

Table 4. Comparison for Recoveries of Pesticides between Florisil+PSA to SAX+ENVICARB+PSA

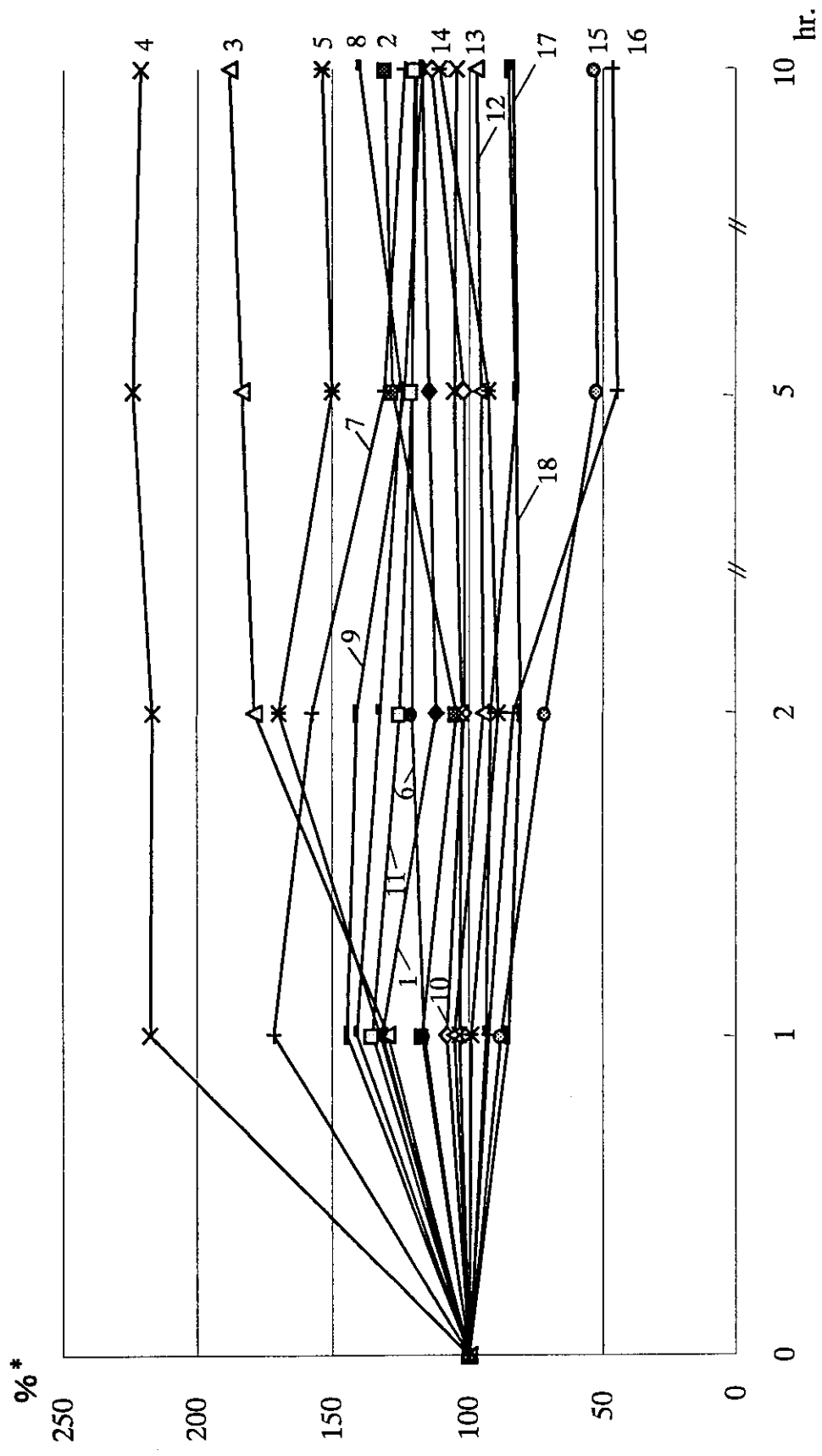
No.	Pesticides	carrot			onion			orange		
		FL+PSA	3 columns	**FL+PSA	3 columns	FL+PSA	3 columns	FL+PSA	3 columns	3 columns
1	Inabentfide*	41.5	—	***	59.0	—	15.4	—	—	
2	Myclobutanil*	30.0	110.6		38.4	53.5	48.0	49.4		
3	Imazalil	68.7	66.6		75.9	97.1	※	※		
4	Triflumizole*	65.2	100.5	※	※	※	95.2	129.1		
5	Buprofezin	59.8	87.2	49.0	76.2	73.8	78.5	84.8		
6	Methabenzthiazuron*	100.6	126.0	—	52.2	78.4	27.6	21.3		
7	Furametpyr*	88.5	106.2	32.4	78.4	—	—	—		
8	Benfuresate*	99.4	—	78.4	—	—	—	—		
9	Dymron	98.3	※	※	107.2	103.8	92.8			
10	Iprodione	105.9	73.1	52.2	89.3	79.2	※			
11	Tebufenozide*	107.2	119.7	93.3	92.2	101.3	80.4			
12	Pyrazoxyfen	112.1	99.1	74.4	103.4	105.1	76.5			
13	Pencycuron	93.0	59.6	60.5	77.2	87.6	75.7			
14	Fenpyroximate	110.3	※	82.3	109.1	97.3	80.2			
15	Diflubenzuron*	98.3	87.5	72.0	75.8	97.7	89.8			
16	Hexaflumuron	※	113.1	116.2	90.5	115.0	92.0			
17	Flufenoxuron	107.1	※	102.3	102.9	102.2	※			
18	Chlorfluazuon*	※	113.5	115.7	94.2	123.7	※			

* These crops were spiked at 0.5 μ g/g of these pesticides and 0.1 μ g/g of the others.

** 3 columns equal SAX+ENVICARB+PSA

*** impossible to recover from mini-columns

※ over lap



Graph 1. Variation of measurement value of standard pesticides by LC/MS

*It was calculated value with 100% at the time of 0 hours (hours showed elapsed time from apparatus start-up)
 Numbers correspond to No. of pesticides in Table 1.

Table 5. Recoveries of 18 Pesticides by the Proposed Method (LC/MS)

No.	Pesticides	Recovery (%) mean \pm SD (n=3-5)						
		Potato	Radish	Apple	Cucumber	Banana	Rice	
1	Inabenfide*	73.5 \pm 13.6	71.2 \pm 9.6	87.0 \pm 5.3	74.2 \pm 10.9	78.6 \pm 7.0	85.5 \pm 9.6	
2	Myclobutanil*	77.9 \pm 18.4	63.0 \pm 12.8	70.5 \pm 8.4	58.6 \pm 8.3	55.7 \pm 9.5	64.0 \pm 9.5	
3	Imazalil	79.2 \pm 11.5	65.1 \pm 8.2	83.6 \pm 11.5	61.9 \pm 8.8	66.2 \pm 16.3	71.7 \pm 10.8	
4	Triflumizole*	62.4 \pm 16.0	92.4 \pm 9.8	77.1 \pm 8.5	104.3 \pm 9.1	88.2 \pm 9.4	84.7 \pm 11.0	
5	Buprofezin	50.1 \pm 15.9	55.7 \pm 7.7	48.3 \pm 5.3	29.4 \pm 14.9	38.4 \pm 11.0	36.2 \pm 10.9	
6	Methabenzthiazuron	75.0 \pm 1.7	86.5 \pm 1.4	82.2 \pm 1.6	87.8 \pm 15.4	74.4 \pm 10.4	81.8 \pm 6.9	
7	Furametpyr*	73.1 \pm 8.2	72.4 \pm 1.5	87.6 \pm 4.6	87.9 \pm 4.0	78.2 \pm 7.2	83.2 \pm 14.6	
8	Benfuresate*	75.4 \pm 7.2	76.0 \pm 6.3	86.3 \pm 1.3	96.7 \pm 8.4	84.8 \pm 4.0	78.6 \pm 4.4	
9	Dymron	81.9 \pm 6.4	79.8 \pm 8.1	95.7 \pm 6.1	91.4 \pm 3.1	76.9 \pm 9.0	72.3 \pm 4.8	
10	Iprodione	69.0 \pm 15.2	79.7 \pm 11.9	93.0 \pm 9.9	91.4 \pm 9.5	80.1 \pm 7.3	90.4 \pm 6.2	
11	Tebufenozide*	83.4 \pm 10.2	83.9 \pm 11.5	85.5 \pm 7.5	71.4 \pm 8.9	71.1 \pm 15.9	48.9 \pm 27.9	
12	Pyrazoxyfen	82.5 \pm 7.1	75.8 \pm 6.2	85.1 \pm 0.6	90.7 \pm 6.9	66.5 \pm 9.7	65.2 \pm 27.2	
13	Pencycuron	68.3 \pm 4.5	80.8 \pm 1.7	81.2 \pm 1.4	67.8 \pm 14.6	61.5 \pm 9.8	70.7 \pm 3.2	
14	Fenpyroximate	82.7 \pm 3.7	76.2 \pm 8.9	70.6 \pm 9.4	50.9 \pm 4.3	69.2 \pm 5.7	53.7 \pm 9.8	
15	Diflubenzuron*	72.7 \pm 10.9	99.5 \pm 11.6	66.9 \pm 13.3	91.5 \pm 7.5	72.5 \pm 3.1	80.4 \pm 6.6	
16	Hexaflumuron	70.9 \pm 3.9	96.3 \pm 6.2	80.9 \pm 11.7	66.9 \pm 31.1	75.6 \pm 9.1	78.2 \pm 12.2	
17	Flufenoxuron	66.0 \pm 16.2	78.9 \pm 13.0	95.8 \pm 6.6	77.4 \pm 15.0	110.8 \pm 4.4	76.0 \pm 20.9	
18	Chlorfluazuon*	79.7 \pm 11.7	98.9 \pm 6.2	92.0 \pm 10.2	80.6 \pm 8.5	81.5 \pm 9.7	85.9 \pm 15.3	

* These crops were spiked at 0.5 μ g/g of these pesticides and 0.1 μ g/g of the others.

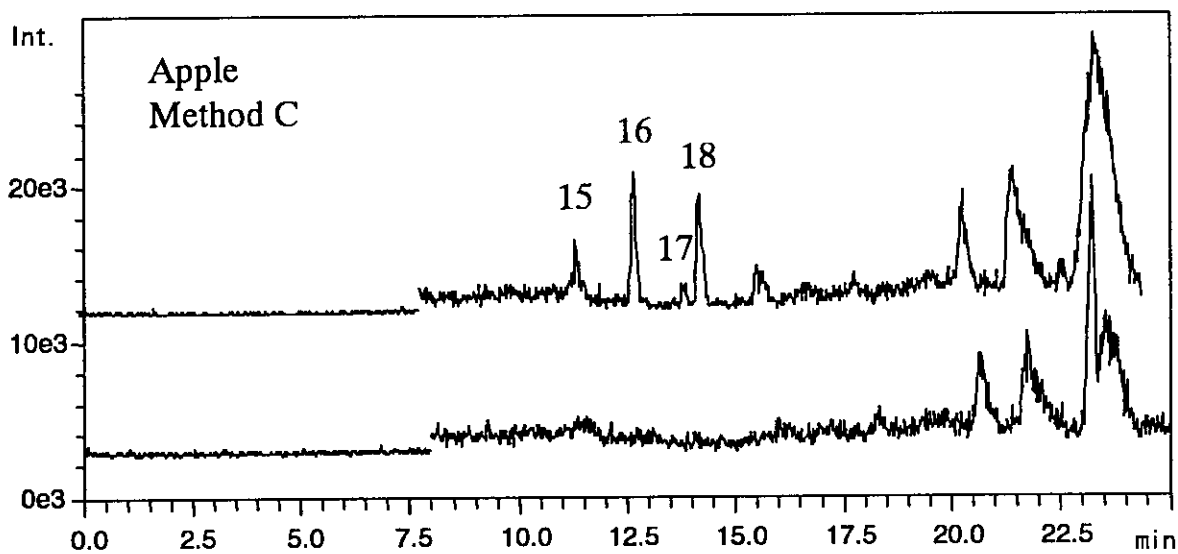
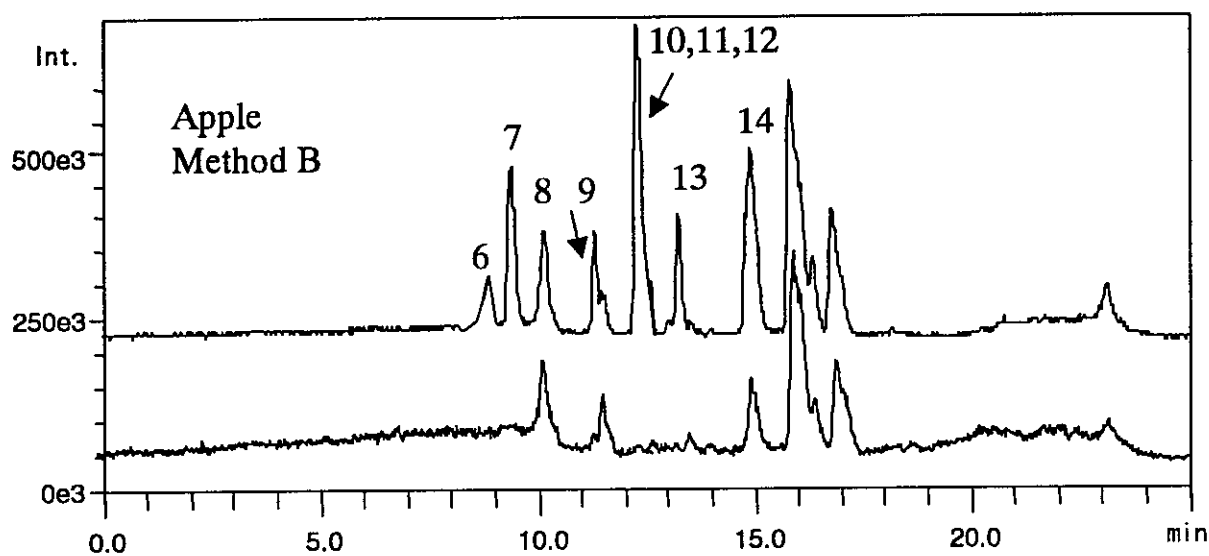
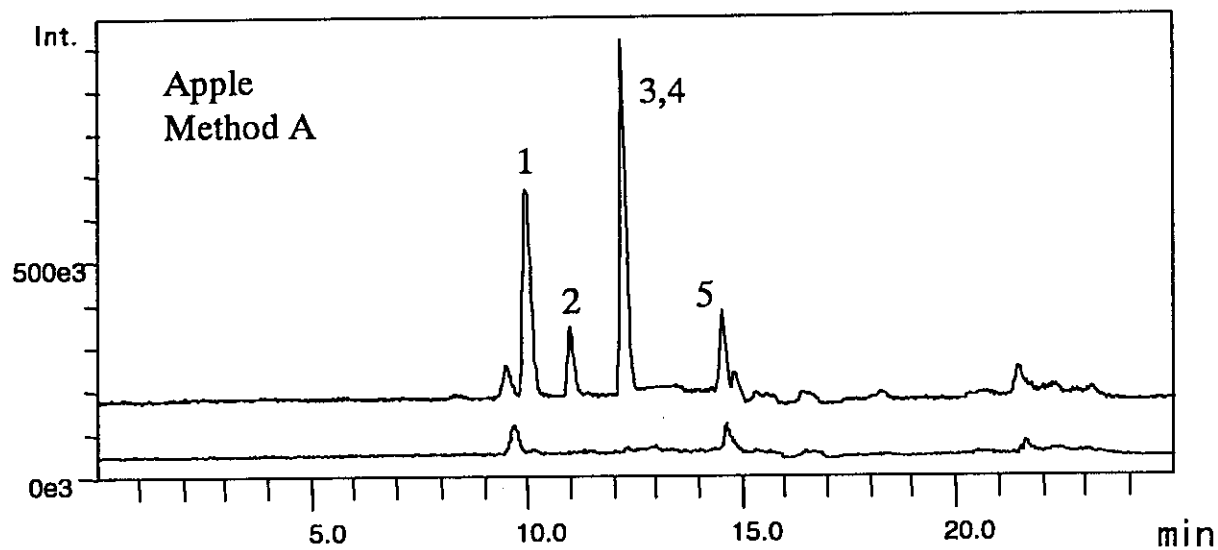


Fig. 8 SIM chromatograms of pesticides spiked to apple*

*Spiked level of pesticides are the same as Table 4.

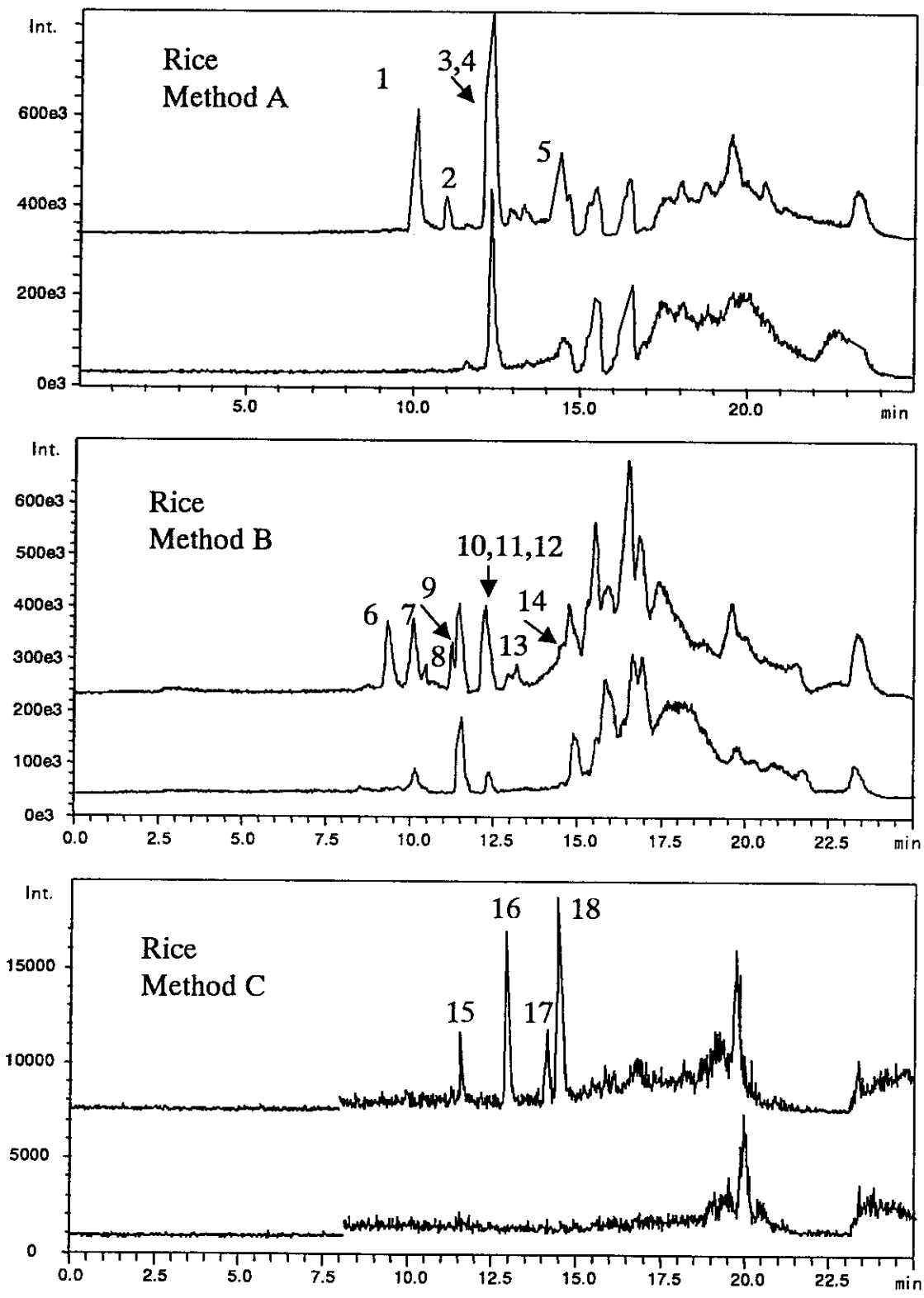


Fig.9 SIM chromatograms of pesticides spiked rice*

*Spiked level of pesticides are the same as Table 4.

Table 6. Recoveries of 18 Pesticides determined by the GC/MS

No.	Pesticides	Recovery (%) mean \pm SD (n=3-5)							
		Potato*	Radish*	Apple*	Cucumber*	Banana*	Rice*		
1	Inabentfide	---	---	---	---	---	---	---	
2	Myclobutanil	93.9 \pm 3.6	95.1 \pm 6.4	97.2 \pm 3.6	93.9 \pm 0.9	83.0 \pm 2.8	55.7 \pm 11.7	---	
3	Imazalil	32.7 \pm 14.2	49.0 \pm 6.8	44.4 \pm 2.4	48.4 \pm 6.4	31.4 \pm 15.6	39.1 \pm 5.5	---	
4	Triflumizole	50.4 \pm 5.5	69.9 \pm 3.7	52.3 \pm 7.0	65.6 \pm 4.5	55.2 \pm 3.0	31.4 \pm 4.8	---	
5	Buprofezin	53.1 \pm 3.5	65.7 \pm 6.1	73.6 \pm 8.1	66.9 \pm 2.7	53.6 \pm 1.3	34.3 \pm 9.2	---	
6	Methabenzthiazuron	119.7 \pm 2.2	120.8 \pm 5.3	102.8 \pm 5.4	137.7 \pm 4.6	110.9 \pm 2.6	89.0 \pm 6.6	---	
7	Furametpyr	99.9 \pm 2.3	95.5 \pm 6.8	98.7 \pm 3.1	94.3 \pm 0.6	86.3 \pm 0.7	42.0 \pm 22.2	---	
8	Benfuresate	92.8 \pm 3.0	90.9 \pm 5.4	96.6 \pm 4.5	93.2 \pm 2.8	83.7 \pm 0.9	67.2 \pm 8.0	---	
9	Dymron	---	---	---	---	---	---	---	
10	Iprodione	125.2 \pm 11.5	67.4 \pm 8.6	98.0 \pm 9.8	55.6 \pm 30.9	77.9 \pm 5.8	55.5 \pm 12.6	---	
11	Tebufozicide	100.8 \pm 8.4	78.3 \pm 4.9	84.6 \pm 17.3	91.9 \pm 18.3	76.6 \pm 2.5	77.9 \pm 3.1	---	
12	Pyrazoxyfen	---	---	---	---	---	---	---	
13	Pencycuron	100.2 \pm 9.9	96.0 \pm 16.0	✳	✳	✳	✳	---	
14	Fenpyroximate	---	---	---	---	---	---	---	
15	Diflubenzuron	106.2 \pm 4.4	83.0 \pm 9.5	99.6 \pm 5.0	100.0 \pm 5.4	103.1 \pm 1.9	87.4 \pm 7.2	---	
16	Hexaflumuron	---	---	---	---	---	---	---	
17	Flufenoxuron	88.7 \pm 5.9	82.6 \pm 9.2	62.1 \pm 0.4	34.9 \pm 27.8	68.2 \pm 0.7	68.6 \pm 9.3	---	
18	Chlorfluazuron	---	---	---	---	---	---	---	

*Test solutions are the same as the proposed method in Table 4.

** It was impossible to detect because specified monitoring ion was not obtained.

✳ over lap

Table 7. Ratio of LC/MS to GC/MS for Recovery of Pesticides

No.	Pesticides	Potato	Radish	Apple	Cucumber	Banana	Rice
1	Inabenfide*	—**	—	—	—	—	—
2	Myclobutanil*	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	1.1
3	Imazalil	2.4	1.3	1.9	1.3	2.1	1.8
4	Triflumizole*	1.2	1.3	1.5	1.6	1.6	2.7
5	Buprofezin	0.9	0.8	0.7	0.4	0.7	1.1
6	Methabenzthiazuron	0.6	0.7	0.8	0.6	0.7	0.9
7	Furametpyr*	0.7	0.8	0.9	0.9	0.9	2.0
8	Benfuresate*	0.8	0.8	0.9	1.0	1.0	1.2
9	Dymron	—	—	—	—	—	—
10	Iprodione	0.6	1.2	0.9	1.6	1.0	1.6
11	Tebufenozide*	0.8	1.1	1.0	0.8	0.9	0.6
12	Pyrazoxyfen	—	—	—	—	—	—
13	Pencycuron	0.7	0.8	0.5	0.3	0.4	0.5
14	Fenpyroximate	—	—	—	—	—	—
15	Diflubenzuron*	0.7	1.2	0.7	0.9	0.7	0.9
16	Hexaflumuron	—	—	—	—	—	—
17	Flufenoxuron	0.7	1.0	1.5	2.2	1.6	1.1
18	Chlorfluazuon*	—	—	—	—	—	—

* Recovery ratio of pesticides by LC/MS and GC/MS is the value in Table 4/Table 5.

** impossible to calculate

第二章 LC/MS による農薬分析の文献調査

1) 農薬の分析例とイオン化法

本報告は LC/MS による農薬の定量性について検討することが目的であるが、現時点においてどの程度まで研究がなされているか文献調査を行った。その結果を以下に示す。

現在、LC/MS による測定は生体内物質、ビタミン、色素、医薬品、環境ホルモン、糖、抗生物質等多岐に渡っている。農薬についてもいくつか報告されており、中でもカルバメート系農薬の分析法について報告されているものが多い。質量分析は大気圧イオン化法(API)のうち、APCIあるいはエレクトロスプレー(ES)で測定されている。APCIとESとを比較すると、溶液中でイオン化している化合物や難揮発性化合物にはESが適しており、一方、揮発性のある化合物にはAPCIが適している。またAPCIではESでは測定できない溶媒、流量、添加物を使用しているものでも測定可能である。また、いずれのイオン化法においても、試料のもつ性質により測定モード(ポジティブ、ネガティブ)の最適化の必要がある。

2) カルバメート系農薬の分析

ここで、カルバメート系農薬のAPCI(ネガティブ、ポジティブモード)とESによる分析結果を述べている①の文献を紹介する。各モードで得られる主たるフラグメントイオンとSIM測定の際のタイムスケジュールをTable 1,2に示した。検出感度についてはESが高く(Table 3)、また感度の低いAPCI(ネガティブモード)についても高濃度の分析においては確認手段として可能であると述べている。また、農作物での添加回収実験では、ESにおいて、平均値64-105%、絶対標準偏差5-15%で(Table 4)、APCIでも同様に実験した結果、ほぼ同じ結果が得られた。

以上のことより、APCI,ESの両法を用いることにより、妨害物質の影響をあまり受けることなく高感度に試料中(0.5g)のカルバメート系農薬の分析が可能であると結論づけている。

3) LC/MS 装置の保守

一方、ES-MSをルーチン分析法として使用する際の有効性は、装置の重稼働を考慮し同一日内と評価されるとも述べている。これは一日以上装置を稼働し続けると、イオン強度が確実に低下する傾向にある為である。この傾向は他機種装置でも見られ、そのため日内変動や日差変動を求めている文献が他にもいくつかみられる。このような変動は、試料や装置自体の状態によるイオン化率の変動に起因するものと推測され、その一因として、試料溶液中の多量の妨害物質の存在が考えられる。API-MSでは試料溶液は高電場に導入されると電荷を帯びた液滴になり複雑な過程を経てイオン化されるが、この際に多量の試料成分が存在すると目的成分のイオン化過程に支障を来す為である。故にAPI-MSで良い結果・感度を得るためには、適切なサンプル前処理が必要となるのである。しかし、これらの難点はキャピラリー先端部の位置及び保守確認に努めること、また、測定時には測定値が装置の状態になるべく影響されないように試料と標準は必ず交互に測定するなどの工夫により改善される点も多いと考えられる。本報での結果においても標準偏差は10%~15%であり、GC/MSでの測定によっても一般的に5%程度の変動があることや現在のLC/MSによる測定技術水準を考慮すると、本報の結果は妥当なものであると思われる。

4) 高感度化の検討

そのほか、前述したように現在は一台で低分子から高分子化合物のものまで多種多様な化合物の測定に対応するために質量範囲が10~2000から3000 m/zと広範囲に設計されているが、農薬は低分子化合物なので低分子化合物の測定に特化した装置があれば感度の点でも有利であろうし、より高感度な測定が可能になると考えられる。現在、LC/MSはまだ発展途上の段階にあると考えられ、メーカーによってインターフェイスやイオン化部の構造が多様であることから、今後より一層の装置の改良が期待される。

5) データ処理の簡便化

現在、LC/MSにより採取されたデータは、ほとんど手動で解析されており、分析対象化合物や検体が多くなるほど作業効率は低下する。定量処理では予め化合物のターゲットとなる質量数や保持時間を設定しておくが、実試料を用いるとベースラインの変動や保持時間のずれはなかなか回避できない。このため、手動の波形処理を行わざるをえなくなる。また、農薬によりイオン強度やピーク形状が異なるため波形処理パラメータを同一にできないのも手動解析に頼らざるをえない一因となっている。よってこのような変動にも十分対応できるような、高度な波形処理の自動化が可能な処理ソフトの改良が望まれる。

<参考文献>

① M.Fernandez, Y.Pico, J.Manes: *J.Chromatogr.A*, **871**(2000)43-56

固相分散と LC/MS(APCI 及び ES)による果実・野菜中に残留するカルバメートの定量

② A.I. Valenzuela, M.J.Redondo, Y.Pico, G.Font: *J.Chromatogr.A*, **871**(2000)57-65

LC/MS(ES)による果実・野菜中に残留するアバメクチンの定量

③ A.I.Valenzuela, Y.Pico, G.Font: *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **14**(7)(2000)572-577

LC/MS(APCI)による柑橘類果物中に残留する3種のベンゾイル尿素系殺虫剤の定量

④ M.Z.Mesmer, R.A.Flurer: *J.Chromatogr.A*, **891**(2000)249-255

HPLC(UV)及び LC/MS(ES)による市販殺鼠剤中

のクロロファシノン、ジファシノンの定量

⑤ J.Hau, S.Riediker, N.Varga, R.H.Stadler: *J.Chromatogr.A*, **878**(1)(2000)77-86

LC/MS(ES)による食品中に存在するクロルメクワットの定量

⑥ E.Lacassie, M.F.Dreyfuss, J.L.Daguet, M.Vignaud, P.Marquet, G.Lachatre: *J.Chromatogr. A*, **830**(1)(1999)135-143

LC/MS(ES)を用いたりんご、梨中に残留する農薬の多成分分析法

⑦ J.D.Vargo: *J.Anal.Chem.*, **70**(13)(1998)2699-2703

LC/MS/MS による土水中のクロロアセトアニリドとクロロアセトアミド除草剤のスルホン酸分解物の定量

⑧ K.A.Barnes, R.J.Fussell, J.R.Startin, M.K.pegg, S.A.Thorpe, S.L.Reynolds: *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **11**(1)(1997)117-123

10種農薬定量のための LC/MS(APCI 及び ES)のシステム開発

⑨ K.A.Barnes, R.J.Fussell, J.R.Startin, S.A.Thorpe, S.L.Reynolds: *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **9**(14)(1995)1441-1445

LC/MS(APCI)によるプラム、イチゴ、クログスリ果実飲料中のジフルベンズロン、クロフェンテジンの定量

⑩ K.A.Barnes, J.R.Startin, S.A.Thorpe, S.L.Reynolds, R.J.Fussell: *J.Chromatogr.A*, **712**(1995)85-93

LC/MS(APCI)によるマッシュルーム中のジフルベンズロンの定量

Table 1
Important mass spectral fragments and their relative abundances (R%) obtained by FIA-IC-APCI-MS and FIA-IC-ES-MS at fragmentor voltages of 20 V in positive mode and 40 V in negative mode

Compound	M_w	APCI		ES	
		Positive mode		Positive mode	
		M/z and tentative ions	R%	M/z and tentative ions	R%
Carbaryl	201	202 [M+H] ⁺	100	143 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
		234 [M+H+CH ₃ OH] ⁺	13		
Carbofuran	221	222 [M+H] ⁺	100	163 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Dichlofencarb	267	268 [M+H] ⁺	100	266 [M-H] ⁻	100
		182 [M+H-(CH ₃) ₂ CH ₂ NCO] ⁺	22		
Ethiofencarb	225	226 [M+H] ⁺	100	167 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Fenobucarb	207	208 [M+H] ⁺	100	149 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Fenoxycarb	301	302 [M+H] ⁺	100	185 [M-H-(CH ₃) ₂ CH ₂ NCO ₂] ⁻	100
		210 [M+H-(CH ₃) ₂ NCO] ⁺	28		
Isoprocarb	193	194 [M+H] ⁺	100	135 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Methiocarb	225	226 [M+H] ⁺	100	167 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Metholcarb	165	166 [M+H] ⁺	100	152 [M-H-CH ₃ NCO-CH ₃] ⁻	60
				107 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Oxamyf	219	163 [M+H-CH ₃ NCO] ⁺	100	161 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
				147 [M-(CH ₃) ₂ NCO] ⁻	40
Pirimicarb	238	239 [M+H] ⁺	100		
		261 [M+Na] ⁺	29		
Propoxur	209	210 [M+H] ⁺	100	151 [M-H-CH ₃ NCO] ⁻	100
Thiofencarb	257	258 [M+H] ⁺	100	132 [M-CH ₂ C ₈ H ₄ Cl] ⁻	100
				107 [M-CH ₃ CH ₂ S-CH ₃ NCO] ⁺	50
				164 [M-CH ₃ CH ₂ S] ⁺	50
				208 [M+H] ⁺	100
				226 [M+NH ₃] ⁺	25
				302 [M+H] ⁺	100
				324 [M+Na] ⁺	41
				194 [M+H] ⁺	100
				216 [M+Na] ⁺	15
				226 [M+H] ⁺	100
				248 [M+Na] ⁺	19
				242 [M+Na] ⁺	100
				258 [M+K] ⁺	40
				237 [M+NH ₃] ⁺	27
				251 [M-CH ₃ OH] ⁺	17
				239 [M+H] ⁺	100
				210 [M+H] ⁺	100
				168 [M+H-CH ₂ CH=CH ₂] ⁺	33
				153 [M+H-CH ₃ NCO] ⁺	20
				258 [M+H] ⁺	100

Table 2

Time scheduled SIM condition for monitoring carbamates pesticides in fruit and vegetable samples obtained by ES and APCI mode

Compound	ES positive		APCI positive		APCI negative	
	channel mass <i>m/z</i>	retention window, min	channel mass <i>m/z</i>	retention window, min	channel mass <i>m/z</i>	retention window, min
Oxamyl	242.0	1-11	163.0	1-5	161.0	1-5
Metolcarb	166.0	11-14	166.0	5-10	107.0	5-10
Propoxur	210.1	14-17	210.1	5-10	151.0	5-10
Carbofuran	222.1	14-17	222.1	5-10	163.0	5-10
Carbaryl	202.0	17-23	202.0	10-14	143.0	10-14
Ethiofencarb	226.0	17-23	226.0	10-14	167.0	10-14
Isoprocarb	194.1	23-25	194.1	14-17	135.0	14-17
Pirimicarb	239.1	23-25	239.1	17-22	-	-
Fenobucarb	208.1	25-30	208.1	17-22	149.0	17-22
Diethofencarb	268.1	25-30	268.1	17-22	266.0	17-22
Methiocarb	226.0	25-30	226.1	22-25	167.0	22-25
Fenoxycarb	302.1	30-40	302.1	25-30	185.2	25-30
Thiobencarb	258.0	30-40	258.0	25-30	132.2	25-30

Table 3

Maximum residue limits (MRLs) authorized and limits of detection (LODs)

Compound	MRLs (mg kg ⁻¹)		LODs (mg kg ⁻¹)		
	UE-Spain	FAO/WHO	APCI-MS positive	APCI-MS negative	ES-MS positive
Carbaryl	1-5	5-7	0.01	0.01	0.005
Carbofuran	0.1-2	0.1 ^a	0.005	0.05	0.001
Diethofencarb	0.05-1	-	0.005	0.05	0.001
Ethiofencarb	1-2	-	0.01	0.1	0.01
Fenobucarb	-	-	0.01	0.01	0.005
Fenoxycarb	0.02-2	-	0.01	0.1	0.005
Isoprocarb	-	-	0.005	0.01	0.005
Methiocarb	0.01-0.2	0.05 ^a	0.01	0.05	0.01
Metholcarb	-	-	0.01	0.05	0.005
Oxamyl	0.05-2	0.05 ^a -5	0.01-1 ^b	0.1	0.005
Pirimicarb	0.5	0.05 ^a -1	0.001	-	0.001
Propoxur	3	0.05	0.01	0.05	0.01
Thiobencarb	0.1	-	0.01	0.1	0.01

^a At or about the limit of determination.^b LOD in orange samples.

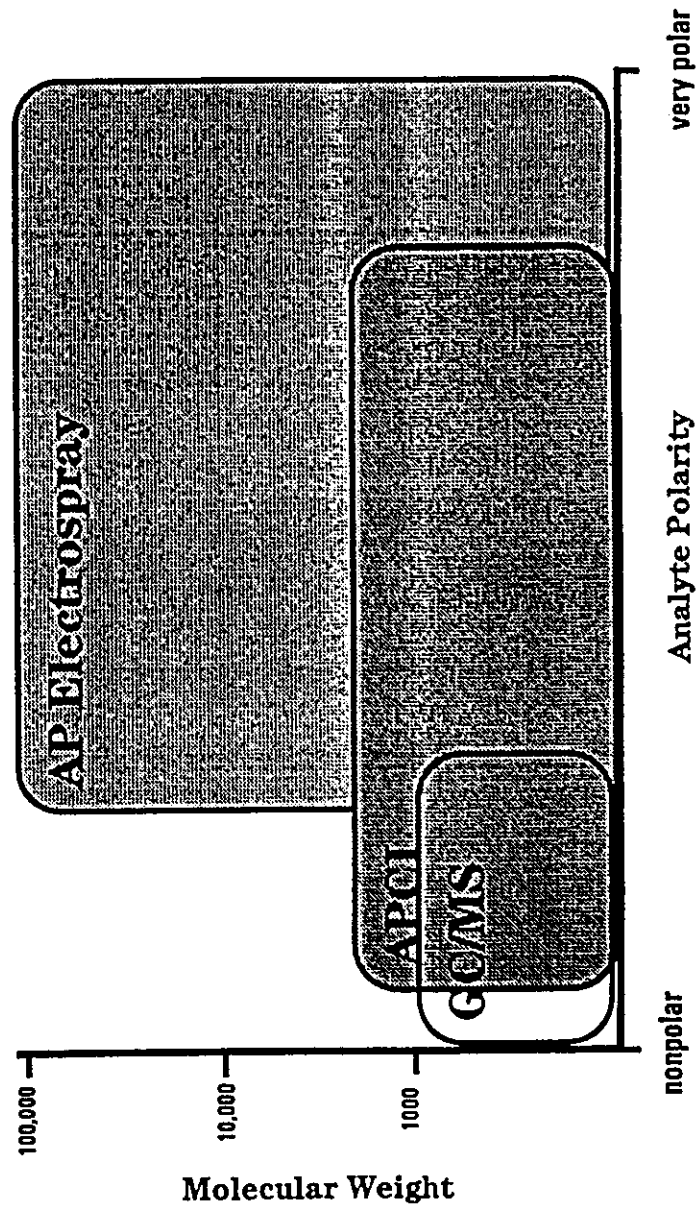
Table 4

Recovery of 13 carbamates added at different concentration to the grape samples after MSPD with C₁₈ and LC-ES-MS

Concentration (mg kg ⁻¹)	Recovery% (x±RSD)			
	10	1	0.1	0.01
Oxamyl	67±9	64±9	73±12	68±15
Metholcarb	91±5	92±7	86±7	78±10
Propoxur	91±4	83±8	86±9	88±16
Carbofuran	85±3	84±5	79±6	86±12
Carbaryl	70±6	67±9	73±11	73±13
Ethiofencarb	86±4	78±12	74±13	85±15
Isoprocarb	67±6	63±8	69±9	69±11
Diethofencarb	76±2	67±6	78±7	69±8
Fenobucarb	78±8	74±7	79±9	81±10
Methiocarb	93±7	74±9	84±10	92±13
Fenoxycarb	87±4	69±6	79±8	83±9
Thiobencarb	106±5	104±8	99±12	104±13
Pirimicarb	91±3	87±9	83±11	94±11

< 参照 >

MSのイオン化法



ESI と APCI

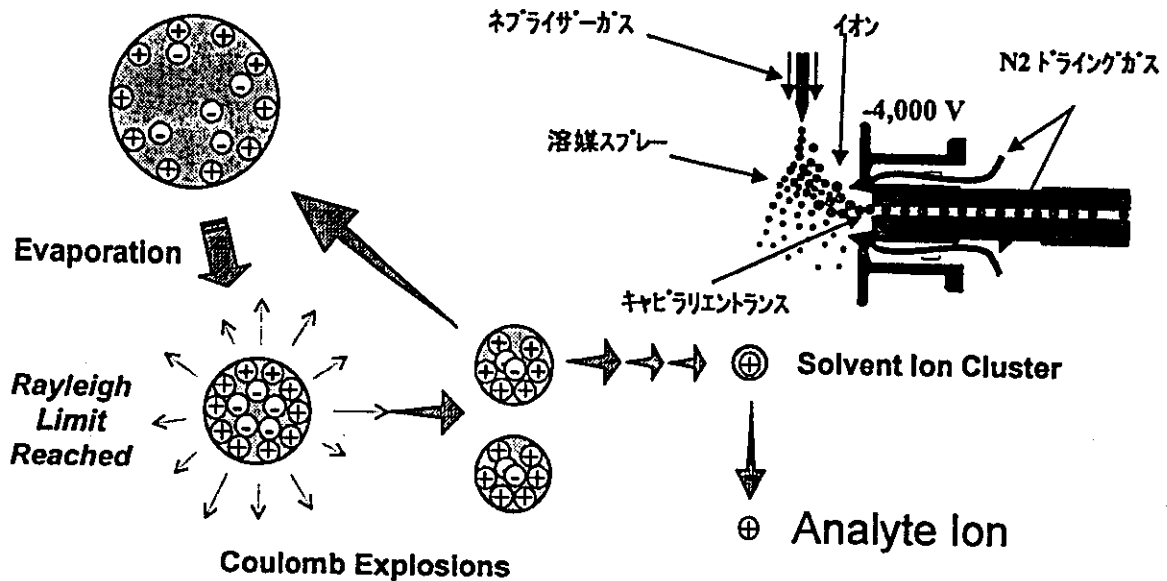
ESI (エレクトロスプレーイオン化法)

強い電場にサンプルを導入することにより、液滴に電荷を帯びさせ、目的化合物をイオン蒸発によってMSに導く方法

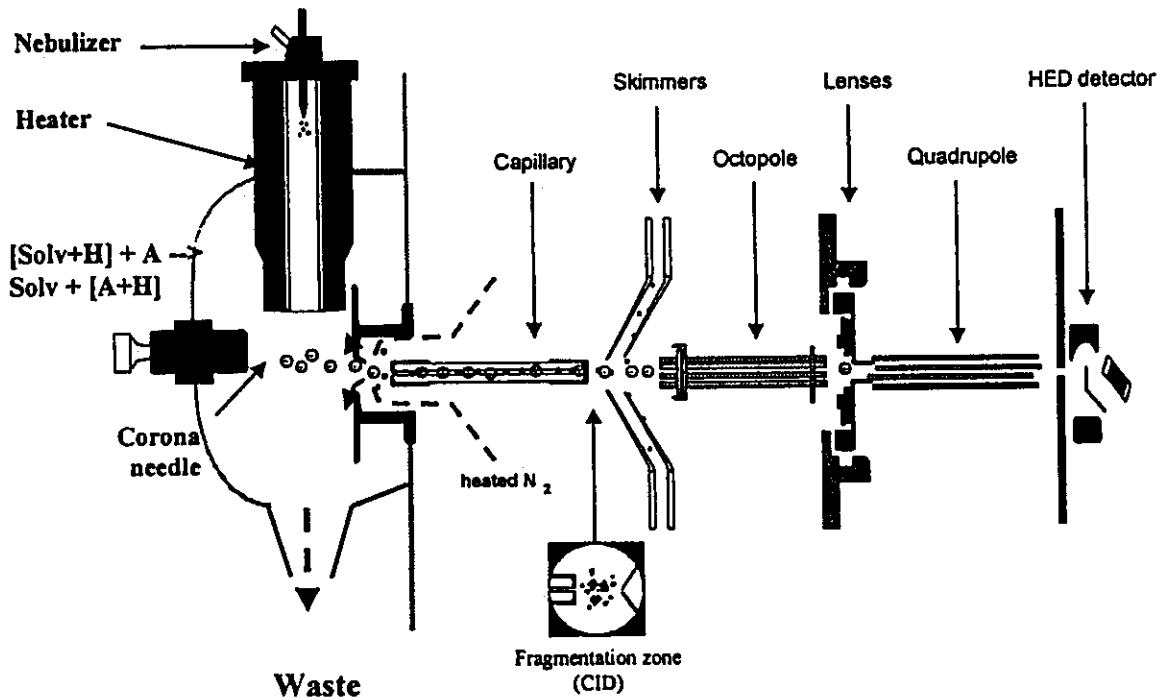
APCI (大気圧化学イオン化法)

溶媒をコロナ放電によりイオン化することにより、反応ガスと同じような形で化学イオン化を起こしMSに導く方法

API-Electrospray イオン化法



大気圧化学イオン化 (APCI)



ESIとAPCIの特長

	ESI	APCI
イオン化	イオン蒸発	化学イオン化(CI)
イオン化	強い電場でイオン化させる	コロナ放電により溶媒をイオン化
安定性	最もソフトなイオン化	熱不安定物質に不適切
サンプルの極性	中極性から極性の高い化合物	極性の低い化合物
メンテナンス性	容易	コロナノードルのクリーニング
流量	低流量 200ul/min程度	1ml/min
分子量	数十から数万	1000から1500以下

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、キャピラリーカラムを用いたLC/MSによるアルジカルブ、オキサミル及びカルバリル(NAC)などのN-メチルカルバメート系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。

今年度は、一般によく用いられるLC/MS用HPLCカラムを用いて、N-メチルカルバメート系農薬の他、アジメスルフロン、イマズスルフロン、クロルスルフロン、シクロスルフアムロンなどHPLCで測定する農薬を迅速に一斉検出する条件の検討を行った。また、これら農薬の簡易一斉検出を試みた。

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13年3月15日現在、130種類以上の食品に対して214種類の農薬の基準が設定され(そのうち15種類は平成13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ィー(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、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214種類に係わる試験法

は110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。昨年度は、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、キャピラリーカラムによる高感度化と分離条件の最適化を試みた。今年度は、汎用型の分離カラムを用いて簡易一斉に定性・定量する超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オキサミル、NAC など 14 種類の N-メチルカルバメート系農薬及びトリベヌロンメチル、シクロスルファミロンなどの食品規格が設けられているスルホニルウレア系農薬など 13 種類の農薬、計 27 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: 日本分光(株)製 GULLIVER

MS: マイクロマス社製 PLATFORM II

3. 試験方法

(1) LC/MS の測定条件

以下の条件で行った。

カラム: TSK-GEL ODS-80T

2.0mm i.d.×150mm (5 μ m)

カラム温度: 50 °C

移動相: アセトニトリル・水(60:40)

流量: 0.08ml/min

注入量: 20 μ l

スプリット比: 10:1

イオン化モード: ESI+

コーン電圧: 20eV

(2) 試験に供した試料

玄米、ぶどう及びピーマンを試験した。

(3) 添加回収試験

a. 添加量

いずれの農薬も、試料中濃度として 0.10ppm となるように添加した。

b. 試料溶液の調製

試料中の農薬は、アセトンで抽出後ジクロロメタンに転溶した。玄米はアセトニトリル分配により油脂を除去した。

操作の概要をチャート 1 に示した。



チャート 1. 試験溶液の調製方法

C. 研究結果

LC/MS により多種類の農薬を一斉に検出する方法を検討した。

厚生労働省から告示された試験法で、HPLC を用いて試験する N-メチルカルバメート系殺虫剤及びスルホニルウレア系除草剤など 27 種類の農薬について、簡易な前処理で高感度に測定する手法の確立を試みた。

汎用型の送液ポンプが利用できる内径 2.0 mm 以上の一般的な LC/MS 用カラムを用い、移動相の送液はアイソクラティックな HPLC 条件下で、アルジカルブ、NAC、ピリミカーブなど 14 種類の N-メチルカルバメート系農薬及びアジムスルフロ、イマゾスルフロ、トリベヌロンメチルなどのスルホニルウレア系農薬など 13 種類の農薬、計 27 種類の農薬を検出できることが判明した。

1. 測定イオンの選択

1.0 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 (Na 付加) の強度が高く現れるイオンを用いることにより、十分な感度で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、短時間内に連続注入して試験ができる、アイソクラティックな条件下での農薬相互の分離向上を目指した。

以下の HPLC 条件を用いることにより、27 種類の農薬が 20 分以内で検出でき、30 分ごとに連続注入して試験できることがわかった。しかし、MPMC と XMC は、本条件下では保持時間がほとんど同じであり、また、同一の測定イオンを用いることから、分離測定はできなかった。

HPLC 条件

カラム: TSK-GEL ODS-80T

2.0mm i.d.×150mm (5 μ m)

カラム温度: 50 °C

移動相: アセトニトリル・水(60:40)

流量: 0.08ml/min

注入量: 20 μ l

3. MS による検出の条件

イオン化方式及びイオン化電圧の最適化を試みた。以下の条件に調整したところ、27 種類の農薬を同一条件下で検出できた。

スプリット比: 10:1

イオン化モード: ESI+

コーン電圧: 20eV

なお、イオン化モードは APCI+でも同様に検出できた。

4. 添加回収試験

検討した 27 種類の農薬のうち、アルジカルブ、イマザリル及びジメトモルフは、試料溶液注入時のピーク感度の変動が大きく、MS クロマトグラムからピークを検出することが困難な場合があった。

玄米、ぶどう及びピーマンにおける N-メチルカルバメート系農薬及びスルホニルウレア系農薬など 24 種類の農薬(検討した農薬からアルジカルブ、イマザリル及びジメトモルフを除いた)の回収試験結果を表 3,4 に示した。なお、MPMC 及び XMC は合算値で示した。

各農薬を試料中 0.10ppm となるように添加したとき、玄米から 54.1 ~ 114.0 %、ぶどうから 58.5 ~ 140.1 %、ピーマンから 45.0 ~ 101.9 %回収された。

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。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残留農薬基準値が設定されている。

試験法は当初 GC 法であったが、平成 6 年 6 月 9 日厚生省告示第 199 号により 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。

スルホニルウレア系農薬は、 $RSO_2NHCONHR'$ の構造を有し、選択性が高く、微量で高い除草活性を示す除草剤として利用されている。

現在、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、メスルフロンメチルなど 11 種類のスルホニルウレア系除草剤について残留農薬基準値が設定されている。

これら農薬は性質が大きく異なるものが多く、精製方法が多岐に渡るため、6 通りの試験法が告示されている。

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簡易に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から、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やアジムスルフロン等試験法、イマゾスルフ

ロン等試験法、クロルスルフロン等試験法など 6 通りの試験法で測定されるスルホニルウレア系除草剤にイマザリル及びダイムロンを加えた 27 種類の農薬を対象に、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、オキサミル及びアジムスルフロン、イマゾスルフロンなどの農薬は、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、ピリミカーブやダイムロンなど、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。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。そこで今回、LC/MS を用いた簡易な一斉分析手法の確立を試みた。

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、カルバリルなどの N-メチルカルバメート系農薬やアジムスルフロン、イマゾスルフロンなどのスルホニルウレア系農薬は、分子イオン(H^+)を用いて良好に測定できることができた。しかし、アルジカルブ及びオキサミルは本検討条件では分子イオンの捕捉が困難であり、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 2.0mm のカラムを用いて、27 種類の農薬を測定することができた。これら農薬のうち、12 種類の N-メチルカルバメート系農薬の LC/MS クロマトグラムを図 1 に示した。ややピーク幅は広いものの、十分検出できる。しかし、アルジカル

ブ、イマザリル及びジメトモルフは、分子イオン($H^+ m/z: 220$)及び擬分子イオン($Na^+ m/z: 242$)のいずれでもピークの再現性が悪く、検出感度の悪いときはベースラインノイズに隠れて検出することが困難であった。また、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分離測定は困難であった。

標準溶液及び試料溶液を連続して LC/MS に注入したときの保持時間の変動を表 5 に示した。N-メチルカルバメート系農薬ではほとんど変動はみられなかったが、シクロスルファミロン、トリベヌロンメチル、ベンスルフロンメチルなどは、試料溶液の注入などイオンソースやカラム流路の汚れなどにより保持時間が変動した。今回の HPLC カラムでの分離条件は、内径が 2.0mm と比較的細いカラムを用い、かつ、移動相の流速も 0.08ml/min と遅い。カラム注入時の溶媒が移動相と異なっていたことも、保持時間が変動した要因の一つと考えられる。標準溶液を連続注入したときは、保持時間の変動はほとんどみられなかったことから(表 6)、5 ~ 6 試料溶液を注入後には標準溶液を注入して保持時間を補正するなど、標準溶液の注入間隔を狭めて保持時間を確認することにより農薬の有無の判断は可能であった。

玄米、ぶどう及びピーマンについて添加回収試験を行った。試料溶液に共存する種々の成分による影響を観察するため、アセトン抽出液をジクロロメタンに転溶した後、直接 LC/MS に注入し、多くの妨害成分が存在する中での農薬の検出を試みた。なお、検討した農薬すべてを十分に抽出、転溶するため、転溶溶媒はジクロロメタンを用いた。

試料中濃度が 0.10ppm となるように添加し、3 回繰り返し試行した。玄米、ぶどう及びピーマンの LC/MS クロマトグラムの例を図 2 ~ 4 に示した。平均回収率は、45.1 ~ 140.1 % であり、農薬を添加しなかったブランク試料からは妨害ピークはみられなかった。2 日以上に渡り連続して測定すると、シクロスルファミロンやトリベヌロンメチルなどに保持時間の変動がみられたが、標準溶液の注入による

保持時間の補正により、各農薬を検出できた。

本測定条件における検出感度は、試料中濃度で、N-メチルカルバメート系農薬は約 0.01ppm まで検出可能と思われるが、スルホニルウレア系農薬などは約 0.05ppm と推察される。

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、内径 2.0mm のカラムを用いてほとんど前処理を行わなくても一斉分析できることがわかった。しかし、スルホニルウレア系農薬の一部は保持時間の変動が見られることもあり、今後その原因の把握と解決に向け更に検討加える必要がある。