アプリケーションノート

食品

トリプル四重極 GC/MS を用いた酸性農薬のメチルエステル化による一斉分析および前処理の自動化

著者

杉立 久仁代[1]、野原 健太[1]、山本 慎也[1]

金丸 直樹[2]

1) アジレント・テクノロジー株式会社

2) 一般財団法人 日本穀物検定協会

要旨

カルボキシル基を有する酸性農薬について、トリメチルシリルジアゾメタンを用いた誘導体化（メチルエステル化）による一斉分析メソッドを開発しました。さらに、汎用的な利用を可能にするためにオートサンプラによる誘導体化の自動化についても検討を行い、検量線、再現性とも良好な結果が得られました。

はじめに

カルボキシル基を有する酸性農薬は数多く存在します。農薬ごとに前処理方法や測定機器が異なり、同時に分析可能な酸性農薬は種類が限られています。例えば、液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）による測定法としては「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）」[1)]や個別試験法[1)]で試験法が示されています。一方、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）による測定も同様に試験法がいくつか示されていますが、いずれも個別試験法であり、農薬毎に異なる誘導体化が必要です。

そこで、同一の前処理・測定機器による酸性農薬の一斉分析を目指して、誘導体化-GC/MS 法で同時分析可能な酸性農薬を確認するための検討を行いました。LC/MS 法で測定する酸性農薬の中には比較的低感度な農薬も存在するため、誘導体化-GC/MS 法によりそれらの低感度な農薬を補完することも期待できます。

また、誘導体化-GC/MS 法の前処理にかかる手間を削減してさらに汎用的な利用を可能にするために、オートサンプラによる誘導体化反応の自動化も検討しました。

分析条件

サンプル

玄米

試薬

標品：単品を混合（アセトン/メタノール 8:2 v/v）
誘導体化試薬：トリメチルシリルジアゾメタン（約 10 % 溶液、富士フィルム和光純薬工業）

対象農薬

通知法で前処理の異なる農薬のうち、LC/MS で比較的低感度な農薬、カルボキシル基以外にアミノ基も有する農薬、など、物性の異なる農薬を 26 種類を選択しました。カルボキシル基は有しませんが個別分析法では同じトリメチルシリルジアゾメタンを用いて誘導体化するベンタゾンも対象に入れました。

前処理

「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）」に従い、アセトニトリルで抽出した後にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを通過させ、その後シリカゲルカラムを用いて精製しました。誘導体化試薬には取り扱いが簡便な市販のトリメチルシリルジアゾメタンを用いました。誘導体化は、精製後のサンプルに対して行いました。

なお試験法によっては抱合体やエステル体を分解して合算するために加水分解を行うことがありますが、本研究では本体のみを対象とした一斉分析のために加水分解は行っていません。

分析条件

装置	：8890-7010C トリプル四重極 GC/MS
カラム	：DB-5ms UI（p/n 121-5522UI） 長さ 20 m, 内径 0.18 mm, 膜厚 0.18 µm
注入モード	：水素、パルスドスプリットレス（15 psi, 1 min）
注入口温度	：250 °C
注入口ライナ	：ウルトライナートスプリットレスライナ（p/n 5190-2293）
注入量	：2 µL
カラム流量	：水素 0.7 mL/min
オーブン温度	：60 °C（2 min）– 10 °C /min – 190 °C - 3 °C /min – 210 °C – 10 °C /min – 300 °C
トランスファーライン温度	：250 °C
イオン源温度	：300 °C（Extractor Lens 6 mm）
測定モード	：MRM, ゲイン係数 10

自動前処理装置	：7693A（ヒーター /ミキサー付き）
シリンジ	：フロント 10 µL（p/n G4513-80203） バック 100 µL（p/n G4513-80243）

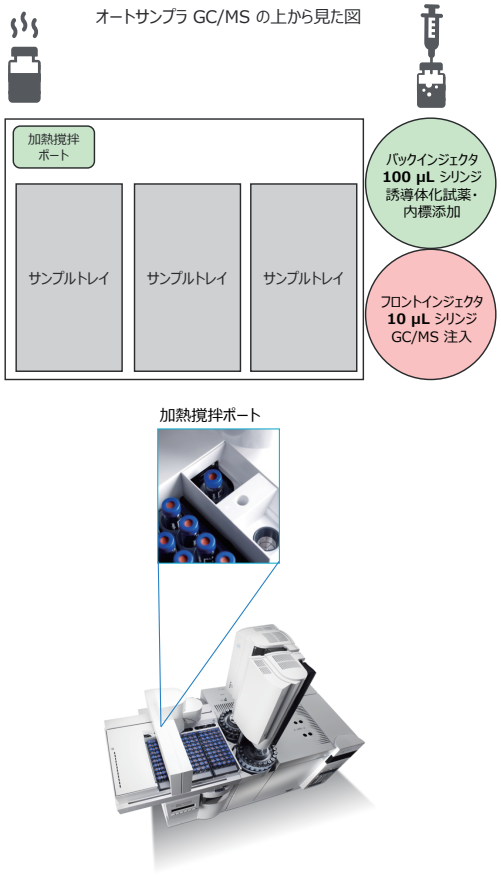

図 1. 7693A オートサンプラの図

結果

LC/MS 一斉分析法の添加回収率

通知法では農薬によって抽出・精製方法が異なるため「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）」の前処理が酸性農薬の一斉分析に適用できるか事前検討を行いました。なお、個別分析法では GC/MS で測定する農薬では抽出、誘導体化後に精製しますが、今回用いたオートサンプラでは精製工程を含めた自動化は困難なため、LC/MS 一斉分析法に従って抽出および精製を行った検液に対して誘導体化を行いました。

添加濃度は 0.1 ppm、*n*=2 で試験を行い、玄米によるマトリックスマッチングで添加回収率を求めました。6-クロロピコリン酸、ピクロラムでは回収率が 56 % 程度でしたが、それ以外の農薬はすべて 70 % 以上と良好な結果が得られました。

誘導体化試薬量および反応時間

オートサンプラでの前処理の自動化にあたり、トリメチルシリルジアゾメタンの量を最適化しました。標準溶液もしくはサンプル溶液 100 µL（アセトン/メタノール 8:2）に対して、誘導体化試薬は 40 µL としました。また、自動化による誘導体化反応の確認を行うため、内部標準としてミリスチン酸-d_{27}（ヘキサン溶液）も 40 µL 添加しました。

反応温度はベンタゾンを除く農薬では 40 °C , 50 °Cで差がありませんでしたが、ベンタゾンのみ温度や反応時間によって差が認められましたので、50 °C 30 分としました。最終的に決定した前処理のワークフローを図 2 に示します。

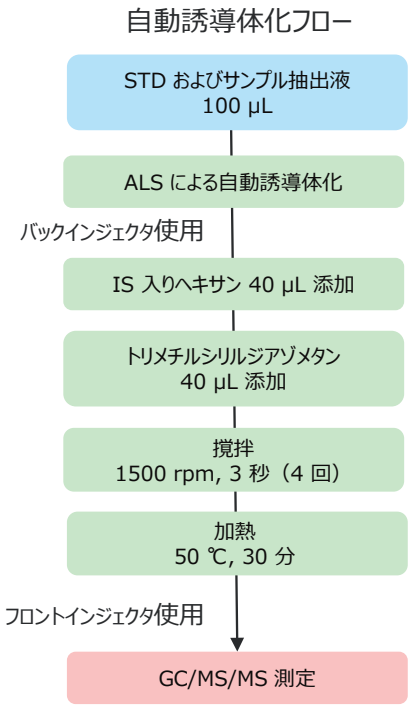

図 2. 自動誘導体化の前処理フロー

検量線、再現性、感度

検量線は 5 ～ 200 ppb の 6 点で作成し、標準溶液、玄米（等倍希釈と 2 倍希釈溶液）の 10 ppb 添加溶液で前処理自動化の再現性を検証しました。検量線はいずれの農薬でも決定係数（R^2）が 0.995 以上、10 ppb の再現性（試行数 *n* = 3）もアシフルオルフェンを除いてすべて 10 % 未満と良好でした。

検量線と再現性の結果を表 1 に、玄米 2 倍希釈溶液に 10 ppb になるように添加したときの MRM クロマトグラムを図 3 に示しました。いずれの成分も 5 ppb（標準溶液）において十分な感度が得られましたが、ビスピリバックは他に比べて比較的低感度でした。

表 1. 5 ～ 200 ppb の検量線決定係数と 10 ppb の再現性

化合物名	RT	トランジション	検量線 R^2	再現性（n=3）		
				STD	玄米 2 倍希釈	玄米（等倍）
6-クロロピコリン酸	7.46	113 -> 78	0.9991	7.6	5.0	7.5
クロピラリド	8.77	146 -> 110	0.9992	6.4	5.8	6.1
4-クロロフェノキシ酢酸	9.31	200 -> 141	0.9995	6.2	5.2	6.2
ジカンバ	9.58	203 -> 97	0.9994	4.9	5.6	6.6
メコプロップ	9.99	142 -> 107	0.9995	3.2	5.5	6.6
MCPA	12.68	141 -> 77	0.9992	3.6	3.9	6.0
ジクロルプロップ	10.22	162 -> 63	0.9995	3.8	2.8	6.4
2,4-D	13.34	175 -> 111	0.9996	4.7	4.0	5.7
アシベンゾラル酸	10.73	166 -> 135	0.9988	5.3	2.1	0.5
トリクロピル	11.00	210 -> 110	0.9992	3.4	5.5	6.2
1-ナフタレン酢酸	11.17	200 -> 141	0.9992	1.7	6.3	4.9
ミリスチン酸-d_{27}	11.63	219 -> 107	-	2.2	3.1	4.7
2,4,5-T	11.72	268 -> 233	0.9994	5.1	5.7	3.7
MCPB	11.87	142 -> 107	0.9994	5.7	6.9	6.7
フルロキシピル	12.61	268 -> 209	0.999	6.7	4.5	4.6
2,4-DB	13.19	162 -> 63	0.9995	0.7	4.0	5.5
ベンタゾン	13.57	212 -> 104	0.9996	0.8	6.6	6.4
ピクロラム	14.04	196 -> 161	0.9993	4.1	5.9	8.2
キンクロラック	14.48	224 -> 161	0.9995	5.4	5.0	6.9
シクラニリド	16.32	252 -> 192	0.9992	5.1	6.7	8.2
ハロキシホップ	16.40	316 -> 91	0.9997	5.4	8.2	7.7
クロジナホップ酸	17.67	266 -> 91	0.9989	3.0	9.6	8.3
アシフルオルフェン	17.74	345 -> 223	0.9954	14.6	6.8	6.1
ピリチオバック	18.75	281 -> 238	0.9989	5.6	5.4	8.8
ナプタラム	23.34	273 -> 228	0.9987	1.7	4.9	5.1
キザロホップ	25.36	163 -> 100	0.9981	3.5	4.7	6.0
ピスピリバック	26.51	385 -> 83	0.9963	3.7	9.8	4.9

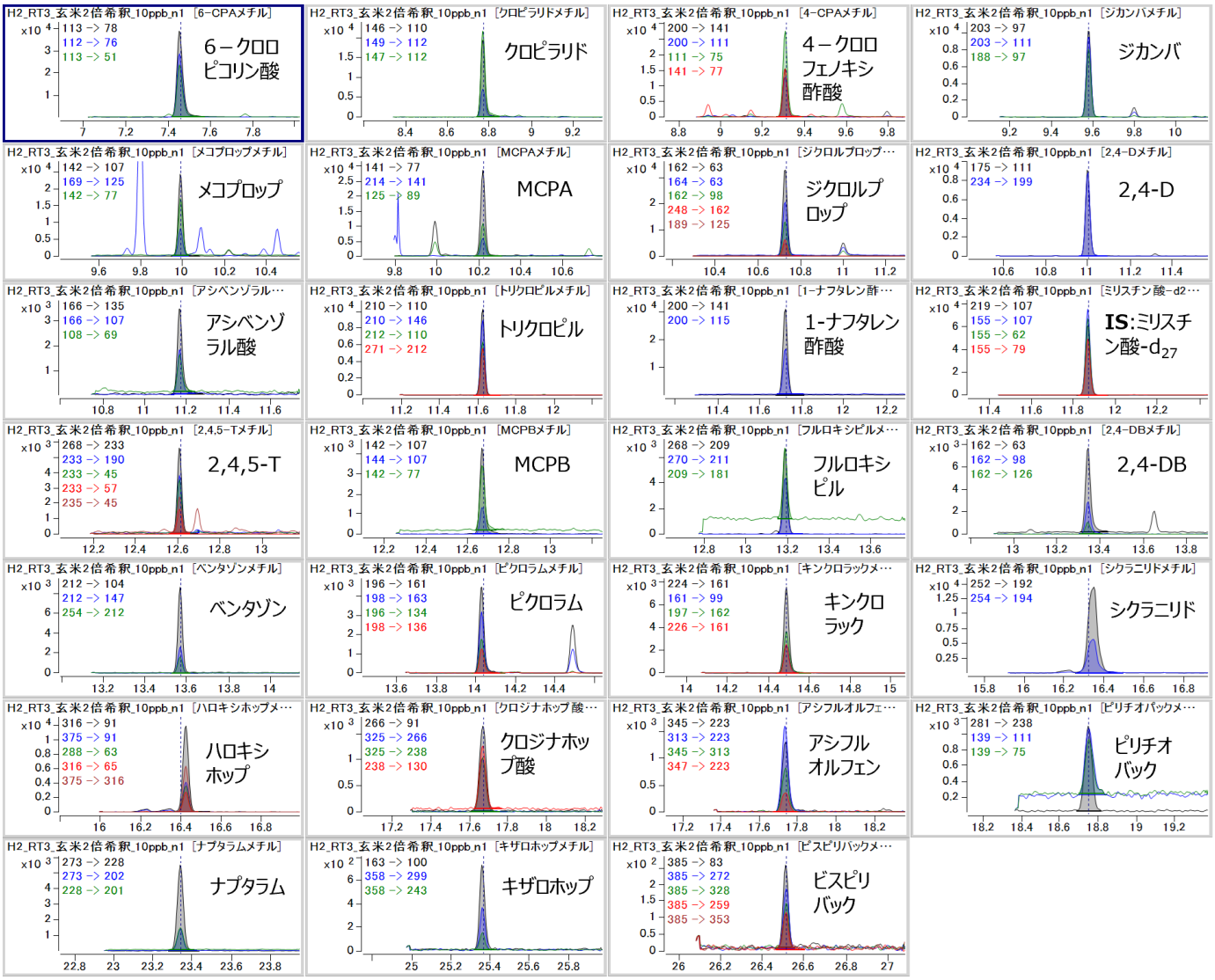

図 3. 玄米抽出液（2 倍希釈）に 10 ppb になるように農薬を添加した MRM クロマトグラム

脂肪酸による妨害とマトリックス効果

「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）」には脂肪酸除去の工程がないため、最終検液には大量の脂肪酸が残留していることがスキャン分析の TICC で確認されました。特にリノール酸・オレイン酸の濃度が高く、これらの脂肪酸と共溶出するシクラニリドは GC オーブン条件を変更しないと測定が難しかったため、脂肪酸溶出付近の昇温速度を落としました。また、シクラニリドの他にハロキシホップも脂肪酸と共溶出するため、この 2 農薬は他の農と比較して、マトリックス効果が極めて高い結果となりました。図 4 に玄米抽出液のスキャンのトータルカレントイオンクロマトグラム（TICC）とマトリックス効果のグラフを示しました。

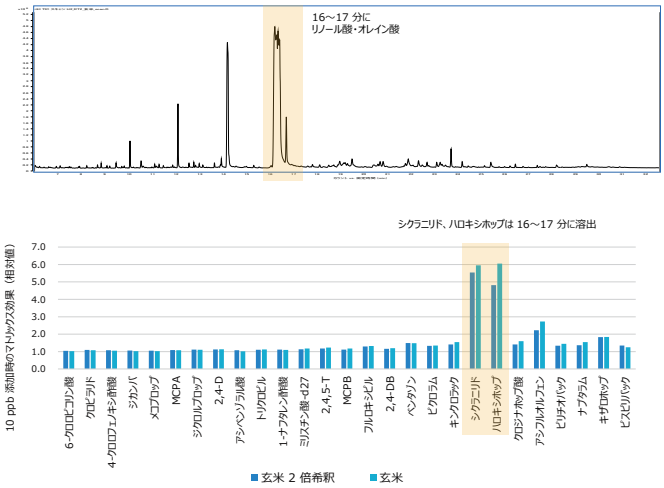

図 4. 玄米抽出液の TICC および各農薬のマトリックス効果

まとめ

代表的な酸性農薬およびベンタゾンのメチルエステル化および自動化による一斉分析の検討を行いました。その結果、前処理に「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）」を用い、トリメチルシリルジアゾメタンで誘導体化することで、一斉分析が可能であることが示されました。検量線は 5 ppb から作成が可能で、自動化による操作の再現性も良好でした。

しかしながら、脂肪酸と共溶出するシクラニリドやハロキシホップはマトリックス効果が極めて高く、標準添加法もしくはマトリックスマッチングによる検量線が必須であると考えられました。また、シクラニリドは条件によってはピーク形状の悪化や保持時間（RT）のシフトなどの影響も認められたことから、今回検討していないその他の酸性農薬でも影響を受ける可能性があり、食品サンプルには必ず含まれる脂肪酸の除去が望ましいと考えられました。一斉分析法で使用されることの多い NH_2 や PSA カラムでは、脂肪酸と同時に酸性農薬も除去されてしまうため、酸性農薬の分析においては採用が困難であると予想されます。一方、Captiva EMR-Lipid（Agilent Technologies）は充填剤とのサイズ排除および疎水性相互作用により、長鎖の脂肪酸のみを効果的に除去できる可能性がある[2]ため、精製効果が期待できます。

※本アプリケーションノートは第 47 回農薬残留分析研究会（2024, 徳島）[3]で発表したものです。

参考文献

1) 厚生労働省 食品に残留する農薬等の試験法
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/zanryu/zanryu3/index.html

2) Agilent アプリケーションノート 5994-2038JAJP「Agilent Captiva EMR-Lipid と LC/MS/MS および GC/MS/MS による牛乳中の複数種類の残留農薬の多成分分析」(2020)

3) 第 41 回農薬環境科学研究会・第 47 回農薬残留分析研究会合同シンポジウム・講演要旨集, pp.135-144 (2024)

※水素ガスの取り扱いについて

水素ガスは酸素との混合により引火爆発を起こしやすいガスです。水素ガスは水素ガス供給源、ガスを導入する分析機器および途中配管を含めた使用環境、機器操作等に、使用者の責任において細心の注意の上で取り扱う必要があります。より詳細な情報は、下記よりご覧いただけます。
http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002538

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

DE-005937

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, April 18. 2025
5994-8322JAJP

Agilent
Trusted Answers