農産物中81種の農薬のLC/MS/MS による一斉分析法

概要

農作物などを害する病害虫、雑草、ねずみ、その他を防除して農業の生産性を高めるために、数多くの農薬が使用されています。現在800種類以上の化合物が農薬として使用されており、ほとんどの国でその使用に何らかの規制を設けています。食物となる農産物では、定められた化合物は許容残留量(Maximum Residue Level, MRL)以下でなければなりません。ですから果物、野菜、穀物など種々の作物中の残留農薬をモニターする必要があります。分析にかかる装置及び人材と時間を効率的に活用するため、1回の分析でできるだけ多くの残留農薬をモニターできることが望まれます。

多成分一斉分析法は通常同じ属性の化合物類を分析対象物としています。そのため抽出法や前処理法を最適化することが可能です。異なる属性の化合物類を同時に抽出・前処理しようとすると、その方法は選択性が低くなるために、分析の妨害になるマトリクスが充分取り除けない危険性が高まります。

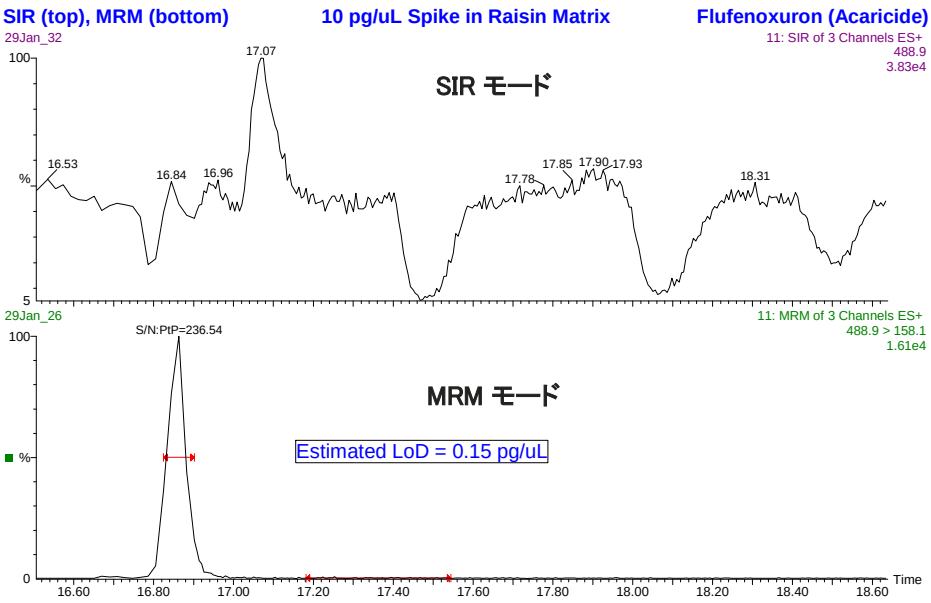
そこでトリプル四重極LC/MS/MSをマルチプルリアクションモニタリング(MRM)モードで使用すると、複雑なサンプルマトリクス中のターゲット化合物を高感度に検出するための選択性を得ることが出来ます。

Fig1.

Figure1.にMRMモードとシングルイオンレコーディング(SIR)モードの選択性の差を示します。レーズン抽出物にFlufenoxuronを0.02 mg/kg 添加したサンプルを分析したクロマトグラムですが、m/z 488.9 を第1MSで選択、衝突誘起解離(CID)で生成するプロダクトイオンm/z 158.1 を第2MSで選択するMRMモードではターゲット化合物が明瞭に検出されています。一方m/z 488.9 を選択するだけのSIRモードでは、ターゲット化合物はマトリクス由来の妨害に隠れて検出することが出来ません。

MICROMASS MS TECHNOLOGIES

Fig1. レーズン抽出物に0.02 mg/kgの濃度で添加したFulfenoxuron のMRMとSIRクロマトグラムの比較差



このようなMRMモードを使用することにより、81種の農薬及び代謝物の一斉分析法を開発しました。

キーワード:
農薬　LC/MS/MS　Quattro *micro* API

抽出・前処理法は一般的な方法を用いました。この分析法をレーズン、アボカド、小麦粉、トマト、レモンの農産物マトリクスで妥当性を検証しました。これらを選んだのは、糖が多い、脂質が多い、乾燥、水分が多い、酸性、と異なる特長を有しているからです。分析対象化合物にはカルバメート系、有機リン系、オキシム系、スルホニル尿素系など異なる属性の化合物類が含まれています。

メソッド

抽出手順

試験試料は果汁を損なわないようにして粗く刻みます。10 g分ブレンダーカップに移します。穀物、インスタント乳児食、小麦粉などのような水分の少ない乾燥試料についてはホモジナイズして均質化し、5 gをブレンダーカップに量り取ります。ブレンダーカップに水を加えますが、その際、もともと試料が持っている水分に加えた水を足すと合計で10mLとなるように水を加えます。10 gのトマト(水分含量95%)には0.5 ML、レモン(水分含量90%)には1 mL、アボカド(水分含量70%)には3 mLの水をそれぞれ加えます。5 gのレーズン(水分含量20%)には9 mL、小麦粉(水分含量10%)には9.5 mLの水をそれぞれ加えます。水分の少ない乾燥試料の場合、水を加えてから10分放置します。この後、さらにメタノールを20 mL加え、2分間サンプルをブレンダーで混合します。抽出上清は全体で30 mLになります(これには試料自身の含有水分も含まれます)。懸濁状態がひどい場合には、一部を取り3000gで遠心分離を行います。

ChemElutによる分画

抽出液6 mLに2 mLの塩化ナトリウム水溶液(20gの塩化ナトリウムを100 mLの水に溶解)を加え、混合します。5mLを取り(この溶液には1.25 gの通常試料または0.625g乾燥試料に相当する残留農薬が含まれています)、5 mL珪藻土を含むChemElutカラムに移します。
5分間放置後、16 mLのジクロロメタンで溶出させます。溶出溶液は緩やかに蒸発乾燥させます。乾燥残留物を超音波洗浄機を用いて250µLのメタノールで再溶解させます。メタノール溶解後、さらに1000µLの水で希釈します。抽出液には1mL当たり1 gの通常試料または0.5 gの乾燥試料に相当する残留農薬が含まれることになります。0.451µmのフィルターでろ過し、ガラス製のサンプルバイアルに移します。

Table 1 MRMメソッドパラメータ

残留農薬	プレカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)	保持時間 (min)	ドゥエル時間 (ms)	相対レスポンス
Daminozid	161	143	20	12	1.19	50	0.89
Methamidophos	142	93.9	22	14	2.11	50	0.82
Acephate	184	143	15	8	2.51	50	2.29
Omethoat	214	183	20	12	2.91	50	2.19
Butoxycarboxim-sulfoxid	207	132	15	10	2.97	50	0.58
Aldicarb-sulfoxid	207	132	16	10	3.26	50	0.58
Butoxycarboxim	240	106	13	14	3.62	50	0.30
Aldoxycarb	240	86	15	22	3.78	50	0.53

HPLCメソッド

装置　　:2795セパレーションモジュール
移動相A :5mM 酢酸アンモニウムin
　　メタノール/水 (1:4 v/v)
移動相B :5mM酢酸アンモニウム in
　　メタノール/水 (9:1 v/v)
カラム　:ウォーターズ Atlantis dC18
　　4.6 mm id ×100 mm (3μm)
流量　　:1.0 mL/min
注入量　:20 uL
スプリット比 :約2:1 (MS手前)
グラジェント : 時間　　溶離液%

時間	溶離液%
0 mins	0% B
15 mins	100% B
29 mins	100% B
29.1 mins	0% B
40 mins	0% B

MSメソッド

Quattro micro
APIトリプル四重極マススペクトロメータ (Waters Corp., Manchester,UK) を用い、ポジティブイオンモードのエレクトロスプレイ法で分析しました。脱溶媒のN2ガス流量は850L/hr、温度は450℃です。ソースブロック温度は120℃です。
キャピラリー電圧は0.6 kVです。

Figur2.で示したMSメソッドエディターで、MRM取り込み設定を分析成分の保持時間を元に設定しています。このシステムではMRMのドゥエル時間をフレキシブルに設定することができるため全体のスキャンサイクルタイムは短いまま、ドゥエル時間を長くすることで強度の小さいピークのS/N比を大きくすることができます。

各残留農薬に関するプレカーサーイオンとプロダクトイオンのm/z値、コーン電圧、コリジョン電圧、保持時間、ドゥエル時間をTable1.に一覧表示しました。Imazalilのレスポンスをリファレンスとした各成分の相対レスポンスも示しています。相対レスポンスは50pg/μLの標準溶液分析結果から求めました。

残留農薬	プレカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)	保持時間 (min)	ドゥエル時間 (ms)	相対レスポンス
Oxamyl	237	71.9	13	10	3.89	50	0.63
Propamocarb	189.1	102	25	17	4.06	30	10.98
Oxydemeton-methyl	246.9	169	20	13	4.24	30	2.43
Methomyl	163	87.9	12	8	4.66	50	0.68
Demeton-S-methyl-sulfon	263	169	25	16	4.72	30	1.88
Quinmerac	222	141.1	20	33	4.95	50	0.57
Pymetrozin	218	105	25	17	5.06	50	1.42
Nicosulfuron	411	182.1	25	20	5.12	200	0.30
Monocrotophos	224	127	20	15	5.23	30	1.50
6-chloro-4-hydroxy-3-phenyl-pyridazin	207	76.9	35	30	5.58	200	0.90
Amidosulfuron	370	261	20	14	5.58	50	0.11
Thiofanox-sulfoxid	252.1	103.9	9	12	5.81	50	0.18
Ethiofencarbsulfon	275	107	13	18	5.81	50	0.97
Metsulfuron-methyl	381.9	167.1	22	15	5.89	30	0.31
Ethiofencarbsulfoxid	242	107	14	18	5.94	30	1.86
Thifensulfuron-methyl	387.9	167.1	22	14	5.94	50	0.31
Rimsulfuron	431.9	182.1	25	20	6.17	200	0.12
Imidacloprid	256	209	20	16	6.23	50	0.30
Thiofanox-sulfon	268.1	76	10	12	6.4	200	0.22
Clethodim-imin-sulfon	302.1	98	35	30	6.66	50	0.52
5-Hydroxy-clethodim-sulfon	408	204.1	20	16	6.75	200	0.19
Chlorsulfuron	357.9	141.1	25	16	6.79	30	0.19
Vamidothion	288	146.1	16	12	6.81	30	3.85
Clethodim-imin-sulfoxid	286.1	208.1	20	17	6.85	50	0.82
Carbofuran-3-hydroxy	220	163	25	10	6.91	30	2.62
Cinosulfuron	414	183.1	25	18	6.91	50	0.63
Metamitron	203.1	175.1	28	16	6.92	100	0.80
Dimethoat	229.9	124.9	15	20	7.09	50	0.80
Flazasulfuron	408	182.1	25	20	7.58	200	0.59
Triasulfuron	402	167.1	25	17	7.71	30	0.31
Clethodim-sulfon	392	300.1	25	13	7.95	50	0.35
Clethodim-sulfoxid	376	206.1	22	17	7.97	50	0.62
Thiacloprid	253	126	25	20	8.14	30	1.64
Carbendazim	192	160.1	25	18	8.38	200	6.84
Butocarboxim	213	74.9	25	14	8.53	50	0.77
Aldicarb	208.1	116	10	6	8.65	200	0.04
Propoxur	210.1	111	13	13	9.88	50	1.45
Carbofuran	222.1	165.1	20	12	10.06	50	4.46
Bendiocarb	224.1	109	18	18	10.06	50	1.23
Prosulfuron	420	141.1	25	20	10.45	50	0.63
Carbaryl	202.1	145.1	20	10	10.74	30	1.74
Ethiofencarb	226	107	15	15	11.01	50	1.34
Triflusulfuron-methyl	493	264.1	28	20	11.19	50	0.66
Pirimicarb	239.1	71.9	28	18	11.37	30	3.81
Thiodicarb	354.9	87.9	15	12	11.56	50	0.56
Atrazin	216	174.1	30	17	11.74	50	2.31
Metalaxyl	280.1	220.1	20	14	11.87	50	3.75
Isoproturon	207.1	71.9	25	15	11.93	30	3.02
Isoxaflutole	377	251	13	18	11.93	300	0.07
3,4,5-Trimethacarb	194.1	137.1	15	10	12.13	30	3.62
Diuron	233	71.9	25	18	12.19	50	1.10
Clethodim	360	164.1	20	19	12.83	50	1.35
Azoxystrobin	404	372	20	13	12.99	50	7.66

残留農薬	プレカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)	保持時間 (min)	ドゥエル時間 (ms)	相対レスポンス
Pyrimethanil	200.1	107	45	25	13.12	50	0.28
Linuron	248.9	160	25	18	13.12	50	0.51
Methiocarb	243	121.1	10	25	13.18	50	0.29
Promecarb	208.1	151.1	18	9	13.38	50	1.94
Fenhexamid	302	97.1	35	25	14	50	1.35
Metolachlor	284	176.1	20	25	14.43	50	2.40
Fenoxycarb	302.1	87.9	20	20	14.61	50	2.01
Tebufenozid	353.1	133.1	14	18	14.61	50	0.64
Tebuconazol	308.1	69.9	30	18	14.98	50	1.64
Cyprodinil	226	93	40	33	15.13	50	0.61
Imazalil	297	159	30	18	15.16	200	1.00
Haloxyfop-methyl	376	316	30	16	15.74	50	3.75
Spiroxamine	298.2	144.1	30	20	16.03	50	7.95
Haloxyfop-ethoxyethyl	434	316	25	20	16.23	50	4.57
Fluazifop-P-butyl	384.1	282.1	30	22	16.29	50	5.18
Quizalofop-ethyl	373	299.1	30	20	16.35	50	3.65
Furathiocarb	383.1	195.1	20	16	16.48	50	2.89
Flufenoxuron	488.9	158.1	25	16	17.22	90	1.10
Pyridate	379.1	207.1	20	16	19.43	90	1.55
Fenpropimorph	304.2	147.1	40	30	19.74	90	3.11

Figure2.

保持時間でプログラムしたMRM取り込みメソッド

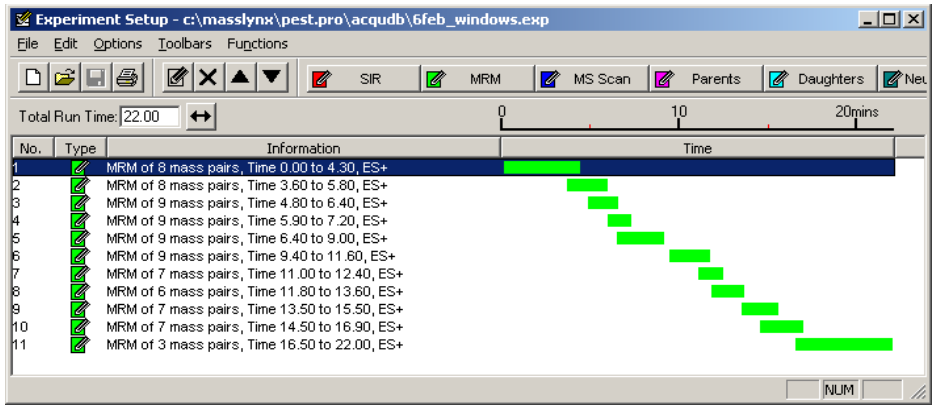
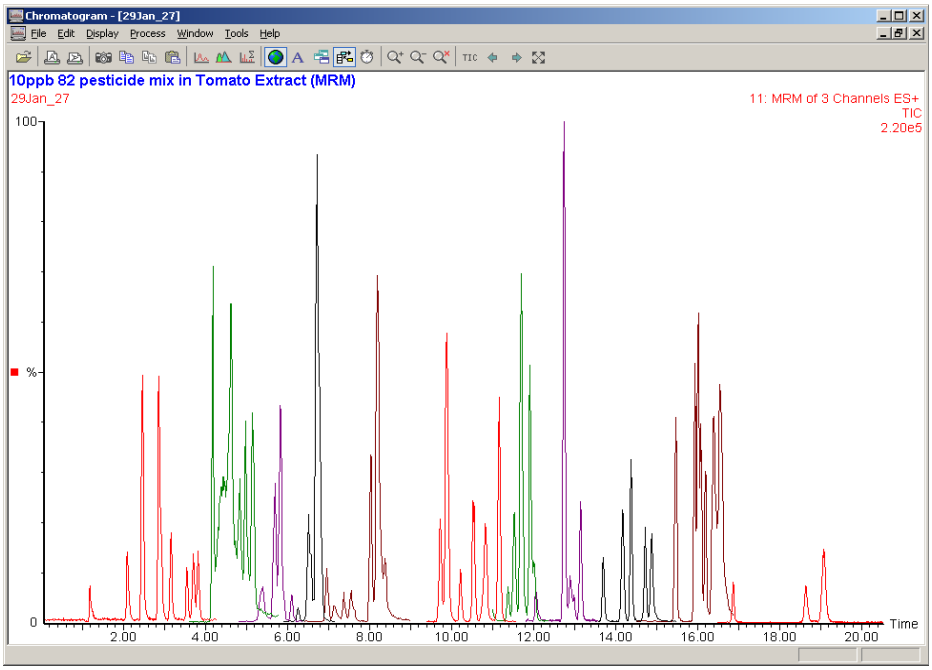


Figure3.

トマト抽出物に0.01 mg/kg の濃度で添加した全81化合物のクロマトグラム



結果

トマト抽出物に0.01 mg/kg の濃度で添加した全81化合物のクロマトグラム

Figure 3 は0.01 mg/kgとなるように標品を添加したトマト試料を分析した際のクロマトグラムです。

5種類の農産物抽出物に全81種の化合物を 5、20、40、60、80、100 pg/ul となるよう添加しました。この濃度はトマト、アボカド、レモンでは 0.005、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/kg に相当します。レーズンと小麦粉では 0.01、0.04、0.08、0.12、0.16、0.2 mg/kg に相当します。Figure 4、6、8、10、12 にオキシムカルバメート系殺虫剤Butocarboxim、ピリミジン系殺菌剤 Pyrimethanil、フェニルメチルカルバメート系殺虫剤 Promecarb、ピリミジン系殺菌剤 Cyprodinil、有機チオリン酸系殺虫剤 Vamidothionの検量線を例として示します。それぞれトマト、レーズン、アボカド、小麦粉、レモン抽出物に添加したものです。Figure 5、7、9、11、13 に、各検量線の最低濃度でのMRMクロマトグラムを示します。

トマト、レモン、アボカドでは0.01及び0.05 mg/kg 添加サンプルを、レーズンと小麦粉では 0.02 及び0.1 mg/kg 添加サンプルを検量線ブラケット法のQCサンプルとして5回繰り返し分析を行いました。検出限界（LOD）、再現性などメソッドの詳細については別のアプリケーションノートとして報告します。

Figure4.

Butocarboxim の検量線 （トマト抽出物に添加）

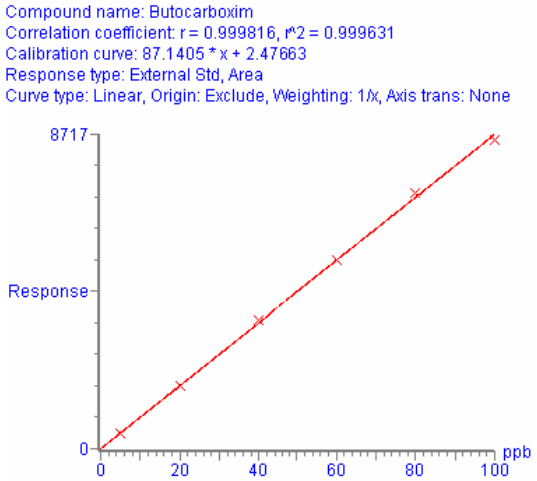
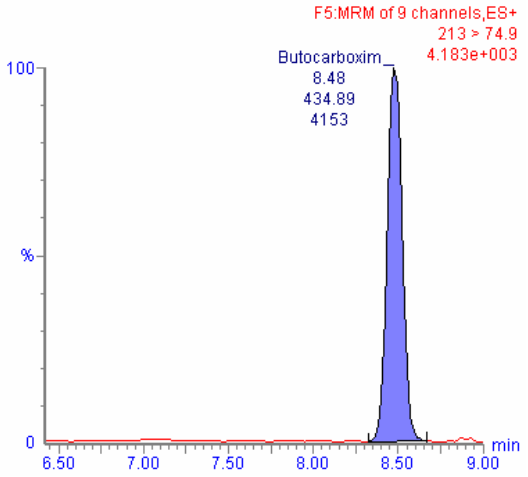


Figure5.

トマト抽出物に 0.005 mg/kg の濃度で添加したButocarboximのクロマトグラム



Pyrimethanil の検量線 （レーズン抽出物に添加）

Figure6.

Compound name: Pyrimethanil
Correlation coefficient: r = 0.999888, r^2 = 0.999777
Calibration curve: 33.6368 * x + 4.18039
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

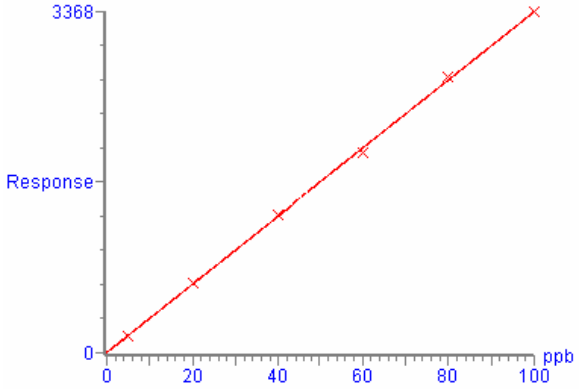
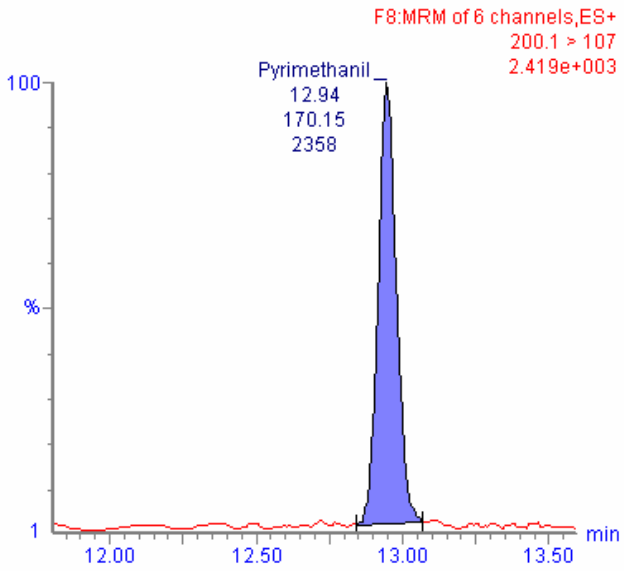


Figure7.



Promecarb の検量線 （アボカド抽出物に添加）

Figure8.

Compound name: Promecarb
Correlation coefficient: r = 0.999311, r^2 = 0.998623
Calibration curve: 262.634 * x + 20.5966
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

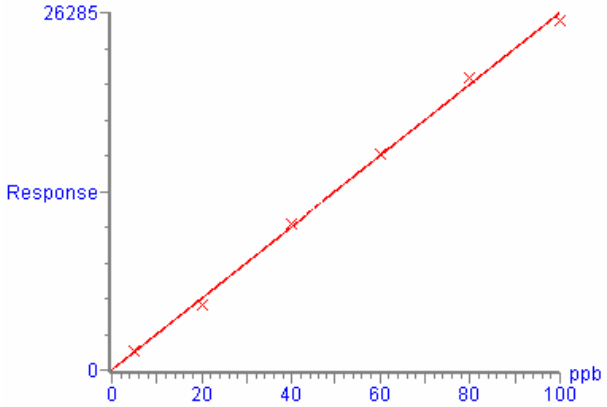


Figure9.

アボカド抽出物に 0.005 mg/kg の濃度で添加したPromecarb のクロマトグラム

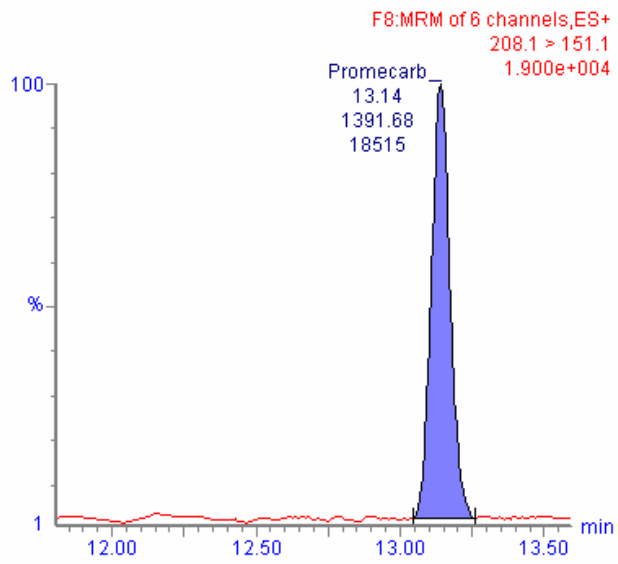


Figure10.

Cyprodinil の検量線 （小麦粉抽出物に添加）

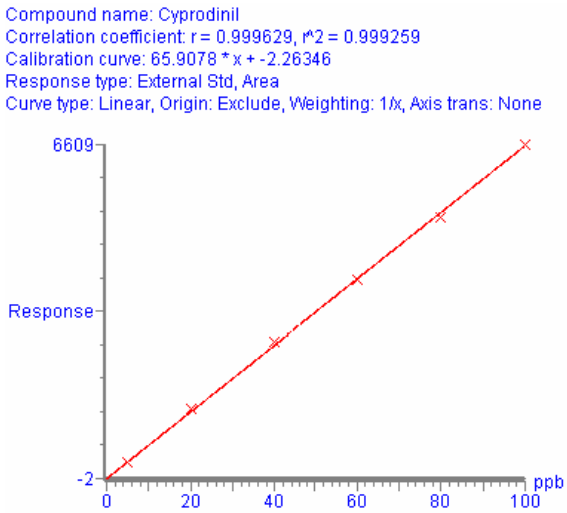


Figure11.

Cy小麦粉抽出物に 0.01 mg/kg の濃度で添加したCyprodinilのクロマトグラム

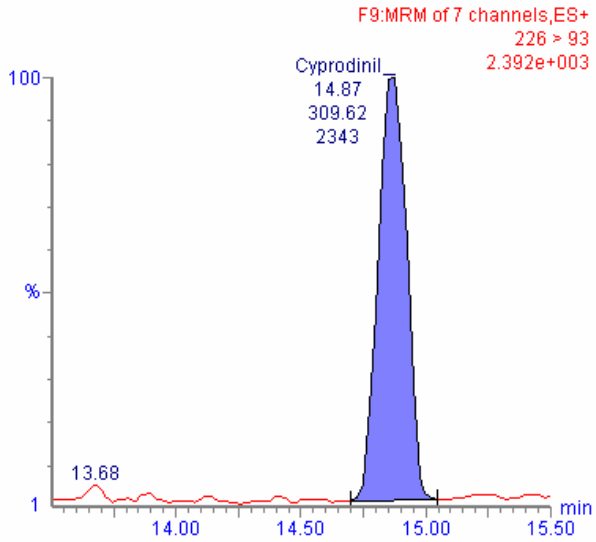


Figure12.

Vamidothion の検量線 （レモン抽出物に添加）

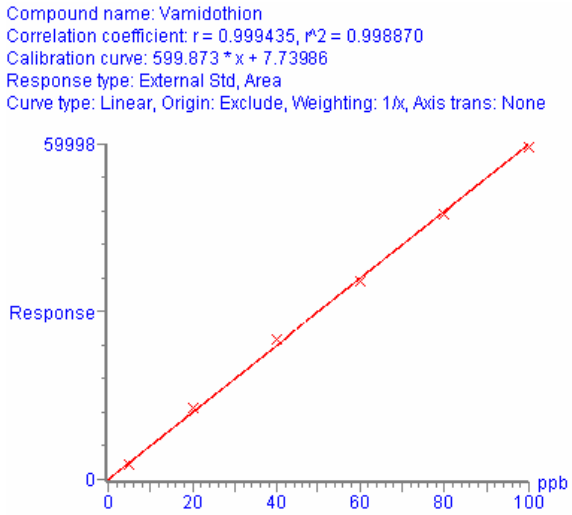
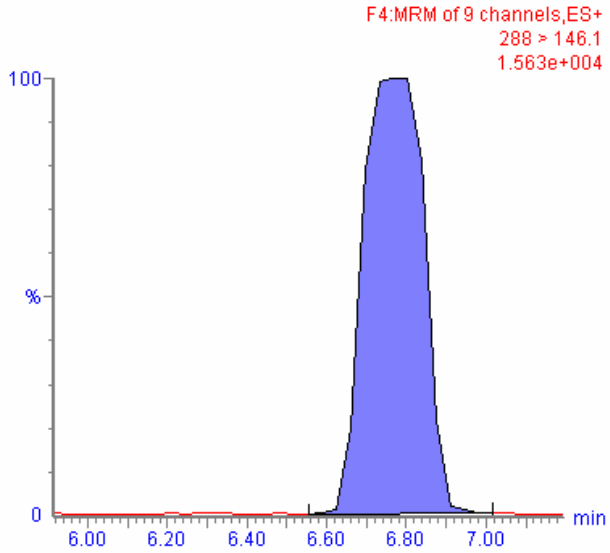


Figure13.

レモン抽出物に 0.005 mg/kg の濃度で添加したVamidothionのクロマトグラム



結論

一般的な抽出法とHPLC/MS/MS分析法を組み合わせた分析手法は、代表的なマトリックスで幅広い種類の化合物に有効な分析手法であり、果実や野菜に含まれる81種類の残留農薬のスクリーニングにも適していました。また、ここでの測定限界はEUでのサーベイランスモニタリングで求められる検出感度よりも申し分なく低く、従ってこのメソッドはすでに検討済のカテゴリー内の化合物であれば、より多くの化合物に応用を広げることが可能であるのは明らかです。

Waters

日本ウォーターズ株式会社

本社：東京都品川区北品川1-3-12　第5小池ビル
TEL:03-3471-7191　FAX:03-3471-7118

Gordon Kearney[1], Lutz Alder[2], Anthony Newton[1], Jeannette Klein[2]

1 Waters Corporation, Atlas Park, Manchester, UK, M22 5PP

2 Federal Institute for Risk Assessment, P.O.B. 33 00 13, D-14191 Berlin, Germany