

201234004B

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

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～24 年度 総合研究報告書

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 25(2013)年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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 -----	7
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 --	61
坂井 隆敏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	119
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	123

I. 総合研究報告

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

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伴い、規制対象となる農薬等は現在 830 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精確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を開発するため、「測定」と「抽出・精製」の両面から分析法の効率化・迅速化を図った。「測定」に関しては、選択性の高いガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計(GC-MS/MS)及び液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計(LC-TOFMS)の応用、「抽出・精製」に関しては、自動化が可能で選択性が高い超臨界流体抽出(SFE)の残留農薬分析への適用について検討した。平成 22 年度は高～中極性農薬を対象に、残留農薬一斉分析に適した LC-TOFMS 測定法を確立した。平成 23 年度は高～中極性農薬を対象に、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)及び SFE を用いた簡便な残留農薬一斉分析法を開発した。平成 24 年度は中～低極性農薬を対象に、GC-MS/MS 及び SFE を用いた残留農薬一斉分析法を開発した。農薬残留試料を用いて、SFE 法と溶媒抽出法との分析値の比較を行った結果、ほぼ同等の結果が得られ、SFE 法はスクリーニング法として有効であることが示された。以上のように、GC-MS/MS 及び LC-TOFMS を用いた選択性の高い測定法及び自動化が可能な SFE を用いた抽出・精製法を確立し、迅速かつ効率的な農産物中の残留農薬スクリーニング分析法を開発した。

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

検査機関におけるより効率的な検査態勢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残留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。平成 22 年度は種々の畜水産物から可能な限り多種多様な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。平成 23 年度は広範囲な農薬等に適用可能であり、且つ、種々の畜水産物中の試料マトリックス成分を効果的に除去可能なミニカラム精製条件の確立を中心に検討を行った。平成 24 年度は開発した分析法について、畜水産物 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)における添加回収試験を実施し、種々の畜水産物に対する適用性を評価した。以上のような検討から、種々の畜水産物に適用可能な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を開発した。

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

食品部主任研究官)

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29日に施行され、現在約830品目(農薬約610品目、動物用医薬品約220品目)の農薬等が規制対象となっている。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スクリーニング分析法の開発が不可欠である。そのため本研究では、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

食品に残留する膨大な数の農薬等を検査するための、迅速且つ効率的な一斉分析法の開発を目的として、本研究では、農産物中の残留農薬を対象として「測定」と「抽出・精製」の両面から分析法の効率化・迅速化を図った。「測定」に関しては、食品マトリックス中から多数の農薬を効率的に検出するため、選択性の高いGC-MS/MS及び液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計の応用について検討した。「抽出・精製」に関しては、自動化が可能で選択性

が高い超臨界流体抽出(SFE)を残留農薬分析に応用し、抽出・精製の効率化・迅速化を図り、測定に関する検討と合わせて高効率なスクリーニング分析法の開発を行った。

平成22年度は「測定」における効率化を図るため、高～中極性農薬(約150化合物)を用いて残留農薬一斉分析に適したLC-TOFMS測定条件を確立し、定量性や定量限界等を評価した。平成23年度は「抽出・精製」における効率化・迅速化を図るため、LC測定が可能な高～中極性農薬(約120化合物)について一斉分析に適したSFE条件(圧力、温度、時間、モディファイヤー等)やSFE用試料調製法を検討し、SFEを用いた一斉分析法を開発した。平成24年度は中～低極性農薬(約100化合物)を対象に、GC-MS/MSによる測定系を確立するとともに、SFEを用いた残留農薬一斉分析法を開発した。

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

ポジティブリスト制度の導入に伴い、農薬、動物用医薬品それぞれに対する一斉試験法の研究・開発がなされ、今日までに動物用医薬品について3種類、農薬について5種類の一斉試験法が通知されている。現在、各検査機関においては、これら通知試験法に準拠した分析法を用いて食品中の残留農薬等の検査が実施されている。これら通知試験法の分析対象化合物は、当然ではあるが、動物用医薬品一斉試験法であれば動物用医薬品、農薬一斉試験法であれば農薬であり、動物用医薬品一斉試験法で農薬が、また農薬一斉試験法で動物用医薬品が分析可能であるかについてはほとんど検討がなされていない。

一方、動物用医薬品はもとより、農薬の中にも畜水産物に基準値が設定されているものがある

ため(約 300 農薬)、畜水産物については動物用医薬品及び農薬の両方を分析する必要がある。しかしながら、上述のように、現行の一斉試験法は動物用医薬品もしくは農薬のどちらか一方のみが分析対象であるため、畜水産物を検査する場合、現状では動物用医薬品一斉試験法及び農薬一斉試験法を用いて二度の分析を行う必要がある。

動物用医薬品と農薬は、使用対象や使用方法・目的などは当然異なるが、食品中に残留した場合には、どちらも人の健康を損なうおそれのある化学物質である。したがって、分析対象となる食品が同じであれば、同一の方法で動物用医薬品と農薬とを分析することが可能であると考えられる。動物用医薬品及び農薬を同時に分析できる方法が開発されれば、現在それぞれの試験法で行われている検査を一回の検査に短縮できる為、より効率的な食品の検査が可能になると考えられる。

本研究では、検査機関におけるより効率的な検査態勢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農薬及び動物用医薬品を対象として、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。

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。

平成 23 年度は、可能な限り多くの農薬等に適用可能であり、且つ、種々の畜水産物中の試料マトリックス成分を効果的に除去可能なミニカラム精製条件の確立を中心に検討を行った。

平成 24 年度は、開発検討した分析法の種々の畜水産物に対する適用性を評価することを目的として、畜水産物 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)を用いた添加回収

試験を実施した。

B. 研究内容

分担研究 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)では、「測定」と「抽出・精製」の両面から残留農薬分析法の効率化・迅速化を図った。「測定」に関しては、LC-TOFMS 及び GC-MS/MS の応用について検討した。「抽出・精製」に関しては、SFE の応用について検討した。抽出・精製の効率化・迅速化と、測定に関する検討とを合わせて高効率なスクリーニング分析法の開発を行った。

分担研究 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)では、畜水産物中の農薬及び動物用医薬品を同時に分析可能な、包括的一斉スクリーニング分析法の開発を行った。

それぞれの分担課題については、研究内容が異なるため、個別に総合研究報告書を作成した。

C. 健康危険情報

なし。

D. 研究発表

1. 論文発表

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MS による農産物中のピンドン分析法、食品衛生学雑誌、52(4)、237-243(2011)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MS による畜水産物およびはちみつ中の 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤分析法、食品衛生学雑誌、52(4)、244-250(2011)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MS による畜水産物およびはちみつ中のピンドン分析法、食品衛生学雑誌、52(5)、

294-298(2011)

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)

2. 学会発表

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子: 農産物中のピンドン試験法の開発、第 101 回日本食品衛生学会学術講演会(2011.5)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-TOFMSを用いた農産物中残留農薬分析の検討、第 102 回日本食品衛生学会学術講演会(2011.9)

坂井隆敏、坂井英里、齊藤静夏、根本 了、松田りえ子: 畜水産物中のヒドロコルチゾン分析法の開発、第 102 回日本食品衛生学会学術講演会(2011.9)

坂井隆敏、齊藤静夏、根本 了、松田りえ子: 加工食品中に高濃度に残留する農薬等試験法の検討-III、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会(2011.11)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子:

畜水産物中のプロディファコウム及びワルファリン試験法の開発、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会(2011.11)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MSによる茶中の残留農薬一斉分析の検討、第 34 回農薬残留分析研究会(2011.11)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:超臨界流体抽出及び LC-MS/MS を用いた野菜・果実中の残留農薬一斉分析法の検討、第 103 回日本食品衛生学会学術講演会(2012.5)

Shizuka Saito, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda: Multi-residue method for the determination of pesticides in tea by LC-MS/MS、9th European Pesticide Residue Workshop(2012.6)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-MS/MSを用いた野菜・果実中酸性農薬の一斉分析法の検討、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会(2012.9)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:超臨界流体抽出及び LC-MS/MS を用いた穀類及び茶中の残留農薬一斉分析法の検討、第 49 回全国衛生化学技術協議会年会(2012.11)

E. 知的所有権の取得状況

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

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を開発するため、「測定」と「抽出・精製」の両面から分析法の効率化・迅速化を図った。「測定」に関しては、選択性の高い GC-MS/MS (ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計) 及び LC-TOFMS (液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計) の応用、「抽出・精製」に関しては、自動化が可能で選択性が高い超臨界流体抽出 (SFE) の残留農薬分析への適用について検討した。平成 22 年度は高～中極性農薬を対象に、残留農薬一斉分析に適した LC-TOFMS 測定法を確立した。平成 23 年度は高～中極性農薬を対象に、LC-MS/MS 及び SFE を用いた簡便な残留農薬一斉分析法を開発した。平成 24 年度は中～低極性農薬を対象に、GC-MS/MS 及び SFE を用いた残留農薬一斉分析法を開発した。農薬残留試料を用いて、SFE 法と溶媒抽出法との分析値の比較を行った結果、ほぼ同等の結果が得られ、SFE 法はスクリーニング法として有効であることが示された。以上のように、GC-MS/MS 及び LC-TOFMS を用いた選択性の高い測定法及び自動化が可能で SFE を用いた抽出・精製法を確立し、迅速かつ効率的な農産物中の残留農薬スクリーニング分析法を開発した。

研究協力者

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品および飼料添加物)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)の農薬等が規制対象となっている。このような膨大な数の品目を検査するためには、迅速且つ効率的な一斉分析法の確立が望まれる。そこで本研究では、農産物中の残留農薬を対象として「測定」と「抽出・精製」の両面から分析法の効率化・迅速化を図った。「測定」に関しては、食品マトリックス中から多数の農薬を効率的に検出する

ため、選択性の高い GC-MS/MS 及び LC-TOFMS の応用について検討した。「抽出・精製」に関しては、自動化が可能で選択性が高い超臨界流体抽出 (SFE) を残留農薬分析に応用し、抽出・精製の効率化・迅速化を図り、測定に関する検討と合わせて高効率なスクリーニング分析法の開発を行った。

平成 22 年度は「測定」における効率化を図るため、高～中極性農薬(約 150 化合物)を用いて残留農薬一斉分析に適した LC-TOFMS 測定条件を確立し、定量性や定量限界等を評価した。平成 23 年度は「抽出・精製」における効率化・迅速化を図るため、LC 測定が可能で高～中極性農薬(約 120 化合物)について一斉分析に適した SFE 条件(圧力、温度、時間、モディファイヤ

一等)や SFE 用試料調製法を検討し、SFE を用いた一斉分析法を開発した。平成 24 年度は中～低極性農薬(約 100 化合物)を対象に、GC-MS/MS による測定系を確立するとともに、SFE を用いた残留農薬一斉分析法を開発した。

B. 研究方法

I. LC-TOFMS を用いた残留農薬一斉分析の検討

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 μm 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/NH2(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_2HPO_4) 52.7 g 及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. 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 $\mu\text{g/mL}$ 、水及びメタノール(1:1)混液)、リファレンス流速: 5 $\mu\text{L/min}$ 、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 $\mu\text{g/mL}$ 、水及びメタノール(1:1)混液)、リファレンス流速: 5 $\mu\text{L/min}$ 、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 を量り採った。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。

II. SFE 及び LC-MS/MS を用いた残留農薬一斉分析の検討

1. 試料

市販のトマト、レモン、きゅうり、玄米及び茶を用いた。トマト、レモン及びきゅうりは、フードカッターで細切均一化したものを用いた。玄米及び茶は遠心粉砕機で粉砕して均一化し、425 µm の標準網ふるいに通したのを用いた。

2. 試薬及び試液

有機溶媒は、関東化学(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。硫酸マグネシウム(無水、特級)は関東化学(株)製を用いた。ケイソウ土(セライト 545)及び硫酸ナトリウム(無水、残留農薬試験用)は、和光純薬工業(株)製を用いた。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用いた。ガラス繊維ろ紙 (GF/F) は Whatman 社製を用いた。LC-MS/MS の移動相溶媒は、関東化学(株)製の LC-MS 用蒸留水及びメタノールを用いた。

表 1 に検討に用いた農薬 (123 化合物) を示した。各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Dr. Ehrenstorfers 社及び Riedel-de Haën 社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。検量線作成用及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 及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 水酸化ナトリウム溶液または 1 mol/L 塩酸を用いて

pHを7.0に調整した後、水を加えて1Lとした。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは、Agilent社製 Mega Bond Elut C18(担体量1000 mg)を用いた。グラフアイトカーボン/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社製 InertSep GC/PSA(担体量500 mg/500 mg)を使用した。

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-MS/MSは、Waters社製の高速度液体クロマトグラフ Alliance 2695 及び同社製質量分析計 Micromass Quattro Premierを使用した。

SFE装置は、日本分光(株)製の超臨界二酸化炭素流体抽出装置システムを用いた。

4. 測定条件

4.1 LC条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm 、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 μm 、ジーエルサイエンス社製); カラム温度: 40°C; 注入量: 5 μL ; 移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A液)及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B液); グラジエント条件 (t: 時間(分)): t_0 : B=15%、 t_1 : B=40%、 $t_{3.5}$: B=40%、 t_6 : B=50%、 t_8 : B=55%、 $t_{17.5}$: B=95%、 t_{33} : B=95%、 $t_{33.1}$: B=100%、 t_{43} : B=100%、 $t_{43.1}$: B=15%; 保持時間: 表1に示した。

4.2 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(+))及びネガティブモード(ESI(-)); 測定モード: selected reaction monitoring (SRM); キャピラリー電圧: 3 kV;

ソース温度: 120°C; コーンガス: 50 L/h(N_2); 脱溶媒温度: 400°C; 脱溶媒ガス: 800 L/h(N_2); コリジョンガス: $\pm 3.1 \times 10^{-3}$ mbar(Ar); 測定イオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー: 表3に示した。

5. SFE条件

最終的なSFE条件を以下に示した。

CO_2 密度: 0.8 g/mL; 抽出温度: 40°C; CO_2 流速: 2.0 mL/min; 抽出時間: 30分; トラップ: ODS(内径4.6 mm、長さ50 mm、粒子径30 μm 、充填量0.45 g); トラップ温度: 30°C; トラップからの溶出: アセトニトリル 5 mL(2.0 mL/min)で溶出し、これをSFE抽出液とした。その後、ヘキサン/アセトン(1:1) 10 mL(2.0 mL/min)で洗浄し、アセトニトリル 10 mL(2.0 mL/min)でコンディショニングを行った。

6. 試験溶液の調製

6.1 SFE法

6.1.1 果実・野菜の場合

試料5.0 gを乳鉢に採り、セライト5.0 gを加えた後、無水硫酸マグネシウム5.0 gを加えて、よく混合した。試料混合物4.5 g(試料1.5 g相当)を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底部にメタノール0.2 mLを添加してSFE抽出を行った。得られたSFE抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に3 mLとしたものを試験溶液(試料0.50 g相当/mL)とした。

6.1.2 穀類の場合

試料5.0 gを乳鉢に採り、セライト5.0 gを加えてよく混合した。試料混合物4.0 g(試料2.0 g相当)を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーと

して抽出管の底部にメタノール 0.2 mL 及び水 0.2 mL を添加して SFE 抽出を行った。得られた SFE 抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に 4 mL としたものを試験溶液(試料 0.50 g 相当/mL)とした。

6.1.3 茶の場合

試料 5.0 g を乳鉢に採り、セライト 15 g を加えてよく混合した。試料混合物 4.0 g (試料 1.0 g 相当)を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底部にメタノール 0.2 mL 及び水 0.2 mL を添加して SFE 抽出を行った。得られた SFE 抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に 4 mL としたものを試験溶液(試料 0.25 g 相当/mL)とした。

6.2 溶媒抽出法

通知一斉試験法「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)に準じて以下のように行った。

果実・野菜の場合は試料 20.0 g を量り採った。玄米の場合は 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。茶の場合は 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。茶の場合は、抽出液 5 mL

を採り、アセトニトリル 15 mL、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 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、分離した水層を捨てた。

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。残留物をアセトニトリルトルエン(3:1) 2 mL に溶解した。

GC/PSA 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)にアセトニトリルトルエン(3:1)を 10 mL 注入し、流出液は捨てた。このカラムに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) 20 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(果実・野菜の場合は 8 mL、玄米及び茶の場合は 4 mL)に溶解したものを試験溶液(果実・野菜及び玄米の場合は試料 0.50 g 相当/mL、茶の場合は 0.25 g 相当/mL)とした。

7. 添加回収試験

市販のトマト、レモン、きゅうり、玄米及び茶を用いて試料中濃度 0.01 ppm で 5 併行の添加回収試験を行った。

8. 定量

添加回収試験における回収率 12.5、25、50、75、100 及び 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(農薬を添加していない試

料を用いて試験法に従って調製した試験溶液) 100 μ L 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 μ L 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. SFE 及び GC-MS/MS を用いた残留農薬一斉分析の検討

1. 試料

東京都内の小売店で購入したものをフードカッターで細切均一化して用いた。

2. 試薬及び試液

有機溶媒は、関東化学(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。硫酸マグネシウム(無水、特級)は関東化学(株)製を用いた。ケイソウ土(セライト 545)、硫酸ナトリウム(無水、残留農薬試験用)、リン酸水素二カリウム(無水、特級)及びリン酸二水素カリウム(無水、特級)は、和光純薬工業(株)製を用いた。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。ガラス繊維ろ紙(GF/F)は Whatman 社製を用いた。

表 1 に検討に用いた農薬(101 化合物)を示した。各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Dr. Ehrenstorfers 社及び Riedel-de Haën 社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、ヘキサン(ヘキサンに溶解しにくい場合はヘキサン/アセトンの混合溶媒に溶解) 10 mL に溶解して調製した。添加用混合標準溶

液は、各農薬の標準原液を混合し、アセトンで適宜希釈して調製した。検量線作成用の混合標準溶液は、添加用混合標準溶液をヘキサン/アセトン(1:1)で適宜希釈して用事調製した。*n*-アルカン混合標準溶液(炭素鎖 7~14 及び 16~29 100 mg/L、15 及び 30~33 200 mg/L、ヘキサン溶液、林純薬工業(株)製)は、ヘキサンで適宜希釈して用いた。

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 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液または 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。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル(PSA)ミニカラムは InertSep PSA(200 mg、ジーエルサイエンス社製)、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(NH₂)積層ミニカラムは InertSep GC/NH₂(500 mg/500 mg、ジーエルサイエンス社製)を用いた。

3. 装置

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。超高純度蒸留水精製装置は、藤原製作所(株)製の NZJ-2DSYW を用いた。GC-MS/MS は、ThermoFisher Scientific 社製ガスクロマトグラフ質量分析計 TSQ Quantum XLS Ultra 及びオートサンプラー TriPlus RSH を使用した。SFE 装置は、日本分光(株)製の超臨界二酸化炭素流体抽出装置を用いた。

4. GC-MS/MS 測定条件

カラム DB-5ms(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m、Agilent 社製); ガードカラム 不活性キャピラリー(内径 0.25 mm、長さ 2 m、Agilent

社製); ライナー 不活性化処理済みのシングルテーパ付のもの; カラム温度 50°C (1 min) - 25°C/min - 125°C (0 min) - 10°C/min - 300°C (8.5 min); 注入口温度 230°C; トランスフアーライン温度 280°C; キャリヤーガス ヘリウム; キャリヤーガス流量 1 mL/min; 注入法 ホットニードル法 (Pre-injection time 3 s、Post-injection time 0.5 s); 注入量 2 µL; イオン化法 EI(+); イオン化エネルギー 70 eV; イオン源温度 230°C; 測定モード SRM; 測定イオン及びコリジョンエネルギー 表 10 に示した。

5. SFE 条件

最終的な SFE 条件を以下に示した。

抽出温度 40°C; 圧力 16.4 MPa; CO₂ 密度 0.8 g/mL; CO₂ 流速 2.0 mL/min; 抽出時間 30 分; トラップ ODS (内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒子径 30 µm、充填量 0.45 g、ジーエルサイエンス(株)製); トラップ温度 30°C; トラップからの溶出 アセトニトリル 2 mL で溶出し、これを SFE 抽出液とした。その後、ヘキサン/アセトン (1:1) 10 mL (2.0 mL/min) で洗浄し、アセトニトリル 10 mL (2.0 mL/min) でコンディショニングを行った。

6. 試験溶液の調製

6.1 SFE 法

試料 5.0 g を乳鉢に採り、セライト 5.0 g を加えた後、無水硫酸マグネシウム 5.0 g を加えて、よく混合した。農薬等を添加する場合には、試料に添加回収試験用の混合標準溶液を添加して良く混合し、30 分間放置したものを試料とした。試料混合物 4.5 g (試料 1.5 g 相当) を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底

部にメタノール 0.2 mL を添加して SFE を行った。得られた SFE 抽出液を、予めアセトニトリル 4 mL でコンディショニングした PSA ミニカラム (200 mg) に負荷し、さらにアセトニトリル 4 mL で溶出した。全溶出液を 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、アセトン/ヘキサン (1:1) 1.5 mL に溶解したものを試験溶液 (試料 1.0 g 相当/mL) とした。

6.2 溶媒抽出法

通知一斉試験法「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) に従って以下のように行った。

試料 20.0 g 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正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL (試料 4.0 g 相当) を採り、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 (0.5 mol/L、pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。得られたアセトニトリル層を採り、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。この残留物をアセトニトリル/トルエン (3:1) 2 mL に溶解した。

グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) にアセトニトリル/トルエン (3:1) を 10 mL 注入し、流出液は捨てた。このカラムに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) 20 mL を注入した。全溶出液を 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。残留物をアセトン/ヘキサン (1:1)

4 mL に溶解したものを試験溶液(試料 1.0 g 相当/mL)とした。

7. SFE 法での添加回収試験

市販のトマト及びほうれんそうを用いて、試料中濃度 0.1 及び 0.01 ppm で 5 併行の添加回収試験を行った。添加回収試験における回収率 12.5、25、50、75、100 及び 150%相当濃度のマトリックス添加標準溶液を調製し、ピーク面積法で検量線を作成して濃度を求めた。

8. 分析値の比較

農薬が残留した試料を用いて、SFE 法と溶媒抽出法での分析値を標準添加法により比較した。「6. 試験溶液の調製」で得られた各試験溶液 50 μ L を採り、溶媒標準溶液(20 ng/mL、りんごでは 5 ng/mL) 50 μ L を加えて混合し、それぞれ 2 μ L を GC-MS/MS に注入して、ピーク面積法で濃度を求めた。

(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必要としなかった。

C. 研究結果及び考察

I. LC-TOFMS を用いた残留農薬一斉分析の検討

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 Bla(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 μ g/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]⁺)、アンモニウム付加分子([M+NH₄]⁺)、ナトリウム付加分子([M+Na]⁺)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]⁻)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。

(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±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±10 mDa と±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、±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 ± 10 mDa 以上に設定するのがよいと考えられ、本研究では ± 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 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)→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)]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 $\mu\text{g/mL}$ 、154 農薬)と大豆のマトリックス標準溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、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。

② 再現性

グラジエント条件 a で混合標準溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、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。

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 ± 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 µg/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([M-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 µg/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≥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 Bla、MCPA、2,4-D、アシフルオルフェン、プロボ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 4-1 及び 4-2 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 5-1 及び 5-2 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[C₃H₈NOS]⁺(計算精密質量(calcd.) *m/z* 106.0321, Fr.1)及び[C₃H₆NS]⁺(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 5-1)。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 [C₁₄H₆³⁷ClF₃NO₃]⁻(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 [C₁₃H₆ClF₃NO₃]⁻(calcd. *m/z* 315.9994, Fr.1a)、50 V では[C₇H₃ClF₃O]⁻(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 5-2)。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あった。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