

201033033A

厚生労働科学研究成費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

# 食品中残留農薬等のスクリーニング分析法 の開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

平成 23(2011)年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 食品中残留農薬等のスクリーニング分析法の開発に関する研究 ----- 1  
根本 了

## II. 分担研究報告

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発 ----- 11  
根本 了  
齊藤 静夏
2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発 -- 41  
坂井 隆敏

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 67

## I. 総括研究報告

### 食品中残留農薬等のスクリーニング分析法 の開発に関する研究

研究代表者 根本 了

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
平成 22 年度総括研究報告書

食品中残留農薬等のスクリーニング分析法の開発に関する研究

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度の導入にともない、基準値が設定された農薬等は現在 820 品目を超える。更に、食品中の残留農薬等の安全性を確保するためには、このような膨大な数の品目について農産物及び畜水産物中の残留濃度を正確にかつ迅速に測定する必要があり、そのためにはより効率的で信頼性の高いスクリーニング分析法の開発が不可欠である。本研究では、食品に残留する農薬等のより効率的な検査の実施に資するスクリーニング分析法を開発するために、次の2つの分担研究を実施した。

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

農産物中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法開発の一環として、測定における効率化を図るため、LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討した。農産物中の残留農薬の一斉分析に適した TOFMS 条件を ESI(+)及び ESI(-)、それぞれについて詳細に検討し、最適化を行った。また、食品マトリックスの影響を受けにくい LC 測定条件や、フラグメントイオンを用いた確認方法についても検討した。最適化した条件で 154 農薬(ESI(+))134 農薬, ESI(-))73 農薬)について、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性を大豆及びほうれんそうのマトリックス標準溶液を用いて評価した。その結果、ESI(+))では約 96%, ESI(-))では約 60%の農薬で定量限界(S/N $\geq$ 10)が一律基準レベル(0.01 mg/kg)以下となった。また、定量限界以上の濃度では大部分の農薬が食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬(農薬等)の包括的スクリーニング分析法の開発を試みた。初年度である平成 22 年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法の開発を中心に検討を行った。その結果、抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、融解・再固化した牛の脂肪から幅広い物性の農薬等を脂肪とともに効率的に抽出することが可能であった。また、脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配後に C18 ミニカラムで精製する方法について詳細に検討したところ、検討した方法は抽出脂肪等を効果的に除去することができ、幅広い物性の農薬等に適用可能であった。

## 研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所  
食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所  
食品部主任研究官)

## 研究協力者

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

### A. 研究目的

#### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

食品中の残留農薬の分析では、高感度・高選択的な LC-MS/MS や GC-MS/MS 等の四重極型質量分析計が汎用されているが、これらは設定したイオンのみしか検出できないことや、データポイント数の制約により何百もの化合物を同時測定することは困難等の問題点がある。一方、LC-TOFMS や GC-TOFMS 等の飛行時間型質量分析計(TOFMS)を用いた測定では、四重極型質量分析計と異なり、化合物ごとの測定イオンや MS パラメーターの設定は不要であり、同時に測定可能な化合物数にも制限はないため、対象化合物の網羅的な測定が可能である。そこで、本研究では TOFMS の網羅的な測定が可能であるという特徴に着目し、LC-TOFMS の農産物中の残留農薬分析への活用について検討した。22 年度は、農産物中の残留農薬の一斉分析に適した LC-TOFMS の測定条件について詳細に検討した。最適化した測定条件で、154 農薬について食品マトリックスを用いて各農薬の定量性や定量限界等を評価し、LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討した。

#### 2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

畜水産物中の農薬等の一斉試験法としては、

動物用医薬品を対象とする 3 試験法と農薬を対象とする 2 試験法がそれぞれ通知されているが、動物用医薬品と農薬の両方を対象とする試験法は示されていない。そのため、畜水産物の残留農薬等の検査では、動物用医薬品と農薬を別々の方法で検査する必要がある。

そこで本研究では、検査機関における畜水産物のより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬を共通の方法で分析可能な、包括的一斉スクリーニング分析法の開発を試みた。22 年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの動物用医薬品及び農薬を効率的に抽出可能な抽出方法及び脱脂精製法の開発を中心に検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

農薬は様々な構造や分子量を持つことから、残留農薬の一斉分析を行う際には、幅広い農薬に適した代表的な TOFMS 条件を設定する必要がある。そこで、分子量の異なる代表的な 10 農薬(分子量範囲 162~873: ESI(+)<sup>5</sup> 農薬, ESI(-)<sup>5</sup> 農薬)を用いて TOFMS 条件の最適化を行った。最適化に当たっては、用いた TOFMS 装置で設定可能であり、かつ、化合物により最適値が異なると予想されたキャピラリー電圧、コーン電圧及びアパーチャー1 電圧の3種類のパラメーターを ESI(+)<sup>5</sup> 及び ESI(-)<sup>5</sup>、それぞれについて検討した。

次に、LC-TOFMS 測定条件の検討を行った。TOFMS 測定条件としては、各農薬の定量イオン、定量イオンの質量確度及び抽出質量幅(mass window)について検討した。LC 条件としては、流速、グラジエント条件、注入量、再現性及び検

量線について検討した。更に、得られた LC-TOFMS 測定条件について、大豆及びほうれんそうのマトリックス標準溶液を用いて、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性について検討した。

また、より信頼性の高い測定系を確立するため、確認方法について検討を行った。検討に当たっては、同位体パターンによる確認が困難な農薬に対応するため、インソース衝突誘起解離 (in-source CID) によって生成させた、フラグメントイオンを用いる方法について検討した。

## 2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

種々の畜水産物中の残留農薬等を効率的に分析するためには、様々な物性の農薬等を対象として、試料からの効率的な抽出方法、複雑な試料マトリックスを効果的に除去する方法を検討する必要がある。そこで、先ず、畜水産物に基準値が設定されている約 600 の農薬等の中から log Pow 値を指標として低極性から高極性まで偏りなく、合計 164 化合物[動物用医薬品 61 化合物、農薬 86 化合物及び農薬かつ動物用医薬品として使用される品目(農薬兼動物薬) 17 化合物]を選択し、選択した検討対象化合物の LC-MS/MS 一斉測定法を開発した。

抽出溶媒の検討では、牛の脂肪を試料に用いて、メタノール、エタノール、アセトン及び *n*-ヘキサンの抽出挙動(固体脂肪の分散状況、抽出脂肪量)を検討し、畜水産物の抽出に適した抽出溶媒を選択した。次いで、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂方法について詳細に検討し、分配に用いるアセトニトリル及び *n*-ヘキサンの組成の脱脂効果及び検討対象化合物の回収率に与える影響について検討した。更に、追加の脱脂方法として、C18 ミニカラムによる脱脂効果につ

いて検討し、各検討対象化合物の溶出条件の検討及び脱脂精製効果の確認を行った。

次に、抽出溶媒として選択したアセトンの畜水産物に対する農薬等の抽出状況を評価した。即ち、融解した牛の脂肪に検討対象化合物を添加し、再固化させた試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配後、C18 ミニカラム(1,000 mg)で脱脂・精製したのち、LC-MS/MS 測定して各検討対象化合物の回収率を求めるとともに、食品マトリックスの測定への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

分子量の異なる 10 農薬について、各農薬のピーク面積の変化を指標として TOFMS 条件の最適化を行った。その結果、キャピラリー電圧、コーン電圧及びアパーチャー1 電圧の最適値は、それぞれ 3000 V, 25 V 及び 5 V であった。

LC-TOFMS 測定条件の検討では、先ず移動相に 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(A 液)及びメタノール溶液(B 液)を用いて 154 農薬[ESI(+):134 農薬, ESI(-):73 農薬]を測定し、観察されたイオンのうち S/N 比が最も高いイオンを定量イオンとした。次に、各農薬の定量イオンの質量確度を求めたところ、ESI(+ )及び ESI(-)ともに検討したすべての農薬で $\pm 5$  ppm 以内であり、精密質量数測定に関して良好な精度が得られた。また、最適な抽出質量幅について検討した結果、測定精度の点から抽出質量幅は $\pm 10$  mDa 以上に設定するのがよいと考えられた。LC 条件については、農薬のピーク形状、食

品マトリックスの測定への影響等を考慮し、流速 0.3 mL/min, グラジエント条件[0分(A:B=95:5)→10分(A:B=5:95)→15分(A:B=5:95)→15.1分(A:B=0:100)→25分(A:B=0:100)→25.1分(A:B=95:5)]及び注入量 3 µL を決定した。得られた LC 条件では、検討したすべての農薬において、ピーク面積値の相対標準偏差 (RSD) は 10% 以内、保持時間の RSD は 0.5% 未満であり、良好な再現性が得られた。検量線については、0.005~0.1 µg/mL の範囲では検討したすべての農薬で  $r > 0.995$  となったが、高濃度 (0.5 µg/mL 以上) の測定では、大部分の農薬で直線性が低下した。

得られた LC-TOFMS 測定条件が実際の農産物中の残留農薬分析に適用可能かを評価するために、大豆及びほうれんそうのマトリックス標準溶液を用いて、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性について検討した。その結果、高濃度 (0.1 µg/mL, 試料中 0.1 ppm 相当) では、ESI(+) 及び ESI(-) とともに、検討したほぼすべての農薬でマトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。低濃度 (0.01 µg/mL, 試料 0.01 ppm 相当) では、 $S/N \geq 10$  のピークが得られた農薬数は、ESI(+) 及び ESI(-) でそれぞれ検討対象農薬の約 96% 及び約 60% であり、ESI(-) の方が一律基準レベル (0.01 ppm) を定量できない農薬の割合が高かった。 $S/N \geq 10$  のピークが得られた農薬については、ESI(+) 及び ESI(-) とともに一律基準レベルにおいても食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく、測定可能であった。また、ブランク試験溶液の測定では、定量を妨害するピークは観察されず、選択性に問題はなかった。

次に、確認方法として、フラグメントイオンを用いる方法について検討した。定量測定に用いた

LC-TOFMS 測定条件では、測定感度を優先させるため、農薬によっては確認に必要なフラグメントイオンの生成が少ない場合がある。用いた TOFMS 装置ではアパーチャー1 電圧を高くすることにより、インソース衝突誘起解離によるフラグメンテーションが起りやすくなる。そこで、分子量の異なる 10 農薬を用いて、フラグメントイオンの測定に適したアパーチャー1 電圧を検討した。その結果、主なフラグメントイオンのピーク面積はアパーチャー1 電圧 20~50 V で最大となり、30 V 付近で最大となるものが多かったことから、フラグメントイオンの測定においてはフラグメンテーションを起こしやすい農薬では 20 V, そのほかの農薬では 30~50 V に設定するのが良いと考えられた。

## 2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

選択した検討対象化合物について、LC-MS/MS 測定条件の最適化を行ったところ、全ての検討対象化合物について、0.01 µg/mL の標準溶液を測定可能 ( $S/N \geq 10$ ) であった。

牛の脂肪にメタノール、エタノール、アセトンもしくは *n*-ヘキサンを加えてホモジナイズしたところ、メタノールでは脂肪が均一に分散するまでに多少の時間を要したが、全ての検討溶媒で脂肪を均一に分散ないし溶解させることが可能であった。また、抽出脂肪量は、メタノール、エタノール、アセトン及び *n*-ヘキサンでそれぞれ 0.18 g, 1.41 g, 4.44 g 及び 4.47 g であった。

アセトニトリル/ヘキサン分配に用いる溶媒の組合せとして、アセトニトリル及び *n*-ヘキサン、アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンについて検討した。その結果

, アセトニトリルを *n*-ヘキサンで飽和させた場合には, 飽和させない場合よりも, アセトニトリル層への脂肪の抽出が少なかった. 一方, *n*-ヘキサンのアセトニトリルでの飽和の有無による, アセトニトリル層への脂肪の抽出量の変化は見られなかった. C18 ミニカラムからの各検討対象化合物の溶出溶媒について, アセトニトリルとメタノールについて検討した結果, メタノール 10 mL で良好に溶出された. また, カラムへの負荷溶媒についてはアセトニトリルとメタノールとで結果に差は認められなかった.

融解した牛の脂肪に検討対象化合物を添加し, 再固化させた試料からアセトンで抽出後, 脱脂精製して回収率を求めたところ, 回収率 70~120%であったのは, 溶媒で調製した標準溶液で定量した場合は 93 化合物であったのに対し, マトリックス添加標準溶液で補正した場合には 141 化合物であった.

#### D. 考察

##### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

分子量の異なる 10 農薬(分子量範囲 162~873)を用いて, TOFMS 条件(キャピラリー電圧, コーン電圧及びアパーチャー1 電圧)の最適化を行い, 広範囲の農薬に対して適用可能な条件を設定することができた. また, 154 農薬の定量イオンについて検討するとともに, 各農薬の定量イオンの質量確度, 最適な抽出質量幅について検討し, 高感度で精度の良い測定条件が得られた. また, LC 条件(流速, グラジエント条件及び注入量)について検討し, 食品マトリックスの影響を受けにくく, 再現性良く 154 農薬を一斉分析可能な LC-TOFMS 条件が得られた. 得られた LC-TOFMS 測定条件では, 0.1  $\mu\text{g/mL}$ (試料中 0.1 ppm 相当)では, 検討したほぼすべての農薬

でマトリックスによる大きな影響を受けることなく定量可能であった. しかし, 0.01  $\mu\text{g/mL}$ (試料 0.01 ppm 相当)では, ESI(-)測定で検討農薬の約 40%で一律基準レベル(0.01 ppm)を定量できなかったことから, 試験溶液の濃縮倍率の変更などより高感度化の検討が必要と思われた. 選択性については, 大豆及びほうれんそうを用いた検討ではあるが, 一律基準レベルにおいても食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量可能であったことから, 精密質量数を用いた TOFMS 測定は, 複雑な夾雑成分を含む食品中の残留農薬分析に有効な方法と考えられた. 更に, インソース衝突誘起解離によるフラグメンテーションを利用した確認方法の検討から, 定量測定ではアパーチャー1 電圧を低くして分子イオンを検出し, 確認用の測定ではアパーチャー1 電圧を上げることでフラグメンテーションを起こさせて, フラグメントイオン情報を得ることが可能であった. TOFMS 測定の精密質量情報にフラグメントイオン情報を加えることにより, より信頼性の高い分析が可能と思われる.

##### 2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

選択した検討対象化合物について, 一律基準値(0.01 ppm)レベルでの正確な定量が可能な LC-MS/MS 測定法を開発した.

畜水産物からの農薬等の抽出に用いる抽出溶媒としては, 脂肪の溶解性・分散性が高く, 液体試料との混和性も良好であり, 且つ低極性から高極性まで幅広い物性の農薬等の溶解性も高い溶媒が必要である. メタノール, エタノール, アセトン及び *n*-ヘキサンについて検討した結果, これらの条件を満たしている溶媒としてアセトンを選択した.

アセトン抽出後の脱脂方法として, アセトニトリ



ル/ヘキサン分配及びC18ミニカラム精製について検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配については、分配に用いるアセトニトリルは、*n*-ヘキサンで飽和した方が脱脂効果が向上するが、*n*-ヘキサンは、アセトニトリルで飽和する必要性は認められなかった。よって、アセトニトリル/ヘキサン分配は、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサンを用いることとした。C18 ミニカラム精製については、アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層の溶媒をメタノールに置換することなく、濃縮してミニカラムに負荷し、メタノールで溶出することで、検討対象化合物の損失を抑えることが可能であった。抽出脂肪 200 mg を上記の方法により精製した時の残留物量は 0.4 mg(負荷抽出脂肪の 0.2%)であり、高い脱脂効果が得られた。

融解・再固化させた脂肪を用いて、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラムにより脱脂・精製する方法を用いて得られた回収率(マトリックス添加標準溶液で定量した回収率)と保持時間との関係を求めた。その結果、検討対象化合物の保持時間に依らず回収率は概ね 75~120%の範囲内であったことから、アセトンにより低極性から高極性まで幅広い物性の農薬等を固体脂肪から効率的に抽出可能であることが示唆された。しかし、LC-MS/MS 測定を妨害する畜水産物試料由来マトリックス成分の除去が不十分であったことから、更に効果的な精製方法の確立及び分析法への追加が必要と思われた。

## E. 結論

### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

本研究では LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討し、農産物中の残留農

薬の一斉分析に適した TOFMS 条件を求めた。また、食品マトリックスの影響を受けにくい LC 測定条件や、フラグメントイオンを用いた確認方法についても検討を行った。最適化した条件では、検討した 154 農薬(ESI(+))134 農薬, ESI(-) 73 農薬)のうち、ESI(+ )では約 96%, ESI(-)では約 60%の農薬で一律基準レベル(0.01 mg/kg)を定量可能であった。また、開発した方法は、定量限界以上の濃度では大部分の農薬において、食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であり、選択性も問題なかった。今後、LC-TOFMS 法による残留農薬分析の妥当性が示されれば、スクリーニングのみならず、基準値判定にも LC-TOFMS を用いることが可能と考えられる。

### 2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬を対象として、これらの包括的一斉スクリーニング分析法の開発を試みた。22年度は、畜水産物からの農薬等の抽出に適した抽出溶媒の検討及び脱脂・精製法の開発を中心に検討を行った。その結果、抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、畜水産物試料から幅広い物性の農薬等を脂肪とともに効率的に抽出することが可能と思われる。また、アセトニトリル/ヘキサン分配及びC18ミニカラム精製により、抽出された脂肪等を効果的に除去することが可能であった。また、検討対象化合物のうち、回収率が 70~120%であったのは、溶媒標準溶液を用いた場合には全体の約 50%であったのに対し、マトリックス添加標準溶液を用いた場合には 86%であったことから、多くの化合物が測定の際にマトリックスの影響を受けていることが示唆された。次年度は、検討対象化合物の測定に影響を

及ぼす試料由来マトリックス成分の効果的な除去・精製方法について検討を行う予定である。

**F. 健康危機情報**

なし

**G. 研究発表**

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## Ⅱ. 分担研究報告

### 1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬の スクリーニング分析法の開発

研究分担者 根本 了

研究協力者 齊藤 静夏

# 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

## 平成 22 年度分担研究報告書

### 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

研究分担者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

#### 研究要旨

農産物中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法開発の一環として、測定における効率化を図るため、LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討した。農産物中の残留農薬の一斉分析に適した TOFMS 条件を ESI(+)及び ESI(-), それぞれについて詳細に検討し、最適化を行った。また、食品マトリックスの影響を受けにくい LC 測定条件や、フラグメントイオンを用いた確認方法についても検討した。最適化した条件で 154 農薬(ESI(+))134 農薬, ESI(-)73 農薬)について、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性を大豆及びほうれんそうのマトリックス標準溶液を用いて評価した。その結果、ESI(+)では約 96%, ESI(-)では約 60%の農薬で定量限界(S/N $\geq$ 10)が一律基準レベル(0.01 mg/kg)以下となった。また、定量限界以上の濃度では大部分の農薬が食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

#### 研究協力者

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

同時に何百もの化合物を測定するのは困難等の問題点がある。

#### A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度が平成 18 年 5 月に施行され、現在約 830 品目(農薬約 610 品目、動物用医薬品約 220 品目)の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、食品中の残留農薬等を精確かつ迅速に測定し評価する必要があるが、このような膨大な数の品目を検査するためには、効率的で信頼性の高い測定系の確立が望まれる。

食品中の残留農薬等の分析では、高感度かつ高選択的な測定が可能な LC-MS/MS や GC-MS/MS 等の四重極型質量分析計が汎用されているが、これらは設定したイオンのみしか検出できないことや、データポイント数の制約により

近年、食品中の残留農薬分析へ LC-TOFMS や GC-TOFMS 等の飛行時間型質量分析計(TOFMS)を用いた測定法が導入されつつある。TOFMS 測定では、四重極型質量分析計を用いた測定で行うような化合物ごとの測定イオンや MS パラメーターの設定は不要であり、同時に測定可能な化合物数にも制限はない。

本研究では、農産物中の残留農薬の一斉分析に適した LC-TOFMS の測定条件について詳細に検討を行った。最適化した測定条件で、154 農薬について食品マトリックスを用いて各農薬の定量性や定量限界等を評価し、LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討を行ったので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 試料

市販のほうれんそう及び大豆を使用した。ほうれんそうはフードカッターで細切均一化した。大豆は 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉碎して均一化した。

## 2. 試薬及び試液

### (1) 有機溶媒及び試薬

有機溶媒及び試薬は、関東化学(株)または和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。LC-TOFMS の移動相溶媒は、関東化学(株)製の LC-MS 用蒸留水及びメタノールを用いた。ケイソウ土は、和光純薬工業(株)製のセライト 545 を用いた。LC-TOFMS のリファレンス(ロックマス)用試薬は、ロイシン-エンケファリン酢酸塩水和物(Sigma-Aldrich 社製)を水及びメタノール(1:1)混液に溶解したものを用いた。

### (2) 農薬標準品及び標準溶液

#### ① TOFMS 条件の最適化

メソミル、シメコナゾール、ヘキシチアゾクス、アゾキシストロビン、アバメクチン(アベルメクチン B1a/アベルメクチン B1b(92.3:6.9)), MCPA, 2,4-D, アシフルオルフェン、プロポキシカルバゾンナトリウム塩及びイオドスルフロンメチルナトリウム塩は、残留農薬試験用(林純薬工業(株)、和光純薬工業(株)または関東化学(株))を使用した。

標準原液(1000 mg/L)は、各農薬標準品 10 mg(アバメクチン、プロポキシカルバゾンナトリウム塩及びイオドスルフロンメチルナトリウム塩は、それぞれアベルメクチン B1a, プロポキシカルバゾン及びイオドスルフロンメチルとして 10 mg)を精秤し、アセトニトリル(プロポキシカルバゾンナトリウム塩はメタノール) 10 mL に溶解して調製した。検討用標準溶液は、各標準原液をメタノールで希釈して使用した。

#### ② LC-TOFMS 測定条件の検討

LC-TOFMS 測定条件の検討には、林純薬工業(株)製の LC-MS (/MS)用混合標準溶液(PL2005 農薬 LC-MS Mix4~10)を混合し、メタノールで適宜希釈したものを用いた。

### (3) 精製ミニカラム

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは、Varian 社製 Mega Bond Elut C18(担体量 1000 mg)を用いた。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは、GL Sciences 社製 InertSep GC/NH<sub>2</sub>(担体量 500 mg/500 mg)を使用した。

### (4) 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)の調製

0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)は、以下の通りに調製した。リン酸水素二カリウム(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

## 3. 装置

遠心粉碎機は Retsch 社製 ZM200、フードカッターは Retsch 社製 Grindomix GM200、ホモジナイザーは Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を用いた。LC-TOFMS は、Waters 社製液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC 及び同社製飛行時間型質量分析計 LCT Premier を使用した。

## 4. 測定条件

### (1) TOFMS 条件の最適化

#### ① MS 条件

イオン化モード: ESI(+)及び ESI(-), 分析モード: W モード(>10,000 FWHM, ESI(+) $m/z$  556.2766, ESI(-) $m/z$  554.2620), ソース温度: 120°C, 脱溶媒ガス温度: 350°C, 脱溶媒ガス流量: 600 L/h, コーンガス流量: 50 L/h, スキャン範囲:  $m/z$  50~1000

リファレンス(ロックマス): ロイシン-エンケファ

リン(0.2 µg/mL, 水及びメタノール(1:1)混液),  
リファレンス流速: 5 µL/min, リファレンス導入間  
隔: 5 スキャン

a) キャピラリー電圧の検討

キャピラリー電圧: 1000, 1500, 2000, 2500,  
3000 及び 3500 V, コーン電圧: 25 及び 50 V,  
アパーチャー1 電圧: 5 及び 15 V

b) コーン電圧の検討

キャピラリー電圧: 3000 V, コーン電圧:  
12.5, 25, 50, 75, 100 及び 125 V, アパーチャー  
1 電圧: 5 及び 15 V

c) アパーチャー1 電圧の検討

キャピラリー電圧: 3000 V, コーン電圧: 25  
V, アパーチャー1 電圧: 5, 10, 15, 20, 30, 40,  
50 及び 60 V

② LC 条件

移動相: 10 mM ギ酸アンモニウム溶液及び  
メタノール(1:1)混液, 流速: 0.05 mL/min, 注  
入法: フローインジェクション, 注入量: 3 µL

(2) LC-TOFMS 測定条件の検討

① MS 条件

イオン化モード: ESI(+)及び ESI(-), 分  
析モード: Wモード, ソース温度: 120°C, 脱溶  
媒ガス温度: 350°C, 脱溶媒ガス流量: 600 L/h,  
コーンガス流量: 50 L/h, キャピラリー電圧:  
3000 V, コーン電圧: 25 V, アパーチャー1 電  
圧: 5 V, スキャン範囲:  $m/z$  50~1000, 定量イ  
オン: 表1に示した.

リファレンス(ロックマス): ロイシン-エンケファリ  
ン(0.2 µg/mL, 水及びメタノール(1:1)混液), リ  
ファレンス流速: 5 µL/min, リファレンス導入間  
隔: 5 スキャン

② LC 条件

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18(内径2.1  
mm, 長さ100 mm, 粒子径1.7 µm, Waters 社

製), カラム温度: 40°C, 注入量: 3 µL, 移動  
相: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(A液)  
及びメタノール溶液(B液), 流速: 0.30 mL/min,  
グラジエント条件 a: 0分(A:B=95:5)→10分  
(A:B=5:95)→15分(A:B=5:95)→15.1分  
(A:B=0:100)→25分(A:B=0:100)→25.1分  
(A:B=95:5), グラジエント条件 b: 0分(A:B=  
95:5)→5分(A:B=5:95)→10分(A:B=5:95)  
→10.1分(A:B=0:100)→20分(A:B=0:100)  
→20.1分(A:B=95:5), 保持時間(グラジエント  
条件 a): 表1に示した.

5. ブランク試験溶液の調製

ほうれんそう及び大豆のブランク試験溶液は,  
通知試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験  
法 I (農産物)」(食安発第 1129002 号平成 17  
年 11 月 29 日)に準じて以下の方法で調製した.

(1) 抽出

ほうれんそうの場合は, 試料 20.0 g を量り採つ  
た. 大豆の場合は, 試料 10.0 g に水 20 mL を加  
え, 15 分間放置した.

これにアセトニトリル 50 mL を加え, ホモジナイ  
ズした後, 吸引ろ過した. ろ紙上の残留物にア  
セトニトリル 20 mL を加え, ホモジナイズした後,  
吸引ろ過した. 得られたろ液を合わせ, アセトニ  
トリルを加えて正確に 100 mL とした.

抽出液 20 mL を採り, 塩化ナトリウム 10 g 及び  
0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0) 20 mL を加えて  
10 分間振とうし, 静置した後, 分離した水層を捨  
てた.

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム  
(1,000 mg) にアセトニトリル 10 mL を注入し, 流  
出液は捨てた. このカラムに上記のアセトニトリ  
ル層を注入し, さらに, アセトニトリル 2 mL を注  
入して, 全溶出液を採り, 無水硫酸ナトリウムを  
加えて脱水し, 無水硫酸ナトリウムをろ別した後;

ろ液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 2 mLを加えて溶かした。

## (2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg)に、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 20 mLを注入し、全溶出液を 40°C以下で濃縮した。残留物をメタノールに溶かして、ほうれんそうの場合は正確に 4 mL(試料 4.0 g/4 mL)、大豆の場合は 2 mL(試料 2.0 g/2 mL)としたものをブランク試験溶液とした。

## 6. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液 100 µLをバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を 0.01 または 0.1 µg/mLの混合標準溶液 100 µLに溶解してマトリックス標準溶液とした。溶媒標準溶液とマトリックス標準溶液を交互に各 2 回測定し、溶媒標準溶液のピーク面積の平均値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の平均値の比を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。なお、ジメトモルフ、フェリムゾン、トラルコキシジム及びトリデモルフは各異性体のピーク面積の和を用いて定量した。

### (倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に倫理面の問題はない。

## C. 研究結果及び考察

### 1. TOFMS 条件の最適化

農薬は様々な構造や分子量を持つことから、各農薬に最適な TOFMS 測定条件は異なると予想される。しかしながら、TOFMS による測定では、

四重極型質量分析計によるスキャン測定と同様に連続してデータを取り込むため、原則として化合物ごとに MS パラメーター(コーン電圧, キャピラリー電圧, アパーチャー1 電圧等)を設定することは困難である。したがって、LC-TOFMS を用いて残留農薬の一斉分析を行う際には、幅広い農薬に適した代表的な TOFMS 条件を設定する必要がある。そこで、分子量の異なる代表的な 10 農薬(ESI(+))5 農薬, ESI(-))5 農薬を用いて詳細に MS 条件を検討した。すなわち、用いた TOFMS 装置で設定可能であり、かつ、化合物により最適値が異なると予想されたキャピラリー電圧, コーン電圧及びアパーチャー1 電圧の 3 種類のパラメーターを ESI(+))及び ESI(-))、それぞれについて最適化した。農薬の分子量範囲を想定し、ESI(+))ではメソミル(分子量(M.W.) 162), シメコナゾール(M.W. 293), ヘキシチアゾクス(M.W. 353), アゾキシストロビン(M.W. 403)及びアベルメクチン B1a(M.W. 873), ESI(-))では MCPA(M.W. 201), 2,4-D(M.W. 221), アシフルオルフェン(M.W. 362), プロポキシカルバゾン(M.W. 398)及びイオドスルフロンメチル(M.W. 507)を用いて検討を行った。検討は、各農薬の標準溶液(0.2 µg/mL)をフローインジェクション法で注入し、それぞれの条件でのピーク面積を比較した。

#### (1) キャピラリー電圧

まず、キャピラリー電圧について 1000~3500 V の範囲で、各農薬のピーク面積への影響を検討した。コーン電圧は 25 または 50 V, アパーチャー1 電圧は 5 または 15 V に設定した。図 1-1 及び 1-2 にコーン電圧 25 V, アパーチャー1 電圧 5 V での結果を示した。ESI(+)), ESI(-))ともに、検討した農薬はいずれの条件においても 3000~3500 V でピーク面積が最大となった。よ

って、ESI(+), ESI(-)ともにキャピラリー電圧を 3000 V に設定することとした。

### (2) コーン電圧

次に、コーン電圧について 12.5~125 V の範囲で各農薬のピーク面積への影響を検討した。なお、キャピラリー電圧は 3000 V, アパーチャー1 電圧は 5 または 15 V に設定した。アパーチャー1 電圧 5 V での結果を図 2-1 及び 2-2 に示した。ESI(+ )ではアパーチャー1 電圧の値によらず、コーン電圧 12.5~25 V でピーク面積が最大となった。ESI(-)では、アパーチャー1 電圧の値によらず、12.5~50 V でピーク面積が最大となった。これらの結果から、ESI(+), ESI(-)ともにコーン電圧を 25 V に設定することとした。

### (3) アパーチャー1 電圧

アパーチャー1 電圧について、5~60 V の範囲で各農薬のピーク面積への影響を検討した。なお、キャピラリー電圧は 3000 V, コーン電圧は 25 V に設定した。その結果、ESI(+ )ではアパーチャー1 電圧 5~15 V でピーク面積が最大となった(図 3-1)。アパーチャー1 電圧 30 V では、検討した農薬はいずれもピーク面積値が最大値の 40%以下となった。また、メソミルは 10 V 以上で大幅にピーク面積が減少した。ESI(-)では、アパーチャー1 電圧 5~10 V でピーク面積が最大となり、30 V 以上では大幅に減少した(図 3-2)。アパーチャー1 電圧を 10 V 以上に設定すると、メソミルのようなフラグメンテーションを起こしやすい農薬ではピーク面積が大幅に減少することから、分子イオンの測定では ESI(+), ESI(-)ともにアパーチャー1 電圧を 5 V に設定することとした。

## 2. LC-TOFMS 測定条件の検討

分析カラムに ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm), 移動相に 10 mM ギ酸

アンモニウム溶液及びメタノールを用いて LC-TOFMS 測定条件の検討を行った。検討には、林純薬工業(株)製の LC-MS(/MS)用混合標準溶液(PL2005 農薬 LC-MS Mix4~10)の 154 農薬を用いた。

### (1) 定量イオン

混合標準溶液(0.1 μg/mL)を ESI(+ )及び ESI(-)で測定したところ、検討したすべての農薬において、ESI(+ )または ESI(-)で S/N > 10 の分子イオンピークが観測された(表 1)。154 農薬中、ESI(+ )では 134 農薬、ESI(-)では 73 農薬で S/N > 10 の分子イオンピークが得られ、53 農薬が ESI(+ )及び ESI(-)の両モードで測定可能であった。ESI(+ )では、プロトン付加分子([M+H]<sup>+</sup>)、アンモニウム付加分子([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>)、ナトリウム付加分子([M+Na]<sup>+</sup>)のうち、S/N 比が最も高いイオンを定量イオンとした。また、ESI(-)では脱プロトン化分子([M-H]<sup>-</sup>)を定量イオンとした。

### (2) 質量確度

混合標準溶液(0.1 μg/mL)を測定し、各農薬の定量イオンの質量確度を求めた。その結果、ESI(+), ESI(-)ともに検討したすべての農薬で質量確度は±5 ppm 以内であった(図 4)。

### (3) 抽出質量幅(mass window)の設定

抽出質量幅(mass window)を狭くすると選択性は向上する。その一方、質量幅を過剰に狭くすると測定精密質量のわずかなずれにより定量性が低下する可能性があり、低感度の化合物では検出できなくなるおそれもある。そこで、最適な抽出質量幅を設定するため、0.1 μg/mL の混合標準溶液(PL2005 農薬 LC-MS Mix10, 20 農薬, 林純薬工業(株)製)を 10 回連続測定し、抽出質量幅を±5, ±10 及び±50 mDa に設定してピーク面積の変動を比較した。その結果、±10 及



び $\pm 50$  mDaに設定した場合のピーク面積の変動(RSD)は、それぞれ3~6%及び3~4%であった。また、抽出質量幅 $\pm 10$  mDaと $\pm 50$  mDaとではピーク面積値に大きな差は見られなかった。これに対し、 $\pm 5$  mDaに設定した場合はピーク面積の変動が大きく、20農薬中7農薬がRSD 10%以上であった。これらの結果から、抽出質量幅を $\pm 10$  mDa以上に設定するのがよいと考えられ、本研究では $\pm 20$  mDaに設定して定量を行うこととした。

#### (4) LC条件の検討

##### ① 流速

流速について0.2, 0.3及び0.4 mL/minを、移動相の流量を一定にして比較した。検討した154農薬の中で最も溶出の速いアルドキシカルブの抽出イオンクロマトグラムを図5示した。アルドキシカルブは比較的ピーク幅が広いが、流速を速くするとピーク幅が狭くなり、S/N比が向上した。溶出の遅いアベルメクチンB1aについてもアルドキシカルブと同様に、流速が速いほど高いS/N比が得られた。流速0.2, 0.3及び0.4 mL/minでの最大カラム圧力は、それぞれ約7500, 10700及び13600 psiであった。用いたLC装置は約15000 psiでの測定も可能であるが、食品マトリックスによってカラム圧力が上昇する可能性を考慮し、流速0.3 mL/minで測定を行うこととした。

##### ② グラジエント条件

食品マトリックスの影響を受けにくいLC条件を構築するため、グラジエント条件a [0分(A:B=95:5) $\rightarrow$ 10分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 15分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 15.1分(A:B=0:100) $\rightarrow$ 25分(A:B=0:100) $\rightarrow$ 25.1分(A:B=95:5)]及びグラジエント条件b [0分(A:B=95:5) $\rightarrow$ 5分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 10分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 10.1分(A:B=0:100) $\rightarrow$ 20

分(A:B=0:100) $\rightarrow$ 20.1分(A:B=95:5)]を検討した。各グラジエント条件(流速0.3 mL/min)で溶媒標準溶液(0.1  $\mu$ g/mL, 154農薬)と大豆のマトリックス標準溶液(0.1  $\mu$ g/mL, 試料中0.1 ppm相当)を測定し、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を比較した。その結果、分析時間が長いグラジエント条件aでは、検討したすべての農薬で溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が0.82~1.15となり、食品マトリックスの大きな影響を受けることなく測定可能であった。これに対し、分析時間の短いグラジエント条件bでは、0.80未満が3農薬(アザメチホス, ピラゾリネート, ピラゾスルフロンエチル), 1.21以上が1農薬(アシベンゾラル-S-メチル)あり、グラジエント条件aでの測定と比較してマトリックスの影響を受けやすかった。よって、グラジエント条件aで測定を行うこととした。

##### ③ 注入量

低極性の農薬や夾雑成分は、含水メタノールへの溶解性は低いと推測されたことから、最終試験溶液はメタノール(有機溶媒100%)で調製することとした。しかしながら、メタノールで試験溶液の調製を行うと、溶出の速い農薬では、注入量によってはカラムに保持されにくくなり、ピーク形状が悪くなる可能性がある。そこで、検討した農薬の中で最も溶出の速いアルドキシカルブを用いて、注入量3, 5及び7  $\mu$ Lでのピーク形状を比較した。各注入量でのアルドキシカルブの抽出イオンクロマトグラムを図6に示した。注入量3  $\mu$ Lでは良好なピーク形状が得られることがわかった。

##### ④ 再現性

グラジエント条件aで混合標準溶液(0.1  $\mu$ g/mL, 154農薬)を連続5回繰り返し測定した。

その結果、検討したすべての農薬においてピーク面積値の変動(RSD)は10%以内、保持時間のRSDは0.5%未満であり、良好な再現性が得られた。

#### ⑤ 検量線

混合標準溶液(0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0  $\mu\text{g/mL}$ )を測定し、検量線を作成した。その結果、0.005~1.0  $\mu\text{g/mL}$  の範囲では、大部分の農薬(ESI(+))では134農薬中114農薬、ESI(-)では73農薬中22農薬で相関係数( $r$ )が0.995未満となった。0.005~0.2  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で $r < 0.995$ となったのは11農薬(ESI(+))4農薬、ESI(-)7農薬のみであり、0.005~0.1  $\mu\text{g/mL}$  の範囲では検討したすべての農薬で $r > 0.995$ となった。高濃度(0.5  $\mu\text{g/mL}$  以上)の測定では、大部分の農薬が検出器において飽和し、質量誤差が大きくなったことが、検量線の直線性が低い原因と推察された。高濃度の高感度農薬を測定する場合には試験溶液を希釈する必要があると考えられた。

### 3. 食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性

大豆及びほうれんそうのマトリックス標準溶液を用いて、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性を評価した。なお、S/N比は抽出質量幅によって変わるため(抽出質量幅を広くするとノイズが高くなるためS/N比は低下し、質量幅を狭くするとS/N比は向上する)、本研究では定量に用いた抽出質量幅である $\pm 20$  mDaに設定し、マトリックス標準溶液を用いて定量限界(S/N=10)を求めた。

ESI(+))での結果を表2-1に示した。高濃度(0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 試料中0.1 ppm)においては、大豆は134農薬すべてで、ほうれんそうは2農薬(トリアスルフロン及びフルフェノクスロン)を除く132

農薬で、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が0.80~1.20となり、マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。ほうれんそうのブランク試験溶液を測定したところ、フルフェノクスロンの分子イオンピーク( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 及び $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )と同じ精密質量をもつイオンが観測され、用いたほうれんそう試料中にフルフェノクスロンが残留していたものと推察された。低濃度(0.01  $\mu\text{g/mL}$ , 試料0.01 ppm相当)においては、134農薬中129農薬でS/N $\geq 10$ のピークが得られ、そのうち溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が0.80~1.20の範囲であったものは大豆で125農薬、ほうれんそうで117農薬であり、検討した農薬の大部分が一律基準レベル(0.01 ppm)においても測定可能であった。

ESI(-)での結果を表2-2に示した。高濃度(0.1  $\mu\text{g/mL}$ )においては、大豆は73農薬すべてで、ほうれんそうはフルフェノクスロンを除く72農薬で、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が0.80~1.20であった。ほうれんそうのブランク試験溶液を測定したところ、ESI(-)においてもフルフェノクスロンの分子イオンピーク( $[\text{M}-\text{H}]^-$ )と同じ精密質量をもつイオンが観測されたことから、フルフェノクスロンのほうれんそう試料中の残留が確認された。低濃度(0.01  $\mu\text{g/mL}$ )においては、73農薬中29農薬(約40%)でS/N $< 10$ となり、一律基準レベル(0.01 ppm)では定量できない農薬の割合がESI(+))と比較して多かった。しかしながら、S/N $\geq 10$ のピークが得られた44農薬のうち、大豆で44農薬、ほうれんそうでは39農薬で溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が0.80~1.20となり、イオン強度が大きい農薬については一律基準レベルにおいても食品

マトリックスによる大きな影響を受けることなく、測定可能であった。

ブランク試験溶液を測定したところ、ほうれんそう中のフルフェノクスロンを除き、定量を妨害するピークの面積は溶媒標準溶液(0.01 µg/mL)を測定したときのピーク面積の 1/10 未満となり、選択性に問題はなかった。

#### 4. 確認方法の検討

より信頼性の高い測定系を確立するため、確認方法について検討を行った。検討に用いた 154 農薬のうち、75 農薬は塩素原子、1 農薬は臭素原子を分子内に 1 つ以上含有するため、これらの農薬では同位体パターンによって確認を行うことが可能である。そのほかの農薬についてはフラグメントイオンを検出することができれば、確認に用いることができると考えられる。用いた TOFMS 装置ではアパーチャー1 電圧を高くすると、インソース衝突誘起解離(in-source CID)によるフラグメンテーションが起こりやすくなる。そこで 10 農薬(メソミル、シメコナゾール、ヘキシチアゾクス、アゾキシストロビン、アベルメクチン B1a, MCPA, 2,4-D, アシフルオルフェン、プロポキシカルバゾン及びイオドスルフロメチル)を用いてフラグメントイオンの測定に適したアパーチャー1 電圧を検討した。図 7-1 及び 7-2 にメソミル及びアシフルオルフェンのマススペクトルを示した。また、図 8-1 及び 8-2 に、アパーチャー1 電圧 5 V での定量イオンのピーク面積を 100 としたときの同位体イオン及び主なフラグメントイオンのピーク面積比(%)を示した。メソミルは、アパーチャー1 電圧 5 V では  $[M+H]^+$  (Mol.) が観測され、15 V では  $[M+H]^+$  のほかにフラグメントイオンとして  $[C_3H_8NOS]^+$  (計算精密質量(calcd.)  $m/z$  106.0321, Fr.1) 及び  $[C_3H_6NS]^+$  (calcd.  $m/z$  88.0215, Fr.2) が観測された。2 つのフラグメント

イオンはいずれもアパーチャー1 電圧 15~20 V でピーク面積が最大となった(図 8-1)。アシフルオルフェンでは、アパーチャー1 電圧 5 V では  $[M-H]^-$  (Mol.a) とその同位体イオン  $[C_{14}H_6^{37}ClF_3NO_5]^-$  (Mol.b) のピークが観測され、20 V ではフラグメントイオンとして  $[C_{13}H_6ClF_3NO_3]^-$  (calcd.  $m/z$  315.9994, Fr.1a), 50 V では  $[C_7H_3ClF_3O]^-$  (calcd.  $m/z$  194.9830, Fr.2a) が各同位体イオン(Fr.1b, Fr.2b)とともに観測された。Fr.1a 及び Fr.2a は、それぞれ 20 及び 50 V でピーク面積が最大となった(図 8-2)。そのほかの 8 農薬についても、主なフラグメントイオンのピーク面積はアパーチャー1 電圧 20~50 V で最大となり、30 V 付近で最大となるものが多かった。これらの結果から、アパーチャー1 電圧は、分子イオンの測定では 5 V に設定し、フラグメントイオンの測定においてはフラグメンテーションを起こしやすい農薬では 20 V、そのほかの農薬では 30~50 V に設定するのが良いと考えられた。

#### D. 結論

本研究では LC-TOFMS 法の残留農薬分析への適用について検討した。農産物中の残留農薬の一斉分析に適した TOFMS 条件を ESI (+) 及び ESI (-), それぞれについて詳細に検討し、最適化を行った。また、食品マトリックスの影響を受けにくい LC 測定条件や、フラグメントイオンを用いた確認方法についても検討を行った。最適化した条件で 154 農薬(ESI(+)) 134 農薬, ESI(-) 73 農薬)について、食品マトリックスの測定への影響、定量限界及び選択性を評価した。その結果、ESI(+)) では約 96%, ESI(-)) では約 60% の農薬で定量限界が一律基準レベル(0.01 mg/kg) 以下となった。また、定量限界以上

の濃度では大部分の農薬において、食品マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であり、選択性も問題なかった。今後、LC-TOFMS 法による残留農薬分析の妥当性が示されれば、スクリーニングのみならず、基準値判定にも LC-TOFMS を用いることが可能と考えられる。

**E. 研究発表**

なし

**F. 知的財産権の出願・登録状況**

なし