

# 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2報)

鈴木 恵子 宮下 妙子 矢野 公一

## 要 旨

2006年度に検討したアセフェート、オメトエート、メタミドホス同時分析法で、メタミドホスの回収率が低かったキャベツと回収率がほぼ良好であったいちごを用いて、アセトニトリル抽出液の精製法を検討した。その結果、塩を添加し陰イオン交換ミニカラムで精製したところ、キャベツでのメタミドホスの回収率が改善した。

## 1. 緒 言

2006年5月に食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制が導入され、ほぼすべての農薬に基準が設定された<sup>1)</sup>。厚生労働省で通知された一斉試験法<sup>2)</sup>を用いて一度に多くの農薬が分析可能となったが、検出事例が多いにもかかわらず適用が困難である農薬も少なくない。

そのような農薬の代表であるアセフェート、メタミドホス及びこれらと同じ個別検査法<sup>3)</sup>が通知されているオメトエートについて、2006年度に検討したLC/MS同時分析法<sup>4)</sup>では、キャベツと茶でメタミドホスの回収率が50%を下回った。回収率の向上を図るには、精製法の改善が必要であると考え、今回はキャベツと既報<sup>4)</sup>で回収率がほぼ良好であったいちごの抽出液を用いてアセトニトリル抽出液の精製法を検討を行ったので報告する。

## 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高速液体クロマトグラフィー用試薬

水：Milli-Q SP TOC(ミリポア社製)で精製した。

GLpak Jr. SCX 500mg (SCX)：GLサイエンス社製

Mega Bond Elut ODS 1g6ml (ODS)

Mega Bond Elut SAX 1g6ml (SAX)：Varian社製  
Accell plus QMA 360mg(QMA)

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秤取りし、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といちごを用いた。

### 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

試料：25 g

↓アセトニトリル抽出(50ml+25ml)

定容(アセトニトリル100ml)

↓ 4ml分取  
 窒素気流下でアセトニトリル留去  
 ↓ 1MKCl溶液 500 μl加える  
 水で3mlにする  
 ↓  
 QMA+AC-2  
 ↓ 水1mlで2回洗い込む  
 ↓ 水5mlで洗浄  
 AC-2  
 ↓ 水5mlで3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)  
 ↓ N<sub>2</sub>気流下メタノール留去  
 ↓ 水で2mlにする  
 試験溶液  
 (2) LC/MS分析条件  
 カラム: Inertsil ODS-3 (2.1mm i.d. × 150mm)  
 カラム温度: 40 流速: 0.2ml/min  
 移動相: アセトニトリル:水 (5:95) (15min) -  
 1min - アセトニトリル:水 (95:5) (3min)  
 注入量: 3 μl  
 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 AC-2溶出条件の検討

AC-2で精製する際に水で洗浄後、メタノールでバックフラッシュ溶出を行う<sup>4)</sup>が、カラムの乾燥状態が回収率に影響を与えることが考えられた。そこで、アセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ0.05 μg相当となるよう添加した水6mlを用いて、(1)カラムに水が残っている状態、(2)水をほぼ除いた状態、(3)ほぼ除いた後空気を5ml通過させた状態の三種類の条件でメタノール8mlでバックフラッシュ溶出を行い、窒素気流下でメタノールを除去した後、水で1mlとし、LC/MSで測定して回収率を求めた。表1

にそれぞれの回収率を示す。

表1 AC-2乾燥状態別回収率

|               | Recovery (% , mean ± SD , n=3) |            |               |
|---------------|--------------------------------|------------|---------------|
|               | containing water               | drying     | driyg+air 5ml |
| acephate      | 89.5 ± 8.0                     | 82.9 ± 4.8 | 96.5 ± 1.4    |
| omethoate     | 94.4 ± 8.0                     | 87.6 ± 5.8 | 99.8 ± 3.2    |
| methamidophos | 93.5 ± 9.2                     | 86.1 ± 5.0 | 94.7 ± 3.2    |

いずれも回収率は80%以上で良好であったが、最も回収率が高くばらつきも少ない条件である、水をほぼ除去し空気を5ml通過させた状態からバックフラッシュ溶出を行うこととした。

#### 3-2 精製可能なミニカラムの検討

ODSミニカラムでは脂質等の除去が可能であるが、それ以外の夾雑物を除去するためにはODS以外に精製可能なミニカラムの検討が必要である。そこで水系の精製によく用いられるイオン交換カラムのうち、陰イオン交換カラムであるSAXとQMA、陽イオン交換カラムであるSCXについて検討した。

10ml遠沈管にアセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ0.05 μg相当となるよう添加した水6mlをとり、これをメタノール10ml、水10mlでコンディショニングしたカラムに負荷した。遠沈管を2mlの水で2回洗い、これも負荷した。ここまでに得られた溶出液をすべて分取し、10mlとした。さらに水で溶出して10mlごとに分取し、それぞれの画分をLC/MSで測定して回収率を求めたところ、負荷時の溶出液以外からは回収されなかった。表2にそれぞれの回収率を示す。

表2 ミニカラム回収率

|               | Recovery(%) |      |      |
|---------------|-------------|------|------|
|               | SAX         | SCX  | QMA  |
| acephate      | 63.6        | 63.9 | 83.8 |
| omethoate     | 75.9        | 65.6 | 86.4 |
| methamidophos | 46.7        | 65.5 | 78.2 |

SCXは三種類全てが、SAXはオメトエート以外の回収率が70%を下回ったが、QMAは全てにほぼ80%前後の回収率が得られたので、QMAを精製に使用することとした。

### 3-3 QMAによる精製条件の検討

#### (1) QMA溶出状況の確認

QMAの水での溶出状況を確認するため、アセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ1 $\mu$ 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4ml（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4mlにアセフェート、オメトエート、メタミドホスがそれぞれ0.1 $\mu$ gとなるよう混合標準液を添加したもの（試料添加溶液）を用いた。

標準添加溶液と試料添加溶液を10ml遠沈管にとり、アセトニトリルを窒素気流下で留去し水で3mlにした。水10mlでコンディショニングしたQMAに負荷した後、遠沈管を水1mlで2回洗い、これも負荷した。ここで得られた溶出液をすべて分取し5mlとした。さらに水で溶出して5mlごとに分取し、それぞれの画分をLC/MSで測定して回収率を求めた。その結果を図1-1~3に示す。

いずれも負荷時と5mlまでの画分のみ溶出された。標準添加溶液、試料添加溶液の種類により溶出パターンが異なっていたことから、作物によりQMAでの溶出パターンが異なることが示唆された。キャベツの試料添加溶液でメタミドホスとアセフェートの回収率がかなり低かったが、QMAに吸着して回収されない可能性があると考えられた。

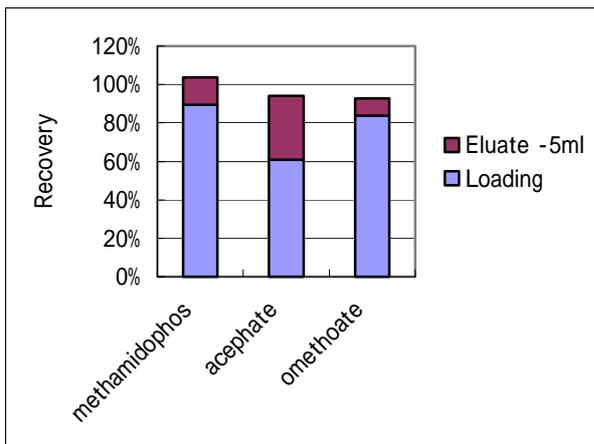


図1-1 標準添加溶液溶出状況

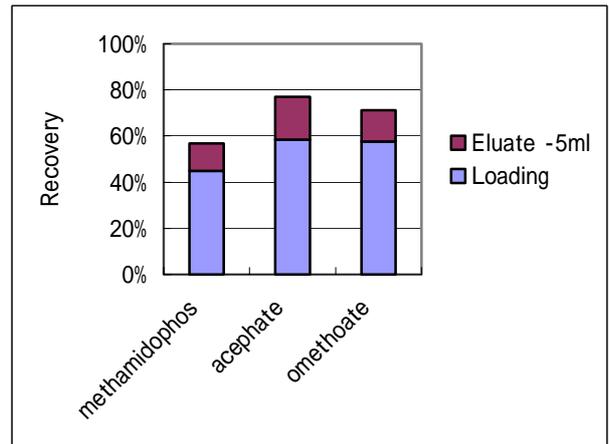


図1-2 試料添加溶液（いちご）溶出状況

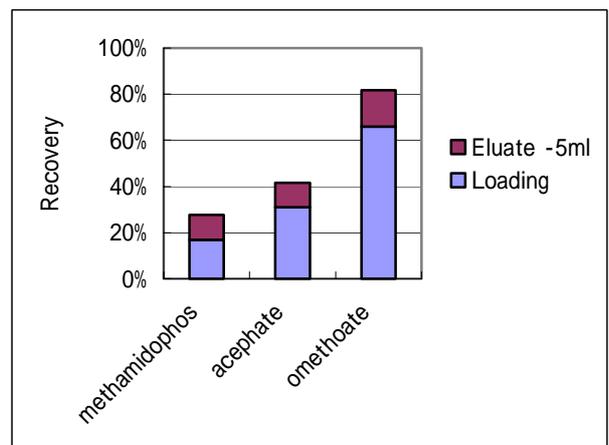


図1-3 試料添加溶液（キャベツ）溶出状況

#### (2) 塩化カリウム添加時の溶出状況の確認

陰イオン交換カラムではpHを上げるもしくは塩を添加して、目的物質を溶出させる。陽イオン交換カラムの例であるが、塩化カリウムを添加することにより、溶出パターンの変動を抑制した報告<sup>5)</sup>があるので、これを参考に塩化カリウムを添加して、溶出状況の変化を確認した。

標準添加溶液と試料添加溶液のアセトニトリルを留去後、1M塩化カリウム溶液を0.3 $\mu$ l（300 $\mu$ g相当）添加し、水で3mlとした。QMAを通した溶液は塩を含むため、そのままではLC/MSによる測定は不可能である。そこで、QMAにアセトン10mlと水10mlでコンディショニングしたAC-2を連結し、分取画分ごとにAC-2カラムを交換し、それぞれの画分の溶出液をAC-2に負荷した。AC-2カラムは脱塩のため、5mlの水で3回洗浄し、水をほぼ除去した後空気を5ml通した後、メタノール8mlで

バックフラッシュ溶出を行った。メタノールを窒素気流下で留去後、水で2mlにして、LC/MSで測定し回収率を求めた。その結果を図2-1～3に示す。

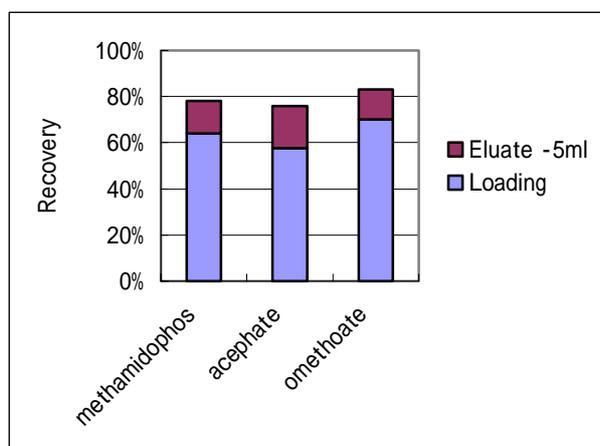


図2-1 標準添加溶液溶出状況  
(300 µg 塩化カリウム添加)

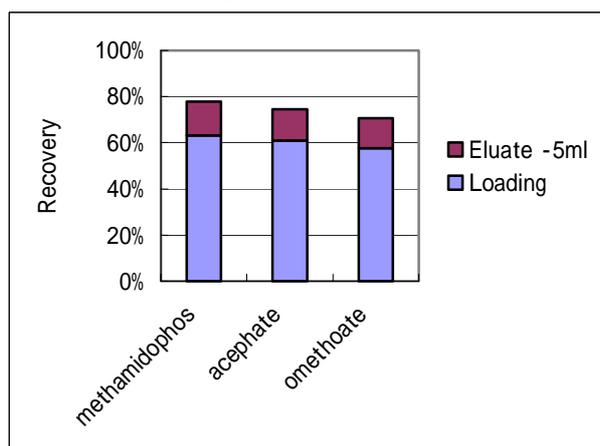


図2-2 試料添加溶液(いちご)溶出状況  
(300 µg 塩化カリウム添加)

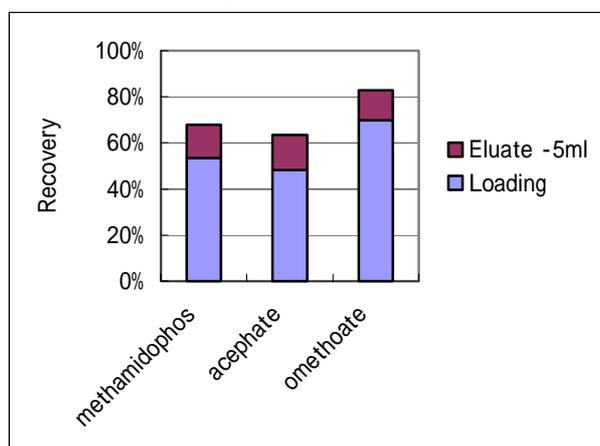


図2-3 試料添加溶液(キャベツ)溶出状況  
(300 µg 塩化カリウム添加)

いずれの試料からもほぼ同一の溶出パターンが得られた。また、キャベツのメタミドホスとアセフェートの回収率も改善した。試料中の塩濃度の差がQMAでの溶出パターンの変動する原因であり、塩化カリウムの添加によって、塩濃度の差を一定にし、溶出パターンの変動が抑えられると考えられた。

### (3) 塩化カリウム添加量の検討

塩を含む試験溶液は、LC/MSに負担をかけ、多大なダメージをあたえるため、好ましくない。そこで、精製に必要な最低限の塩化カリウムの添加量を検討した。

標準添加溶液のアセトニトリル留去後、1M塩化カリウム溶液をそれぞれ200 µl、500 µl、1000 µl (200 µg、500 µg、1000 µg相当) 加えて、QMAとAC-2による精製を行い回収率を求めた。結果を表3に示す。

表3 塩化カリウム添加量別回収率

| KCl added<br>(µg) | Recovery (% , mean ± SD , n=3) |            |               |
|-------------------|--------------------------------|------------|---------------|
|                   | acephate                       | omethoate  | methamidophos |
| 200               | 79.2 ± 4.1                     | 87.4 ± 4.9 | 78.6 ± 4.4    |
| 500               | 85.6 ± 1.8                     | 92.6 ± 2.0 | 84.9 ± 0.9    |
| 1000              | 85.2 ± 1.5                     | 90.8 ± 1.6 | 81.6 ± 2.6    |

いずれも回収率は70%以上で良好であったが、200 µgでは、若干回収率が低かった。500 µgと1000 µgでは回収率にほとんど差がみられなかったため、500 µg添加することとした。

### 3-4 添加回収試験

添加回収試験は、ブランク及び添加していない試料と同時にを行った。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。

本来であれば、ODSで精製した後、QMAとAC-2による精製を行うが、既報<sup>4)</sup>の結果より、ODSによる精製についても試料により溶出パターンが異なる可能性があるため、QMAとAC-2のみで精製を行った。結果を表4に示す。

表4 添加回収試験結果

| 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    |

回収率はおおむね向上していた。特に、キャベツのメタミドホスの回収率の平均は既報<sup>4)</sup>の44.3%から68.4%に改善している。しかしながら、キャベツ、いちごともメタミドホスの回収率が70%を下回っているのは、ODSによる精製を省略したため、イオンサプレッションによりLC/MSの感度が低下した可能性がある。この結果から、QMAとAC-2による精製に加えて、ODSによる精製を行うことが望ましいと考える。

#### 4. 結 語

既報<sup>4)</sup>でメタミドホスの回収率が低かったキャベツのアセトニトリル抽出液を留去後、塩を添加しQMAとAC-2で精製したところ、回収率に改善が見られた。今回の添加回収試験ではODSの精製過程を省略しているので、大豆やほうれんそうといった油脂が多いまたは色素の多い作物ではQMAのみで精製することは難しい。また、メタミドホスの回収率が低かった原因のひとつに精製不足が考えられることから、ODSによる精

製を行ったほうが望ましい。

今後は試料による溶出パターンの変動を考慮したODSによる精製条件の検討等を行うことが必要である。

#### 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 弘他：札幌市衛生研究所年報, 33, 57-62, 2006
- 5) 田中 健他：果物, 野菜中のPMG, AMPAのHPLCによる測定, 食衛誌, 33, 125-132, 1992

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

Keiko Suzuki, Taeko Miyashita 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 that we reported in 2006. The extracts were evaporated until removal of acetonitrile. We added KCl to the solutions and purified them by Sep-Pak plus QMA (anion-exchange column) connected to Sep-Pak plus AC-2.

In this method, recoveries of each pesticides from cabbage and strawberry were mostly improved. The mean recovery of methamidophos from cabbage increased from 44.3% to 68.4%.