報 文

LC-MS/MSを用いた豆類中残留農薬の迅速分析法に関する研究

(平成28年4月28日受理)

岩越景子* 大塚健治 田村康宏 富澤早苗 増渕珠子
八巻ゆみこ 中川由紀子 増田諒子 須藤将太 小鍛冶好恵
新藤哲也 高野伊知郎

Rapid Multi-Residue Analysis of Pesticides in Pulses by LC-MS/MS

Keiko IWAKOSHI*, Kenji OTSUKA, Yasuhiro TAMURA, Sanae TOMIZAWA,
Tamako MASUBUCHI, Yumiko YAMAKI, Yukiko NAKAGAWA, Ryoko MASUDA,
Shota SUTO, Yoshie KOKAJI, Tetsuya SHINDO and Ichiro TAKANO

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;

*Corresponding author

Rapid multi-residue analysis of pesticides in pulses was developed using LC-MS/MS. Pesticide residues in 5 g of homogenized pulses were extracted with 30 mL of acetonitrile and salted out with 4 g of anhydrous magnesium sulfate and 2 g of sodium chloride in the presence of citrate buffer in a disposable tube. The resulting residues were extracted with 30 mL of acetonitrile, and co-extractives were removed on a handmade four-layer column, consisting of a layer of Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) dry particles on top of a three-layer, custom-made (pre-packed) column (lower bed: 60 mg of PSA, middle bed: 30 mg of GC, and top bed: 60 mg of C18) packed in a 10 mm internal diameter polypropylene column (3 mL). The developed method showed good recoveries of pesticides in soybean, lentil, white kidney bean and garbanzo. According to the method validation guideline of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, recovery tests were conducted in soybeans fortified with 107 kinds of pesticides at the levels of 0.01 and 0.1 µg/g, respectively. At each concentration 2 samples were extracted on 5 separate days. Pesticides in the test solution were determined by LC-MS/MS using scheduled MRM. As regards the trueness of this method for 107 pesticides in soybeans, 97 pesticides were in the range of 70–120% with satisfactory repeatability and within-run reproducibility. This new method is expected to be applicable for routine examination of pesticide residues in soybeans.

(Received April 28, 2016)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 多成分一斉分析 multi-residue analysis; 農産物 agricultural product; 大豆 soybean; 豆類 pulse; 固相抽出 solid-phase extraction; 液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 LC-MS/MS

付録資料: 付録資料 (付録図 Table S1, Table S2はJ-Stageの日本食品衛生学雑誌 (<http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.57.150>) で閲覧できる.

緒 言

食品中の残留農薬分析では、食品衛生法の改定に伴うポジティブリスト制度が導入され、さらに農薬等の規格基準への適合性について判断を行う試験については、「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」^{*1}が通知された。現在、規制対象となる農薬について

は800以上が該当し、それらの農薬についてガイドラインに従って評価を実施するためには、正確かつ迅速性の高い分析法の開発が必要である。これまでに筆者らも、多くの食品に適応可能な分析法を開発し、その妥当性を評価してきた¹⁾。

しかし、食品中のさまざまな成分は、分析を妨害するこ

* 連絡先 Keiko_Iwakoshi@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^{*1} 厚生労働省医薬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（平成19年11月15日食安発第1115001号）、一部改正について（平成22年12月24日食安発1224第1号）」

とや、分析機器の流路を汚染して感度を低下させることがあった。特に大豆等を含む豆類については、脂質の影響が大きく、残留農薬分析での課題となっている。一部にマトリックス検量線を採用して改善する方法²⁾はあるものの、絶対検量線での定量は困難とされている。筆者らも、既法¹⁾を用いて、大豆を含む豆類について分析したところ、十分な真度を確保することができなかった。

一般的に脂質を多く含む食品における残留農薬分析では、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)³⁾、低温抽出法^{4),5)}、固相抽出⁶⁾等による精製が必要とされている。しかし、GPCでは多量の有機溶媒が必要となり、また、高分子量の農薬が保持できないといった問題がある³⁾。冷凍保存等による低温抽出法では、時間を要する割には油分が十分除去できないなどの報告例がある^{4),5)}。

そこで今回、既法¹⁾における抽出条件および精製条件に改良を加え、大豆を含む豆類についてのより効果的な分析法を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の大豆 (日本産)、レンズ豆 (アメリカ産)、白いんげん豆 (アメリカ産)、ひよこ豆 (アメリカ産) を使用した。いずれも今回検討する農薬は含まれていないことを確認した後、実験に供した。

2. 試薬および標準品

分析対象農薬として、農薬混合標準溶液8種およびアミノカルブは、関東化学(株)製の残留農薬試験用、イソカルボホスはSIGMA-ALDRICH®社製の残留農薬試験用を使用した。標準原液は、各農薬標準品をアセトニトリルで溶解して1,000 µg/mLとした。10 µg/mLの農薬混合標準溶液 (アセフェートおよびメタミドホスについては50 µg/mL) は、各農薬の標準原液1 mLを混合してアセトニトリルで100 mLに定容した。また検量線は、標準溶液をアセトニトリル/水 (1:1) で適宜希釈して $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ µg/mL (アセフェートおよびメタミドホスについては $2.5 \times 10^{-3} \sim 25.0 \times 10^{-2}$ µg/mL) の範囲で作製した。

無水硫酸マグネシウム、クエン酸水素2ナトリウム1.5水和物、クエン酸3ナトリウム2水和物、塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)製の特級品を用いた。アセトニトリル、メタノール、酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製のLC/MS用を用いた。水はMerck Millipore社製Milli-Q Integralの超純水を用いた。

固相抽出カラムは、既法¹⁾で用いたジーエルサイエンス社製 (特注品) に、SIGMA-ALDRICH®社製のZ-Sep/C18 (20 mg/50 mg) dSPE CLEAN-UP TUBEを使用時に積層したもの (以下; ジルコニア含有積層カラム) を用いた (Fig. 1)。

3. 装置および分析条件

LC: Waters社製ACQUITY UPLC, MS/MS: Waters社製Xevo TQD, カラム: CAPCELL PAK C18 AQ (3.0 µm,

Fig. 1. Structure of the handmade SPE column

A four-layer column, with a layer of Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) dry particles on top of a three-layer, custom-made (pre-packed) column (lower bed: 60 mg of PSA, middle bed: 30 mg of GC, and top bed: 60 mg of C18) packed in a 10 mm internal diameter polypropylene column (3 mL).

2.0 mm i.d.×150 mm), カラム温度: 40℃, 移動相: A; 0.5 mol/L酢酸アンモニウム含有水溶液, B; 0.5 mol/L酢酸アンモニウム含有アセトニトリル, グラジエント条件: [A;100% (0 min)→5% (20→30 min)→0% (30.1→40 min)], 流量: 0.2 mL/min, 注入量: 2 µL, イオン化: ESI+, キャピラリー電圧: 0.5 kV (+), デゾルベーションガス温度: 400℃. なお, MRMトランジションをTable S1に示した。

4. 試験液の調製

パナソニック社製ファイバーミキサーのミルを用いて細かく粉碎し、均一化した試料5 gを100 mL容量のIWAKI社製ポリプロピレン製遠心管に採り、水を10 mL加え、30分間放置した。これに、アセトニトリル30 mLを加え、マイクロテック・ニチオン社製シャフト型ホモジナイザーで1分間ホモジナイズした後、無水硫酸マグネシウム4 g, クエン酸3ナトリウム2水和物1 g, クエン酸水素2ナトリウム1.5水和物0.5 g, 塩化ナトリウム2 gを加えてガラス製のかく拌棒を用いて1分間かく拌し、さらに手振りで振とうした。その後、遠心分離 (1,800×g, 10 min, 4℃) してアセトニトリル層を分取した。残留物に、アセトニトリル30 mLを加え、1分間かく拌、振とうし、同条件で遠心分離した後、アセトニトリル層を分取し、両液を合わせて80 mLに定容した。

Fig. 1に示すジルコニア含有積層カラムを、アセトン2 mL, トルエン/アセトニトリル (1:3) 混液9 mLでコンディショニングした後、上記抽出液のうち4 mLを負荷し、さらに、トルエン/アセトニトリル (1:3) 混液5 mLを加えて自然落下にて溶出した。全溶出液を窒素気流下で乾固後、LC/MS用アセトニトリル0.5 mLに溶解した。その液に超純水0.5 mLを加え、LC-MS/MS用試験液 (4倍希釈) とした。

結果および考察

1. 抽出法の検討

アセトニトリル 30 mL を用いて、45 農薬 0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加したときの大豆における回収率について、抽出回数 1 回の場合は 40 mL、2 回の場合は 80 mL に定容し、抽出回数による違いを比較した。その結果、検討したすべての農薬で、2 回とすることで回収率が向上することが分かった (Fig. 2)。また、既法¹⁾で使用していた塩化ナトリウム量について添加量を 1~4 g の範囲で比較したところ、2 g とすることで、抽出時の水層と有機層が最もよく分離した。以上のことから、抽出回数を 2 回、塩化ナトリウム添加量を 2 g と設定した。

2. 精製法の検討

大豆を含む豆類には、多量の脂質が含まれることから⁷⁾、既法¹⁾で使用したカラムのみでは、十分に除去できず、乾固後に油滴のようなものが認められた。また、脂質等の夾雑成分により生じる LC-MS/MS でのイオン化抑制により、絶対検量線での定量が困難であった。

そこで、モノアシルグリセロールや脂肪酸等の除去効果が報告されている^{8)~11)} ジルコニア結合型シリカゲルカラムの使用を試みた。

Z-Sep⁺ と Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) を比較したところ、Z-Sep⁺ では検討した農薬のほとんどで十分な回収率および精度が得られなかった。また、ほかの報告例¹¹⁾ と同様に、特に有機リン系農薬で回収率が低かったことから、Z-Sep⁺ では、農薬の吸着がより強いことが示唆された。これは、他の報告例⁹⁾ と同じ傾向であった。

一方、Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) では良好な回収率および精度が得られた。Z-Sep/C18 においても有機リン系農薬等の回収率が低いという報告例があるが¹¹⁾、本法では、分散系として使用せず、SPE としてカラムに積層させた

こと、および溶出液にトルエン含有アセトニトリル液を使用したことが良好な回収率が得られた理由として考えられた。また、Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) を追加したことで、精製後に乾固した後の、乾固できない粘性の高い油滴と推察される残留物の量が減少した。これは、このカラムの特性として報告例^{8)~11)}にある脂質除去効果の可能性が示唆された。これらのことから、今回は Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) を選択し、既法¹⁾のカラム上部に積層して用いることとした (Fig. 1)。

次に、Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) を追加したことによる精製効果を確認するために、0~25 ppb での 5 点の検量点で、絶対検量線とマトリクス検量線の傾きを比較した。両者の傾きの比からマトリクス効果について以下の評価指標を用いて評価した。

【評価指標】

マトリクス効果 $a = b/c$

b = マトリクス検量線の傾き, c = 絶対検量線の傾き

大豆においてマトリクス効果が 0.8~1.2 の範囲¹²⁾に抑えられた農薬数を比較したところ、既法¹⁾による精製では 107 農薬中 78 農薬、Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg) を追加した精製では 86 農薬となり、後者によって、よりマトリクスの影響が軽減された。白いんげん豆ではいずれも 86 農薬であり、精製方法による差が見られなかったものの、レンズ豆では、79 農薬が 85 農薬に、ひよこ豆では、80 農薬が 87 農薬にそれぞれ改善された (Fig. 3)。

3. 添加回収実験および妥当性評価

大豆について、既法¹⁾を用いて 0.01 $\mu\text{g/g}$ (アセフェートおよびメタミドホス) の濃度で、添加回収実験を行ったところ、真度 (70~120%) を満たしたものは、107 農薬中 51 農薬であった。また、その他の豆類 (レンズ豆、白いんげん豆およびひよこ豆) についても同

Fig. 2. Effect of the number of extractions on the recovery of 45 pesticides in soybean at the level of 0.1 $\mu\text{g/g}$

*Each value is the mean of 2 replications.

Fig. 3. Effect of clean up with each column on matrix effect of pulses

Non Z is the original column. Z is the original column plus Z-Sep/C18 (20 mg/50 mg).

*Each value is the mean of 3 replications.

a : slope ratio between matrix-matched and solvent calibration.

Fig. 4. Recovery test in pulses fortified with 107 kinds of pesticides at the level of 0.01 µg/g

This graph shows the number of pesticide for which the recovery is between 70 and 120%.

*Each value is the mean of 3 replications. The result for soybeans by the new method is based on the method validation guideline of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

様に十分な真度が得られなかった。一方、本法を用い、3併行の予備的な添加回収実験を実施したところ、107農薬中100農薬で真度の基準を満たした。

大豆以外の豆類3種（レンズ豆、白いんげん豆およびひよこ豆）について、既法¹⁾および本法を用いて0.01 µg/g（アセフェートおよびメタミドホスは0.05 µg/g）の添加濃度で、3併行の添加回収実験を実施した。その結果、真度が70～120%の範囲で確認できた農薬は、レンズ豆において既法では107農薬中73農薬、本法では91農薬であった。同様に白いんげん豆では51農薬が95農薬、ひよこ豆では68農薬が99農薬となり、本法での大幅な改善が見られた（Fig. 4）（Table S2）。一方、低回収率であった農薬には、ジクロトホス、メタミドホス、モノクロトホスといった比較的極性が小さく、溶出時間も速い有機リン系農薬が確認できた。これらはマトリックス効果が認められ、特に、イオン化抑制が顕著であったメタミドホスでは、絶対検量線における定量値が50%前後であったが、マトリックス検量線で定量した場合は、いずれの豆においても回収率が70%以上に向上することが分かった。

大豆については、本法を用いて、ガイドライン^{*1}に従って2濃度（0.01 µg/gならびに0.1 µg/g（アセフェートおよびメタミドホスは0.05 µg/gならびに0.5 µg/g））、試験者1名、2併行、5日間での枝分かれ添加回収実験を実施し、真度、併行精度および室内精度を算出した。なお、定量値の算出については、ピーク面積による絶対検量線法を用いた（Table S3）。

評価基準を満たしたものは、107農薬中97農薬であり、これらの農薬については定量分析を伴う検査が可能であった。なお、真度において評価基準を満たせなかった農薬についても十分な検出感度が得られていることから、本法を用いて豆類のスクリーニング検査が可能と考えられた。

ま と め

LC-MS/MSを用いた豆類中残留農薬の迅速分析法について検討した。抽出はアセトニトリル30 mLで2回行い、

塩析用塩化ナトリウム量を2 gに設定した。精製には著者らのオリジナルカラム¹⁾にZ-Sep/C18（20 mg/50 mg）を加えることで、マトリックス効果を改善した。妥当性評価ガイドラインに従って本法の妥当性を評価したところ、大豆については、107農薬中97農薬でガイドライン^{*1}のすべてのパラメータについて評価基準を満たし、絶対検量線法による定量が可能であることを確認できた。また、本法を他の豆類に適用したところ、大豆と同様に十分な真度が確保できた。本法は、既法¹⁾と同様に、使用する器具、溶媒が少なく、作業工程も少ないことから、効率的かつ効果的な豆類中残留農薬の日常検査法として適用できるものと考ええる。

本論文の一部は、日本食品衛生学会第108回学術講演会（2015、金沢）において発表した。

文 献

- 1) Iwakoshi, K., Yasuhiro, T., Otsuka, K. et al. Studies on a rapid multi-residue analysis of pesticide in agricultural products by LC-MS/MS. *J. Pestic. Sci.*, **55**, 254-259 (2014).
- 2) Wang, J., Cheung, W., Chow, W. Ultra-high performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry determination of 151 pesticides in soybeans and pulses. *J. AOAC Int.*, **96**, 1114-1133 (2013).
- 3) Fernandez Moreno, J. L., Arrebola Liebanas, F. J., Garrido Frenich A., Martinez Vidal J. L. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry I. *J. Chromatogr. A*, **1111**, 97-105 (2006).
- 4) Nguyen, T. D. Lee, M. H. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchem. J.*, **95**, 113-119 (2010).
- 5) Koesukwawat, U., Lehotay S. J., Mastovska, K., Dorweiler K. J. Leepipatpiboon, N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts, and doughs. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5950-5958 (2010).
- 6) Okimashi, M., Kitagawa, Y., Akutsu, K., Obana, H., Tanaka, Y. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. *J. Pestic. Sci.*, **30**, 368-377 (2005).
- 7) 香川芳子. 五訂食品成分表 2001. 東京, 女子栄養大学出版部, 2001, p. 50-57. (ISBN 4-7895-010-9)
- 8) Rajski, L., Lozano, A., Ucles, A., Ferrer, C., et al. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1304**, 109-120 (2013).

- 9) Palenikova, A., Martinez-dominguez, G., Arrebola, F., et al. Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS-MS. *Food Chem.*, **173**, 796–807 (2015).
- 10) Li, Y., Kelly, R. A., Lydy, M. J., et al. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, **140**, 81–87 (2015).
- 11) Sugitate, K., Saka, M. Decrease in the matrix enhancement effect on pesticides analysis with GC-MS using new types of solid-phase extraction column. *J. Pestic. Sci.*, **40**, 87–91 (2015).
- 12) Kollipara, S., Bende G., Agarwal, N., Varshney, B., Palival, J. International guidelines for bioanalytical method validation: a comparison and discussion on current scenario. *Chromatographia*, **73**, 201–217 (2011).