

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

研 究 報 告 書

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 佐々木久美子

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 佐々木久美子

国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 外海 泰秀

愛知県衛生研究所 岡 尚男

研究報告書内容

総括研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究	1
-----------------------------	---

分担研究報告書

1. 安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトロメトリー による食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発	5
2. LC/MSによる残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究	17
3. 各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究	
(1) 超臨界流体抽出法の野菜・果実試料への適用	41
(2) 原子発光検出器による含硫黄作物中の有機塩素系農薬の測定	63

総括研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

主任研究者 佐々木久美子

(国立医薬品食品衛生研究所)

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

総括研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

主任研究者 佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

農作物中の残留農薬分析の効率化と精度向上を目的として、スクリーニング試験法及び個別分析法の開発に関する下記の研究を実施した。

(1) 柑橘類中のチアベンダゾール(TBZ), イマザリル(IMA), オルトフェニルフェノール(OPP)について、フローインジェクション・エレクトロスプレータンデムマススペクトルメトリーによる同時スクリーニング法を開発した。安定同位体を内部標準物質として用いることにより、迅速かつ精度の高い分析法が確立できた。柑橘類に TBZ, OPP, IMA をそれぞれその使用基準値である 10 mg/kg(TBZ, OPP)及び 5 mg/kg(IMA) 添加した場合の回収率は 77~101%, 変動係数は 0.7~4.2%であった(n=5)。また、本法では、試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は僅か 15 分程であった。

(2) 柑橘類中の N-メチルカルバメート系農薬(NMC) 21 種及びそれらの代謝物または異性体 12 種を、ジクロロメタンを用いずに同時定量する方法を検討した。試料をアセトン抽出、次いで酢酸エチルで再抽出し、ENVI-Carb 及び SAX の2種のミニカラムで精製した。オレンジではポストカラム反応蛍光検出 HPLC で全ての NMC を測定することができた。レモン及びグレープフルーツでは、HPLC と LC/MS(SIM)を用いることにより、ほとんどの場合に試料由来の妨害を受けずに定量ができた。HPLC と LC/MS の定量値はよく一致していた。添加回収率(0.1 µg/g 添加)は一部の NMC を除き、60.1~97.8%であった。HPLC における検出下限は概ね試料中 0.005 µg/g であった。LC/MS における検出下限は HPLC と同等程度のものであった。

(3-1) 超臨界流体抽出(SFE)法の野菜・果実試料への適用を検討した。代謝物を含む 159 農薬(有機塩素系 26, ピレスロイド系 14, カルバメート系 17, 有機リン系 46, 有機窒素系 48, その他 8)を用いて、SFE法と有機溶媒抽出法の添加回収率を比較するとともに、実試料を用いて分析値の比較を行った。その結果、添加回収率、実試料の分析値ともに一部の農薬を除き両分析法でほぼ同じ結果が得られた。SFE法は1検体当たりの抽出時間が1時間程度であり、また、SFE法で得られた抽出液はそのまま GC/MS 測定が可能であるため分析操作が大幅に簡略化された。

(3-2) 原子発光検出器ガスクロマトグラフ(GC-AED)を用いて含硫黄作物中の有機塩素系農薬の検出を試みた。塩素を有する 15 農薬、塩素及び硫黄を有する 6 農薬の計 21 農薬を、塩素または硫黄元素を対象として測定し、検出の可否を検討した。その結果、全農薬とも 1 ng を十分に検出できた。また、含硫黄作物のタマネギ、ネギ及びシイタケの抽出液にこれら農薬を添加して、フロリジルミニカラムで精製後 GC-AED で測定したところ、多くの農薬が検出できることが示唆された。

分担研究者

佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所
食品部第一室長
外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 食品試験部長
岡 尚男 愛知県衛生研究所
生活化学科長

A. 研究目的

農作物中の残留農薬には平成 14 年 3 月現在、229 農薬に対して基準値が設定されている。食品輸入量の急激な増加と多様化の中で、これら多数の農薬の基準値への適合性を検査するためには、迅速、簡便かつ精度が高いスクリーニング試験法が必要である。既存の局長通知法によるスクリーニ

ング、すなわち作物試料中の農薬を有機溶媒で抽出し、精製した後、試験溶液を GC 及び HPLC で測定する方法は必ずしも効率的とは言えず、より効率的なスクリーニング法の開発が必要である。一方、分析に用いる手法、測定法は日進月歩であり、新たな手法を取り入れることによって、より簡便で質の高い公定試験法を作成する必要もある。本研究では行政検査に適する試験法開発を目的として今年度は次の 3 課題の研究を実施した。

(1) 安定同位体を内標準物質とするタンデムマスペクトロメトリーを用いた柑橘類中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発

(2) N-メチルカルバメート系農薬の試験に LC/MS を使用した簡便な新試験法の開発

(3) 各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究 ①超臨界流体抽出法の野菜、果実試料への適用及び② GC-AED による含硫黄作物中の有機塩素系農薬の測定

B. 研究方法

分担研究1

柑橘類中のチアベンダゾール(TBZ)、イマザリル(IMA)及びオルトフェニルフェノール(OPP)についてタンデムマスペクトルメトリー(MS/MS)による検出条件の最適化を図り、試料導入キャリアの種類、試料導入条件を検討した。次いで、内部標準物質を選択、試験溶液の調製法を検討した。検量線の直線性を確認後、市販のレモン、オレンジ、グレープフルーツを用いて本法による添加回収実験を実施した。

分担研究2

N-メチルカルバメート(NMC)系農薬 21 種とそれらの代謝物、異性体 12 種を、レモン、オレンジ及びグレープフルーツに添加(0.1 µg/g)し、各 20g をアセトン抽出、次いで酢酸エチルで再抽出し、Supelclean ENVI-Carb 及び Mega Bond Elut SAX で精製した。ポストカラム反応蛍光検出 HPLC と LC/MS(SIM)を用いて定量し、定量値を比較した。

分担研究3

① SFE 法と有機溶媒抽出法とを比較するために、159 農薬(有機塩素系 26、ピレスロイド系 14、カーバメート系 17、有機リン系 46、有機窒素系 48、その他 8)を用いて、トマト、ハウレンソウ及びレモンからの回収率を両方法について求めた。

次いで、野菜・果実 27 種類、43 検体中の残留農薬を SFE 法と有機溶媒抽出法で分析し、両者による分析値を比較した。

②タマネギ、ネギ及びシイタケの溶媒抽出液 1 mL に農薬標準混合溶液 0.1 mL を加え、カラムにより精製処理したものを試験溶液とし、塩素あるいは硫黄元素を測定対象として調整した GC-AED に注入し、各農薬の回収率を求めた。

C. 結果及び考察

分担研究1

柑橘類中の TBZ, IMA, OPP について、フローインジェクション・エレクトロスプレータンデムマスペクトルメトリーによる同時スクリーニング法を開発した。優れた選択性を有する MS/MS と、安定同位体を内部標準物質として用いることにより、迅速かつ精度の高い分析法が確立された。レモン、オレンジ及びグレープフルーツを試料として、各防かび剤をそれぞれその使用基準値である 10 mg/kg (TBZ, OPP) 及び 5 mg/kg (IMA) 添加した場合の回収率は 77~101%、変動係数は 0.7~4.2% であった(n=5)。また、本法では、試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は僅か 15 分程であった。

分担研究2

オレンジでは全ての NMC が HPLC で測定できたが、レモンとグレープフルーツでは、それぞれ 8 種、10 種の NMC が妨害ピークと保持時間が一致し、正確に定量できなかった。これらを LC/MS (SIM) で定量した結果、ほとんどの場合に試料由来の妨害を受けずに NMC の定量ができた。HPLC と LC/MS の定量値はよく一致した。添加回収率はブトキシカルボキシム等一部の NMC を除き、60.1~97.8% であった。HPLC における検出下限は概ね試料中 0.005 µg/g であった。LC/MS における検出下限は HPLC と同等程度のものが多かった。

分担研究3

① トマト、ハウレンソウ及びレモンを用いた添加回収実験による回収率を有機溶媒抽出法と比較した結果、一部の農薬を除きほぼ同じ回収率及び精度が得られた。SFE 法は検討した 159 農薬中、良好な回収率(70~120%)が得られた 135 を超える農薬に対して適用可能と思われる。回収率がやや

低かった(50~70%) 5~13 農薬及び回収率が 120 %を超えた 11 農薬でも、再現性は良かったのでスクリーニング分析は可能と思われる。低回収率(<50%)だった農薬のうち EPTC、ブチレート及びビフェニルは濃縮時の揮散を防止すれば適用できる可能性がある。クロロタロニル、キャプタン、カブタホール、ジコホール、アミトラズ、ジクロフルアニド、イミペンコナゾール代謝物1及びメトリブジンの 8 農薬には SFE 法は適用困難と思われる。

次に、実試料中の残留農薬を両抽出法で分析し、比較した結果、一部の農薬を除き分析値は非常に良く一致し、精度も良かった。検出された 58 種類の農薬中分析値が異なったのは、操作中の分解により SFE 法で分析値が低くなるクロロタロニル及び原因不明であるが SFE 法で高い値となるフルバリネート、トリフルラリン、ペルメリン、シペルメトリン、シハロトリンであった。後者の 5 農薬は、添加回収実験の結果から実試料での結果を説明できなかった。

②検討した 21 農薬は塩素を測定対象としたとき、1 ng の注入で全て検出できた。また、カブタホール、キャプタン、ジクロフルアニド、エンドスルファン I、エンドスルファン II 及びエンドスルファンサルフェートは、硫黄を測定対象にしても検出可能であった。硫黄を測定したとき、GC-FPD と異なり AED では検量線が直線性を示すため、定量性に優れていた。ネギ抽出物に各農薬を試料中濃度として 0.1 ppm となるように添加し、フロリジルカラムで精製後、塩素を対象に測定したとき、妨害ピークはほとんどなかったが、硫黄では多くの妨害ピークが認められた。

タマネギでは各農薬 70~120%の回収率が得られたが、シイタケでは回収率の低い農薬が多かった。回収率が低い農薬も、さらに精製を加えると検出される場合があり、妨害成分の影響で注入口などでの分解が促進され、あるいは原子化が抑えられた可能性もある。さらに検討を加える必要があると考える。

D. 結論

残留農薬分析の効率化と精度向上のために、スクリーニング試験法及び個別分析法の開発に関する研究を実施した。その結果、スクリーニング分析及び個別試験にとって有用な研究成果を得た。

(1) タンデムマススペクトルメトリーと、安定同位体を内部標準物質として用いることにより、迅速かつ精度の高い分析法が確立された。

(2) ジクロロメタンを使用せず、柑橘類に適用可能な N-メチルカルバメート農薬の HPLC 及び LC/MS による分析法が確立できた。

(3) ①添加回収試験及び実試料の分析値を有機溶媒抽出法の結果と比較することにより、野菜・果実に対する SFE 法の有用性及び適用可能な農薬の範囲が確認できた。

② GC-AED では含硫黄作物中の有機塩素系農薬等多くの農薬が妨害を受けずに感度よく検出できることが示唆された。

上記の研究結果は、検討した各分析法がいずれも実試料に適用可能であることを示すものである。直ちに実用可能な試験法もあり、さらに広範な農作物、各種農薬への適用性を検証する発展性を持つ試験法もあるが、衆知されれば、実用的な迅速試験法となるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

(1) 「安定同位体を用いた柑橘類中のチアベンダゾール、イマザリル及びオルトフェニルフェノールのスクリーニング法」、伊藤裕子、後藤智美、岡尚男、松本 浩(愛知衛研)、高橋伸之、中澤裕之(星薬大)、日本食品衛生学会第 82 回学術講演会、平成 13 年 10 月、長崎。

(2) 「GC-AED を用いたネギ類、キノコ類中塩素及び硫黄含有農薬の分析」、立石恭也、永山敏廣、高野伊知郎、小林麻紀、伊藤正子、田村康宏、木村奈穂子、北山恭子、斉藤和夫(東京都立衛生研究所)、日本食品衛生学会第 81 回学術講演会、平成 13 年 5 月、東京

分担研究報告書

安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトロメ
トリーによる食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発

分担研究者 岡 尚男

(愛知県衛生研究所)

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

安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトルメトリーによる 食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発

分担研究者 岡 尚男 愛知県衛生研究所 生活化学科長

研究要旨

柑橘類中のチアベンダゾール(TBZ), イマザリル(IMA), オルトフェニルフェノール(OPP)について, フローインジェクション・エレクトロスプレータンデムマススペクトルメトリーによる同時スクリーニング法を開発した. 優れた選択性を有するタンデムマススペクトルメトリーと, 安定同位体を内部標準物質として用いることにより, 迅速かつ精度の高い分析法が確立された. レモン, オレンジ, グレープフルーツを試料として, TBZ, OPP, IMAをそれぞれその使用基準値である10 mg/kg(TBZ, OPP)及び5 mg/kg(IMA)添加した場合の回収率は77~101%, 変動係数は0.7~4.2%であった(n=5). また, 本法では, 試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は僅か15分程であった.

研究協力者

伊藤裕子 愛知県衛生研究所
後藤智美 愛知県衛生研究所
松本 浩 愛知県衛生研究所
中澤裕之 星薬科大学

密な試料溶液の精製を必要とするものが多く, 迅速なスクリーニング法はほとんど報告されていない(2-7)

一方, 化合物の構造情報が得られる質量分析計(MS)を2台直列に配したMS/MS装置は, 優れた選択性を有するため, 食品衛生分析への応用が期待されている. この装置では, 最初のMSでプリカーサーイオンのみに質量分離し, 次のMSでこれが開裂して生じたプロダクトイオンを分離して検出する. したがって, 最初のMSで行なわれる『質量分離』を『夾雑物からの目的物質の分離』と置き換えて考えることができる. これはすなわち, 試料抽出液の精製操作や各種分析カラムでの分離を省略し, この質量分離のみで化学物質の分析が可能であることを示唆している. このことから, 試料抽出液の直接導入, すなわち, フローインジェクション(FI)により各種分析が可能であると判断された. そこで我々は, 柑橘類中の防かび剤を同時かつ迅速にスクリーニング分析するために, このFI-ESI MS/MSの応用を試みた. また, 定量性を向上させるには内部標準物質の使用が有効であることから, 内部標準物質として使用可能な安定同位体を検索し, 安定同位体を用いた分析法について検討を加えた.

A.研究目的

チアベンダゾール(TBZ), イマザリル(IMA)及びオルトフェニルフェノール(OPP)は, 主に柑橘類の収穫後の輸送・保存中に発生するかびを防止するポストハーベスト農薬として, 世界的に使用されている. 我が国においては, 平成4年11月に食品添加物の防かび剤として使用が許可され, 柑橘類においてはTBZとOPPが10 mg/kg, IMAが5 mg/kgと, それぞれ使用基準値が設定されている¹⁾. また, IMAについては, 農薬の残留基準値としての値も同じく5 mg/kgとして設定されている. 試料中に存在する基準値付近の防かび剤を迅速に分析することは, 食品衛生行政上非常に重要であることから, 簡便で信頼性が高く効率的なスクリーニング法が求められている. しかしながら, これまで報告されているこれら3種の防かび剤の分析法は個別分析法が主体であり, 同時分析であっても, 異なる検出装置を組み合わせるもの, それに厳

B. 研究方法

1. 試薬

標準品として、チアベンダゾール(シグマ製)、イマザリル(Riedel- de Haën製)、オルトフェニルフェノール(和光純薬工業製)を用いた。

安定同位体として、チアベンダゾール-¹³C₆(林純薬工業製)、イマザリル-d₅(林純薬工業製)、パラフェニルフェノール-d₉(C/ D/ N Isotopes製)を用いた。

その他の試薬はすべて和光純薬製残留農薬分析用もしくは、特級試薬を用いた。

2. 試料

平成 13 年に名古屋市内で購入したレモン、オレンジ、グレープフルーツを用いた。

3. 操作方法

3-1. FI- ESI MS/ MS 条件

MS 装置: QUATTRO II (Micromass 製)

キャリアー: メタノール-水(9:1)

流速: 0.2 mL/min

試料注入量: 1 μL

デソルベーションガス(N₂): 300 °C, 370 L/hr

イオン源温度: 100 °C

検出方法: 選択反応検出法(MRM)

その他の条件は、Table 1に示した。

3-2. 試験溶液調製法

スキーム 1 に示した。

C. 結果と考察

1. FI-ESI MS/ MS 条件の検討

1-1. MS/ MS 条件の最適化

高感度に精度良く MS/MS 分析するためには、各測定物質に合わせた MS/MS 条件の設定が必要である。このため、まず、各種防かび剤の標準溶液を MS 分析することにより、検出されるイオンを確認した。その結果、チアベンダゾール(TBZ)とイマザリル(IMA)は、ともに陽イオンモードでプロトン化分子(m/z 202, m/z 297)が検出された。一方、オルトフェニルフェノール(OPP)は、陰イオンモードで脱プロトン化分子(m/z 169)が検出された。そこで、これらのイオンをプリカーサーイオンとして、それぞれ MS/MS 分析したところ、TBZ は m/z 131

に、IMA は m/z 159 に、それぞれ高い強度を示すプロダクトイオンが検出されたことから、モニターするイオンとしてこれらを選択した。OPP についても同様に測定したが、プリカーサーイオンの開裂は観察されなかったことから、モニターイオンとしてプリカーサーイオンと同じ m/z 169 を選択した。

実験に用いた装置では、イオンの取り込み口にかかる電圧(コーン電圧)によりプリカーサーイオンの強度比をコントロールすることが可能である。また、コリジョンエネルギーを変化させることにより、プロダクトイオンすなわち、モニターイオンの強度比を調整することが可能である。そこで、3 種の防かび剤の分析にあたり、コーン電圧及びコリジョンエネルギーの最適化を試み、その結果を Table 1 に示した。

イオン源温度及びデソルベーション温度は、プリカーサーイオンの強度に関与するが、これらの温度は化合物毎に設定を変えることができないため、3 種の防かび剤のうち最もイオン強度の低い OPP の標準液を用いて最適化した。イオン源温度が 100 °C、デソルベーション温度が 300 °C のとき、OPP のプリカーサーイオンである m/z 169 の強度が最も強く観察されたことから、これらの温度を使用することとした。

1-2. キャリヤーの検討

ESI MS 分析においては、スプレーにより生じた液滴が微細なほどイオン化効率がよく、高感度分析が可能となる。また、一般的にはスプレーする液体に含まれる有機溶媒が多いほど表面張力が小さくなり、液滴は微細となる。そこで先ず、キャリアーとしてメタノールを用い、TBZ, IMA, OPP の標準液の分析を試みた。その結果、TBZ と IMA に関しては十分な感度で検出されたが、OPP は実用困難なほど低い感度でしか検出されなかった。そこで、イオン化を補助する効果のある水をキャリアーに添加することにより、OPP の検出感度を向上させることとした。キャリアー中の水の濃度を 0 ~ 40 % に変化させて検討したところ、10 % の濃度のときに OPP の検出感度は最高となっただけでなく、TBZ と IMA の検出感度も測定目的に充分適うものであった。そこで、キャリアーとしては、メタノール-水(9:1)混液を用いることとした。

FI-ESI MS/MS において、キャリアーの流速は直接測定時間に影響する。本研究においては、迅速性を最優先とするため、使用する MS/MS 装置の最大流量である 200 μ L/min を選択した。

1-3. 試料導入条件の検討

TBZ, IMA, OPP の混合標準液 100 μ L を FI-ESI MS/MS 分析すると、各防かび剤の MRM プロファイル上にピークが 2 つ検出された。TBZ の例を Figure 1 に示したが、これは、試料溶液がキャリアーと混和した部分では測定物質はイオン化している[Figure 1. (b)]のに対し、試料溶液のみの部分ではイオン化しない、あるいは、しにくい[Figure 1. (c)]ことを示している。このことから、注入した試料が全てキャリアーと混和する条件が必要と判断された。そこで、試料注入量を使用装置の最少注入量である 1 μ L とし、試料溶液とキャリアーが混和する条件を検討した。2 液の混合を調整するためには、互いが接触する時間と面積が重要となる。これはすなわち、試料注入装置と MS/MS 装置を連結するチューブの長さとその内径の調整を意味している。そこで、種々の異なる長さとお内径のチューブを用いて防かび剤の標準溶液を分析し、得られる選択反応検出(MRM)プロファイル上のピーク面積とその強度及びピーク形状を比較検討した。その結果、長さ 100 cm, 内径 0.5 mm のチューブを使用したとき、得られるピークが最も満足できる面積、強度、形状を示したことから、この長さ、内径のチューブを使用することとした。

2. 内部標準物質の選択

FI-ESI MS/MS を用いて精度良く定量分析を実施するためには、内部標準物質を用いることが有効である。内部標準物質としては、分子量以外の化学的性質がほとんど等しいことから、特に MS 分析においては、安定同位体が非常に優れている。そこで、3 種の防かび剤について市販の安定同位元素標識体を検索した。TBZ については $^{13}\text{C}_6$ 体が、IMA については d_5 体が共に粉末として市販されていたが、OPP については $^{13}\text{C}_6$ 体がヘキサン溶液としてのみ市販されていた。また、この溶液の濃度は約 100 mg/L と低かったことから、粉末として入手が可能であり、OPP と類似した性質を持つ、パラフェニルフェノール(PPP)の d_9 体を OPP

の内部標準物質として用いることとした。3 種の内部標準物質それぞれについての MS/MS 条件は、1-1 に従って同様に最適化を図った。これら 3 種の内部標準物質分析のための最適条件を Table 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

迅速分析法を確立するためには、試料の前処理法を可能な限り省略することが必要である。そこで、試料である柑橘類を塩基性下で脱水しつつ、酢酸エチルで 1 回抽出するのみとした。1 回抽出にすることで、大幅な前処理時間の短縮が可能となるが、抽出率の低下が懸念された。そこで、試料採取後直ちに内部標準物質を加え、これを補正することとした。本法においては、試料に含まれる使用基準値付近の防かび剤を精密に定量する必要があるため、内部標準物質は、それぞれの基準値に相当する量を添加した。

4. 検量線

柑橘類における使用基準値に相当する標準溶液(TBZ, OPP : 1 mg/L, IMA : 0.5 mg/L)を分析したときに得られるプロファイルを図 2 に示した。3 種の防かび剤とそれぞれの内部標準物質は、6 つのプロファイル上に質量分離されて良好な感度で検出された。

検量線は、各防かび剤の MRM プロファイル上に検出されるピークの面積とそれぞれの内部標準物質のピーク面積との比を用いて作成した。その結果、TBZ と OPP は 0.4 ~ 10 mg/L の範囲で、IMA は 0.2 ~ 5 mg/L の範囲で良好な直線性を示した($r > 0.999$)。これらの濃度範囲は、実試料中の濃度に換算すると使用基準値の 1/5 の低濃度から 10 倍の高濃度と広範囲に相当することから、本法の目的にかなうものと考えられた。

5. 添加回収実験

市販のレモン、オレンジ、グレープフルーツを用いて本法による添加回収実験を実施した。得られた結果を Table 2 に示したが、使用基準値に相当する TBZ(10 mg/kg), IMA(5 mg/kg), OPP(10 mg/kg)を添加した場合の回収率は 77.2 ~ 101.4 %, 変動係数は 0.69 ~ 4.20 %であった。また、基準値の 1/2 量を添加した場合の回収率は 61.9 ~ 112.4 %, 変動係数は 0.73 ~ 8.36 %であった。レ

モンにこれら 3 種の防かび剤を基準値相当量添加したときに得られた MRM プロファイルを、防かび剤を全く添加しなかったブランク試料のプロファイルと共に Figure 3 に示した。防かび剤を添加した試料からは、添加した 3 種の防かび剤とそれぞれの内部標準物質が 6 つのプロファイル上に明瞭なピークとして観察された。また、防かび剤を添加しなかったブランク試料からは、内部標準物質のみが良好に検出され、定量を妨害する物質は検出されなかった。以上のことから、本法の有用性が確認された。

D. 結論

フローインジェクションにより導入された試料は、高い選択性を有する MS/MS により質量が分離されて検出されることから、柑橘類中の TBZ, IMA 及び OPP を同時分析することが可能となった。本法は、試料抽出液の精製操作を必要とせず、サンプリングから結果を得るまでの分析所要時間が僅か 15 分程であることから、食品衛生行政の現場などにおいてこれら防かび剤の迅速スクリーニング法として非常に有用と考えられた。

E. 参考文献

- (1) Food Sanitation Law, Article No. 7, Law No. 233, December 24 (1947), Standards or Requirements of Foods or Additives, Ministry of Health and Welfare Notification as of April 17th, 1997.
- (2) Matsumoto, H. *J. AOAC. Int.* 2001, 84, 546-550.
- (3) Fernandes, M.; Rodriguez, R.; Pico, Y.; Manes, J. *J. Chromatogr. A* 2001, 912, 301-310.

- (4) Yamazaki, Y.; Ninomiya, T., *J. AOAC. Int.* 1999, 82, 1474-1478.
- (5) Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Hayakawa, J.; Kagami, T., *J. Chromatogr. A* 1998, 810, 81-87.
- (6) Chatani, Y.; Chitamoto, T.; Munehisa, M.; Adachi, T.; Komatsu, M., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 1996, 37, 187-194.
- (7) Nakazato, M.; Ogawa, K.; Tadano, H.; Ushiyama, H.; Kawai, Y.; Kobayashi, T.; Tateishi, Y.; Tamura, Y., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 1995, 41, 392-397.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

安定同位体を用いた柑橘類中のチアベンダゾール、イマザリル及びオルトフェニルフェノールのスクリーニング法:伊藤裕子, 後藤智美, 岡尚男, 松本 浩(愛知衛研), 高橋伸之, 中澤裕之(星薬大), 日本食品衛生学会第 82 回学術講演会, 平成 13 年 10 月, 長崎.

2. 論文

現在執筆中.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. Compound-Specific ESI MS/MS Parameters for the Fungicides and the Corresponding Internal Standard

Analyte	Precursor ion (m/z)	Monitor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Ion mode (ESI)
Thiabendazole	202 ([M+H] ⁺)	131	40	40	+
Thiabendazole- ¹³ C ₆	208 ([M+H] ⁺)	181	40	40	+
Imazalil	297 ([M+H] ⁺)	159	35	25	+
Imazalil-d ₅	302 ([M+H] ⁺)	159	35	35	+
<i>o</i> -Phenylphenol	169 ([M-H] ⁻)	169	35	10	-
<i>p</i> -Phenylphenol-d ₉	178 ([M-H] ⁻)	178	45	10	-

Table 2. Recoveries of thiabendazole, imazalil and *o*-phenylphenol from citrus fruits

Sample	thiabendazole			imazalil			<i>o</i> -phenylphenol		
	Added (mg/kg)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Added (mg/kg)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Added (mg/kg)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)
Lemon	10	101.4	1.71	5	100.7	0.96	10	100.6	0.73
	5	103.0	1.65	2.5	99.1	1.28	5	95.8	8.36
Orange	10	100.6	0.69	5	100.4	1.78	10	96.0	1.71
	5	100.8	0.73	2.5	112.4	1.24	5	70.3	3.39
Grapefruit	10	100.5	1.22	5	100.4	1.45	10	77.2	4.20
	5	103.2	1.28	2.5	101.0	1.92	5	61.9	3.64

^a Average of 5 trials. ^b Coefficient of variation.

Sample 5 g

add I.S. ethyl acetate solution
(50 mg/l of IMA-d5 and
each 100 mg/l of TBZ-¹³C6 and PPP-d9) 0.5 ml
anhydrous Na₂SO₄ 20 g
and anhydrous Na₂HPO₄ 1.5 g
homogenize with ethyl acetate 50 ml
centrifuge at 3,100 rpm for 8 min

Ethyl acetate layer

make up to 50 ml with ethyl acetate

FI-ESI MS/MS

1 μl inj.

Scheme 1. Analytical procedure of thiabendazole, imazalil and *o*-phenylphenol in citrus fruits

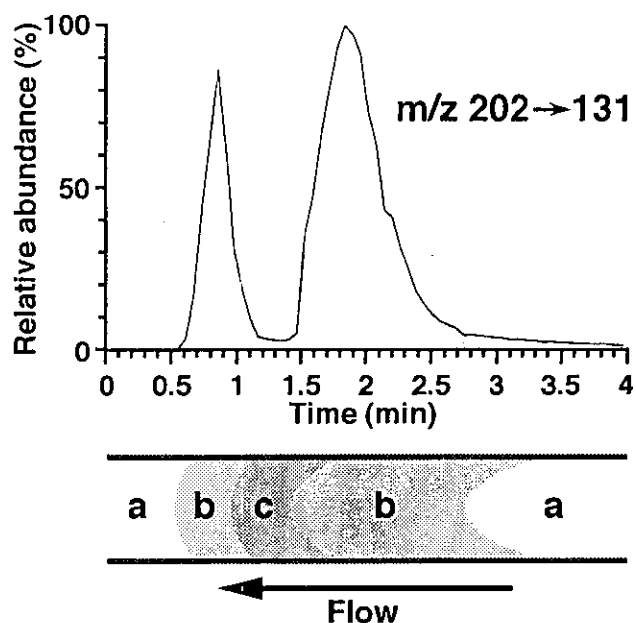


Figure 1. MRM profile of thiabendazole under FI-ESI MS/MS conditions and corresponding schematic representation of tube inside. Operating conditions, tube size: 100 cm x 0.5 mm i.d.; injection volume: 100 μ l; others: see Experimental section. (a) Carrier liquid, (b) sample solution and carrier liquid, (c) sample solution.

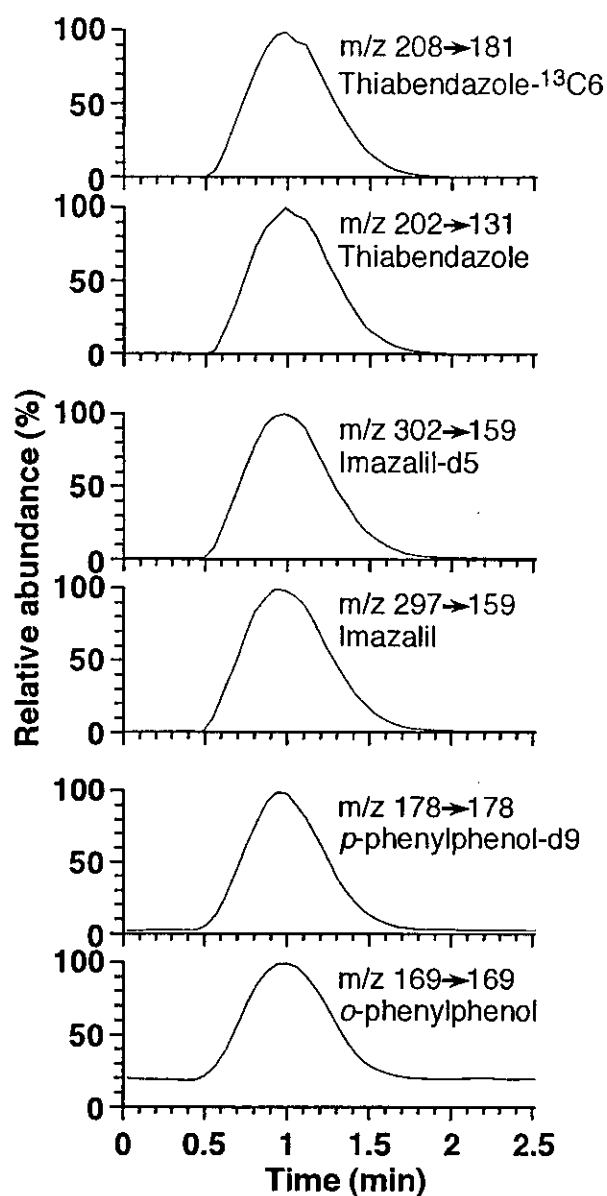


Figure 2. MRM profiles of the standard fungicides under FI-ESI MS/MS conditions.

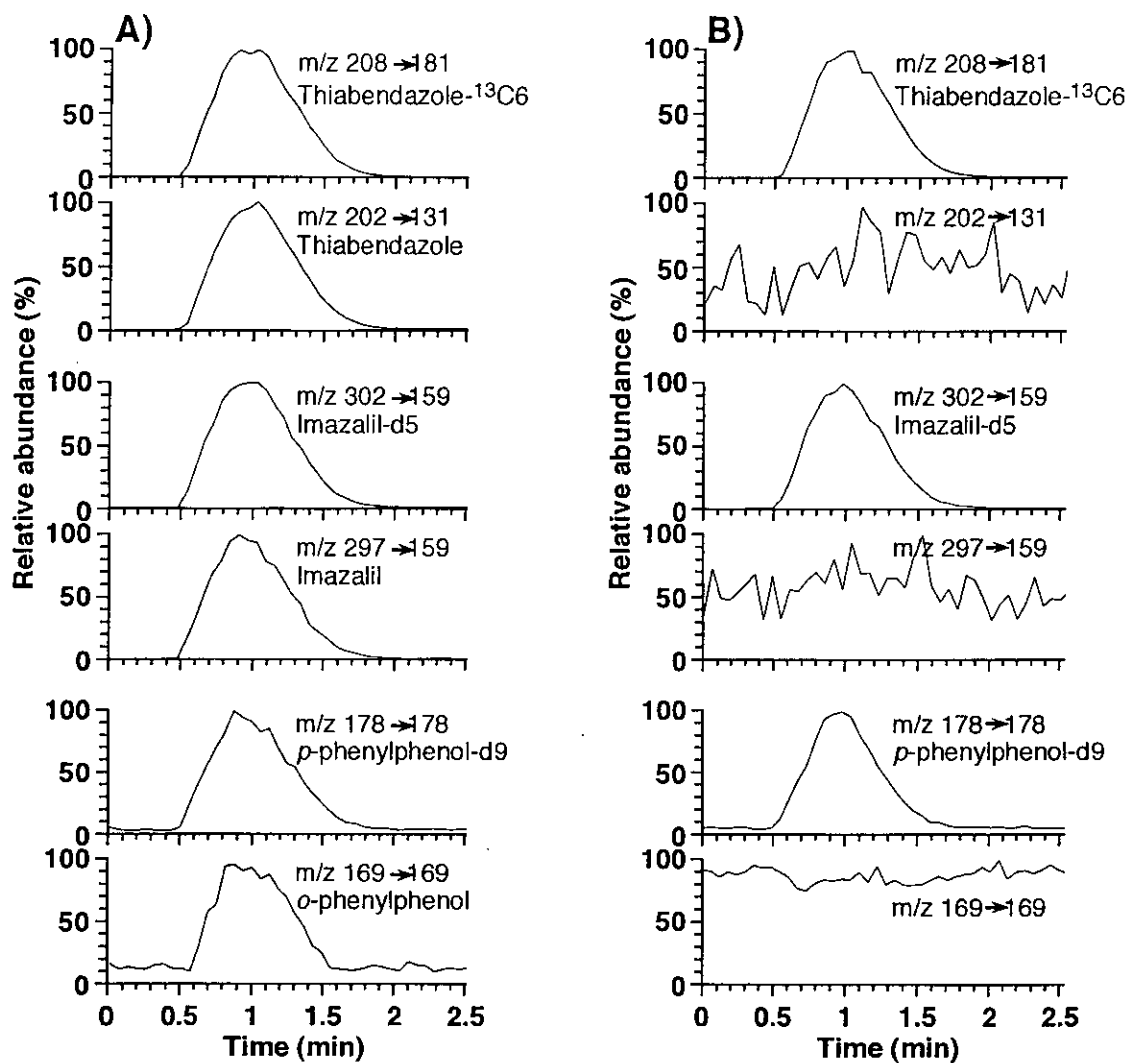


Figure 3. Typical MRM profiles of lemon samples under FI-ESI MS/MS conditions. (A) Fortified at 100 mg/kg of TBZ and OPP and 50 mg/kg of IMA; (B) Lemon (control).

分担研究報告書

LC/MSによる残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

分担研究者 外海 泰秀

(国立医薬品食品衛生研究所大阪支所)

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による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究
柑橘類中のN-メチルカルバメート系農薬21種及び
それらの代謝物12種のジクロロメタン不使用同時分析

分担研究者 外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 食品試験部長

研究要旨

柑橘類中のN-メチルカルバメート(NMC)系農薬21種及びそれらの代謝物又は異性体12種を、ジクロロメタンを用いずに同時に定量する方法を検討した。レモン、オレンジ、グレープフルーツ各20gをアセトン抽出、次いで酢酸エチルで再抽出し、Supelclean ENVI-Carb及びMega Bond Elut SAXの2種のミニカラムを組み合わせて精製した。NMCはポストカラム反応蛍光検出HPLC(以下HPLC)で定量した。オレンジを試料とした場合は、すべてのNMCについて妨害ピークの影響を受けずに測定することができたが、レモン及びグレープフルーツでは、それぞれ8種または10種のNMCについて妨害ピークとHPLCの保持時間が一致し、正確な定量値が得られなかった。これらの組み合わせについては、LC/MS(SIM)を用いて定量した。その結果、ほとんどの場合に試料由来の妨害成分の影響を受けることなくNMCの定量ができた。HPLCとLC/MSの双方で定量したNMC(83例)について定量値の一致度を計算した結果、 $R^2=0.9178$ とよく一致していた。添加回収率(0.1 μ g/g添加)はプトキシカルボキシム等一部のNMCを除き、60.1~97.8%であった。HPLCにおける検出下限値は大多数について試料中0.005 μ g/gであった。LC/MSにおける検出下限値は対象化合物によって異なっていたが、HPLCと同等程度のものが多かった。

研究協力者

石光 進 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
津村ゆかり 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
吉井公彦 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

A. 研究目的

N-メチルカルバメート(NMC)系殺虫剤はコリンエステラーゼ阻害作用を有し、世界各国において多種類の化合物が実用化されている(Fig.1, Table 1)。また、アルジカルブ、エチオフェンカルブなどのチオエーテル基を有するカルバメート系農薬は、散布後農作物中でそれぞれ対応するスルホキシド及びスルホン(Fig.1)に酸化される。これらの代謝物は親化合物と同等以上の生物活性を持つことが知られており、代謝物も含めた分析が必要である。これらも含めると、分析対象となりうるNMCの数は非常に多い。

ポストカラム反応蛍光検出HPLCはNMCを加水分解後蛍光誘導体化して定量する方法であ

り、永山ら¹⁾及び著者ら²⁾が改良を行って厚生労働省の告示分析法中「アルジカルブ等試験法³⁾」及び「メチオカルブ試験法⁴⁾」に採用されている。この方法は感度が高く実用的に優れているが、排水基準が厳しく廃液処理コストが高いジクロロメタンを抽出溶媒として使用していること、また、柑橘類の分析においては蛍光性の夾雑物の影響で測定できないNMCがあることが欠点である。

永山らは後者の欠点を、3種類のミニカラム(ENVI-Carb, Bond Elut PSA, Bond Elut SAX)を連結して精製する方法によって解決した⁵⁾。一方著者らは、柑橘類以外の農作物についてジクロロメタンを用いない精製法を開発した⁶⁾。

本研究の目的は、この両者の研究成果を合わせることで、柑橘類についてもジクロロメタンを用いずにNMCを定量する方法を開発することである。

ポストカラム反応蛍光検出のみでは妨害ピークの影響を完全に回避することは困難と考えら

れたため、定量には液体クロマトグラフ-質量分析法(LC/MS)を併用することとした。LC/MSは近年 NMC の分析にも用いられるようになったが、感度や再現性の点でポストカラム反応蛍光検出より劣るとして、スクリーニング法または確認法として位置づけている報告が多い^{7, 8)}。しかし、LC/MS の技術面の進歩は著しく、当初のサーモスプレーイオン化法から大気圧イオン化法(API)が主流となっており、さらに最近ではエレクトロスプレーイオン化法(ESI)が広く用いられるようになった。現時点で使用可能な最新の機器を用いた場合に、どの程度信頼性のある測定値が得られるかを検証することも、本研究の目的である。

なお、以下の本文ではポストカラム反応蛍光検出 HPLC を、LC/MS との対比で単に HPLC と記述する。また、酸化代謝物があるブトカルボキシム、アルディカルブ、エチオフエンカルブ、チオフアノックス、メチオカルブは、それぞれのチオエーテル基に付加した酸素の原子数に応じて頭文字に数字を付けて、親化合物を B0、スルホキシド体を B1、スルホン体を B2 のように略記した。(Table 1)

B. 研究方法

1. 試料

添加回収試験用の柑橘類(レモン、オレンジ、グレープフルーツ)は大阪市内の小売店で購入した。

2. 農薬及び農薬代謝物標準品

日本バイエルアグロケム、林純業工業(株)、和光純業工業(株)、Accu Standard Inc., Dr.Ehrenstorfer GmbH, Riedel-de-Haenの農薬分析用標準品を用いた。これらの標準品は約20mgを正確に量り採ってメタノールに溶解し、正確に20mLとして標準原液とした。

3. 試薬

溶媒類は残留農薬分析用又は HPLC 用、その他の試薬は特級品を用いた。

Sep-Pak[®] Plus NH₂: ウォーターズ製

Supelclean ENVI-Carb: スペルコ製, 0.25g, 3 mL

Bond Elut PSA: バリアン製, 500mg, 3mL

Mega Bond Elut SAX: バリアン製, 1g, 6mL

メンブランフィルター: 日本ミリポア工業(株)

コスモナイスフィルター W (0.45 μ m, 13mm id)

4. 2連結ミニカラムの前処理

Supelclean ENVI-Carb及び Mega Bond Elut SAXのそれぞれについて、アセトン 20mL、次いでヘキサン 10mL を通過させる。その後 ENVI-Carb の出口側に SAX を連結する。

5. 試験液調製方法

柑橘類を磨砕した試料 20.0g をとる。これにアセトン 100mL を加えて3分間ホモジナイズしてろ過する。残さにアセトン 50mL を加え、再度ホモジナイズしてろ過し、ろ液を合わせる。ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、アセトンを除去する。ここに塩化ナトリウム 2.5g を加え、酢酸エチル 100mL で3回、各5分間振とう抽出する。有機層を分取して合わせ、無水硫酸ナトリウム 20g を加えて15分間放置して脱水し、減圧濃縮して約1 mL とし、窒素気流を吹き付けて乾固させる。これにアセトンを加えて溶解し、全量を2mL とする。この0.5mL を2連結カラムに負荷し、下端から吸引して ENVI-Carb 内の溶媒を抜く。続いて、流速を0.5mL/min に保ちながら、① 5%アセトン/ヘキサン 15mL, ② 10%アセトン/ヘキサン 15mL, ③ 20%アセトン/ヘキサン 15mL を通過させ、ENVI-Carb をはずして④ 50%アセトン/ヘキサン 15mL を通過させる。[①+②], ③, ④をそれぞれ減圧乾固し、残留物に500 μ L のメタノールを加えて溶解する。その200 μ L を採り、1%酢酸2 mL を加え、メンブランフィルターでろ過して試験溶液とする。

以上の方法は Scheme 1 に示した。減圧濃縮時の水浴温度は40 $^{\circ}$ C とした。

6. 添加回収試験

標準原液を A ~ C の3グループ(Table 1)に分けて混合し、メタノールで希釈して、添加回収用の標準混液とした。濃度はチオフアノックス 10 μ g/mL, それ以外の NMC は2 μ g/mL とした。添加用混液 1 mL を試料に添加後30分間放置して抽出を開始した。

7. HPLC 及び LC/MS 条件

Table 2 -1,2 に示した。

C. 結果及び考察

1. HPLC 条件

ポストカラム反応蛍光検出 HPLC の条件については、前報⁶⁾から変更した点はなく、Fig. 2 に示した通りのクロマトグラムが得られた。ただし、LC/MS のイオン源部を損傷しないために、試験溶液の希釈に塩酸溶液を用いるのを避け、酢酸水溶液を用いたことから、アミノカルブはピークがブロードになった。この化合物は窒素原子に3つのアルキル基が結合したトリアルキルアミンの形であり、塩基性の性質を持つため、酢酸イオンと何らかの相互作用をするのではないかと考えられた。アミノカルブは塩酸水溶液として測定する必要があった。

また、前報⁶⁾に述べたとおり、この方法では、分析操作中に混合溶液 B 中の T0 から生成する T1 は E1 と、混合溶液 C 中の M0 から生成する M1 は T2 と保持時間が一致するため、Table 2-1 の Operating parameters II の HPLC 条件で再度注入して定量した。

HPLC での繰り返し注入における保持時間の変動係数は Table 3 に示したとおり 0.04 ~ 0.11%、ピーク面積の変動係数は 1.4 ~ 4.0 % であり、再現性は良好であった。

2. LC/MS条件

ポストカラム反応蛍光 HPLC において妨害ピークと重なって測定できなかった NMC 及びそれらと保持時間が近い NMC を 13 種類選んで、LC/MS による定量を行った。その際用いた測定イオンは Table 1 に示した。一つの NMC について、測定イオンは必ずしも毎回同じではなかった。例えばある日の M1 の測定には質量数 185 が最適であったが、別の日には 242 の方が強度が大きく最適であった。このような変化の理由は、質量分析計の状態（真空の到達度やイオン化室の汚れの程度）が測定日ごとに微妙に異なっており、コンピュータがその状態に合わせて自動的に装置のチューニングを行うためと考えられる。異なるチューニング状態で得られるマススペクトルは、同じ物質であっても各質量ピークの相対強度が異なる場合がある。このために、測定日によって最適なモニターイオンが異なる結果になったものと考えられる。

従って、最初に個々の化合物のマススペクトルを取って測定イオンを決める際に、各物質について一つではなく3通り以上の質量数を選ん

で測定条件ファイルに設定しておき、データ解析の段階で各測定日の最適なイオンを選ぶことで、より高い感度を得られた。

なお、同一のチューニング状態における一連の測定内では、ピーク強度が著しく変化することはなかった。LC/MS における標準溶液のクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

今回の研究で LC/MS を使用し始めた時点では、得られた測定値の変動が大きく、HPLC よりも信頼性が低いのではないかと考えられた。しかし、同じ条件での操作を継続する間に、測定値の変動は少なくなっていた。これは、時間経過に伴って真空状態が安定するなど機器の状態が良好になったためと考えられる。

安定した結果が得られるようになった時点では、繰り返し注入における保持時間の変動係数は Table 3 に示したとおり 0 ~ 0.11%、ピーク面積の変動係数は 1.8 ~ 3.1 % であり、再現性は HPLC と同程度であった。

3. ジクロロメタンを酢酸エチルで代替した場合の抽出効率

塩化ナトリウム水溶液に NMC を添加し、酢酸エチルで抽出して、どのような抽出条件が最適か検討した。結果を Table 4 に示した。アルディカルブスルホキシド(A1)の回収率が低いのは抽出効率が低いためであり、水層の量を少なく、有機溶媒の量を多くすれば9割程度回収されることがわかった。また、塩化ナトリウム濃度は20%程度必要と考えられた。

4. Bond Elut PSAを通過させた場合の回収率低下

永山らの報告⁵⁾では ENVI-Carb, Bond Elut PSA, Bond Elut SAX の3種のカラムを連結して用いて優れた精製効果を得ている。著者らもこれらのカラムを個別に検討したが、Bond Elut PSA に NMC を通過させると M2 の回収率が著しく低く、M1 の回収率も若干低くなった。違うロットナンバーの製品各3試行で検討した結果を Table 5 に示した。いずれの場合も、M2 の回収率は ND ~ 37.8 % であり低かった。

Sep-Pak NH2 でも同様の回収率低下が観察されたが、Table 6 に示したとおり、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)を添加すると抑制することができた。しかし Bond Elut PSA による回収率低下は、Table 7 に示したとおり、MPA を