

報 文

限外ろ過法を用いた LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析

(平成 17 年 11 月 28 日受理)

畠山えり子*[†] 梶田 弘子* 菅原隆志* 佐々木 陽*
高橋 悟* 小向隆志*Simultaneous Determination of Pesticides in Agricultural Products by
LC/MS/MS Using Clean-up with UltrafiltrationEriko HATAKEYAMA[†], Hiroko KAJITA, Takashi SUGAWARA, Akira SASAKI,
Satoru TAKAHASHI and Takashi KOMUKAI(Research Institute for Environmental Sciences and Public Health of Iwate Prefecture:
1-36-1, Iikasinden, Morioka 020-0852, Japan; [†]Corresponding author)

A method for simultaneous determination of multiple pesticide residues in agricultural products was developed by using a pretreatment with ultrafiltration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The pretreatment process (extraction of pesticides from agricultural products with methanol, dilution of the extract with water, and ultrafiltration) gave recoveries in the range of 50–150% for 63 of 83 pesticides spiked at 0.25 µg/g into 6 agricultural products. The detection limits of pesticides by LC/MS/MS were below 0.0005~0.05 µg/g. This method is useful for screening purposes and for multiresidue analysis of pesticides in agricultural products. Pesticide residues in 50 domestic crops were investigated by this method, and residues of 14 pesticides were detected in 30 crops.

(Received November 28, 2005)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 農作物 agricultural product; 一斉分析 simultaneous determination; 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS; 限外ろ過 ultrafiltration

緒 言

食品中に残留する農薬は、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」(昭和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号)によって規制されている。平成 18 年 5 月からは、食品中の残留農薬基準にポジティブリスト制が導入され、基準項目が 500 種以上に拡大されることから、迅速かつ効率的な多成分分析法の開発が早急に求められている。

これまでの多成分分析法は GC や GC/MS^{1)~3)}を用いたものが多く、難揮発性農薬や熱に不安定な農薬は、誘導体化などの煩雑な操作が必要なため一斉分析が困難な状況にあった。また、このような農薬は HPLC-UV 法、HPLC-ポストカラム蛍光検出法を用いて分析が行われており、感度や選択性が不十分であるため、きょう雑物の多い試料を対象とする場合は煩雑な精製操作を必要とする。

近年、LC/MS の普及に伴い、簡易な前処理で多数の難揮発性農薬や熱に不安定な農薬の分析が可能な LC/MS (MS) による多成分分析法^{4)~8)}が報告されている。しか

し、極性の高い農薬や固相から溶出しにくい農薬などで、回収率が低いことが指摘されている^{6), 8)}。

そこで、本研究では GC/MS による一斉分析が困難な農薬を中心に、高感度・高選択性を有する LC/MS/MS による農産物中の一斉分析法について検討したところ、限外ろ過による精製方法を用いることにより、迅速かつ簡易に一斉分析が可能であったので報告する。

実験方法

1. 試 料

試験には、市販の玄米、トマト、パプリカ、リンゴ、グレープフルーツ、ハウレン草を使用した。

2. 対象農薬

対象農薬は Table 1 に示した有機リン系 6 成分、カーバメート系 17 成分、スルホニル尿素系 8 成分、ネオニコチノイド系 3 成分、イミダゾール系 4 成分、ベンゾイルフェニル系 5 成分、ベンズイミダゾール系 3 成分、酸アミド系 3 成分、その他 35 成分、合わせて 83 成分の農薬を対象とした。

[†] 連絡先

* 岩手県環境保健研究センター：〒020-0852 岩手県盛岡市飯岡新田 1-36-1

Table 1. Compound-specific ESI MS/MS Parameters

No.	Pesticides	R.T.* (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential	Collision energy	LOD ($\mu\text{g/g}$)**
[Positive mode]							
1	Daminozide	2.5	161	61	60	20	0.05
2	Methamidophos	3.2	142	112	56	17	0.0025
3	Acephate	3.3	184	143	51	13	0.0025
4	Omethoate	3.5	214	183	57	16	0.0005
5	Aldicarb sulfoxide	3.8	207	132	56	11	0.0025
6	Propamocarb	4.1	189	102	71	25	0.0005
7	Pymetrozin	4.2	218	105	71	31	0.0025
8	Nitenpyram	5.7	271	126	61	39	0.0025
9	Oxamyl	6.0	237	72	36	29	0.0025
10	Aldicarb sulfone	6.0	223	148	56	11	0.0005
11	Methomyl	7.6	163	88	46	15	0.0025
12	Ethiofencarb sulfoxide	9.9	242	107	66	13	0.0025
13	Carbendazim	10.6	192	160	61	25	0.0005
14	Vamidothion	10.7	288	146	56	19	0.0005
15	Ethiofencarb sulfone	11.0	258	107	66	23	0.0025
16	Imidacloprid	11.2	256	209	71	21	0.0005
17	Acetamiprid	11.5	223	126	66	23	0.0005
18	Tricyclazole	11.5	190	163	111	31	0.0005
19	Metsulfuron methyl	12.2	382	167	66	23	0.0005
20	Chlorsulfuron	12.3	358	141	56	25	0.0005
21	Diffubenzuron	12.6	311	158	91	23	0.005
22	Thiophanate methyl	12.6	343	151	76	27	0.0005
23	Thiodicarb	12.7	355	88	51	31	0.0005
24	Azimsulfuron	12.7	425	182	66	21	0.0005
25	Bendiocarb	12.9	224	167	61	11	0.0005
26	Methabenzthiazuron	12.9	222	165	71	17	0.0005
27	Carbofuran	13.0	222	123	51	23	0.0005
28	Triflumizole metabolite	13.0	295	43	71	47	0.0025
29	Halosulfuron methyl	13.1	435	182	66	27	0.0005
30	Fosthiazate	13.2	284	228	61	15	0.0005
31	Carbaryl	13.2	202	148	51	13	0.0005
32	XMC	13.3	180	123	53	16	0.0005
33	Imazosulfuron	13.3	414	156	61	27	0.0005
34	Probenazole	13.3	224	41	56	15	0.005
35	Metalaxyl	13.3	220	192	101	17	0.0005
36	Ethiofencarb	13.4	226	107	61	23	0.0005
37	Atrazine	13.4	216	174	86	25	0.0025
38	Felimzone	13.5	255	91	81	49	0.0005
39	Bensulfuron methyl	13.5	411	149	71	29	0.0005
40	Isoprocarb	13.5	194	95	56	21	0.0025
41	Imazalil	13.6	297	159	66	31	0.0025
42	Inabenzfide	13.6	340	80	56	53	0.0025
43	Methiocarb	14.1	226	169	56	15	0.0005
44	Fenobucarb	14.2	208	95	66	17	0.0005
45	Linuron	14.3	249	160	72	25	0.005
46	Azoxystrobin	14.3	404	372	71	21	0.0005
47	Dymuron	14.4	269	151	59	19	0.0005
48	Fenhexamid	14.5	302	97	81	35	0.0005
49	Triadimefon	14.5	294	197	61	21	0.0005
50	Cyclosulfamuron	14.5	422	261	66	25	0.0005
51	Molinate	14.9	188	126	56	19	0.0025
52	Isoprothiolane	15.1	291	231	46	17	0.0005
53	Benomyl	15.1	291	192	46	17	0.0005
54	Tebufenozide	15.2	353	297	46	13	0.0005
55	Metolachlor	15.2	284	252	71	21	0.0005
56	Prochloraz	15.4	376	308	56	17	0.0005
57	Indanofan	15.4	341	175	61	19	0.0025
58	Cyprodinil	15.5	226	93	101	49	0.0005
59	Ethoxyquin	15.6	218	148	51	31	0.0025
60	Spinosyn A	15.7	732	142	81	41	0.0025
61	Etobenzanid	16.0	340	149	80	30	0.0025
62	Triflumizole	16.1	346	278	46	15	0.0005
63	Pencycuron	16.2	329	125	81	35	0.0005
64	Phoxim	16.1	299	77	61	45	0.0025
65	Benthiocarb	16.4	258	125	41	21	0.0005
66	Imibenconazole	16.7	411	125	76	45	0.0005
67	Quizalofop-ethyl	16.9	373	299	86	27	0.0005
68	Spinosyn D	16.9	746	142	76	41	0.0025
69	Chethodim	17.2	359	164	51	27	0.0025
70	Benfuracarb	17.5	411	190	61	17	0.0005
71	Pyrimidifen	17.5	378	184	91	33	0.0005

Table 1. Continued

No.	Pesticides	R.T.* (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential	Collision energy	LOD ($\mu\text{g/g}$)**
72	Furathiocarb	17.6	383	195	81	25	0.0005
73	Oxaziclomefone	17.6	376	190	71	23	0.0005
74	Flufenoxuron	17.7	489	158	76	29	0.0025
75	Hexythiazox	18.4	353	228	60	20	0.0025
76	Fenpyroximate	19.0	422	366	76	23	0.0005
77	Ethofenprox	22.2	359	183	40	35	0.0025
[Negative mode]							
1	Bentazone	9.3	239	132	-70	-20	0.0005
2	Flazasulfuron	10.6	408	251	-45	-18	0.0005
3	Iprodione	12.0	328	243	-40	-16	0.05
4	Iprodione metabolite	13.2	328	141	-40	-16	0.0005
5	Teflubenzuron	13.4	379	339	-35	-16	0.0005
6	Lufenuron	14.3	509	326	-60	-22	0.0025

* Retention time

** Limit of detection ($S/N > 3$)

Table 2. Gradient Conditions

[Positive mode]							
Time (min);	0	1	9	18	18.01	26	
A (%)	80	80	10	10	80	80	
B (%)	20	20	90	90	20	20	
[Negative mode]							
Time (min);	0	1	5	10.01	18		
A (%)	80	80	10	80	80		
B (%)	20	20	90	20	20		

A: 0.05% formic acid + 10 mmol/L ammonium acetate

B: Acetonitrile

3. 試薬など

溶媒: アセトニトリル, 蒸留水は関東化学(株)製の LC/MS 用, メタノールは関東化学(株)製の残留農薬試験用, その他の試薬は関東化学(株)製の特級を用いた。

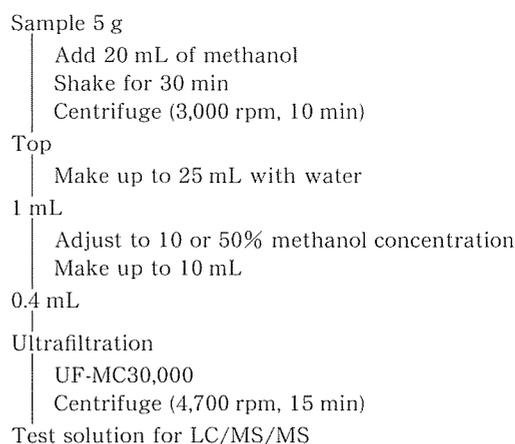
農薬標準品: 関東化学(株), 林純薬工業(株), 和光純薬工業(株)および Dr. Ehrenstorfer GmbH 社製の残留農薬試験用農薬標準品を用いた。標準品はそれぞれ 10 mg をアセトニトリル (カルベンダジムは水-アセトニトリル=1:1) に溶解し, 正確に 100 mL とし標準原液とした。混合標準液は $1\mu\text{g/mL}$ の濃度でアセトニトリルで用時調製した。

限外ろ過膜: Millipore 社製 amicon ULTRAFREE-MC3,000, 5,000, 10,000, 30,000 を用いた。

4. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ: Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを用い, カラムは Waters 社製 AtlantisTM d-C18 (3 μm , 2.1 \times 150 mm) を使用した。また, カラム温度は 40°C で行った。移動相は A 液に 10 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.05% ギ酸水溶液, B 液にアセトニトリルを用い, グラジェント溶出法を採用した (Table 2)。なお, サンプルの注入量は 10 μL とした。

質量分析装置: Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるボ



Scheme 1. Analytical procedure for pesticide residues in agricultural products

ジティブならびにネガティブモードで行い, イオンスプレー電圧は 5.5 kV, イオン源温度は 600°C に設定した。化合物ごとの条件は Table 1 に示した。

遠心分離機: トミー社製 LX-140, 日立工機(株) HIMAC CENTRIFUGE SCT15B を使用した。

振とう機: TITEC 社製 RECIPRO SHAKER SR-2W を使用した。

5. 試験溶液の調製および定量

フードプロセッサーを用いペースト状になるまで磨砕均一化した試料 5 g (粉碎玄米については 2.5 g に水 5 mL を加え常温下で 30 分間膨潤) を 50 mL ポリエチレン遠心管に採取し, メタノール 20 mL を加え, 30 分間振とう抽出した後, 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を 25 mL メスフラスコに移し, 水を加えて 25 mL に定容した液 1 mL を 10 mL メスフラスコに分取した。その後, 溶液のメタノール濃度を 50% に調整し, 抽出試料の 50 倍希釈液を作製した。得られた希釈液 0.4 mL を限外ろ過膜ユニット ULTRAFREE-MC 30,000 に分注し, 4,700 rpm の条件で 15 分間遠心分離したろ液を LC/MS/MS 試

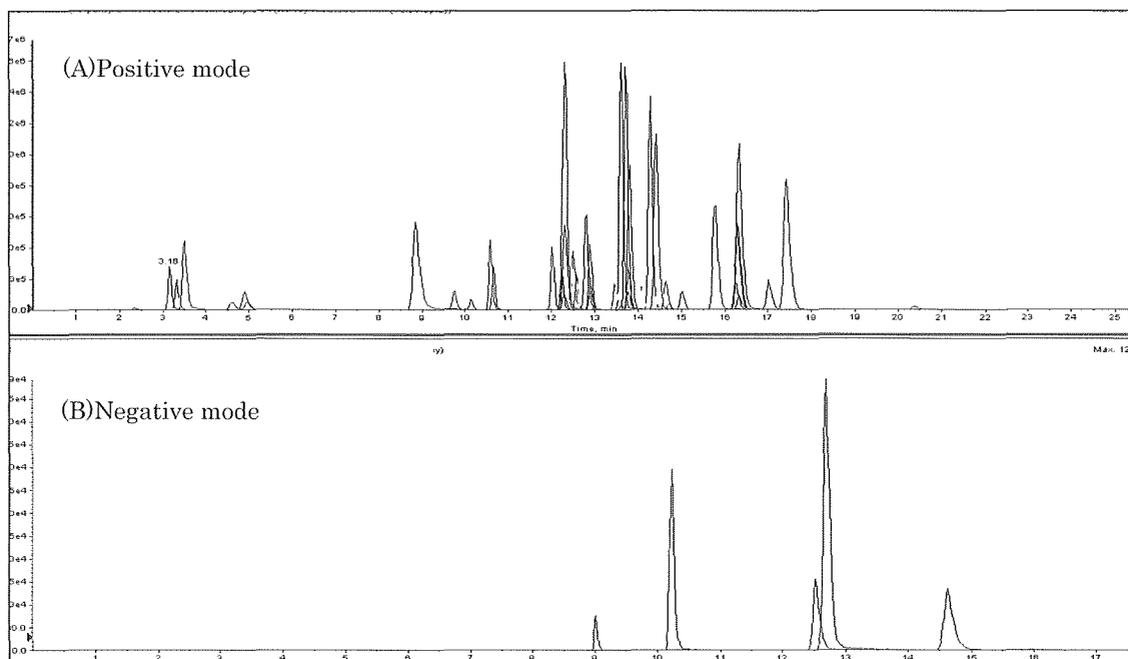


Fig. 1. LC/MS/MS chromatograms of standard mixture (10 ng/mL)
(A) Positive mode: 77 pesticides; (B): Negative mode: 6 pesticides

験溶液とした。なお、ダミノジッド、アセフェート、メタミドホスの3成分はメタノール濃度10%で調製し、同様に操作して試験溶液を作製した (Scheme 1)。

検量線は混合標準液を20%メタノール溶液で希釈した0.01~10 ng/mLの標準溶液を用い、MRM (Multiple Reaction Monitoring) クロマトグラムよりピーク面積を求める絶対検量線法により作成した。なお、ベノミルはカルベンダジムの検量線からカルベンダジムとして定量したのち、係数1.52を乗じてベノミルに換算した。

結果および考察

1. MS 条件

標準溶液を用いてQ1 スキャンを行い、観測される $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ などをプレカーサーイオンとしてFIA (Flow Injection Analysis) によって、MS/MSのパラメーターを最適化し、MRMの測定条件を作成した。各成分のMS/MS条件はTable 1に示した。

2. LC 条件

農薬分析で用いることの多いODS系カラム (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, Cadenza CD-C₁₈, AtlantisTM d-C₁₈) について、ピーク形状、感度を中心に検討した結果、混合標準溶液のマスキロマトグラム (Fig. 1) に示したように、AtlantisTM d-C₁₈ がピーク形状、高極性農薬のカラム保持性能に優れており、ポジティブモードで77成分、ネガティブモードで6成分の一斉分析が可能であった。

また、各農薬の検出下限は0.0005~0.05 μg/gであり、基準値レベルの分析に対して十分な検出感度を有していた。検量線の相関係数は、ダミノジッド (0.971) 以外で0.998~1.000と良好な値を示した。

Table 3. Comparison of Analytical Results Obtained Using Shaking and Homogenization

Pesticides	Sample	Residues (μg/g)			
		Shake		Homogenize	
		Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Propamocarb	Paprika	0.03	6.3	0.03	3
Imidacloprid	Paprika	0.09	8.8	0.08	2.4
Acetamiprid	Paprika	0.06	5.4	0.06	5
Imidacloprid	Snap-bean	0.01	8.9	0.01	21.9
Thiophanate methyl	Snap-bean	0.03	11.1	0.03	10.2
Carbendazim	Snap-bean	0.03	7.9	0.03	8.5

n=5

3. 前処理法の検討

3.1 抽出条件

本実験では比較的極性の高い農薬を対象としたことから、抽出溶媒をメタノールとした。また、抽出方法について振とう抽出 (30分間振とう)、ホモジナイズ抽出 (ホモジナイズ2分) の違いを、農薬が残留していた実サンプル (パプリカ、スナップエンドウ) を用いて検討した結果、いずれも残留農薬の測定値に差は認められなかったため、振とう抽出法を採用した (Table 3)。

3.2 精製方法

限外ろ過 (UF: Ultrafiltration) を用いる方法は、0.005~0.1ミクロンの微粒子は透過させずに、水、イオン分子、低分子量物質を透過させる性質を利用して分離する技術で、いろいろな分野で利用されている。そこで、本研究では、試料のメタノール抽出液に水を加えて希釈した際、

Table 4. Recoveries of 83 Pesticides According to Methanol Concentration (Matrix None)

No.	Pesticides	R.T. (min)	Recovery (%)*							
			10% methanol		20% methanol		30% methanol		50% methanol	
			Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
[Positive mode]										
1	Daminozide	2.5	40.3	11.0	96.9	15.7	71.0	5.0	79.8	4.1
2	Methamidophos	3.2	69.1	2.1	76.1	5.8	62.0	4.4	63.3	5.5
3	Acephate	3.3	71.9	5.2	95.5	7.7	80.0	3.5	74.0	4.6
4	Omethoate	3.5	100.3	1.7	93.1	5.0	80.9	3.1	85.7	3.1
5	Aldicarb sulfoxide	3.8	86.6	2.9	81.3	1.7	75.5	5.6	83.5	8.9
6	Propamocarb	4.1	105.7	1.0	113.6	0.9	79.7	10.7	87.9	9.8
7	Pymetrozin	4.2	87.0	0.5	82.9	4.2	83.2	4.3	87.0	0.5
8	Nitenpyram	5.7	101.7	2.3	89.2	10.0	77.7	6.3	85.8	2.4
9	Oxamyl	6.0	70.7	1.3	99.3	8.7	72.9	5.9	75.9	2.4
10	Aldicarb sulfone	6.0	68.0	2.8	93.7	2.4	75.9	4.3	80.4	4.9
11	Methomyl	7.6	98.5	1.7	101.4	7.5	79.1	2.2	79.6	1.5
12	Ethiofencarb sulfoxide	9.9	99.9	6.1	89.1	9.9	96.5	2.0	96.9	3.4
13	Carbendazim	10.6	76.3	4.3	95.9	5.1	83.1	4.8	90.7	2.4
14	Vamidothion	10.7	103.2	2.0	94.5	8.3	81.3	2.6	82.2	2.3
15	Ethiofencarb sulfone	11.0	73.8	3.8	92.3	3.8	73.5	1.8	78.6	3.6
16	Imidacloprid	11.2	100.3	4.2	95.5	3.4	88.9	7.5	89.5	4.0
17	Acetamiprid	11.5	102.6	2.6	83.2	18.2	77.6	6.3	86.2	1.5
18	Tricyclazole	11.5	95.4	3.1	78.9	11.5	86.8	0.8	89.9	2.0
19	Metsulfuron methyl	12.2	121.5	2.0	95.1	11.2	76.1	8.1	82.1	7.3
20	Chlorsulfuron	12.3	119.7	2.2	130.8	6.3	81.0	3.2	83.8	2.9
21	Diflufenuron	12.6	111.2	3.8	117.5	5.8	72.3	9.3	71.1	8.4
22	Thiophanate methyl	12.6	115.5	2.9	100.9	5.4	86.0	6.2	82.1	11.3
23	Thiodicarb	12.7	93.9	4.2	106.5	5.3	77.7	3.4	84.3	2.6
24	Azimsulfuron	12.7	111.4	1.2	90.2	5.0	77.4	3.8	76.7	6.2
25	Bendiocarb	12.9	73.2	2.1	104.9	9.2	73.9	2.7	81.5	3.8
26	Methabenzthiazuron	12.9	98.8	0.4	93.9	3.4	83.8	1.3	87.0	1.6
27	Carbofuran	13.0	111.7	2.2	103.9	3.2	73.2	4.5	76.7	1.7
28	Triflumizole metabolite	13.0	96.7	0.7	92.5	0.5	83.7	4.8	87.5	5.7
29	Halosulfuron methyl	13.1	118.1	2.7	130.5	1.2	83.1	4.3	89.3	5.6
30	Fosthiazate	13.2	95.0	1.4	110.7	5.2	83.2	3.9	86.8	5.0
31	Carbaryl	13.2	71.1	2.1	68.5	5.3	53.3	24.1	76.0	4.0
32	XMC	13.3	72.8	1.0	104.7	4.9	77.3	1.0	81.9	1.8
33	Imazosulfuron	13.3	110.6	2.5	119.9	2.9	77.7	5.4	79.9	2.8
34	Probenazole	13.3	69.3	16.1	105.9	4.2	82.0	10.0	76.0	9.0
35	Metalaxyl	13.3	95.4	1.4	103.9	8.3	82.7	3.6	84.3	2.3
36	Ethiofencarb	13.4	88.6	2.5	104.3	14.5	87.0	3.2	76.1	10.1
37	Atrazine	13.4	80.7	0.4	93.9	6.2	78.9	2.2	84.8	0.5
38	Felimzone	13.5	80.8	7.8	116.9	4.6	71.0	9.4	76.5	1.2
39	Bensulfuron methyl	13.5	105.9	3.2	98.0	9.1	77.7	3.9	82.8	4.8
40	Isoprocarb	13.5	80.5	2.5	90.6	7.9	72.9	5.2	79.1	2.8
41	Imazalil	13.6	74.1	9.4	81.8	13.5	63.5	15.5	87.6	9.0
42	Inabenfide	13.6	75.1	3.7	84.0	12.2	72.7	12.2	84.3	12.8
43	Methiocarb	14.1	68.3	3.5	96.9	7.7	77.8	2.2	81.4	1.0
44	Fenobucarb	14.2	75.0	3.9	97.3	4.5	74.4	3.8	83.6	1.7
45	Linuron	14.3	66.1	3.3	73.5	7.2	64.1	9.4	79.6	6.5
46	Azoxystrobin	14.3	79.7	3.1	100.9	1.8	85.4	2.8	91.6	1.5
47	Dymuron	14.4	93.3	2.4	102.3	5.9	77.3	2.0	82.3	1.9
48	Fenhexamid	14.5	66.0	4.2	105.9	3.3	80.4	1.7	69.9	32.9
49	Triadimefon	14.5	72.1	1.3	105.5	1.4	77.0	5.9	75.9	23.8
50	Cyclosulfamuron	14.5	76.9	4.4	91.1	1.4	82.9	2.1	88.8	3.5
51	Molinate	14.9	74.4	5.6	86.1	3.2	74.9	3.8	80.9	1.8
52	Isoprothiolane	15.1	80.5	3.0	100.6	5.2	77.1	1.3	82.9	1.8
53	Benomyl	15.1	67.9	15.7	76.9	10.0	64.5	10.2	84.1	4.7
54	Tebufozide	15.2	80.0	3.1	106.7	8.7	72.9	2.7	80.7	8.3
55	Metolachlor	15.2	83.8	2.0	97.3	3.4	76.7	5.6	83.9	0.8
56	Prochloraz	15.4	53.8	3.0	96.9	11.6	79.3	4.8	88.0	2.8
57	Indanofan	15.4	57.9	4.0	90.3	1.5	69.1	1.9	76.7	5.4
58	Cyprodinil	15.5	55.5	3.7	70.9	3.2	75.9	2.5	83.2	1.0
59	Ethoxyquin	15.6	69.3	2.7	76.1	4.7	82.0	2.0	76.0	4.0
60	Spinosyn A	15.7	2.5	36.9	3.7	86.6	60.0	9.0	116.0	4.0
61	Etobenzanid	16.0	30.1	6.3	78.9	1.5	73.1	3.6	91.5	2.3
62	Triflumizole	16.1	34.8	4.5	82.4	1.3	67.5	3.0	81.9	2.9
63	Pencycuron	16.2	58.3	3.9	93.7	5.6	80.2	1.9	88.3	3.2
64	Phoxim	16.1	20.9	14.5	75.5	9.4	67.0	4.0	75.0	3.0
65	Benthiocarb	16.4	21.2	1.6	55.3	3.4	60.5	2.8	77.3	2.1
66	Imibenconazole	16.7	4.0	15.3	47.5	11.9	54.9	6.8	81.5	5.0
67	Quinalofop-ethyl	16.9	19.0	7.3	65.3	5.1	68.3	2.8	82.1	1.9
68	Spinosyn D	16.9	1.7	27.9	1.9	173.2	51.0	4.0	125.0	3.0
69	Chethodim	17.2	84.9	9.2	88.2	9.6	85.7	11.1	80.2	14.5

Table 4. Continued

No.	Pesticides	R.T. (min)	Recovery (%)*							
			10% methanol		20% methanol		30% methanol		50% methanol	
			Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
69	Chethodim	17.2	84.9	9.2	88.2	9.6	85.7	11.1	80.2	14.5
70	Benfuracarb	17.5	2.7	31.9	96.2	9.8	66.3	12.7	82.5	14.1
71	Pyrimidifen	17.5	20.2	6.8	76.1	2.0	73.1	5.0	86.7	1.1
72	Furathiocarb	17.6	21.1	8.5	80.7	9.6	70.5	1.8	86.0	2.6
73	Oxaziclomefone	17.6	31.1	4.4	77.7	6.6	67.7	2.5	81.1	1.4
74	Flufenoxuron	17.7	0.0	—	6.5	3.9	16.2	45.5	86.5	5.9
75	Hexythiazox	18.4	4.2	7.7	37.9	5.8	53.5	6.4	78.1	6.0
76	Fenpyroximate	19.0	0.4	7.9	20.0	11.4	40.9	9.5	90.7	4.4
77	Ethofenprox	22.2	0.0	—	0.0	—	2.6	44.0	60.6	12.7
[Negative mode]										
1	Bentazone	9.3	110.3	5.1	115.5	10.9	93.5	7.3	97.9	9.2
2	Flazasulfuron	10.6	96.0	1.7	98.5	6.5	91.3	3.8	90.5	5.5
3	Iprodione	12.0	104.0	13.7	130.0	12.4	91.0	12.0	116.0	7.0
4	Iprodione metabolite	13.2	64.6	4.5	81.8	10.9	79.1	1.6	90.0	3.1
5	Teflubenzron	13.4	30.9	3.7	89.9	3.1	73.6	2.9	89.9	2.0
6	Lufenuron	14.3	1.4	9.3	1.4	10.0	30.0	4.0	89.8	6.4

* Sample was spiked with 0.25 µg/g of each pesticide.

n=3

Table 5. Recoveries of 3 Pesticides According to Methanol Concentration (Matrix Tomato)

Pesticides	R.T. (min)	Recovery (%)*												
		10% methanol		30% methanol		35% methanol		40% methanol		45% methanol		50% methanol		
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
1	Daminozide	2.5	42.1	7.9	35.3	4.3	35.7	18.6	31.4	5.2	32.0	10.7	28.2	14.2
2	Methamidophos	3.2	59.7	4.9	48.8	10.2	47.1	12.3	49.3	8.5	43.9	11.2	42.2	11.6
3	Acephate	3.3	84.7	11.0	72.9	5.9	64.6	3.5	59.4	4.7	56.4	4.6	58.3	4.4

* Sample was spiked with 0.25 µg/g of each pesticide.

n=3

疎水性の高分子化合物がコロイド状の沈殿物として生成されることに注目し、限外ろ過膜による精製の可能性を検討した。限外ろ過膜ユニット ULTRAFREE-MC3,000～30,000 を用い、精製実験を行った結果、MC-30,000 による 4,700 rpm, 15 分間の遠心で沈殿物および色素の除去が可能であった。

次に、限外ろ過における農薬の挙動を把握するため、水を用いてメタノール濃度を段階的に変え、回収試験を行った。この場合、メタノール濃度が低いほうが疎水性のマトリックスの除去率が高いと考え、農薬の回収率が 50% 以上となる最低メタノール濃度を求めた。その結果、Table 4 に示したように、メタノール濃度 50% でろ過した場合、すべての農薬で回収率が 50% 以上となることが分かった。また、メタノール濃度が 10% の場合、フルフェノクスロン、フェンピロキシメート、エトフェンプロックスなどの 18 成分で回収率が低下したが、この原因は、限外ろ過膜への吸着⁹⁾が考えられた。

また、LC/MS/MS による測定では試料成分の影響によりイオン化の抑制や促進が起こり、検出感度が変化する場合があることから、メタノール濃度の違いによる試料成分

の影響を調べるため、トマトの抽出液を用い回収試験を行った。Table 5 の結果で示すように、極性の高いダミノジッド、メタミドホス、アセフェートは、メタノール濃度 10% の条件で回収率が高い傾向にあった。そこで、試料成分によるイオン化の抑制効果を確認するため、メタノール濃度を 10～50% に調製して得られた試験溶液それぞれに標準液を添加して回収率を求めた。その結果、特にメタミドホスでメタノール濃度による回収率の差が顕著で、メタノール濃度 50% ではイオン化抑制が 50% に上昇していた。したがって、これらの 3 成分については、メタノール濃度を 10% で、それ以外の成分については、50% で処理することで、おおむね回収率が 50～150% の範囲に入ることが分かった。

4. 添加回収試験

各試料（玄米、トマト、パプリカ、リンゴ、グレープフルーツ、ハウレン草）に対して 0.25 µg/g 相当の混合標準液を添加し、Scheme 1 に従って分析した結果を Table 6 に示した。なお、ベノミルは速やかにカルベンダジムに変化¹⁰⁾することから、ベノミルのみを添加して回収試験を行ったところ、LC/MS/MS の分析結果から微量のベノ

Table 6. Recoveries of 83 Pesticides Added to Agricultural Products

Pesticides	Recovery (%)*											
	Brown rice		Tomato		Paprika		Apple		Grape fruit		Spinach	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Daminozide**	19.4	9.0	20.1	9.7	24.5	11.6	33.8	13.7	13.2	3.7	6.3	72.5
Methamidophos**	70.2	3.9	66.0	2.0	37.8	8.7	54.7	9.8	41.7	2.4	54.6	6.3
Acephate**	86.7	11.6	87.3	4.1	60.6	7.6	72.8	4.2	63.3	6.8	83.3	4.1
Omethoate	87.8	6.0	90.8	2.0	75.8	3.0	73.8	5.0	75.4	3.0	77.1	3.0
Aldicarb sulfoxide	97.0	5.8	90.5	3.0	71.1	3.9	75.8	6.4	68.8	3.9	82.8	4.5
Propamocarb	110.3	3.0	91.5	2.2	69.7	1.2	79.5	1.3	70.3	3.1	74.9	9.7
Pymetrozin	82.9	3.3	75.3	0.4	91.0	4.0	108.3	2.8	46.9	3.0	71.0	0.9
Nitenpyram	89.5	2.0	97.8	9.2	82.8	5.0	93.7	2.4	75.5	6.9	75.6	1.0
Oxamyl	65.6	7.5	92.0	0.9	72.3	3.0	76.6	0.9	69.3	3.4	86.4	1.8
Aldicarb sulfone	80.7	9.0	86.7	1.1	74.0	3.8	73.2	5.1	65.9	5.8	78.6	1.5
Methomyl	90.2	2.5	88.8	1.6	81.0	2.7	79.4	0.2	78.6	1.6	101.7	6.0
Ethiofencarb sulfoxide	72.5	14.7	101.4	4.4	76.1	4.1	79.4	0.2	79.3	3.3	72.7	6.3
Carbendazim	79.6	1.6	83.5	4.9	75.8	2.3	60.1	3.0	63.6	1.3	73.0	2.7
Vamidothion	84.5	6.7	90.9	1.6	77.3	2.4	86.3	1.3	79.2	3.3	87.4	5.7
Ethiofencarb sulfone	81.3	6.3	82.8	1.1	60.8	2.9	74.6	2.5	57.4	5.8	70.2	2.9
Imidacloprid	82.3	5.1	81.1	2.8	91.3	4.9	98.4	5.6	44.5	3.4	74.2	4.0
Acetamiprid	84.0	6.4	90.1	1.1	57.2	1.3	85.3	0.8	53.3	3.0	78.6	4.6
Tricyclazole	76.9	6.0	87.8	2.6	51.0	3.2	79.8	2.9	44.0	4.7	70.3	0.6
Metsulfuron methyl	111.5	1.6	96.5	1.1	98.6	0.4	102.8	1.1	84.8	4.1	77.2	2.8
Chlorsulfuron	87.7	3.2	76.6	0.5	95.6	3.4	95.5	4.5	84.7	1.9	79.1	5.4
Diffubenzuron	81.2	6.8	99.9	1.5	88.6	1.8	92.2	2.9	84.7	1.7	78.7	2.2
Thiophanate methyl	87.8	1.2	94.3	1.2	90.5	2.2	101.9	1.0	86.3	2.8	77.5	0.9
Thiodicarb	101.3	1.9	95.5	0.9	67.6	2.3	86.9	1.7	60.8	4.2	54.0	5.7
Azimsulfuron	93.2	1.8	97.8	1.2	85.3	3.8	91.3	1.0	60.8	2.3	67.0	8.5
Bendiocarb	78.5	25.3	85.8	5.1	68.3	2.8	78.2	2.6	67.5	3.2	79.3	1.5
Methabenzthiazuron	110.2	1.7	98.9	0.8	74.4	1.4	95.9	3.9	93.3	1.2	87.3	1.9
Carbofuran	100.3	0.9	98.3	1.7	74.3	1.9	106.7	2.5	104.3	3.2	81.8	3.0
Triflumizole metabolite	106.9	15.4	99.1	2.7	82.8	0.9	80.8	2.1	85.3	4.1	81.3	1.5
Halosulfuron methyl	74.2	7.3	92.1	0.2	84.8	3.2	95.8	0.5	81.8	2.5	70.5	1.5
Posthiazate	92.3	4.4	92.3	1.0	76.0	1.5	81.4	6.9	79.2	5.1	85.0	1.3
XMC	89.6	4.8	86.4	2.2	69.1	2.9	78.5	5.6	66.8	1.6	84.2	3.2
Imazosulfuron	87.3	2.6	88.8	2.3	87.9	0.2	103.3	4.0	37.0	7.8	77.1	3.8
Probenazole	98.6	8.7	117.2	14.3	55.0	17.4	93.8	9.4	51.5	26.1	76.2	16.3
Metalaxyl	91.8	5.3	91.9	0.2	77.8	2.7	85.0	3.1	66.8	4.3	79.3	1.9
Ethiofencarb	74.8	23.1	89.3	2.8	65.9	2.5	86.4	2.8	63.4	1.6	75.3	3.9
Atrazine	78.8	2.0	82.9	2.5	71.6	2.5	76.5	4.0	47.4	3.9	78.3	2.8
Felimzone	107.8	8.2	94.8	2.0	82.4	2.8	83.3	0.6	87.3	2.3	85.6	1.9
Bensulfuron methyl	94.8	5.4	98.7	0.4	86.3	2.5	86.1	19.2	89.0	2.6	88.7	4.0
Isoprocab	87.5	2.7	89.8	1.9	73.6	3.2	84.3	3.9	70.0	3.3	85.0	2.4
Imazalil	103.1	5.9	91.4	1.2	78.1	6.4	86.3	1.8	Not examined		80.8	4.6
Inabenfide	68.2	14.0	79.2	6.7	69.3	4.7	65.7	0.8	41.8	10.0	71.6	6.4
Methiocarb	88.3	5.7	89.7	3.1	67.3	2.9	77.2	6.3	64.8	3.1	79.4	1.6
Fenobucarb	93.4	4.6	93.5	1.9	72.3	2.8	75.8	7.3	72.0	3.5	79.7	4.9
Linuron	75.3	10.3	78.4	7.8	68.2	11.6	80.9	14.8	61.7	7.5	73.4	8.5
Azoxystrobin	82.5	6.7	89.6	1.1	77.4	1.0	81.9	2.1	71.1	2.3	81.3	0.4
Dymuron	88.2	1.6	99.1	2.3	83.8	1.2	85.9	0.4	79.5	2.2	84.3	1.6
Fenhexamid	77.8	8.5	85.6	3.9	66.2	3.6	78.4	2.3	67.9	6.5	74.3	4.6
Triadimefon	88.0	6.2	92.3	2.3	70.8	1.6	70.3	4.5	69.3	2.5	75.8	3.8
Cyclosulfamuron	83.2	2.0	92.5	1.6	81.4	0.5	105.0	0.4	84.8	6.7	83.5	1.5
Molinate	77.9	7.7	85.3	8.5	74.9	1.3	76.2	2.2	73.0	3.1	83.3	6.0
Isoprothiolane	86.5	13.0	97.2	1.9	80.2	1.1	82.5	2.6	81.0	3.7	88.4	2.2
Benomyl	79.6	5.9	71.3	17.1	34.3	11.5	89.2	9.1	34.4	0.4	60.8	11.3
Tebufenozide	54.8	21.6	101.4	0.6	78.5	3.5	83.1	2.7	80.3	5.3	87.3	3.6
Metolachlor	83.3	5.0	92.9	3.5	77.6	1.8	82.5	1.3	77.4	3.7	80.3	0.8
Prochloraz	82.3	16.0	95.5	2.4	80.2	4.5	83.7	0.6	75.1	5.1	81.9	0.2
Indanofan	79.0	6.7	88.8	6.1	62.4	9.3	73.9	8.9	54.3	4.0	72.8	4.6
Cyprodinil	78.8	4.0	91.3	3.6	73.4	4.5	82.2	2.6	74.3	1.9	69.4	3.8
Ethoxyquin	20.9	12.9	1.9	39.7	61.7	4.1	54.8	1.8	75.4	4.3	44.3	3.4
Carbaryl	64.4	14.7	89.8	0.7	67.2	3.2	75.4	0.8	72.6	6.5	84.8	3.4
Etobenzanid	72.5	3.4	89.8	5.3	62.3	4.7	83.3	2.1	66.2	6.3	74.0	6.3
Triflumizole	84.7	8.2	88.6	1.1	80.6	5.6	80.2	2.4	74.8	3.5	79.8	1.6
Pencycuron	84.7	8.2	88.3	3.0	81.2	3.7	85.8	3.7	82.4	4.3	79.9	1.6
Phoxim	84.2	10.0	84.8	4.9	63.9	5.0	77.3	4.0	71.4	5.2	77.8	2.9
Spinosyn A	143.6	2.8	105.1	5.7	117.8	8.0	130.3	3.9	196.4	15.5	139.3	6.6
Benthiocarb	77.1	3.4	82.7	2.9	60.7	6.0	71.4	5.0	69.1	6.9	73.1	3.3
Imibenconazole	59.7	4.2	81.1	1.2	62.2	9.7	58.2	0.7	67.8	9.7	59.4	10.2
Quinalofo-pethyl	59.8	2.8	81.8	1.9	63.1	3.7	72.9	1.7	67.4	6.4	63.1	8.4
Chethodim	74.4	6.6	100.4	7.3	70.8	12.3	67.4	5.0	70.2	18.4	79.4	10.2
Benfuracarb	57.2	24.7	71.6	4.4	82.1	6.8	28.8	6.0	11.7	1.7	88.9	4.0
Pyrimidifen	83.6	2.0	93.4	1.1	81.5	6.9	84.8	1.5	85.3	8.4	79.9	4.0

Table 6. Continued

Pesticides	Recovery (%)*											
	Brown rice		Tomato		Paprica		Apple		Grape fruit		Spinach	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Furathiocarb	78.8	3.4	91.8	0.5	76.0	7.1	82.3	1.0	81.0	10.4	74.2	1.1
Oxaziclomefone	82.6	6.1	92.9	1.2	80.3	8.7	83.0	0.0	84.4	6.2	79.8	1.3
Flufenoxuron	71.0	7.2	91.7	4.4	63.8	4.9	93.3	5.7	77.8	7.6	71.2	0.5
Spinosyn D	155.2	5.3	130.1	4.7	139.1	11.7	120.8	8.0	252.4	12.9	155.3	9.8
Hexythiazox	75.0	3.5	79.8	3.5	59.7	4.9	73.4	4.6	58.3	4.8	68.6	2.4
Fenpyroximate	70.8	3.1	89.7	0.2	70.6	5.2	82.7	0.8	80.2	10.8	70.1	1.8
Ethofenprox	45.3	12.0	64.5	8.7	28.1	10.7	46.9	13.4	53.5	6.8	28.4	4.3
Bentazone	110.3	14.8	110.5	2.3	151.0	0.9	104.8	4.3	153.4	0.5	103.4	4.0
Flazasulfuron	82.7	12.7	83.9	1.2	79.1	1.6	74.9	4.6	76.6	2.9	79.5	1.9
Iprodione	83.8	2.8	92.6	2.2	75.9	22.8	53.8	35.8	88.3	15.1	76.8	22.4
Iprodione metabolite	86.0	4.7	97.3	3.1	79.4	4.8	86.5	1.0	81.8	4.0	81.3	2.5
Teflubenzron	84.3	0.4	91.7	2.5	77.7	5.7	92.0	1.4	71.8	7.5	81.9	0.4
Lufenuron	93.3	2.4	113.3	1.8	95.3	2.3	102.9	3.3	103.5	3.2	83.3	0.8

* Sample was spiked with 0.25 µg/g of each pesticide.

** Daminozide, methamidophos and acephate were measured at 10% methanol concentration, other pesticides were measured at 50% methanol concentration.

Table 7. Pesticide Residues in Agricultural Products

Pesticides	Total detections	Range (ppm)	Sample
Acephate	1	0.97	Tomato
Acetamiprid	16	0.01-0.02	Apple
Azoxystrobin	1	0.01	Grape
Carbendazim	4	0.01-0.03	Tomato
Cyprodinil	6	0.01-0.03	Apple
Hexythiazox	1	0.08	Green pepper
Imidacloprid	1	0.01	Green pepper
Iprodione	6	0.04-0.10	Tomato, Apple, Grape
Iprodione metabolite	3	0.02	Apple
Spinosad	2	0.01	Tomato, Green pepper
Teflubenzuron	2	0.03-0.07	Apple
Thiophanate methyl	5	0.11-0.21	Tomato, Grape
Triflumizole	1	0.04	Tomato
Triflumizole metabolite	2	0.02-0.04	Grape

ミルの存在も確認された。しかし、ベノミルの残存量は微量であり、かつ検体の種類の相違においてもほとんど変わらないことから、カルベンダジムとして回収率を求めた。

ほとんどの農薬が全作物で良好な回収率を示したが、すべての作物で回収率が50%以下であったダミノジッドは、今回の処理条件では測定が困難と考えられた。

また、作物によっては回収率の低い成分があったことから、その原因を究明するため、次のような実験を行った。すなわち、限外ろ過膜や沈殿物への吸着については、標準液を添加した試験溶液をろ過前およびろ過後に測定して比較した。試料成分の影響によるイオン化抑制または促進については試験溶液に標準液を添加して測定する方法（スパイクシリッジ）で確認した。その結果、玄米では、エトフェンプロックスで限外ろ過膜あるいは沈殿物への吸着による回収率の低下が認められた。その他の成分では、メタミドホス、アセフェート、ヘキシチアゾクス、イミベンコナゾールおよびフルフェノクスロンで20~30%のイオン

化抑制が認められた。同様に、グレープフルーツではエトフェンプロックスで吸着による回収率の低下が認められたが、メタミドホス、アセフェート、トリシクラゾール、プロペナゾール、アトラジンおよびヘキシチアゾクスで40~50%のイオン化抑制が認められた。

以上の結果、絶対検量線法により得られた回収率が50~150%、変動係数20%以下であった農薬は、玄米で75、トマトで81、パプリカで77、リンゴで79、グレープフルーツで69、ほうれん草で78成分であった。

5. 実態調査

本法を用いて、市販の野菜20検体および果実30検体について、残留実態調査を実施した結果をTable 7に示した。いずれも、残留農薬基準および登録農薬保留基準値以内であった。なお、検出した農薬は、プロダクトスキャンによるスペクトルあるいはイオン化条件を変えての他のフラグメントイオンにより確認を行った。なお事例として、トマトからアセフェート、ブドウからチオファネート

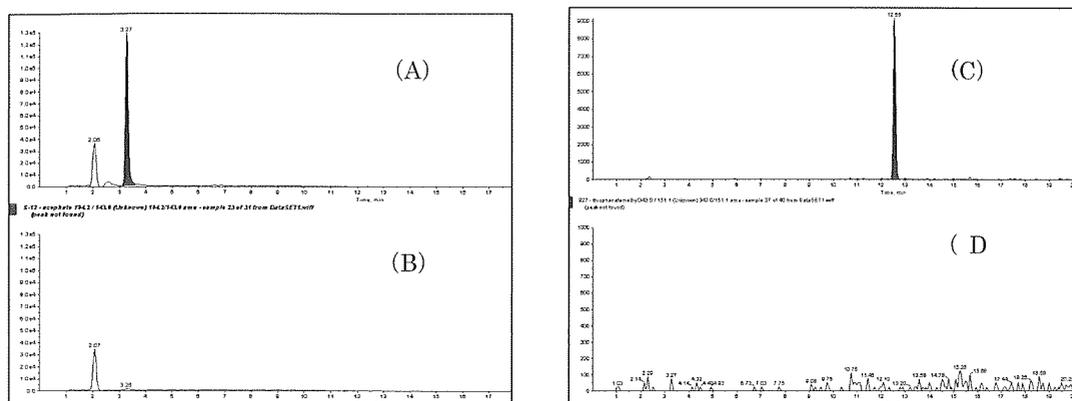


Fig. 2. LC/MS/MS chromatograms of acephate and thiophanate-methyl in samples

- (A): Tomato sample containing 0.97 $\mu\text{g/g}$ of acephate
 (B): Blank tomato sample
 (C): Grape sample containing 0.01 $\mu\text{g/g}$ of thiophanate-methyl
 (D): Blank grape sample

メチルが検出されたクロマトグラムおよび検出されていないクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。いずれも妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。

まとめ

高感度・高選択性を有する LC/MS/MS を用い、農作物中の残留農薬一斉分析について検討した結果、限外ろ過膜を用いた精製法により、濃縮操作を省略した迅速かつ簡易な分析方法を確立することができた。すなわち、本法で分析したすべての作物において回収率が 50~150%、変動係数 20% 以下であった農薬は、83 成分中 63 成分であった。またトマトで 81 成分、グレープフルーツで 69 成分と作物による回収率の差は多少認められたが、簡易な方法でマトリックスの影響を軽減できたことから、本法が農産物中の残留農薬スクリーニング分析として有用であると考えられる。

謝辞

本論文の作成にあたり、貴重なご意見をいただいた金城学院大学薬学部の岡尚男教授に深謝いたします。

文献

- 1) Akiyama, Y., Yano, M., Mitsuhashi, T., Takeda, N., Tsuji, M., Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 351-362 (1996).
- 2) Yamaguchi, S., Eto, S., Eguchi, Y., Kido, K., Hisamatsu, Y., Nakazawa, H., Screening analysis for multiple pesticide residues in agricultural products with GC/MS-

SCAN method. *Bunseki Kagaku*, **46**, 905-914 (1997).

- 3) Nemoto, S., Sasaki, K., Eto, S., Saito, I., Sasaki, H., Takahashi, T., Tonogai, Y., Nagayama, T., Hori, S., Mae-kawa, Y., Toyoda, M., Multi-residue determination of 110 pesticides in agricultural products by GC/MS (SIM). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 233-241 (2000).
- 4) Okihashi, M., Kitagawa, Y., Akuthu, Obana, H., Hori, S., Determination of seventeen pesticide residues in agricultural products by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 389-393 (2002).
- 5) Higuchi, M., Hanada, Y., Ishikawa, S., Ueda, E., Takahashi, M., Simultaneous determination of *N*-methylcarbamate and urea pesticides in agricultural products by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 263-267 (2003).
- 6) Kakimoto, Y., Naetoko, Y., Iwasaki, Y., Nakamura, S., Tatsuguchi, H., Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by GC/MS (SCAN) and LC/MS (SIM). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 153-160 (2005).
- 7) Klein, J., Alder, L., Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *J. AOAC Int.*, **86**, 1,015-1,037 (2003).
- 8) Tanizawa, H., Shima, M., Ikehara, C., Kobata, M., Sato, M., Multi-residue method for screening of pesticides in crops by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 185-197 (2005).
- 9) 普及版高純度化技術“第2巻分離技術”，フジテクノシステム，2001，p. 605-656.
- 10) 上水試験方法，日本水道協会，2001，p. 418.