

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 (第3報)

鈴木 恵子 矢野 公一

要 旨

食品中のアセフェート、オメトエート及びメタミドホスの一斉試験法による同時分析を目的として、ODSミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムを用いた精製条件を検討した。

その結果、キャベツ、いちご、大豆による添加回収試験を行ったところ、回収率が67.4～88.3%であり、第一報と比較して大幅に向上したことから、検査の省力化に有用な同時分析法となりうることが示された。

1. 緒 言

2006年5月に施行となった食品中の残留農薬等に関するポジティブリスト制の導入により、ほぼすべての農薬に基準が設定された¹⁾。2005年1月に厚生労働省通知で示された一斉試験法²⁾により、一度に多数の農薬を分析することが可能となったが、依然として一斉試験法の適用が困難な農薬も少なくない。

これらのうち、検出事例は多いものの、2006年3月に厚生労働省通知で示された個別検査法³⁾でのみ分析が可能なアセフェート、メタミドホス及びオメトエートについて、一斉試験法によるアセトニトリル抽出液を用いて、試料の前処理方法の改良による同時分析法の検討を行ってきた^{4,5)}。

今回、既報^{4,5)}の課題であった回収率の向上を図るため、ODSミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムによる精製条件を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LC/MS用試

薬

メタノールとアセトニトリルは、和光純薬工業(株)社または関東化学(株)社製を用いた。

水：Milli-Q SP TOC(ミリポア社製)で精製した。
Mega Bond Elut ODS 1g6ml (ODS)：Varian社製
Accell plus QMA 360mg(QMA)、Accell plus CM 360mg(CM)、Sep-Pak Plus AC-2 (AC-2)：Waters社製
1M塩化カリウム溶液：塩化カリウム(試薬特級)を7.5g秤取し、水で溶解後100mlにした。

混合標準原液：アセフェート(和光純薬工業(株)社製)、メタミドホス、オメトエート(Riedel-de Haen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

市内を流通するキャベツ、いちご、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)

2-4 方 法

(1) 試験溶液の調製

アセトニトリル抽出液（100ml定容まで）は、当所の一斉試験法⁶⁾により調製した。

アセトニトリル抽出液（100ml定容）

↓ 2mlを10ml遠沈管（遠沈管）に分取

アセトニトリルで4mlとする

↓

ODSによる精製

↓ 4mlとした抽出液を負荷後、遠沈管をアセトニトリル1mlで2回すすぎ、これも負荷する

↓ アセトニトリル2mlで溶出し、遠沈管にとる

窒素気流下でアセトニトリルを留去

↓ 1MKCl溶液を 500 μ l加える

水で3mlとする（ODS精製液）

↓

CMの下にAC-2を連結したカラム（CM+AC-2）による精製

↓ ODS精製液を負荷後、遠沈管を水1mlで2回すすぎ、これも負荷する

↓ 水5mlで洗浄後、CMをはずす

AC-2

↓ 水5mlで2回洗浄

↓ 水を切った後、空気5ml注入

バックフラッシュ溶出（メタノール8ml）

↓ 窒素気流下でメタノールを留去

↓ 水で1mlとする

試験溶液

(2) LC/MS分析条件

カラム：Cadenza CD-C18（3mm i.d. × 150mm 3 μ m）（インタクト（株）社製）

カラム温度：40 流速：0.2ml/min

移動相：アセトニトリル：水（5：95）（18min） - 0.5min - アセトニトリル：水（95：5）（2.9min）

注入量：3 μ l

イオン化モード：ESI(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 ODS溶出状況の確認

(1) 検出感度の確認

既報⁴⁾の ODS 精製条件では、試料により溶出パターンが異なる可能性があると考えられた。また、脂質や色素等の夾雑物が多く含まれる試料を精製する際、同じサイズの ODS で精製できるようアセトニトリル抽出液の量を 4ml から 2ml に減らしたため、感度の確認を行った。アセトニトリル抽出液を 2ml とした場合の定量下限値（標準溶液濃度の S/N 比 10 相当）は、表 1 に示したとおり、いずれも個別検査法³⁾における定量下限値を下回っており、同等以上の感度を有することがわかった。

表1 定量下限値

	Determination limit (μ g/g)		
	acephate	omethoate	methamidophos
Vegetables & Fruits	0.001 (0.01)	0.0004 (0.01)	0.0004 (0.01)
Soybean	0.002 (0.01)	0.0008 (0.01)	0.0008 (0.01)

() : 個別試験法による定量下限値

(2) ODS溶出状況の確認

既報⁴⁾の結果から、ODSによる精製で作物ごとに溶出状況が変動することが考えられたため、アセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ1 μ g 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2ml（標準添加溶液）、いちごとキャベツのアセトニトリル抽出液2mlにアセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ0.02 μ gとなるよう混合標準液を添加したもの（試料添加溶液）を用いて、それぞれの溶出状況を確認をした。

標準添加溶液と試料添加溶液を10ml遠沈管（遠沈管）にとり、あらかじめアセトニトリル10mlで洗浄したODSにそれぞれ負荷した。遠沈管をアセトニトリル1mlで2回洗浄しこれも負荷した後、アセトニトリル

ル2mlで溶出した。負荷時の溶出液、遠沈管の洗液を負荷した際の溶出液、アセトニトリルでの溶出液をそれぞれ分取した。アセトニトリルを留去し水で3mlとした。既報⁵⁾によりAC-2に負荷し、水5mlで2回洗浄した後、メタノール8mlでバックフラッシュ溶出し、メタノールを窒素気流下で留去後、水で1mlにしてLC/MSで測定し、画分ごとの回収率を求めた。また、マトリックスの濃度がODSの溶出状況に影響を与えることが考えられたので、標準添加溶液と試料添加溶液にそれぞれアセトニトリルを2ml添加したものを同様にして画分ごとの回収率を求めた。結果を図1に示す。

これらの結果から、標準添加溶液と試料添加溶液の溶出パターンがほぼ同じであり、試料による変動は見られなかった。アセトニトリルを添加した試料のほうが若干溶出が早かったため、アセトニトリル抽出液2mlにアセトニトリルを2ml加えた後、ODSによる精製を行うこととした。

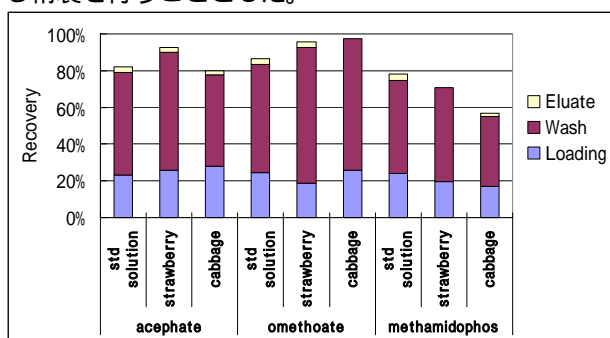


図1-1 ODS溶出状況

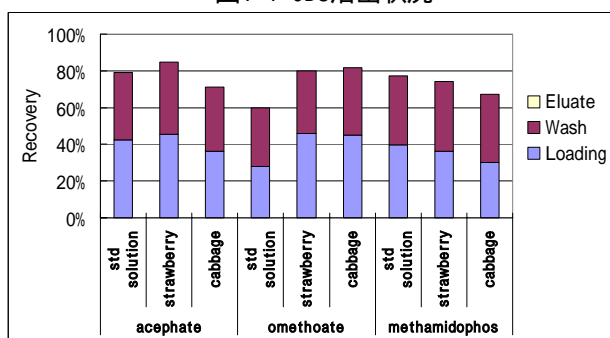


図1-2 ODS溶出状況 (アセトニトリル2ml添加)

3-2 CM溶出状況の確認

(1) 標準添加溶液による溶出状況の確認

既報⁵⁾では、ODSミニカラム以外の精製に陰イオン交換カラムであるQMAを選択したが、試料由来の色素が除去しきれないなど、陰イオン交換カラムでは精製が不十分であることも考えられた。そこで、同じメーカーの陽イオン交換カラムであるCMで精製が可能であるか、標準添加溶液を用いて確認した。

標準添加溶液4mlを遠沈管にとり、窒素気流下でアセトニトリルを留去後、1M塩化カリウム溶液を0.5 μl (500 μg相当) 添加し水で3mlとした。水10mlで洗浄したCMの下にアセトン10mlと水10mlで洗浄したAC-2を連結し負荷した。遠沈管を水1mlで2回洗いこれも負荷後、水5mlで洗浄した。CMをはずし、AC-2を水5mlで2回洗浄後、既報⁵⁾のとおりメタノール8mlでバックフラッシュ溶出した。窒素気流下でメタノールを留去後水で2mlとし、LC/MSで測定して回収率を求めた。結果を表2に示す。

表2 標準添加溶液CM回収率

	Recovery (% , mean ± SD , n=3)		
	acephate	omethoate	methamidophos
CM	90.1 ± 3.6	93.8 ± 3.1	92.0 ± 6.6

SD: 標準偏差

(2) 試料添加溶液による溶出状況の確認

標準添加溶液はCMで良好に回収されたので、キャベツといちごの試料添加溶液2mlを用いて、同様にして回収率を求めた。結果を表3に示す。

表3 試料添加溶液CM回収率

	Recovery (% , mean ± SD , n=3)		
	acephate	omethoate	methamidophos
Cabbage	75.0 ± 9.9	77.9 ± 3.8	68.4 ± 4.5
Strawberry	81.6 ± 4.3	87.0 ± 17.5	59.4 ± 5.3

SD: 標準偏差

試料添加溶液を用いても回収率は良好であったので、CMも精製に使用可能であると考えた。

3-3 QMAとCMによる精製法の比較

いちごとキャベツの試料添加溶液2mlをODSで精製後、窒素気流下で溶媒を留去し、1M塩化カリウム溶液を0.5 μl 添加して水で3mlにし、QMAとAC-2または

CMとAC-2で精製を行い、それぞれの回収率を求めた。結果を表4に示す。

表4-1 試料添加溶液（いちご）回収率

	Recovery (% , mean ± SD , n=3)		
	acephate	omethoate	methamidophos
QMA+AC-2	84.7 ± 2.0	97.5 ± 6.1	62.2 ± 7.3
CM+AC-2	88.2 ± 0.9	84.3 ± 2.7	93.4 ± 3.0

SD: 標準偏差

表4-2 試料添加溶液（キャベツ）回収率

	Recovery (% , mean ± SD , n=3)		
	acephate	omethoate	methamidophos
QMA+AC-2	90.7 ± 2.5	97.4 ± 3.4	79.5 ± 3.8
CM+AC-2	84.7 ± 8.1	91.1 ± 4.3	80.7 ± 10.3

SD: 標準偏差

回収率はおおむね良好であったが、QMAではいちごのメタミドホスの回収率が70%未満であった。CMではいずれも80%以上の回収率が得られたため、CMを使用することとした。

3-4 添加回収試験

添加回収試験は、いちご、キャベツ、大豆について空試験及び添加していない試料と同時に行った。試料に混合標準原液を1 µg相当添加して30分放置後、試験検査に供した。結果を表5に示す。

表5 添加回収試験結果

	Recovery (% , mean ± SD , n=3) , RSD (%)					
	acephate		omethoate		methamidophos	
Strawberry	88.3 ± 6.1	6.9	81.5 ± 6.2	7.6	83.5 ± 2.6	3.1
Cabbage	83.1 ± 3.0	3.6	77.8 ± 2.8	3.6	75.9 ± 2.1	2.8
Soybean	67.4 ± 3.1	4.6	70.2 ± 7.9	3.2	68.0 ± 2.2	3.2

SD: 標準偏差 RSD: 相対標準偏差

大豆は既報⁴⁾では回収率が50%前後であったが、ほぼ70%前後に改善されていた。全体の回収率は67.4 ~ 88.3%、相対標準偏差も10%未満であり、おおむね良好な結果を得られたと考える。

4. 結 語

今回、一斉試験法²⁾によるアセトニトリル抽出液を用いたアセフェート、メタミドホス及びオメトエートの同時分析法開発の完結を目的として、試料の精製条件の再検討を行った結果、ODS ミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムの使用により、回収率を大きく改善することができた。

アセフェート、メタミドホスは比較的検出頻度の高い農薬であるが、個別検査法によらざるを得なかったため、これまで検査機関には大きな負担となっていた。

今後は2007年11月の厚生労働省通知⁷⁾で示されたバリデーション試験を経ることにより、検査の省力化に有用な同時分析法となりうることを期待される。

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) 鈴木恵子，坪井 弘，宮下妙子他：札幌市衛生研究所年報，33，57-62，2006
- 5) 鈴木恵子，宮下妙子，矢野公一：札幌市衛生研究所年報，34，71-75，2007
- 6) 葛岡修二，伊勢香織，鈴木恵子他：札幌市衛生研究所年報，34，55-70，2007
- 7) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて（食安発第1115001号 平成19年11月15日）

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

Keiko Suzuki and Koichi Yano

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

We studied to modify the determination method on them by LC/MS as previously reported. The extracts were purified by Mega Bond Elut ODS and exposed to N₂ flow until removal of acetonitrile. We added KCl to the solutions and purified them by Sep-Pak plus CM (cation-exchange column) connected to Sep-Pak plus AC-2.

In this method, recoveries of each pesticides from cabbage, soybean and strawberry were improved. The recoveries of them ranged from 67.4% to 88.3%.