

ポジティブリスト制度施行後に残留基準が新設された 12 農薬への多成分一斉分析法の適用

秋山 由美* 松岡 智郁

Application of Multi-residue Analytical Method for 12 Pesticides Added to the Positive List

Yumi AKIYAMA*, Tomofumi MATSUOKA

Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

The applicability of our multi-residue analytical method for 12 pesticides which were added to the positive list after the implementation on May 29, 2006 was investigated. Amisulbrom, benthiavalicarb-isopropyl, cyflumetofen, flonicamid, fluopicolide, metconazole, orysastorobin, and pyraclonil were analyzed by both GC/MS and LC/MS. Flubendiamide, mandipropamide, metaflumizone, and oxadiargyl were analyzed by LC/MS. Using both instruments enabled to elude matrix effects and determine at the level of uniform limit (0.01 µg/g). The rate of recovery of 12 pesticides from fortified brown rice, spinach, and lemon ranged from 66 to 118% for the matrix-matched standard with the RSD usually <10% for 3 trials. These 12 pesticides could be included in the object of the routine analysis by multi-residue method.

I はじめに

2006年5月より、食品中に残留する農薬等の規制にポジティブリスト制度が導入され、当初は、586農薬に残留基準値が設定されていた¹⁾。その後、新たな農薬の開発等に伴い、食品安全委員会での安全性評価を経て、2009年9月までに新規17農薬について残留基準値が告示され、ポジティブリストに追加された²⁾。2008年1月までに告示された8農薬については、告示とほぼ同時に個別分析法が通知されたが³⁾、2008年4月以降に告示された9農薬については、分析法は後日通知されることになっており、2009年12月現在ではまだ示されていない。また、いずれの農薬に対しても、厚生労働省から通知されている一斉分析法³⁾が適用できるかどうかは示されて

いない。

我々は、農産物中の残留農薬の効率的な監視を目的として、独自の多成分一斉分析法を開発し⁴⁾、これまでに500種を超える農薬に適用できることを確認した^{5,6)}。さらに、新規農薬に対しても、標準品が入手できたものから順次、多成分一斉分析法の適用性を検討してきた。今回、告示済みの17農薬中の12農薬について検討したところ、すべてに適用できたので報告する。

II 材料と方法

1. 試薬および試液

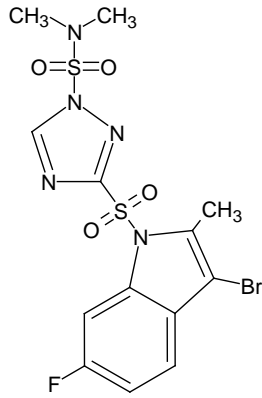
残留農薬試験用のアセトニトリル、アセトン（和光純薬工業(株)製）、および *n*-ヘキサン（関東化学(株)製）を試験溶液の調製に、高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル（和光純薬工業(株)製）を LC/MS 分析に用いた。その他は試薬特級を用いた。

固相抽出用ミニカラム; ODS (Isolute C18 (endcapped) 1g, Biotage 社製) は、アセトニトリル 10mL および水

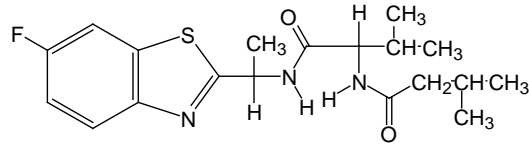
健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 秋山 由美

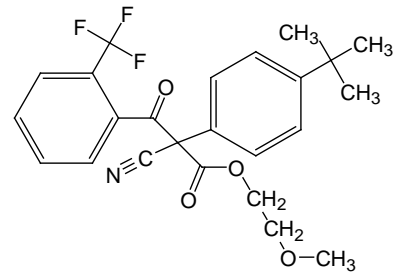
10mL で調整した. PSA (Isolute PSA 500mg, Biotage 社製) は, アセトン-*n*-ヘキサン(1:1) 6mL で調整した.



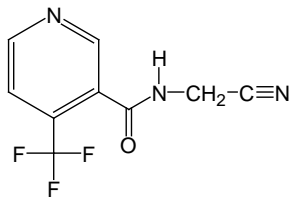
Amisulbrom
(notification:2008.04.30)



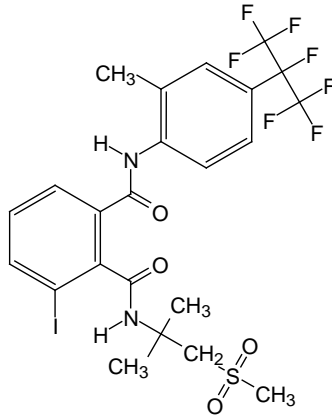
Benthiavalicarb-isopropyl
(notification:2007.04.26)



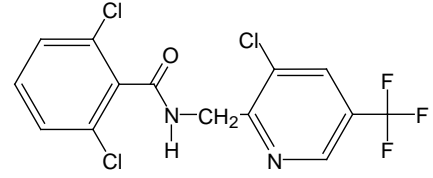
Cyflumetofen
(notification:2007.10.26)



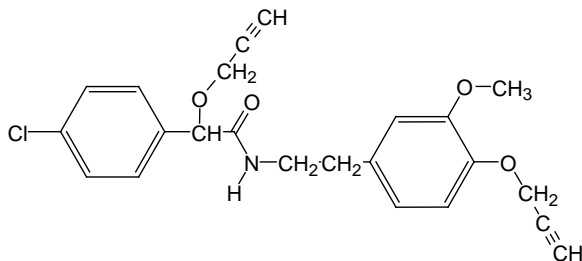
Flonicamid
(notification:2006.10.06)



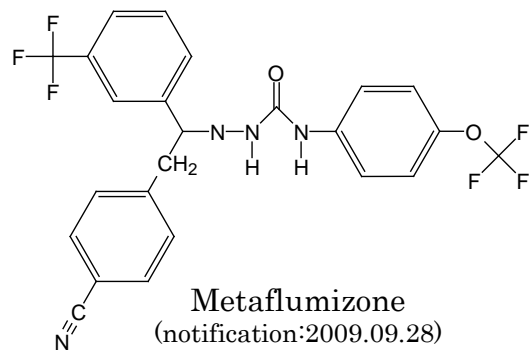
Flubendiamide
(notification:2007.02.27)



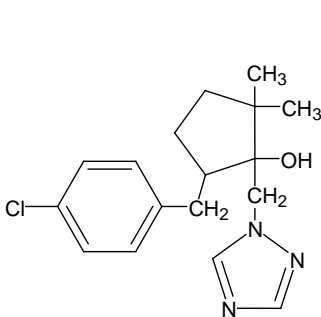
Fluopicolide
(notification:2008.01.24)



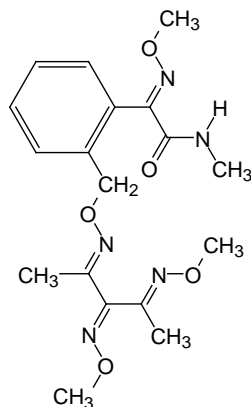
Mandipropamid
(notification:2009.06.04)



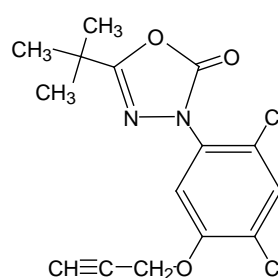
Metaflumizone
(notification:2009.09.28)



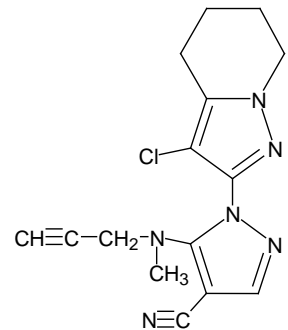
Metconazole
(notification:2006.11.29)



Orisastrobin
(notification:2006.07.11)



Oxadiargyl
(notification:2008.06.30)



Pyraclonil
(notification:2007.12.28)

Fig.1 Structural formulas for 12 investigated pesticides

農薬標準品：アミスルブロム，オキサジアルギル，オリサストロビンおよびその 5*Z* 異性体，シフルメトフェン，ピラクロニル，フルベンジアミド，フロニカミド，ベンチアバリカルブイソプロピル（以上 8 種および異性体 1 種，林純薬工業(株)製），フルオピコリド，マンジプロパミド，メタフルミゾン（以上 3 種，Sigma-Aldrich Co. 製），メトコナゾール（Dr. Ehrenstorfer GmbH 製）を用いた。これらの化学構造式を Fig.1 に示した。各農薬 25mg をアセトンで溶解して 250 μ g/mL の標準原液を調製した。これらをアセトンで希釈して添加回収実験用の標準混合溶液を，さらに，アセトン-*n*-ヘキサン（1:4）で用時希釈して GC/MS 分析用標準溶液を調製した。また，LC/MS 分析用標準溶液は，アセトニトリルに溶媒置換して調製した。

2. 装置および測定条件

GC/MS：Agilent 社製 6890N 型ガスクロマトグラフおよび 5973inert 型質量分析計

LC/MS：Agilent 社製 1100 型液体クロマトグラフおよび質量分析計（SL）

測定条件は既報^{7,8)}のとおりである。

3. 試験溶液の調製

既報に従い^{5,6)}，Fig.2 に示す手順で行った。なお，添加回収実験は，各農薬の試料中濃度が 0.1 μ g/g となるように添加し，30 分放置後，抽出を開始した。また，標準溶液および内部標準溶液を添加しないブランク試料抽出液を調製し，この一部を濃縮乾固した後，機器分析用標準溶液で溶解して，マトリックス添加標準溶液とした。

III 結果および考察

1. GC/MS および LC/MS 分析の適用性

今回検討対象としたのは，2009 年 3 月までに標準品が入手できた 12 農薬である。このうち，GC/MS では 8 農薬が，LC/MS では，正イオン化モード（pos）で 10 農薬が，負イオン化モード（neg）で 6 農薬が測定できた。それらの保持時間，特徴的なフラグメントイオンお

CH₃CN Extraction

Sample 25 g + CH₃CN 60 mL
 (+water 20 mL for cereals)
 (+CH₃COONa 5 g for citrus fruits)
 internal standard soln.(5 ppm) 0.25 mL
 homogenize for 3 min
 filter with filter paper (No.5A)

ODS Clean-up

pass through ODS (1 g) cartridge

Salting-out

shake eluate with 2 M phosphate buffer (sat. Brine soln., pH7.0) 10 mL and NaCl 6 g
 dehydrate and evaporate
 adj. to 3 mL with *n*-hexane:acetone(1:1)
 centrifuge for 5 min

PSA Clean-up

load 2 mL aliquot on PSA (500 mg) cartridge
 add *n*-hexane:acetone(1:1) 3 mL \times 3
 collect all eluate and conc. to near dryness
 adj. to 2 mL with *n*-hexane:acetone(4:1)

Sample solution (5 g/mL)

(1 mL) GC/MS analysis
 (0.4 mL) LC/MS analysis
 Solvent exchange
 evaporate 0.4 mL
 dissolve with
 0.2 mL acetonitrile

Fig.2 Sample preparation method for multi-residue analysis
 Sample : Agricultural products

および検出下限値を Table 1 および 2 に示した。

GC/MS 分析では，オキサジアルギル，フルベンジアミド，マンジプロパミドおよびメタフルミゾンの 4 農薬で良好なピークが得られなかったが，それらを除く 8 農薬の分析が可能であった。LC/MS 分析では，12 農薬すべてに対応でき，このうち，アミスルブロム，フルベンジアミド，ベンチアバリカルブイソプロピルおよびメトコナゾールの 4 農薬は pos と neg の両モードで検出できた。

アミスルブロムの感度は LC/MS(pos) < LC/MS(neg) < GC/MS の順に上昇した。GC/MS では 5 倍濃縮，LC/MS では 10 倍濃縮の試験溶液を調製し，4 μ L を分析に供することにより，いずれの農薬についても，一律基準値に相当する 0.01 μ g/g の定量が可能であった。

Table 1 GC/MS analytical parameters

| Pesticide | Retention Time (min) | Monitor Ion (<i>m/z</i>) | | Detection Limit (ng) |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------|-----------|----------------------|
| | | Target | Qualifier | |
| Flonicamid | 10.51 | 174.0 | 146.0 | 0.005 |
| Fluopicolide | 27.94 | 209.0 | 347.0 | 0.021 |
| Metconazole | 29.65 | 125.0 | 250.1 | 0.018 |
| Orysastrobin | 30.16 | 116.1 | 205.1 | 0.007 |
| Orysastrobin(5 <i>Z</i> -isomer) | 30.41 | 116.1 | 205.1 | 0.007 |
| Cyflumetofen | 30.47 | 173.0 | 145.0 | 0.003 |
| Benthiavalecarb-isopropyl | 30.60 | 181.0 | 381.2 | 0.037 |
| Pyraclonil | 31.60 | 279.1 | 299.1 | 0.037 |
| Amisulbrom | 32.94 | 226.0 | 467.0 | 0.011 |

Table 2 LC/MS analytical parameters

| Pesticide | Retention Time (min) | Monitor Ion (<i>m/z</i>) | | Detection Limit (ng) |
|----------------------------------|-------------------------|--|-----------|-------------------------|
| | | Frag:100V | Frag:200V | |
| <Positive ionization mode> | | | | |
| Pyraclonil | 10.09 | 315.2 (M+H) ⁺ | 169.2 | 0.022 |
| Benthiavalicarb-isopropyl | 10.58 | 382.0 (M+H) ⁺ | 180.0 | 0.007 |
| Orysastrobil | 11.32 | 392.0 (M+H) ⁺ | 205.2 | 0.008 |
| Mandipropamid | 11.43 | 412.0 (M+H) ⁺ | 328.0 | 0.013 |
| Fluopicolide | 11.71 | 382.8 (M+H) ⁺ | 173.0 | 0.026 |
| Orysastrobil(5 <i>Z</i> -isomer) | 11.81 | 392.0 (M+H) ⁺ | 205.2 | 0.008 |
| Metconazole | 12.11 | 320.2 (M+H) ⁺ | 70.2 | 0.013 |
| Flubendiamide | 12.81 | 408.0 | 274.0 | 0.026 |
| Oxadiargyl | 13.78 | 358.1 (M+NH ₄) ⁺ | 341.1 | 0.093 |
| Amisulbrom | 14.45 | 467.8 (M+H) ⁺ | 227.0 | 0.235 |
| Cyflumetofen | 15.34 | 465.2 (M+NH ₄) ⁺ | 173.0 | 0.091 |
| <Negative ionization mode> | | | | |
| Flonicamid | 3.50 | 228.0 (M-H) ⁻ | 146.0 | 0.025 |
| Benthiavalicarb-isopropyl | 10.58 | 380.0 (M-H) ⁻ | 320.0 | 0.007 |
| Metconazole | 12.11 | 378.2 (M+CH ₃ COO) ⁻ | 235.2 | 0.012 |
| Flubendiamide | 12.81 | 680.8 (M-H) ⁻ | 254.0 | 0.008 |
| Amisulbrom | 14.45 | 359.0 | 67.2 | 0.057 |
| Metaflumizone | 14.81 | 505.0 (M-H) ⁻ | 302.0 | 0.013 |

2. 添加回収実験

12 種農薬を玄米，ほうれんそう，レモンに 0.1µg/g の試料濃度で添加したときの回収率を Table 3 に示した。通常の溶媒標準に対して算出した値とともに，マトリックス添加標準溶液で計算した値も合わせて示し，マトリックスの影響を調べた。

GC/MS 分析では，アミスルブロムの感度がレモン抽出液との共存で著しく低下した。また，シフルメトフェンの感度はほうれんそう抽出液との共存で低下し，ばらつきが大きくなった。このため，これら 2 種農薬の溶媒標準に対する回収率は低値を示した。フロニカミドには，マトリックスとの共存で注入口等への農薬の吸着が抑制される正のマトリックス効果が見られ，溶媒標準に対する回収率が高くなり，特にレモンで顕著であった。上記以外の回収率は溶媒標準に対して 81~118%，マトリックス添加標準に対して 77~116%，相対標準偏差は 10% 未満と良好であった。

一方，LC/MS 分析では，マトリックスの影響によるイオン化抑制が起こりやすく，ピラクロニルは試料がレモンの場合，マトリックス添加標準に比べて，溶媒標準で算出した回収率は，顕著に低かった。その他の回収率は，溶媒標準に対して 59~117%，マトリックス添加標準に対して 77~118% となり，シフルメトフェン，オキサジアルギルおよびフルオピコリドについても，マトリックス添加標準に比べて，溶媒標準に対する回収率に低下傾向がみられた。また，相対標準偏差は，アミスルブロムが，ほうれんそうでやや高い値を示したが，その他

は 10% 未満と良好であった。

実試料の分析においては，GC/MS 分析と LC/MS 分析を併用することで同定を確実にし，マトリックスの影響で両者の定量値に差が生じた場合は，マトリックス添加標準を用いた定量を行った。その結果，信頼性の高いデータが得られることがわかり，検討した 12 農薬すべてを多成分一斉分析法による日常検査の対象とすることができた。

なお，告示済みの新規 17 農薬中ペンチオピラド，シエノピラフェン，フルセトスルフロニ，クロラントラニリブロール，よう化メチルの 5 農薬については，標準品の市販に合わせて，現在，検討を進めている。

IV 結論

新規規制農薬 12 種（アミスルブロム，オキサジアルギル，オリサストロビンおよびその 5*Z* 異性体，シフルメトフェン，ピラクロニル，フルオピコリド，フルベンジアミド，フロニカミド，ベンチアバリカルブイソプロピル，マンジプロパミド，メトコナゾールおよびメタフルミゾン）に，既存の我々が開発した多成分一斉分析を適用することができた。玄米，ほうれんそう，レモンの 3 作物で添加回収実験を行った結果，GC/MS 分析と LC/MS 分析を併用することで，マトリックスの影響を補完的に抑え，さらに，マトリックス添加標準を用いた定量により，正確なデータを得られることがわかった。

Table 3 Recovery data of pesticides added to agricultural products

| Pesticide (0.1 µg/g added) | Brown rice | | | Spinach | | | Lemon | | |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------|------------|----------------------------|----------------------|------------|----------------------------|----------------------|------------|
| | Recovery (%) ^{a)} | | RSD (%) | Recovery (%) ^{a)} | | RSD (%) | Recovery (%) ^{a)} | | RSD (%) |
| | sol.st ^{b)} | mat.st ^{c)} | | sol.st ^{b)} | mat.st ^{c)} | | sol.st ^{b)} | mat.st ^{c)} | |
| <GC/MS> | | | | | | | | | |
| Amisulbrom | 117.4 | 96.5 | 2.7 | 117.9 | 116.2 | 8.4 | 11.1 | 87.2 | 9.8 |
| Benthiavdicarb-isopropyl | 112.0 | 100.5 | 2.7 | 109.6 | 93.2 | 2.6 | 94.4 | 82.6 | 0.3 |
| Cyflumetofen | 103.3 | 90.8 | 2.3 | 47.6 | 95.8 | 21.3 | 80.8 | 116.2 | 3.4 |
| Flonicamid | 125.7 | 104.2 | 3.7 | 112.6 | 105.2 | 2.8 | 197.6 | 105.1 | 4.0 |
| Fluopicolide | 105.9 | 99.8 | 3.4 | 106.0 | 97.1 | 2.5 | 98.6 | 90.7 | 0.4 |
| Metconazole | 100.7 | 96.1 | 1.4 | 101.5 | 85.2 | 1.1 | 98.2 | 76.9 | 2.4 |
| Orysastrobin | 113.2 | 104.0 | 2.3 | 107.3 | 105.9 | 2.0 | 102.4 | 97.9 | 2.1 |
| Orysastrobin (5 <i>Z</i> -isomer) | 109.6 | 105.5 | 2.7 | 100.1 | 105.7 | 1.6 | 95.0 | 97.5 | 1.2 |
| Pyraclonil | 108.2 | 100.1 | 2.5 | 110.1 | 95.1 | 1.7 | 98.1 | 81.7 | 0.4 |
| <LC/MS (Positive ionization mode)> | | | | | | | | | |
| Amisulbrom | 75.6 | 85.1 | 3.3 | 73.5 | 104.4 | 10.4 | 95.0 | 89.0 | 2.4 |
| Benthiavdicarb-isopropyl | 100.9 | 97.7 | 1.9 | 97.4 | 102.7 | 5.2 | 94.1 | 92.3 | 2.2 |
| Cyflumetofen | 86.5 | 100.7 | 3.3 | 68.3 | 94.9 | 7.2 | 58.6 | 105.4 | 4.9 |
| Flubendiamide | 77.3 | 102.5 | 1.6 | 98.8 | 98.8 | 4.0 | 91.4 | 95.7 | 5.0 |
| Fluopicolide | 69.5 | 84.2 | 2.9 | 87.4 | 109.2 | 2.4 | 83.7 | 96.1 | 4.0 |
| Mandipropamide | 92.0 | 100.2 | 4.6 | 85.6 | 93.5 | 7.6 | 85.0 | 82.1 | 3.3 |
| Metconazole | 76.0 | 96.7 | 1.9 | 82.8 | 107.5 | 1.6 | 83.0 | 83.0 | 8.2 |
| Orysastrobin | 107.6 | 102.3 | 3.5 | 105.2 | 106.9 | 4.3 | 106.4 | 102.7 | 3.2 |
| Orysastrobin (5 <i>Z</i> -isomer) | 95.5 | 101.6 | 9.2 | 96.4 | 107.5 | 2.5 | 96.2 | 102.1 | 1.8 |
| Oxadiazyl | 86.8 | 105.6 | 6.5 | 84.1 | 118.2 | 3.0 | 65.5 | 80.4 | 3.9 |
| Pyraclonil | 88.9 | 97.1 | 6.3 | 80.2 | 103.2 | 3.0 | 15.4 | 65.7 | 0.6 |
| <LC/MS (Negative ionization mode)> | | | | | | | | | |
| Amisulbrom | 108.5 | 83.5 | 5.0 | 116.7 | 92.9 | 14.0 | 94.6 | 77.4 | 4.2 |
| Benthiavdicarb-isopropyl | 112.4 | 103.9 | 4.0 | 105.3 | 96.1 | 5.7 | 86.0 | 78.5 | 6.5 |
| Flonicamid | 102.9 | 97.4 | 3.1 | 99.9 | 103.1 | 9.0 | 108.6 | 106.3 | 8.7 |
| Flubendiamide | 93.0 | 104.2 | 3.5 | 112.3 | 103.6 | 6.2 | 97.1 | 78.1 | 1.4 |
| Fluopicolide | 90.9 | 112.0 | 5.1 | 63.4 | 87.8 | 3.1 | 91.6 | 89.8 | 7.2 |
| Metaflumizone | 81.9 | 90.3 | 3.0 | 93.9 | 99.2 | 5.7 | 92.9 | 91.0 | 2.8 |

a) Average value of 3 trials. b) Recovery data calculated for solvent standard.

c) Recovery data calculated for matrix-matched standard.

文 献

- 1) 厚生労働省告示第 499 号：食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件，平成 17 年 11 月 29 日
- 2) 厚生労働省告示第 422 号：食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件，平成 21 年 9 月 28 日
- 3) 厚生労働省医薬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試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号，別添（最終改正：平成 21 年 6 月 26 日）
- 4) 秋山由美，矢野美穂，三橋隆夫，武田信幸，辻正彦：固相抽出法を用いた農産物中残留農薬の GC/MS による多成分一斉分析，食衛誌，**37**，351-362（1996）
- 5) 秋山由美：GC/MS、LC/MS を用いた農産物中の残留農薬の一斉分析法，今月の農業 **51**，50-55（2007）
- 6) Y. Akiyama, N. Yoshioka and T. Matsuoka: "Pesticide Chemistry" ed. by H. Ohkawa, H. Miyagawa and P. W. Lee, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 395-399, 2007.
- 7) 秋山由美，松岡智郁，吉岡直樹：農薬等 432 種の GC/MS 測定に用いる保持時間，モニターイオン等の分析情報，兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要第 4 号，104-115（2007）
- 8) 松岡智郁，秋山由美，吉岡直樹：農薬等 154 種の LC/MS 測定に用いる保持時間，モニターイオン等の分析情報，兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要第 4 号，97-103（2007）