

Technical Report

LC/MS/MSを用いたQuEChERS法による食品中残留農薬の一斉分析

Analysis of Pesticides in Food Matrix using QuEChERS by Triple Quadrupole LC/MS/MS

藤戸 由佳¹、猪鼻 祐介²、荒川 清美²、平野 一郎²

Abstract:

EUで規制されている農薬138成分についてLCMS-8040による一斉分析を行いました。本レポートでは、138成分中のGC/MS/MSによる測定法が推奨されている農薬についても、LC/MS/MSによる測定法で良好な結果が得られたのでご紹介します。

Keywords: ポジティブリスト、残留農薬、QuEChERS法、MRL、回収率、LC/MS/MS

1. はじめに

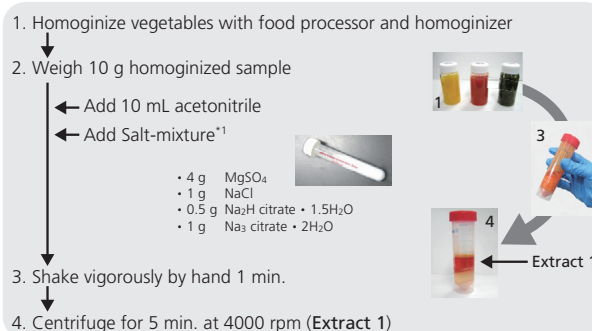
食の安全に対する関心が高まる中、2006年5月29日にポジティブリスト制度が導入され、国内では現在約800種類の農薬・動物医薬品に対して残留基準及び分析法が設定されています。しかし、規制対象成分や残留基準値は国毎に異なっており、食品の輸出入が増加する中で、より迅速でグローバルな対応が求められています。EUでは2008年9月1日にEU内で統一された残留農薬基準 (Maximum Residue Levels=MRLs) が設定され、Qu (Quick; 速い) E (Easy; 簡単) Ch (Cheap; 廉価) E (Effective; 効果的) R (Ruggedness; 堅牢) S (Safe; 安全) なQuEChERS法を前処理法として用いたGC/MS/MSとLC/MS/MSによる簡易な残留農薬分析法が示されています。

ここでは、EUで規制されている農薬138成分についてLCMS-8040を用いて一斉分析を行い、さらに実試料として野菜 (パプリカ・ニラ) 抽出溶液の測定を行った結果をご紹介します。

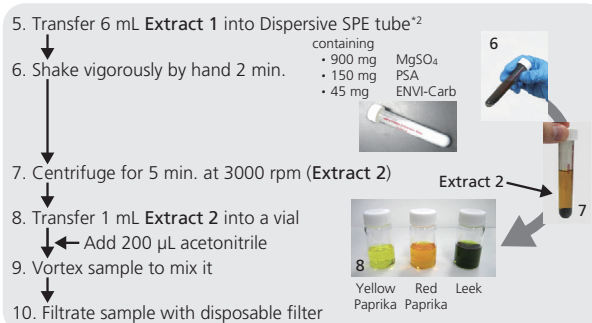
2. 方法

QuEChERS法は、2003年にAnastassiadesらによって発表された残留農薬分析の前処理方法です。ポリプロピレンチューブ内でアセトニトリル抽出・塩析・脱水を行った後、遠心分離した抽出溶液に固相抽出に用いる充填剤を直接混合 (分散固相抽出: dispersive SPE) しクリーンアップするという迅速で簡易な手法であることから、現在世界中で広く利用されており、日本国内においても普及しつつあります。今回、マトリクスとしてニラ・パプリカを用意し、これらの野菜サンプルについてQuEChERS法で前処理を行い (Fig. 1)、測定に用いました。

Step 1 : Sample Extraction



Step 2 : Sample Cleanup



*1 : Citrate Extraction Tube (SIGMA ALDRICH)
*2 : PSA/ENVI-Carb SPE Clean Up Tube 2 (SIGMA ALDRICH)

Fig. 1 実サンプルの前処理 (QuEChERS法 EUメソッド)

使用した超高速液体クロマトグラフNexera、トリプル四重極型質量分析計LCMS-8040の分析条件は、下記の通りです。

Table 1 分析条件

HPLC : Nexera UHPLC system	
Column	: Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2 mmI.D., 2.2 μm)
Mobile phase A	: 2 mM ammonium formate containing 0.1% formic acid – water
Mobile phase B	: Methanol
Gradient program	: 5% B (0-2.5 min.) → 55% B (2.51-6 min.) → 80% B (6.01-12 min.) → 100% (12-15 min.) → 5% (15.01-20 min.)
Flow rate	: 0.2 mL / min.
Column temperature	: 40°C
MS : LCMS-8040 Triple quadrupole mass spectrometer	
Ionization	: ESI (Positive / Negative)
Ion spray voltage	: +4.5 kV / -3.5 kV
MRM	: 276 MRM transitions (2 MRMs / compound) Dwell time 5 msec. / Pause time 1 msec.

イオン化法はエレクトロイオンスプレーイオン (ESI) 化法を用い、正負イオン化同時測定を行いました。また、138成分の化合物のMRMを同時に行うため、276個のMRM (1化合物あたり2 MRM) を設定し、Dwell timeおよびPause timeは、それぞれ5 msec.および1 msec.としました。

LC/MS/MS推奨化合物 (72成分)			
Acephate	Epoxiconazole	Linuron	Spinosad
Acetamiprid	Fenbutatin oxide	Lufenuron	Spiroxamine
Aldicarb	Fenbuconazole	Metconazole	Tebufenozide
Amitraz	Fenhexamid	Methamidophos	Teflubenzuron
DMF, DMPF	Fenoxycarb	Methiocarb	Thiabendazole
Azinphos-methyl	Fenpropimorph	Methomyl	Thamethoxam
Azoxystrobin	Fenthion sulfoxide	Methoxyfenozide	Thiacloprid
Bitertanol	Fludioxonyl	Monocrotophos	Thiophanate-methyl
Boscarid	Flufenoxuron	Oxamyl	Triadimenol
Cadusafos	Fluquinconazole	Oxydemeton-methyl	Trichlorfon
Carbaryl	Flutriafol	Paclotbutrazole	Trifloxystrobin
Carbendazim	Formetanate	Pencycuron	Triflumuron
Carbofuran	Fosthiazate	Penconazole	Triticonazole
Clorfentezin	Hexaconazole	Phosmet	Zoxamide
Clothianidin	Hexythiazox	Pyraclostrobin	
Cyproconazole	Imazalil	Prochloraz	
Dichlorvos	Imidacloprid	Propamocarb	
Difenoconazole	Indoxacarb	Propargite	
Dimethoate	Iprovalicarb	Prothioconazole	
Dimethomorph	Kresoxim-methyl	Quinoxifen	

3. 農薬138成分のMRM測定

EURL「Multiresidue Method using QuEChERS following by GC-QqQ/MS/MS and LC-QqQ/MS/MS for Fruits and Vegetables」では、農薬138成分のうち72成分についてはLC/MS/MS、66成分についてはGC/MS/MSを測定法として推奨しています (Fig. 2) が、今回138成分全成分についてLCMS-8040を用いて一斉分析し、イオン化の可否および定量下限値を確認しました。Table 2に農薬138成分の定量下限値を示しました。LC/MS/MSが測定法として推奨されている化合物の定量下限値は、全成分で10 ppb以下となりました。また、GC/MS/MSが測定法として推奨されている化合物では、約8割の化合物がLCMS-8040でイオン化が可能であり、さらに約7割の化合物で定量下限値が10 ppb以下となりました。Fig. 3に代表的な農薬4成分の検量線とMRMクロマトグラムを示します。この4成分については1-1000 ppbの範囲で十分な直線性、n=6で再現性が得られました。

Table 2 農薬の定量下限値 (LOQ)

推奨試験法 (on the EURL method)	LOQs < 10 ppb	LOQs > 10 ppb	Not Ionization
	LC/MS/MS	72 (100%)	0 (0%)
GC/MS/MS	47 (71%)	6 (9%)	13 (20%)

GC/MS/MS推奨化合物 (66成分)			
Acrinathrin	Endosulfan	Myclobutanil	Tebufenpyrad
Bifenthrin	Ethion	Oxadixyl	Tefluthrin
Bromopropylate	Etofenprox	Parathion	Tetraconazole
Bupirimate	Etoprofos	Parathion-methyl	Tetradifon
Buprofezin	Fenarimol	Pendimethalin	Tolclofos-methyl
Captan	Fenazaquin	Permethrin	Tolyfluandid
Chlorfenvinphos	Fenitrothion	Phenthoate	Triazophos
Chlorotalonil	Fenproprathrin	Phosalone	Trifluralin
Chlorpropham	Fenthion	Pirimicarb	Vinclozolin
Chlorpyrifos	Fenvalerate	Pirimiphos-methyl	
Clorpyrifos-methyl	Fipronil	Procymidone	
Cyfluthrin	Flusilazole	Profenofos	
Cypermethrin	Folpet	Propiconazole	
Cyprodinil	Iprodione	Propyzamide	
Deltamethrin	λ-Cyhalothrin	Pyridaben	
Diazinon	Malathion	Pyriminyl	
Dichlofluanid	Mepanipyrim	Pyriproxyfen	
Dichloran	Metalaxyl	Taufluvinalinate	
Diphenylamine	Methidathion	Tebuconazole	

Fig. 2 EUで規制されている農薬138成分のリスト

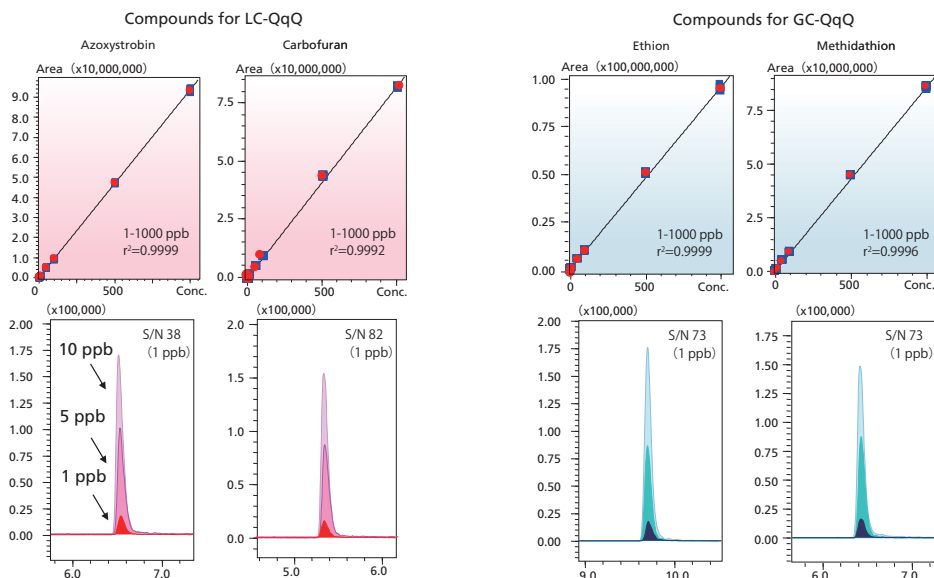


Fig. 3 代表的な農薬4成分の検量線とMRMクロマトグラム

4. マトリクス中に添加した農薬138成分の回収率

ニラ・パプリカ抽出溶液に農薬138成分を各5 ppb添加し、回収率を算出しました。Fig. 4に各溶液中の農薬の回収率を示しました。また、回収率をLC/MS/MS推奨化合物およびGC/MS/MS推奨化合物に分けて算出したものをTable 3に示しました。QuEChERS法は簡易前処理法であるため、マトリクス中には多くの夾雑成分を含んでいると考えられますが、いずれのマトリクスにおいても約80-90%の

農薬が良好な回収率を示しました。なお、マトリクスに添加した農薬のうち、回収率が120%を上回る化合物がいくつか確認されましたが、これらはマトリクスブランクでも検出されていることが確認されました (Fig. 5) が、定量の結果、マトリクスブランクで検出された農薬は、いずれも基準値以下の値となりました。

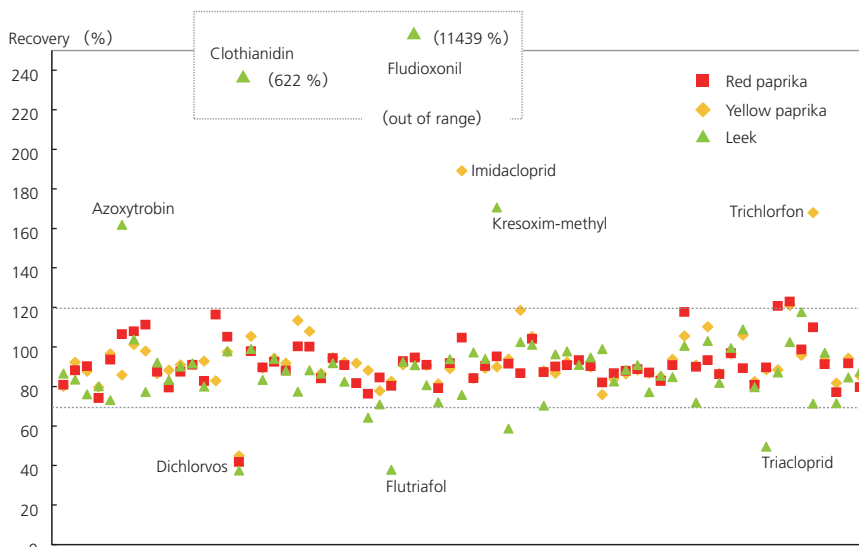


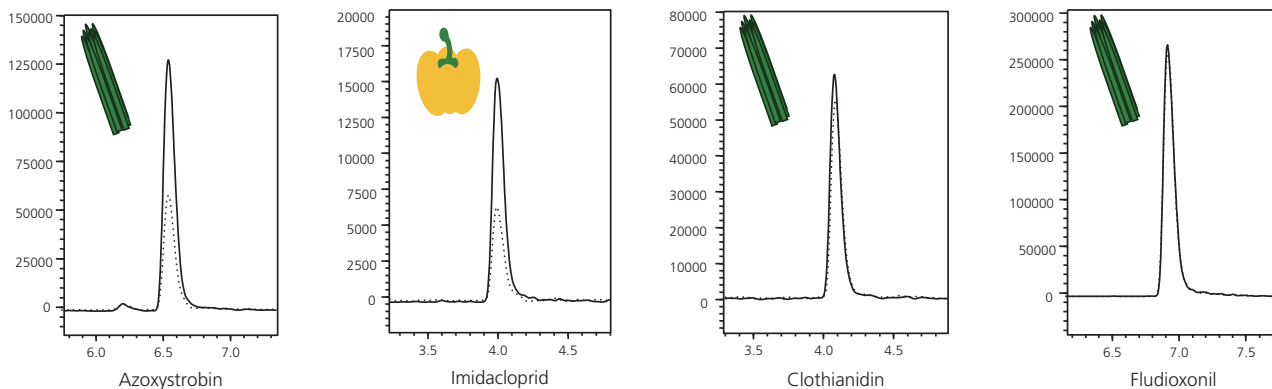
Fig. 4 野菜抽出溶液（パプリカ・ニラ）に添加した農薬の回収率（添加濃度：5 ppb）

Table 3 LC/MS/MS推奨化合物およびGC/MS/MS推奨化合物の回収率

Recovery	LC/MS/MS推奨化合物 (72成分)			GC/MS/MS推奨化合物 (66成分)			
	Paprika (Yellow)	Paprika (Red)	Leek	Recovery	Paprika (Yellow)	Paprika (Red)	Leek
70-120 %	94	97	87	70-120 %	96	86	86
120 % <	4	1	6	120 % <	0	0	0
70 % >	1	1	7	70 % >	2	14	14

(単位: %)

— 5 ppb standards spiked
 Matrix blank



	Azoxystrobin	Imidacloprid	Clothianidin	Fludioxonil
5 ppb standards spiked	8.19 ppb	8.99 ppb	25.78 ppb	556.58 ppb
Matrix blank	3.77 ppb	3.19 ppb	21.39 ppb	550.92 ppb
MRL (Japan)	5 ppm	3 ppm	15 ppm	10 ppm

Fig. 5 農薬4成分のMRMクロマトグラムと定量結果 (5 ppb添加サンプル/マトリクスブランク)

5. 結論

QuEChERS法により前処理した野菜サンプル中の農薬について、LCMS-8040を用いて高速MRM正負イオン同時測定を行い、MRLs以下の濃度で測定が可能でした。EURLでGC/MS/MSが測定法として推奨されている農薬の中で主要なものについてLC/MS/MSによる測定が可能であることが確認できました。