

LC/MSによるアセフェート、オメトエート、メタミドホス同時分析法

鈴木 恵子 坪井 弘 宮下 妙子 藤田 晃三

要 旨

検出事例の多いアセフェート、メタミドホス及びこれらと同じ個別検査法が通知されたオメトエートについて、野菜、果実、大豆ではGC/MS一斉分析法で抽出したアセトニトリル溶液を用いて、茶では熱水抽出液を用いて、LC/MSで分析可能かどうか検討した。短時間で分析可能であったが、回収率は40.1～78.4%であった。

1. 緒 言

平成18年5月に食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制が導入され、ほぼすべての農薬に基準が設定された¹⁾。厚労省で通知された一斉試験法²⁾を用いて一度に多くの農薬が分析可能となったが、検出事例が多いにもかかわらずアセフェート、メタミドホスのように適用が困難である農薬も多い。

そこで、アセフェート、メタミドホス及びこれら2種類の農薬と同じ個別検査法³⁾が通知されたオメトエートについて、野菜、果実、大豆ではGC/MS一斉分析法で抽出したアセトニトリル溶液を用いて、茶では個別検査法に従って熱水抽出液を用いて、精製条件等を検討し、LC/MSで分析可能かどうか検討したので報告する。

2. 方 法

2-1 試 薬

メタノール：残留農薬試験用試薬

アセトニトリル：残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用試薬

水：Milli-Q SP TOC(ミリポア社製)で精製した。

Mega Bond Elut ODS 1g6ml (ODS(1g)): Varian社製

Sep-Pak Plus AC-2 (AC-2)、Sep-Pak Vac ODS 2g 12ml (ODS(2g)): Waters社製

混合標準原液：和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)社製の農薬分析用標準品をそれぞれ10mg精秤し、水で正確に10mlにした。それらを200μlずつ採取、混合して水で正確に10mlにしたものを混合標準原液(20μg/ml)とした。

混合標準溶液：混合標準原液を水で適宜希釈した。

2-2 試 料

市内を流通する農産品9種類(オレンジ、りんご、いちご、ぶどう、きゅうり、キャベツ、ほうれんそう、茶、大豆)を用いた。

2-3 装 置

高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)：Agilent1100シリーズ LC/MSD SLシステム(Agilent technologies社製)

吸引マニホールド：J&W Scientific社製

2-4 方 法

(1) 試験溶液の調製

野菜、果実、大豆

野菜、果実:25g 大豆:10g+水20ml(15分放置)

↓アセトニトリル50ml+20ml

定容(アセトニトリル100ml)

↓10ml分取

ODSミニカラム(2g:ほうれんそう 1g:その他)

↓1g:アセトニトリル2ml×2回溶出

↓2g:アセトニトリル2ml×2回+6ml溶出

アセトニトリル留去

↓ 水で5ml

Sep-Pak Plus AC-2

↓ 水2mlで2回洗い込む

↓ 水10mlで洗浄

バックフラッシュ溶出 (メタノール8ml)

↓ N₂気流下メタノール留去

↓ 水で1ml

試験溶液

茶

茶10g + 水 (100度) 600ml

↓ 5分放置

ろ過 (ガーゼ)

↓ 放冷

ろ過 (減圧ろ過 5A)

↓ 6ml分取

Sep-Pak Plus AC-2

↓ 水2mlで2回洗い込む

↓ 水10ml洗浄

バックフラッシュ溶出 (メタノール8ml)

↓ N₂気流下メタノール留去

↓ 水で1ml

試験溶液

(2) LC/MS分析条件

カラム : Inertsil ODS-3 (2.1mm i.d. × 150mm)

カラム温度 : 40 流速 : 0.2ml/min

移動相 : アセトニトリル:水 (5 : 95) (15min) -
1min - アセトニトリル:水 (95 : 5) (3min)

注入量 : 3μl

イオン化モード : API-ES(positive)

フラグメンター電圧 : 100V

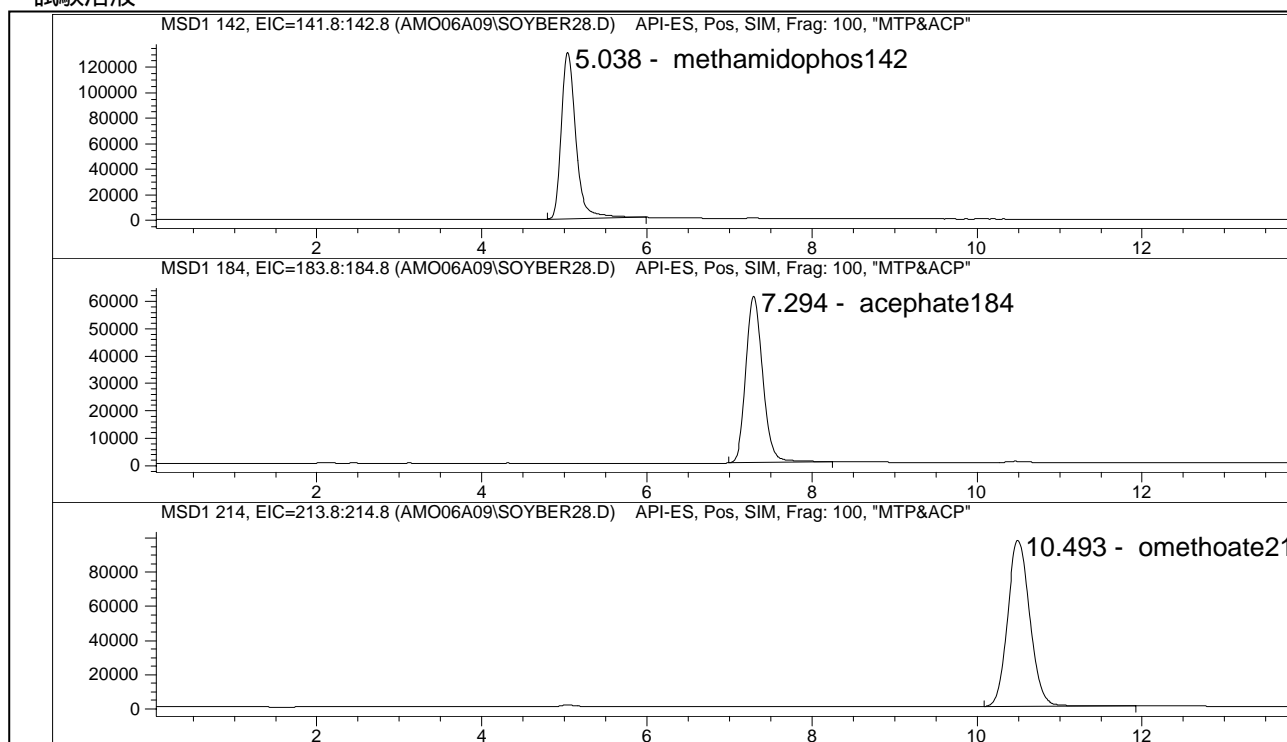
(3) 定 量

試験溶液及び標準溶液のピーク面積から、算出した。

3. 結果及び考察

3-1 LC/MS分析条件の検討

LC条件は上水試験法2001年版を準用⁴⁾した。アセフェート、オメトエート、メタミドホスはいずれもイオン化モードはポジティブで測定できた。フラグメンター電圧50~200Vの間でTICを測定し、最も感度のよい100Vに設定した。この条件でそれぞれの[M+H]⁺が感度よく得られたので、これを用いてSIMで同時に定量することが可能であった。図1に混合標準溶液(0.1μg/ml)のSIMクロマトグラムを示す。いずれも0.002~0.2μg/mlで良好な直線性を示した。



定量下限値は、標準溶液のピークの高さとノイズ幅を測定し、S/N比が10相当となる標準溶液濃度から算出したところ、表1のとおり個別検査法³⁾の定量下限を下回る値が得られたので、通知法と同等以上の感度を有する分析法と考える。

表 1 定量下限値

	Determination limit (μg/g)		
	acephate	omethoate	methamidophos
Vegetables & Fruits	0.0002	0.00008	0.00008
Soybean	0.0005	0.0002	0.0002
Green tea	0.005	0.002	0.002

3-2 ミニカラム精製条件の検討

(1) ODS溶出条件

野菜、果実、大豆はアセトニトリルで抽出するが、AC-2で精製する前にアセトニトリルを留去し、水溶液にする必要がある。そこで、水に不溶な成分を除去するため、アセトニトリルを留去する前にODS(1g)を通過させることにした。ほうれんそう等アセトニトリル抽出液に色素が多量に含まれる作物では、ODS(1g)では除去しきれないことが予想されたため、ODS(2g)についても溶出条件を検討した。

検討にはアセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ1μgとなるよう混合標準原液を添加した水20mlをアセトニトリルで100mlとした溶液(標準添加溶液)を用いた。あらかじめアセトニトリル10mlで洗浄したODS(1g)と20mlで洗浄したODS(2g)に標準添加

溶液10mlを負荷後、アセトニトリル2mlでカラムを2回洗浄し、さらにアセトニトリルで溶出した。負荷時の溶出液、洗浄時の溶出液及びアセトニトリルでの溶出液を2mlずつをそれぞれ分取し、窒素気流下でアセトニトリルを留去後、水で1mlにしてLC/MSで測定し、溶出状況の確認及び溶出が認められた画分のピーク面積の総和から回収率を求めた。図2-1~2に結果を示す。

ODS(1g)ではアセトニトリル2mlで2回洗浄する際にほぼ溶出された。ODS(2g)では4mlまでの画分でほぼ溶出されたが、4-6mlの画分で検出下限をやや下回るメタミドホスのピークが認められたため、洗浄後アセトニトリルを6ml流すこととした。

(2) AC-2溶出条件

上水試験方法 2001年版に準じて⁴⁾、メタノールでバックフラッシュ溶出の条件検討を行った。10ml遠沈管に水5mlをとり、それぞれ0.1μg相当となるよう混合標準原液を添加したものを用いた。

アセトン10mlと水10mlで洗浄したAC-2に負荷し、水2mlで遠沈管を2回洗いこれも負荷する。水10mlでAC-2を洗浄後、メタノールでバックフラッシュ溶出し、2mlごとに分取した。窒素気流下でメタノールを留去後、水で1mlにしてLC/MSで測定し、溶出状況の確認及び溶出が認められた画分のピーク面積の総和から、この条件での回収率を求めた。結果を図3に示す。

この結果より、メタノール8mlでバックフラッシュ溶出を行うこととした。

	Loading	Washing	Eluate (acetonitorile)				Recovery (%)
			-2ml	2-4ml	4-6ml	6-8ml	
methamidophos							92.8
acephate							89.1
omethoate							111

図2-1 ODS(1g)溶出状況

	Loading	Washing	Eluate (acetonitorile)				Recovery (%)
			-2ml	2-4ml	4-6ml	6-8ml	
methamidophos							92.9
acephate							82.1
omethoate							105

■ : Elution fraction

図2-2 ODS(2g)溶出状況

	Eluate (methanol)					Recovery (%)
	-2ml	2-4ml	4-6ml	6-8ml	8-10ml	
methamidophos						114
acephate						93.9
omethoate						101

: Elution fraction

図3 AC-2バックフラッシュ溶出状況

標準添加溶液10mlを用いてODS通過後、アセトニトリルを完全に留去し、水で5mlとしたものをAC-2で精製を行い回収されるかどうか確認した。結果を表2に示す。良好な回収率が得られ、この条件で精製することが可能と考えられる。

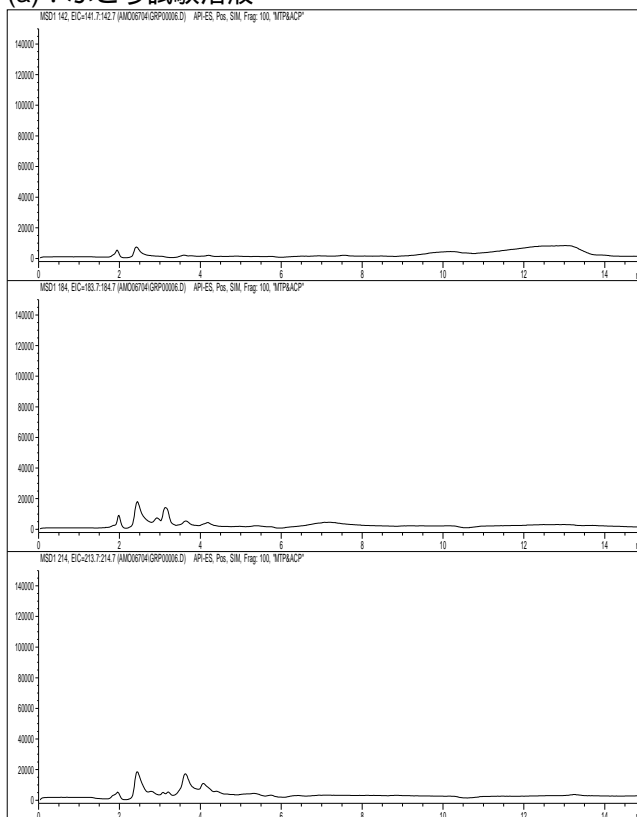
表2 ODSとAC-2を用いた精製による回収率

	Recovery (%)	
	ODS(1g)+AC-2	ODS(2g)+AC-2
methamidophos	96.3	88.0
acephate	88.3	76.8
omethoate	102	89.6

3-3 添加回収試験

添加回収試験は、ブランク及び添加していない試料と同時にを行った。添加回収試験は野菜、果実は試料採取後、大豆は試料採取後に水を添加して 15 分放置後に混合標準原液を 1 µg 相当、茶は抽出液 6ml に 0.1 µg 相当添加して 30 分放置後、試験検査に供した。図 4-1~2 にぶどうと大豆の SIM クロマトグラムを示す。ほとんどの試料で妨害となるようなピークは検出されなかったが、大豆でメタミドホスの保持時間近くに大豆由来と思われるピークが見られた。

(a) : ぶどう試験溶液



(b) : 1 µg 相当添加ぶどう試験溶液

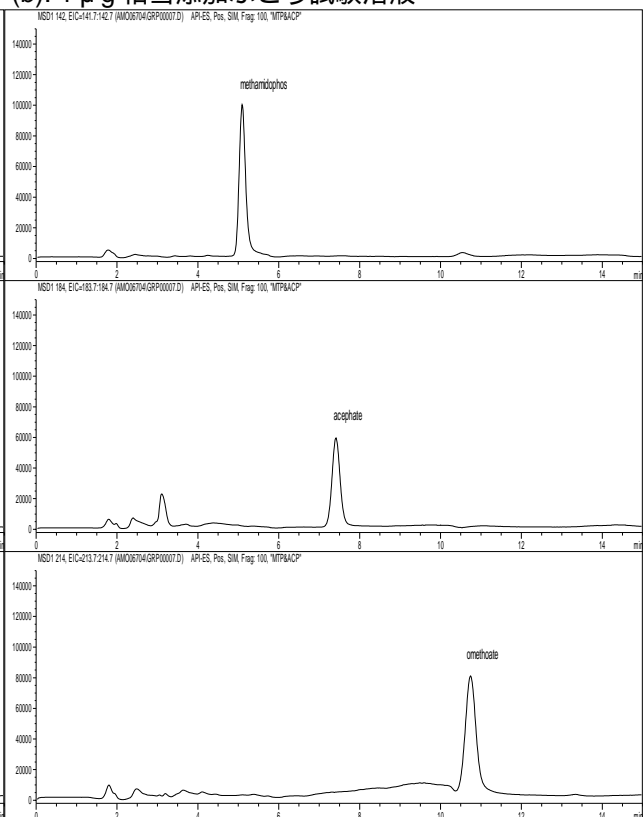


図 4-1 添加回収試験 (ぶどう) SIM クロマトグラム

(a) : 大豆試験溶液

(b) : 1 µg 相当添加大豆試験溶液

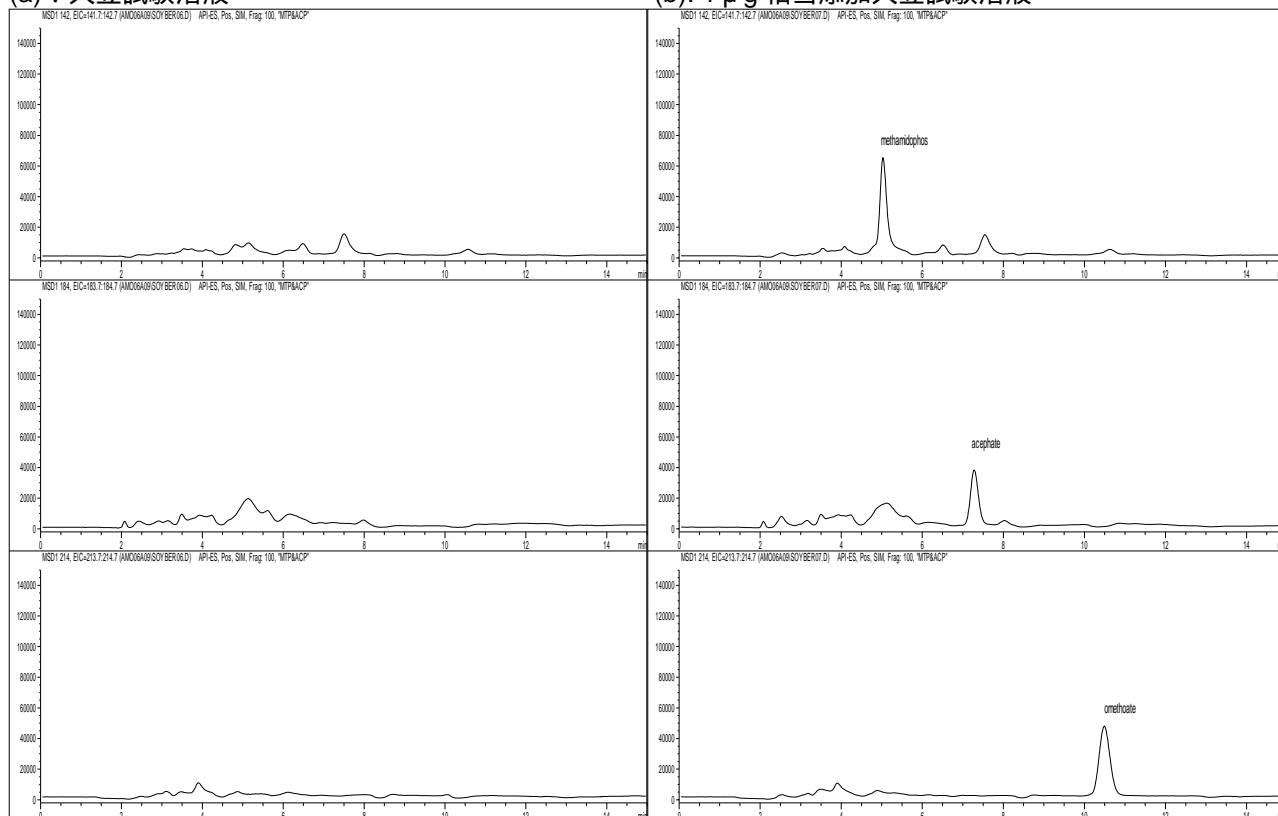


図 4-2 添加回収試験（大豆）SIM クロマトグラム

表 3 に添加回収試験結果を示す。

回収率はメタミドホスでキャベツと茶が 50% を下回った。それ以外は 50～70% の回収率が得られた。

短時間で分析可能であるが、回収率が若干低かった。回収率が低い原因としては、作物由来の成分での分解または試料液中では AC-2 での保持または溶出条件が変動した可能性があると考えられた。

表3 添加回収試験結果

	Recovery (%, mean ± SD , n=3)		
	acephate	omethoate	methamidophos
Orange	60.4 ± 10.2	62.1 ± 12.0	53.2 ± 5.6
Apple	80.6 ± 7.5	84.5 ± 8.2	67.6 ± 8.4
Strawberry	71.1 ± 11.5	60.5 ± 2.6	58.1 ± 3.3
Grape	74.2 ± 5.6	78.4 ± 13.1	68.7 ± 6.2
Cucumber	75.1 ± 6.0	68.1 ± 6.4	71.3 ± 11.0
Cabbage	73.8 ± 3.7	66.6 ± 2.7	44.3 ± 0.9
Spinach	56.2 ± 6.6	51.2 ± 2.4	54.7 ± 3.5
Green tea	50.8 ± 3.2	56.4 ± 6.9	40.1 ± 5.3
Soybean	59.0 ± 11.2	51.7 ± 2.9	53.4 ± 8.9

4. 結 語

アセフェート、メタミドホスは検出事例が多いにもかかわらず、一斉試験法²⁾の適用が難しい農薬である。今回、同じ個別試験法³⁾であるオメトエートとともに、野菜、果実、大豆については GC/MS 一斉分析法によるアセトニトリル抽出溶液の一部をとり、ODS と AC-2 で精製し、茶については熱水抽出液を直接 AC-2 で精製して、LC/MS で分析する方法を検討した。

回収率が若干低かったが、短時間で分析可能であることから、使用実態の調査などモニタリングの分析法としては有用な手段であると考ええる。

今後は個別検査法³⁾での回収率と比較検討し、精製条件等の改良を図りたい。

5. 文 献

- 1) 厚生労働省告示第497, 498及び499号（平成17年11月29日）
- 2) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知：食品

に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の検査法について
(食安発第0124001号 平成17年1月24日)
3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の

成分である物質の検査法について(一部改正)
(食安発第0315001号 平成18年3月15日)
4) (社)日本水道協会編：上水試験方法2001年版，423 - 424，2001

Simultaneous Determination of Acephate, Omethoate and Methamidophos by LC/MS in Agricultural Products

Keiko Suzuki, Hiroshi Tsuboi, Taeko Miyashita and Kozo Fujita

Acephate, omethoate and methamidophos are organophosphorus pesticides. Acephate and methamidophos are often detected in agricultural products, but it is difficult to apply the multiresidue method to determine all of them.

We studied an analytical method by LC/MS using acetonitrile extracts by the multiresidue method for the samples except green tea or boiling water extract for green tea by the individual-residue method. We used ODS cartridge-column and Sep-Pak plus AC-2 to clean up acetonitrile extracts and Sep-Pak plus AC-2 to clean up boiling water extract.

In this method, recoveries of each pesticide from nine agricultural products ranged between 40.1 and 78.4%.