

LC/MS/MS による農産物中残留農薬の一斉分析法

小谷野貴文¹, 伴埜行則¹, 筒井達也¹, 橋本貴弘¹,
羽室夫美子¹, 米田昌裕¹, 川勝剛志¹, 稲田眞之助¹, 森田正和¹

Simultaneous Determination of Multiple Pesticide Residues in Agricultural Products by LC/MS/MS

Takafumi KOYANO, Yukinori BANNO, Tatsuya TSUTSUI, Takahiro HASHIMOTO,
Fumiko HAMURO, Masahiro KOMEDA, Tsuyoshi KAWAKATSU,
Shinnosuke INADA, Masakazu MORITA

Abstract : The LC/MS/MS method for simultaneous determination of multiple pesticide residues in agricultural products has been developed. Residues were extracted from samples with acetonitrile. The extract was cleaned up with a porous diatomaceous earth cartridge, gel permeation chromatography and graphitized carbon cartridge. With this procedure, 41-47 pesticides gave good recoveries (70-120%) from 4 kinds of vegetables. The LC/MS/MS was found superior to other methods such as HPLC/UV or LC/MS with respect to specificity in the determination of pesticide residues in agricultural foods.

Key words : 残留農薬 pesticide residue, 一斉分析法 multi-residue determination, 農産物 agricultural products, 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS, マススペクトロメトリー/マススペクトロメトリー MS/MS

I はじめに

食品衛生法では平成14年3月末現在, 農産物を対象として229農薬の残留基準値が設定されており, 農薬ごとの分析法として123の試験法(公定法)が示されている¹⁾。しかし残留農薬を個別の分析法によって検査することは人手・時間・労力の面から困難である。

平成9年4月, 旧厚生省より残留農薬迅速分析法の利用についての通知がなされ²⁾, 生活衛生部門でもこれに準じた分析法により分析装置としてガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)及び液体クロマトグラフィー/吸光度計(HPLC/UV)を用いて農産物中の残留農薬検査を行ってきた(図1)。

一方, 平成11年11月, 公定法の確認試験の一部に液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)が採用されたことにともない³⁾, 翌年12月に当部門にも LC/MS が導入された。LC/MS は GC/MS と違い不揮発性で熱に不安定な物質の測定が可能であるため, これまでの検査よりも分析対象農薬を広げることができるというメリットがある。さらにこのたび導入された LC/MS は MS/MS 機能を持つことから試料マトリックスの影響を受けない確実な同定が期待できる。

今回は公定法において LC/MS が採用されている農薬や GC/MS による測定が難しい農薬などを対象として, 当部

門でこれまで行ってきた残留農薬一斉分析法が LC/MS にも適用できるか検討を行った。

II 実験方法

1. 試料

だいこん, はくさい, ブロッコリー, ほうれんそう

2. 試薬

1) 農薬混合標準液

表1の農薬を含む $10\mu\text{g/ml}$ 混合標準液をアセトニトリルにて調製した。これを原液とし, 目的に応じて希釈, マトリックスマッチング等を行った。

2) 試薬

溶媒: アセトニトリル, 酢酸エチル, アセトン, ヘキサンは残留農薬試験用を使用した。シクロヘキサンは特級を使用した。LC/MS 移動相のアセトニトリルは HPLC 用, 酢酸は精密分析用を使用した。

塩化ナトリウム: 試薬特級のものを 450°C , 3時間加熱処理して使用した。

3) 固相抽出カートリッジ

ケイソウ土カラム(Extrelut NT20, MERCK)

活性炭カラム(0.5g) (Envi-carb, SUPELCO)

3. ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)

装置: LC-10 (島津製作所)

カラム: CLNpak EV-2000(20mm × 300mm) (Shodex)

ガードカラム: CLNpak EV-G(20mm × 100mm) (Shodex)

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

移動相：アセトン／シクロヘキサン（2：8）

流速：4.0ml/min

注入量：2 ml

分取時間：13.75～38.75min

4. 液体クロマトグラフ／質量分析計 (LC/MS)

1) LC 部

装置：Agilent 1100 Series (Agilent Technologies)

カラム：Inertsil ODS-3 (2.1mm ×150mm) (GL Sciences)

カラム温度：40℃

移動相：A 液 0.5%酢酸水溶液 B 液 アセトニトリル

グラジエント(B 液)：15% — (20min) — 95% (10min)

流速：0.2ml/min

注入量：5 μl

2) MS 部

装置：LCQ DECA (ThermoQuest)

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

Spray Voltage：5 kV

Capillary Temp.：300℃

Full Scan MS/MS 分析（ジクロメジン，トリシクラゾール，シプロジニルのみ SIM 分析）

各農薬の正・負モード，前駆イオン(precursor ion)，衝突エネルギー，モニターイオン，リテンションタイムは表 4 のとおりである。

5. 試験溶液調製法

図 1 の手順で調製した。農薬添加量は 4 μg とした。

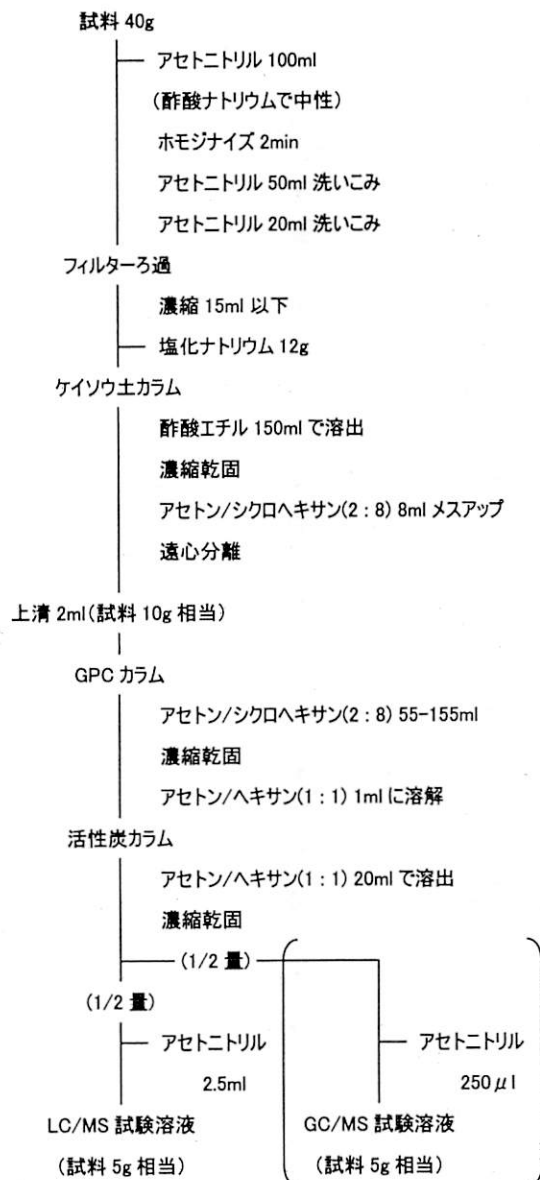


図 1 試験溶液の調製法

表 1 添加回収試験用混合標準 (77農薬)

propamocarb	pymetrozine	formamidine hydrochloride	acephate
methamidophos	difenzoquat methylsulfate	imazalil	CPF
imazamox	acetamiprid	tricyclazole	methiocarb-sulphone
prohexadione	cymoxanil	aldicarb	imibenconazole-debenzyl
emamectin benzoate	asibenzolar acid	metsulfuron-methyl	methabenzthiazuron
dichlorvos	emamectin amino	quinclorac	bensulfuron-methyl
fosthiazate	azimsulfuron	inabenfide	dimethomorph
tribenuron methyl	diclomezine	flazasulfuron	cyproconazole
imazosulfuron	pacrobutrazole	desmedipham	chlorimuron ethyl
isofenphos oxon	daimuron	cumyluron	2,4-D
phoxim	hexaconazole	prochloraz	cyprodinil
diflubenzuron	pyrazoxyfen	penconazole	tebfenozide
bitertanol	pyraclofos	propiconazole	triflumizole
thifluzamide	hexaflumuron	kresoxim-methyl	clofentezine
difenoconazole	pyrethrins	pyrimidifen	imibenconazole
pencycuron	tebufenpyrad	teflubenzuron	cycloxdim
quizalofop-ethyl	fenpyroxymate(Z)	diflufenican	chlorfluazuron
diafenthiuron-urea	flufenoxuron	lufenuron	hexythiazox
emamectin MFA	fenpyroxymate(E)	emamectin FA	ethoxazole
pyridate			

Ⅲ 結果

1. LC/MS/MS 分析条件の検討

イオントラップ型質量分析計による MS/MS(MSⁿ)法は、前駆イオン(precursor ion)をイオントラップ内に保持した後、衝突活性化・イオン放出を繰り返し行って最終的なプロダクトイオンを検出する方法である⁴⁾。

インフュージョン測定により各農薬分析時の正・負モード、前駆イオン及び衝突エネルギーを決定した。前駆イオンは基本的にプロトン化分子・脱プロトン化分子を選択したが、ごく一部の農薬についてはナトリウムイオン付加分子を前駆イオンに設定した。また MS/MS スペクトルが不安定な化合物のみ SIM で測定した(表4)。

スキャンイベント数を3に設定し、セグメント間の前後にリテンションタイムを持つ農薬の時間差を最も小さいところで0.6~0.7分程度にしたところ、分析メソッド A ~ D の4グループになった。表5にメソッド A とメソッド D を示す。

2. 混合標準の繰り返し精度

添加回収試験用混合標準液(0.1 µg/ml)を繰り返し測定(n=3)したときの相対標準偏差を調べたところ表2のような結果であった。感度の悪い8農薬及び RSD が20%以上の2農薬(×印)は以後の検討対象から除いた。

表2 混合標準の各農薬の相対標準偏差(%)

農薬名	RSD(%)	農薬名	RSD(%)
propamocarb	2.5	formamidine_hydrochloride	— ×
methamidophos	10.4	imazalil	2.0
imazamox	0.3	tricyclazole	1.2
prohexadione	— ×	aldicarb	— ×
emamectin_benzoate	2.1	metsulfuron-methyl	1.0
dichlorvos	— ×	quinclorac	2.4
fosthiazate	5.1	inabenfide	2.5
tribenuron_methyl	9.4	flazasulfuron	2.2
imazosulfuron	1.4	desmedipham	1.0
isofenphos_oxon	5.1	cumyluron	1.1
phoxim	26.3 ×	prochloraz	1.0
diflubenuron	3.3	penconazole	11.7
biteranol	2.6	propiconazole	2.0
thifluzamide	5.3	kresoxim-methyl	4.0
difenoconazole	1.2	pyrimidifen	4.1
pencycuron	2.5	teflubenzuron	2.6
quizalofop-ethyl	0.7	diflufenican	2.1
diafenthiuron-urea	1.0	lufenuron	5.2
emamectin_MFA	3.8	emamectin_FA	8.0
pyridate	13.5	pyrethrin-(I)	— ×
pymetrozine	2.0	acephate	0.8
difenzoquat_methylsulfate	2.7	CPF	3.6
acetamiprid	3.5	methiocarb-sulphone	3.8
cymoxanil	— ×	imibenconazole-debenzyl	3.5
asibenzolar_acid	6.9	methabenzthiazuron	2.0
emamectin amino	— ×	bensulfuron-methyl	2.9
azimsulfuron	2.4	dimethomorph(E)	1.0
diclomezine	3.8	dimethomorph(Z)	0.5
pacrobutrazole	4.3	cyproconazole	17.0
daimuron	0.3	chlorimuron_ethyl	3.4
hexaconazole	22.8 ×	2,4-D	3.4
pyrazoxyfen	2.8	cyprodinil	1.4
pyraclofos	2.3	tebfenozide	6.8
hexaflumuron	11.2	triflumizole	2.9
pyrethrin-(II)	— ×	clofentazine	6.4
tebufenpyrad	3.3	imibenconazole	1.9
fenpyroximate(Z)	10.3	cycloxdim	0.5
flufenoxuron	7.8	chlorfluazuron	2.1
fenpyroximate(E)	3.4	hexythiazox	0.2
		ethoxyzole	2.6

注) ×印は感度の悪い農薬及び RSD が20%以上の農薬

3. 混合標準の共存効果による感度変化

混合標準液に含まれている農薬数が非常に多いので、すべての成分がカラムで完全に分離できているわけではない。このとき農薬どうしの共存効果によってイオン強度が変わる可能性がある。

「添加回収試験用混合標準」と「カラムで完全に分離する混合標準(別途調製)」のそれぞれ0.2 µg/ml 溶液を用いて各農薬のピークエリアを比較した(後者を100%とする)。大部分の農薬では±20%以上の感度差は見られなかった(表3)。20%以上感度差のある5農薬(×印)は以後の検討対象からはずした。

表3 完全分離標準と不完全分離標準の感度比較

農薬名	不完全/完全 (%)	農薬名	不完全/完全 (%)
propamocarb	80.4	imazalil	95.8
methamidophos	92.3	tricyclazole	95.9
imazamox	100.1	metsulfuron-methyl	101.3
emamectin_benzoate	110.5	quinclorac	99.1
fosthiazate	102.2	inabenfide	98.6
tribenuron_methyl	96.4	flazasulfuron	95.7
imazosulfuron	97.9	desmedipham	99.3
isofenphos_oxon	110.8	cumyluron	104.4
diflubenuron	83.5	prochloraz	100.9
biteranol	102.8	penconazole	102.6
thifluzamide	81.8	propiconazole	107.4
difenoconazole	92.4	kresoxim-methyl	39.1 ×
pencycuron	93.5	pyrimidifen	101.7
quizalofop-ethyl	94.6	teflubenzuron	101.2
diafenthiuron-urea	98.9	diflufenican	100.7
emamectin_MFA	98.9	lufenuron	98.8
pyridate	63.4 ×	emamectin_FA	93.7
pymetrozine	98.3	acephate	86.8
difenzoquat_methylsulfate	115.3	CPF	101.0
acetamiprid	101.0	methiocarb-sulphone	104.8
asibenzolar_acid	118.9	imibenconazole-debenzyl	95.4
azimsulfuron	93.2	methabenzthiazuron	103.3
diclomezine	143.2 ×	bensulfuron-methyl	101.4
pacrobutrazole	87.2	dimethomorph(E)	90.8
daimuron	97.5	dimethomorph(Z)	101.4
hexaconazole	82.3	cyproconazole	70.9 ×
pyrazoxyfen	102.9	chlorimuron_ethyl	86.9
pyraclofos	104.1	2,4-D	106.5
tebufenpyrad	104.8	cyprodinil	88.9
fenpyroximate(Z)	241.5 ×	tebfenozide	91.2
flufenoxuron	92.3	triflumizole	93.5
fenpyroximate(E)	115.5	clofentazine	98.8
		imibenconazole	98.2
		cycloxdim	100.8
		chlorfluazuron	87.2
		hexythiazox	88.6
		ethoxyzole	100.2

注) ×印はピークエリアが±20%以上違う農薬

4. LC/MS におけるマトリックス効果

当部門のスクリーニング検査で行われている抽出・精製方法によって得られた試験溶液が、LC/MS による測定の際にどの程度マトリックスの影響を受けるか調べた。マトリックス濃度は図1により調製したときの濃度で、標準液濃度は0.1 µg/ml である。

表6は「マトリックスを含まない標準」に対する「マトリックスマッチした標準」の比(%)を示している。図2は標準液に試料マトリックスが含まれることで±30%以上の感度差が生じた農薬数をグラフにしたものである。

だいこんはマトリックス効果の影響が最も少なく、ブロッコリー・ほうれんそうは影響を受けやすかった(図2)。マトリックス効果の大きい農薬では7~8割程度の感度低下や2~3倍の感度上昇が認められた。ブロッコリー中のメタミドホスは検出できなかった(表6)。

5. 添加回収試験

農産物40g あたり4 μ gの農薬(ジメトモルフはE体とZ体の合計で4 μ g)を加えて添加回収試験を行った。検量線作成用の標準液はマトリックス効果を考慮し、マトリックスマッチした混合標準液(0.02 μ g/ml ~0.5 μ g/ml)

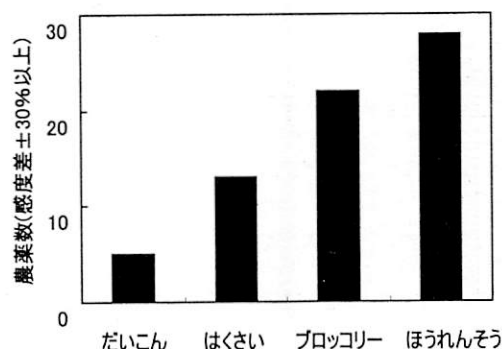


図2 農産物によるマトリックス効果の違い

表4 各農薬のLC/MS/MS条件

農薬名	モニターイオン	R.T.	polarity	分子量	precursor ion	energy (eV)
propamocarb	143.9 102.0	1.6	+	224.7	189.1	28
methamidophos	112.0	2.5	+	141.1	142.1	25
imazamox	284.1 278.0 261.0	10.9	+	305.3	306.2	35
prohexadione	157.0 139.0	12.7	+	212.2	213.1	18
emamectin benzoate	888.4	14.5	+	1008.3	886.9	25
dichlorvos	127.0 145.0	14.8	+	221.0	221.1	29
fosthiazate	227.9	16.4	+	283.3	284.1	20
tribenuron methyl	155.0 363.8	17.8	+	395.4	395.7	22
imazosulfuron	153.1	18.2	+	412.8	413.1	21
isofenphos oxon	270.7 287.9	18.9	+	329.3	329.8	22
phoxim	270.9 271.9	19.7	+	298.3	299.1	24
diflufenuron	158.1	20.3	+	310.7	311.1	21
bifentanol	268.9	20.4	+	337.4	338.1	20
thifluzamide	508.9	21.4	+	528.1	528.9	24
difenoconazole	336.9 251.1	21.9	+	406.3	406.3	32
pencycuron	218.1 125.1	22.9	+	328.8	329.3	28
quizalofop-ethyl	299.0	23.6	+	372.8	373.1	29
diafenthiuron-urea	313.0 327.1 271.1	24.2	+	368.5	369.2	30
emamectin MFA	874.8 918.5 808.5	26.2	+	914.1	936.6	34
pyridate	350.9	27.5	+	378.9	379.1	22
pymetrozine	105.1	2.0	+	217.2	218.1	30
difenzoquat methylsulfate	208.1 193.2 146.2	2.5	+	360.4	249.3	45
acetamiprid	126.1 187.1 181.1 206.1	11.6	+	222.7	223.2	31
cymoxanil	128.0	12.7	+	198.2	198.9	18
asibenzolar acid	134.9	13.8	-	180.2	179.1	25
emamectin amino	832.5 876.5 766.4	14.4	+	872.1	894.7	34
azimsulfuron	182.1 244.1	17.1	+	424.4	425.2	21
diclomezine	255.3	17.9	+	255.1	255.3	SIM
pacrobutrazole	207.0	18.4	+	293.8	294.3	27
daimuron	150.8	19.8	+	268.4	268.9	24
hexaconazole	244.9	20.5	+	314.2	314.3	29
pyrazoxyfen	374.9 367.0 281.1	21.5	+	403.3	402.9	32
pyraclofos	332.9 319.0 275.0	22.1	+	360.8	361.1	31
hexaflumuron	438.9 403.1	22.6	-	461.1	459.3	21
pyrethrin-(I)	161.0 143.1	23.1	+	372.5	373.1	22
tebufenpyrad	147.1 199.8 171.1	23.8	+	333.9	334.3	38
fenpyroximate(Z)	366.1	24.4	+	421.5	422.1	30
flufenoxuron	466.9 289.2 411.1	24.7	-	488.8	486.9	22
fenpyroximate(E)	366.1	25.4	+	421.5	422.1	30

農薬名	モニターイオン	R.T.	polarity	分子量	precursor ion	energy (eV)
formamidine hydrochloride	122.1 132.1	2.0	+	198.7	163.1	40
imazalil	200.9 255.1	10.4	+	297.2	297.3	31
tricyclazole	190.2	11.8	+	189.2	190.2	SIM
aldicarb	115.9 155.9	13.5	+	190.3	213.1	25
metsulfuron-methyl	167.1	15.6	+	381.4	382.1	22
quinclorac	224.1	17.3	+	242.1	242.1	25
inabenzide	321.2	17.5	+	338.8	339.2	26
flazasulfuron	182.1 301.2	17.9	+	407.3	408.2	22
desmedipham	181.9	18.7	+	300.3	301.0	20
cumylfuron	185.0	19.4	+	302.8	303.2	22
prochloraz	307.8	20.0	+	376.7	375.9	20
penconazole	173.0 214.9	20.6	+	284.2	284.2	27
propiconazole	159.1 204.9 272.9	21.1	+	342.2	342.3	30
kresoxim-methyl	267.0 282.0	21.6	+	313.4	313.8	17
pyrimidifen	184.1	22.5	+	377.9	378.4	29
teflufenuron	358.8 339.1	23.0	-	381.1	379.3	19
diflufenican	266.3 375.1	23.2	+	394.3	395.2	27
lufenuron	339.1 488.8	23.9	-	511.2	509.6	20
emamectin FA	860.5 904.5 794.5	24.6	+	900.1	922.6	34
pyrethrin-(I)	160.9	25.5	+	328.5	329.0	22
acephate	142.9	2.5	+	183.2	184.0	15
CPF	128.1 181.1 126.1	10.9	+	198.7	199.1	35
methiocarb-sulphone	200.9	12.6	+	257.3	258.1	18
imibenconazole-debenzyl	215.9 201.9 167.1	14.0	+	271.1	271.1	35
methabenzthiazuron	165.1	15.9	+	221.3	222.1	26
bensulfuron-methyl	149.1 182.1 212.7	17.6	+	410.4	411.3	24
dimethomorph(E)	301.0	18.0	+	387.9	388.0	30
dimethomorph(Z)	301.0	18.3	+	387.9	388.0	30
cyproconazole	125.1	18.8	+	291.8	292.2	27
chlorimuron ethyl	186.1 368.9 212.9	19.5	+	414.8	415.2	23
2,4-D	161.0	19.9	-	221.0	219.6	25
cyprodinil	228.3	20.4	+	225.3	226.3	SIM
tebfenozide	149.0	21.3	-	352.5	351.1	30
triflumizole	277.8	21.8	+	345.7	346.0	20
clofentazine	138.1	22.8	+	303.2	303.1	21
imibenconazole	343.9	23.4	+	411.7	413.1	28
cycloxdim	280.2	24.0	+	325.5	326.1	23
chlorfluazuron	365.1	25.1	+	540.7	542.0	23
hexythiazox	228.0 270.9	25.1	+	352.9	353.1	22
ethoxazole	304.1 317.0	25.6	+	359.4	360.2	30

表5 セグメント及びスキャンイベントの設定例

	segment 1			segment 2			segment 3			segment 4			segment 5			segment 6			segment 7			segment 8			segment 9			segment 10		
(min)	0.00	[6.70]		6.70	[5.10]		11.80	[1.78]		13.58	[2.01]		15.59	[1.54]		17.13	[2.15]		19.26	[1.77]		21.05	[1.30]		22.35	[2.66]		25.21	[4.78]	30.00
	RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy	
scan event 1	1.6	+ 189.1	28	10.9	+ 300.2	35	12.7	+ 213.1	18	14.8	+ 221.1	29	16.4	+ 284.1	20	17.8	+ 365.7	22	19.7	+ 299.1	24	21.4	+ 528.9	24	22.9	+ 328.3	28	27.5	+ 378.1	22
	propamocarb			Imazamox			prohexadione			dichlorvos			fosfthiazate			tribenuron methyl			phoxim			thifluzamide			pencycuron			pyridate		
scan event 2	2.5	+ 142.1	25							14.5	+ 806.9	25				18.2	+ 413.1	21	20.4	+ 338.1	20	21.9	+ 406.3	32	23.6	+ 373.1	28	26.2	+ 636.6	34
	methamidophos									emamectin benzoate						Imazosulfuron			bitertanol			difenoconazole			quizalofop-ethyl			emamectin MFA		
scan event 3																18.9	+ 328.8	22	20.3	+ 311.1	21				24.2	+ 368.2	30			
													isofenphos oxon			diflufenuron									difenthiuron-urea					

分析メソッド A

	segment 1			segment 2			segment 3			segment 4			segment 5			segment 6			segment 7			segment 8			segment 9			segment 10		
(min)	0.00	[6.67]		6.67	[5.06]		11.75	[1.55]		13.30	[1.62]		14.92	[1.82]		16.74	[2.42]		19.16	[1.67]		20.83	[1.47]		22.30	[2.25]		24.55	[5.45]	30.00
	RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy		RT. ± PI	energy	
scan event 1	2.5	+ 194.0	15	10.9	+ 199.1	35	12.6	+ 258.1	18	14.0	+ 271.1	35	15.9	+ 222.1	26	17.6	+ 411.3	24	19.5	+ 415.2	23	21.3	+ 351.1	30	22.8	+ 303.1	21	25.1	+ 542.0	23
	acephate			CPF			methiocarb-sulphone			imibenconazole debenzyl			methabenzthiazuron			bensulfuron-methyl			chlorimuron ethyl			tebhenozide			clofentazine			chlorfluazuron		
scan event 2																18.0 18.3	+ 398.0	30	20.4	+ 226.3	SIM	21.8	+ 346.0	20	23.4	+ 413.1	28	25.1	+ 353.1	22
																dimethomorph (E) dimethomorph (Z)			cyprodinil			trifluzole			imibenconazole			hexythiazox		
scan event 3																18.8	+ 292.2	27	19.8	+ 219.6	25				24.0	+ 326.1	23	25.6	+ 360.2	30
													cyproconazole			2,4-D									cyprodim			ethoxazole		

分析メソッド D

表6 LC/MSにおけるマトリックス効果

農薬名	だいこん (%)	はくさい (%)	ブロッコリー (%)	ほうれんそう (%)
propamocarb	101.2	90.5	90.7	106.1
methamidophos	93.6	102.4	—	124.0
imazamox	108.6	111.6	117.0	117.8
emamectin_benzoate	97.8	88.6	101.7	82.5
fosfthiazate	90.3	76.3	60.5	55.3
tribenuron_methyl	117.2	129.3	91.9	87.4
imazosulfuron	115.5	117.2	114.6	140.5
isofenphos_oxon	101.3	45.4	47.3	39.2
diflubenuron	84.7	78.5	53.4	51.4
bitertanol	112.3	115.7	111.2	68.4
thifluzamide	95.2	78.8	83.9	57.2
difenoconazole	119.3	118.7	113.6	100.1
pencycuron	102.7	102.5	87.6	90.4
quizalofop-ethyl	101.6	87.0	66.0	69.2
diafenthiuron-urea	98.4	94.6	90.1	77.0
emamectin_MFA	208.2	314.1	133.8	119.6
pymetrozine	101.2	90.3	96.9	125.0
difenoquat_methylsulfate	107.1	122.0	111.3	102.7
acetamiprid	96.5	81.3	77.5	79.1
asibenzolar_acid	115.6	123.7	94.3	98.6
azimsulfuron	199.2	200.4	211.6	183.4
pacrobutrazole	84.5	94.5	82.5	60.3
daimuron	102.6	99.6	84.0	73.2
pyrazoxyfen	111.4	113.0	108.7	106.7
pyraclofos	120.9	112.7	87.9	97.8
hexaflumuron	125.3	128.3	191.6	147.2
tebufenpyrad	127.5	114.0	90.2	98.3
flufenoxuron	99.5	144.1	296.6	179.2
fenpyroximate(E)	112.2	110.5	67.1	108.3

農薬名	だいこん (%)	はくさい (%)	ブロッコリー (%)	ほうれんそう (%)
imazalil	97.1	95.4	95.5	94.5
tricyclazole	99.9	104.9	84.8	59.1
metsulfuron-methyl	129.6	144.9	134.8	149.2
quinclozac	108.5	107.3	94.2	83.3
inabenfide	104.2	101.1	95.3	93.8
flazasulfuron	112.0	128.5	122.5	138.8
desmedipham	86.6	67.6	54.0	18.5
cumyluron	103.2	103.9	90.3	85.9
prochloraz	105.7	109.5	100.3	107.0
penconazole	126.3	110.1	94.1	78.4
propiconazole	107.6	111.1	107.3	85.3
pyrimidifen	102.9	102.4	101.7	97.3
teflubenzuron	112.3	98.3	77.4	29.9
diflufenican	53.0	87.6	45.4	28.5
lufenuron	119.2	168.3	183.2	303.4
emamectin_FA	168.3	207.8	109.3	69.4
acephate	84.6	55.9	32.0	90.6
CPF	94.8	92.7	95.7	95.2
methiocarb-sulphone	96.4	68.6	29.2	51.3
imibenconazole-debenzyl	106.8	96.5	97.7	95.7
methabenzthiazuron	103.4	95.8	91.9	79.9
bensulfuron-methyl	120.2	135.7	134.4	145.5
dimethomorph(E)	104.3	108.1	97.6	105.5
dimethomorph(Z)	114.2	109.2	98.8	104.1
chlorimuron_ethyl	111.1	128.9	118.4	119.9
2,4-D	103.1	109.6	92.8	85.7
cyprodinil	100.4	98.3	98.3	90.8
tebfenozide	84.4	39.9	42.9	24.4
trifluzole	106.9	104.2	94.5	100.6
clofentazine	78.0	76.8	33.8	15.5
imibenconazole	113.4	89.2	85.0	77.1
cycloxdim	140.6	156.2	139.8	322.1
chlorfluazuron	89.2	82.9	43.0	30.9
hexythiazox	86.2	78.0	63.1	44.2
ethoxyzole	93.6	90.5	87.8	102.8

を使用した。各農薬の農産物ごとの回収率は表7のとおりである ($n=4\sim 5$)。回収率70~120%かつ RSD20%以下の農薬は41~47種類であった (表7, ○印)。だいこん及びはくさいを添加試料としたときのフェンピロキシメート(E)は定量可能な検量線が得られなかった。

6. LC/MS/MS と HPLC/UV の特異性の比較

HPLC/UV は高速液体クロマトグラフィーの中では比較的広く使用されている分析装置で、公定法にもしばしば採用されている。HPLC/UV と LC/MS/MS のクロマトグラムを比較し、特異性の違いを調べた。分析試料には農産物マトリックスを含む標準液 ($2\mu\text{g/ml}$) を使用し (試料中濃度としては $1\mu\text{g/g}$ に相当), MS/MS と UV で測定を行った。LC/MS/MS は HPLC/UV と比べて高感度であるため、同一の標準液を LC/MS/MS では $0.5\mu\text{l}$, HPLC/UV では $5\mu\text{l}$ 注入した。

農産物の種類による違いはあるものの、UV で測定した試料ブランクからは $1\mu\text{g/g}$ レベルでかなり妨害ピークが現れており、ブロッコリーとほうれんそうでは顕著であった。 $0.1\mu\text{g/g}$ レベルになると、いずれの農産物も大部分の農薬が測定できなくなることがうかがわれる (図3 HPLC/UV)。一方、MS/MS で測定した試料ブランクにはどの農産物にも妨害ピークは存在しない (図3 LC/MS/MS)。以上のことから LC/MS/MS が HPLC/UV よりもはるかに高い特異性を持っていることが確認できた。

なお、図3は LC/MS/MS と HPLC/UV のリテンションタイムをそろえるための補正を行っている。

7. LC/MS と LC/MS/MS の比較

MS スペクトルでは同定が難しいが MS/MS スペクトルであれば検出を確認できた例を示す (図4)。MS スペクトル測定の場合、(1) ジフェノコナゾール (2) テブフェノジドともに試料マトリックス由来のピークの出現により十分な同定ができないが、MS/MS スペクトルを測定することでマトリックスの影響を排除した確実な同定を行うことができた。なお図4のスペクトルはいずれもバックグラウンド補正を行っていない。

IV 考察

1. スクリーニング検査への適用

添加回収試験の結果によれば回収率70~120%の農薬は RSD (%) もほとんどが20%以下であり、大きなばらつきは見られなかった (表7)。また今回の検討を通じてアシベンゾラル酸、キンクロラック、2,4-D を除くすべての農薬でリテンションタイムの変動はなく、MS 部の分解洗浄

を要するトラブルも1度もなかった。これらのことから、当部門において GC/MS 及び HPLC/UV を使用して行ってきた一斉分析法が LC/MS にも適用できることがわかった。

2. LC/MS/MS による一斉分析法の有用性

1) 農産物から調製された同一試験溶液を測定した場合、LC/MS/MS は HPLC/UV と違いクロマトグラム上におけるマトリックス由来の妨害ピークがほとんど現れないため測定できる農薬の種類が多い (図3)。

2) 「MS スペクトル」による測定では試料マトリックスの影響により同定が不十分になる場合があるが、「MS/MS スペクトル」であれば確実な同定を行うことができる (図4)。MS/MS 機能により農産物中の残留農薬を誤りなく速やかに把握することができる。

3) 当部門の残留農薬検査では「 $n=5$, 検査4回毎に1回」及び「 $n=1$, 検査毎」の添加回収試験の実施を定めている。HPLC/UV の場合検出器の性格上、混合標準を複数のグループに分ける必要があるため添加回収試験時の試料数が増え時間・労力がかかってしまう。しかし LC/MS/MS の使用により混合標準を1グループにまとめることが可能になるので作業の省力化がはかれる。

3. 検査に利用するにあたって

今回添加回収試験用の標準液としてマトリックスマッチしたものをを使用した。通常、当部門の検査では様々な種類の農産物を対象にしているが、各農産物に対応するマトリックス含有標準液をその都度すべてそろえることは難しいため試料成分を含まない標準液を用いている。マトリックス効果による感度低下の大きい農薬については、マトリックスを含まない標準液で定量したとき残留農薬基準値以下であっても実際には基準を超えている可能性もあるので定量値の扱いには注意が必要である。この場合試験液の十分な希釈、標準添加法による定量、試料マトリックスを含む標準液の使用などにより再度測定を行うことになる。

V 結論

1. 生活衛生部門がこれまで GC/MS 及び HPLC/UV で行ってきた残留農薬一斉分析法が LC/MS にも適用できた。
2. LC/MS/MS は HPLC/UV と違い試料マトリックス由来の妨害ピークがクロマトグラム上に現れないので測定可能な農薬の種類が多い。
3. MS/MS は MS と比べてマトリックスの影響のないスペクトルが得られるため、検査の信頼性と迅速性が向上した。
4. LC/MS/MS の導入により HPLC/UV ではできなかった

表 7 添加回収試験結果

農薬名	だいこん (n=5)		はくさい (n=5)		ブロッコリー (n=5)		ほうれんそう (n=4)		公定法	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	LV ¹⁾	MS ²⁾
propamocarb	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—		
methamidophos	88.5	11.8	87.7	6.1	—	—	104.2	6.0	○	
imazamox	89.6	2.1	66.0	5.5	54.1	14.7	49.9	6.8	*	*
emamectin_benzoate	48.9	7.5	29.5	6.3	9.7	41.3	50.3	10.9	*	*
fosthiazate	99.0	1.8	101.3	2.8	89.1	7.0	104.8	3.6	○	
tribenuron_methyl	48.8	11.9	46.1	16.9	25.5	18.1	65.1	4.2	*	
imazosulfuron	95.1	1.4	89.6	4.2	77.0	12.3	103.4	5.7	○	*
isofenphos_oxon	92.6	2.4	114.4	4.5	86.5	7.1	97.2	4.0	○	
diflubenuron	83.6	11.1	79.1	9.1	87.9	11.0	81.3	6.9	○	*
bisertanol	98.7	3.7	99.0	6.3	87.8	10.1	99.4	4.7	○	
thiufuzamide	91.2	5.2	88.9	9.9	93.2	8.4	100.9	3.9	○	
difenoconazole	98.3	1.6	94.3	3.1	88.6	10.5	100.2	4.9	○	
pencycuron	91.3	1.8	89.1	3.8	86.3	6.6	98.1	4.9	○	*
quizalofop-ethyl	87.2	9.8	88.6	5.0	87.8	6.4	95.5	4.6	○	*
diafenthion-urea	100.6	5.5	91.2	4.8	86.8	9.3	104.6	3.2	○	*
emamectin_MFA	77.8	23.2	57.1	11.0	52.6	24.6	91.4	42.3	*	*
pymetrozine	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—	*	*
difenoquat_methylsulfate	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—		
acetamiprid	102.0	2.8	97.4	2.4	92.5	17.9	104.8	8.9	○	
asibenzolar_acid	82.5	9.2	47.3	15.8	38.8	35.2	0.0	—	*	*
azimsulfuron	89.5	2.6	97.5	4.2	83.4	14.6	112.4	11.0	○	*
pacrobutrazole	90.6	9.4	94.1	4.8	87.3	8.3	87.2	14.7	○	
daimuron	96.5	2.5	90.8	3.5	89.2	8.1	96.8	4.8	○	*
pyrazoxyfen	83.3	5.1	96.8	2.8	96.2	7.4	93.3	5.3	○	
pyraclofos	86.0	2.0	95.3	3.1	87.9	7.7	98.1	4.4	○	
hexaflumuron	150.3	48.5	96.4	9.8	157.3	19.8	87.2	11.7	○	*
tebufenpyrad	70.8	13.6	82.9	5.6	96.9	4.6	108.9	10.1	○	
flufenoxuron	116.5	24.0	144.6	9.6	89.0	19.3	95.8	11.2	○	*
fenpyroximate(E)	—	—	—	—	68.9	16.0	95.4	9.2	○	
imazalil	76.8	1.5	50.2	4.5	34.2	29.6	69.8	11.0	*	
tricyclazole	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—		
metsulfuron-methyl	99.3	2.0	92.0	4.0	63.7	14.3	98.8	8.0	○	*
quinclorac	80.8	7.4	67.1	14.6	22.5	50.8	0.0	—	*	
inabنفide	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—	*	*
flazasulfuron	91.4	2.2	87.6	4.4	79.3	15.0	89.7	10.5	○	*
desmedipham	85.7	11.1	90.2	5.8	83.6	12.0	94.0	9.4	○	*
cumyluron	96.2	1.7	90.1	3.3	90.1	9.8	92.6	6.7	○	*
prochloraz	86.6	2.5	84.2	4.3	72.5	13.3	84.8	7.4	○	
penconazole	95.5	12.0	93.3	7.4	96.3	2.8	97.8	11.2	○	
propiconazole	96.2	3.5	100.0	3.4	102.8	9.9	95.5	5.6	○	
pyrimidifen	64.5	14.8	69.8	11.0	76.8	11.3	85.4	4.5	○	
teflubenzuron	81.7	8.7	89.1	2.6	87.7	7.6	124.0	27.1	*	*
diflufenican	0.0	—	60.6	11.3	10.9	78.6	70.4	7.4	○	
lufenuron	90.3	7.6	84.8	40.0	86.2	10.8	74.1	34.5	*	*
emamectin_FA	66.9	14.8	50.7	8.3	40.8	20.9	33.7	20.7	*	*
acephate	84.5	2.8	81.9	2.4	85.5	8.3	96.1	8.1	○	
CPF	100.1	2.9	97.4	2.1	93.5	10.4	97.2	3.0	○	
methiocarb-sulphone	96.0	2.1	78.2	4.2	76.1	6.0	86.6	5.0	○	
imibenconazole-debenzyl	97.4	2.6	94.4	1.5	89.7	11.3	91.3	4.8	○	
methabenzthiazuron	71.4	15.6	80.9	10.7	70.7	17.2	89.3	5.9	○	*
bensulfuron-methyl	93.2	2.7	72.9	3.7	73.4	13.8	71.0	6.0	○	*
dimethomorph(E)	77.2	2.1	91.3	2.0	80.0	11.8	93.7	6.1	○	*
dimethomorph(Z)	111.0	3.1	95.1	1.9	100.1	11.8	95.5	7.8	○	*
chlorimuron_ethyl	92.5	4.7	92.7	5.7	85.0	11.1	95.8	9.0	○	*
2,4-D	106.0	7.0	83.5	9.4	123.6	10.4	48.3	24.4		
cyprodinil	0.0	—	9.9	103.1	0.0	—	64.9	12.8	*	*
tebfenozide	96.0	2.7	99.9	6.7	92.8	7.7	85.1	2.9	○	*
triflumizole	85.5	5.2	68.6	5.3	71.2	8.6	81.4	3.8	○	*
clofentezine	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—	*	*
imibenconazole	78.3	11.7	84.3	8.2	80.0	11.5	87.0	6.2	○	
cycloxdim	69.6	8.3	29.9	12.3	0.0	—	0.0	—		
hexythiazox	98.3	12.3	98.1	13.2	87.3	6.7	101.7	10.2	○	*
chlorfluazuron	93.5	13.4	88.8	23.1	82.7	28.6	125.1	48.1	*	*
ethoxazole	98.9	5.6	98.1	3.9	81.8	9.4	105.6	3.6	○	
回収率70~120% RSD≤20%	47農薬		41農薬		41農薬		44農薬			

1) 公定法の定性、定量試験にHPLC/UVを用いる(※)

注) ○印は回収率70~120%かつRSD 20%以下の農薬

2) 公定法の確認試験にLC/MSを用いる(※)

1. methiocarb-sulphone
2. imibenconazole-debenzyl
3. methabenzthiazuron
4. bensulfuron-methyl
5. chlorimuron ethyl
6. tebfenozide
7. clofentazine
8. chlorfluazuron

各 2 μ g/ml

(分析条件)

HPLC/UV

測定波長 250nm

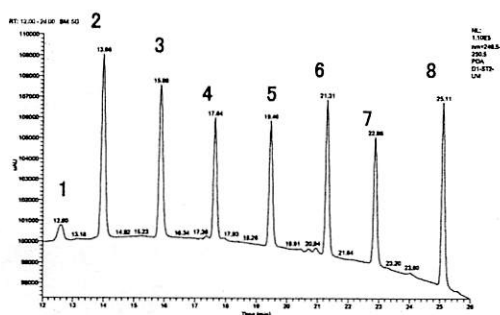
注入量 5 μ l

LC/MS

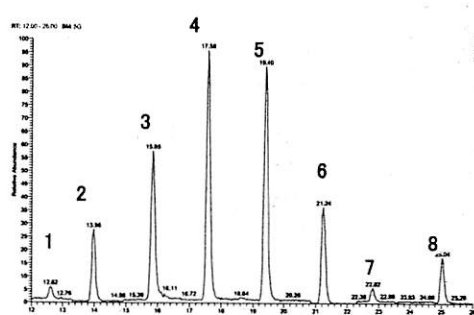
MS 条件 Full Scan MS/MS

注入量 0.5 μ l

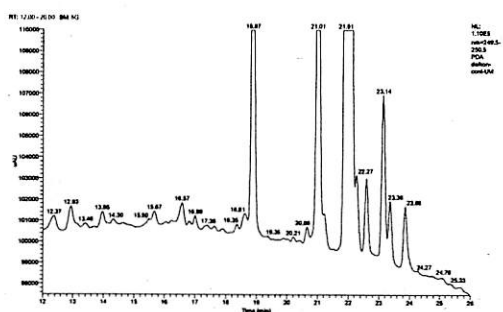
HPLC/UV



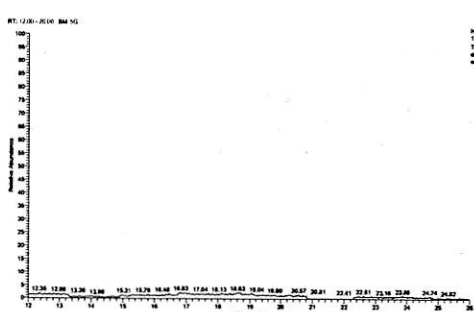
LC/MS/MS



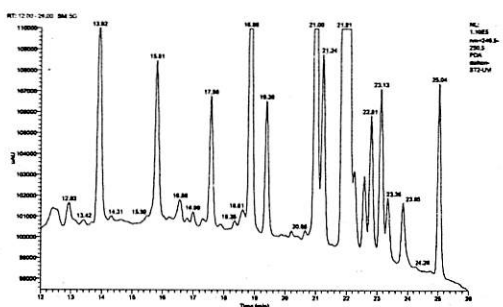
標準



(ブランク)



だいこん



(標準添加)

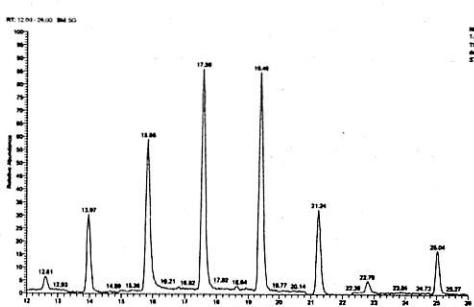


図3-1 LC/MS/MSとHPLC/UVのクロマトグラムの違い (標準, だいこん)

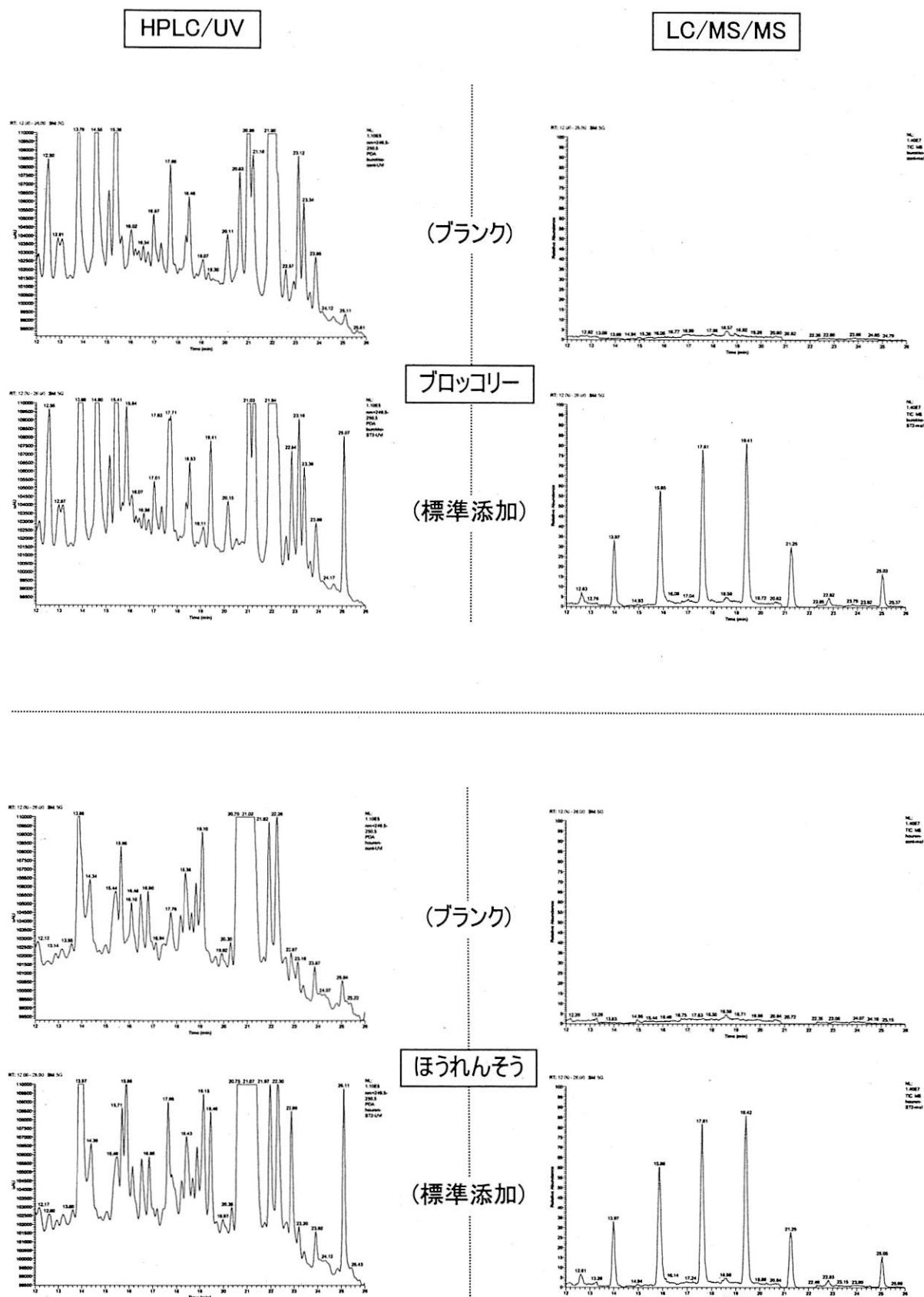


図 3-2 LC/MS/MSとHPLC/UVのクロマトグラムの違い (ブロッコリー, ほうれんそう)

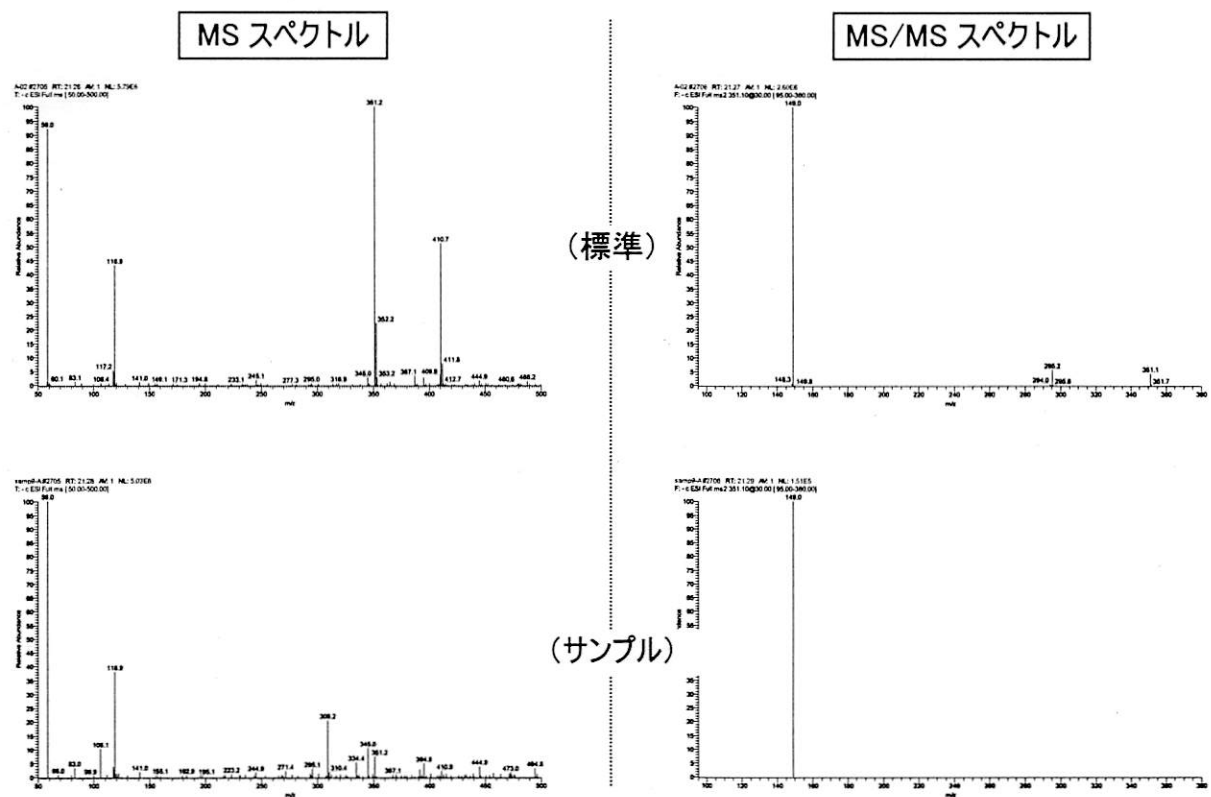
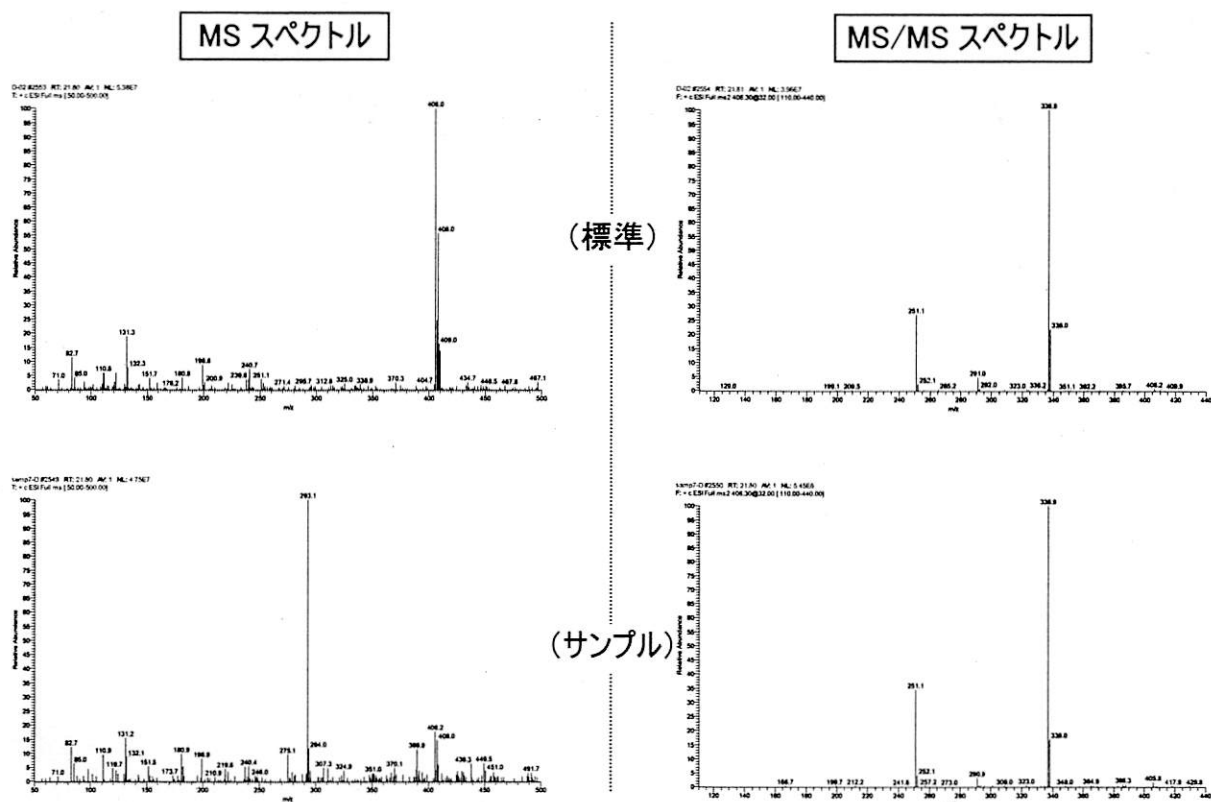


図 4 試料測定時のMSスペクトル及びMS/MSスペクトル

混合標準の1グループ化が可能になり、内部精度管理試験における作業の省力化がはかれた。

VI 参考文献

- 1) 平成14年3月13日，厚生労働省告示第94号
- 2) 旧厚生省生活衛生局長通知：“残留農薬迅速分析法の利用について”平成9年4月8日，衛化第43号
- 3) 平成11年11月22日，旧厚生省告示第237号
- 4) 原田健一・岡尚男編：LC/MS の実際 天然物の分離と構造決定，講談社サイエンティフィク（1996）