

図 11 牛の筋肉における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

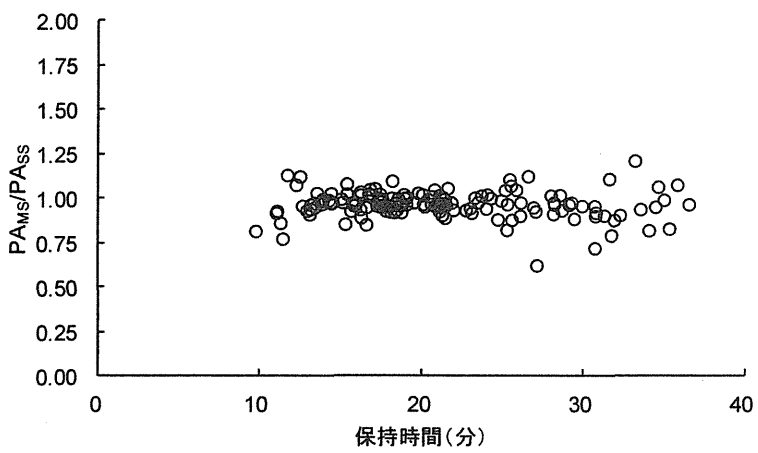
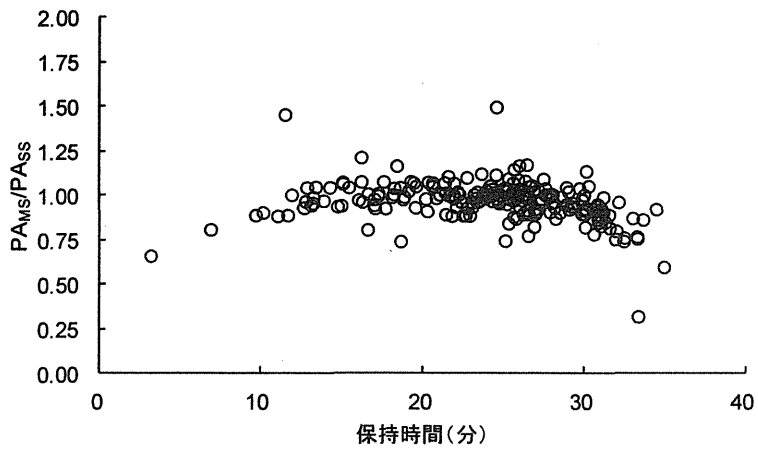


図 12 鶏の筋肉における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

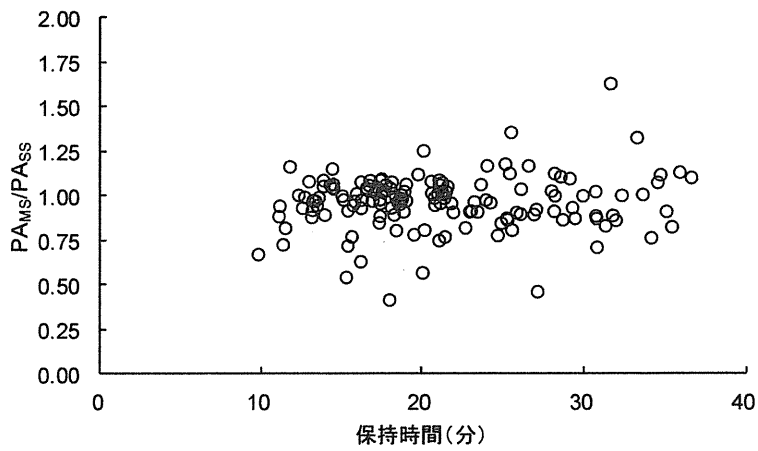
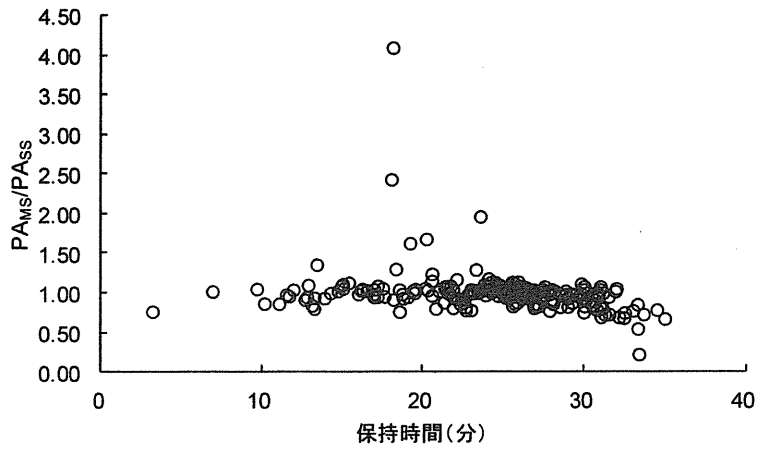


図 13 牛の肝臓における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

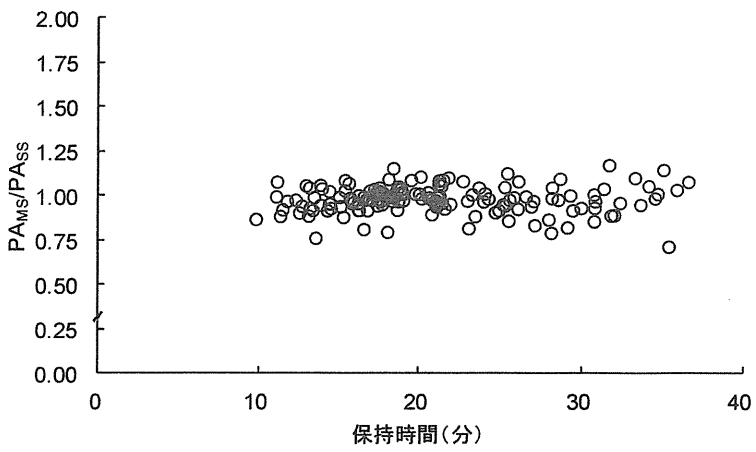
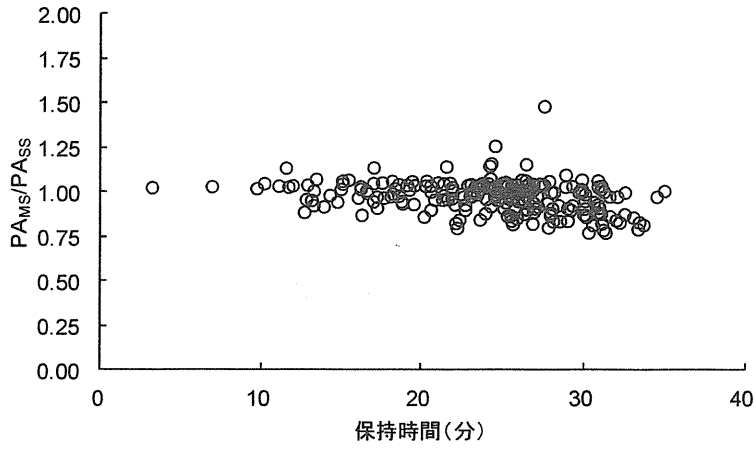


図 14 牛の脂肪における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
上: 農薬、下: 動物用医薬品

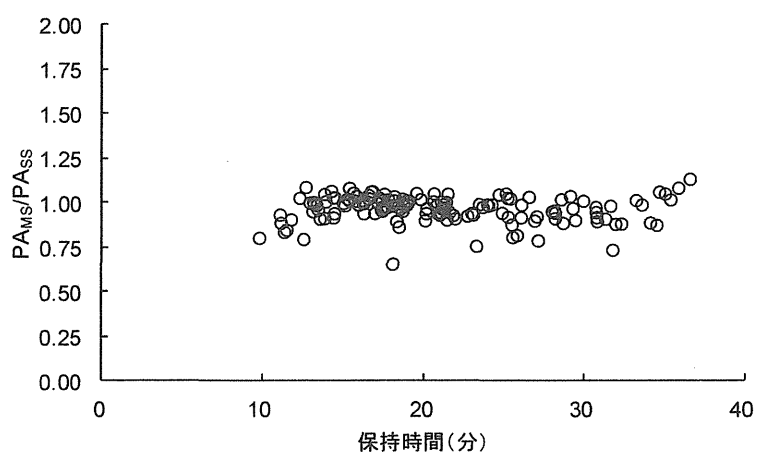
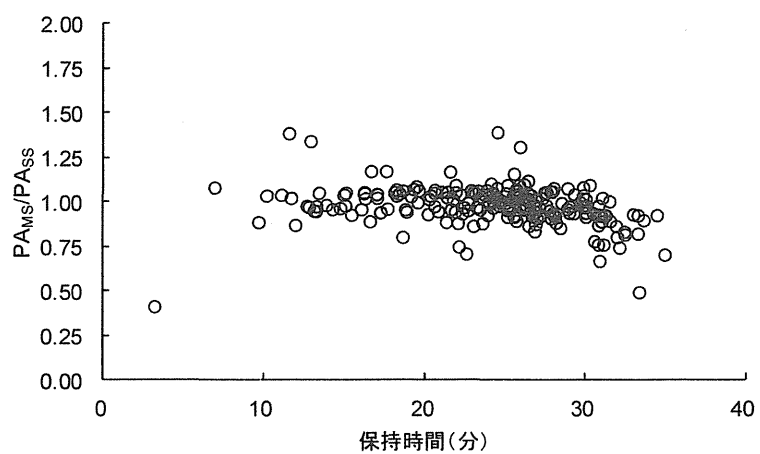


図 15 牛乳における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
上: 農薬、下: 動物用医薬品

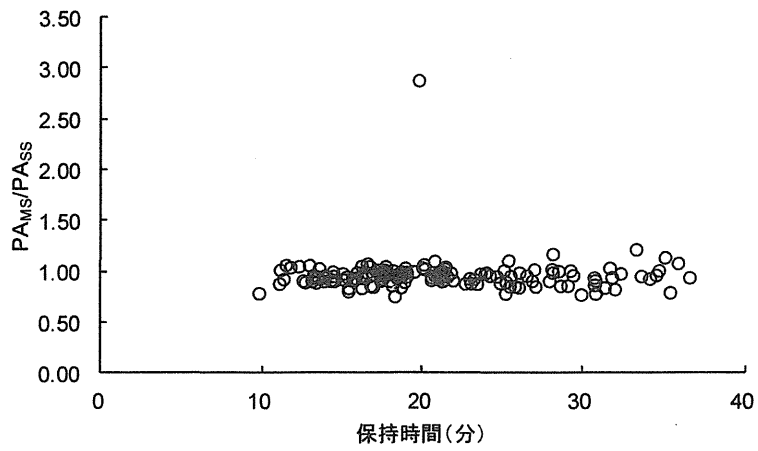
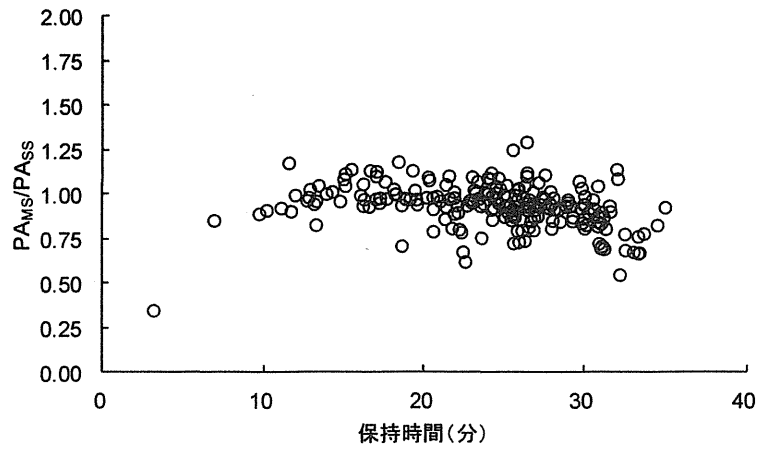


図 16 鶏卵における対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

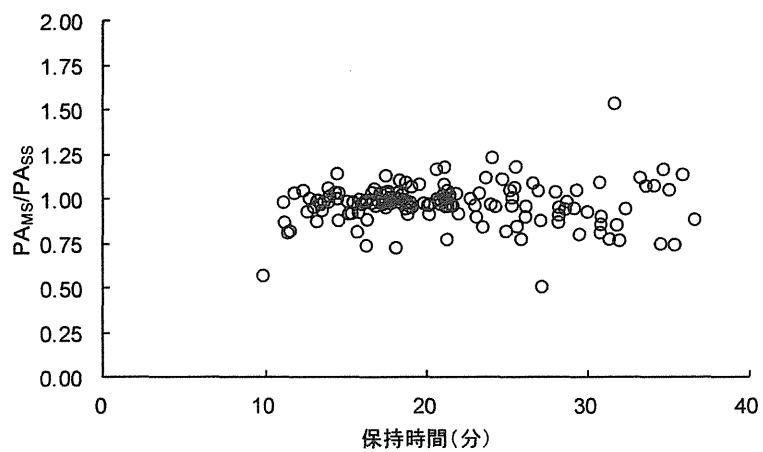
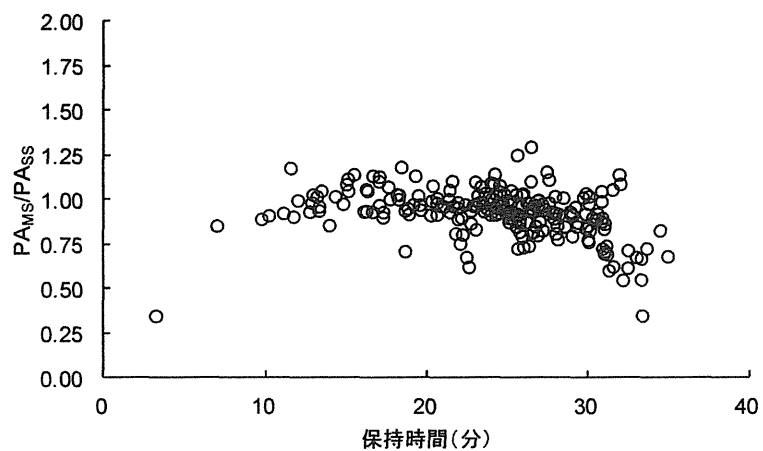


図 17 ウナギにおける対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

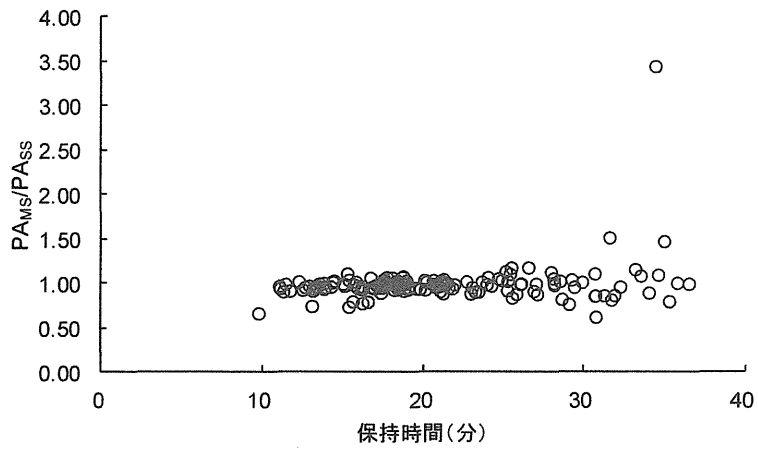
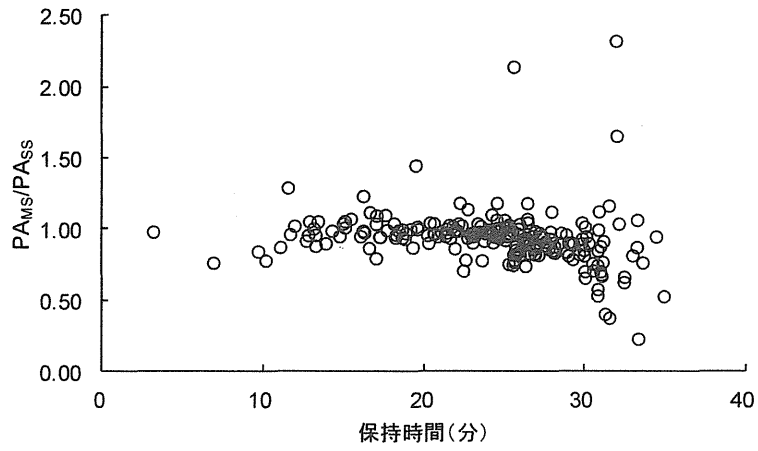


図 18 サケにおける対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品



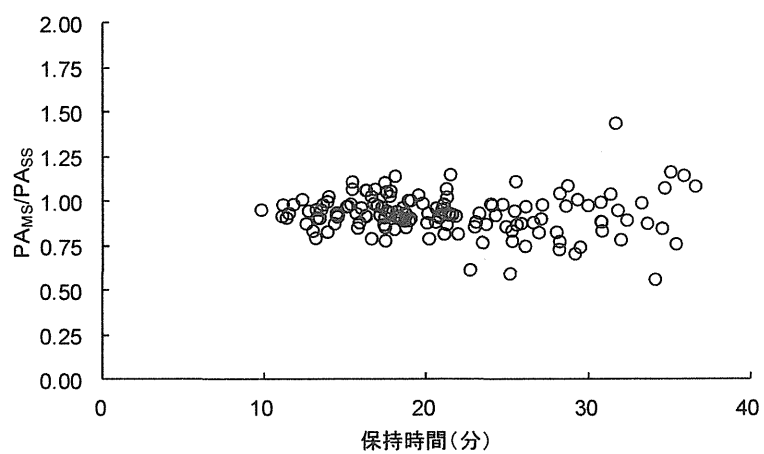
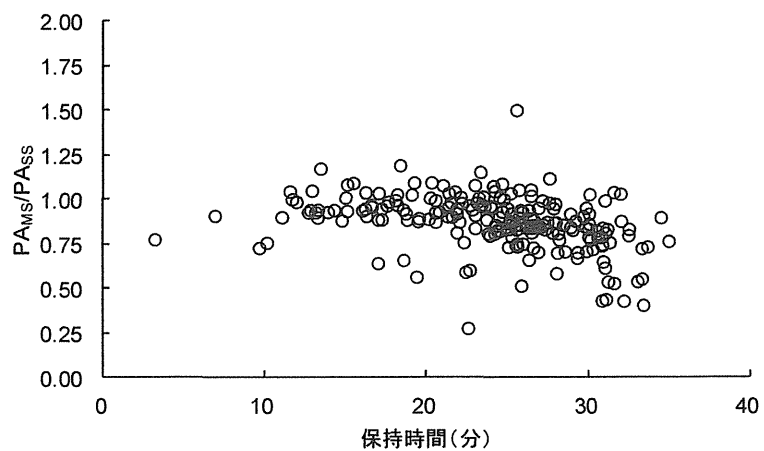


図 19 しじみにおける対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

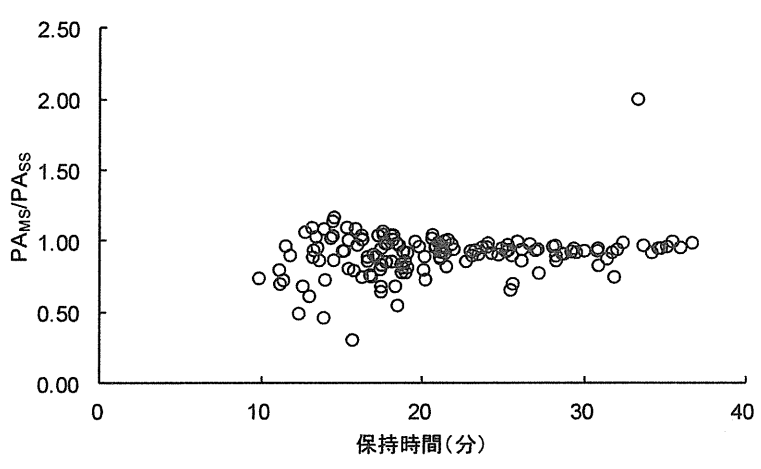
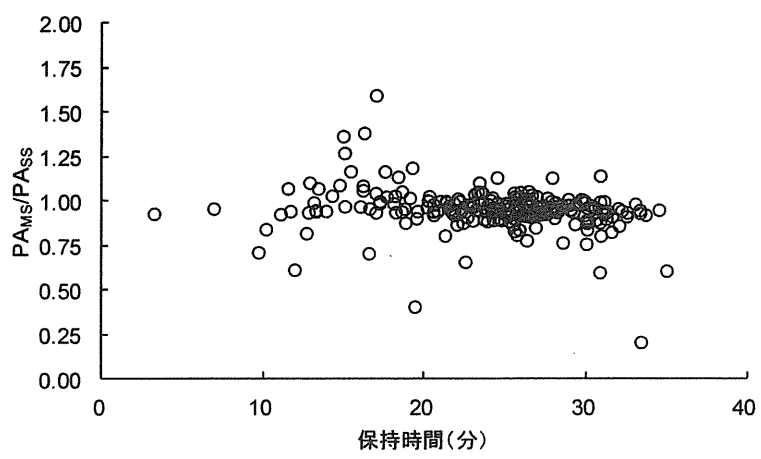


図 20 はちみつにおける対象化合物の  $PA_{MS}/PA_{SS}$  と保持時間の関係  
 上: 農薬、下: 動物用医薬品

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
齊藤静夏、根本了、松田りえ子	LC-MS/MS による緑茶中の残留農薬一斉試験法	日本食品化学学会誌	19(2)	104-110	2012
Shizuka Saito, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda	Multi-residue Analysis of Pesticides in Agricultural Products by Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry	Food Hygiene and Safety Science,	53(6)	255-263	2012

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## LC-MS/MS による緑茶中の残留農薬一斉試験法

(2012年4月6日受付)

(2012年5月31日受理)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

## Multiresidue method for determination of pesticides in green tea by LC-MS/MS

(Received April 6, 2012)

(Accepted May 31, 2012)

Shizuka Saito, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda

Division of Foods, National Institute of Health Sciences

## Abstract

A multiresidue method for the determination of pesticides in green tea was developed by modification of Japanese official method. In this method, a sample was allowed to swell in water before extraction with acetonitrile. After the removal of water by salting-out, the crude extract was passed through an ODS mini-column, and then purified by a tandemized graphitized carbon/primary secondary amine (PSA) mini-column and graphitized carbon mini-column, prior to the determination by LC-MS/MS. The recoveries of 135 compounds from fortified green tea after a spike at maximum residue levels (MRLs) set by Japan, were in the ranged from 70 to 106%, except for 15 compounds, and the relative standard deviations were within the required analytical performance criteria for pesticide residues in Japan. The limits of quantitation (LOQs) of all the tested compounds were below MRLs set by Japan.

Keywords : 農薬、緑茶、一斉試験法、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計  
pesticide, green tea, multiresidue method, LC-MS/MS

## I 緒言

茶を対象とした LC-MS/MS による残留農薬の一斉試験法として、厚生労働省より「LC-MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」<sup>1)</sup> (以下、通知法) が通知されている。通知法は、Fillion J. らによって報告された野菜・果実を対象とした多成分分析法<sup>2)</sup>をベースに開発された試験法であり、酸性農薬を除く幅広い農薬に適用可能な方法とされている。しかし、茶のような夾雑成分の非常に多い食品に対しては精製が不十分であり、LC-MS および LC-MS/MS 測定において、試料マトリックスによるイオン化阻害を受けやすいことや、装置が著しく汚染して感度低下を生じやすい等の問題点があるため、試験法の改良が望まれている。そこで本研究では、通知法を改良し、緑茶を対象としてミニカラム精製および LC-MS/MS による残留農薬の一斉試験法を検討したので報告する。

## II 実験方法

## 1. 試料

市販の緑茶(製茶)を遠心粉碎機で粉碎して均一化し、425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいに通したものをを用いた。

## 2. 試薬・試液

有機溶媒および試薬は、関東化学(株)または和光純薬工業(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。ケイソウ土は、和光純薬工業(株)製のセライト 545 を用いた。試験溶液の調製で用いた水は、超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。LC-MS/MS の移動相溶媒は、関東化学(株)製の LC-MS 用蒸留水およびメタノールを用いた。

各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)および和光純薬工業(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、アセトニトリル 10 mL に溶解して調製した。検量線作成用および添

加回収試験用の混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して調製した。

リン酸緩衝液 (0.5 mol/L、pH7.0) は、以下の通りに調製した。リン酸水素二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 52.7 g およびリン酸二水素カリウム ( $KH_2PO_4$ ) 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. 精製ミニカラム

グラファイトカーボンミニカラムは、ジーエルサイエンス (株) 製 InertSep GC (充てん量 500 mg) を用いた。

グラファイトカーボン/PSA (エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル) 積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス (株) 製の InertSep GC/PSA (充てん量 500 mg/500 mg)、InertSep GC/PSA (充てん量 1000 mg/500 mg) および InertSep GC/PSA (充てん量 1000 mg/1000 mg) を用いた。なお、添加回収試験は InertSep GC/PSA (充てん量 500 mg/500 mg) を用いて行った。

グラファイトカーボン/ $NH_2$  (アミノプロピルシリル化シリカゲル) 積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep GC/ $NH_2$  (充てん量 500 mg/500 mg) を用いた。

ODS (オクタデシルシリル化シリカゲル) ミニカラムは、Agilent 社製の Mega Bond Elut C18 (充てん量 1000 mg) を用いた。

### 4. 装置

LC-MS/MS は、Waters 社製の液体クロマトグラフ Alliance 2695 および同社製質量分析計 Micromass Quattro Premier を使用した。遠心粉碎機は Retsch 社製 ZM200、ホモジナイザーは Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を用いた。蒸留水精製装置は、藤原製作所 (株) 製の超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW を用いた。pH メーターは、(株) 堀場製作所製 F-52 を用いた。

### 5. LC-MS/MS 測定条件

#### 1) LC 条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu$ m、ジーエルサイエンス社製)、ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm、長さ 10 mm、粒子径 3  $\mu$ m、ジーエルサイエンス社製)、カラム温度: 40°C、注入量: 5  $\mu$ L、移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) および 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)、移動相流速: 0.20 mL/min、グラジエント条件: 0 分 (A:B = 85:15)  $\rightarrow$  1 分 (A:B = 60:40)  $\rightarrow$  3.5 分 (A:B = 60:40)  $\rightarrow$  6 分 (A:B = 50:50)  $\rightarrow$  8 分 (A:B = 45:55)  $\rightarrow$  17.5 分 (A:B = 5:95)  $\rightarrow$  33 分 (A:B = 5:95)  $\rightarrow$  33.1 分 (A:B = 0:100)  $\rightarrow$  43 分 (A:B = 0:100)  $\rightarrow$  43.1 分 (A:B = 85:15)  $\rightarrow$  55 分 (A:B = 85:15)、保持時間: 表 1 に示した。

表 1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果

化合物	イオン化モード	保持時間 (分)	定量イオン		定性イオン		基準値 (ppm)	添加濃度 (mg/kg)	添加回収試験 グループ <sup>a)</sup>	真度 (%)	併行精度 (%)
			プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )	プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )					
アクリナトリン	ESI (+)	24.4	559.1	207.9	559.1	181.0	10	10	B	79	3
アザメチホス	ESI (+)	14.4	325.0	182.9	325.0	111.8	0.01	0.01	A	90	9
アシベンゾラル-S-メチル	ESI (+)	20.4	211.0	135.9	211.0	91.0	0.01	0.01	A	106	3
アジンホスメチル	ESI (+)	19.1	318.2	132.2	318.2	160.2	0.01	0.01	A	81	14
アセタミプリド	ESI (+)	10.8	223.1	125.9	223.1	90.0	30	30	B	83	4
アゾキシストロビン	ESI (+)	19.4	404.1	372.1	404.1	329.0	10	10	B	93	2
アトラジン	ESI (+)	17.6	216.1	174.0	216.1	95.9	0.1	0.1	A	74	3
アニロホス	ESI (+)	21.6	368.0	198.8	368.0	124.8	0.01	0.01	A	94	6
アベルメクチン Bla	ESI (+)	25.0	890.5	305.1	890.5	567.1	0.02	0.02	A	62	13
アラマイト	ESI (+)	23.4	352.1	191.0	352.1	57.3	0.1	0.1	A	86	4
アルジカルブ	ESI (+)	13.5	207.9	115.5	207.9	88.5	0.05	0.05	A	81	6
アルドキシカルブ	ESI (+)	7.2	239.9	147.7	239.9	85.5	0.01	0.01	A	80	12
イソキサチオン	ESI (+)	22.1	314.1	104.8	314.1	96.8	5	5	B	86	3
イソキサフルトール	ESI (+)	18.0	360.0	250.9	360.0	219.9	0.01	0.01	A	52	12
イプロバリカルブ	ESI (+)	20.5	321.2	118.9	321.2	203.0	0.01	0.01	A	91	7
イマザリル	ESI (+)	21.7	297.0	158.9	297.0	69.0	0.1	0.1	A	74	6
イミダクロプリド	ESI (+)	9.8	255.9	208.8	255.9	174.8	10	10	B	86	4
イミベンコナゾール	ESI (+)	23.0	413.0	124.8	413.0	126.8	15	15	B	81	8
インダノファン	ESI (+)	21.0	341.2	187.0	341.2	175.0	0.01	0.01	A	73	13
インドキサカルブ	ESI (+)	22.5	527.9	202.8	527.9	149.7	0.01	0.01	A	103	8
エチオン	ESI (+)	23.4	385.0	198.8	385.0	142.8	0.3	0.3	A	75	3
エチプロール	ESI (-)	18.7	395.0	330.7	395.0	249.9	10	10	B	90	4
エトキサゾール	ESI (+)	24.0	360.2	140.9	360.2	303.9	10	10	B	81	4
エトフェンプロックス	ESI (+)	26.2	394.2	177.0	394.2	106.9	10	10	B	81	3
エポキシコナゾール	ESI (+)	20.8	330.0	120.9	330.0	101.0	0.01	0.01	A	77	9
オキサジクロメホン	ESI (+)	23.2	376.2	190.0	376.2	161.0	0.01	0.01	A	87	7
オキサミル	ESI (+)	7.6	237.3	90.3	237.3	72.3	0.01	0.01	A	70	12
オキシカルボキシ	ESI (+)	11.9	268.3	175.1	268.3	147.1	0.01	0.01	A	20	13
カルバリル	ESI (+)	16.5	201.8	144.7	201.8	126.6	1	1	A	73	6
カルプロバミド	ESI (+)	21.7	334.1	138.9	334.1	102.8	0.01	0.01	A	84	4
カルボフラン	ESI (+)	15.6	221.8	164.8	221.8	122.6	0.2	0.2	A	85	4

表 1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果 (つづき)

化合物	イオン化モード	保持時間 (分)	定量イオン		定性イオン		基準値 (ppm)	添加濃度 (mg/kg)	添加回収試験グループ <sup>a)</sup>	真度 (%)	併行精度 (%)
			プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)					
キザロホップエチル	ESI (+)	23.3	373.1	298.9	373.1	91.0	0.01	0.01	A	86	5
キナルホス	ESI (+)	21.5	299.1	162.9	299.1	146.9	0.1	0.1	A	87	3
クミルロン	ESI (+)	20.2	303.2	185.0	303.2	124.8	0.01	0.01	A	91	11
クレソキシムメチル	ESI (+)	21.3	314.2	205.9	314.2	115.8	20	20	B	88	5
クロキントセットメキシル	ESI (+)	23.6	336.1	237.9	336.1	191.7	0.01	0.01	A	81	5
クロチアニジン	ESI (+)	10.0	249.9	168.7	249.9	131.5	50	50	B	85	1
クロフェンテジン	ESI (+)	22.9	302.9	137.6	302.9	101.5	20	20	B	90	3
クロマフェノジド	ESI (+)	20.6	395.3	175.0	395.3	90.8	20	20	B	91	3
クロメプロップ	ESI (+)	23.4	324.1	119.8	324.1	202.9	0.01	0.01	A	81	15
クロリダゾン	ESI (+)	11.4	222.2	104.2	222.2	92.2	0.01	0.01	A	45	15
クロルピリホス	ESI (+)	23.8	351.9	96.9	351.9	199.8	10	10	B	80	4
クロルピリホスメチル	ESI (+)	22.5	323.9	124.8	323.9	291.7	0.1	0.1	A	81	8
クロルフルアズロン	ESI (+)	24.3	539.9	382.8	539.9	157.9	10	10	B	86	4
クロロクスロン	ESI (+)	20.3	291.0	163.8	291.0	71.5	0.1	0.1	A	84	9
シアブファミド	ESI (+)	20.9	325.0	107.8	325.0	216.9	0.01	0.01	A	85	12
ジウロン	ESI (+)	18.1	232.8	71.5	232.8	159.6	1	1	A	80	6
シクロプロトリン	ESI (+)	24.2	499.2	180.9	499.2	229.0	0.5	0.5	A	64	10
ジフェノコナゾール	ESI (+)	22.2	406.0	250.9	406.0	187.8	10	10	B	86	4
シフルフェナミド	ESI (+)	22.1	413.0	202.9	413.0	294.9	0.01	0.01	A	74	6
ジフルベンズロン	ESI (+)	21.1	311.0	157.7	311.0	140.6	20	20	B	89	4
シプロジニル	ESI (+)	22.4	226.0	92.5	226.0	107.5	0.01	0.01	A	80	7
シメコナゾール	ESI (+)	20.4	294.2	69.8	294.2	72.8	10	10	B	90	2
ジメチリモール	ESI (+)	17.3	210.1	71.0	210.1	98.0	0.01	0.01	A	64	14
ジメトモルフ (E, Z)	ESI (+)	19.4, 19.8	388.0	301.0	388.0	164.7	0.01	0.01	A	87	6
スピノシン A	ESI (+)	26.4	732.5	141.8	732.5	97.8	2	2	B	82	5
スピノシン D	ESI (+)	27.2	746.5	141.8	746.5	97.9	2	2	B	79	5
スピロメシフェン	ESI (+)	23.7	388.2	273.0	388.2	255.0	30	30	B	76	2
ダイアジノン	ESI (+)	21.9	305.2	169.0	305.2	152.9	0.1	0.1	A	85	2
ダイアレート	ESI (+)	23.0	270.0	86.0	270.0	108.8	0.1	0.1	A	86	9
ダイムロン	ESI (+)	20.1	269.2	150.9	269.2	90.8	0.01	0.01	A	95	6
チアクロブリド	ESI (+)	12.4	252.8	125.5	252.8	89.5	30	30	B	90	2
チアベンダゾール	ESI (+)	15.1	201.8	174.7	201.8	130.6	0.1	0.1	A	31	16
チアメトキサム	ESI (+)	8.2	291.9	210.7	291.9	180.6	15	15	B	66	2
テトラクロルピンホス	ESI (+)	21.3	367.0	127.1	367.0	206.0	0.01	0.01	A	87	14
テトラコナゾール	ESI (+)	20.0	372.0	158.8	372.0	70.0	20	20	B	87	5
テブコナゾール	ESI (+)	20.9	308.2	70.0	308.2	124.8	25	25	B	86	6
テブチウロン	ESI (+)	15.9	229.3	172.2	229.3	116.2	0.02	0.02	A	69	5
テブフェノジド	ESI (+)	21.2	353.2	132.9	353.2	297.0	25	25	B	92	4
テルベンズロン	ESI (+)	23.6	380.8	157.7	380.8	140.6	20	20	B	88	5
トリアジメノール	ESI (+)	19.6	296.2	70.0	296.2	98.9	20	20	B	88	6
トリアジメホン	ESI (+)	19.6	294.1	69.1	294.1	196.9	1	1	A	85	2
トリチコナゾール	ESI (+)	20.6	318.1	70.0	318.1	124.9	0.01	0.01	A	73	12
トリデモルフ	ESI (+)	27.7, 28.9	298.3	130.0	298.3	57.2	20	20	B	73	5
トリフルミゾール	ESI (-)	22.4	344.0	275.9	344.0	300.9	15	15	B	83	6
トリフルムロン	ESI (+)	20.4	358.9	155.7	358.9	138.6	0.02	0.02	A	90	5
トリフロキシストロピン	ESI (+)	22.4	409.1	185.9	409.1	144.9	5	5	B	85	2
ナプロアニリド	ESI (+)	21.4	292.1	171.0	292.1	119.9	0.01	0.01	A	84	12
ニテンピラム	ESI (+)	7.2	271.1	125.8	271.1	129.7	10	10	B	45	6
ノバルロン	ESI (+)	22.7	492.8	157.7	492.8	140.6	0.01	0.01	A	85	15
ハルフェンブロックス	ESI (+)	26.7	496.1	183.0	496.1	460.7	10	10	B	82	4
ピラクロストロピン	ESI (+)	22.3	388.0	193.9	388.0	163.0	0.01	0.01	A	83	13
ピラゾホス	ESI (+)	22.2	374.1	221.9	374.1	193.9	0.1	0.1	A	87	1
ピラゾリネート	ESI (+)	22.5	438.9	91.0	438.9	172.8	0.02	0.02	A	34	15
ピリダベン	ESI (+)	24.7	365.1	147.0	365.1	308.9	10	10	B	84	2
ピリフタリド	ESI (+)	19.4	319.1	139.0	319.1	82.9	0.01	0.01	A	92	7
ピリアロキシフェン	ESI (+)	23.7	322.1	95.9	322.1	184.9	15	15	B	85	2
ピリミカーブ	ESI (+)	17.6	239.2	72.0	239.2	182.0	0.01	0.01	A	81	9
ピリミジフェン	ESI (+)	24.2	378.1	184.0	378.1	150.1	5	5	B	85	3
フェノキサプロップエチル	ESI (+)	23.1	362.0	287.9	362.0	118.9	0.01	0.01	A	75	12
フェノキシカルブ	ESI (+)	21.3	302.1	88.0	302.1	115.9	0.05	0.05	A	81	5
フェノブカルブ	ESI (+)	19.0	208.3	95.2	208.3	152.1	0.5	0.5	A	87	5
フェリムゾン (E, Z)	ESI (+)	19.9, 20.2	255.2	91.0	255.2	131.9	0.01	0.01	A	88	7
フェンアミドン	ESI (+)	19.5	312.0	236.0	312.0	91.5	0.01	0.01	A	93	11
フェンピロキシメート (E)	ESI (+)	25.0	422.1	366.1	422.1	214.9	10	10	B	92	4
フェンピロキシメート (Z)	ESI (+)	23.9	422.1	366.1	422.1	214.9	10	10	B	87	3
フェンブコナゾール	ESI (+)	20.3	337.1	70.0	337.1	124.8	10	10	B	88	3
フェンプロバトリン	ESI (+)	24.0	350.2	124.9	350.2	97.0	25	25	B	85	2



表 1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果 (つづき)

化合物	イオン化モード	保持時間 (分)	定量イオン		定性イオン		基準値 (ppm)	添加濃度 (mg/kg)	添加回収試験グループ <sup>a)</sup>	真度 (%)	併行精度 (%)
			プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)					
フェンメディファム	ESI (+)	18.6	318.2	168.0	318.2	136.0	0.01	0.01	A	62	7
ブタフェナシル	ESI (+)	20.4	492.1	331.0	492.1	349.0	0.01	0.01	A	88	12
ブプロフェジン	ESI (+)	23.2	306.2	200.9	306.2	115.9	20	20	B	82	4
フラチオカルブ	ESI (+)	23.3	383.2	194.8	383.2	252.0	0.1	0.1	A	70	9
フラメトピル	ESI (+)	17.6	334.0	156.9	334.0	290.0	0.1	0.1	A	84	5
フルフェナセット	ESI (+)	20.6	364.0	151.9	364.0	193.9	0.01	0.01	A	86	5
フルフェノクスロン	ESI (+)	23.9	489.0	157.9	489.0	140.9	15	15	B	88	4
フルリドン	ESI (+)	19.2	330.0	309.8	330.0	259.0	0.01	0.01	A	90	5
プロクロラズ	ESI (+)	21.7	376.0	307.8	376.0	70.0	0.1	0.1	A	79	2
プロバキサホップ	ESI (+)	23.5	444.0	99.9	444.0	70.0	0.01	0.01	A	83	5
プロバルギット	ESI (+)	23.7	368.2	231.0	368.2	175.0	5	5	B	86	3
プロピコナゾール	ESI (+)	21.3	342.1	158.8	342.1	69.1	0.1	0.1	A	80	2
プロフェノホス	ESI (+)	22.8	374.9	304.7	374.9	346.7	1	1	A	85	1
プロボキスル	ESI (+)	14.9	210.1	110.9	210.1	167.9	0.1	0.1	A	85	1
ヘキサフルムロン	ESI (-)	22.7	459.2	438.9	459.2	175.1	15	15	B	94	5
ヘキシチアゾクス	ESI (+)	24.0	353.1	227.9	353.1	167.8	35	35	B	88	3
ベンシクロン	ESI (+)	22.4	329.2	124.8	329.2	88.9	0.01	0.01	A	85	8
ベンゾフェナップ	ESI (+)	23.2	431.2	104.9	431.2	118.8	0.01	0.01	A	80	14
ベンダイオカルブ	ESI (+)	15.6	223.9	166.8	223.9	108.5	0.01	0.01	A	79	10
ベントキサゾン	ESI (+)	23.3	354.2	286.2	354.2	185.9	0.01	0.01	A	61	12
ホサロン	ESI (+)	21.7	368.0	181.8	368.0	110.8	2	2	B	84	7
ボスカリド	ESI (+)	19.5	343.0	307.1	343.0	271.1	0.01	0.01	A	70	9
馬拉チオン	ESI (+)	19.6	331.1	126.8	331.1	98.8	0.5	0.5	A	88	4
ミクロブタニル	ESI (+)	19.4	289.2	70.1	289.2	124.8	20	20	B	88	3
メソミル	ESI (+)	8.3	162.8	105.5	162.8	87.5	20	20	B	77	3
メタベンズチアズロン	ESI (+)	18.0	222.0	165.0	222.0	149.9	0.01	0.01	A	75	6
メタミドホス	ESI (+)	3.8	141.9	94.0	141.9	124.8	5	5	B	39	11
メチオカルブ	ESI (+)	19.5	226.3	169.4	226.3	121.4	0.01	0.01	A	86	14
メチダチオン	ESI (+)	18.3	303.0	144.8	303.0	84.9	1	1	A	86	3
メトキシフェノジド	ESI (+)	20.1	369.2	148.9	369.2	90.8	20	20	B	94	2
メパニピリム	ESI (+)	21.3	224.1	106.0	224.1	77.1	0.01	0.01	A	85	14
モノクロトホス	ESI (+)	8.3	224.1	192.8	224.1	126.8	0.1	0.1	A	43	3
モノリニユロン	ESI (+)	17.0	214.8	125.9	214.8	147.9	0.05	0.05	A	87	5
ラクトフェン	ESI (+)	23.2	479.0	343.9	479.0	222.9	0.01	0.01	A	88	12
リニユロン	ESI (+)	19.5	248.8	159.9	248.8	181.9	0.02	0.02	A	90	8
ルフエヌロン	ESI (-)	23.6	508.9	326.0	508.9	175.0	10	10	B	87	5
XMC	ESI (+)	16.4	180.1	122.9	180.1	107.8	10	10	B	86	2

<sup>a)</sup> A: 試料 0.25 g 相当 /mL、B: 試料 0.005 g 相当 /mL

## 2) MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI (+)) およびネガティブモード (ESI (-))、測定モード: SRM (selected reaction monitoring)、キャピラリー電圧: 3 kV、ソース温度: 120°C、コーンガス流量: 50 L/h (N<sub>2</sub>)、脱溶媒温度: 400°C、脱溶媒ガス流量: 800 L/h (N<sub>2</sub>)、コリジョンガス流量:  $\pm 3.1 \times 10^{-3}$  mbar (Ar)、測定イオン (m/z): 表 1 に示した。

## 6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法の概略を図 1 に示した。

### 1) 抽出

試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様に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 100 mL に定容し、抽出液とした。

抽出液 20 mL (試料 1 g 相当) を採り、塩化ナトリウム 10 g およびリン酸緩衝液 (0.5 mol/L、pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とうした。これを毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い、分離したアセトニトリル層を分取した。

ODS ミニカラム (1000 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 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル 3 mL を加え、約 1 分間超音波処理して溶解後、トルエン 1 mL を加えてよく混合した。

### 2) 精製

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) およびグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にアセトニトリル/トルエン (3:1) を各 10 mL 注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し、1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄した) を注入した。全溶出液を 40°C 以下

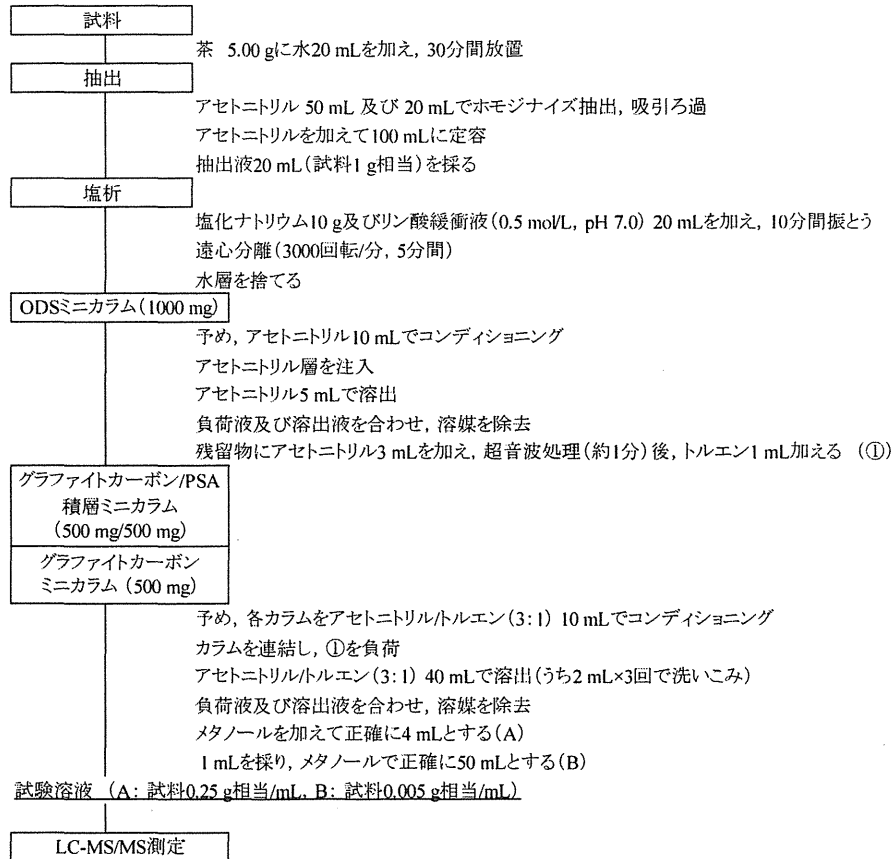


図1. 試験溶液調製方法の概要

下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノール4 mLに溶解したものを試験溶液(試料0.25 g相当/mL)とした。

## 7. 添加回収試験

基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。添加回収試験は、基準値が1 ppm以下の農薬(グループA)と1 ppmを超える農薬(グループB)の2つのグループに分け、それぞれについて行った。グループBの添加回収試験においては、6項で得られた溶液1 mLを採り、メタノールで正確に50 mLとしたものを試験溶液(試料0.005 g相当/mL)とした。なお、抽出操作は農薬の混合標準溶液0.5 mLを添加後、30分経過してから開始した。

## 8. 定量

添加回収試験における回収率12.5、25、50、75、100および150%相当濃度の標準溶液をメタノールで調製し、それぞれ5 µLをLC-MS/MSに注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

## 9. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液(農薬の残留していないブランク試料を用い、本法に従って調製した試験溶液)100 µLをバイアル

に採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を添加回収試験における回収率100%相当濃度の溶媒標準溶液(溶媒で調製した標準溶液)100 µLに溶解してマトリックス標準溶液とした。マトリックス標準溶液と溶媒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。

## III 結果および考察

### 1. 測定条件の検討

LC-MS/MS測定は、通知法<sup>1)</sup>に示された条件で行った。なお、カラムの洗浄が不十分な場合、特に保持時間が長い化合物では直前に測定した試料マトリックスのキャリアオーバーにより面積低下などを起こす場合があることから、保持時間が最も長いトリデモルフが溶出した後、B液(5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液)100%で10分間のカラム洗浄を行った。

### 2. 試験溶液調製方法の検討

#### 1) 抽出および塩析

抽出および塩析は通知法に従って行った。なお、塩析においてエマルジョンが生じた場合は、毎分3000回転で5分間

遠心分離を行った。

塩析における各農薬の回収率を検討した結果、ニテンピラム (64%) およびメタミドホス (42%) を除き、80%以上の回収率が得られた。ニテンピラムおよびメタミドホスの  $\log P_{ow}$  は、それぞれ  $-0.66$  (25°C)<sup>3)</sup> および  $-0.8$  (20°C)<sup>4)</sup> であり、いずれも極性が高いため、一部が水層へ移行したことが低回収率の原因と推察された。

## 2) カラム精製

### (1) ODS ミニカラムによる精製

通知法<sup>1)</sup>の「穀類、豆類および種実類の方法」では、低極性成分を除去するため、「果実および野菜の方法」に ODS ミニカラム精製が追加されている。茶の場合においても ODS ミニカラムによる精製が有効であるかを検討した。茶のアセトニトリル抽出液を塩析後、得られたアセトニトリル層を ODS ミニカラム (1000 mg) に負荷したところ、黄色色素はカラムから溶出されたが、緑色色素はカラムに保持され、除去することができた。また、ODS ミニカラムからの各農薬の回収率を検討した。通知法では、塩析後のアセトニトリル層を負荷した後、アセトニトリル 2 mL で溶出することとされているが、検討した農薬の多くが 2 ~ 5 mL の画分にも溶出が見られた (最大で 16% : ハルフェンブロックス) ことから、アセトニトリル 5 mL で溶出することとした。

### (2) グラファイトカーボンミニカラムおよび陰イオン交換ミニカラムによる精製

通知法<sup>1)</sup>ではグラファイトカーボン/NH<sub>2</sub> 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) による精製を採用しているが、色素等の夾雑成分の除去効果をグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) と比較したところ、グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムの除去効果の方が高かったことから、本研究ではグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムを用いた精製を検討した。

検討にあたって、ODS ミニカラム精製後の溶出液を濃縮して得られた残留物をアセトニトリル/トルエン (3:1) 2 mL で溶解しようとしたところ、残留物が濃縮容器表面に強く付着して回収することができなかった。緑茶は夾雑成分が非常に多く、特に大量に含まれるタンニン等の高極性の夾雑成分のアセトニトリル/トルエン (3:1) への溶解性が低いことが原因と推察された。そこで、アセトニトリル 3 mL を加えて超音波処理を約 1 分間行った後、トルエン 1 mL を加えてミニカラムへ

負荷することとした。アセトニトリルを加えて超音波処理することにより残留物は均一に分散した。その後、トルエンを加えることにより高極性の夾雑成分が析出したが、濃縮容器からの回収は可能であり、析出物によるミニカラムの目詰まり等の問題はなかった。

ミニカラム精製における色素の挙動を表 2 に示した。(a) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) による精製のみでは、黄色色素を除去することはできなかった。また、充てん量の多い (b) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (1000mg/500mg) および (c) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (1000 mg/1000 mg) についても検討したが、いずれも黄色色素が溶出した。

そこで、黄色色素を除去するため、連結カラムでの精製を検討した。(d) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) の下にグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 m) を連結したカラムおよび (e) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) の下にグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) を連結したカラムを検討したところ、いずれも黄色色素はカラムに保持され、ほぼ無色の溶液が得られた。一方、(f) グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) の下にグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) を連結したカラムでは、アセトニトリル/トルエン (3:1) 14 mL (うち 4 mL で負荷) 以上で黄色色素がカラムから溶出した。3種類の緑茶を用いて検討を行ったが、同様の結果が得られ、黄色色素の除去にはグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) の下にグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) を連結することが良いことが判明した。充填量の多い (b) や (c) よりも、連結カラム (d) や (e) を用いた方が色素の除去効果が高い理由は不明であるが、本研究では表 2 の (e) の条件を用いて精製を行うこととした。

条件 (e) を用いて各農薬のカラムから溶出挙動について検討した結果、検討した農薬の多くはアセトニトリル/トルエン (3:1) 24 mL (うち 4 mL で負荷) で溶出した。しかし、クロルフルアズロンやピリミジフェン等の一部の農薬は 24 ~ 44 mL の画分にも溶出が見られたことから、アセトニトリル/トルエン (3:1) 44 mL (うち 4 mL で負荷) で溶出することとした。

ODS ミニカラム、およびグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムで精製

表 2. ミニカラム精製における色素の挙動

ミニカラム		アセトニトリル/トルエン (3:1)			
上	下	0-14 mL (負荷 4 mL)	14-24 mL	24-34 mL	34-44 mL
(a) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	—	黄色	黄色	—	—
(b) InertSep GC/PSA (1000 mg/500 mg, 6 mL)	—	無色	黄色	—	—
(c) InertSep GC/PSA (1000 mg/1000 mg, 12 mL)	—	薄黄色	薄黄色	無色	無色
(d) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	無色	無色	無色	無色
(e) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	InertSep GC (500 mg, 6 mL)	無色	無色	無色	無色
(f) InertSep GC (500 mg, 6 mL)	InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	無色	黄色	—	—

—: 未実施

することにより、ほぼ無色の試験溶液が得られた。

### 3. 添加回収試験

市販の緑茶を用いて、135 化合物を対象に基準値濃度 (0.01 ppm ~ 50 ppm) で 5 併行の添加回収試験を行った。添加濃度が 10 ppm を超えるような高濃度での添加回収試験では、試料 0.25 g 相当 /mL の試験溶液を LC-MS/MS に注入すると検出器においてイオンが飽和すると推測された。また、添加濃度が大幅に異なる化合物の添加回収試験を同時に行うことにより、化合物同士の干渉等の予期しない問題が発生することも考えられた。そこで本研究では、基準値が 1 ppm 以下の農薬 (グループ A) と 1 ppm を超える農薬 (グループ B) の 2 つのグループに分けて添加回収試験を行った。グループ B の添加回収試験においては、試験溶液 (試料 0.25 g 相当 /mL) を 50 倍希釈 (試料 0.005 g 相当 /mL) して LC-MS/MS 測定を行った。

検討した 135 化合物のうち、真度 (回収率) の目標値 (70 ~ 120%) および併行精度 (相対標準偏差, RSD) の目標値 (0.001 ppm < 添加濃度 ≤ 0.01 ppm : 25% 未満、0.01 ppm < 添加濃度 ≤ 0.1 ppm : 15% 未満、添加濃度 > 0.1 ppm : 10% 未満)<sup>5)</sup> を満たした化合物は 120 化合物であった (表 1)。目標値を満たさなかった 15 化合物のうち、オキシカルボキシン、チアベンダゾールおよびピラゾリネートはグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム精製、メタミドホスおよびニテンピラムは塩析での損失が、低回収率の主な原因と考えられた。また、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求めたところ、目標値を満たさなかった 15 化合物中、グループ A の 7 化合物 (オキシカルボキシン、クロリダズン、ジメチリモール、アベルメクチン B1a、テブチウロン、モノクロトホスおよびシクロプロトリン) が 0.80 未満となり、試料マトリックスによるイオン化阻害が低回収率の原因の一つであると推察された。試験溶液を 50 倍希釈して LC-MS/MS 測定を行ったグループ B の化合物は、マトリックスによる大きな影響は認められなかった。ブランク試験溶液を測定した結果、検討した 135 化合物いずれも、定量を妨害するピークの面積は添加試料から得られたピークの面積の 1/10 未満であり、選択性に問題はなかった。ブランク試験溶液 (試料 0.25 g 相当 /mL) を用いて試料中 0.01 ppm 相当のマトリックス標準溶液 (0.0025 μg/mL) を調製し、S/N 比を求めた結果、検討したすべての化合物で S/N ≥ 10 であった。

## IV 結論

厚生労働省通知の「LC-MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」<sup>1)</sup> を改良し、緑茶を対象として LC-MS/MS による残留農薬の一斉試験法を開発した。本法は試料を水で膨潤した後、アセトニトリル抽出および塩析による水層分離を行い、ODS ミニカラムおよびグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムで精製して、LC-MS/MS で定量および確認する方法である。ODS

ミニカラムおよび連結カラムで精製することにより、色素等の夾雑成分を効果的に除去でき、ほぼ無色の試験溶液が得られた。基準値濃度で 5 併行の添加回収試験を行った結果、検討した 135 化合物中 120 化合物が真度および併行精度の目標値を満たした。また、検討したすべての化合物において選択性および定量感度に問題はなかったことから、本法は緑茶の食品衛生法の規格基準への適合性を判断するための試験法として適用可能であると考えられた。

本研究は「平成 23 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係る分析法開発事業」により実施した。

## V 文献

- 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 11 月 29 日、食安発第 1129002 号。
- 2) Fillion, J., Sauve, F., Selwyn, J.: Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, **83**, 698-713 (2000).
- 3) Tomlin, C. ed., “The Pesticide Manual”, Fifteenth ed., BCPC Publications, 2009, p. 817-818.
- 4) Tomlin, C. ed., “The Pesticide Manual”, Fifteenth ed., BCPC Publications, 2009, p. 752-753.
- 5) 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等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号 (平成 22 年 12 月 24 日一部改正、食安発 1224 第 1 号)。