ノート

データベースソフトウェアを用いた GC/MS による
農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法の検討

(平成 19 年 12 月 14 日受理)

上野 英二* 梶島 由佳 大島 晴美 大野 勉

Multiresidue Analysis of Pesticides in Agricultural Products
by GC/MS Coupled with Database Software

Eiji UENO*, Yuka KABASHIMA, Harumi OSHIMA and Tsutomu OHNO

Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6 Nagare, Tsuji-machi,
Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan; * Corresponding author

We evaluated a multiresidue method for determination of pesticides in agricultural products by SCAN mode GC/MS coupled with three kinds of database for 253 pesticides: relative retention time, mass spectra and calibration curve (SCAN method). Twenty-six pesticides, a total of 131 pesticides were detected in samples by the SCAN method. The detection results agreed closely with those of the SIM mode GC/MS method using calibration standards (SIM method). The ratios of the SCAN method to the SIM method ranged from 0.3 to 3.1 with SD values of 0.63. It was judged that the SCAN method could be applied to the screening analysis of pesticide residues in agricultural products, provided that the sample preparation method makes it possible to effectively remove sample matrixes with minimal loss of analytes.

(Received December 14, 2007)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 農産食品 agricultural product; ガスクロマトグラフィー gas chromatography (GC); 質量分析法 mass spectrometry (MS); スキャン SCAN; 選択イオンモニタリング selected ion monitoring (SIM); データベースソフトウェア database software

緒言

食品衛生法改正による残留農薬規制等のポジティブリスト制度が 2006 年 5 月 29 日から導入され、GC/MS による多成分一斉分析法が普及してきている。しかし、高い分離能力を有する SIM モード GC/MS であっても、農産食品中の 100 種類を超えるような農薬成分を一斉に測定して精度良く定量することは困難である。そのため著者らは、残留実態に即した 100 種類程度の農薬成分を選択した上で、簡便で効率の高いアセトニトリル抽出/水層分離法、農薬成分の損失が少なく、かつ妨害成分を効率良く除去する GPC (gel permeation chromatography, ゲル浸透クロマトグラフィー) の選別分画と SPE (solid-phase extraction, 固相抽出) を効果的に組み合わせた精製法、農薬成分の安定同位体を内標準とする SIM モード GC/MS (以下、SIM 法) などを用いて、頑健性を有し、定量性に優れる多成分系統分析法¹⁾を作成している。

今回、SIM 法で対象としていない農薬成分についても

スクリーニング分析を可能とするために、253 種類の農薬成分の保持時間、マススペクトルおよび検量線情報が登録しており、定性・定量用の標準品測定を行うことなく、残留農薬の有無、およその濃度を確認することができるデータベースソフトウェアを用いた SCAN モード GC/MS による多成分一斉分析法 (以下、SCAN 法) を作成して、日常の残留分析への応用を試みたので、その検討結果について報告する。

実験方法

1. 試料

農産食品として市販の生鮮野菜・果実類およびその水煮などの加工品を用いた。

2. 試薬および標準品

試薬は、和光純薬工業(株)の残留農薬試験用、水は脱イオン水を蒸留したものを用いた。

標準品および内標準品は、和光純薬工業(株)および林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い、アセトン-ヘキサン (50:50) で適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。n-アルカン溶液、内標準溶液および GC/MS 性能評価

* 連絡先

愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

標準溶液は、林純薬工業(株)のそれぞれ *n*-アルカン混合標準溶液 II (C7~C33)、内部標準混合溶液 II およびクライテリアサンプル混合溶液を用いた。

グラファイトカーボン SPE カラムは、ガラスリザーバー (Varian 社製, 8.5 mL) に、グラファイトカーボン (Supelco 社製 Supelclean ENVI-Carb)-微結晶セルロース (Merck 社製 Avicel) 混合物 (25 : 75) 0.5 g, 次いで無水硫酸ナトリウム 1 g を充てんしたものを GPC/SPE 装置のコレクター部に装着して用いた¹⁾。シリカゲル/PSA SPE カラムは、Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA (500 mg) の手前に Waters 社製 Sep-Pak Plus Silica (690 mg) を連結して用いた¹⁾。

3. 装置および条件

GPC/SPE 装置: (株)島津製作所製 GPC クリーンナップシステムを用いた。GPC 条件は、既報¹⁾ に準じて設定した。

GC/MS 装置: (株)島津製作所製 GCMS-QP2010 システム (島津ワークステーション GCMSsolution 付) に、Restek 社製の不活性処理済インサート (Custom Shimadzu liner), J & W 社製 DB-5 ms カラム (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m) を装着して用いた。SIM 法の測定条件は、既報¹⁾ に準じて設定した。SCAN 法の測定条件は、注入口温度 250°C, カラム温度プログラム 40°C (2 min) $\rightarrow$ 8°C/min $\rightarrow$ 310°C (5 min), キャリヤーガス He, キャリヤーガス線速度 40 cm/sec, インターフェース温度 300°C, イオン源温度 200°C, イオン化法 EI, チューニングメソッド US EPA method 625, スキャン範囲 33 ~ 600 amu, インターバル 0.3 sec, 注入量 1 μ L に設定した。

データベースソフトウェア: (株)島津製作所製 Compound Composer Ver. 1.1, データベース (農薬 253 成分), および林純薬工業(株)の農薬 MS ライブラリー 2006 を用いた。あらかじめ *n*-アルカン溶液を測定して保持時間を求めておき, Compound Composer を用いて登録してある農薬成分の保持時間を *n*-アルカンとの相対値を用いた保持指標 (リテンションインデックス) により修正したのち, データベースを島津ワークステーション

GCMSsolution に読み込んでデータ解析に使用した。

4. 試験操作

a. 抽出

細切試料 20 g から既報²⁾ に準じて抽出し, アセトン-シクロヘキサン (20 : 80) で 8 mL に定容して試料原液とした (Table 1)。

b. 精製

試料原液を 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離後, 上清 4 mL を既報¹⁾ に準じて GPC の選別分画およびグラファイトカーボン SPE により精製し, さらにシリカゲル/PSA SPE により精製したのち, アセトン-ヘキサン (50 : 50) で 2 mL に定容して試験原液 (試料濃度 5 g/mL) とした (Table 1)。

c. 測定および解析

SIM 法では, 試験原液 100 μ L に内標準としてアセフェート-*d*₆ をはじめ 14 種類の安定同位元素標識農薬の混合溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L をシリンジスパイクして試験溶液とし, GC/MS 測定した¹⁾。

SCAN 法では, 試験原液 100 μ L に内標準として 4-クロロトルエン-*d*₄, 1,4-ジクロロベンゼン-*d*₄, ナフタレン-*d*₈, フェナントレン-*d*₁₀, アセナフテン-*d*₁₀, フルオランテン-*d*₁₀, クリセン-*d*₁₂ およびピリレン-*d*₁₂ の混合溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L をシリンジスパイクして試験溶液とし, GC/MS 測定した。ワークステーションのデータ解析画面上で, 253 種類の農薬成分テーブル, および農薬成分ごとに定量用イオンの SIM クロマトグラムを表示させ, ピークを自動認識させるとともにバックグラウンド補正された MS スペクトルを表示させた。目視により保持時間, ピーク形状, QP-2010 で測定されデータベース登録してある農薬成分のマススペクトル, イオン比, および市販の農薬 MS ライブラリーを用いたシミラリティー検索での標準マススペクトルとの類似度を確認することにより定性し, ベースラインが不適切な場合には切り直してピーク面積を再計算したのち, データベース登録してある検量線 (およそ 0.01 ~ 1 μ g/g) により保持時間の近い内標準を農薬成分に割り当てる内標準法を用いて定量した。

Table 1. Present method and QuEChERS method

	Present method	QuEChERS method
Sample volume	20 g	10 g
Internal standard	Stable isotopes	Triphenyl phosphate
Extraction, volume	Acetonitrile, 60 + 20 mL	Acetonitrile, 10 mL
Method	Homogenization	Shaking
Salting-out	NaCl 7 g, phosphate buffer (pH 7.0)	Anh. MgSO ₄ 4 g, NaCl 1 g
Concentration	Rotary vacuum evaporation	—
Re-extraction	Ethyl acetate	—
Dehydration	Anh. Na ₂ SO ₄	Anh. MgSO ₄
Clean-up 1	GPC/graphitized carbon column SPE	PSA dispersive SPE
Clean-up 2	Tandem silica gel/PSA column SPE	—
Sample solution	Acetone-hexane (50 : 50)	Acetonitrile
Concentration	ca. 5 g sample/mL	ca. 1 g sample/mL

Table 2. GC/MS performance test

Compound ^{a)}	Present method		QuEChERS method	
	Retention time	Peak height	Retention time	Peak height
	after ^{b)} –before, min	after/before, %	after–before, min	after/before, %
Isoxathion	–0.004	90.4	0.047	5.9
Captafol	–0.007	102.9	0.039	13.3
<i>p,p'</i> -DDT	–0.007	99.8	0.033	67.3
2,4-Dinitro-benzenamine	–0.008	92.4	0.047	35.2
Pentachlorophenol	–0.010	93.7	0.037	51.9
Simazine	–0.004	98.9	0.023	69.3
Fenitrothion	–0.008	86.9	0.038	44.5
Chlorpyrifos-methyl	–0.005	97.3	0.021	79.0

^{a)} Each compound (1 µg/mL×1 µL) was injected into the SCAN mode GC/MS system.

^{b)} Each compound was injected after the 10th injection of a spinach extract.

Table 3. Pesticide residues found in agricultural products by the SCAN method, and the ratio to the SIM method

Pesticide residue	No. of found	Residue found, µg/g		Ratio to SIM method		Representative commodity
		Range	Average	Range	Average	
Chlorfenapyr	21	0.01–0.04	0.02	0.6–1.0	0.9	Egg plant
Cypermethrin	14	0.04–0.19	0.12	0.8–1.0	0.9	Spinach
Iprodion	12	0.02–0.19	0.11	0.3–0.8	0.5	Tomato
Chlorpyrifos	11	0.01–0.44	0.15	1.0–2.0	1.3	Apple
Fenvalerate	11	0.01–0.10	0.06	0.5–0.9	0.7	Apple
Kresoxim-methyl	9	0.01–0.22	0.06	0.3–1.4	0.8	Apple
Procymidone	7	0.03–0.14	0.08	1.0–1.9	1.5	Cucumber
Cyhalothrin	5	0.01–0.04	0.02	0.5–1.7	1.0	Apple
Fenpropathrin	5	0.01–0.15	0.09	0.3–1.0	0.7	Apple
Captan	4	0.01–0.08	0.04	0.3–3.0	1.7	Egg plant
Buprofezin	3	0.02–0.12	0.07	0.7–1.7	1.2	Pear
Chlorothalonil	3	0.01–0.18	0.07	0.4–2.7	1.7	Green perilla
Diazinon	3	0.05–0.10	0.08	0.5–1.0	0.8	Kiwifruit
Etofenprox	3	0.05–0.54	0.30	0.8–2.5	1.6	Peas with pods
Permethrin	3	0.05–1.2	0.85	0.4–1.8	1.1	Peas with pods
Pyridaben	3	0.01–0.03	0.02	1.0–3.0	2.0	Tomato
Tebufofenpyrad	3	0.01–0.05	0.03	0.3–1.0	0.7	Apple
Metalaxyl	2	0.02–0.04	0.03	0.3–0.8	0.5	Qing gin cai
Methidathion	2	0.08–0.67	0.38	0.7–1.3	1.0	Iyo orange
Deltamethrin	1	0.09		0.6		Litchi
Difenoconazole	1	0.02		0.3		Persimmon
Fenarimol	1	0.02		0.3		Apple
Fenitrothion	1	0.01–0.02		1.0		Iyo orange
Fludioxonil	1	0.01		1.0		Grape
Mepanipyrim	1	0.24		–		Tomato
Tolclofos-methyl	1	2.4		3.1		Lettuce
Total	131	0.01–2.4	0.11	0.3–3.1	0.98	

“–” not tested

結果および考察

1. GC/MS 性能評価試験

定性・定量結果に影響を与える大きな要因として、GC/MS 装置の汚染や劣化が挙げられる。特に SCAN 法では装置の状態が良好に保たれる必要があると考えられた。そこで、本試料調製法、および対照として精製操作などを簡略化した試料調製法の代表として QuEChERS 法^{3), 4)} (Table 1) により得られたハウレンソウの試験溶液について、それぞれ 10 回連続して測定する GC/MS 装置の性能評価試験を実施した。すなわち、50%アセトン/ヘキサン溶液、性能評価標準溶液、ハウレンソウの試験溶液 (10

回連続)、50%アセトン/ヘキサン溶液、次いで性能評価標準溶液の順に測定し、測定後の性能評価標準品ピークの保持時間の遅れと減衰について検証した。なお、性能評価標準には、GC/MS 装置の汚染部位などにより感度低下を起こしやすいものを選択した^{*1}。

その結果を Table 2 に示したように、QuEChERS 法では、注入口インサートやカラム先端部分へのクロロフィル色素の付着などによって感度低下を起こしやすいイソキサ

*1 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全・安心確保推進研究事業「検査機関の信頼性確保に関する研究」平成 18 年度総括・分担研究報告書, p. 29, 69–71, 108 (2007)。

チオン、カブタホールおよび *p,p'*-DDT、カラムの不活性度の低下などによって感度低下を起こしやすい 2,4-ジニトロアニリン、ペンタクロロフェノールおよびシマジン、イオン源の汚染などによって感度低下を起こしやすいフェントロチオンで測定後のピーク強度が著しく減衰した。このように QuEChERS 法は、酢酸エチル不溶物を除去するといった濃縮後の溶媒置換などがないために、試験溶液中に夾雑物が多く残存しやすく、試料によっては GC/MS 装置の汚染などが予想以上に進むものと考えられた。これに対して本試料調製法は、およそ 5 倍濃縮の試験溶液を用いながら保持時間の遅れがなく、ピーク強度の減衰率も低いレベルにあり、GC/MS 装置の汚染などが少ないことが確認されたことから、SCAN 法にとって適切な試料調製法であると考えられた。なお、SIM 法で対象としている農薬成分¹⁾の SCAN 法での検出限界 ($S/N=3$) の多くは 0.002~0.01 g/g の範囲にあった。

2. 市販農産食品への応用

2006 年 1 月~6 月に、野菜・果実類など 102 検体 (20~30 検体/回) の残留モニタリングを実施し、SCAN 法により 26 種類の農薬成分、延べ 131 成分を検出した (Table 3)。検出された農薬成分は、実験方法に示した手法による確認が困難な場合、その農薬成分の GPC 溶出画分のみを選択的に分取して SPE により精製する選択的 GPC/SPE 法²⁾を用いて高度に精製/濃縮したのち、異なる分離カラムを装着したシングルインジェクションデュアルカラム GC-NPD/FPD³⁾などで確認した。EI モード GC/MS では感度の低いシベルメトリンや選択性の高いイオンが見当たらないクロルフェナピルなどにおいて SCAN 法により同定が困難となる場合も見受けられたが、SCAN 法と SIM 法の定性結果は良く一致した。また、SIM 法の対象としていなかったトマト中メパニピリムを除く延べ 130 成分について、SCAN 法と SIM 法で得られた両分析値を比較したところ、Table 3 に示したように (SCAN 法/SIM 法) 比は 0.3~3.1 (平均値 0.98, 標準偏差 0.63, 相関係数 0.89) と、SCAN 法は半定量法としておおむね満足すべき範囲にあった。農薬成分の損失が少なく、精製度が高く、かつ試料濃縮倍率の高い試験溶液が得られる試料調製法を採用することによって、SCAN 法はスクリーニング分析法としての実用性が示唆される結果が得られた。

SCAN 法は、定量法としてまだ検討すべき点が多い。しかし、日常の残留分析において複雑な標準品の使用などを大きく低減できる。また、健康危機管理状況下での未知成分の同定および、およその濃度を確認できると考えられ、今後の発展的展開が期待される。

ま と め

253 種類の農薬成分が登録しており、標準品測定を行うことなく、残留農薬の有無、およその濃度を確認することができるデータベースソフトウェアを用いた SCAN モード GC/MS による農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法を作成し、残留分析への応用を試みた。その結果、適切な試料調製法を採用することによって、本法はスクリーニング分析法としての実用性が示唆される結果が得られた。

文 献

- 1) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. *J. AOAC Int.*, **87**, 1003-1015 (2004).
- 2) Ueno, E., Oshima, H., Matsumoto, H., Saito, I., Tamura, H. Determination of spinosad in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection after gel permeation chromatography and solid-phase extraction cleanup on a 2-layered column. *J. AOAC Int.*, **89**, 1641-1649 (2006).
- 3) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, **86**, 412-431 (2003).
- 4) Lehotay, S. J., Kok, A., Hiemstra, M., Bodegraven, P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **88**, 595-614 (2005).
- 5) Ueno, E. Application of dual column GC for pesticide residues analysis in foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, J-299-J-304 (2006).