

表4 LC/MS/MS一斉分析による添加回収試験結果

No.	農薬名	C18&PSA					
		開弁		別注		キヨウ	
		回収率	Cv.	回収率	Cv.	回収率	Cv.
1	EPH	89.9	6.4	86.6	10.0	75.6	3.3
2	アジムスルフロン	49.3	4.3	62.3	3.7	61.7	8.1
3	アセタミプリド	78.6	26.1	84.9	23.6	62.9	9.1
4	アゾキシストロビン	86.2	4.3	89.3	8.3	85.6	3.6
5	アルジカルブ	83.5	37.1	93.8	44.9	53.9	8.1
6	イソキサチオン	86.2	4.4	90.2	8.7	72.6	3.6
7	イソプロカルブ	85.7	15.9	96.4	25.1	60.4	10.5
8	イソプロチオラン	80.8	7.4	100.7	16.0	80.3	5.9
9	イナベンフィド	88.7	2.9	76.1	5.0	74.2	9.2
10	イマザリル	70.3	8.9	76.1	7.6	65.1	2.7
11	イマゾスルフロン	51.0	6.2	43.7	3.7	60.2	12.3
12	イミダクロプリド	76.3	27.1	94.3	33.5	73.6	11.3
13	イミベニコナゾール	87.1	4.3	84.9	7.9	75.1	4.0
14	インダノファン	93.3	3.6	83.0	3.9	71.8	12.1
15	エトキシキン	93.8	10.0	95.3	12.6	58.5	5.4
16	エトベンサニド	89.4	6.5	84.1	3.9	74.5	3.9
17	オキサジキシル	74.6	8.3	104.6	42.8	64.3	10.1
18	オキサジクロメホン	82.2	4.3	87.9	4.6	81.8	3.3
19	カルバリル	85.6	9.9	98.2	31.9	62.1	9.1
20	カルベンダジム	85.1	29.2	74.0	24.6	51.9	1.3
21	チオファンートメチル	84.5	6.6	95.1	13.9	83.9	6.7
22	ベノミル	28.8	8.3	32.1	3.7	14.1	17.9
23	キザロホップエチル	93.8	7.0	88.9	7.8	75.1	1.6
24	キノメチオネート	5.9	0.2	18.9	5.6	2.8	3.7
25	クロルスルフロン	40.7	6.1	49.1	5.3	39.7	7.0
26	ジェトフェンカルブ	84.4	7.4	95.2	19.0	67.7	6.2
27	シクロスルフアムロン	50.1	4.4	63.0	6.6	58.7	5.0
28	ジクロルボス	80.7	17.0	96.2	22.6	67.6	4.9
29	ジフェノコナゾール	85.6	5.5	82.7	5.7	81.0	4.4
30	ジフルベンズロン	79.0	3.6	93.4	12.8	76.3	0.6
31	シプロジニル	78.6	6.4	83.4	11.2	65.3	4.1
32	ジメトエート	82.3	31.7	100.6	38.6	55.6	9.8
33	スピノシンA	51.6	6.2	51.3	4.0	44.6	12.5
34	スピノシンD	46.1	9.4	65.0	2.6	41.3	14.3
35	セトキシジム	46.4	4.0	66.2	1.4	46.9	11.1
36	ダイムロン	84.2	6.0	95.5	14.7	76.1	4.6
37	チアベンダゾール	82.1	19.1	70.6	17.1	56.7	3.8
38	チオジカルブ	63.6	1.3	73.7	14.5	69.3	8.2
39	チアメトキシム	67.9	31.6	96.4	20.8	65.1	7.1
40	テトラコナゾール	93.1	6.7	92.9	10.2	84.4	3.9
41	テブコナゾール	86.7	7.8	86.3	11.1	79.9	1.7
42	テブフェノジド	77.1	6.4	122.5	18.9	0.0	0.0
43	テブフェンピラド	87.9	7.1	82.8	5.6	73.3	4.1
44	トリアジメホン	80.5	9.5	95.9	14.1	80.3	2.9
45	トリクロルホン	57.9	25.6	64.3	18.8	49.6	2.9
46	トリシクラゾール	82.1	21.3	75.7	19.0	66.9	4.3
47	トリフルミゾール	101.1	6.1	79.9	10.3	69.3	6.7
48	トリフルミゾールメタボライト	77.1	4.4	82.0	7.3	72.1	6.7
49	ニテンピラム	78.7	35.6	72.1	21.6	43.7	8.6
50	バミダチオン	75.1	23.6	86.7	24.4	63.2	9.6
51	ハロスルフロンエチル	64.9	6.0	76.7	9.0	71.1	8.9
52	ピメトロジン	60.8	11.0	49.3	17.6	29.3	2.6
53	ピラクロボス	82.7	3.1	84.6	3.1	72.2	6.4
54	ピラソルスルフロンエチル	60.9	4.9	76.7	8.6	65.7	7.7
55	ピリダフェンチオン	90.7	7.6	95.0	14.6	81.6	1.5
56	ピリプロチカルブ	85.2	5.5	88.1	7.9	74.0	2.5
57	ピリミカルブ	84.9	11.9	91.9	16.9	66.9	5.6
58	ピリミジフェン	68.0	3.4	68.7	0.7	59.2	9.6
59	フェノピカルブ	63.7	10.7	84.9	25.1	36.7	15.9
60	フェリムゾン	79.3	8.1	85.6	12.8	75.6	1.7
61	フェンピロキシメート	77.3	4.9	77.3	3.9	72.5	5.3
62	フェンヘキサミド	41.7	5.0	63.7	4.0	49.3	6.7
63	フルフェノクスロン	89.5	6.2	91.3	8.6	77.7	2.9
64	プロクロラズ	69.6	3.8	81.6	18.2	81.4	7.1
65	プロバモカルブ	0.0	0.0	44.7	16.1	6.1	0.0
66	プロピコナゾール	81.1	3.7	82.9	3.6	72.7	6.8
67	プロベナゾール	0.0	0.0	30.6	17.2	16.9	2.1
68	プロホキシル	73.5	12.6	107.0	38.7	52.7	7.4
69	ヘキサコナゾール	80.8	4.6	80.0	5.3	69.1	9.3
70	ヘキシチアゾクス	87.2	8.1	86.1	7.0	65.9	3.6
71	ベンシクロン	86.7	5.7	89.3	7.3	76.1	6.1
72	ベンンスルフロンメチル	38.9	1.9	53.3	3.7	47.1	7.3
73	ベンダイオカルブ	0.0	0.0	120.1	59.9	0.0	0.0
74	ボスカリド	86.7	4.7	83.9	8.0	76.1	8.6
75	ボスチアセート	73.3	5.9	100.4	29.1	70.7	11.7
76	メソミル	76.3	24.6	47.4	10.2	74.5	3.2
77	メタベンズチアズロン	81.1	8.7	84.7	11.8	69.7	5.7
78	メタラキシル	84.9	13.4	87.4	27.2	81.5	10.6
79	メチオカルブ	79.1	7.2	100.9	22.7	62.6	7.2
80	メチダチオン	92.8	7.0	81.7	38.4	59.7	15.2
81	メトスルフロンエチル	36.8	3.4	51.7	8.0	42.9	6.6
82	メトラクロール	90.1	10.8	93.5	17.0	76.2	1.2
83	モリネート	80.3	10.4	81.3	16.8	58.7	3.3
84	リニユロン	88.3	6.9	93.6	13.3	70.7	1.9
85	ベンフラカルブ	46.9	3.2	63.1	5.9	50.6	3.3

平行試験数; n=3, 添加濃度: 0.05mg/kg

加工食品中の残留農薬分析法の検討

小林ゆかり, 土田由里子, 岩崎奈津美, 丹治敏英

Determination of Residual Pesticides in Processed Foods

Yukari Kobayashi, Yuriko Tsuchida, Natsumi Iwasaki and Toshihide Tanji

Keywords: 加工食品, 有機リン系農薬, カルバメート系農薬, GC/MS, LC/MS/MS

1 はじめに

2008年1月に発生した中国産冷凍ギョウザによる有機リン系農薬中毒事件を契機に, 加工食品の安全性に対する関心が高まったことから, 新潟県においても加工食品中の残留農薬の調査を行うこととなった。

加工食品中の残留農薬の試験法については, 有機リン系農薬を対象に, 試料を無水硫酸ナトリウムで脱水しながら酢酸エチルで抽出して測定する方法が, 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課から示された¹⁾。しかし, この方法では, 精製操作を行わないため分析機器が汚れやすく, 多くの試料を安定して測定するには問題があった。また, 大垣²⁾がゲル浸透クロマトグラフ (GPC) による精製方法で良好な結果を得ているが, この方法は大量の溶媒が必要となる短所がある。

本研究では, 有機リン系農薬42種及びカルバメート系農薬7種を対象に, 簡便な精製操作によって加工食品中の残留農薬を分析する方法を検討した。

2 試験方法

2.1 試料

市販の冷凍ギョウザ及びレトルトカレーを用いた。

2.2 試薬等

農薬標準品: 和光純薬工業(株), 林純薬工業(株), 関東化学(株), Dr. Ehrenstorfer GmbH及びRiedel-de Haën製の残留農薬試験用標準品を用いた。

有機溶媒等: アセトン, 酢酸エチル及びメタノールは関東化学(株)製, ヘキサンは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用, その他は試薬特級を用いた。

ミニカラム: VARIAN製 MEGA BOND ELUT C18 (1000mg) (以下, C18) 及びVARIAN製 BOND ELUT PSA (500mg) (以下, PSA) を用いた。

0.2 μ mフィルター: Waters製Acrodisc GHPを用いた。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 GC/MS

装置: (株)島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム: Agilent Technologies製 DB-5MS (0.25mm

i. d. \times 30m, 膜厚0.25 μ m)

プレカラム: ヒューズドシリカチューブ (2m)

カラム温度: 50 $^{\circ}$ C (1min) \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 125 $^{\circ}$ C (0min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (8.5min)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

インターフェース温度: 280 $^{\circ}$ C

キャリアガス: 高純度ヘリウム, 1.5mL/min

注入量: 2 μ L (スプリットレス)

イオン化法: EI

測定モード: SIM

2.3.2 LC/MS/MS

装置: Waters製 Micromass Quattro Premier XE 及び Acquity UPLC system

カラム: Waters製 XTerra MS C18 (3.5 μ m, 2.1 \times 150mm)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

注入量: 5 μ L

移動相: (A) 5mmol/L酢酸アンモニウム溶液, (B) メタノール, グラジエント条件: (B) 5%(0min) \rightarrow 90%(15min) \rightarrow 90%(25min), 流速: 0.2mL/min

イオン化法: ESI (ポジティブ)

測定モード: MRM

キャピラリー電圧: 1kV

イオン源温度: 120 $^{\circ}$ C

2.4 試験溶液調製法

試験溶液調製法を図1から3に示した。A法 (図1) は, 厚生労働省の方法¹⁾をもとに, アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作及びミニカラムによる精製操作を加えたものである。ミニカラムの選択にあたっては, 厚生労働省の通知試験法³⁾及び吉岡らの方法⁴⁾を参考とし, 脂質等を除去するためにC18を, 色素や脂肪酸等を除去するためにPSAを用いた。B法 (図2) は, A法における抽出からアセトニトリル/ヘキサン分配までの操作の短縮を試みたものである。C法 (図3) は, B法での検討結果から, 精製条件の一部変更を行ったものである。

2.5 添加回収試験

試料中0.1 μ g/gとなるよう農薬混合標準液を添加し, 2.4試験溶液調製法に示した方法で, n=3の併行試験を行った。

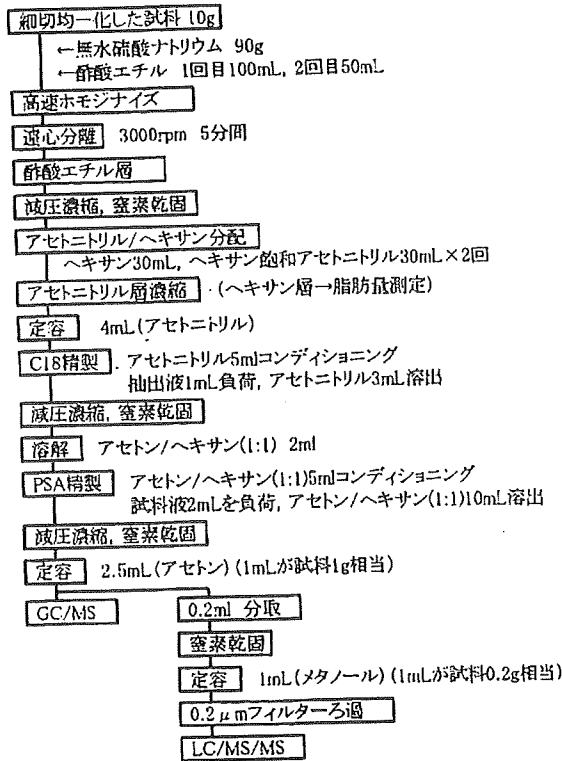


図1 試験溶液調製法(A法)

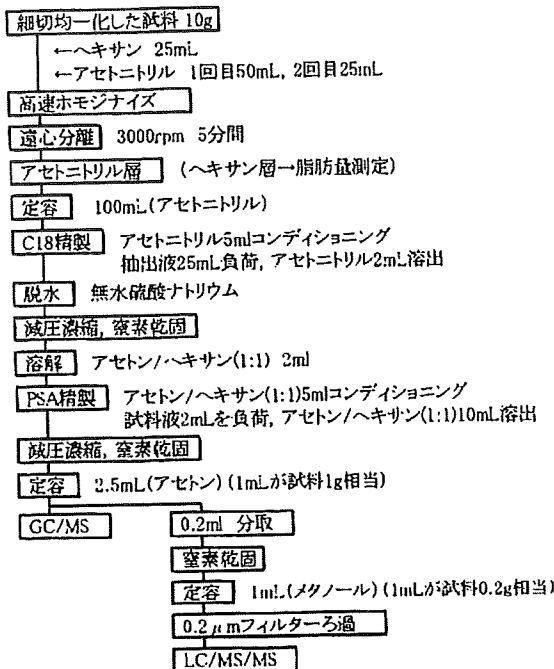


図2 試験溶液調製法(B法)

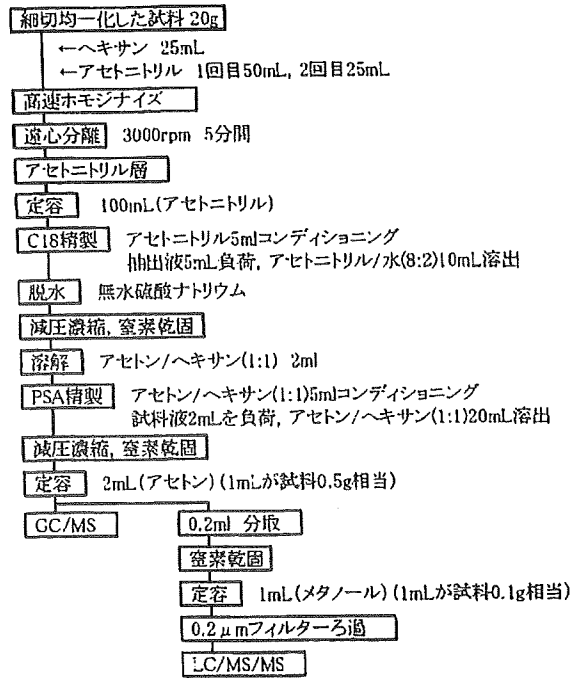


図3 試験溶液調製法(C法)

2.6 試料マトリックスの影響の検討

農薬が含まれない試料を用いて、2.4試験溶液調製法に示した方法で調製した試験溶液に、農薬混合標準液を添加し、2.5添加回収試験における回収率100%に相当する濃度にしたもの(以下、マトリックス標準)を調製した。通常の溶媒で調製した標準液(以下、溶媒標準)とマトリックス標準とを比較し、試料マトリックスが測定に及ぼす影響について検討した。

3 結果と考察

3.1 脂肪抽出量の比較

試料のサンプリング誤差を確認するため、抽出効率の参考とするため、A法、B法それぞれの抽出過程で得られるヘキサン層を濃縮乾固し、脂肪量の測定を行った。結果を表1に示した。

表1 ヘキサン層に抽出された脂肪量の比較(n=5)

	冷凍ギョウザ		レトルトカレー	
	脂肪量(mg/g)	RSD(%)	脂肪量(mg/g)	RSD(%)
A法	96.8	1.56	41.4	1.60
B法	92.1	3.30	41.8	1.37

脂肪量のばらつきは、冷凍ギョウザのB法で相対標準偏差(RSD)が3.3%となった他は1.5%前後であり、10gの試料量で十分サンプリング誤差を無視できることがわかった。

A法とB法の脂肪量を比較すると、レトルトカレーではほ

とんど差がなかったが、冷凍ギョウザではA法に比べB法での脂肪量がやや少ない結果となった。この原因の一つとして、冷凍ギョウザをB法で抽出したとき遠心分離後に沈殿物が再浮遊しやすく、ヘキサソール層が回収しにくかったことが考えられる。この点を考慮すると、B法でもA法と大差な

く脂肪の抽出が可能であり、比較的脂溶性の高い農薬であっても問題なく液層に移行できると考えられた。

3.2 A法, B法による試験結果

8種類の農薬について、A法及びB法による添加回収試験を行った結果を表2に示した。

表2 冷凍ギョウザ及びレトルトカレーを用いた添加回収試験結果(A法,B法)

冷凍ギョウザ	GC/MS測定					LC/MS/MS測定						
	A法		B法		マトリックス影響	A法		B法				
	回収率 (%)	(RSD%)	回収率 (%)	(RSD%)		回収率 (%)	(RSD%)	回収率 (%)	(RSD%)			
acephate	430.2	(10.70)	5.00	261.7	(7.54)	4.23	82.0	(5.14)	1.01	66.3	(3.28)	0.98
bendiocarb	112.3	(3.00)	1.22	111.8	(2.20)	1.23	87.9	(3.82)	1.00	89.6	(4.58)	1.03
carbaryl	102.9	(2.53)	1.05	106.7	(2.06)	1.16	84.3	(3.03)	1.00	90.2	(3.59)	1.00
edifenphos	157.2	(3.89)	1.69	174.6	(4.20)	2.03	74.4	(3.65)	0.93	81.4	(3.42)	0.91
malathion	148.8	(1.26)	1.66	164.5	(0.70)	1.80	83.5	(5.26)	0.99	88.6	(4.04)	0.99
methamidophos	112.4	(1.56)	1.05	121.6	(1.77)	1.72	80.6	(4.56)	0.96	62.5	(1.78)	1.02
pirimicarb	0.0	(-)	1.18	93.6	(5.32)	1.17	0.0	(-)	1.00	74.2	(7.24)	1.01
tolclofos-methyl	106.7	(0.75)	1.20	104.1	(2.55)	1.20	84.8	(7.04)	0.96	85.9	(2.12)	0.90

レトルトカレー	GC/MS測定					LC/MS/MS測定						
	A法		B法		マトリックス影響	A法		B法				
	回収率 (%)	(RSD%)	回収率 (%)	(RSD%)		回収率 (%)	(RSD%)	回収率 (%)	(RSD%)			
acephate	159.0	(5.25)	1.94	456.0	(6.96)	7.13	97.4	(4.21)	1.00	72.6	(11.12)	0.96
bendiocarb	104.1	(4.92)	1.14	101.5	(3.50)	1.10	93.3	(2.95)	1.01	88.9	(2.29)	1.00
carbaryl	85.7	(10.15)	0.93	83.0	(2.49)	0.98	94.7	(1.84)	1.00	89.0	(2.37)	1.00
edifenphos	146.4	(1.95)	1.61	155.9	(2.63)	1.67	89.6	(0.43)	0.92	86.0	(2.00)	0.95
malathion	113.9	(2.51)	1.25	133.8	(6.15)	1.47	94.9	(4.10)	1.00	93.0	(5.67)	1.01
methamidophos	155.9	(4.27)	1.86	161.9	(1.52)	2.29	86.9	(3.50)	0.98	73.0	(11.41)	0.99
pirimicarb	0.0	(-)	1.08	83.1	(4.97)	0.97	0.0	(-)	1.01	83.5	(2.42)	0.99
tolclofos-methyl	94.6	(5.24)	1.07	90.7	(2.98)	1.02	91.1	(4.97)	1.01	89.4	(8.03)	1.04

注) マトリックス影響=マトリックス標準のピーク面積/同一濃度の溶媒標準のピーク面積

A法では、冷凍ギョウザ、レトルトカレーともにピリミカルブの回収率が0%となった。原因を調べるため、C18に農薬混合標準液(0.1µg/mL)1mLを負荷し、溶出条件を変えて溶出状況を調べたところ、ピリミカルブはアセトニトリルではC18から溶出しにくいことがわかった(図4)。A法ではC18への負荷液量が少ないためピリミカルブが回収できなかったのに対し、B法では負荷液量が25mLと多く、また抽出液に試料由来の水分が含まれていることもあってピリミカルブが回収できたと考えられる。

一方B法では、C18精製の際に、抽出液中の着色成分がミニカラム上部に留まらずに拡散、溶出されてしまった。これは、ミニカラムに負荷する抽出液量がA法に比べて多いことが原因と考えられた。B法でC18精製の効果を十分得るためには、ミニカラムへ負荷する抽出液の量を減らす必要があると考えられた。

GC/MSとLC/MS/MSによる測定結果を比較すると、GC/MSによる測定では、A法、B法とも回収率が100%を超える農薬が多かった。特に、アセフェートは回収率400%を超える場合もあった。また、アセフェートやメタミドホスは、標準溶液と試験溶液とで検出されたピークの保持時間がずれ、同定に支障があった。溶媒標準とマトリックス標準とを比較した場合も、ピーク面積の差や保持時間のずれが見られたことから、これらはいずれも試料マトリックスの影響によるものと考えられた。

LC/MS/MSによる測定では、B法の冷凍ギョウザでアセフェート及びメタミドホスの回収率が70%を若干下回ったほかは、概ね良好な結果が得られた。溶媒標準とマトリックス標準との測定結果にほとんど差はなく、試料マトリックスの影響はほとんどないと考えられた。

3.3 C法による試験結果

前述の結果からB法を一部変更したC法について、対象農薬を増やして検討した。C法では、試料の濃縮率をなるべく

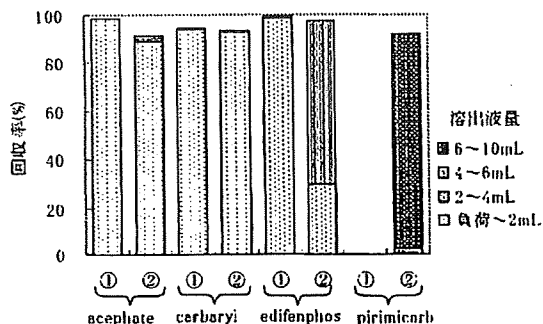


図4 C18からの各農薬の溶出 (①:アセトニトリル溶出 ②:アセトニトリル/ホ(8:2)溶出)

く変えずにC18への負荷液量を減らすために、試料量を20g、C18への負荷液量を5mLとした。C18からの溶出にはアセトニトリル/水(2:8)10mLを用いた。また、PSAのロットが変わるとアセフェートが十分溶出しないうちがあったため、溶出に用いるアセトン/ヘキサン(1:1)の液量を20mLに変更した。

各農薬の添加回収試験結果を表3に示した。

GC/MSによる測定では回収率が100%を超える農薬が多くあり、定量できた47農薬のうち、冷凍ギョウザで19農薬、レトルトカレーで32農薬が回収率120%を超えた。溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス標準のピーク面積の比を求めると、多くの農薬で1倍を超えており、冷凍ギョウザで8農薬、レトルトカレーで11農薬が2倍を超えた。ホスメットは冷凍ギョウザ、レトルトカレーとも約5倍の差があった。このことから、試料マトリックスの影響で回収率が極めて高いものが多いと考えられた。マトリックス標準で回収率を補正すると、回収率が120%を超えるものはなくなり、冷凍ギョウザで38農薬、レトルトカレーで37農薬が回収率70~120%の範囲となった。未知試料を分析する際は試料マトリックスの影響を十分考慮して定量を行う必要があると考えられる。ジクロロボスは回収率が低く、冷凍ギョウザ、レトルトカレーとも約30%の回収率となったが、これは濃縮操作時に揮散したものと考えられた。

LC/MS/MSによる測定では、定量できた43農薬のうち、冷凍ギョウザで40農薬、レトルトカレーで41農薬が回収率70~120%の範囲となった。溶媒標準とマトリックス標準を比較した場合に顕著な差は見られず、回収率をマトリックス標準で補正してもあまり影響なかった。エチオフェンカルブは冷凍ギョウザで、プロチオホス、テルブホスは冷凍ギョウザ及びレトルトカレーとともに、回収率が約60%となった。これらはGC/MSによる測定(マトリックス補正後)でも同様の結果となったが、原因は不明であり、今後さらに検討する必要がある。

ホスメットはLC/MS/MSによる測定中、標準液のピーク面積が変動することがあった。詳しく調べたところ、メタノール中で劣化することがわかった。10℃で保存した場合、0.025 µg/mLメタノール溶液のピーク面積が、調製から4時間後に約80%、16時間後に約50%まで低下した(図5)。今回の添加回収試験では、試験溶液の調製とほぼ同時に標準液を調製し、また、試験溶液と標準液を交互にLC/MS/MSで測定したため、試験溶液と標準液が同程度に劣化して、見かけ上良好な回収率となったと考えられる。ホスメットはGC/MS測定では試料マトリックスの影響が大きく、正確な測定は難しいと考えられるため、試験溶液をアセトニトリル等メタノール以外の溶媒で調製してLC/MS/MSで測定するなど、さらに検討が必要である。

なお、今回のLC/MS/MS測定における移動相の条件は、A法、B法検討時のものをそのまま使用したが、保持時間15分前後に多くの農薬が集中して検出されるため、C法で検

討した農薬に対応するには、あまり良好な条件ではなかった。移動相条件についてもさらに検討する必要があると考えられた。

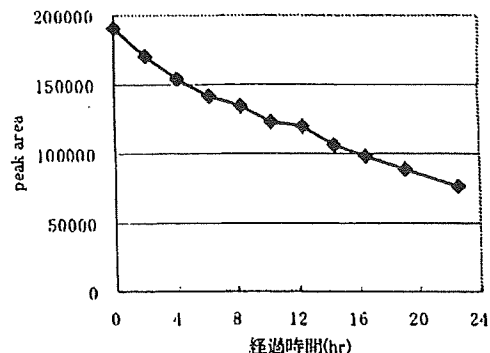


図5 phosmet(メタノール溶液)のピーク面積の変化

5 まとめ

加工食品中の残留農薬分析法について、冷凍ギョウザ及びレトルトカレーを用いて検討した。試料をアセトニトリル及びヘキサンで抽出し、C18及びPSAミニカラム精製を行う方法で、有機リン系農薬42種、カルバメート系農薬7種を対象に添加回収試験を行った。測定にはGC/MS及びLC/MS/MSを用いた。

その結果、有機リン系農薬38種、カルバメート系農薬6種について概ね良好に分析することが可能と考えられたが、GC/MSによる測定では試料マトリックスの影響に留意する必要があった。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡：食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について、平成20年3月7日
- 2) 大垣有紀，他：三重県保健環境研究所年報，10，25 (2008)。
- 3) 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，平成17年1月24日，食安発第0124001号
- 4) 吉岡直樹，秋山由美，辻正彦：兵庫県立健康環境科学研究所年報，1，165 (2002)。

表3 冷蔵キョウザ及びトレットクローを用いた添加回収試験結果(C法)

検体名	冷蔵キョウザ				トレットクロー				(参考) 定置イオン及び浮置下層						
	GC/MS測定		LC/MS/MS測定		GC/MS測定		LC/MS/MS測定		GC/MS		LC/MS/MS				
	回収率 (%)	マトリックス影響 (%)	補正後回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	マトリックス影響 (%)	補正後回収率 (%)	RSD (%)	定置イオン (μg/mL)	定置下層イオン (μg/mL)	浮置下層イオン (μg/mL)	定置下層イオン (μg/mL)			
acetate	122.2 (2.75)	1.74	70.4	77.2 (3.85)	1.09	70.7	119.1 (16.13)	1.82	65.4	94	0.2	183.9	142.8	0.003	
aldicarb	※1	※1	※1	89.5 (1.98)	1.08	82.6	※1	※1	88.0 (3.12)	1.00	87.7	208.1	115.4	0.002	
benflocarb	97.5 (5.15)	0.99	98.8	94.8 (3.63)	1.22	71.5	83.1 (2.64)	0.98	84.6	224.1	0.04	224.1	108.9	0.0004	
butanifos	104.1 (2.73)	1.29	80.4	85.5 (4.23)	1.06	80.8	124.9 (6.74)	1.42	77.4	333.2	0.02	333.2	179.8	0.0004	
cadusafos	108.3 (4.51)	1.44	75.4	82.0 (2.83)	1.04	74.6	112.2 (1.46)	1.45	77.4	271.1	0.008	271.1	130.5	0.0004	
carbaryl	87.1 (5.53)	0.93	93.8	91.1 (3.57)	1.12	81.1	85.7 (6.09)	0.87	98.6	144	0.04	202.0	144.9	0.0006	
chlorfenvinphos-E	114.2 (4.08)	1.34	85.2	86.4 (3.63)	1.03	86.2	123.8 (6.44)	1.43	85.2	269	0.03	359.1	126.6	0.003	
chlorfenvinphos-Z	103.3 (4.16)	1.50	68.8	89.7 (4.51)	0.97	92.1	124.0 (3.71)	1.43	86.7	269	0.02	359.1	126.6	0.003	
chlorpyrifos	96.5 (2.49)	1.20	80.3	71.8 (2.11)	1.08	66.5	102.3 (4.84)	1.29	79.4	314	0.01	351.9	199.7	0.0005	
chlorpyrifos-methyl	111.9 (2.61)	1.40	79.7	89.8 (7.46)	1.12	80.4	118.7 (3.13)	1.48	80.1	243	0.01	244.0	101.4	0.003	
cyanazophos	21.9 (3.41)	1.56	78.0	※2	※2	※2	133.4 (1.70)	1.81	73.7	179	0.008	305.1	168.7	0.0002	
diazinon	103.0 (5.29)	1.39	74.1	85.3 (2.44)	1.14	75.0	104.8 (5.31)	1.40	75.0	185	0.006	220.3	108.9	0.001	
dichlorvos	36.8 (12.78)	1.29	28.6	※2	※2	※2	36.5 (26.85)	1.25	29.2	87	0.05	230.1	124.6	0.001	
dimethoate	180.9 (1.51)	2.41	75.1	89.7 (1.39)	1.15	78.2	181.3 (6.28)	2.62	69.1	295	0.02	333.1	126.7	0.003	
dimethylvinphos-E	125.0 (2.81)	1.45	86.5	87.1 (8.87)	1.08	80.6	142.0 (3.09)	1.81	78.4	295	0.02	333.1	126.7	0.003	
dimethylvinphos-Z	102.7 (6.68)	1.35	75.9	82.7 (1.58)	1.06	78.3	137.2 (4.58)	1.45	94.9	310	0.02	311.2	282.9	0.0005	
edifenphos	165.3 (4.26)	2.10	78.9	82.9 (2.72)	1.02	81.1	129.3 (7.42)	2.40	74.7	157	0.01	324.1	156.5	0.007	
EPN	124.3 (8.64)	1.47	84.5	92.1 (7.05)	1.00	92.6	136.3 (5.93)	1.62	84.3	107	0.03	226.1	106.7	0.0008	
ethionfenacarb	135.7 (12.44)	2.30	59.0	58.8 (10.15)	1.08	54.3	166.0 (2.44)	2.42	68.6	231	0.008	385.0	198.8	0.0003	
ethion	28.2 (8.22)	1.74	73.7	82.3 (2.31)	1.03	79.7	134.8 (5.14)	1.85	73.0	158	0.01	243.1	130.6	0.002	
etiprophos	117.3 (4.54)	1.38	85.2	84.8 (2.32)	1.04	81.4	123.7 (3.83)	1.42	86.9	292	0.01	278.1	124.6	0.0002	
etrimifos	123.5 (4.72)	1.61	76.7	81.1 (1.77)	1.05	83.2	128.4 (6.78)	1.55	80.2	121	0.03	293.0	124.7	0.005	
fenitrothion	124.8 (5.38)	1.76	70.8	※2	※2	※2	164.1 (6.63)	2.26	72.5	171	0.004	208.2	94.6	0.0004	
fenobucarb	118.5 (1.20)	1.31	90.5	92.5 (4.69)	1.14	81.3	131.1 (5.65)	1.38	95.1	292	0.01	309.1	156.7	0.001	
fen硫ofluthion	149.4 (6.89)	1.71	87.1	93.4 (1.93)	1.12	83.2	153.8 (3.74)	2.01	76.5	278	0.006	279.0	168.7	0.003	
fenthion	107.1 (5.65)	1.35	79.6	87.2 (2.63)	1.09	80.2	121.4 (2.89)	1.61	75.6	195	0.06	284.1	103.5	0.001	
fosthiazate	143.1 (2.60)	1.83	78.2	95.2 (2.95)	1.15	82.6	170.7 (5.34)	2.14	79.7	255	0.04	346.2	244.9	0.0002	
isofenphos	117.0 (6.21)	1.51	77.5	85.3 (3.13)	1.07	79.4	130.9 (5.69)	1.61	81.5	229	0.02	330.2	200.8	0.001	
isofenphos-oxon	111.7 (5.49)	1.65	67.8	90.6 (2.70)	1.08	83.8	164.3 (4.29)	1.99	82.8	173	0.03	331.2	98.6	0.0008	
malathion	117.8 (8.91)	1.78	66.2	89.2 (5.22)	1.12	79.5	135.3 (6.17)	1.61	83.8	94	0.05	141.8	93.5	0.0009	
methamidophos	106.7 (0.78)	1.34	79.9	75.3 (4.42)	1.09	69.0	85.3 (17.29)	1.25	68.0	145	0.03	303.0	144.6	0.001	
methidathion	151.6 (5.15)	2.08	72.8	82.6 (3.14)	1.14	81.1	175.9 (7.95)	2.37	74.1	72	0.08	237.2	71.6	0.0004	
oxamyl	※3	※3	※3	88.7 (3.19)	1.19	74.5	※3	※3	※3	291	0.02	292.0	235.9	0.009	
parathion	124.2 (3.39)	1.50	82.8	※1	※1	※1	129.5 (4.68)	1.58	82.1	263	0.02	—	—	—	
parathion-methyl	146.3 (3.46)	1.86	78.7	※1	※1	※1	170.7 (7.20)	2.12	80.4	274	0.01	321.1	162.7	0.0005	
phenthoate	106.7 (4.61)	1.36	78.4	90.2 (2.12)	1.09	82.7	126.7 (5.53)	1.58	80.1	260	0.01	261.0	198.8	0.005	
phorate	99.3 (2.29)	1.47	87.4	71.9 (4.34)	0.95	75.8	112.3 (5.11)	1.43	78.4	182	0.02	368.1	181.8	0.0004	
phosalone	220.5 (1.09)	2.54	86.7	91.4 (1.60)	1.08	85.0	193.9 (6.63)	2.71	71.6	160	0.02	318.0	159.7	0.001	
phosmet	280.6 (6.24)	4.65	57.5	107.7 (7.65)	1.37	78.7	319.9 (6.16)	5.57	55.4	166	0.02	239.2	71.6	0.0002	
pirimicarb	118.3 (2.53)	1.43	82.7	93.2 (5.48)	1.18	78.8	121.0 (4.02)	1.36	88.9	290	0.01	306.1	163.8	0.0002	
pirimiphos-methyl	116.3 (0.79)	1.44	80.7	86.0 (0.24)	1.03	83.8	126.2 (3.88)	1.59	78.7	339	0.05	375.0	304.9	0.0004	
profenofos	111.3 (1.84)	1.46	76.5	77.9 (4.75)	1.09	77.8	159.4 (3.26)	1.77	90.2	309	0.02	345.0	240.8	0.001	
prothiofos	80.4 (3.23)	1.44	55.7	63.0 (7.02)	1.00	57.8	83.4 (5.89)	1.53	54.4	360	0.02	361.2	256.9	0.0002	
pyralophos	233.0 (6.40)	3.30	85.7	87.8 (3.15)	1.11	79.5	287.5 (2.90)	3.71	72.2	340	0.02	341.1	188.8	0.0008	
pyridaphenthion	177.5 (9.03)	2.07	85.7	88.3 (3.70)	1.06	83.5	101.5 (3.99)	1.41	67.3	146	0.02	299.1	146.5	0.0005	
quinalphos	110.0 (4.44)	1.52	72.6	86.2 (2.73)	1.04	82.8	123.3 (3.57)	1.46	84.6	231	0.004	289.0	56.6	0.002	
terbufos	93.9 (8.31)	1.37	68.4	69.3 (20.24)	1.14	60.8	116.3 (7.63)	1.61	64.9	88	0.007	—	—	—	
thiomethon	110.6 (8.57)	1.53	72.6	※1	※1	※1	104.1 (7.43)	1.68	89.1	265	0.002	301.0	174.7	0.002	
tolclofos-methyl	107.1 (4.57)	1.32	80.9	91.8 (7.74)	1.07	85.6	115.5 (5.31)	1.40	82.4	95.5	(4.83)	0.93	102.8	—	—

注) マトリックス影響=マトリックス標準のピーク面積/同一濃度の標準標準のピーク面積
 補正後回収率=回収率/マトリックス影響
 定置下層: S/N=10となる濃度
 ※1: 標準品のピークが確認できなかった
 ※2: 感度不足のため定置下層測定できなかった
 ※3: 試験溶液の析出によるピークのため定置下層測定できなかった

報 文

LC-MS による農産物中デメトン-S-メチル, オキシデメトンメチル
およびデメトン-S-メチルスルホンの分析

(平成 20 年 10 月 23 日受理)

上野 英二^{1,*} 梶島 由佳¹ 大島 晴美¹ 大野 勉¹
根本 了² 米谷 民雄^{2,3}Analysis of Demeton-S-methyl, Oxydemeton-methyl and Demeton-S-methylsulfone
in Agricultural Products by LC-MSEiji UENO^{1,*}, Yuka KABASHIMA¹, Harumi OSHIMA¹, Tsutomu OHNO¹,
Satoru NEMOTO² and Tamio MAITANI^{2,3}¹Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6 Nagare, Tsuji-machi,
Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan;²National Institute of Health Science: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan;³ Present address: University of Shizuoka: 52-1 Yada, Suruga-ku,
Shizuoka 422-8526, Japan;

*Corresponding author

We studied the simultaneous determination of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl, and their oxide demeton-S-methylsulfone, in agricultural products by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). The sample homogenized with antioxidants L-ascorbic acid and butylhydroxytoluene was extracted with acetone. An aliquot of the crude extract was reextracted with ethyl acetate by using an EXTrelut[®] column. After hexane/acetonitrile partitioning lipid-rich samples such as cereals, the extract was cleaned up on a PSA column or tandem graphitized carbon/PSA column, and determined by ESI-SIM mode LC-MS. Average recoveries ($n=5$) of compounds from ten kinds of samples fortified at the analyte concentration of $0.05 \mu\text{g/g}$ were from 73.8% to 102.5%, and the relative standard deviations were $\leq 5.7\%$.

(Received October 23, 2008)

Key words: デメトン-S-メチル demeton-S-methyl; オキシデメトンメチル oxydemeton-methyl; デメ
トン-S-メチルスルホン demeton-S-methylsulfone; 農産物 agricultural product; 液体クロマトグ
ラフィー/質量分析法 LC-MS

緒 言

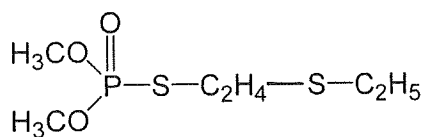
デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルは、浸透移行性の有機リン系殺虫剤であり、日本では農薬として登録されていない。デメトン-S-メチルは、1974年に登録が失効したメチルデメトンの成分として知られており^{1),2)}、急性毒性が高く、皮膚から吸収されやすいことから毒物劇物取締法により特定毒物に指定されている。その構造にチオエーテルを有し、植物体内でスルホキシド体のオキシデメトンメチル、次いでスルホン体のデメトン-S-メチ

ルスルホンに酸化される (Fig. 1)。また、オキシデメトンメチルは、 $\log P_{ow}$ が -0.74 (21°C) と水溶性が高く、強い吸着性があり、熱分解することから GC で測定することができない^{3),4)}。

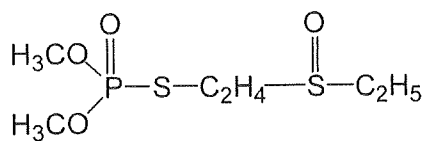
従来、このような酸化されやすい有機リン系農薬の分析法として、農産物からアセトンで抽出し、ジクロロメタンに転溶後、ヘキサン/アセトニトリル分配により脱脂、次いで過マンガン酸カリウムを用いて本体およびスルホキシド体をスルホン体に一括変換し、ジクロロメタンで再抽出して GC-FPD などで測定する方法 (以下、GC 法)^{4)~6)} が一般に用いられている。しかし、GC 法は、環境負荷の大きいジクロロメタンを多量に使用する。その上、デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルで添加回収試験を行ったところ、農産物によっては回収率が大きくばらつき

* 連絡先

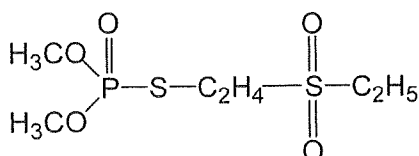
¹ 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1³ 現所属: 静岡県立大学: 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1



Demeton-S-methyl (m.w. 230.3)



Oxydemeton-methyl (m.w. 246.3)



Demeton-S-methylsulfone (m.w. 262.3)

Fig. 1. Structures of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl and demeton-S-methylsulfone

やすいことが判明した。また、デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルは、食品衛生法によりそれぞれ残留基準値が設定されており、これらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホンを含む3成分を別々に定量できる分析法が望ましい。そこで今回、ジクロロメタンを使用することなく、分析上の問題点が多い3成分を精度良く定量可能とするために、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)を用いた同時分析法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は、市販の農産物(玄米, 大豆, ばれいしょ, ほうれんそう, キャベツ, トマト, りんご, いちご, オレンジおよび茶)を用いた。

2. 試薬および標準品

L-アスコルビン酸およびブチルヒドロキシルエンは和光純薬工業(株)の特級品を用いた。その他の試薬は和光純薬工業(株)の残留農薬試験用またはLC-MS用を用いた。

デメトン-S-メチル, オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホン標準品は林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い, アセトニトリルに溶解して1 mg/mL 標準原液とし, メタノールで適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。また, 標準原液をそれぞれアセトンで希釈し, 添加回収試験用の標準溶液とした。

多孔性ケイソウ土カラムはMerck社製EXTrelut® NT

Table 1. Retention times, and monitor ions of 3 compounds obtained by ESI-SIM mode LC-MS

Compound	RT, min	Monitor ion, m/z	
		Target	Qualifier
Oxydemeton-methyl	7.49	247.0	169.0
Demeton-S-methylsulfone	7.80	263.1	265.1
Demeton-S-methyl	14.06	231.0	89.0

20 (20 mL 保持用) を用いた。PSA カラムは Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA(500 mg), グラファイトカーボン/PSA 連結カラムは Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA(500 mg) の手前に Supelco 社製 ENVI-Carb (1,000 mg) を連結したものをそれぞれアセトン 10 mL, 次いでヘキサソ 10 mL で洗浄して用いた。

3. 装置および条件

a 装置

試料細切装置: Retsch 社製 グラインドミキサー GM 200.

LC-MS 装置: (株)島津製作所製 LCMS-2010A システム。

b LC-MS 条件

カラム: (株)資生堂製 Capcell Pak C18 AQ (内径 2 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μm), カラム温度: 40°C, 移動相: A 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液, グラジエント条件: B%濃度 15→95%(16 min)→95%(25 min)→15%(25.01 min)→Stop(39 min), 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 3 μL。

イオン化法: ESI ポジティブ, キャピラリー電圧: 4.5 kV, ヒートブロック温度: 200°C, CDL 温度: 250°C, ネブライザーガス(窒素): 1.5 L/min, ドライングガス(窒素): 10 L/min, 測定モード: SIM, インターバル: 0.8 sec, 保持時間およびモニターイオンは Table 1 に示した。

4. 試験操作

a 細切均一化

必要により 2~3 cm 幅程度に切った試料 500 g に, 10%L-アスコルビン酸水溶液 90 g, 次いで 10%ブチルヒドロキシルエンヘキサソ溶液 10 g を添加後, 細切均一化した。

b 抽出

細切試料 24 g (水分の少ない玄米, 大豆などは 12 g, 茶は 6 g) を量り採り, 玄米, 大豆などは水 12 mL, 茶は水 18 mL を加えて 30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズ抽出し, 3,000 回転/分で 5 分間遠心分離後, 上清を吸引ろ過した。残さはさらにアセトン 50 mL で抽出し, 吸引ろ過した。ろ液を合わせ, アセトンを加えて 200 mL に定容したのち, その 80 mL を 500 mL 容ナスフラスコに採り, 15 mL 以下まで減圧濃縮した。これに塩化ナトリウム 4 g を加えて振り混ぜた。

Table 2. Concentrations of 3 compounds in test solutions of agricultural products spiked with demeton-S-methyl without antioxidant

Sample	Concentration, $\mu\text{g/g}$ ($n=5$) ^{a)}			
	Demeton-S-methyl	Oxydemeton-methyl	Demeton-S-methylsulfone	Total as demeton-S-methyl
	Mean \pm SD ^{b)}	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Brown rice	0.041 \pm 0.003	0.003 \pm 0.001	nd	0.044 \pm 0.002
Soybean	0.031 \pm 0.001	0.010 \pm 0.000	nd	0.040 \pm 0.001
Potato	0.033 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	nd	0.037 \pm 0.001
Spinach	0.028 \pm 0.015	0.016 \pm 0.016	0.000 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001
Cabbage	0.042 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	nd	0.046 \pm 0.001
Tomato	0.048 \pm 0.003	0.004 \pm 0.000	nd	0.051 \pm 0.003
Apple	0.023 \pm 0.005	0.023 \pm 0.006	nd	0.044 \pm 0.001
Strawberry	0.019 \pm 0.011	0.034 \pm 0.013	nd	0.051 \pm 0.002
Orange	0.041 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	nd	0.044 \pm 0.001
Tea	0.024 \pm 0.005	0.028 \pm 0.006	nd	0.050 \pm 0.003

"nd" not detected.

^{a)} Samples were spiked with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of demeton-S-methyl.

^{b)} SD=standard deviation.

のち、多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、15分間放置した。500 mL容ナスフラスコに酢酸エチル 150 mLを加えて洗い込み、これを上記のケイソウ土カラムに注入した。溶出液は、流速を4~5 mL/分に調整して300 mL容ナスフラスコに採り、約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。

c 脱脂

脂質の多い玄米、大豆は、残渣をヘキサン 30 mLに溶解し、100 mL容分液漏斗に移した。300 mL容ナスフラスコにヘキサン飽和アセトニトリル 30 mLを加えて洗い込み、これを上記の分液漏斗に移して5分間振とうし、静置後、アセトニトリル層を分取する操作を2回繰り返した。アセトニトリル層を合わせて約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。

d 精製

残さをアセトン-ヘキサン(1:1) 5 mLに溶解し、色素の少ない玄米、大豆、ばれいしょはPSAカラムに、それ以外はグラファイトカーボン/PSA連結カラムに負荷したのち、アセトン-ヘキサン(1:1) 10 mLで溶出した。溶出液を合わせて約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。この残渣をメタノールで4 mL(玄米、大豆などは2 mL、茶は1 mL)に定容して試験溶液(2 g試料/mL)とした。

e 定量

デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの0.02, 0.05, 0.10, 0.15および0.20 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液3 μL をLC-MSに注入して、ピーク面積法により絶対検量線を作成した。試験溶液についても同様に操作し、混合標準溶液で作成した絶対検量線を用いて、試料中のデメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの濃度をそれぞれ求めた。なお、デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルの定量には、次式を用いた。

デメトン-S-メチルとしての総濃度=デメトン-S-メチルの濃度+オキシデメトンメチルの濃度 \times 0.9350+デメトン-S-メチルスルホンの濃度 \times 0.8780。

オキシデメトンメチルとしての総濃度=オキシデメトンメチルの濃度+デメトン-S-メチルスルホンの濃度 \times 0.9390。

結果および考察

1. LC-MSによる定量

GC法において回収率がバラツキやすい主な原因として、デメトン-S-メチルスルホンもオキシデメトンメチルと同様にGC注入部に吸着して熱分解しやすく、マトリックス効果⁷⁾によるピーク強度の上昇もあって、GCの感度変動が大きいことが考えられた。このためGC法は定量性の点で問題があると判断し、LC-MSを用いることにした。

厚生労働省通知のLC-MSによる農薬等の一斉試験法(以下、通知法)^{*1}に示されているLC条件を用いて検討した。その結果、デメトン-S-メチルは良好なピークが認められたが、極性の高いオキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンはカラムへの保持が弱く、カラムによっては固定相への吸着もあってピークが大きくテーリングした。そこで、吸着が少なく、かつ極性の高い成分を強く保持するカラムとしてCapcell Pak C18 AQを採用し、注入量を5 μL から3 μL に変更したところ、良好なピークが得られた(Fig. 2)。なお、試験溶液は移動相の組成とは異なるが、試料の溶解性および成分の安定性を考慮して通知法と同様にメタノール溶液とした。また、MS条件は、定量イオンとして3成分ともに[M+H]⁺を選択し(Table 1)、各イオンの強度などが最適になるように設定

*1 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”平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)。

Table 3. Concentrations of 3 compounds in test solutions of agricultural products spiked with demeton-S-methyl with L-ascorbic acid and butylhydroxytoluene

Sample	Concentration, $\mu\text{g/g}$ ($n=5$) ^{a)}			
	Demeton-S-methyl	Oxydemeton-methyl	Demeton-S-methylsulfone	Total as demeton-S-methyl
	Mean \pm SD ^{b)}	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Brown rice	0.044 \pm 0.002	nd	nd	0.044 \pm 0.002
Soybean	0.041 \pm 0.001	0.001 \pm 0.000	nd	0.041 \pm 0.001
Potato	0.038 \pm 0.001	0.000 \pm 0.000	nd	0.038 \pm 0.001
Spinach	0.046 \pm 0.002	0.001 \pm 0.000	nd	0.048 \pm 0.002
Cabbage	0.047 \pm 0.001	0.000 \pm 0.000	nd	0.047 \pm 0.001
Tomato	0.048 \pm 0.003	0.000 \pm 0.000	nd	0.049 \pm 0.003
Apple	0.045 \pm 0.002	0.001 \pm 0.001	nd	0.046 \pm 0.001
Strawberry	0.048 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001	nd	0.048 \pm 0.001
Orange	0.045 \pm 0.001	nd	nd	0.045 \pm 0.001
Tea	0.047 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000	nd	0.048 \pm 0.001

"nd" not detected.

^{a)} Samples were spiked with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of demeton-S-methyl.

^{b)} SD=standard deviation.

した。検量線は、デメトン-S-メチルで0.02~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.06~1.5 ng), オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンで0.01~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.03~1.5 ng) の範囲で良好な直線性 ($r > 0.999$) が得られた。

2. 抗酸化剤の添加

細切試料にデメトン-S-メチルの標準溶液 1 mL (試料中濃度 0.05 $\mu\text{g/g}$) を添加後, 1 時間放置したものについて操作し, 試験溶液中の 3 成分の濃度を求めた。その結果, Table 2 に示したようにデメトン-S-メチルとしての総濃度に変化はなかったが, ほうれんそうなど試料によってはデメトン-S-メチルの多くが操作中にオキシデメトンメチルに酸化されることが判明した。なお, オキシデメトンメチルのデメトン-S-メチルスルホンへの酸化はわずかであった。そこで, 抗酸化剤として水溶性のL-アスコルビン酸および脂溶性のブチルヒドロキシルエンを選択し, 添加方法および量について検討した。試料 500 g に対して 5~20% L-アスコルビン酸水溶液 90 g または 5~20% ブチルヒドロキシルエンヘキサン溶液 10 g を添加して細切均一化したものを用いたところ, それぞれ 10% L-アスコルビン酸水溶液 90 g, 10% ブチルヒドロキシルエンヘキサン溶液 10 g の添加によりデメトン-S-メチルの酸化を抑制する効果が高かった。さらに, Table 3 に示したように 10% L-アスコルビン酸水溶液 90 g と 10% ブチルヒドロキシルエンヘキサン溶液 10 g を同時に添加して細切均一化する方法により, 多くの試料でデメトン-S-メチルの酸化がほとんど抑制された。なお, 本検討では酸化を抑制するために, 実験方法に示したように溶媒の留去操作において純度の高い窒素を多用するとともに, 試験溶液の調製までの操作を速やか (6 時間以内) に行った。

3. 酢酸エチル転溶

糖類など水溶性の夾雑成分の除去および脱水のために, 疎水性の溶媒に転溶する方法を検討した。10% 塩化ナトリウムを含む水層 100 mL に対して, 酢酸エチル 100 mL

Table 4. Recoveries of 3 compounds through each cleanup procedure

Compound	Recovery, % ^{a)}		
	EXTrelut column SPE	Hexane/ acetonitrile partitioning	Gra-PSA column SPE ^{b)}
Oxydemeton-methyl	95	102	93
Demeton-S-methylsulfone	97	101	96
Demeton-S-methyl	98	99	101

^{a)} Mean of 3 replicates.

^{b)} Tandem graphitized carbon-PSA column SPE: Each compound in 5 mL acetone-hexane (1:1) was loaded on the column, and eluted with 10 mL acetone-hexane (1:1).

で 2 回転溶したところ, デメトン-S-メチルでは 90% 程度の転溶率が得られたが, 極性の高いオキシデメトンメチルで 30% 程度, デメトン-S-メチルスルホンでは 50% 程度の低い転溶率であった。そこで, 多孔性ケイソウ土カラムを用いて転溶する方法⁸⁾に変更したところ, 酢酸エチル 150 mL でいずれの成分も 95% 以上の良好な転溶率が得られた (Table 4)。なお, 試料によっては多孔性ケイソウ土カラムから水分が溶出した。また, 後述する精製カラムの過負荷による性能低下を防ぐために, 多孔性ケイソウ土カラムへの試料負荷量を 8 g (水分の少ない玄米, 大豆などは 4 g, 茶は 2 g) 相当とした。

4. 脱脂, 精製

ヘキサ/アセトニトリル分配による脱脂法について検討した。ヘキサン層 30 mL に対して, ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 2 回転溶したところ, いずれの成分もほぼ 100% の転溶率 (Table 4) であったので, 脂質の多い玄米, 大豆に対してこの操作を追加した。

また, 通知法に示されているグラファイトカーボン/ NH_2 (500 mg/500 mg) カラムおよび溶出液としてアセトニトリル-トルエン (3:1) を用いる精製法について検討し

た。その結果、ほうれんそう、茶では、グラファイトカーボン層から色素成分が溶出した。その上、これらの成分の影響によりNH₂層から脂肪酸などの夾雑成分が溶出し、試験溶液中に不溶物が認められた。そこで、脂肪酸などの保持容量が多いPSA (500 mg) カラムの手前に、原則としてグラファイトカーボン(1,000 mg)カラムを連結して用いる方法とした。溶出液は、カロテノイド色素や高極性成分の除去効果⁹⁾を考慮してアセトン-ヘキサン(1:1)を用いたところ、3成分は10 mLで溶出した(Table 4)。なお、試験溶液を0.2 μm フィルターでろ過したところ、オキシデメトンメチルの吸着と考えられる損失が認められたことから、この操作を省略した。

5. 添加回収試験

代表的な10種類の農産物の細切試料に、3成分の標準溶液1 mL (試料中濃度 0.05 μg/g) をそれぞれ添加後、1時間放置したものについて回収率を求めた。その結果、Table 5に示したように、73.8~102.5%の回収率、0.9~5.7%の相対標準偏差が得られ、本分析法の良好な定量性が確認された。また、SIMクロマトグラム上に農産物由来の妨害となるようなピークは見られなかった。島津LCMS solutionの解析ソフトウェアを用いて、S/Nが10を与える定量限界値を求めたところ、デメトン-S-メチルで試料中濃度 0.008 μg/g、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンで試料中濃度 0.004 μg/gで

Table 5. Recoveries of 3 compounds from fortified agricultural products

Sample	Recovery, % (n=5) ^{a)}					
	Demeton-S-methyl		Oxydemeton-methyl		Demeton-S-methylsulfone	
	Mean	RSD ^{b)}	Mean	RSD	Mean	RSD
Brown rice	88.6	3.9	92.3	1.7	98.0	2.3
Soybean	83.0	1.9	80.2	2.8	90.9	2.1
Potato	76.9	1.9	77.2	2.0	80.1	4.6
Spinach	95.4	4.1	78.5	3.0	88.0	3.0
Cabbage	93.8	2.8	93.8	1.6	98.7	1.3
Tomato	97.4	5.9	94.3	2.1	80.5	0.9
Apple	92.7	2.9	87.6	4.5	96.8	2.3
Strawberry	96.9	2.0	98.9	2.0	94.6	1.8
Orange	90.4	2.0	82.2	2.7	94.5	3.0
Tea	97.0	2.3	73.8	5.7	102.5	2.8

^{a)} Samples were spiked with 0.05 μg/g of each compound.

^{b)} RSD=relative standard deviation.

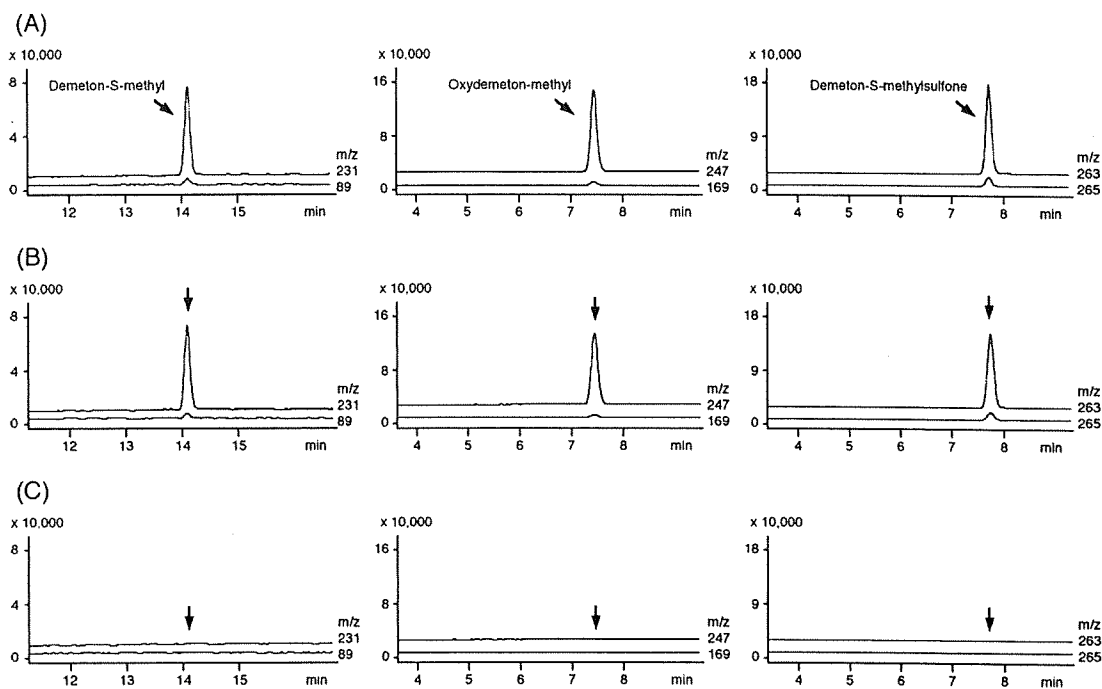


Fig. 2. SIM chromatograms of (A) standard solution of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl and demeton-S-methylsulfone (0.1 μg/mL), (B) extract of brown rice spiked with 0.05 μg/g of each compound, (C) extract of blank brown rice.

あった。Fig. 2に3成分の標準溶液、標準品を添加した玄米の試験溶液および玄米のブランク試験溶液のSIMクロマトグラムを示した。

まとめ

農産物中のデメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびこれらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホン高精度良く定量するための同時分析法を開発した。

1. LC-MSにより、極性が高く、吸着性を有するオキシデメトンメチルなど3成分を良好に分離して定量するシステムが構築できた。

2. 試料に2種類の抗酸化剤を添加する方法などを考案し、デメトン-S-メチルの酸化を大きく抑制することができた。

3. 多孔性ケイソウ土カラムを用いて溶媒転溶する方法などを採用することで、ジクロロメタンの使用を回避することができた。

4. 酢酸エチル転溶、ヘキサン/アセトニトリル分配およびグラファイトカーボン/PSA 連結カラム精製などを組み合わせることで、夾雑成分を効率良く除去することができた。

謝辞 本研究は、平成19年度厚生労働省医薬食品局食品安全部残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入にかかわる分析法開発事業により実施したものである。ご指導いただきました残留農薬等分析法検討会の先生方に感謝いたします。また、本論文の作成にあたり、貴重なご意見をいただいた国立医薬品食品衛生研究所の松田りえ子氏に感謝いたします。

文献

- 1) 毒物劇物取締法制研究会編。新版毒物劇物取扱の手引。東京、時事通信社、2006、p.764-765。(ISBN 4-7887-0659-0)
- 2) Shibuya, S. Kawahata, Y. Kawahata, M. SHIBUYA INDEX (Index of Pesticides) 11th edition, Tokyo, Shibuya Index Research Group, 2006, p. 8.
- 3) Tomlin, C. D. S., The Pesticide Manual 14th edition, UK, British Crop Protection Council, 2006.
- 4) 後藤真康, 加藤誠哉. 残留農薬分析法. 東京, ソフトサイエンス社, 1980, p. 85-86.
- 5) 今月の農業編集室編, 改訂4版農業登録保留基準ハンドブック 作物・水質残留基準と試験法. 東京, 化学工業日報社, 2003, p. 359-360. (ISBN 4-87326-405-7)
- 6) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法改訂版” 東京, 中央法規出版, 2006, p. 331-332. (ISBN 4-8058-2782-3)
- 7) Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M., Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr.*, 638, 57-63 (1993).
- 8) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法改訂版別冊” 東京, 中央法規出版, 2006, p. 45-47. (ISBN 4-8058-2782-3)
- 9) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. *J. AOAC Int.*, 87, 1003-1015 (2004).

Note

Determination Method for Ractopamine in Swine and Cattle Tissues Using LC/MS

(Received February 21, 2007)

Takatoshi SAKAI^{1,*}, Tomomi HITOMI², Kyoko SUGAYA³, Shigemi KAI⁴,
Mitsunori MURAYAMA¹ and Tamio MAITANI¹

¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

²Tochigi Prefectural Northern District Meat Inspection Office: 66-2 Machijima, Otawara-shi, Tochigi 324-0063, Japan; ³Tochigi Prefectural Northern District Health and Welfare

Services Center: 2-14-9 Sumiyoshi-cho, Otawara-shi, Tochigi 324-8585, Japan;

⁴Kanagawa Prefectural Institute of Public Health: 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa 253-0087, Japan; * Corresponding author

Simple and reliable methods using LC/MS have been developed for the determination of the β -agonist ractopamine in swine and cattle tissues. Ractopamine was extracted with ethyl acetate from muscle and liver, and the ethyl acetate layer was evaporated to dryness. The residue was purified by partition with acetonitrile/*n*-hexane. In the case of fat, ractopamine was extracted and purified by partition with acetonitrile/*n*-hexane. The resulting acetonitrile solutions were evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol, and subjected to LC/MS. The LC separation was performed on a Wakosil-II 3C18HG column (150 × 3 mm i.d.) in isocratic mode with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80 : 20) as a mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The MS detection was performed in the selected ion recording (SIR) mode, with detection of the M + H⁺ ion of ractopamine (*m/z* 302) produced by electrospray ionization (ESI). The mean recoveries of the drug from swine muscle (0.01 μ g/g fortified), fat (0.01 μ g/g fortified) and liver (0.04 μ g/g fortified) were 99.7%, 99.5% and 100.8%, and those from cattle samples were 108.3%, 97.0% and 109.4%, respectively. The relative standard deviations (RSDs) ranged from 0.1% to 9.5%. The limit of quantification (LOQ) of the drug was 1 ng/g.

Key words: ractopamine; β -agonist; swine; cattle; LC/MS

Introduction

β -Adrenergic agonists (β -agonists) are widely used as bronchodilators, tocolytics and heart tonics in clinical and veterinary medicine¹⁾. Ractopamine (Fig. 1) is a β -agonist, and the impact of this drug on growth performance and carcass quality has been clearly demonstrated in pig, mainly in terms of increased weight gain and lean tissue accretion, as well as improved feed conversion ratio²⁾⁻⁴⁾. The advantages of feeding pigs with this drug have been reported as increased daily weight gain, improved feed efficiency, saving on feed, increased nitrogen retention and shortened breeding period^{5),6)}.

Recently, veterinary drug residues have become a matter of public concern because of possible adverse effects on human health owing to carryover from drug-treated animals to the human diet. Ractopamine has been approved as a feed supplement in the U.S.A. and Australia. On the other hand, the EU has officially banned the use of such adrenergic drugs as growth-promoting agents and the import of ractopamine-treated meat. In Japan, the use of this drug has also

been banned and maximum residue limits (MRLs) have been set for the drug as shown in Table 1.

Several screening methods for ractopamine have been reported based on enzyme immunoassay (EIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)⁷⁾⁻⁹⁾. The detection limits of these methods were in the 1-50 ng/mL (ppb) range, and the cross-reactivities for other β -agonists were generally less than 0.5%. These methods are able to detect ractopamine without complicated purification, due to the specificity of antibody used, though matrix effects often occur. Other screening methods using HPLC with electrochemical detection^{10),11)}, UV detection¹²⁾, and fluorescence

Table 1. Maximum residue limits (MRLs) for ractopamine in Japan

Animals	Tissues	MRL (ppm)
Cattle and Swine	Muscle	0.01
	Fat	0.01
	Liver	0.04
	Kidney	0.09
	Other edible parts	0.04

detection⁵ have also been reported. These methods are sensitive, but generally require complicated pre-treatments and are also time-consuming for detection of ppb levels of ractopamine (Table 1). The methods using HPLC with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) are highly sensitive^{8, 13, 14}, but these instruments are expensive.

On the other hand, LC/MS systems are widely available, and are sensitive enough to detect ppb levels of ractopamine as listed in Table 1. So, if a simple and reliable method using LC/MS is developed, more inspection agencies will be able to perform residue analysis of ractopamine.

The aim of this study was to develop a simple and reliable method for the quantification and confirmation of trace amounts of ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. The procedure was developed for use in routine monitoring of ractopamine residues, as mandated by the inspection agencies.

Materials and Methods

Samples, chemicals and materials

Swine and cattle tissues (muscle, fat and liver) were purchased from a market in Tokyo, Japan. These samples were stored at -40°C until analysis. Standard ractopamine hydrochloride was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Ractopamine standard solutions were prepared as described below. A standard stock solution containing $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of ractopamine was prepared in methanol, and the solution was diluted successively with methanol. These standard solutions were stored at -20°C until analysis. All the solvents used were of LC grade and other chemicals used were of analytical grade unless otherwise stated.

Liquid chromatograph and mass spectrometer

Alliance 2695 separation module liquid chromatograph (Waters, Co., Milford, MA, USA) coupled with a micromass ZQ 2000 mass spectrometer (Waters).

LC/MS conditions

Column: Wakosil-II 3C18HG ($150 \times 3\ \text{mm i.d.}$, $3\ \mu\text{m}$, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Column oven temperature: 40°C

Mobile phase composition: 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80 : 20)

Flow rate: 0.4 mL/min

Source temperature: 100°C

Desolvation temperature: 350°C

Gas: nitrogen, flow rate: ca. 360 L/hr

Capillary voltage: 3.5 kV

Ionization mode: ESI, positive ion mode

Measuring mode: SIR

Monitoring ion: $m/z\ 302$

Cone voltage: 20 V

Sample preparation

For meat and liver, a finely chopped sample (5.0 g)

was weighed into a 50 mL centrifuge tube. Then 20 mL of ethyl acetate and 1 mL of 4 mol/L potassium carbonate solution were added to the tube, and the sample was homogenized for 2 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The ethyl acetate layer was transferred to a recovery flask, and 20 mL of ethyl acetate was added to the pellet in the tube. The mixture was homogenized and centrifuged. The resulting ethyl acetate solutions were combined and evaporated to dryness below 40°C . The residue was dissolved in 30 mL of acetonitrile, and the acetonitrile solution was vigorously shaken twice with 30 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile. The resulting acetonitrile solution was evaporated to dryness, and the residue was redissolved in 1.0 mL of methanol.

For fat samples, preparation of the test solution was performed as described below. A sample (5.0 g) was weighed into a 250 mL glass tube. Then 30 mL of acetonitrile and an equivalent volume of *n*-hexane saturated with acetonitrile were added, and the sample was homogenized for 2 min and centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. The acetonitrile layer was transferred to a recovery flask, and 30 mL of acetonitrile was added to the glass tube. The mixture was homogenized and centrifuged. The two acetonitrile layers were combined and defatted with 30 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile. The acetonitrile layer was evaporated to dryness, and the residue was redissolved in 1.0 mL of methanol.

Determination of ractopamine

Determination of ractopamine was performed by LC/MS. Aliquots of $2\ \mu\text{L}$ of the ractopamine standard solutions and the test solutions were injected into the LC/MS system. The quantification was performed by calculating the peak areas. Detection was performed by SIR at $m/z\ 302$.

Results and Discussion

MS conditions

Ractopamine is a basic compound possessing an amino group (Fig. 1). Therefore, the positive ESI mode was applied for the analysis of this drug. In the MS spectrum of ractopamine, the proton adduct of the ractopamine molecule ($\text{M} + \text{H}^+$) ($m/z\ 302$) was observed as a base peak. Therefore, the $m/z\ 302$ ion was selected as the monitor ion for SIR. The cone voltage was set to 20 V, since the monitoring ion ($m/z\ 302$) was observed most strongly.

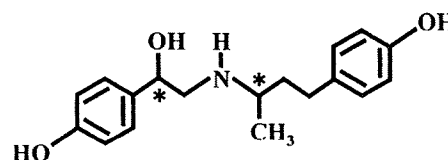


Fig. 1. Structure of the β -agonist ractopamine

The asterisks indicate asymmetric carbon atoms.

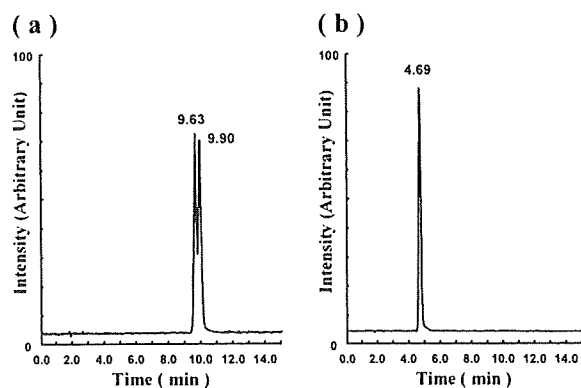


Fig. 2. Chromatograms of ractopamine standard solutions with two different mobile phases

0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ractopamine standard solution was injected into the LC/MS with the mobile phase of 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (85:15) (a) or (80:20) (b).

HPLC conditions

A standard C18 column, which is generally used for the analysis of veterinary drugs, was selected as the analytical HPLC column.

Acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid were selected as the mobile phase and the flow rate was set to 0.4 mL/min, based on the Multiresidue Method I for Veterinary Drugs, etc. by HPLC (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan).

The standard solution of ractopamine was subjected to LC/MS using 2 different mobile phases (0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20 and 85:15)). The chromatograms obtained are shown in Fig. 2. The peak obtained was very sharp with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20), whereas it was slightly broadened with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (85:15). It was considered that the isomers of ractopamine were partially separated in the latter mobile phase.

The MRLs for ractopamine are set as the total concentration of these isomers. Therefore the mobile phase of 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20) was selected in this study and the ractopamine was determined based on the one peak.

Extraction and clean-up

First, solvents for the extraction of ractopamine were investigated. Almost all added ractopamine was extracted by using methanol/acetic acid¹⁾, methanol⁵⁾ or acetonitrile, but materials which interfered with the determination of ractopamine were also extracted. Therefore, we used ethyl acetate as a solvent for extraction, and transferred un-ionized ractopamine to the ethyl acetate layer by adding 4 mol/L potassium carbonate. This method could extract ractopamine almost entirely, without extracting any interfering material. In the case of fat, ractopamine was extracted and purified by partition with acetonitrile/*n*-hexane, because no interfering material was extracted.

Table 2. Results of recovery tests for ractopamine

	Fortified (ppm)	Swine		Cattle	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Muscle	0.01	99.7	6.6	108.3	0.1
Fat	0.01	99.5	9.5	97.0	0.1
Liver	0.04	100.8	5.7	109.4	1.9

n = 3

Next, clean-up procedures were investigated using several cartridge columns (polymer, C18 reverse phase and cation-exchange type). The retention and elution of ractopamine were good in the case of the standard solution, but less good in the case of food matrices, and the recoveries varied widely. So, the chosen clean-up procedure consisted of only partition with acetonitrile/*n*-hexane, without using the cartridge columns.

With such a simple method, the extraction of ractopamine was achieved with high recovery and high reproducibility, without interfering peaks on the chromatograms.

Recovery test and precision of analysis

The results of recovery tests are shown in Table 2. Ractopamine was added to muscle and fat at the level of 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$, and added to liver at the level of 0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$. These samples were analyzed by the proposed methods. Mean recoveries of ractopamine from swine tissues were 99.5–100.8%, and those from cattle tissues were 97.0–109.4%. The RSDs (*n* = 3) ranged from 5.7% to 9.5% for swine samples, and from 0.1% to 1.9% for cattle samples. The LOQ was 1 ng/g (*S/N* = 10). These results satisfied the standards for residual analysis of veterinary drugs in foods established by the Codex Alimentarius Commission (CAC). Therefore the method proposed in this study offers good performance for the analysis of ractopamine residues in foods.

Conclusion

A simple and reliable method using LC/MS has been developed for the determination of ractopamine in swine and cattle tissues. The method consists of extraction with ethyl acetate for muscle and liver and with acetonitrile/*n*-hexane for fat, clean-up by extraction with acetonitrile/*n*-hexane saturated with acetonitrile, and determination using LC/MS (SIR mode).

The mean recoveries of ractopamine from swine samples were 99.5–100.8%, and those from cattle samples were 97.0–109.4%. The RSDs ranged from 0.1% to 9.5% (*n* = 3). The LOQ was 1 ng/g (*S/N* = 10). These results meet the standards for residual analysis of veterinary drugs in foods established by CAC. Therefore, the simple method developed in the present study is suitable for routine monitoring of ractopamine.

References

- 1) Antignac, J. P., Marchand, P., Bizec, B. L., Andre, F., Identification of ractopamine residues in tissue and urine

- samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **774**, 59-66 (2002).
- 2) Gu, Y., Schinckel, A. P., Forrest, J. C., Kuei, C. H., Watkins, L. E., Effects of ractopamine, genotype, and growth phase on finishing performance and carcass value in swine: I. Growth performance and carcass merit. *J. Anim. Sci.*, **69**, 2685-2693 (1991).
 - 3) Engeseth, N. J., Lee, K. O., Bergen, W. G., Helferich, W. G., Knudson, B. K., Merkel, R. A., Fatty acid profiles of lipid depots and cholesterol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed ractopamine. *J. Food Sci.*, **57**, 1060-1062 (1992).
 - 4) Siites, C. R., McKeith, F. K., Singh, S. D., Bechtel, P. J., Mowrey, D. H., Jones, D. J., The effect of ractopamine hydrochloride on the carcass cutting yields of finishing swine. *J. Anim. Sci.*, **69**, 3094-3101 (1991).
 - 5) Shishani, E. I., Chai, S. C., Jamokha, S., Aznar, G., Hoffman, M. K., Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **483**, 137-145 (2003).
 - 6) Watkins, L. E., Jones, D. J., Mowrey, D. J., Anderson, D. B., Veenhuizen, E. L., The effect of various levels of ractopamine hydrochloride on the performance and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.*, **68**, 3588-3595 (1990).
 - 7) Haasnoot, W., Stouten, P., Lommen, A., Gazemier, G., Hooijerink, D., Schilt, R., Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay. *Analyst*, **119**, 2675-2680 (1994).
 - 8) Elliott, C. T., Thompson, C. S., Arts, C. J., Crooks, S. R., Baak, M. J., Verheij, E. R., Baxter, G. A., Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the β -agonist. *Analyst*, **123**, 1103-1107 (1998).
 - 9) Shelver, W. L., Smith, D. J., Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine. *J. Immunoassay*, **21**, 1-23 (2000).
 - 10) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with coulometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 1394-1402 (1995).
 - 11) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine in monkey plasma and swine serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, **26**, 279-285 (1996).
 - 12) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine hydrochloride in swine, cattle, and turkey feeds by liquid chromatography with coulometric detection. *J. AOAC Int.*, **77**, 840-847 (1994).
 - 13) Churchwell, M. I., Holder, C. L., Little, D., Preece, S., Smith, D. J., Doerge, D. R., Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residues in livestock tissues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1261-1265 (2002).
 - 14) Fesser, A. C., Dickson, L. C., MacNeil, J. D., Patterson, J. R., Lee, S., Gedir, R., Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **88**, 61-69 (2005).

報 文

LC-MS/MS による畜水産食品中のビコザマイシンの定量

(平成 20 年 10 月 7 日受理)

藤田和弘^{1,*} 仲西亜希子¹ 石原三知代¹ 伊藤裕信¹
 中村宗知¹ 渡井正俊¹ 谷口 誠² 村山三徳³

Determination of Bicozamycin in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Kazuhiro FUJITA^{1,*}, Akiko NAKANISHI¹, Michiyo ISHIHARA¹, Hironobu ITO¹, Munetomo NAKAMURA¹, Masatoshi WATAI¹, Makoto TANIGUCHI² and Mitsunori MURAYAMA³

¹ Japan Food Research Laboratories: 7-4-41 Saitoasagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan;

² Mimasaka University: 50 Kitazono-cho, Tsuyama, Okayama, 708-8511, Japan;

³ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan: *Corresponding author

A novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for trace residue determination of bicozamycin (BZM) in livestock products and seafoods. BZM was extracted from a sample with acetonitrile-water (4:1), followed by a two-stage SPE enrichment and cleanup. The first stage involved a styrene-divinylbenzene copolymer cartridge (GL-Pak PLS-2), and the second stage involved a divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer cartridge (Oasis HLB). The LC separation was performed on a C18 column using 0.01% formic acid-methanol (8:2) as the mobile phase and MS detection with negative ion electrospray ionization. The mean recoveries from swine muscle, liver, yellowtail, and milk fortified at the minimum residue limit (MRL) levels and 0.01 µg/g were >70%, and the relative standard deviations (RSDs) were <20%. Limits of quantitation (LOQs) ranged from 0.002 to 0.005 µg/g.

(Received October 7, 2008)

Key words: ビコザマイシン bicozamycin; 畜産食品 livestock product; 水産食品 seafood; 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC-MS/MS

緒 言

ビコザマイシン (BZM) は, *Streptomyces sapporonensis* から産生される抗生物質で, Fig. 1 に示す構造を有し, *Escherichia coli*, *Salmonella* などのグラム陰性菌に対して抗菌作用を有している。わが国においては, 飼料添加物として鶏用および豚用飼料への使用が認められており, また, 安息香酸塩は水産用医薬品としてスズキ目魚類への使用が認められている。これらのことから, 薬剤が不適切な使用をされた場合, 家畜などへの残留が懸念される。

BZM の化学的な残留分析法としては, 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) により分離し, デンシトメトリーで蛍光検出する方法¹⁾と UV 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾による方法が報告されてい

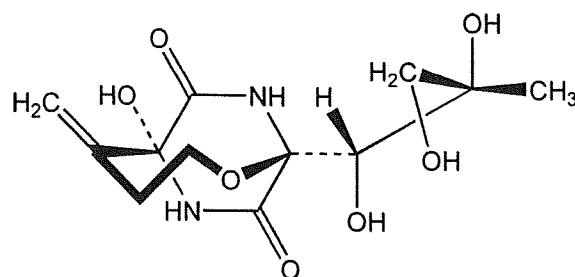


Fig. 1. Chemical structure of BZM.

るが, ポジティブリスト制度において設定された暫定基準値をクリアできる検出感度を有していない。

そこで著者らは, 種々のポリマー系カートリッジに対する BZM の挙動を確認した後, 2 種類のカートリッジを用いて濃縮・精製した後, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による方法を検討したところ, 良好な結果が得られたので報告する。

* 連絡先

¹ 財団法人 日本食品分析センター: 〒567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-4-41

² 美作大学: 〒708-8511 岡山県津山市北園町 50

³ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1. 試料

試料は大阪府内で市販されていた豚筋肉、豚肝臓、ブリオよび牛乳を使用した。

2. 試薬等

標準品: BZM は独立行政法人農林水産消費安全技術センター検定品 (力価 916.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$) を用いた。

標準溶液: BZM 標準品 20 mg (力価として) を精密に量り、メタノール 20 mL に溶解して標準原液 (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とし、標準溶液は用時適宜 0.01% ギ酸で希釈して調製した。なお、標準原液は -25°C で保存した。

GL-Pak PLS-2 カートリッジ (500 mg): ジーエルサイエンス社製、カートリッジはあらかじめメタノール 10 mL および水 10 mL でコンディショニングした後、使用した。

Oasis HLB カートリッジ (60 mg): Waters 社製、カートリッジはあらかじめメタノール 5 mL および水 5 mL でコンディショニングした後、使用した。

試薬: メタノールおよびギ酸は LC/MS 用を、その他の試薬は市販特級品を、水は Millipore 社製 Milli-Q 超純水製造装置で精製した水を使用した。

メンブランフィルター: Millipore 社製 Millex-LG 0.20 μm

3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフは、島津製作所社製 LC-20 シリーズ、タンデム質量分析装置は Applied Biosystems 社製 4000Qtrap を用い、Table 1 および 2 に示した条件で測定した。

4. 検量線

BZM 標準原液を 0.01% ギ酸で希釈し、0.5~25 ng/mL の標準溶液を調製し、その 5 μL を LC-MS/MS に注入した。検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

Table 1. Operating conditions of MS/MS

Ionization	ESI, negative	
Ion spray voltage	-4,500 V	
Ion spray temp.	450°C	
Declustering potential	-40 V	
Dwell time	150 ms	
Curtain gas	20 psi	
Collision gas	6 psi	
Nebulizer gas	60 psi	
MRM Transition (m/z)	CE*1 (eV)	CXP*2 (V)
301→209*3	-22	-3
301→184	-18	-5
301→124	-34	-7

*1 Collision energy.

*2 Collision exit potential.

*3 Daughter ion for quantitation.

Table 2. Operating conditions of LC

Column	Hydrosphere C18 HS-301-3, (3 μm , 100/4.6 mm i.d.)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Oven temp.	40°C		
Injection volume	5 μL		
Eluent	A=0.01% Formic acid, B=Methanol		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00→10.00	100	0
	10.01→24.00	80	20
	24.01→34.00	100	0

5. 試験溶液の調製

試料 5.0 g を採取し、アセトニトリル-水 (4:1) 40 mL を加えてホモジナイズ (30 秒間) した後、遠心分離 (3,500 rpm, 20°C, 5 分間) し、上澄み液を分取した。残留物にさらにアセトニトリル-水 (4:1) 40 mL を加えて 5 分間振とう抽出した後、同様に遠心分離した。上澄み液を先のものと同合わせ、アセトニトリル-水 (4:1) で 100 mL に定容し、その 20 mL を分取した後、1-プロパノール 5 mL を加えて減圧下濃縮乾固した。残留物に 2% 塩化ナトリウム溶液 30 mL およびジエチルエーテル 30 mL を加えて 5 分間振とうした後、遠心分離 (3,500 rpm, 20°C, 5 分間) して水層を分取し、1-プロパノール 10 mL を加えて再度濃縮乾固した。残留物を水 10 mL (5 mL \times 2 回) に溶解して、GL-Pak PLS-2 カートリッジに負荷し、カートリッジを水 5 mL で洗浄後、メタノール-水 (3:2) 10 mL で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、残留物を 0.01% ギ酸 10 mL に溶解した後、Oasis HLB カートリッジに負荷した。通過液の最初の 4 mL を廃棄し、残りの 6 mL を分取してメンブランフィルターでろ過して試験溶液とし、この 5 μL を LC-MS/MS に注入した。

結果および考察

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

1.1 MS/MS 条件の検討

BZM は、極性が高い化合物であることから、イオン化のインターフェイスとして ESI を選択した。標準溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をインフュージョン法により直接 MS 部に導入してイオン化条件を検討した。その結果、Fig. 2 に示すように、脱プロトン化分子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z 301) を高感度に検出することができたため、このイオンをプレカーサーイオンとして選択し、イオン化電圧ならびにコリジョンエネルギーなどの最適化を行った。Fig. 3 にプロダクトイオンのマススペクトルを示した。この結果から、プロダクトイオンには、 m/z 301 > 209, m/z 301 > 184, m/z 301 > 124 の 3 イオンを採用し、最も高感度な m/z 301 > 209 を定量用イオンとし、MRM モードで測定することとした (Table 1)。