

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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大阪支所 食品試験部 外海泰秀

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了
愛知県衛生研究所 生活化学部 岡 尚男

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

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

- 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----- 7
- 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)昇温気化注入法を用いたGC大量注入法の検討----- 31
(2)スターラーバー抽出(SBSE)法を用いた残留農薬スクリーニング分析法の検討---
(3)GC-AEDを用いる残留農薬分析の効率化と精度向上-----

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 外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 大阪支所長

研究要旨

本研究では残留農薬基準のポジティブリスト制への移行に伴う行政検査のニーズに適する農薬試験法の開発を目的として、平成13年度より3ヶ年計画で、以下の3課題の研究を実施している 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」では、双方向向流クロマトグラフィーとタンデムマススペクトロメトリーを直接接続した装置により、植物油、柑橘類及び葉菜中のメソミル、フェノカルブ、カルバリルの迅速な分析法を開発した。コーン油及びゴマ油に3種農薬を1及び0.5 mg/kgの濃度で添加したときの回収率は98-106 %、変動係数は1.3-4.7 %であった (n=5) また、温州ミカン及びホウレン草に0.1及び0.05 mg/kgの濃度で添加したときの回収率は88-108 %、変動係数は1.9-4.6 %であった 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、植物油で約5分、温州ミカンとホウレン草で約20分程度であった

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」では、LC/MS による農薬一斉分析確立を志向し、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いる質量分析検出及び農薬分離に適した分析条件（基本条件）を選定し、270 種の農薬を分析した。各分析データは、スペクトルスコピックアプローチ（検出・感度・定性）、クロマトグラフィックアプローチ（分離・定性）により解析し、ESI-LC/MS 法による分析が可能か否かの判断を行った 全分析農薬数 270 成分中、検出可能農薬 229 成分、良好なピーク分離が期待できる農薬 198 成分、逆相系固相抽出法により濃縮・前処理が期待できる農薬 172 成分であることが判明した 全ての分析データは、マスキングクロマトグラフ及びマススペクトルをまとめデータ集（電子資料）を作成した

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」では、第1には昨年度に確立した昇温気化-大量注入 (PTV-LVI) 法における試料マトリックスの影響について検討したところ、本法は従来のスプリットレス注入法よりも試料マトリックスの影響を受けにくいことが分かった。また、様々な農薬約 160 種類を用いて、スターラーバー抽出 (SBSE) 法の抽出効率に影響を与える因子について検索を行うとともに、抽出条件並びに測定時の熱脱着 (TD) -GC/MS の最適化を行った その結果、SBSE 法は極性の高い農薬に対して抽出効率が低く適用できないほか、熱分解しやすい農薬に対しては測定に際して注意が必要であるが、それ以外の大多数の農薬に対しては良好な結果が得られた

第2には、GC-AED と ECD の検出器の違いによる測定結果の違いを比較した結果、AED に比して ECD ではより高い検出値が導かれることが多い傾向が観察された 次に、比較的妨害成分の多いカモミールの抽出液について、クロルピリホスを試料中濃度で 0.05ppm となるように添加し、AED（ターゲット元素 塩素、硫黄、リン）、ECD、FPD 及び NPD を用いて測定し、得られたクロマトグラムを比較したところ、AED（塩素）以外の検出では、いずれも妨害成分の影響を受け、定量が困難であった。

分担研究者名

外海泰秀 国立医薬品所食品衛生研究所 大阪支所
食品試験部長（兼任）
根本 了 国立医薬品所食品衛生研究所
食品部 主任研究官
岡 尚男 愛知県衛生研究所
生活化学科長

A. 研究目的

食品衛生法に定める農薬の食品残留基準値は、現在 229 農薬、136 農作物に設定されており、より効率的で信頼性が高いスクリーニング法の開発と新技術を導入した告示試験法の簡易化が求められている。本研究では新スクリーニング法の開発と告示個別分析への新手法の導入を目的として平成 13 年にスタートした。しかし、平成 15 年 5 月の食品衛生法の改正で今後 3 年を目途として基準値のポジティブリスト制の導入が決定されたことにより、基準値数はさらに増加して対象農薬数は約 700 に達し、対象食品は動物性食品や加工食品にも拡大される。このような背景を勘案して多種農薬を一斉分析するには、検出の万能性及び選択性という相反する検出能力を持つ質量分析検出(GC/MS, LC/MS, MS/MS)が必須と考えられる。新技術を導入して多数農薬の簡易化スクリーニング法を確立するために、残留農薬分析の効率化と精度向上を目指す本研究の重要性はさらに増大した。

課題 1 の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(MS/MS)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では、新技術として双方向向流クロマトグラフィー(Dual CCC)を用いて効率的な精製を行い、フローインジェクション MS/MS により農薬を一斉分析する方法について検討した。Dual CCC は液体の固定相を用いるため、農薬の固定相への不可逆的な吸着を起こさず、互いに混じり合わない二液層を逆方向へ流すため、分離能が格段に向上する新しい方法である。

課題 2 の 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では、農作物中残留農薬の一斉分析法として LC/MS を検討した。厚生労働省告示試験法では、LC/MS は主に確認試験で用いられているが、適用対象農薬はまだ少なく、それらのほとんどが個別分析である。また、昨年度の研究を含め LC/MS を利用した農薬分析応用例は増加傾向にあるが、不特定多数の農薬を対象とした場合、基本的な前処理および分析条件を用いた場合に、どの農薬が分析可能か否かを見極め、農薬分析の効率化をはかる必要がある。LC/MS の代表的な分析条件(基本条件)を用い、多数の農薬に対して基本条件での LC/MS 分析を実施し、保持時間、ピーク形状、検出極性および検出イオン質量数などを評価し、農薬一斉分析の確立に有益な情報を検索した。

課題 3 の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では、昨年までは超臨界流体抽出(SFE)や昇温気化(PTV)GC 大量注入(LVI)法を農薬分析へ導入するため、操作条件としての各種パラメーターを検討してきた。本年度は PTV-LVI 法における試料マトリックスの影響について検討すると共に、液-液分配の原理を応用した抽出法であるが、固定相量が固相マイクロ抽出法よりも多いスターラーバー抽出(SBSE)法を検討した。また、その他の新しい手法として GC/ECD あるいは S フィルターを装着した GC/FPD 測定では妨害が多いネギ類、きこの類等含硫黄作物中の有機塩素系及び含硫黄農薬を GC/AED (原子発光検出器付き GC) で簡易に検出・定量する方法について検討し、他の検出器との優劣を比較した。

B. 研究方法

課題 1 植物油、柑橘類及び葉菜類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリルについて、本年度は Dual CCC と MS/MS を直結することにより、更に効率的で迅速な分析法の開発を試みた。

課題 2 およそ 270 種農薬に対して基本条件での LC/MS(ESI)分析を実施した。また、保持時間、ピーク形状、検出極性及び検出イオン質量数などの情報を検索し、どの程度の農薬が LC/MS で分析可能かを見極めた。

課題 3 約 160 農薬について昇温帰化-大

量注入(PTV-LVI)法における試料マトリックスの影響について検討した。また、スターラー抽出(SBSE)法を用いたスクリーニング分析法を確立するために、SBSEによる農薬の抽出条件及び測定時におけるGC/MSへの導入条件について検討した。

これと併行して、分子内に塩素または硫黄を含有する農薬32農薬について、GC-AEDを用いた検出条件及び検出感度を調べた。実試料を用いた添加回収試験を実施すると共に、ECD, FPD, FTD 及び AED の特性を比較した。

C. 結果及び考察

課題1 昨年度の試料精製に用いた Dual CCC は、大量分取用に開発された大型カラムであったため、本年度は分析用に開発されたディスク型カラムを使用した。また、二相溶媒のうち分析対象農薬の溶出する下層溶媒が直接質量分析計に導入されるため、農薬のイオン化を促進する溶媒を検討した。その結果、n-ヘキサン及び0.1%ギ酸を含むアセトニトリルの二相が最適であった。

次に、この二相溶媒で分析対象農薬を溶解したときの二相間の濃度比を求め、各農薬の溶出位置、分離状態を推測し、二相溶媒それぞれの流速を上層2 ml、下層1 mlとし、MS/MSの導入時にスプリットさせることとした。その結果、検量線は0.05から1 ppmの範囲で良好な直線性を示した($r > 0.999$)。これらの結果を基に抵抗管、回転数など Dual CCC 条件及び MS/MS 条件を最適化した。コーン油及びゴマ油に3種農薬を1及び0.5mg/kg 添加したときの回収率は98-106%、変動係数は1.3-4.7%であった(N=5)。

課題2 LC/MSを用い、農薬分析に適した分析条件(基本条件)を選定し、270種農薬を分析した。各分析データは、スペクトルスコピックアプローチ(検出・感度・定性)、クロマトグラフィックアプローチ(分離・定性)により解析し、ESI-LC/MS法による分析が可能か否かの判断を行った。全分析農薬数270成分中、検出可能農薬229成分、良好なピーク分離が期待できる農薬198成分、逆相系固相抽出法により濃縮・前処理が期待できる農薬172成分であることが判明した。全ての分析データは、マスクロマトグラフおよびマススペクトルをまとめデータ集(電子資料)を作成した。

課題3 昨年度はPTVを用いたGC大量注入法についてGC/MSを用いて検討した。約130農薬を用いて注入条件の最適化を行い、従来の十倍以上の試験溶液を注入可能な方法を確立した。本年度は確立したPTV-GC大量注入法における試料マトリックスの影響について検討し、本法が従来のスプリットレス注入法よりも試料マトリックスの影響を受けにくいことを明らかにした。

またSBSE法については、まず抽出後のGC/MSへの導入条件として脱着温度、捕集温度等について検討した。ついでSBSEの抽出効率に影響を与える因子について検索を行うとともに、抽出条件の最適化を行った。その結果、SBSE法は極性の高い農薬に対して抽出効率が低く適用できないほか、熱分解しやすい農薬に対しては測定に際して注意が必要であるが、それ以外の大多数の農薬に対しては良好な結果が得られた。

これと併行して、GC-AEDを用いる試験法の検討では、32農薬をネギ類、きのこと類の実試料に0.1 ppm 添加し、フロリジルミニカラムを用いて簡易に精製したところ、塩素をターゲット元素にしてほとんどの農薬を検出することができ、試料中の硫黄成分の影響は見られなかった。添加回収試験による回収率は、殆どの農薬で60~114%であった。ECDでは、AEDに比較して14~23倍の測定値が得られる場合が見られた。

比較的妨害成分の多いカモミールの抽出液について、クロルピリホスを試料中濃度で0.05ppmとなるように添加し、AED(ターゲット元素 塩素、硫黄、リン)、ECD、FPD及びNPDを用いて測定し、得られたクロマトグラムを比較したところ、AED(塩素)以外の検出では、いずれも妨害成分の影響を受け、定量が困難であった。

D. 結論

1) 分析用のディスク型カラムを用いたDual CCCと高い選択性を有するMS/MSを直接連結した装置による、メソミル、フェノブカルブ、カルバリルの迅速な分析法を開発した。本法では試料精製の必要がなくサンプリングから分析結果を得るまでの所要時間は、植物油で5分程度、農作物で20分程度であった。また、Dual CCCでは、一般のカラムクロマトグラフィーのように農薬と測定妨害物質が同じ出口か

ら溶出することがないので、妨害物質の溶出時間を全く考慮する必要がない。これらのことから、このDual CCC-MS/MS装置を用いた分析法は、多数の試料を連続して分析できる有用な方法であると考えられる。

2) 農薬の一斉分析はもっぱらGC/MSが用いられるが、キャピラリーガスクロマトグラフの高分離能および質量分析計の高選択性をもってしても、広範かつ多数のポンティブリスト対象農薬を分析するのは非常に難しくなっている。また農薬自体もより分解性が高く、しかも残留しにくいものへと変わりつつあるため、GC/MSで分析困難な農薬が増える傾向にある。農薬の性質に応じてGC/MSとLC/MSのどちらの手法がより簡便にかつ正確に分析できるか見極め、発展させる必要性を痛感する。今回の研究はその初期段階のもので、LC/MSの分析能力を正しく認識する一助となる。

また、LC/MSはイオン化法の性質上、マスペクトルのみで化合物を定性することは非常に困難である。LCおよびMS個々の分析装置の弱点を相補った装置であるLC/MSでは、定性情報として保持時間(相対保持時間)のクロマト情報および分子イオン種のパターンなどを考慮することで、定性能力を高めることが可能である。もちろん、この情報は移動相条件により大きく影響を受けるため、同一移動相およびグラシエント条件を利用することが必要条件となる。

本研究は、ある基本的な分析条件を定めて多くの農薬が分析できるか否かを確認し、それが実際の分析に利用可能かどうかの判断材料として非常に有益なものと考えている。また、クロマトグラフィーの定量は標準物質なしで行うことは不可能であるか、定性ではマスペクトルから得られる分子量情報、確認される分子イオン種のパターンおよび保持時間(相対保持時間)情報を用いることで、同定精度が上げられる。

3) PTV-LVI法はスプリットレス注入法より、溶媒STDとマトリックスSTDとの面積差が小さくマトリックス効果を受けにくかった。スプリットレス注入では、起爆注入により大きな補正効果が認められたが、その場合でもPTV-LVI法よりマトリックスSTDとの面積差が大きかった。PTV-LVI法においても起爆注入を行った方がより溶媒STDとマ

トリックスSTD間の面積差がなくなり補正効果が見られた。PTV-LVI法はキャピラリーGC測定において、スプリットレス注入法よりも試料マトリックスの影響を受けにくいことがわかった。

これらのことから、PTV-LVI法を用いることにより、濃縮操作を簡略化して試験溶液の調製時間の短縮が図れるとともに、定量に溶媒STDを用いた場合でも試料マトリックスの影響を抑えてより正確な定量が可能となり、分析精度の向上が期待できる。

また、SBSE法は極性の高い農薬に対して抽出効率が低く適用できないほか、熱分解しやすい農薬に対しては測定に際して注意を要するが、それ以外の大多数の農薬に対しては良好な結果が得られた。本法は、濃縮操作無しに、抽出液に攪拌子を入れて攪拌する簡便な操作のみで短時間で分析できるため、残留農薬分析の効率化が期待できる。

GC-AEDはECDに比してやや検出感度は劣るものの、選択性が非常に優れているため、硫黄成分を多量に含む試料(ネギ類、きのこ類)中の塩素を有する農薬の分析に有用であった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 津村ゆかり, 吉井公彦, 石光 進, 外海泰秀 HPLCによる柑橘類中のN-メチルカルバメート系農薬及びそれらの代謝物の含ハロゲン溶媒不使用同時分析, 食品衛生学雑誌, 43, 330-338(2002)

2) Y Ito, T Goto, H Oka, H Matsumoto, N Takahashi and H Nakazawa Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil and phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry, J Agric Food Chem, 51, 861-866(2003)

3) T Goto, Y Ito, H Oka, H Matsumoto, N Takahashi, H Nakazawa Simple and rapid determination of N-methyl carbamate pesticides in citrus fruits by electrospray ionization tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, 487, 201-209(2003)

4) K Yoshii, S Ishimitsu, Y Tonogai, K Arakawa, H Murata, and H Mikami Simultaneous determination of emamectin, its

metabolites, milbemectin, ivermectin and abamectin in tomato, Japanese radish and tea by LC/MS, J Health Sci, 50, 17-24(2004)

2 学会発表

1)吉井公彦, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀 農作物中のエマメクチン安息香酸塩及びその代謝物, アバメクチン, ミルベメクチン及びイベルメクチンのLC/MSによる迅速分析法, 日本食品衛生学会第85回学術講演会,

平成15年5月, 東京

2)立石恭也, 永山敏廣, 高野伊知郎ら 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(第2報), 日本食品衛生学会第85回学術講演会, 平成15年5月, 東京

3)村田英明 LC/MSによる農薬分析のポイント, 分析科学機器展付設 新技術説明会, 平成15年9月, 幕張

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

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

双方向向流クロマトグラフィーとタンデムマススペクトルメトリーを直接接続した装置により、植物油、柑橘類及び葉菜中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリルの迅速な分析法を開発した。コーン油及びゴマ油に1及び0.5 mg/kgの濃度で添加したときの回収率は98-106 %、変動係数は1.3-4.7 %であった(n=5)。また、温州ミカン及びホウレン草に0.1及び0.05 mg/kgの濃度で添加したときの回収率は88-108 %、変動係数は1.9-4.6 %であった(n=5)。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、植物油で約5分、温州ミカンとホウレン草で約20分程度であった。

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

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。食品衛生行政においては、食品の安全性を迅速に確保することが最重要課題であることを考慮して、ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用いた迅速分析法（平成9年4月）が作成されている。しかし、一般的な150種類の農薬に限定しても、検体の搬入から結果を算出するまでに3週間以上の時間と膨大な労力を必要としているのが現状であり、229農薬を迅速に分析することは、不可能に近い。従って、食品衛生行政の現場では、食品の安全性を確保するために簡便で信頼性が高く、効率的なスクリーニング法の開発が必要とされている。

我々は、上述の迅速分析法、或いはこれまで汎用されてきた分析法の問題点の1つとして、固体の固定相を用いたクロマトグラフィーを用いた試料精製法をあげ、これを解決すべく双方向向流クロマトグラフィー（Dual counter-current chromatography, Dual CCC）を前処理に用いた植物油及び柑橘類中のメソミル、カルバリル、フェノブカルブの分析法を報告している。この前処理法では、互いに混じり合わない二液相（アセトニトリルとn-

ヘキサン）を互いが逆方向になるように、それぞれ分離カラム内へ送液することにより、試験溶液中の農薬類がアセトニトリル相に、夾雑物質がn-ヘキサン相に移行し、別々の出口から溶出される。夾雑物質の溶出時間を全く考慮する必要がないため、多数の試料を連続して短時間のうちに精製することが可能である。今回、植物油、柑橘類及び葉菜類中のメソミル、カルバリル、フェノブカルブについて、このDual CCCをタンデムマススペクトルメトリー（MS/MS）と直接接続することにより、更に迅速な分析法の開発を検討した。

B. 研究方法

1 試薬

メソミル Riedel-de Haen社製
フェノブカルブ、カルバリル 和光純薬工業社製
メソミル-d3、フェノブカルブ-d3及びカルバリル-d7 林純薬工業社製
無水硫酸ナトリウム 残留農薬分析用、和光純薬工業製
その他の試薬はすべて特級試薬を用いた

2 試料

平成15年に愛知県内で収穫された温州ミカン及びホウレン草を用いた。コーン油、ゴマ油は日本薬局方品を用いた。

3 操作方法

3-1. Dual CCC-MS/MS条件

Dual CCC装置 分析用ディスク型カラム付き

プロトタイプモデル(Pharma-tech research社製、Figure 1)、MS装置 QUATTRO micro (Micromass社製)

移動相 アセトニトリル・n-ヘキサン・0.1%ギ酸水溶液(45:45:10)、上相,ヘッド側、下相,テイル側及び試料注入側
流速 1 ml/min(ヘッド側、MS/MS接続部で1/5スプリット)、1.8 ml/min(テイル側)、0.2 ml/min(試料注入側)

回転数 1200 rpm

試料注入量 20 ml

イオン化モード ESI(+)

デソルベーション温度 300°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

植物油は、試料1 gに内部標準液(各5 mg/kg、n-ヘキサン溶液)を0.2 ml添加し、n-ヘキサンで10 mlに定容した。その他の試料は、Scheme 1 に示した

C. 結果と考察

1 二相溶媒の検討

Dual CCCとMS/MSを直接接続することから、MS/MSに導入されるのは、二相溶媒のうち、分析対象農薬の溶出する下相溶媒である。使用するESI MS/MSでは、化合物によっては、導入される液体の組成によりイオン化効率が大きく変化することがある。このため、高感度に分析するには、イオン化を促進する溶媒系を選択することが有効である。著者らはこれまでの研究により、カルバメート系農薬をESI MS/MS分析するとき、5-10%程度の水と0.01%程度のギ酸を含んだ溶媒系を使用することが有効である知見を得ている¹⁾。また、昨年度の本研究において、n-ヘキサンとアセトニトリルを溶媒系として選択したDual CCCは、分析妨害物質となる油脂の除去に有効である知見を得ている。一方、CCCでは、溶媒が二相に分離することが必須条件であり、二相を試験管などの容器中で攪拌後、静置して分離するまでの時間(セッティングタイム)が短いほど溶媒系として適している²⁾。これらのことから、ヘキサン・アセトニトリル・0.1%ギ酸水溶液の二相溶媒系の組成比を変化させ、セッティングタイムを比較した。種々検討した結果、ヘキサン・アセトニトリル・0.1%ギ酸水溶液(45:45:10)のセッティングタイムが約20

秒と最も短かったことから、これを用いることとした。

なお、この溶媒系の下相溶媒がMS/MSに導入されるので、3種の農薬及び内標準物質をそれぞれ下相溶媒で希釈し、MS/MS条件(コロン電圧、コリジョンエネルギー)を最適化した(Table 1)。

2 流速の検討

昨年度用いたDual CCCは、大量分取用に開発された内容量約60 mlの大型のカラムであったため、今回、分析用に新たに開発されたディスク型カラム(内容量約10 ml、Figure 1)を用いることとした。このカラムの適正流速は、2液を合わせて3-4 ml/minとされている。一方、接続するMS/MSの許容流速は、0.2-0.3 ml/minまでとされている。そこで、二相溶媒のうち、MS/MSに導入される下相溶媒の流速を遅く、上相溶媒の流速を早くすることとした。CCCでは、化合物を溶解したときの二相間の濃度比(分配係数)により、その化合物の溶出位置や分離状態を推測することが可能である。2液の流速の比率は、2相間の容量比に等しいこととして、いくつかの容量比での各農薬の分配係数を測定した(Table 2)。その結果、下相溶媒の流速が0.75 ml/min以下では、フェノプロカルブが他の2つの農薬よりも遅く溶出することが明らかとなったため、2相溶媒の流速は上相2 ml/min、下相1 ml/minとし、MS/MSへの導入時にスプリットさせることとした。

3 試料注入方法の選択

昨年度使用したコイル型チューブカラムと同様に、今回使用したディスク型カラムでも、3カ所からの試料注入が可能であるため、これらをそれぞれ比較した。昨年度と同様に、下相溶媒導入ライン上にレオダイニンジェクターを設置した時、農薬分離ピークが拡散するため、検出感度が著しく低下し、カラムの中央部分にある試料注入用ラインを利用したとき、農薬分離ピークは良好であったものの、試料のコンタミネーションやデッドボリュームが問題となった。また、上相溶媒導入ライン上にレオダイニンジェクターを設置した時、農薬と測定妨害物質との分離が不十分であった。今回のカラムでは、カラム上の各ラインの位置を変更することができないため、試料注入用ラインでの問題点を解決することとした。最も有効かつ簡易で操作性の優

れた方法は、レオダイニンジェクターを利用することであるが、これを使用するためには、取り付けられたラインに液体が流れていることが条件となっている。ここで、試料を注入するときのみ液体を流すようポンプを作動させた場合、すなわち一時的にカラム内の流量が増加する場合、カラム内の二相溶媒の平衡状態が乱れることは昨年度の実験でも明らかである。そこで、二相溶媒の一部を常にこの試料注入用ラインからカラム内に導入し、平衡状態を得ることとした。二相溶媒のうち上相溶媒は試料抽出液（*n*-ヘキサン抽出液）と容易に混和することから、サンプルループ内の洗浄効果が高い。また、試料注入用ラインから導入する流量は、少ないほどカラム効率が上がるが、試料注入に時間を要する上、ピークが拡散する可能性が高い。そこで、流速0.2 ml/minで試料注入用ラインから、1.8 ml/minで上相溶媒導入ラインから導入したところ、ピーク形状及び測定妨害物質との分離が共に良好であったことから、これを用いることとした。

次に、試験溶液の注入量を5-30 mlと変化させて、ピーク形状及び感度を比較した。20 mlを注入して得られたピークが最もイオン強度が強く、また、データポイント数とピーク幅のバランスが良好であったため、これを注入量とした。

4 回転数及び抵抗管の調整

これまでの検討によりDual CCC-MS/MS装置は、概要図（Figure 2）のとおりとなった。二相溶媒をそれぞれ流した時、カラムが安定して長時間回転できる最高回転数は、1200 rpmであったことから、これを用いることとした。また、この装置及び回転数に合わせて上相溶媒捕集ラインに抵抗管を取り付け、カラム内で二相溶媒が平衡となるよう調整した。

5 添加回収実験

2種の植物油（コーン油及びゴマ油）にその濃度が1 mg/kg及び0.5 mg/kgとなるように農薬を添加し、添加回収実験を行った（*n*=5）。Table 3に結果を示すように、回収率は98-106%、変動係数は0.3-4.7%と非常に良好であった。このとき上相溶媒捕集液及び下相溶媒のうちMS/MSに導入されなかった液をそれぞれ濃縮し、Dual CCCの洗浄効果を確認した。各油につき、それぞれ添加試料10件と添加していない試料1件を連続して分析した後、各捕

集液を濃縮し目視により比較した。コーン油及びゴマ油、ともに上相溶媒捕集液を濃縮したのものには油状物質が残り、下相溶媒を濃縮したのものにはほとんど残渣はなかった。このことから、このDual CCCが油状物質の除去に非常に有効であることが確認できた。

次に農産物への応用として、温州ミカン及びホウレン草を試料とし、その濃度が0.1 mg/kg及び0.05 mg/kgとなるように農薬を添加して、添加回収実験を行なった（*n*=5）。それぞれの平均回収率と変動係数は、温州ミカン 96-108%、2.1-3.8%、ホウレン草 88-101%、1.9-4.6%であった（Table 3）。また、温州ミカンに農薬を0.05 mg/kgとなるように添加したときに得られたMRMプロファイル、農薬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。農薬を添加した試料からは、添加した3種の農薬とそれぞれの内部標準物質が明瞭なピークとして観察された。また、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、Dual CCC-MS/MSの有用性が確認された。

6 内部標準物質の数と回収率

先の添加回収実験により得られたMRMデータを用いて、内部標準物質の効果について調査した。コーン油に0.5 mg/kgとなるよう、温州ミカン及びホウレン草には0.1 mg/kgとなるよう農薬をそれぞれ添加したとき得られたデータについて、内部標準物質を使用しないで回収率を求めた。平均回収率と変動係数は、コーン油 106-110%、3.5-3.6%、ホウレン草 50-72%、3.4-7.1%、温州ミカン 23-53%、4.8-23%であった。これらの値をTable 3と比較すると、試料を希釈するのみでDual CCC-MS/MS分析するコーン油は、回収率、変動係数ともにTableの値との差は許容できる範囲であった。しかし、抽出操作のあるホウレン草と温州ミカンでは、全く許容できるものではなかった。内部標準物質は、MSのマトリックス効果を補正する他に、試料採取直後に添加することにより、抽出効率を補正する上でも大きな役割を担っている。今回の結果から、Dual CCCの効率的な洗浄効果によりマトリックスの影響はほとんど存在せず、内部標準物質の効果は、もっぱら1回抽出による出口ロスの補正に現れているのではないかと推測さ

れた。

D. 結論

以上のように、分析用のディスク型カラムを用いたDual CCCと高い選択性を有するMS/MSを直接連結した装置による、メソミル、フェノブカーブ、カルバリルの迅速な分析法を開発した。本法では試料精製の必要がなくサンプリングから分析結果を得るまでの所要時間は、植物油で5分程度、農作物で20分程度であった。また、Dual CCCでは、一般のカラムクロマトグラフィーのように農薬と測定妨害物質が同じ出口から溶出することがないので、妨害物質の溶出時間を全く考慮する必要がない。これらのことから、このDual CCC-MS/MS装置を用いた分析法は、多数の試料を連続して分析できる有用な方法であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) T. Goto et al , Anal Chem Acta , 487, 201-209(2003).
- 2) Ito, Y., Conway, W D. “ High-Speed Countercurrent Chromatography” , (1995), (John Wiley & Sons, Inc., Chichester)

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

双方向高速向流クロマトグラフィー質量分析計を用いた植物油中のカーバメート系農薬の分析 伊藤裕子、後藤智美、岡 尚男、松本 浩（愛知衛研）、永瀬久光（岐阜薬大）、伊東洋一郎（米国・NIH）、日本薬学会第124年会、2004、3月29日、大阪。

2 投稿論文

現在執筆中。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3 その他

なし

Sample 5 g

**add internal standard n-hexane solution
(each 5 mg/l of carbaryl-d7,
fenobucarb-d3 and methomyl-d3) 0.1 ml
anhydrous Na₂SO₄ 20 g
n-hexane 50 ml**

homogenize

centrifuge (3100 rpm, 10 min)

evaporate to just dryness

make up to 5 ml with n-hexane

Dual CCC-MS/MS

20 µl inj.

**Scheme 1. Analytical procedure of carbamate pesticides
in vegetable and fruit using dual CCC-MS/MS**

Table 1
Compound-specific ESI MS/MS parameters for the pesticides and the internal standards

Carbamate pesticide	Precursor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Monitor ion (m/z)
Carbaryl	202	20	10	145
Carbaryl-d7	209	20	12	152
Fenobcarb	208	25	13	95
Fenobcarb-d3	211	25	13	95
Methomyl	226	25	15	128
Methomyl-d3	229	25	15	131

* [M + H]⁺

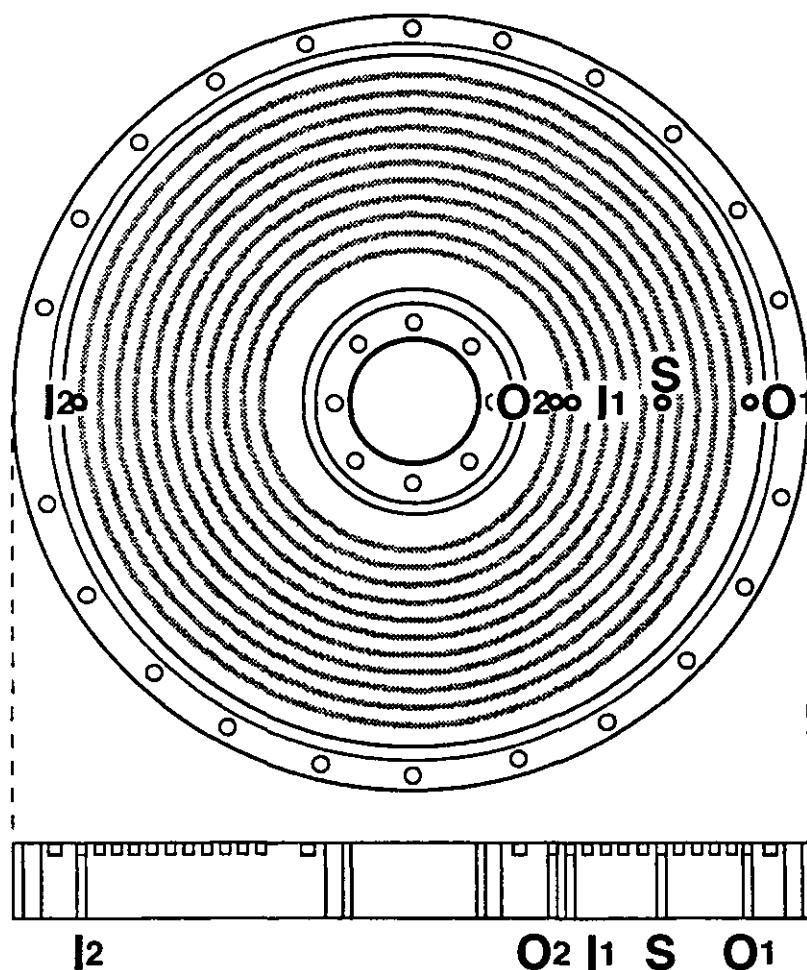
Table 2
Selection of each flow-rate of two-phase solvent

Ratio (upper lower)	Partition coefficient		
	Carbaryl	Fenobcarb	Methomyl
2 15	0.01	0.04	0.02
2 10	0.03	0.06	0.01
3 0.75	0.06	0.17	0.03
3 0.3	0.08	0.45	0.07

Table 3
Recoveries of carbaryl, fenobucarb and methomyl from oils, mandarin orange and spinach

Sample	Fortified (mg/kg)	Carbaryl		Fenobucarb		Methomyl	
		Recovery† (%)	C V** (%)	Recovery† (%)	C V** (%)	Recovery† (%)	C V** (%)
Corn oil	1	100	3.1	101	2.4	99	1.3
	0.5	100	2.5	98	2.0	106	4.7
Sesame oil	1	102	2.5	102	0.3	98	3.1
	0.5	106	1.4	99	2.4	105	3.5
Mandarin orange	0.1	108	3.2	98	2.1	96	3.8
	0.05	107	3.7	100	3.6	97	3.8
Spinach	0.1	97	1.9	96	2.5	88	4.6
	0.05	101	3.0	93	2.4	98	3.0

†Average of 5 trials **Coefficient of variation



Disk size: 12.5 cm diameter, 1.2 cm thick

Separation channel: 1 mm wide x 2 mm deep

with 2 mm ridge, 3 mm pitch

Flow tubes: I₁, inlet 1 (lower phase),

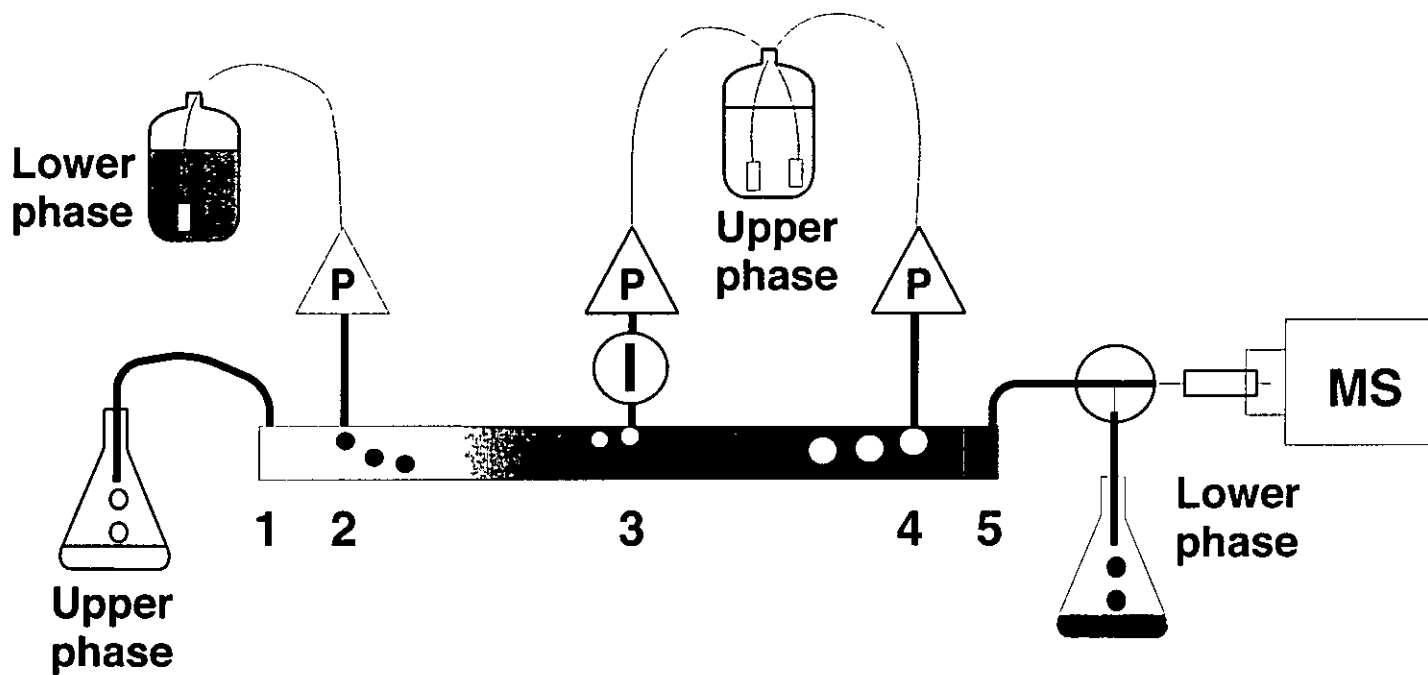
I₂; inlet 2 (upper phase),

O₁; outlet 1 (lower phase),

O₂, outlet 2 (upper phase),

S; sample feed

Figure 1. Spiral disk for dual CCC



- 1: outlet 2
- 2: inlet 1
- 3: sample feed
- 4: inlet 2
- 5: outlet 1

Figure 2. Dual CCC-MS/MS system

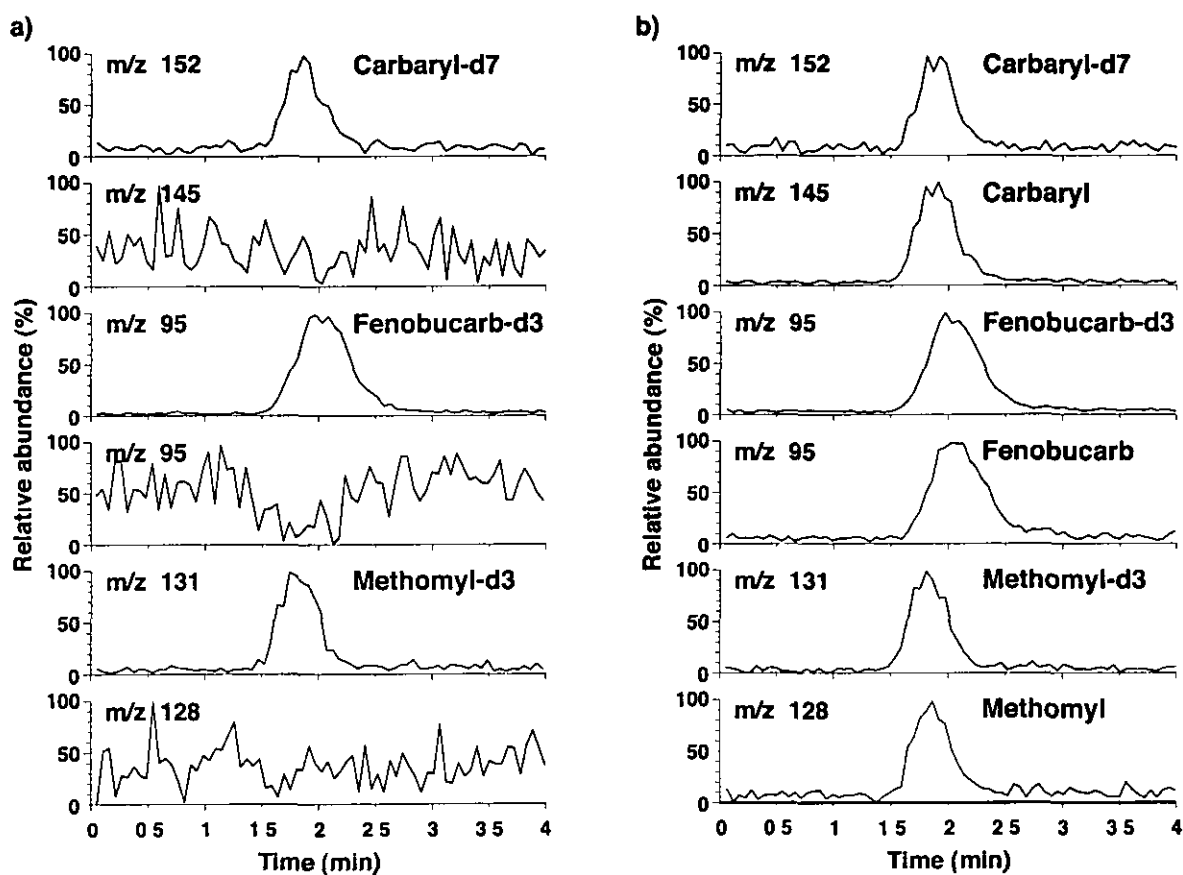


Figure 3. Typical MRM profiles of the fortified mandarin orange sample under dual CCC-MS/MS conditions
a) Mandarin orange (control) b) Fortified with the carbamate pesticides at the concentration of 0.05 mg/kg.

厚生労働省科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
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
農薬一斉分析を志向したLC/MSによる基礎データの取得

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

LC/MSによる農薬一斉分析確立を志向し、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いる質量分析検出および農薬分離に適した分析条件(基本条件)を選定し、270種の農薬を分析した。各分析データは、スペクトルスコピックアプローチ(検出・感度・定性)、クロマトグラフィックアプローチ(分離・定性)により解析し、ESI-LC/MS法による分析が可能か否かの判断を行った。全分析農薬数270成分中、検出可能農薬 229成分、良好なピーク分離が期待できる農薬 198成分、逆相系固相抽出法により濃縮・前処理が期待できる農薬 172成分であることが判明した。全ての分析データは、マスクロマトグラフおよびマススペクトルをまとめデータ集(電子資料)を作成した。これは、LC/MSによる農薬分析を行う上で有用なリファレンスとして活用可能である

研究協力者

村田英明, 荒川清美, 三上博久
株式会社 島津製作所 分析計測事業部
応用技術部
吉井公彦
国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所
食品試験部

そこで、LC/MSの代表的な分析条件(基本条件)を用い、270成分の農薬に対して基本条件でのLC/MS分析を実施し、保持時間、ピーク形状、検出極性および検出イオン質量数などを評価し、農薬一斉分析の確立に有益な情報をまとめた。

A 研究目的

現在、厚生労働省で進められている農薬のポジティブリスト化に伴い、以前にも増して多種農薬の一斉分析法の開発が急がれている。多種農薬一斉分析では、検出の万能性および選択性という相反する検出能力をもつ質量分析検出(GC/MSおよびLC/MS)が強力なツールとなると考えられる。厚生労働省告示試験法では、LC/MSは主に確認試験で用いられているが、適用対象農薬はまだ少なく、それらのほとんどが個別分析である。また、昨年度の研究を含めLC/MSを利用した農薬分析応用例は増加傾向にあるが、不特定多数の農薬を対象とした場合、基本的な前処理および分析条件を用いた場合に、どの農薬が分析可能か否かを見極め、農薬分析の効率化をはかる必要性を痛感する。

B 研究方法

1 試薬

農薬標準品 使用した農薬(270種)はいずれも、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)またはRiedel-de Haen製の残留農薬試験用試薬を用いた。

HPLC移動相 アセトニトリルは和光純薬工業製HPLC溶媒を、酢酸アンモニウム、ギ酸は和光純薬工業製特級を使用した。また、精製水には、TORAYPURE純水製造装置により精製された純水を使用した。

2 農薬標準品の調製

全ての標準溶液は分解を抑える目的で、アセトニトリルに溶解した。アセトニトリルに対して溶解性の悪い農薬については、適宜、メタノール、水、クロロホルム、THFなどを加え得る限り不溶物が少なくなるよう考慮した

3. 液体クロマトグラフ質量分析計

島津製作所製 液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2010Aおよび同社製オートサンプラSIL-HTcを装備したLC-10Avpシリーズ2液高压グラジエントシステムを用いた。

4 LC/MS分析条件

カラム 島津製作所製 Shim-pack FC-ODS (内径 20 mm, 長さ 150 mm)

移動相A 5 mM 酢酸アンモニウム+0.1% ぎ酸水 (pH 3.2)

移動相B アセトニトリル

グラジエントプログラム 0%B (0 min)→95%B (45-50 min)→0%B (50.1-60 min)

流量 0.2 mL/min

カラム温度 40°C

注入量 0.1 または 10 μL

イオン化条件 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

検出極性 正および負 (マルチシーケンスモード使用)

スキャン範囲 m/z 50-600

CDL温度 200°C

ヒートブロック温度 200°C

霧化ガス流量 1.5 L/min

乾燥ガス圧力 0.2 MPa

CDL電圧 C-mode

Q-array電圧 S-mode

5. 移動相およびカラムの選択

LC/MSを用いて、ある農薬が分析可能かどうかは、“ある条件下で良好なピーク形状(他成分との分離)が得られるか”、“対象化合物が検出可能か否か (=イオン化可能か否か)”, により判断可能である。しかし、ESI法によるイオン化もクロマトグラフィー分離も移動相による影響を大きく受けるため、この研究では移動相条件の選択が重要な鍵となる。

イオン性化合物のイオン化効率の対象化合物のpKaと移動相pHが密接に関係するため、正・負両イオン検出に適するpH3.2を選択した。また、アンモニウムイオンの添加はプロトン親和力の低い化合物に対してイオン化効率を高める作用があるため、より低極性の農薬においても検出できる可能性を期待している。

ESI法は主に分子イオン種を生成させるイオン化法であるため、スペクトルの解釈は

容易である反面、電子イオン化 (EI) 法と比べ、定性能力が乏しいことが欠点とされる。そこで分離による定性能力を期待し、入手可能で高い分離能を有するカラム (Shim-pack FC-ODS) を選択した。

6. 実験方法および評価

標準農薬溶液を前述した分析条件を用い LC/MS分析を実施。分析は基本的に所有している農薬をアルファベット順に実施した。各データは構造、マスクロマトグラム、マススペクトルをデータシートとしてまとめ、以下のクロマトグラフィックおよびスペクトロスコピックアプローチの観点で別表(1~5)にまとめた。

クロマトグラフィックアプローチ

① 保持時間

② 相対保持時間 カルボフランの保持時間を100として表記

③ ピーク形状 G (良好), N (普通), B (幅広), T (テーリング), L (リーディング) を記号により表記

④ ピーク強度 S (強い. イオン飽和が確認される), W (弱い. TICでは成分の確認はできないが, MCにより成分確認が可能), N (普通. SとWの間)

⑤ 検出極性 P (正イオンのみ検出), N (負イオンのみ検出), ND (検出不可), PN (正・負両方のイオンが確認できるが, 正イオン検出の方が有利), NP (正・負両方のイオンが確認できるが, 負イオン検出の方が有利)

⑥ 農薬の安定性 純度の高い標準試料を利用しているが、クロマトグラム上複数のピークが確認された場合に利用 D (分解生成物確認), I (不純物確認=農薬との関連がつかない場合)。

スペクトルスコピックアプローチ

⑦ 分子イオン種の分類 確認された分子イオン種のうち強度の高い順に番号を付した。表タイトルの記号は以下の通り, P=(M+H)⁺, A=(M+NH₄)⁺, S=(M+Na)⁺, P=(M+H+CH₃CN)⁺, a=(M+NH₄+CH₃CN)⁺, S=(M+Na+CH₃CN)⁺, D=(M-H), C=(M+Cl), F=(M+HCOO) 農

⑧ スペクトルの単純性 S (単純), C (複雑)

⑨ 有効なフラグメントイオンの有無 F(有り)

C. 結果と考察

270種の対象農薬を分析した結果、正イオンのみで検出できた農薬131種(47.3%)、負イオンのみで検出できた農薬38種(13.7%)、正および負イオンで検出できた農薬87種(31.4%)でありほとんどの農薬がESI-LC/MSで分析できる可能性を秘めている。検出できなかった農薬はわずか21種(7.6%)であった。表1には検出不可農薬の分類と農薬数および270種農薬に含まれる同類の農薬に対する割合を示した。

表1 検出不可農薬の分類と件数

農薬の分類	検出不可農薬数	4種
シクロジエン系	(4/4)	4種 (4/13)
ピレスロイド系	種 (3/4)	3種 (3/3)
架橋ジフェニル系	2種 (2/41)	1種
フタルイミド系	(1/1)	1種 1種 1種
チオリン酸エステル系		種 1種
有機スズ系		
(リン酸 カルボン酸)系		
(芳香族)系		
(ニトリル)系		
(アミド)系		

シクロジエン系(アルドリノ、ディルドリンなど)、架橋ジフェニル系(プロモプロピレート、クロルフェンソンなど)およびフタルイミド系(カプタホール、ホルベットなど)はESIによりイオン化できない農薬類と判断できる。(芳香族)系、(ニトリル)系、(アミド)系と分類した農薬は、ほかの農薬のように特徴的な構造をもたないためこのような表記を用いたが、イオン性・極性官能基をもたない農薬はESIではイオン化できないという、極めて原理的な裏付となった。ピレスロイド系農薬自体は低極性農薬に分類されるため、イオン化効率の低い農薬に相当するが、ピレスロイド農薬に特徴的な構造以外の部分がイオン化に関与して検出された農薬が多く認められたと思われる。しかしながら、明確に分子イオン種を与えないものも多く、LC/MS分析はピレ

スロイド系農薬を対象とした場合、あまり最適な手法になり得るとは考え難い。(チオ)リン酸エステル系で確認されなかった農薬はわずか5%で、検出不可事例が例外的と思われる。溶解性または分解の問題で対象農薬が確認できなかったと考えられる。

検出可能な農薬はカーバメート系(38種)、スルホニル尿素系(8種)、フェニル尿素系(8種)、コナゾール系(11種)、トリアジン系(8種)、トリアゾール系(7種)、イミダゾール系(5種)、フェノキシ酢酸・プロピオン酸系(6種)、シクロヘキセンオキシム系(3種)、四級アンモニウム塩系(3種)、ウラシル系(3種)、ピラゾール系(2種)、ピロール系(2種)、ジニトロフェノール系(1種)などであり、ほとんど全ての農薬類をカバーしているといえる。本研究で未着手の農薬が多いが、適用可能か否かの判断の目安として十分活用できる。

一般に、ESIはイオン性・高極性化合物のイオン化に適した方法で、イオン性・高極性の化合物に対してはプロトン化分子や脱プロトン分子を主に与えるが、イオン性・極性が低くなるに従い、溶媒アダクトイオンなど分子イオン種のパターンに特徴が見られる。分子イオン種の分布パターン情報は、保持時間情報とあわせることで、同じ分子量を示す化合物群の識別の一助となると考えている。

表2 ピーク形状に関する集計

ピーク形状	農薬数	152種	46種
G(良好)	種	38種	11種 2種
N(普通)			
B(幅広)			
T(テーリング)			
L(リーディング)			

この条件でのピーク形状をみると、およそ200種近い(75.0%)農薬は満足のできるピーク形状(GまたはN)を与えており、この分析条件を用いた分析法が、農薬の一斉分析に適用可能であることを示唆している。

実際の農薬分析において前処理・濃縮操作は避けられない問題である。ポジティブリスト対象農薬数を考慮すると、前処理方

法を個別に最適化するという必要があるが、“より多くの農薬をいかに簡単な前処理で分析する”意義は大きい。我々のグループでは、ほとんどの前処理方法として利用されている逆相系固相カートリッジによる農薬類の前処理条件の検討を別途行っている。この検討結果からは、RRT 800~1800 の範囲に含まれる農薬は比較的高い回収率、再現性が得られるであろうという知見を得ている。良好なピーク形状が確認されている198種のうち、RRT800以下の農薬は38種、RRT1800以上の農薬は19種であることから、172種の農薬（全体の63.7%、検出可能農薬の75%）は、高い回収率で前処理・濃縮ができる可能性があると考えている。

D. 結論

農薬の一斉分析はもっぱらGC/MSが用いられるが、キャピラリーカスクロマトグラフの高分離能および質量分析計の高選択性をもってしても、非常に広範かつ多数のポジティブリスト対象農薬を分析するには非常難しくなっている。また農薬自体もより分解性が高く、しかも残留しにくいものへと変わりつつあるため、GC/MSで分析困難な農薬が増える傾向にある。農薬の性質に応じてGC/MSとLC/MSのどちらの手法がより簡便にかつ正確に分析できるか見極め、発展させる必要性を痛感する。今回の研究はその初期段階のもので、LC/MSの分析能力を正しく認識する一助となる。

また、LC/MSはイオン化法の性質上、マスペクトルのみで化合物を定性することは非常に困難である。LCおよびMS個々の分析装置の弱点を相補った装置であるLC/MSでは、定性情報として保持時間（相対保持時間）のクロマト情報および分子イオン種のパターンなどを考慮することで、定性能力を高めることが可能である。もちろん、この情報は移動相条件により大きく影響を受けるため、同一移動相およびグラジエント条件を利用することが必要条件となる。本研究は、ある基本的な分析条件を定めて多くの農薬が分析できるか否かを確認し、それらが実際の分析に利用可能かどうかの判断材料として非常に有益なものと考えている。また、クロマトグラフィーの定量は標準物質なしで行うことは不可能であるが、定性ではマスペクトルから

得られる分子量情報、確認される分子イオン種のパターンおよび保持時間（相対保持時間）情報を用いることで、同定精度が上げられると考えている。電子資料には分析を行った農薬のマスクロマトグラム、マスペクトルをすべてまとめた（一部を図1から20に示した）個々でまとめた農薬類のLC/MS分析基礎データは、農薬分析さらに前処理法を検討する上で極めて有用な情報データ集として活用できると考えている。

E 参考文献

- 1) Krause, R T, *J Chromatogr* 1979, 185, 615-624 Krause, R T, *J Assoc Off Anal Chem*, 1980, 63, 1114-1124 Krause, R T, *J Assoc Off Anal Chem*, 1985 68 734-741
- 2) Luchtefeld, R G, *J Chromatogr Sci.* 1985, 23, 516-520 Luchtefeld, R G, *J Assoc Off Anal Chem*, 1985, 23, 516-520

F 研究発表

1 口頭発表

LC/MSによる農薬分析のポイント 村田 英明, 分析科学機器展付設 新技術説明会, 2003, 9月12日, 幕張