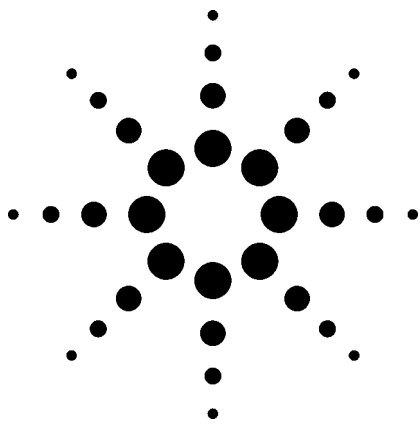


LC/MS/MS による食料品中の 44 種類の農薬の測定 アプリケーション



食品安全性

著者

Masahiko Takino
Agilent Technologies, Inc.
Hachioji, Tokyo
Japan

Toshitsugu Tanaka
Kobe Institute of Health
Department of Food Chemistry
Chuo-ku, Kobe
Japan

要約

Agilent G6410AA 三連四重極型質量分析計 (QQQ) を使用して、数種類の食品中の 44 種類の農薬残留物を測定する高感度で選択性の高い分析メソッドを開発しました。このメソッドでは、2 種類の異なるサンプル前処理メソッドに続いて、LC/MS/MS (液体クロマトグラフ/タンデムマススペクトル) を使用します。すべての農薬の検出限界は食品中で 10 ng/mL 以下でした。QQQ の感度は、日本の食品衛生法で検討された全農薬の残留基準 (MRL) を満たしました。

緒言

農薬は農作業で幅広く使用されます。主な用途は、育成と輸送目的に農産物の収穫後処理に分類できます。この意味では、生産農業は、制御条件を前提とした農薬の使用の主分類から構成され、そのため食品安全性を判断す

るために残留基準 (MRL) が設定されました。近年、商品中の MRL に関して実施された規制がますます厳しくなってきました。日本では、今年いわゆるポジティブリスト制が導入され、すべての食品で 500 を超える農薬に対して MRL が設定されました。この新制度は、食品グループ内の各農薬に対してさまざまな MRL を設定します。一般的に、MRL は商品と農薬に応じて 0.01 ~ 3 µg/g の範囲に及びます。MRL が低いことが、複雑なサンプルに対して適応できるため、より高感度な分析メソッドの開発が促進されました。この意味では、マルチリアクションモニタリング (MRM) モードによる三連四重極型液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) は、今までのところ食品中の極性農薬の定量に最も幅広く使用される技術になりました。MRM モードにより、食品などの複雑なマトリックスでの検出がより明確になります。本書では、2 種類の異なる分析条件で、44 種類の農薬 (表 1 と 2) を分析しました。これらの農薬のポジティブリスト制で設定された感度は、容易に達成できます。

実験

試薬

アセトニトリルは、和光純薬工業 (日本) 製の LC/MS グレードを用いました。トルエン、アセトン、n-ヘキサン、ギ酸、塩化ナトリウム、および無水硫酸ナトリウムは、和光純薬工業の分析グレードです。すべての SPE カートリッジは Spelco Japan (日本) から購入しました。農薬標準試料は林純薬工業 (日本) から入手しました。



Agilent Technologies

サンプル調製 抽出

野菜と果物のサンプルは地元の市場から入手しました。フードプロセッサでサンプルを 10 ~ 500 g に切り刻み、均一な試料にしました。サンプルの一部 20 g を 200 mL の PTFE 遠沈管で秤量しました。次にアセトニトリル 50 mL を遠沈管に入れて、Polutoron でホモジナイズしました。この抽出液は吸引ろ過しました。ろ液を集め、更に、残渣はアセトニトリル 20 mL で再抽出しました。ろ液は 100 mL の容積測定用フラスコに入れ、アセトニトリルで定容しました。抽出液の一部 20 mL を PTFE 製遠沈管に移し、NaCl 10 g と 0.5 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を抽出液に加えた後、5 分間振とうしました。無水 Na₂SO₄ 5 g を塩析後に得られたアセトニトリル層に加えしました。無水 Na₂SO₄ を取り除いた後、抽出液をロータリーエバポレータで蒸発乾固しました (水槽は 40 °C を超えないようにしました)。残渣をアセトニトリル/トルエン (3:1) 2 mL で溶解しました。

クリーンアップ

グループ 1 - アセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL で予めコンディショニングした GCB/アミノプロピル SPE カートリッジ (500 ng/500 mg) に抽出物を負荷しました。アセトニトリル/トルエン (3:1) 20 mL を SPE カートリッジにさらに加えました。すべての溶出液を捕集し、ロータリーエバポレータで濃縮しました。残渣をメタノール 4 mL で溶解しました。

グループ 2 - メタノール、アセトン、および n-ヘキサン各 10 mL (メタノール 10 mL、アセトン 10 mL、および n-ヘキサン 10 mL で全量 30 mL) で予めコンディショニングしたシリカゲル SPE カートリッジ (500 mg) に抽出物を負荷しました。アセトニトリル/トリエチルアミン/n-ヘキサン (20:0.5:80) 10 mL を SPE カートリッジにさらに加えました。溶出液は捨てました。アセトン/メタノール (1:1) 20 mL を加え、溶出液を捕集し、ロータリーエバポレータで濃縮しました。残渣をメタノール 4 mL で溶解しました。

標準試料の調製

個々の農薬の保存溶液を用いて 1 µg/mL のメタノール溶液を調製しました。メタノールを使用し段階的に希釈し、0.001 ~ 1 µg/mL の標準混合溶液を調製しました。

ブランクマトリックス溶液に 10 ng/g の今回検討した農薬標準混合液を添加しました。

LC/MS/MS 装置

この研究で使用した LC/MS/MS システムは、Agilent 1100 シリーズデガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンブラ、カラム恒温槽、およびエレクトロスプレーイオン化源 (ESI) 付き Agilent G6410 三連四重極型質量分析計で構成しました。今回のメソッド開発は、果物と野菜の中の農薬を定量するための高速で高感度の分析手法の開発です。分離における分解能と感度について、さまざまな溶媒とカラムを使用して最適化しました。水、アセトニトリル、ギ酸、および 1.8 µm 粒子径の C18 カラムを使用したシンプルなシステムが良好でした。

LC 条件

装置:	Agilent 1100 HPLC
カラム:	ZORBAX Extend C18、100 mm x 2.1 mm、1.8 µm (P/N 728700-902)
カラム温度:	40 °C
移動相:	A = 0.1% ギ酸 + 5 mM ギ酸 アンモニウム水溶液 B = アセトニトリル
グラジエント:	0 分で 10% の B、30 分で 80% の B
流量:	0.2 mL/min
注入量:	5 µL

MS 条件

装置:	Agilent 6410 QQQ
イオン源:	ポジティブ ESI
乾燥ガス流量:	10 L/min
ネブライザ:	50 psig
乾燥ガス温度:	350 °C
V _{cap} :	4000 V
スキャン:	m/z 100 ~ 550
フラグメンタ:	可変 100 V
MRM イオン:	表 1 と 2 のとおり
衝突エネルギー:	表 1 と 2 のとおり

LC/MS/MS メソッド

定量分析にはタイムプログラムによる MRM モードを使用しました。MRM トランジションに関するパラメータは表 1 と 2 に示した通りです。

表 1 グループ 1 の各農薬の MRM 推移のデータ取込パラメータ

No	農薬	リテンション タイム(分)	分子量	プレカーサイ オン (m/z)	生成物イ オン (m/z)	衝突エネ ルギー (V)
1	チアベンダゾール	5.018	201	202	175	20
2	チアメトキサム	6.16	291	292	211	5
3	クロチアニジン	7.83	249	250	169	10
4	クロリダゾン	8.19	221	222	104	10
5	イミダクロプリド	8.39	255	256	209	20
6	ジメチリモール	8.8	209	210	171	20
7	オキシカルボキシ	11.02	267	268	175	10
8	チアクロプリド	11.03	252	253	126	20
9	アザメチオホス	12.87	324	325	183	10
10	フェリムゾン (E)	13.21	254	255	124	20
11	フェリムゾン (Z)	13.7	254	255	132	20
12	フェンメディファム	17.77	317	318	136	20
13	アジンホスメチル	17.9	318	132	77	15
14	シメコナゾール	18.5	293	294	70	15
15	イソキサフルトール	18.7	359	360	251	15
16	ピリフタリド	18.7	318	319	139	20
17	トリデモルフ	19.21	297	298	130	15
18	メトキシフェノジド	20.06	312	313	149	20
19	クロマフェノジド	20.57	394	175	141	20
20	フェノキシカルブ	20.63	301	302	88	15
21	ナプロアニリド	21.27	291	292	171	10
22	ブタフェナシル	21.55	491	492	331	20
23	シアゾファミド	21.7	324	325	108	10
24	アニロホス	22.5	367	368	199	10
25	ピラゾレート	23.5	438	439	173	15
26	ベンゾフェナップ	24	430	431	105	20
27	シフルフェナミド	24.3	412	413	241	20
28	インドキサカルブ	24.37	527	528	150	15
29	クロメプロップ	24.78	372	373	299	5
30	クロキンセットメキシル	24.8	335	336	238	15
31	フラチオカルブ	25.7	365	383	195	15
32	ラクトフェン	26.3	478	479	344	15
33	トラルコキシジム	26.7	329	330	284	10

表 2 グループ 2 の各農薬の MRM 推移のデータ取込パラメータ

No	農薬	リテンション タイム(分)	分子量	プレカーサ イオン (m/z)	生成物 イオン (m/z)	衝突エネ ルギー (V)
1	フルメツラム	9.96	325	326	129	20
2	チジアズロン	11.95	220	221	102	10
3	イマザキン	12.25	311	312	267	20
4	チフェンスルフロンメチル	12.89	387	388	167	10
5	フロラスラム	13.75	359	360	129	20
6	ホルクロルフエニユロンメチル	14.63	247	248	129	10
7	クローラアシュラムメチル	16.41	429	430	398	10
8	ジクロスラム	16.83	405	406	161	20
9	フォメサフェン	18.27	438	456	344	10
10	トリフルスルフロンメチル	19.29	492	493	264	15
11	ハロキシホップ	19.67	361	362	316	15

結果と考察

MRM トランジションの最適化

各農薬に対する MRM トランジションの最適化には 1 $\mu\text{g/mL}$ の 2 種類の農薬標準混合液を使用して、フルスキャンモード及び、プロダクトイオンスキャンモードを使用して行いました。フルスキャンモードとプロダクトイオンスキャンモードでのこれら標準混合試料の TIC は図 1 と 2 のとおりです。フルスキャンモードでの各農薬のマススペクトルでは、フラグメントイオンとアンモニウム付加イオン $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ がベースピークであったアジンホスメチル、フラチオカルブ、およびフォメサフェンを除き、プロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ がベースイオンで観察されました。MRM モードのプリカーサイオンとして、これらのイオンを選択しました。異なる条件での同時取り込みとタイムプログラミングモードを使用することで、各農薬のプロダクトイオン MS/MS スペクトルを得ることができました。表 1 と 2 のとおり、MRM モードではグループ 1 の 33 種類の農薬に対して 10 タイムセグメント、グループ 2 の 11 種類の農薬に対して 7 タイムセグメントを使用しました。

農薬に対する一律残留基準 (10 ng/mL) での農薬標準混合試料の全イオンクロマトグラムは、図 3 のとおりです。これらはすべての農薬に対して優れた S/N 比を示しています。1 ng/mL の各農薬の MRM クロマトグラムを用いて、S/N 比を検出限界とした、各農薬に対する検出限界 (LOD) を計算しました (表 3 参照)。検量線の直線性を評価するため、0.001 ng/mL ~ 1 ng/mL の範囲のさまざまな濃度の農薬標準溶液を分析しました。表 3 のとおり、直線性は 0.998 以上の相関係数 (r^2) で、すべての農薬に対して非常に良好でした。

10 ng/mL の農薬標準試料を添加したオレンジ、リンゴ、ジャがいも、およびキャベツの抽出物を使用して、このメソッドのマトリックス効果を検討しました。オレンジ抽出物の代表的な MRM クロマトグラムは図 4 と 5 のとおりです。リンゴ、ジャがいも、およびキャベツ抽出物のその他のクロマトグラムは図 6 のとおりです。農薬標準混合液と比較して、すべての食品中でサンプルマトリックス由来のピークは観察されませんでした。これらの結果は MRM モードが非常に高選択性を有することを示しています。

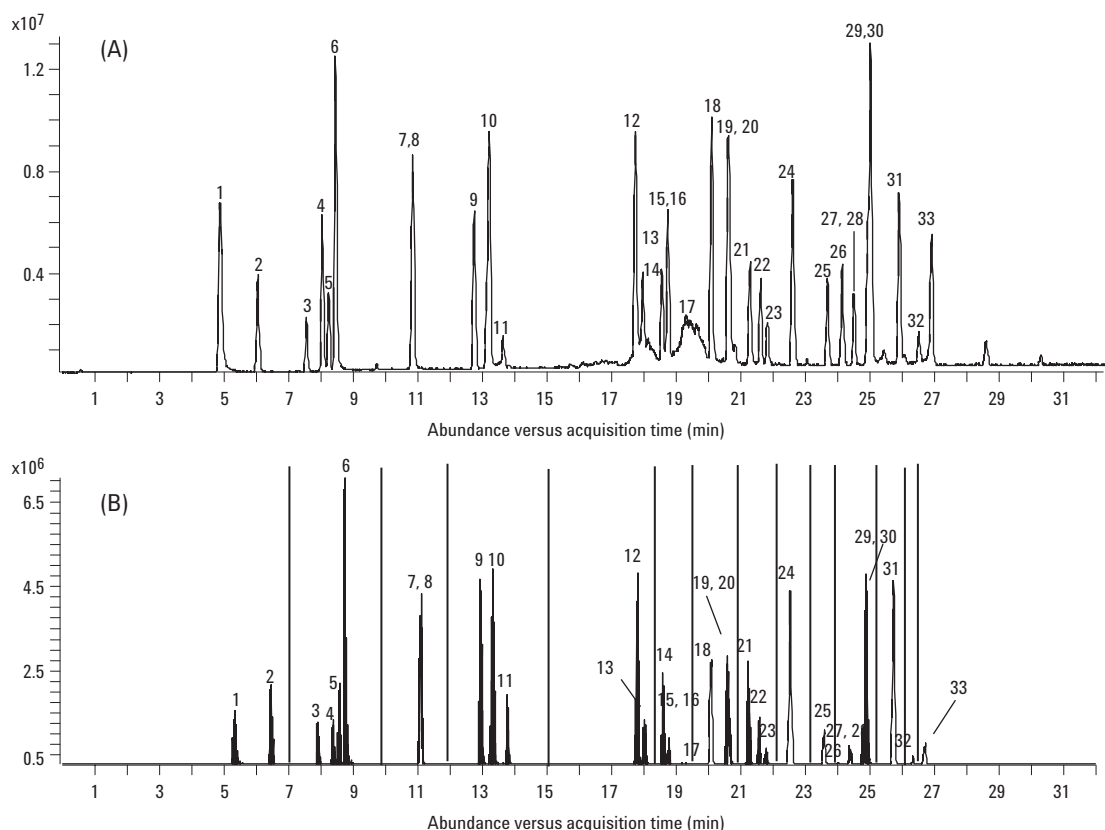


図 1 1 $\mu\text{g/mL}$ のフルスキャンモード (A) と生成物イオンスキャンモード (B) での 33 種類の農薬標準試料の TIC。

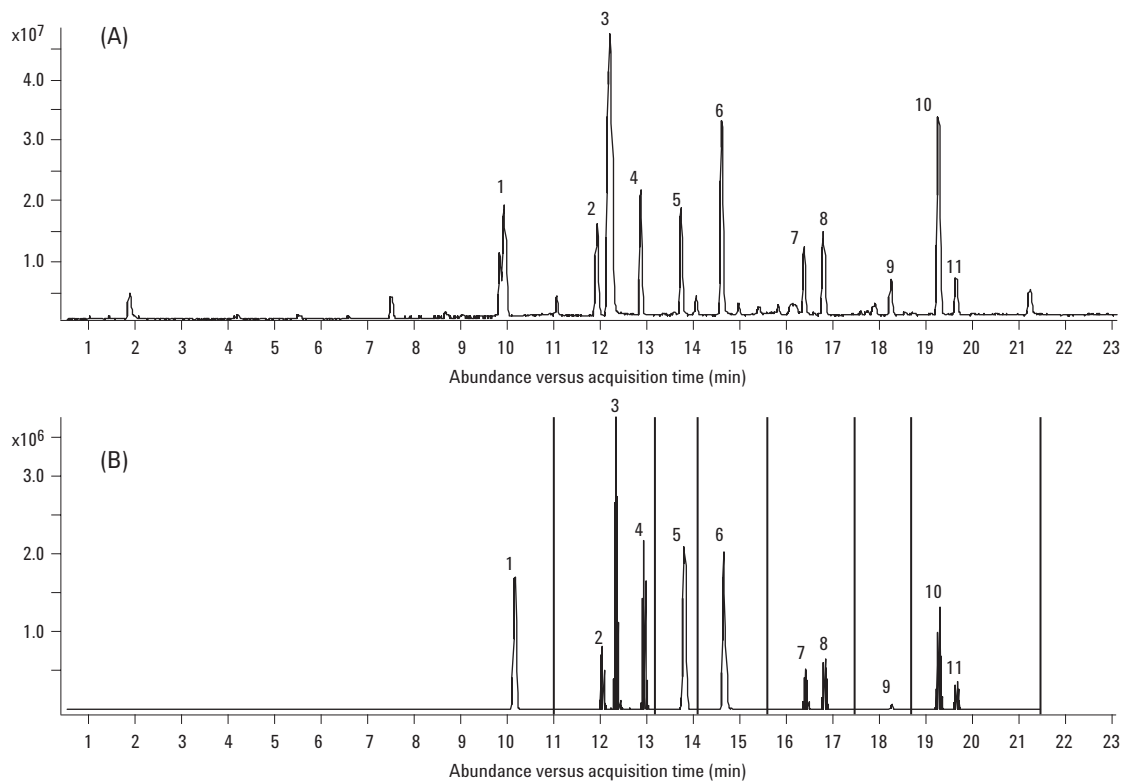


図2 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフルスキャンモード (A) と生成物イオンスキャンモード (B) での 11 種類の農業標準試料の TIC。

さらに、サンプルマトリックスによる各農薬のピーク強度の変化は、農薬標準液のピーク強度と比較することで計算しました。表 4 に示した結果から、各農薬の相対強度は 91 ~ 116% の範囲でした。従って、イオン抑制といったマトリックス効果は大きくなく、マトリックスマッチング標準ではなく、外部標準を使用することができました。オレンジ抽出物中の各農薬の再現性も表 4 のとおりで、各農薬の RSD は 1.7 ~ 5.9% の範囲内でした。

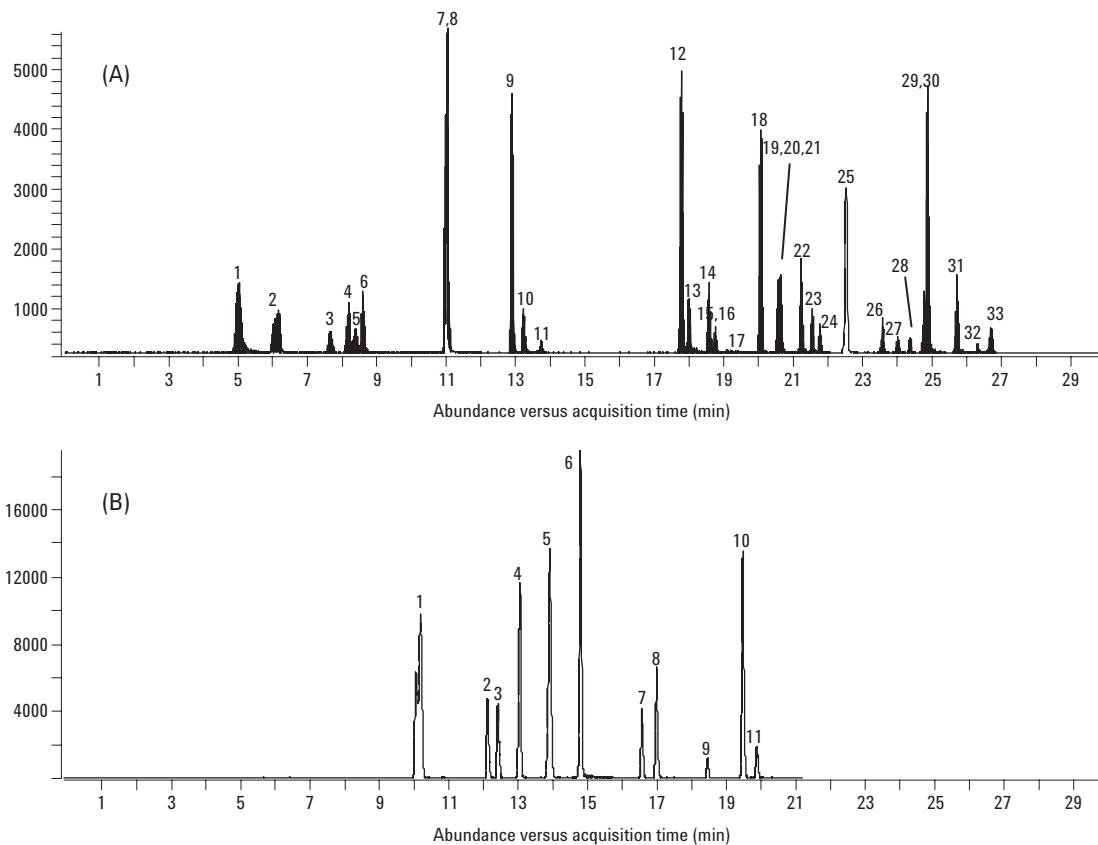


図3 MRMモードで10 ng/mLの33種類の農業標準試料 (A) と11種類の農業標準試料 (B) のTIC。

表3 44種類の標準溶液の直線性とLOD

No	農薬	r ²	LOD (ng/mL)	No	農薬	r ²	LOD (ng/mL)
グループ1							
1	チアベンダゾール	0.9999	< 0.1	18	メトキシフェノジド	0.9993	0.55
2	チアメトキサム	0.9992	< 0.1	19	クロマフェノジド	0.9992	0.49
3	クロチアニジン	0.9999	< 0.1	20	フェノキシカルブ	0.9988	< 0.1
4	クロリダゾン	0.9993	< 0.1	21	ナプロアニリド	0.9993	< 0.1
5	イミダクロプリド	0.9995	< 0.1	22	ブタフェナシル	0.9994	< 0.1
6	ジメチリモール	0.9989	< 0.1	23	シアゾファミド	0.9987	0.43
7	オキシカルボキシ	0.9993	< 0.1	24	アニロホス	0.9991	< 0.1
8	チアクロプリド	0.9991	< 0.1	25	ピラゾレート	0.9990	0.51
9	アザメチオホス	0.9988	< 0.1	26	ベンゾフェナップ	0.9982	0.49
10	フェリムゾン (E)	0.9993	0.34	27	シフルフェナミド	0.9993	0.43
11	フェリムゾン (Z)	0.9995	0.53	28	クロメプロップ	0.9993	0.61
12	フェンメディファム	0.9993	< 0.1	29	インドキサカルブ	0.9991	1.04
13	アジンホスメチル	0.9997	< 0.1	30	キンクロラックメチル	0.9988	0.63
14	シメコナゾール	0.9992	< 0.1	31	フラチオカルブ	0.9987	< 0.1
15	イソキサフルトール	0.9991	< 0.1	32	ラクトフェン	0.9987	1.10
16	ピリフタリド	0.9988	< 0.1	33	トラルコキシジム	0.9992	0.52
17	トリデモルフ	0.9991	1.21				
グループ2							
1	フルメツラム	0.9996	< 0.1	7	クロラスラムメチル	0.9987	< 0.1
2	チジアズロン	0.9994	< 0.1	8	ジクロスラム	0.9989	< 0.1
3	イマザキン	0.9992	< 0.1	9	フォメサフェン	0.9989	0.32
4	チフェンスルフロンメチル	0.9989	< 0.1	10	トリフルスルフロンメチル	0.9992	< 0.1
5	フロラスラム	0.9969	< 0.1	11	ハロキシホップ	0.9995	0.19
6	ホルクロルフエニロンメチル	0.9977	< 0.1				

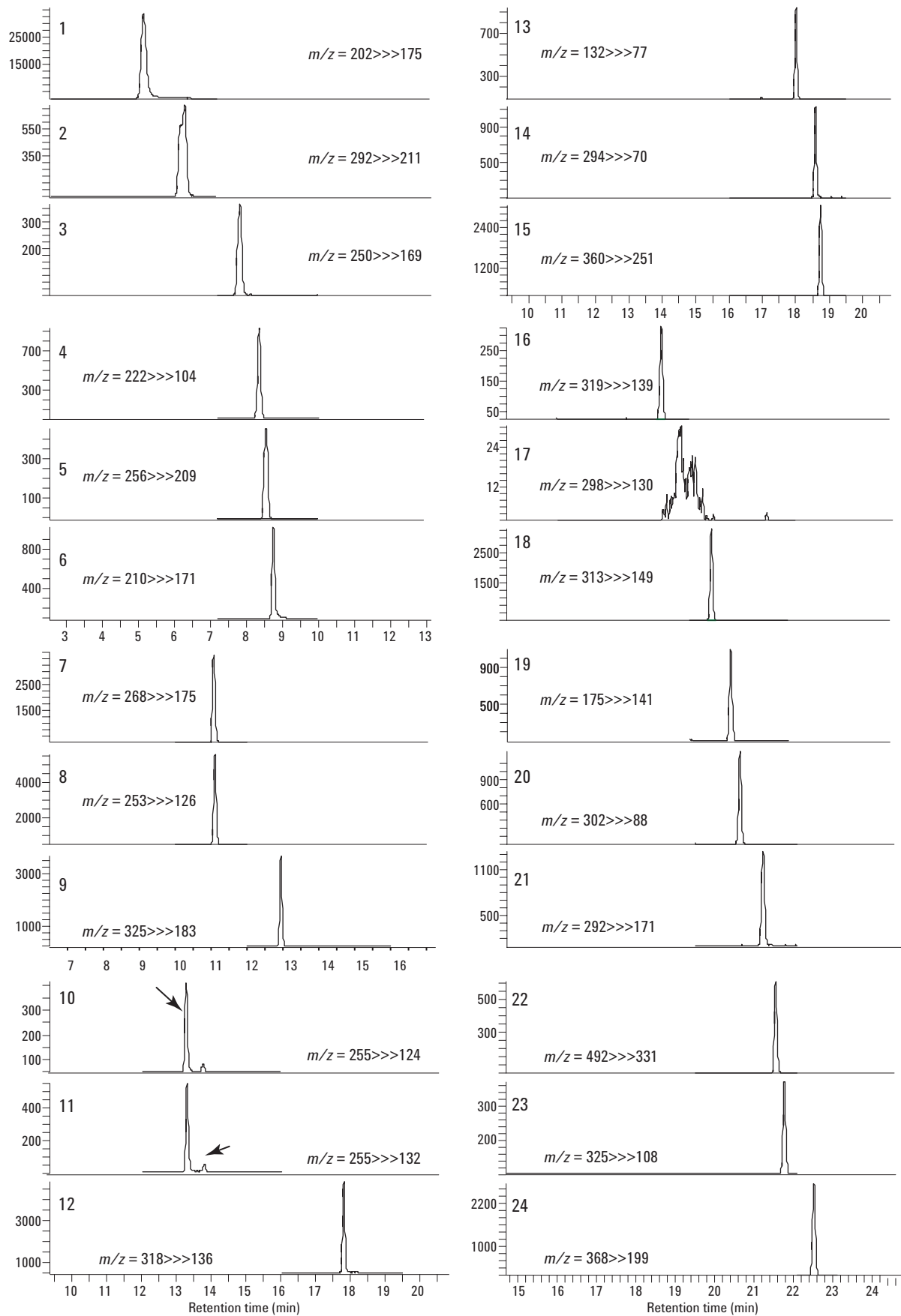


図4 10 ng/mL でスパイクされたオレンジ抽出物中の 33 種類の農薬の MRM (続く)。

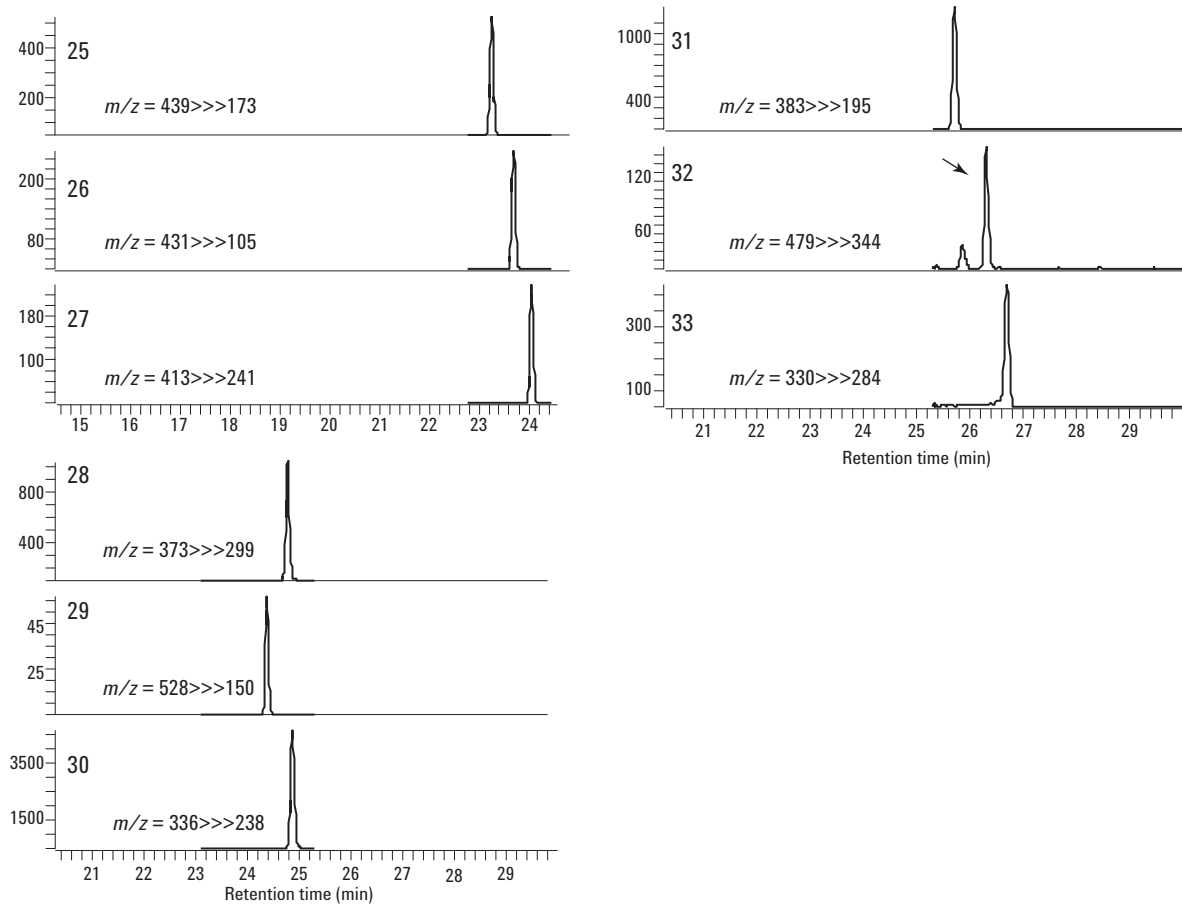


図 4 10 ng/mL でスパイクされたオレンジ抽出物中の 33 種類の農薬の MRM。

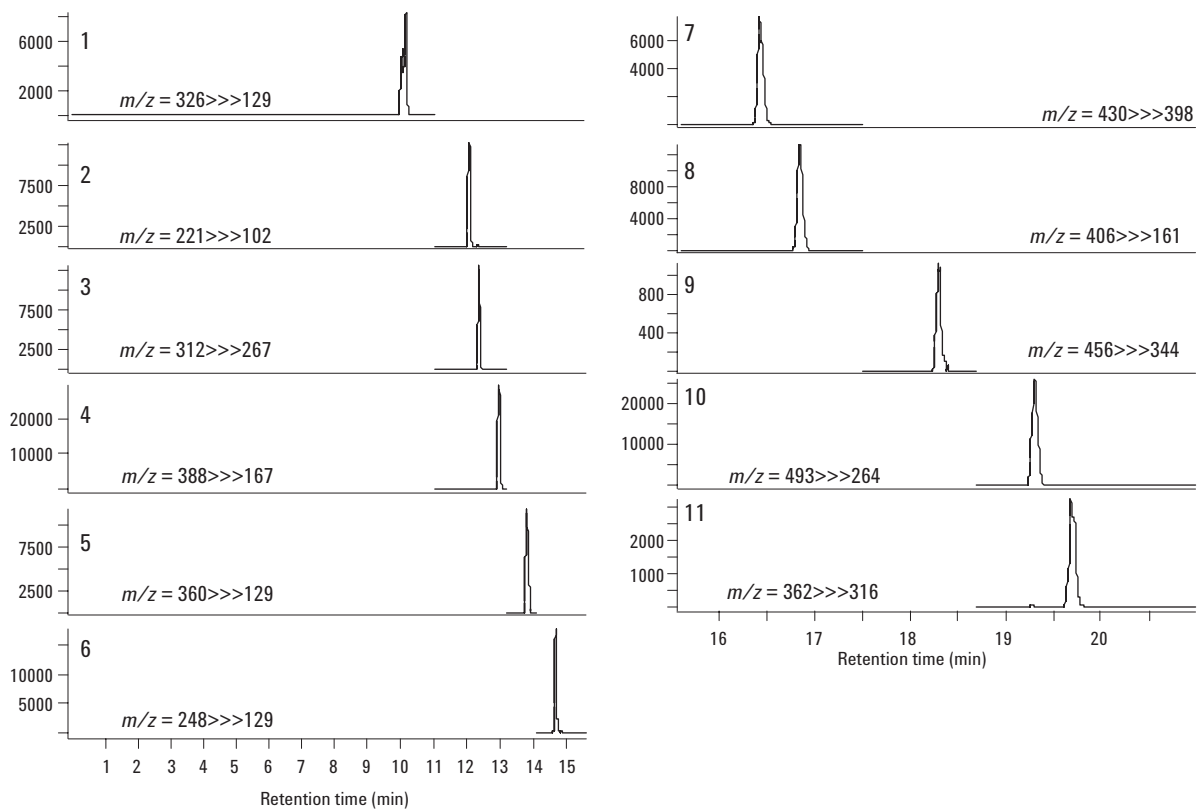


図 5 10 ng/mL でスパイクされたオレンジ抽出物中の 11 種類の農薬の MRM。

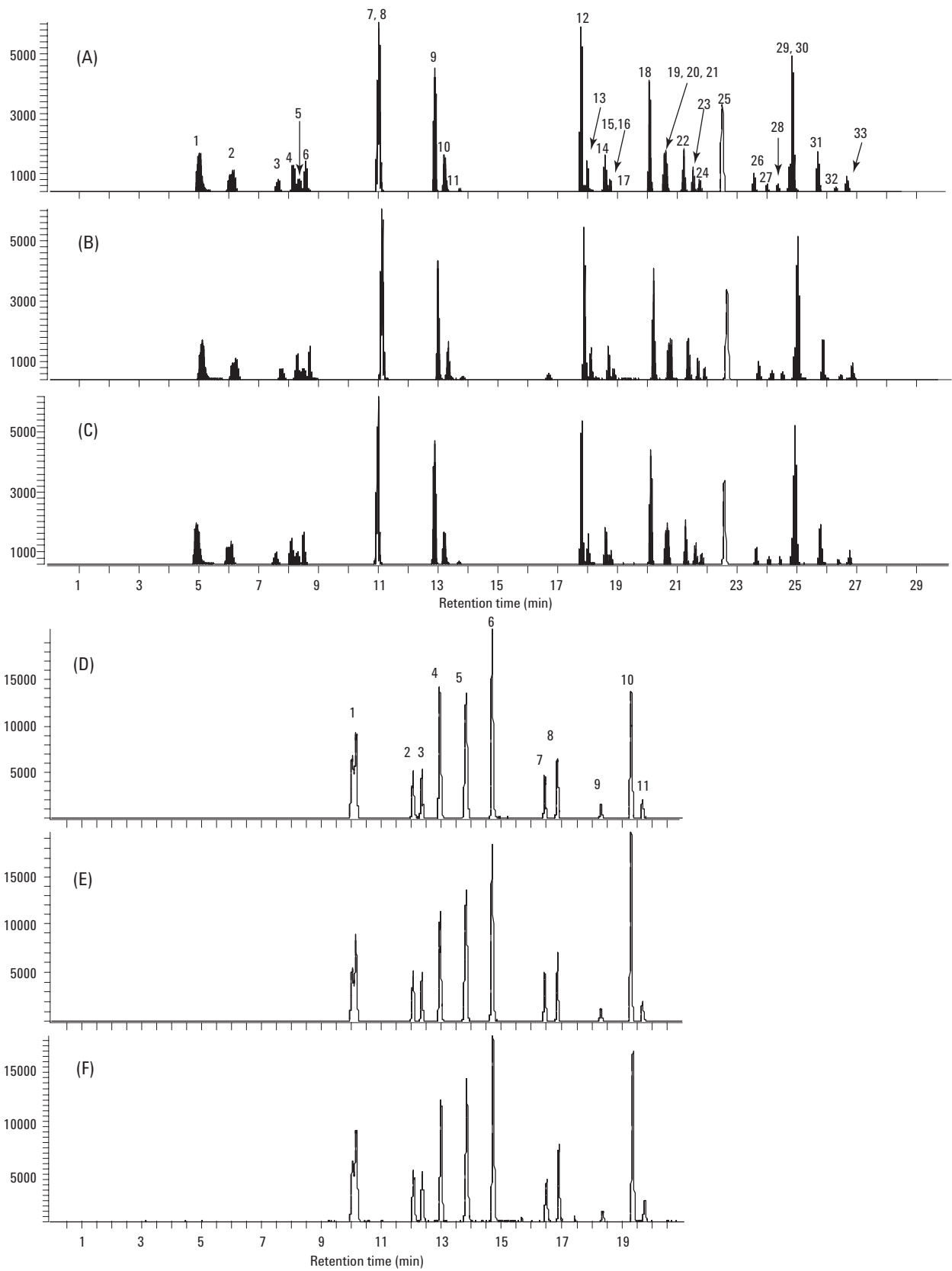


図6 10 ng/mL でスパイクされた抽出物の TIC。

表4 サンプル抽出物中の各農薬の相対強度

No	農薬	相対強度 (%)			
		オレンジ*	キャベツ	りんご	じゃがいも
グループ1					
1	チアベンダゾール	105 (3.2)	101	116	107
2	チアメトキサム	103 (2.1)	98	104	105
3	クロチアニジン	106 (2.9)	101	109	112
4	クロリダゾン	105 (3.3)	106	101	109
5	イミダクロプリド	102 (1.7)	97	102	104
6	ジメチリモール	103 (4.6)	107	103	108
7	オキシカルボキシ	106 (3.7)	102	104	106
8	チアクロプリド	104 (3.1)	104	106	108
9	アザメチオホス	93 (4.6)	90	94	84
10, 11	フェリムゾン (E, Z)	116 (4.1)	109	102	112
12	フェンメディファム	96 (5.3)	99	100	104
13	アジンホスメチル	90 (2.1)	103	104	110
14	シメコナゾール	104 (4.4)	102	106	110
15	インキサフルトール	102 (2.7)	104	108	103
16	ピリフタリド	97 (4.1)	103	104	93
17	メトキシフェノジド	92 (3.1)	99	104	97
18	クロマフェノジド	96 (2.8)	102	103	101
19	トリデモルフ	97 (3.4)	96	100	111
20	フェノキシカルブ	99 (2.1)	105	102	101
21	ナプロアニリド	91 (4.3)	97	98	103
22	ブタフェナシル	102 (2.6)	114	104	114
23	シアゾファמיד	93 (3.5)	92	87	95
24	アニロホス	102 (2.7)	105	103	107
25	ピラゾレート	103 (4.7)	101	103	97
26	ベンゾフェナップ	108 (5.2)	111	98	108
27	シフルフェナミド	108 (3.4)	110	105	101
29	インドキサカルブ	109 (2.6)	105	100	111
28	クロメブロップ	105 (4.2)	107	106	104
30	キンクロラックメチル	105 (4.1)	104	104	105
31	フラチオカルブ	102 (1.8)	104	105	101
32	ラクトフェン	100 (3.7)	109	105	112
33	トラルコキシジム	101 (3.3)	111	102	117
グループ2					
1	フルメツラム	97 (2.6)	110	156	104
2	チジアズロン	104 (4.8)	101	102	113
3	イマザキン	105 (3.1)	100	100	101
4	チフェンスルフロンメチル	106 (2.9)	112	116	113
5	フロラスラム	99 (3.1)	106	103	109
6	ホルクロルフエニロンメチル	101 (4.4)	103	100	108
7	クロラスラムメチル	94 (3.9)	104	97	142
8	ジクロスラム	95 (3.3)	102	96	107
9	フォメサフェン	99 (5.9)	101	95	109
10	トリフルスルフロンメチル	97 (4.1)	111	104	108
11	ハロキシホップ	108 (4.8)	114	110	124

*(): 1日以内に5つの複製に基づき計算されたRSD、%

結論

ここで紹介した LC/MS/MS による多成分一斉分析法は、高感度で選択性が高いため、さまざまな食品試料中の 44 種類の農薬の測定に適していました。このメソッドの他の利点は、イオン抑制が検討したすべての食品サンプルに対して観察されなかったことです。従って、この手法は様々な起源のサンプルに対して分析を面倒にする、マトリックスマッチング標準の必要性を排除できました。

このアプリケーションの詳細については、masahiko_takino@agilent.com にお問い合わせください。

詳細情報

Agilent 製品およびサービスの詳細は、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、
翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
August 8, 2006
5989-5459JAJP