

日本農薬学会  
農薬科学研究成果報告書  
(令和元年度研究奨励金交付課題)

研究課題

安定同位体標識化合物を用いたサロゲート法の LC-MS/MS 農薬多成分一斉分析法への適用にむけての検討

筆頭研究者氏名 伴野 有彩

所属

地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所  
環境研究部環境調査グループ

共同研究者名 (所属)

なし

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】作物を安定に生産するうえで不可欠な農薬は、食の安全のため適正に使用されることが必要である。残留農薬の多成分一斉分析は、農薬が適正に使用されているかを効率的に調査するために適した手法であるが、作物由来の夾雑物によるマトリックス効果 (ME) が作物により異なるなど、精確な分析の妨げとなる場合がある。特に、生産量の少ない地域特産作物を対象とした分析は知見が少ないことから、未知の夾雑物にも対応できる分析法の確立が切望されている。安定同位体標識化合物 (IS) をサロゲートとして用いた内部標準法 (サロゲート法) は、ME が補正できる有用なテクニックである。一方、LC-MS/MS を用いた分析では、現時点で、分析対象とする農薬と補正のための IS との適切な組み合わせが解明されていない場合が多い。

本研究では、大阪府特産作物の葉ごぼう及びいちじくを対象に、ME の解明とサロゲート法による補正に適した IS を探索するための指標に関する調査を行い、サロゲート法の LC-MS/MS 多成分一斉分析に適用可能な農薬と IS との組み合わせを明らかにすることを目的とする。

【方法】

1. IS の分析条件の設定

PL 農薬サロゲート混合標準溶液 II、V 及び VII (林純薬工業株式会社製) に含まれる IS を対象に LCMS<sup>TM</sup>-8050 (島津製作所株式会社製) を用いて分析条件の設定を行った。測定条件は以下の通り。

移動相 A: 2 mmol/L 硝酸アンモニウム及び 0.002 % 硝酸超純水。移動相 B: 2 mmol/L 硝酸アンモニウム及び 0.002 % 硝酸メタノール溶液。グラジエント設定 (移動相 A): 0-1 分、97%; 1 分、90%; 3 分、45%; 10.5 分、0%; 12.01 分、97%; 15 分、97%。LC カラム: Kinetex® Biphenyl 2.6 μm 100×2.1mm (Phenomenex 社製)、オープン温度: 35°C、流速: 0.4 mL/min、注入量: 1 μL、インターフェイス温度: 350°C、ネブライザーガス流量: 3.0 L/min。

2. 分析法 (厚生労働省通知「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農作物)」参考法)

ミキサー (Blixer®3D、株式会社エフ・エム・アイ製) で摩砕均一化処理した試料 20.0 g にアセトニトリル (MeCN) 100 mL を加えて 30 分振とう抽出した後、吸引濾過した。MeCN でろ紙上の残渣を洗い、洗液をろ液に合わせて得られた 200 mL 抽出物から 80 mL 分取し、あらかじめ塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を加えておいた分液ロートに移し 10 分間振とうした。静置後分離した MeCN 層を分取し、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、40 °C 以下で溶媒を減圧留去した。残留物にアセトニトリル/トルエン (3:1 v/v) 混液 (MeCN/PhCH<sub>3</sub> 混液) 5 mL を加えて溶かし、これを MeCN/PhCH<sub>3</sub> 混液 10 mL であらかじめ洗浄しておいた InertSep GC/NH<sub>2</sub> ミニカラム (ジーエルサイエンス株式会社製) に通した。さらに MeCN/PhCH<sub>3</sub> 液 10 mL をカラムに通した後、全溶出液を 40 °C 以下で減圧留去し、残留物をメタノール 2 mL に溶かして測定試料とした。

3. IS に対する葉ごぼう及びいちじく由来の夾雑物による ME の解明

上記分析法を用いて精製したマトリックス溶液に、IS 混合標準溶液を 0.01 μg/mL になるよう加えた測定試料を調製し (標準区)、以下の式で ME を調べた (n=3)。

$$ME = (\text{マトリックス溶液中 IS のピーク面積} / \text{メタノール内 IS のピーク面積}) \times 100\%$$

また、同等の手法で 10 mL 定量の測定試料を調製し (低マトリックス区)、スチューデントの t 検定 (p=0.05) を行い、各区のピーク面積に有意な差があった IS には明確な ME が認められたと仮定し、それらの IS について ME と保持時間 (RT) 及び logPow との相関を調査した。

4. 妥当性評価試験

農薬 50 種類及び IS の混合標準溶液を 0.025 μg/kg になるよう磨砕均一化した試料に添加し、添加回収試験を実

施した (n=6)。無添加試料 (n=2) からピークが検出されない農薬について解析を行い、分析法の妥当性評価を行うと同時に、ME の補正に適した農薬及び IS の組み合わせの探索を試みた。

【成果】

1. IS の分析条件の確立

23 種類の内 17 種類の IS について ESI モードで測定条件を探索し、下記の通り分析条件を設定した。

表 1. IS の RT 及びモニタリングイオン (m/z)

No	IS	RT (min)	m/z	No	IS	RT (min)	m/z
1	アセフェート-d <sub>6</sub>	2.4	190>149, 190>60	10	チアクロプロリト'-d <sub>4</sub>	5.1	257>126, 257>90
2	ジメチアゾリン-d <sub>3</sub>	3.1	206>132, 206>90	11	カルバリル-d <sub>7</sub>	5.1	209>152, 209>124
3	ニフェニラム-d <sub>3</sub>	3.7	274>192, 274>228	12	ホスチアセート-d <sub>5</sub>	5.8	289>233, 289>104
4	クロチアジニ-d <sub>3</sub>	3.8	253>172, 253>132	13	イマザリル-d <sub>5</sub>	7.2	302>46, 302>69
5	チアトキサム-d <sub>3</sub>	3.9	295>214, 295>184	14	イプロベノホス-d <sub>7</sub>	7.3	296>98, 296>212
6	ジメトート-d <sub>6</sub>	4.1	236>205, 236>131	15	メトアコロール-d <sub>6</sub>	7.5	290>258, 290>182
7	イタクロプロリト'-d <sub>4</sub>	4.3	260>213, 260>179	16	トリフルメソール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	8.0	349>281, 349>44
8	アセチプロリト'-d <sub>3</sub>	4.6	226>126, 226>59	17	ジフェノコナール-d <sub>6</sub>	8.8	412>250, 412>343
9	チアベンダゾール- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	4.6	208>181, 208>70				

なお、リニロン-d<sub>6</sub>、ペンジメタリン-d<sub>5</sub>、キアタン-d<sub>6</sub>、γ-HCH-d<sub>6</sub>、ホルト-d<sub>10</sub>、p, p'-DDT-d<sub>8</sub>、イプロジオン-d<sub>5</sub> は検出できなかった。

2. IS の葉ごぼう及びいちじくの ME の解明

葉ごぼう及びいちじくで明確な ME が認められた IS は 17 種類の内 8 種類であった。クロチアジニ-d<sub>3</sub>、アセチプロリト'-d<sub>3</sub>、メトアコロール-d<sub>6</sub> 及びトリフルメソール-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> が両方の作物で認められ、残りの 4 種は葉ごぼうではジメチアゾリン-d<sub>3</sub>、ジメトート-d<sub>6</sub>、チアクロプロリト'-d<sub>4</sub> 及びイプロベノホス-d<sub>7</sub>、いちじくではアセフェート-d<sub>6</sub>、チアベンダゾール-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、イマザリル-d<sub>5</sub> 及びジフェノコナール-d<sub>6</sub> が認められた。これらの IS の ME と RT 及び logPow との相関を調査した結果、ME と RT とでは明確な関係は見られなかったが、ME と logPow とでは緩やかな二次曲線の関係性が見られた (図 1)。この結果から、ME は logPow が低い又は高い場合にイオン化抑制を、それ以外の場合にはイオン化促進が見られやすいことが示唆された。また、葉ごぼうではイオン化抑制が、いちじくではイオン化促進が多く認められたことから、作物の種類により ME の傾向が顕著に異なる可能性が考えられた。

3. 妥当性評価結果及び葉ごぼう及びいちじく ME を補正するために適切な農薬と IS との組み合わせの探索

妥当性評価試験の結果、まず、アセフェート-d<sub>6</sub> 及びチアベンダゾール-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 以外の IS が「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 (GL)」と適合していたため (回収率: >40%)、これらの IS を補正に用いることが可能であると考えられた。次に、農薬 50 種類のうち、回収率は GL と適合していたが (回収率: 70-120%、RSDr: <15%)、スチューデントの t 検定 (p=0.05) の結果、葉ごぼう及びいちじく間で回収率に有意な差が認められた農薬 8 種類 (ジメトート、フェノカルブ、イキサチオ、イトフェンロックス、シプロコナール、テラフェノジド、フルスファミド、フィプロル) については、ME により回収率の差が生じたと仮定し、農薬に対する ME の解析を行った。結果、イトフェンロックスのみで標準区と低マトリックス区間で有意な ME の差が認められた。このことから、イトフェンロックス以外の 7 種類の農薬の作物間における回収率の差は、精製過程での農薬の損失や分解などによるものと推察された。また、イトフェンロックスに対する ME と logPow の関係は、IS に対する ME と logPow との関係とおおよそ一致したことから (図 1)、農薬でも IS と同様の ME の傾向が認められる可能性が示唆された。一方で、イトフェンロックスと logPow が最も近いトリフルメソール-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> を IS として選択しても、いちじくによる ME については適正な補正が行われなかったため、より logPow が高い IS を用いた検討が必要だと考えられる。

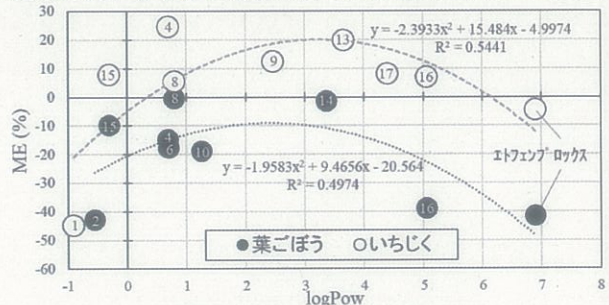


図 1. IS とイトフェンロックスの作物ごとの ME と logPow の関係

本研究では、IS の分析条件が確立され、葉ごぼう及びいちじくの ME が解明されたと共に、GL に適合する IS の種類も明らかとなった。さらに、ME の程度は IS 及び作物種の組み合わせによって異なるものの、分析対象化合物の logPow が極端に低い又は高い場合にはイオン化抑制が起こりやすい可能性が示唆された。一方で、顕著な ME が認められたイトフェンロックスを適切に補正できる IS は断定できなかった。これらの結果から、logPow は RT よりも ME 補正のために IS を選択する際に参考となる指標の 1 つである可能性が考えられるが、より正確な農薬と IS の組み合わせの探索のためには、さらなる農薬及び IS での検討及び化学的な指標の探索が必要である。