

QuEChERS法を用いたLC/MS/MS法による作物中農薬の一斉分析法の検討

アジレント・テクノロジー(株) 滝埜昌彦・澤田浩和



目的

平成18年からいわゆるポジティブリスト制が施行され以来、500以上の農薬が測定対象となり多成分一斉分析法の重要性が高まっている。通知法においてもMultiple Reaction Monitor (MRM)法を用いたLC/MS/MSによる多成分一斉分析法が指定されている。しかし、一斉分析法で測定対象物質の数が増えた場合、同時に設定できるMRMトランジションの設定数に限界があることから、一斉分析で可能な化合物数が100程度である。最近、このMRM法を改良したDynamic MRM (DMRM)法が対象成分の多い一斉分析法に有効な方法として報告されている。一方、試料前処理に関しては、迅速(Quick)、簡易(Easy)、安価(Cheap)、効果的(Effective)、堅牢(Rugged)、安全(Safe)を掲げUSDA (U.S. Department of Agriculture) の研究者を中心に開発されたQuEChERS法が、スクリーニング手法として注目されている。そこで本発表においてはQuEChERS法及びDMRM法を用いたLC/MS/MS法による農薬の多成分一斉分析法の検討として3農作物及び2加工食品を用いて分析法の検討を行った。

方法

装置及び条件

装置にはJet Stream イオン源を装着したAgilent Technologies製 Agilent6460 triple quadrupole LC/MSを使用した。分析用カラムには微小粒子径の逆相カラムであるAgilent Technologies製ZORBAX Extend C18(100mm,2.1mm,1.8µ m)を使用し、移動相にはアセトニトリル及び0.1%ギ酸+10mMギ酸アンモニウム水溶液を使用した。その他分析条件は表.1に示した。また、138農薬のDMRM条件は表.2に示した。

表.1 LC/MS/MSの測定条件

HPLC	: Agilent 1200 SL
Column	: ZORBAX ExtendC18(50mm,2.1mm,1.8µ m)
Oven temp	: 40 °C
Mobile phase	: A: acetonitrile, B: 0.1% HCOOH+10mMHCOONH ₄ 10%A/B--(30min)--100%A
Flow rate	: 0.2 mL/min
Injection	: 3 µL
Mass spectrometer	: Agilent 6460 LC/MS/MS
Ionization	: Jet Stream (Positive ion mode)
Nebulizer gas	: 345 kPa
Dry gas	: 10L/min at 350°C
Sheath gas	: 12L/min at 100°C
Fragmentor	: 100v

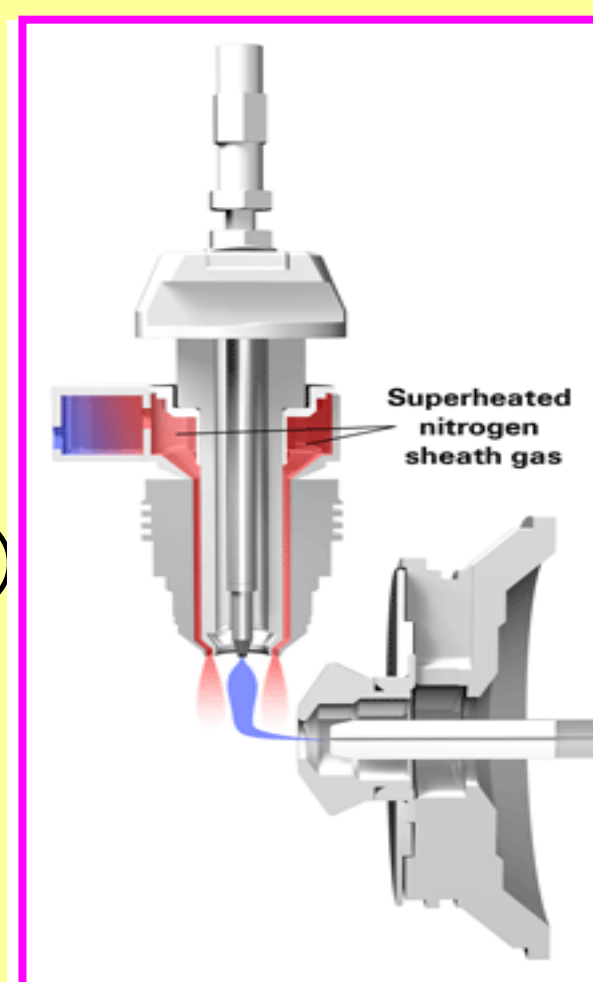


図.1 Jet Stream イオン源

表.2 各農薬のMRM条件

No	Compound Name	Preursor	Product	CE	RT	Delta	No	Compound Name	Preursor	Product	CE	RT	Delta
1	Aldicarbulfone	240	223	0	4.31	2	36	Carbaryl	202	145	0	12.91	1
2	Oxamyl	237	72	0	4.41	2	37	Forchlorfenuron	248	129	15	13.03	1
3	Thiabendazole	202	175	20	4.70	2	38	Metsulfuron methyl	411	196	10	13.06	1
4	Methomyl	163	88	0	4.79	2	39	Sulfentrazone	404	387	0	13.14	1
5	Thiamethoxam	292	211	0	5.89	2	40	Azimsulfuron	425	182	10	13.27	1
6	Clothianidin	250	169	0	6.88	2	41	Monilurin	215	126	10	13.49	1
7	Chloridazon	222	104	20	7.25	1	42	Metosulam	418	175	15	13.51	1
8	Imidacloprid	256	209	10	7.39	1	43	Mesosulfuron methyl	504	182	20	13.54	1
9	Dimethirimol	210	71	25	7.40	1	44	Diuron	233	72	15	13.55	1
10	Flumetsulam	326	129	20	8.74	1	45	Trifloxysulfuron	438	182	15	13.56	1
11	Oxycarboxime	268	175	5	9.56	1	46	Furametpyr	334	290	10	13.59	1
12	Thioclprid	253	126	15	9.56	1	47	Sulfosulfuron	471	211	5	13.99	1
13	Aldicarb	116	89	0	9.82	1	48	Azafenidin	338	264	20	14.14	1
14	Permethrin	239	72	15	9.89	1	49	Zadoksulfuron methyl	508	167	15	14.64	1
15	Tabuthiuron	229	172	10	9.91	1	50	Penoxsulam	484	195	15	14.72	1
16	Thidiazuron	221	102	10	10.45	1	51	Clorosulam methyl	430	398	5	14.73	1
17	Imazoguin	312	267	20	10.71	1	52	Imazosulfuron	413	153	5	14.75	1
18	Foramsulfuron	453	182	15	10.98	1	53	Bensulfuron methyl	411	149	15	14.81	1
19	Azamethiophos	325	183	5	11.31	1	54	Flazasulfuron	408	182	15	14.86	1
20	Thifensulfuron methyl	388	167	10	11.32	1	55	Tribenuron methyl	396	155	5	14.91	1
21	Naptalam	292	144	0	11.68	1	56	Diclosurim	255	141	35	15.13	1
22	Metsulfuron methyl	382	167	10	11.73	1	57	Diclosurim	406	161	25	15.13	1
23	Imazalil	297	159	15	11.77	1	58	Fluzifop	328	282	15	15.29	1
24	Ferimzone(E)	255	132	15	11.83	2	59	Dimethomorph(E)	388	301	10	15.60	2
25	Propoxycarbazone	399	199	5	11.93	1	60	Fluridon	330	309	30	15.93	1
26	Cinosulfuron	414	183	10	11.98	1	61	Methiocarb	226	169	0	15.93	1
27	Bendiocarb	224	109	15	12.17	1	62	Fenobucarb	208	95	5	15.96	1
28	Florasulam	360	129	20	12.21	1	63	Phenmedipham	318	168	5	15.99	1
29	Thiodicarb	355	88	10	12.23	1	64	Fomesafen	456	344	10	16.07	1
30	Carbaryl	222	123	15	12.23	1	65	Prosulfuron	420	141	15	16.08	1
31	Mepiquatpyrim	224	106	20	12.25	1	66	Trifloxysulfuron	318	70	10	16.11	1
32	Chlorpyrifos	358	167	10	12.34	1	67	Azinphos methyl	261	125	5	16.21	1
33	Ferimzone(Z)	255	132	15	12.36	2	68	Halosulfuron methyl	435	182	10	16.22	1
34	Methabenzthiazuron	222	165	10	12.43	1	69	Linuron	249	160	10	16.24	1
35	Triasulfuron	402	167	10	12.56	1	70	Pyrazosulfuron ethyl	415	182	15	16.24	1

試料は粉砕機またはミルで粉砕後、抽出チューブに正確に秤量(乾燥ネギ:大豆:7.5g、ホウレン草:オレンジ:レトルトカレー:15g)した。大豆及び乾燥ネギは15mLの純水を添加した。添加回収試験には標準溶液を添加後、30分放置した。抽出には1%酢酸含有アセトニトリル15mLを使用し1分間激しく振とうした。その後、硫酸マグネシウム:6g及び酢酸ナトリウム:1.5gを添加し振とう後、4000rpmで5分間遠心分離を行った。遠沈後、上澄み液8mLを分散SPE用チューブに添加し1分間Vortex後、4000rpmで5分間遠心分離し上澄み液をLC/MS/MSに注入した。

結果及び考察

LC/MS/MS法

Jet Streamの最適化

Jet Streamは図.1に示した通り従来のESIと比較してネブライザーに特徴があり高温のシースガスが使用され、このシースガスによるイオンフォーカシング効果により高感度化が可能である。そこで最適シースガス温度、流量を検討した。その結果、ほとんどの農薬でシースガス温度を400°Cにすることで2~10倍強度が上昇したが、表.3に示した通り熱に不安定な10農薬では400°Cにすることで1/2~1/20に強度が低下した。以上の結果、シースガス温度は100°Cとした。流量は顕著な影響がなかったことから12L/minとした。また、各農薬のESIに対するJet Streamの相対強度は図.2に示したが、熱不安定農薬以外では強度が1.2~3倍であった。

表.3 熱不安定農薬のシースガス温度の影響

No	Pesticides	強度	No	Pesticides	強度
16	Thidiazuron	28	129	Aramite	32
110	Hexaflumuron	31	130	Lactofen	64
112	Teflubenzuron	55	135	Diallate	52
116	Novaluron	42	136	Abamectin	43
124	Lufenuron	53	138	Silafuofen	6

(100°Cでの400°Cに対する相対強度)

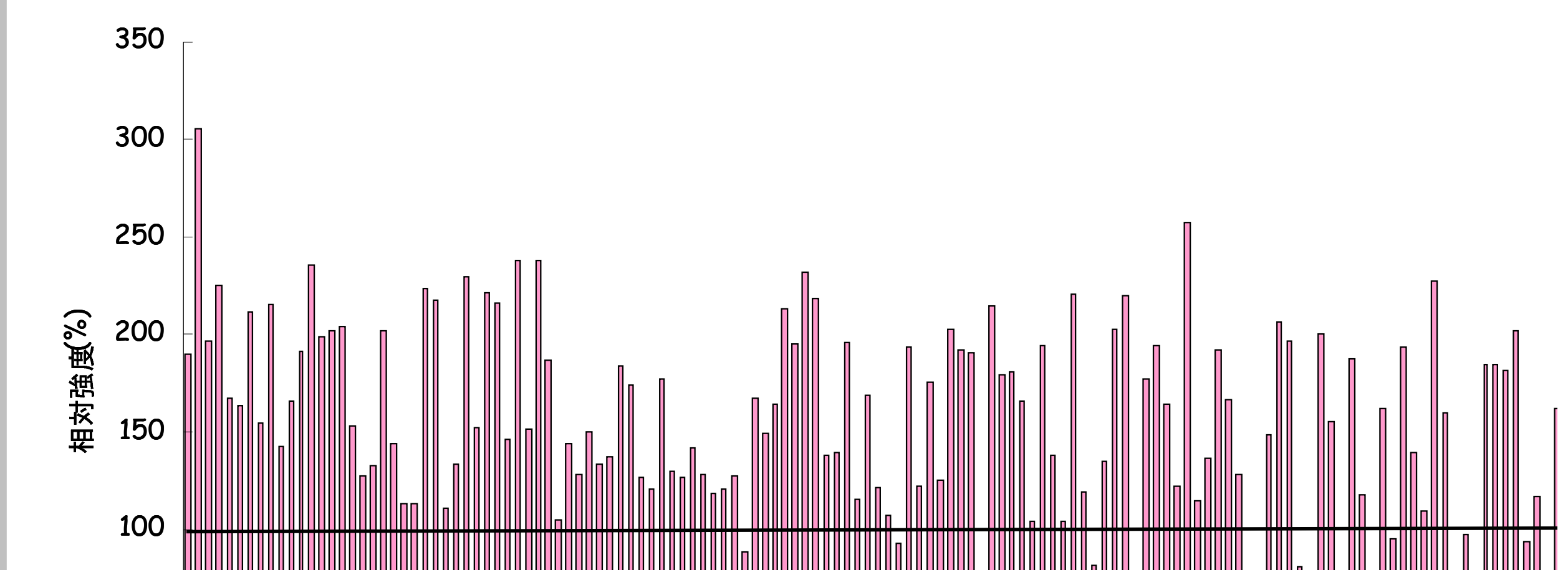


図.2 各農薬のJet Streamによる強度(ESI:100)

DMRMによる138農薬の測定

DMRM法は図.3の通り各農薬のMRMトランジションを保持時間に対し一定範囲のみ測定することで同時に測定すべきMRM数の削減が可能で最大Dwell timeを大きくすることが可能である。また、ピーク中取り込み速度を一定にするためDwell timeを変化させ測定が可能である。今回は取り込み範囲を1または2分にすることでDwell time最小:25msec、最大:596.5msecであった。今回の測定条件での138農薬標準液でのMRMクロマトグラムは図.4に示したが、検出限界(S/N=3)は0.01~1.5ppbであった。

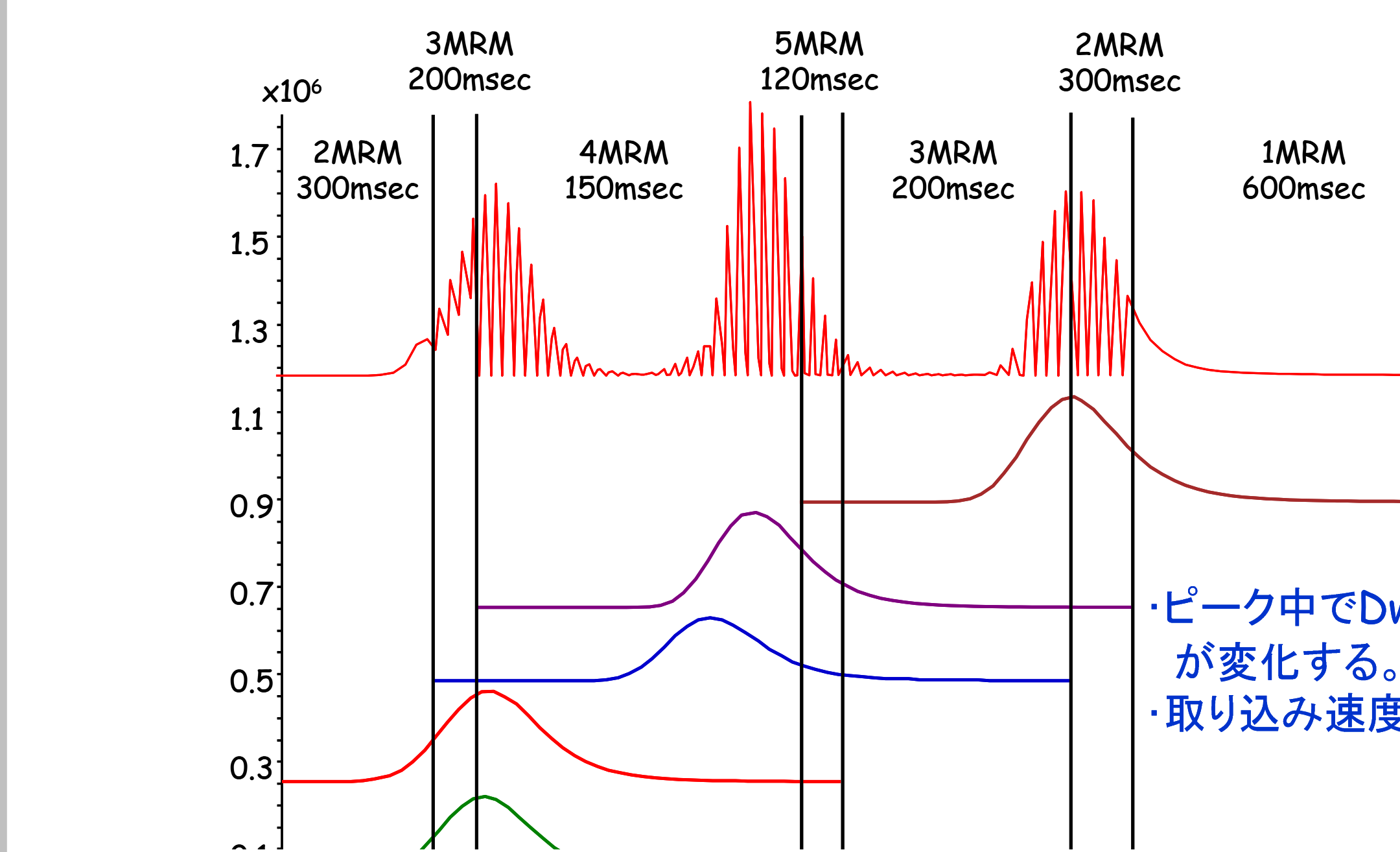


図.3 DMRM法の測定概念

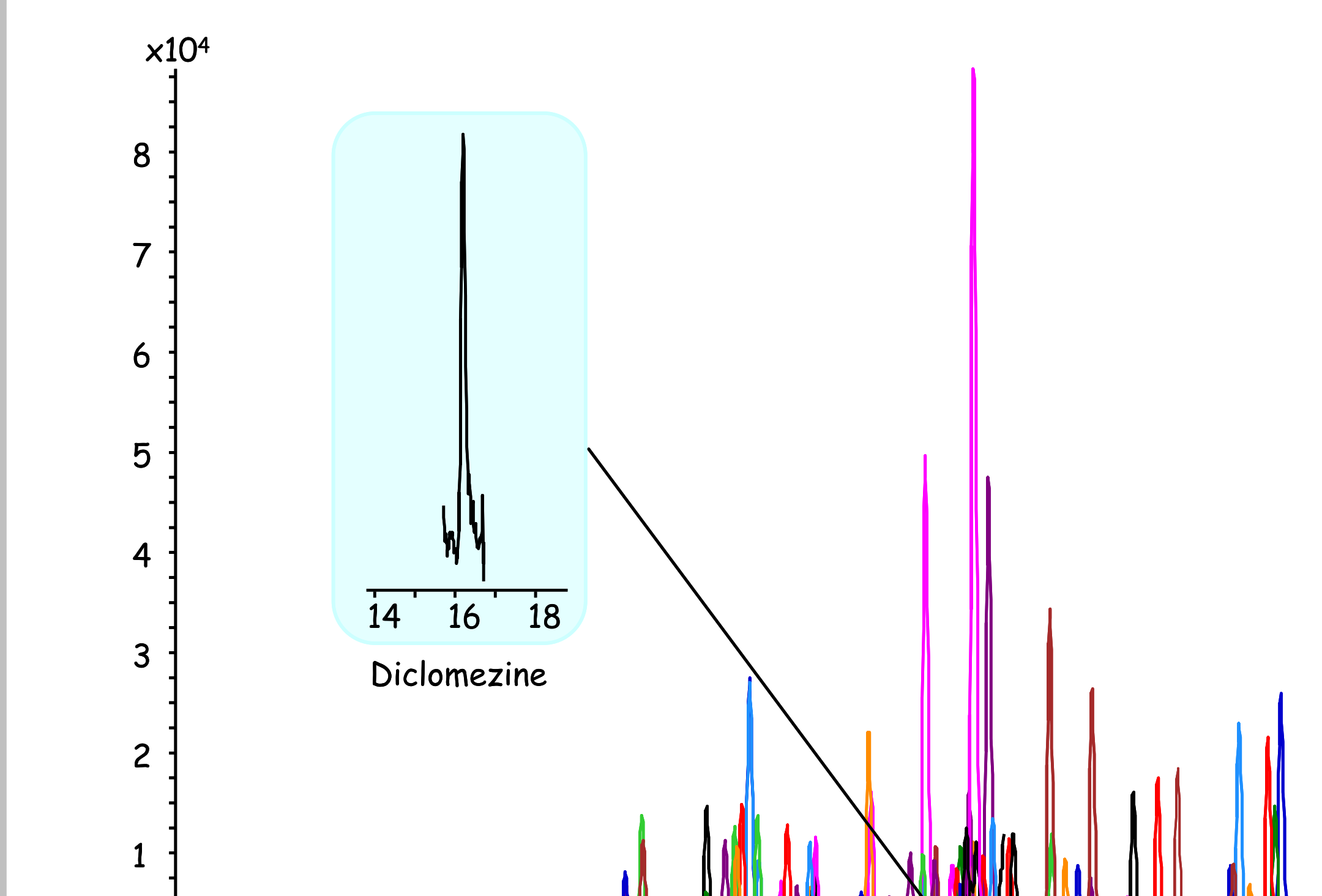


図.4 DMRM法による各農薬のMRMクロマトグラム(濃度:10ppb)

QuEChERS法

各農薬のイオン化抑制

QuEChERS法は非常に迅速な方法であるが、クリーンアップには分散SPEを使用していることから一般的なSPEを使用した方法と比較してマトリックス除去効率が悪い。そこで試料マトリックスによるイオン化抑制について評価した。評価には試料コントロール抽出液に10及び50ng/g相当の標準液を添加した試料を用い、各農薬の標準液との相対強度を使用した。結果は表.4に示したが、マトリックスが比較的多いオレンジ、レトルトカレーにおいて極端なイオン化抑制は観察されず、全試料中全ての農薬で相対強度は80%以上であった。従って、QuEChERS法を使用しても標準液での検量線の使用が可能であった。

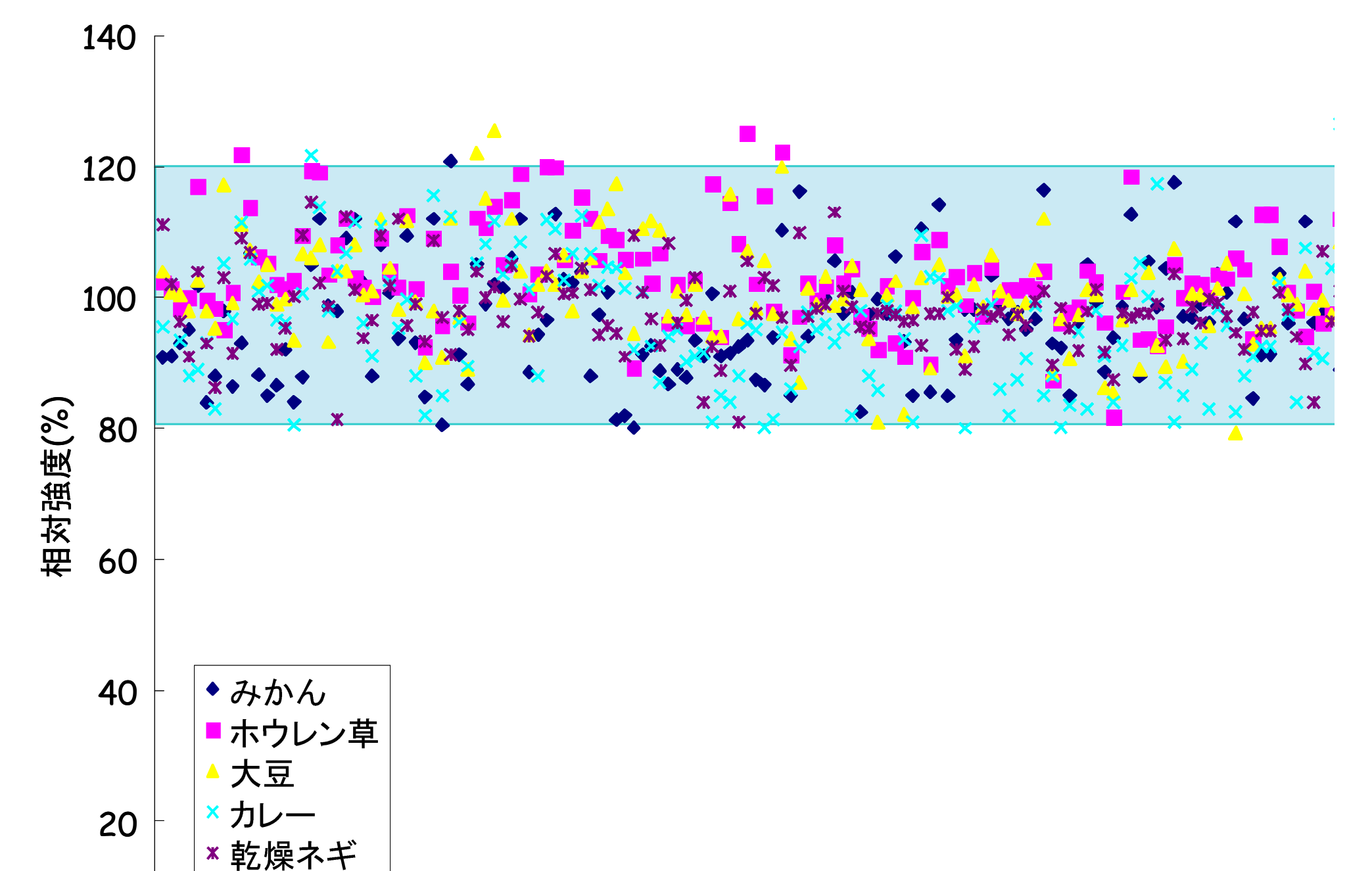


図.4 試料中各農薬のイオン化抑制(標準液:100)

各農薬の回収率

各農薬の回収率のProfileを図.5に示したが、回収率が40%以下の農薬は10~12農薬であった。これら農薬は試料に関係なく共通していた。また、70%以上、120%以下の農薬数は96~106農薬であり全体の70~77%であった。図.5にはホウレン草中各農薬の回収率も示した。

図.6には農薬添加大豆、ホウレン草抽出液のMRMクロマトグラムを示したが、試料マトリックス由来のピークは全く観察されなかった。

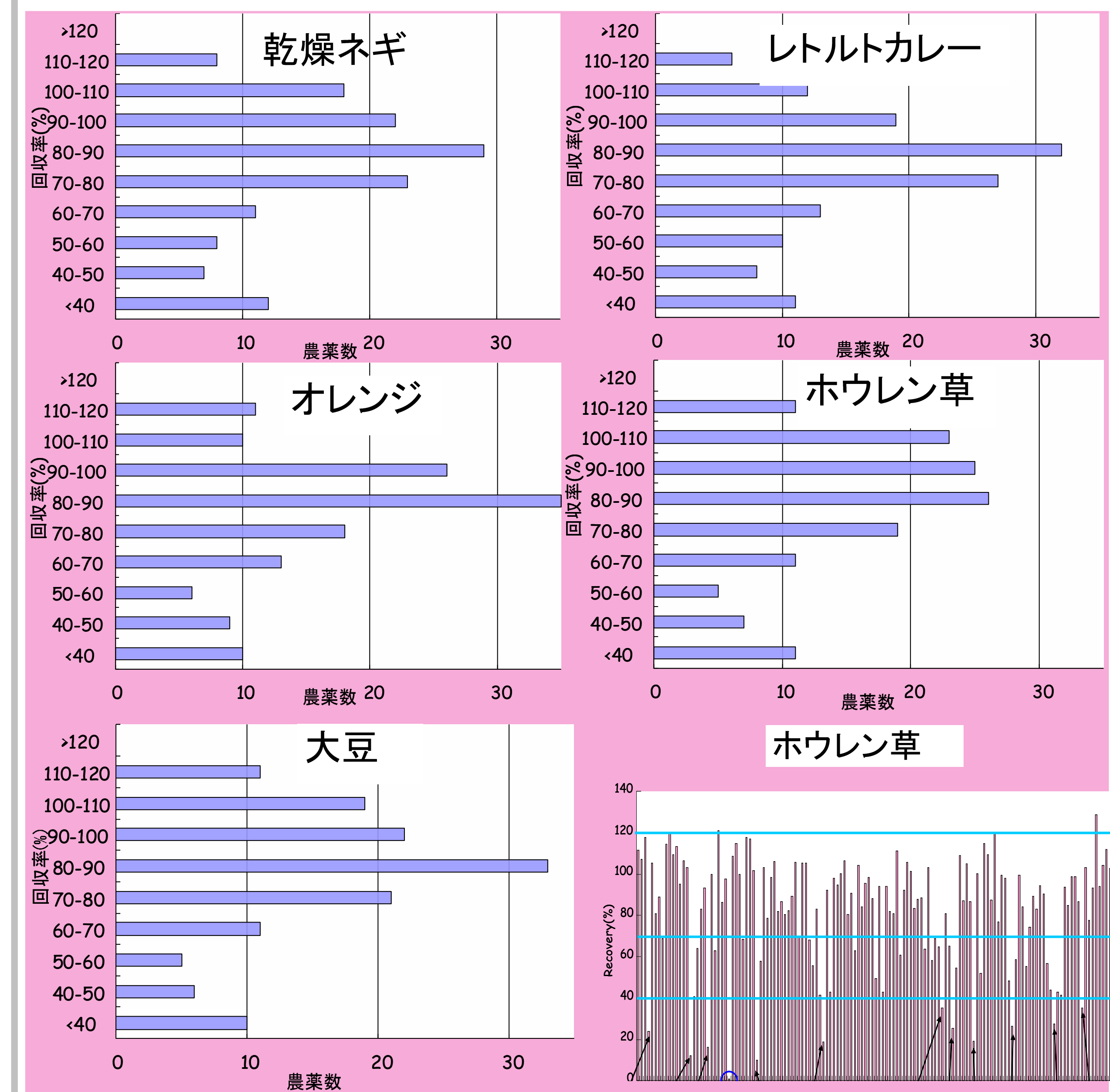


図.5 各試料中農薬回収率の分布図及びホウレン草中各農薬の回収率

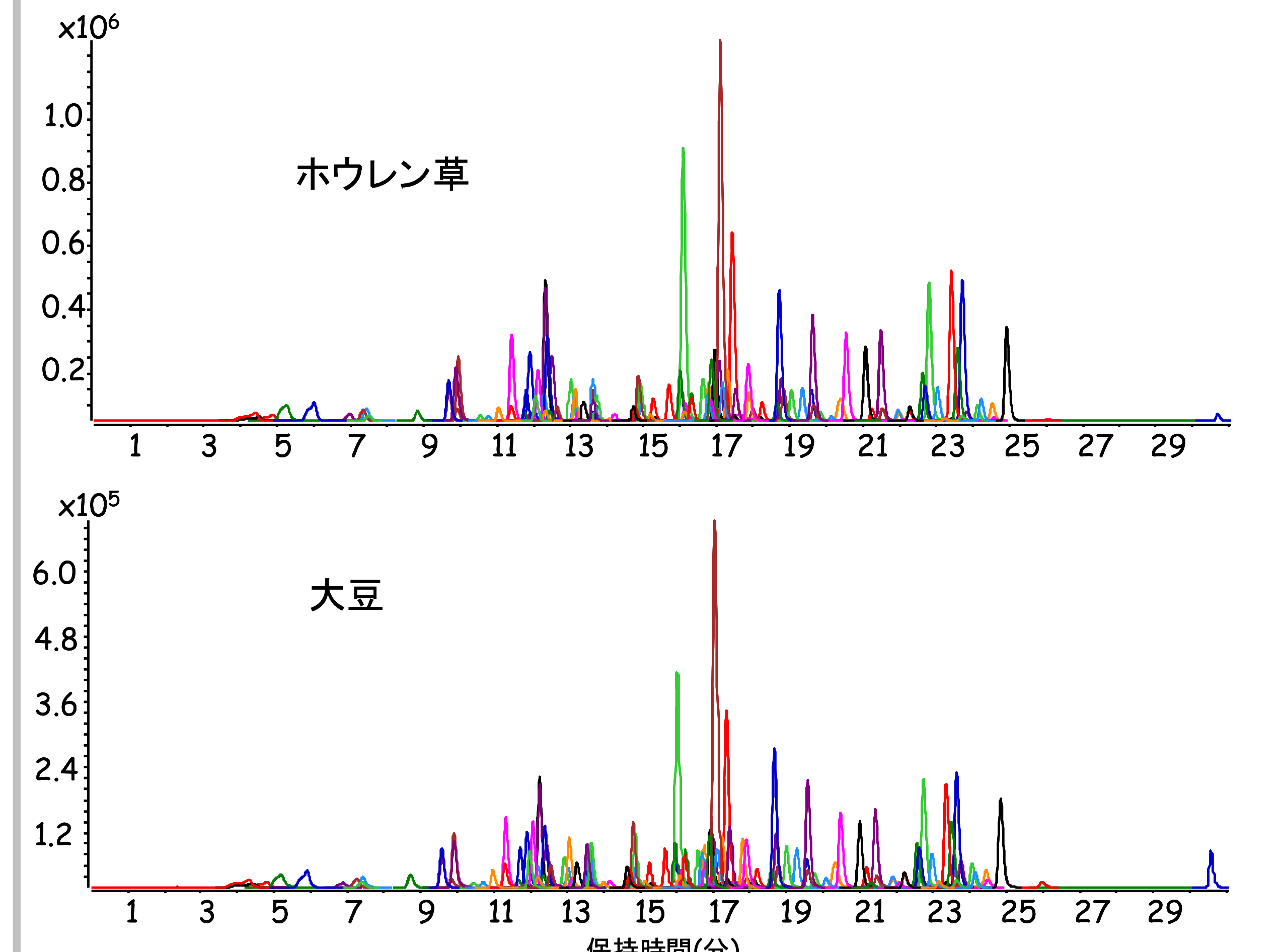


図.6 LC/MS-I及びLC/MS-II法対象農薬の作物中

結論

- 今回農薬一斉分析にJet Streamを使用したがESIと比較して感度が1.2~3倍上がった。
- DMRM法を使用することで138農薬の一斉分析が可能となり検出限界は0.01~1.5ppbであった。
- 試料前処理にQuEChERS法を使用した。試料抽出液中で顕著なイオン化抑制もなく各試料中回収率が70~120%の農薬は70~77%であった。