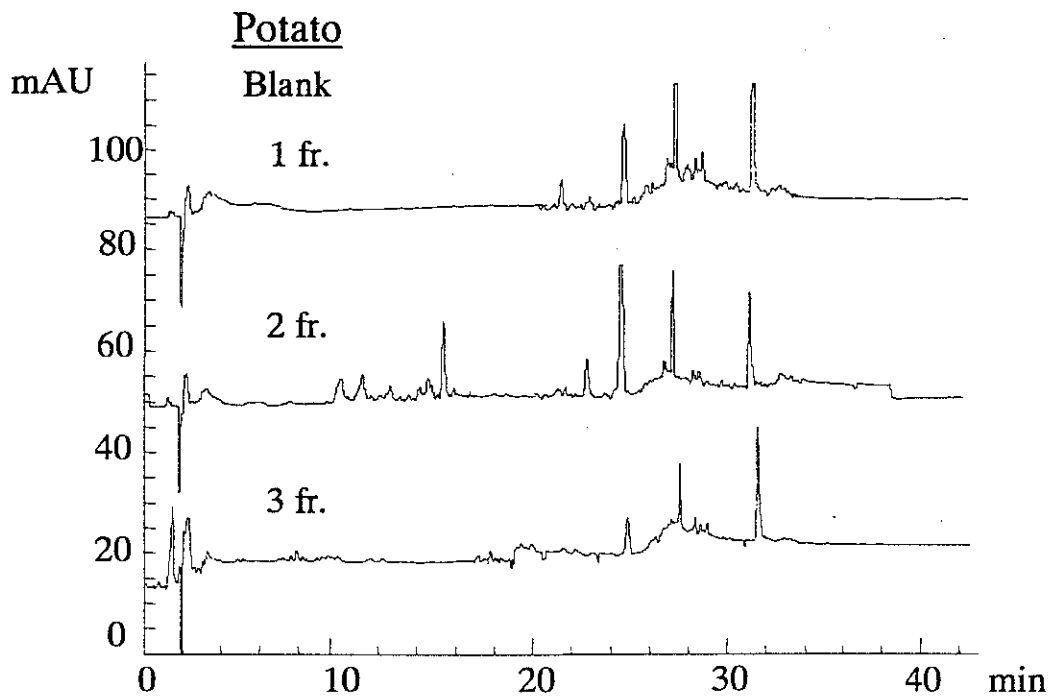


Fig.3. HPLC chromatograms of potato blank and sample fortified B
(each pesticide 0.5 ppm)

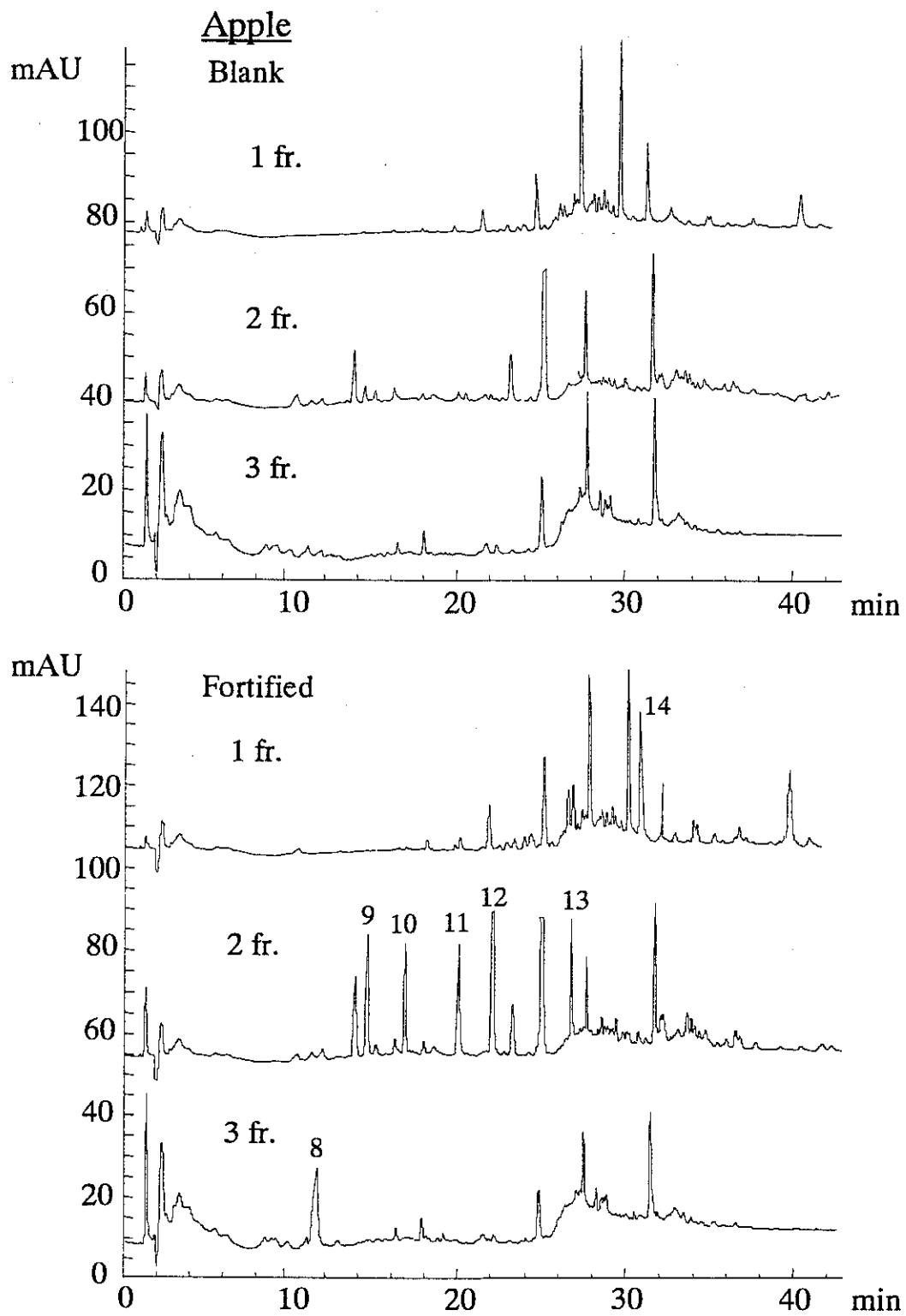


Fig. 4. HPLC chromatograms of apple blank and sample fortified B (each pesticide 0.5 ppm)

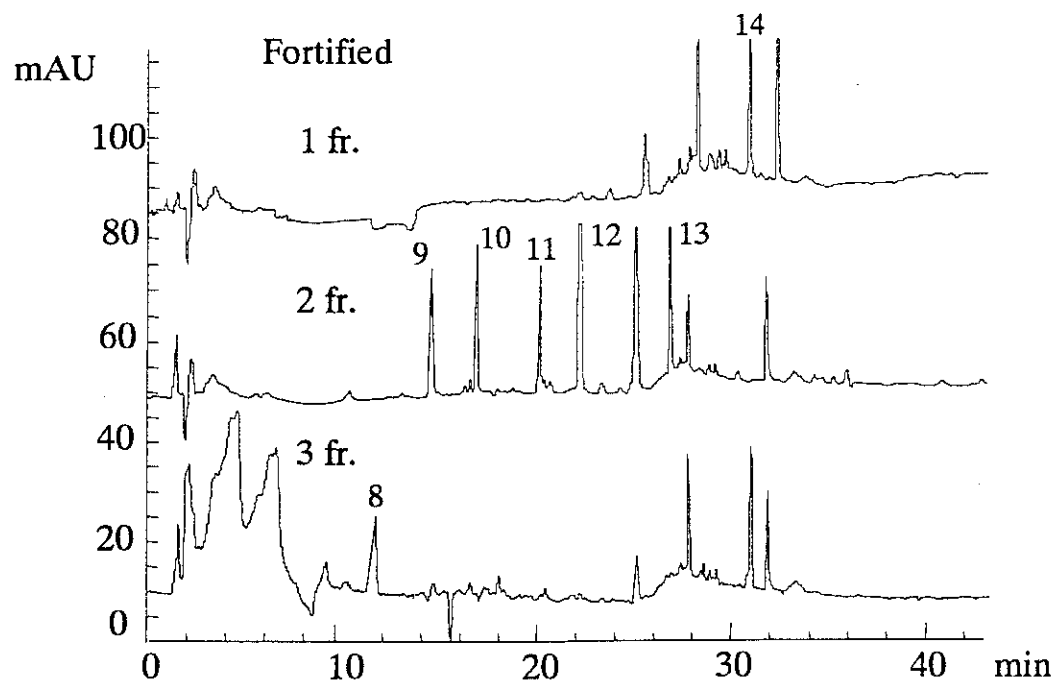
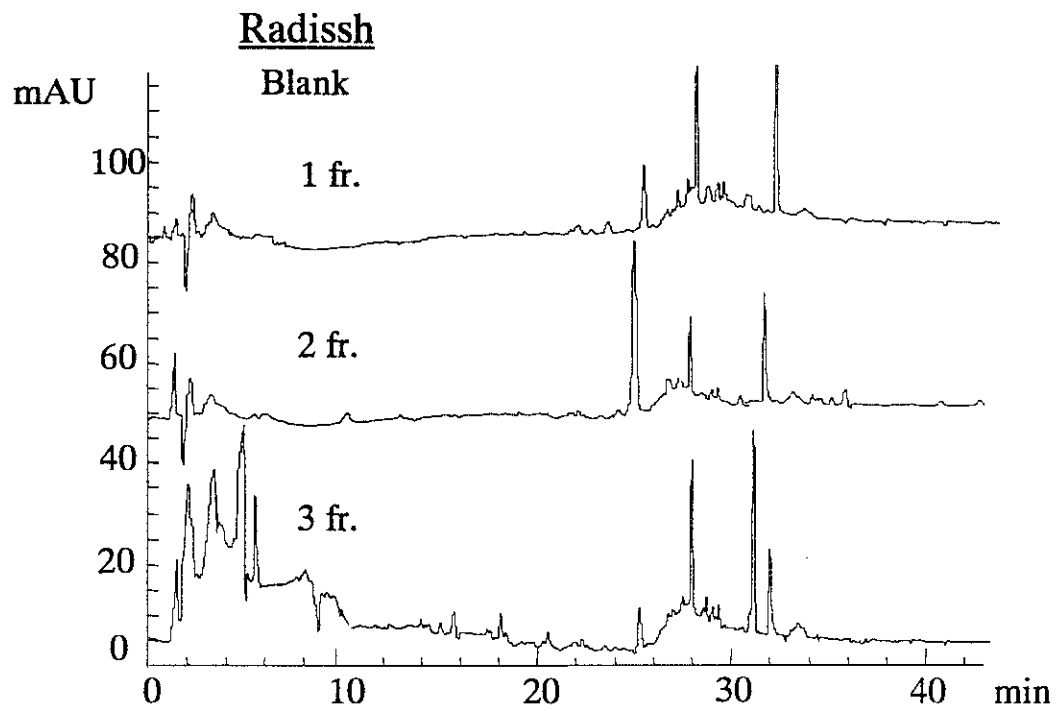


Fig.5. HPLC chromatograms of radissh blank and sample fortified B
(each pesticide 0.5 ppm)

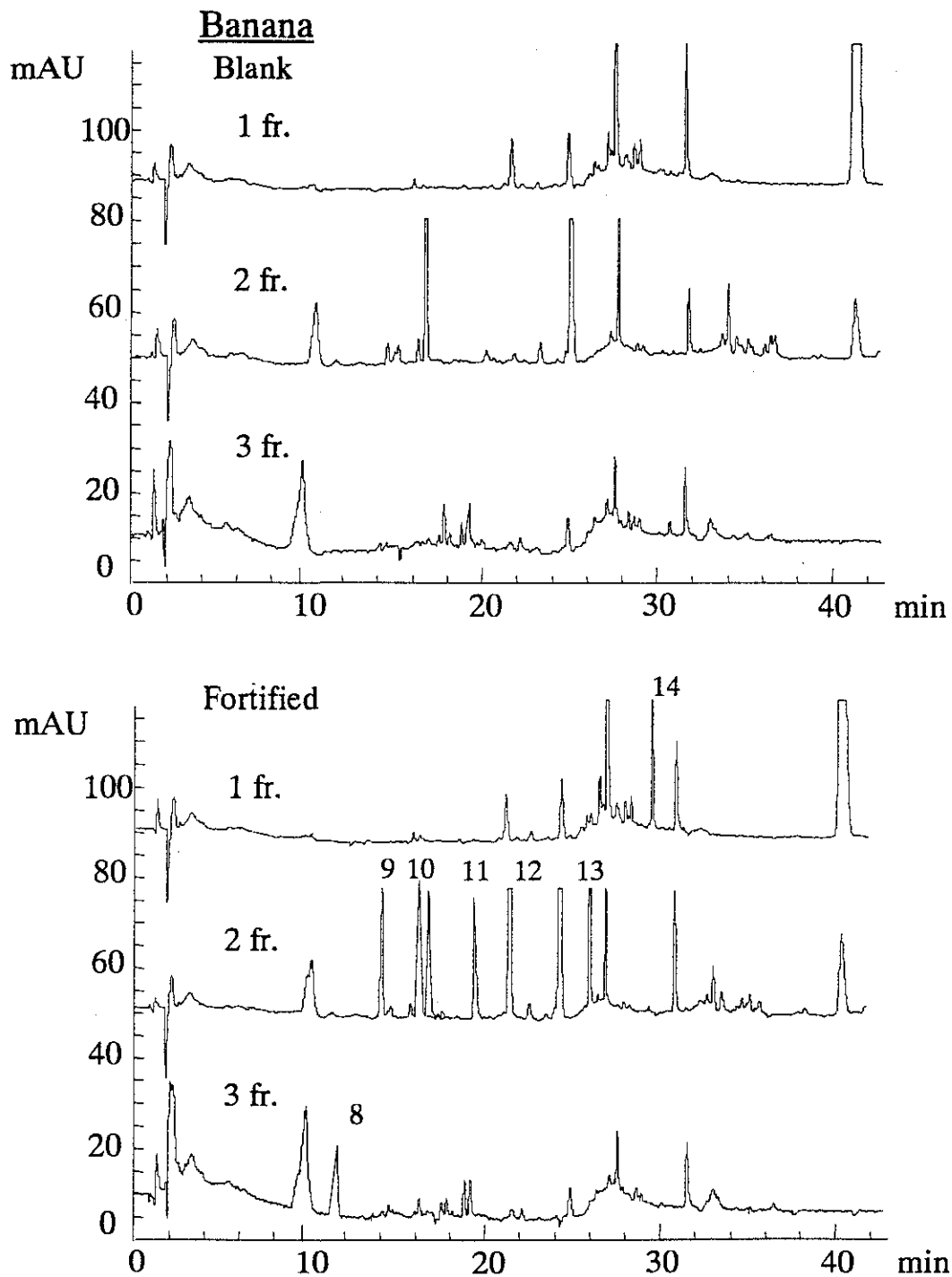


Fig.6. HPLC chromatograms of banana blank and sample fortified B (each pesticide 0.5 ppm)

Onion

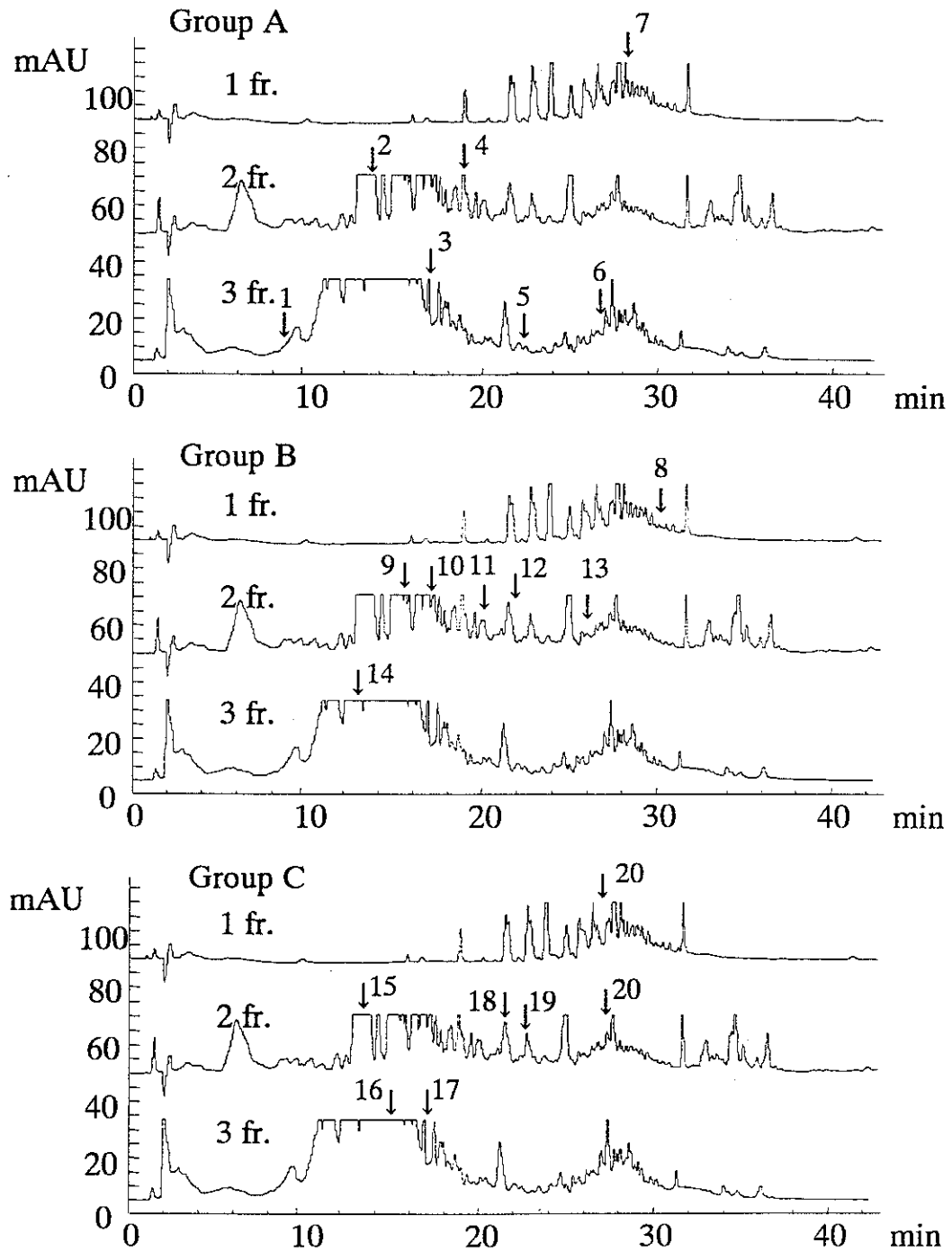


Fig.7. HPLC chromatograms of onion blank sample

1 fr.: 15% ether/*n*-hexane

2 fr.: 15% acetone/*n*-hexane 3 fr.: 50% acetone/*n*-hexane

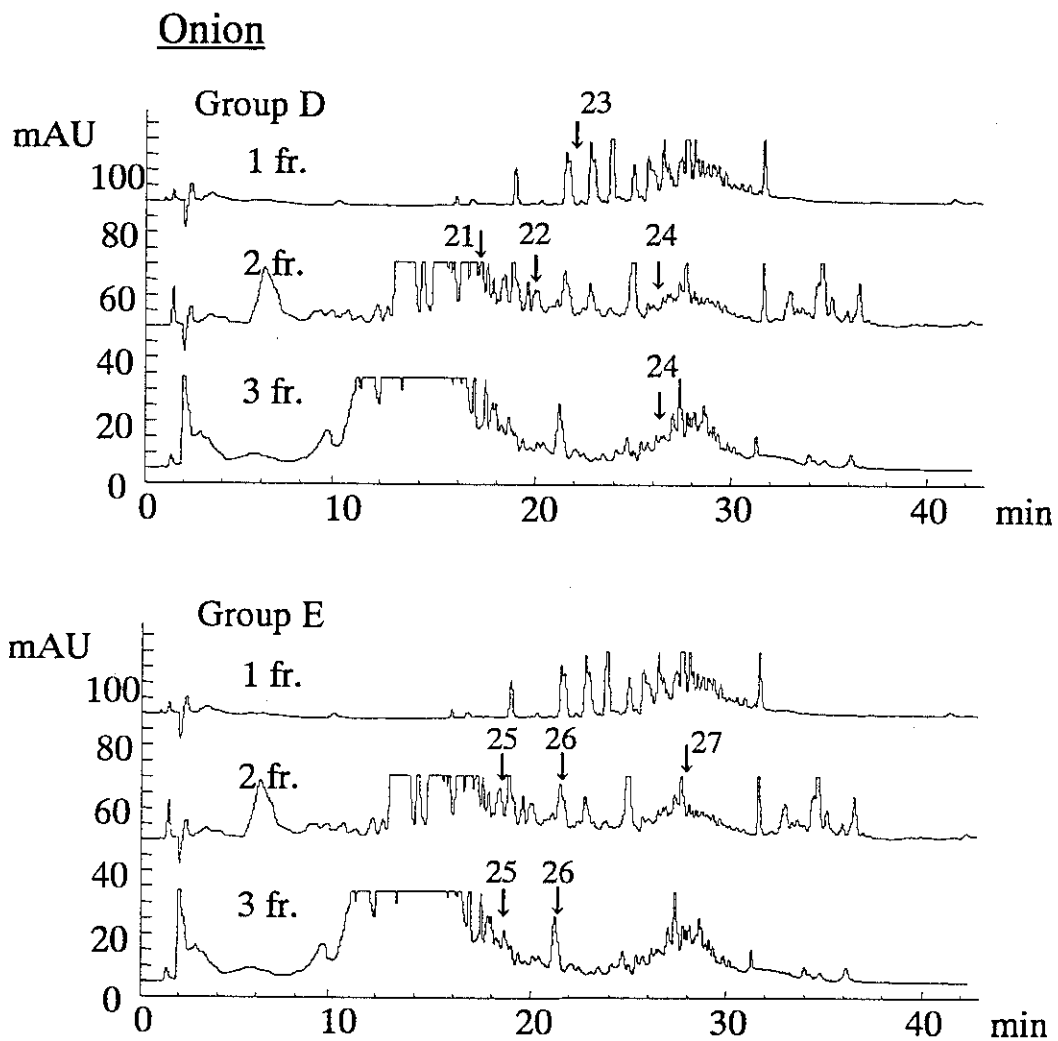


Fig.8. HPLC chromatograms of onion blank sample
 1 fr.: 15% ether/*n*-hexane
 2 fr.: 15% acetone/*n*-hexane 3 fr.: 50% acetone/*n*-hexane

Eggplant

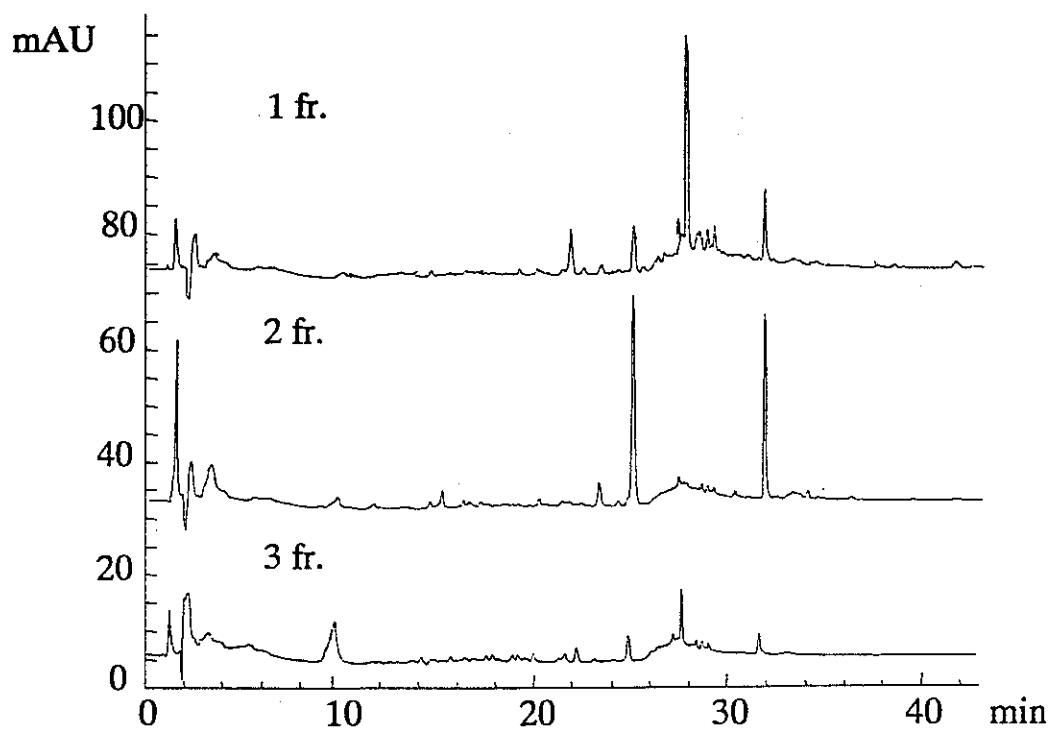


Fig.9. HPLC chromatograms of eggplant blank sample
1 fr.: 15% ether/*n*-hexane
2 fr.: 15% acetone/*n*-hexane 3 fr.: 50% acetone/*n*-hexane

分担研究報告書

LC/MS による残留農薬試験法に関する研究

分担研究者 永山 敏廣

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

LC/MSによる残留農薬試験法に関する研究

分担研究者 永山敏廣 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 主任研究員

研究要旨

本研究では、LC/MSによる食品中残留農薬の確認方法及び定性・定量法の確立を目指している。昨年度は、LC/MSで食品中の残留農薬を確認できることを明らかにした。

今年度は、LCを用いた農薬の一斉分析法を検討し、高感度化と分離条件の最適化を試みた。アルジカルブ、オキサミル及びカルバリルなどのN-メチルカルバメート系農薬の混合標準溶液を用いて検討を加えた。LC/MSにより高感度に一斉分析できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

食品中に残留する農薬は、食品衛生法の食品規格で厳しく規制される。平成12年3月1日現在、130種類以上の食品に対して199種類の農薬の基準が設定され（そのうち20種類は平成12年4月1日から適用される。）、残留量を試験して基準の遵守のチェックが行われている。近年開発され、新しく基準が設定される農薬は加熱分解されやすいものが多く、また、気化が困難な農薬もある。これら農薬を加熱気化して分離測定するGC法を用いて測定するには、誘導体化など煩雑な操作が必要となり、また精度良く測定することが困難なことが多い。そこで、溶媒に溶けた農薬をそのまま分離測定する高速液体クロマトグラフ（LC法）が利用されている。

食品から農薬が検出されたとき、食品成分や他の農薬との誤認を防ぐため、その農薬の定性確認が求められる。このとき、一般に質量分析法を用いて当該農薬を定性確認する。本研究の一環として、昨年度はLC/MSを用いた定性確認法が適用できることを明らかにした。実試料から検出された農薬の確認手段として、LC/MSを用いた確認手法が告示試験法に取り入れられるようになった。

一方、基準設定農薬199種類に係わる試験法は100通りあり、これら試験法をそのまま用いたのでは基準の遵守の確認に多くの手間と時間を要する。そこで、食品中の残留農薬をで

きる限り短時間で一斉に試験し、基準の遵守を確認できる超迅速分析法の開発が試みられている。すでにGC法を利用した超迅速分析法は、検出器に質量分析計を用いて100~200種類の農薬を同時に試験する方法が報告され、さらに実用化への検討が進められている。しかし、LC法を利用した方法については、数種類の農薬を一斉に分析する手法に限られており、また、このとき広く利用される検出器（紫外部吸収検出器、フォトダイオードアレイ検出器など）の選択性がやや劣ることなどから煩雑な精製処理などの前処理が必要であり、迅速化が困難な状況である。そこで今年度は、検出器として汎用型の質量分析計（MS）を装着した高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）を用いて農薬の検出感度を向上させ、一斉に定性・定量する迅速分析への応用を図るための試験を実施した。

B. 研究方法

1. 対象農薬

現在LC法を用いて試験する農薬のうち、多くの検査機関でチェックされているアルジカルブ、オキサミル、カルバリルなど8種類の残留基準が設定されたN-メチルカルバメート系農薬及び日本をはじめ諸外国で広く使用されている5種類のN-メチルカルバメート系農薬及びピリミカーブ、計14種類の農薬について検討した。これら農薬の性状を表1に示した。

2. 機器

LC/MS : LC部 日立製 Micro-HPLC PlusII シリーズ、MS部 マイクロマス社製 PLATFORMII

3. 試験方法

LC/MSの測定：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μ m）を充填したカラム（0.32mm i.d.×150mm）で分離後、エレクトロスプレーイオン化（ESI）によりイオン化して測定した。

C. 研究結果

LC/MSによるN-メチルカルバメート系農薬の一斉検出方法を検討した。14種類のN-メチルカルバメート系農薬について高感度に測定する条件の最適化を試みた。キャピラリーカラムを用いることにより、アルジカルブ、カルバリル、メチオカルブ及びピリミカーブなど13種類の農薬を良好に分離、検出できることが判明した。

1. 測定イオンの選択

0.20 μ g/mL濃度の標準溶液を注入したとき、各農薬が感度良く測定できるイオンの選択を試みた。各農薬の分子イオンあるいは擬分子イオンの強度が高く現れるイオンを用いることにより、感度良く測定できることがわかった。

各農薬の測定イオンを表2に示した。

2. 分離条件の検討

一斉分析したとき、農薬相互の分離能の向上、得られたクロマトグラム上のピーク形状の改善による感度の向上及び注入全量のMS部への導入による定量性の向上を目指し、キャピラリーカラムを用いて検討を加えた。13種類の農薬が2ng以下の注入で十分に検出でき、良好な結果が得られた。しかし、オキサミルは今回の測定条件では検出できなかった。

LC/MSの測定は、以下の条件で行った。

カラム：Inertsil ODS-2

0.32mm i.d.×150mm

カラム温度：室温

移動相：MeOH・H₂O(20:80→80:20/40min)

流速：8 μ l/min

注入量：10 μ L

イオン化モード：ESI⁺

cone電圧：15V

D. 考察

1. 対象農薬について

N-メチルカルバメート系農薬は、フェニル系及びオキシム系などのカルバミン酸エステルで、主要な殺虫剤である。一般に、種特異性が高く、日本ではウンカ、ヨコバイ類の防除などに広く用いられている。

現在、アルジカルブ、オキサミル、カルバリルなど8種類のN-メチルカルバメート系殺虫剤について、穀類、豆類、野菜、果実及び種実類など多くの種類の農産物に0.02~5.0ppmの基準値が設定されている。

試験法は当初GC法であったが、N-メチルカルバメート系殺虫剤は比較的熱に弱く、GC注入時に加熱分解されるため、高感度分析が困難であった。平成6年6月9日厚生省告示第199号により、N-メチルカルバメート系殺虫剤を加水分解して生成するメチルアミンを蛍光物質に誘導して測定するLC法に改正された。本試験法は、感度の高い蛍光検出器を装着し、加水分解・誘導体化を自動処理するポストカラムシステムが採用されている。本手法により、N-メチルカルバメート系殺虫剤は高感度に精度良く同時に測定できるようになった。しかし、加水分解によりメチルアミンを生成しない農薬は測定できないため、測定対象農薬はN-メチルカルバメート系に限定される。

今回、より広範囲な農薬を一斉に測定することを目指して、MSを利用して選択性を高めながら精度良く分析する手法の作成を試みた。現在告示されているLCを用いた試験法の中で、最も多くの農薬を同時に測定するアルジカルブ等試験法で測定されるN-メチルカルバメート系殺虫剤を対象に、LC/MSによる一斉分析法について検討を加えた。

2. LC/MSによる一斉分析

今回測定対象としたアルジカルブ、オキサミル、カルバリル及びメチオカルブなどの農薬は、GC/MS法では、GCの注入口で分解されるため分子イオンの検出が困難であり、また、壊裂イオン（娘イオン）も検出困難な

ものが多い。また、ピリミカブなどのN-メチルカルバメート系農薬以外の農薬であっても、加熱分解されやすいため、LCを用いて蛍光検出器や紫外分光光度型検出器などを利用して個々に測定しなければならない農薬も多い。対象とする農薬の種類が増えると、カラムによる分離が不十分となり、一斉に定性することは難しい。

LC/MSでは、各農薬が有する固有の分子イオンを測定するため、高い選択性を維持することができる。従って、多くの農薬を対象としてカラムによる分離が不十分であっても、それら農薬を良好に定性・定量できる可能性が高い。さらに、LC/MS用の新しい分離カラムも開発され、分離性能の向上も期待される。そこで今回、LC/MSを用いた高感度な一斉分析手法の確立を試みた。

通常、LCに用いるカラムは内径3.2~4.6 mmである。本カラムをLC/MSに用いると送液量が多いため、MS導入前にスプリットして、MS部には注入量の1/100程度を導く。また、カラム内径が太いため、カラムで分離した後のピーク幅が広く、相対的にピーク高さが低くなり、キャピラリーGC/MSのような高感度分析が困難であった。そこで今回、キャピラリーカラムを用いたLC/MSを用いて、良好な分離と分子イオン又は擬分子イオンを捕捉して、多くの農薬を一斉に、かつ確実に測定しようと試みた。

検出イオンは、測定対象とした農薬の性質により、より特異的に高感度で検出できる分子イオンあるいは擬分子イオンを選択する必要がある。今回検討したイソプロカルブ、カルバリル、フェノブカルブなどの農薬は分子イオン(H⁺)を用いて良好に測定できた。しかし、アルジカルブは分子イオンの捕捉が困難であり(図1)、ナトリウムイオンが付加した擬分子イオン(Na⁺)を測定することとした。

内径0.32mmのキャピラリーカラムを用いて、得られるクロマトグラムピーク幅を改善し、高感度に農薬を検出した。カラムの内径が細

く、内容量が少ないため、分離に際し注入液の影響をやや受けやすいものの、試料溶液の組成を移動相と同じにすることでオキサミルを除く13種類の農薬を再現性良く測定することができた(図2)。オキサミルは、分子イオン(H⁺ m/z: 220)及び擬分子イオン(Na⁺ m/z: 242)のいずれでも検出することはできなかった。その原因として、他の農薬に比較して水溶性が非常に高いなど性質が異なっていることから(表1)、今回使用したカラムでは、吸着して溶出しなかったか、あるいは徐々に溶出してピークとして捉えることができなかったことなどが考えられる。

本カラムを用いることにより、注入した目的物質は全量がMSに導かれるため、定量性の向上も期待できる。各農薬の0.20ppm溶液を10 μ l注入したところ、各イオンピークの面積を良好に測定することができた(図3)。各農薬の面積値は1932~134176であり、農薬の種類により違いが見られたが、多くの農薬で10000~30000の数値が得られた(表3)。これら農薬のうち、キシリルカルブとXMCはピークが近接し、かつ測定イオンも同じことから、同時に存在したとき本条件下では高精度な面積測定はやや困難なもの、実務上特に問題とはならないと思われる。これらのことから、本測定条件における検出感度は、試料の10倍濃縮液をLC/MSに注入すると、面積値の最も小さかったチオジカルブでもその1/2量を十分に検知できることから、試料中に0.01ppmの濃度で残留した農薬を的確に検出できることが分かった。

E. 結論

LC/MSによる農薬の一斉分析法を検討した。アルジカルブ、オキサミル及びカルバリルなどのN-メチルカルバメート系農薬は、キャピラリーカラムを用いて一斉分析できることがわかった。今後LC法が採用されている他の農薬についての一斉測定や、実試料を用いた定性・定量性について更に検討を加える。

表 1 測定対象農薬の性状

農 薬	CAS RN	分子式	分子量	水溶解度(mg/L)
アルジカルブ	[116-06-3]	$C_7H_{14}N_2O_2S$	190.3	4930(pH7, 20°C)
イソプロカルブ(MIPC)	[2631-40-5]	$C_{11}H_{15}NO_2$	193.2	265
オキサミル	[23135-22-0]	$C_7H_{13}N_3O_3S$	219.3	280000(25°C)
カルバリル(NAC)	[63-25-2]	$C_{12}H_{11}NO_2$	201.2	120(20°C)
キシリルカルブ(MPMC)	[2425-10-7]	$C_{10}H_{13}NO_2$	179.2	580(20°C)
チオジカルブ	[59669-26-0]	$C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$	354.5	35(25°C)
メチオカルブ	[2032-65-7]	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.3	27(20°C)
ピリミカーブ	[23103-98-2]	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	238.3	3000(pH7.4, 25°C)
フェノブカルブ(BPMC)	[3766-81-2]	$C_{12}H_{17}NO_2$	207.3	420(20°C)
プロボキスル(PHC)	[114-26-1]	$C_{11}H_{15}NO_3$	209.2	1900(20°C)
ベンダイオカルブ	[22781-23-3]	$C_{11}H_{13}NO_4$	223.2	280(pH7, 20°C)
メソミル	[16752-77-5]	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.2	57900(25°C)
メトルカルブ(MTMC)	[1129-41-5]	$C_9H_{11}NO_2$	165.2	2600(30°C)
X M C	[2655-14-3]	$C_{10}H_{18}NO_2$	179.2	470(20°C)

表 2 LC/MS測定イオン

農 薬	測定イオン(m/z)	
アルジカルブ	Na+	213
イソプロカルブ	H+	194
オキサミル	H+	220
カルバリル	H+	202
キシリルカルブ	H+	180
チオジカルブ	H+	355.5
メチオカルブ	H+	226
ピリミカーブ	H+	239
フェノブカルブ	H+	208
プロボキスル	H+	210
ベンダイオカルブ	H+	224
メソミル	H+	163
メトルカルブ	H+	166
XMC	H+	180

表 3 ピーク面積の測定

農 薬	保持時間 (min)	面積
アルジカルブ	20.7	12902
イソプロカルブ	29.9	37727
カルバリル	28.1	65205 ¹⁾
キシリルカルブ	28.1	52687 ²⁾
チオジカルブ	29.2	1932
メチオカルブ	32.7	11179
ピリミカーブ	28.6	134176
フェノブカルブ	32.2	31018
プロボキスル	25.8	11277
ベンダイオカルブ	28.2	28212
メソミル	4.3	4334
メトルカルブ	23.6	11255
XMC	28.6	52687 ²⁾

- 1) XMCの擬分子イオンを合わせて測定。
 2) キシリルカルブとXMCを合わせて測定。

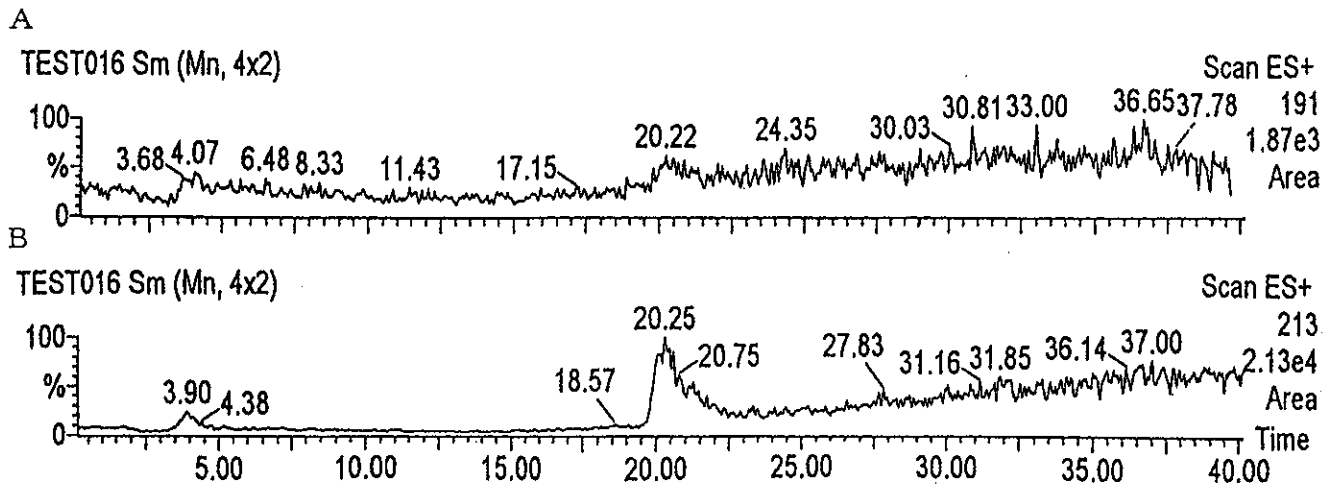


図 1 アルジカルブの LC/MS クロマトグラム

A : H⁺ m/z=191
 B : Na⁺ m/z=213