報 文

NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による
畜水産物中残留農薬の多成分分析

(平成 20 年 5 月 26 日受理)

上野 英二* 梶島 由佳 大島 晴美 大野 勉

Multiresidue Analysis of Pesticides in Animal and Fishery Products
by NCI mode GC/MS and Dual-column GC-micro ECD

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

A sensitive and quantitative multiresidue method using NCI mode GC/MS and GC-micro ECD for determining pesticides in animal and fishery products was established. The crude sample extract obtained by acetone-hexane extraction for solid samples or acetonitrile extraction for liquid samples was cleaned up with a GPC/SPE system. The first GPC pesticide fraction containing lipids and pigments was selectively collected, and loaded directly onto a graphitized carbon/PSA 2-layered column. After the second GPC pesticide fraction was collected, the 2-layered column was eluted with acetone-hexane (3:7). The combined eluate was subjected to NCI-SIM/Scan mode GC/MS for semi-quantification. After fractionation by Florisil cartridge column SPE, each fraction was subjected to dual-column GC-micro ECD for quantification. Average recoveries ($n=5$) of pesticides, except for chlorothalonil and some others, from fortified samples ranged from 76.8% to 107.9% with RSD values of <9.7%.

(Received May 26, 2008)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 畜水産物 animal and fishery product; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC); 固相抽出 solid-phase extraction (SPE); 負化学イオン化 negative chemical ionization (NCI); ガスクロマトグラフィー gas chromatography (GC); 質量分析法 mass spectrometry (MS); マイクロ電子捕獲型検出器 micro-electron capture detector (micro ECD)

緒 言

食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度が、平成 18 年 5 月 29 日より導入され、畜水産物に対しても農薬成分の基準値が設定された*¹。これに対応するために、厚生労働省から EI (electron ionization, 電子イオン化) モード GC/MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物) (以下、通知法) などが通知されている*²。しかし、EI モード GC/MS は、塩素系やピレスロイド系など電子親和性の高い農薬成分に対して感度が低い場合が多い。その

上、基準値の多くは 0.1 ppm 以下であり、畜水産物から抽出される大量の脂質成分などの影響もあって、性状多岐にわたる多くの残留農薬を確実に定性し、精度良く定量することが困難となる場合も少なくない。著者らは、平成 4 年度より厚生省 (現・厚生労働省) の畜産物中残留農薬の実態調査などに協力しながら、GPC (gel permeation chromatography, ゲル浸透クロマトグラフィー), SPE (solid-phase extraction, 固相抽出), およびデュアルカラム GC-ECD などを組み合わせた多成分系統分析法^{1)~3)}、*³を開発している。

そこで今回、さまざまな畜水産物に対応可能な頑健性を有し、特に、高感度かつ定量性に優れた多成分系統分析法を構築するために、電子親和性の高い農薬成分を選択的に

* 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

*¹ 厚生省告示第 370 号 (1959) “食品、添加物等の規格基準” 昭和 34 年 12 月 28 日。*² 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 (2005)。*³ 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 “食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究” 平成 18 年度総括・分担研究報告書, p. 11-21 (2007)。

Fig. 1. Graphitized carbon-PSA two-layered column SPE after GPC

感度良く検出可能な NCI (negative chemical ionization, 負化学イオン化) モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD (以下, GC- μ ECD) を用いた多成分分析法について検討したところ, その有用性が確認されたので報告する。

実験方法

1. 試料

牛肉, 豚肉, 鶏肉などの食肉, サケ, シジミ, エビなどの魚介類, 牛乳, 鶏卵などは愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬および標準品

試薬は和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用, 水は脱イオン水を蒸留し, ヘキサンで洗浄したものを用いた。

標準品は和光純薬工業(株)製および林純薬工業(株)製の残留農薬試験用を用い, 原則としてトルエンに溶解して 1 mg/mL 標準原液とし, アセトン-ヘキサン (5:95) で適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。また, 標準原液を 2 グループに分けてアセトンで希釈し, 添加回収試験用の混合標準溶液とした (Table 2)。

グラファイトカーボン/PSA 二層式 SPE カラムは, Fig. 1 に示したようにリザーバー (Varian 社製 Bond Elut Reservoir, 8.5 mL, フリット付) に, PSA (Varian 社製 Bondesil PSA) 1,000 mg, グラファイトカーボン (Supelco 社製 Carbotrap C, 表面積 10 m²/g)-微結晶セルロース (Merck 社製 Avicel) (20:80) 200 mg, 次いで無水硫酸ナトリウム 1,000 mg を乾式充てんし, 流量調整管 (Supelco 社製 Valve Liner) を付け, GPC/SPE 装置に装着して用いた。フロリジルカートリッジカラムは, 和光純薬工業(株)製の Presep-C Florisil (750 mg) を用いた。

3. 装置および条件

吸引ろ過装置: 125 mL 容の円筒形分液漏斗に減圧用連結管, 次いで桐山ロート (60 mm ϕ , No. 5A ろ紙) を装着し, これを 12 連装できる木製の専用スタンドで固定して用いた^{2), 4)}。

試料濃縮装置: Büchi Labortechnik 社製の多検体エバポレーター Syncore Analyst (200 mL 容の濃縮管, 200 mL 容の貯留槽 (0.5 mL) 付き濃縮管, 12 検体ラック, 還流モジュール, ポンプ V-500, バキュームコントローラー V-805 付), およびロータリーエバポレーター Rotavapor (ポンプ V-700, バキュームコントローラー V-855 付) を用いた。

GPC/SPE 装置: ジーエルサイエンス(株)製の G-Prep GPC 8100 Single システム (脱気ユニット, 溶媒添加モジュールおよび SPE ラック付きフラクションコレクター/ポンプ, 内径 1 mm, 長さ 7 m のプレヒート配管および内径 0.5 mm, 長さ 1 m のポストヒート配管付きカラムオープン, オートサンプラー Midas Prep, UV-VIS 検出器 UV 702, コントロールソフトウェア GP-Link for GPC 付) に, スチレンジビニルベンゼン共重合体のハードタイプゲル (粒径 16 μ m, ポアサイズ 30 Å) を充てんした分離カラム (10 mm i.d. $\times$ 25 cm, 特注品) (昭和電工(株)製) を 2 本連結して装着し, 以下の条件により用いた。カラム温度 40°C, 溶出液アセトン-シクロヘキサン (15:85), 流速 2 mL/min (0-14 min) $\rightarrow$ 3.2 mL/min (14-23 min) $\rightarrow$ 2 mL/min (23-25 min), 測定波長 254 nm。

GC/MS 装置: (株)島津製作所製の GCMS-QP 2010 (オートインジェクター AOC-20i, オートサンプラー AOC-20s, ワークステーション GCMSsolution 付), カラム Restek 社製 Stx-CLPesticides2 (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.20 μ m, 5 m ガードカラム付), Restek 社製のインサー

ト (3.5 mm i.d., テーパー型), 注入口温度 250°C, カラム温度プログラム 80°C (1 min)→20°C/min→180°C→4°C/min→300°C (7 min), インターフェイス温度 300°C, イオン源温度 200°C, イオン化法 NCI, イオン化電圧 70 eV, 試薬ガスメタン, キャリヤーガスヘリウム, キャリヤーガス線速度 40 cm/sec, 注入量 2 μ L, 測定モード (インターバル) SIM/スキャン同時取込 (0.2/0.3 sec), スキャン範囲 60~400 m/z.

GC- μ ECD 装置: Agilent Technologies 社製の 6890 GC plus (オートサンプラー 7673, GC ケミステーション付), シングルインジェクション-デュアルカラム① Restek 社製 Stx-CLPesticides (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μ m) ② Restek 社製 Stx-CLPesticides2 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.20 μ m), Restek 社製のガードカラム (0.32 mm i.d.×2 m), Y コネクターおよびインサート (4 mm i.d., テーパー型), 注入口温度 250°C, カラム温度プログラム 80°C (1 min)→20°C/min→180°C→4°C/min→280°C (12 min), 検出器温度 300°C, キャリヤーガスヘリウム, キャリヤーガス圧力プログラム 300 kPa (1 min)→108 kPa→8 kPa/min→148 kPa→1.6 kPa/min→188 kPa (12 min), メイクアップガス窒素, メイクアップガス流量 30 mL/min, 注入量 2 μ L.

4. 試験操作

a 抽出 (固体試料)

食肉, 魚介類などの固体試料は, 必要により肉ひき機ですじ切りし, フードカッターで細切均一化した 20 g を量り採り, 水 10 g を加えてホモジナイズしたのち, アセトン-ヘキサン (40:60) 100 mL を加えてホモジナイズ抽出した. 3000 回転/分で 5 分間遠心分離後, 上層 (ヘキサン層) を濃縮管に分取した. 残さはさらにヘキサン 50 mL で抽出し, 遠心分離した. 上層を合わせ, 水平方向に円運動する多検体エバポレーターでかくはんしながら適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 5 分間脱水し, 貯留槽 (0.5 mL) 付き濃縮管にろ過後, 無水硫酸ナトリウムをヘキサン 10 mL で 2 回洗浄し, ろ液を合わせた. ろ液は多検体エバポレーターで減圧濃縮後, 残さをアセトン-シクロヘキサン (15:85) で 10 mL に定容し, 試料原液とした.

b 抽出 (液体試料)

牛乳, 鶏卵などの液体試料は, 必要によりフードカッターでかくはん均一化した 10 g を量り採り, アセトニトリル 70 mL を加えてホモジナイズ抽出した. 3,000 回転/分で 5 分間遠心分離後, 吸引ろ過装置を用いて, あらかじめ塩化ナトリウム 5 g および 1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7) 5 mL を加えておいた 125 mL 容の円筒形分液漏斗中に吸引ろ過した. 残さはアセトニトリル 20 mL で洗い込み, 吸引ろ過した. 振とう機で 5 分間振とう後, 静置し, 分離したアセトニトリル層を濃縮管に分取して多検体エバポレーターで減圧濃縮した. 残さは水平方向に円運動する多検体エバポレーターでかくはんしながら, 酢酸エチル 50 mL を加えて溶解し, 適量の無水硫酸ナトリウムを

加えて 5 分間脱水後, 貯留槽 (0.5 mL) 付き濃縮管にろ過した. 無水硫酸ナトリウムは, 酢酸エチル 10 mL で 2 回洗浄し, ろ液を合わせた. ろ液は多検体エバポレーターで減圧濃縮後, 残さをアセトン-シクロヘキサン (15:85) で 5 mL に定容し, 試料原液とした.

c 精製

試料原液中の残さが 2 g (液体試料では 1 g) を超える場合には, 残さの GPC への負荷量が 0.25 g になるようにアセトン-シクロヘキサン (15:85) でさらに希釈した. 試料原液を 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離後, 上清 1.25 mL を GPC/SPE 装置に注入し, 次のとおり操作した. Fig. 1 に示したように, ①GPC カラムからの 10.2~14 分 (20.4~28 mL) の画分はグラファイトカーボン/PSA 二層式 SPE カラムを通過させて 50~100 mL 容のナスフラスコ中に分取した. 次いで, ②14~23 分 (28~56.8 mL) の画分は 50 mL 容のトルビーカー中に直接分取した. その後コレクターヘッドをグラファイトカーボン/PSA 二層式 SPE カラム上に戻し, ③溶媒添加モジュールでアセトン-ヘキサン (30:70) 15 mL を添加してグラファイトカーボン/PSA 二層式 SPE カラムから①のナスフラスコ中に溶出した. トルビーカー中の試料溶液をナスフラスコ中に合わせたのち, ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し, アセトン-ヘキサン (5:95) で 1 mL に定容して GC/MS 用の試験溶液とした.

この試験溶液 0.4 mL をフロリジルカートリッジカラムに負荷し, ジエチルエーテル-ヘキサン (50:50) 20 mL, 次いでアセトン-ヘキサン (30:70) 20 mL で溶出した. 各溶出液はそれぞれロータリーエバポレーターで減圧濃縮後, アセトン-ヘキサン (5:95) で 1 mL に定容して GC- μ ECD 用の試験溶液 (第 1 画分, 第 2 画分) とした.

d 定性および定量

GC/MS ワークステーションのデータ解析画面上で, SIM クロマトグラムと MS スペクトルを表示させ, 目視により保持時間, イオンの強度比, および MS ライブラリーを用いたシミュラティーフ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たのち, 絶対検量線法により定量して参考値とした.

次いで, GC- μ ECD ワークステーションのデータ解析画面上で, 混合標準溶液と試験溶液 (第 1 画分, 第 2 画分) のクロマトグラムをそれぞれ並列させ, 目視により保持時間, 溶出画分, およびテーリングの有無などピーク形状を確認することにより定性したのち⁵⁾, 原則として Stx-CLPesticides2 カラムから得られたクロマトグラムを用いて, 絶対検量線法により定量した. なお, 各異性体, および第 1 画分, 第 2 画分の両方に溶出する農薬成分 (Table 1) については, ピーク面積の和により定量した.

結果および考察

1. 対象農薬と分析法

著者らが 2006 年 9 月~2007 年 8 月に, 肉類, 魚介

Table 1. Retention time, monitor ion, detection limit, and elution of compounds from GPC and the SPE columns

Compound	NCI mode GC/MS					Dual-column GC- μ ECD			GPC elution volume (mL)	Elution rate ^b (%)		
	RT (min)	Ion set	Monitor ion (<i>m/z</i>)		Detection limit ^a (ng/g)	RT (min)		Detection limit (ng/g)		Carbotrap C/ Bondesil-PSA column	Presep-C Florisil	
			Target	Qualifier		Stx-CLP (μ ECD1)	Stx-CLP2 (μ ECD2)				Frac. 1	Frac. 2
Beef tallow									15–24			
Mackerel oil									15–26			
Stearic acid									17–21	0		
Palmitic acid									18–22	0		
Decanoic acid									21–25	0		
Octanoic acid									22–26	0		
Astaxanthin									18–22	0		
α -HCH	11.42	1	70.9	72.9	0.005	9.30	10.98	0.007	28–32	93	95	0
Diazinon	12.47	1	169.0	170.0	0.1	10.22	11.99	0.1	23–27	92	96	0
γ -HCH	12.57	1	70.9	72.9	0.01	10.06	12.07	0.008	29–33	93	94	0
β -HCH	12.87	1	70.9	72.9	0.009	10.31	12.35	0.02	27–31	95	95	0
Dimethoate	13.03	1	157.0	159.0	0.05	10.96	12.51	0.1	35–39	96	0	81
Cyanophos	13.54	1	134.0	141.0	0.003	11.70	13.00	0.02	33–37	93	94	0
δ -HCH	13.87	1	70.9	72.9	0.02	10.76	13.30	0.01	26–30	99	95	0
Chlorothalonil	14.50	2	265.9	263.9	0.004	12.38	13.92	0.03	35–39	88	75	19
Chlorpyrifos-methyl	14.62	2	211.8	213.9	0.03	11.73	14.03	0.02	29–34	96	97	0
Vinclozolin	14.82	2	241.0	243.0	0.002	13.23	14.23	0.02	26–30	97	101	0
Tolclofos-methyl	15.01	2	249.9	251.9	0.06	12.06	14.41	0.03	30–34	98	99	0
Chlorpyrifos	16.19	3	312.9	314.9	0.04	13.05	15.53	0.03	26–30	100	94	0
Fenitrothion	16.42	3	168.0	277.0	0.2	14.01	15.76	0.04	32–36	102	98	0
Malathion	16.46	3	157.0	172.1	0.2	13.86	15.81	0.2	27–31	97	93	0
<i>p,p'</i> -Dichlorobenzophenone ^c	16.55	3	249.9	251.9		13.36	15.86					
Triadimefon	16.71	3	127.0	129.0	0.03	14.50	16.03	0.04	25–29	93	16	78
Fthalide	18.14	4	271.8	269.8	0.008	14.82	17.39	0.01	38–43	86	38	59
Bromophos-ethyl	18.36	4	357.8	355.8	0.1	14.96	17.62	0.02	25–29	96	96	0
Phenthoate	18.57	4	157.0	159.0	0.1	14.82	17.83	0.1	29–33	99	98	0
Triflumizole	18.68	4	286.0	288.0	0.3	16.95	17.94	0.1	23–28	97	0	102
α -Endosulfan	18.81	4	241.8	239.8	0.06	15.27	18.04	0.01	26–30	97	100	0
Procymidone	19.04	4	282.0	283.0	3	16.90	18.28	0.05	27–31	99	95	0
Captan	19.25	4	150.1	149.1	0.3	15.35	18.47	0.08	33–37	99	79	14
<i>p,p'</i> -DDE	19.36	4	317.9	315.8	4	15.26	18.63	0.01	26–30	96	98	0
Prothiophos	19.38	4	300.8	302.8	0.1	15.67	18.64	0.03	25–29	94	99	0
Hexaconazole	19.81	5	257.0	259.0	0.5	16.39	18.93	0.1	25–29	97	0	94
Dieldrin	19.90	5	345.8	343.8	4	16.09	19.08	0.01	28–32	98	95	0
Buprofezin	20.23	5	136.0	137.0	0.7	16.40	19.43	0.7	24–28	95	93	0
Flutolanil	20.41	5	303.0	322.0	3	17.60	19.58	0.5	23–28	98	97	0
Oxadiazone	20.41	5	344.0	346.0	0.2	18.03	19.62	0.07	22–27	97	97	0
Kresoxim-methyl	20.94	6	174.1	107.0	0.1	16.00	20.13	0.05	28–33	89	94	0
Endrin	21.09	6	271.9	273.9	2	16.86	20.23	0.03	28–32	97	98	0
Isoprothiolane	21.14	6	262.0	264.0	0.09	16.60	20.31	0.05	31–35	94	5	95
Isoxathion	21.60	6	169.0	170.0	0.2	18.08	20.76	0.1	28–32	98	96	0
Myclobutanil	21.70	6	288.1	290.0	1	18.80	20.86	0.3	27–31	98	0	93
<i>p,p'</i> -DDD	21.73	6	70.9	72.9	0.3	17.34	20.87	0.02	26–30	96	97	0
β -Endosulfan	21.96	6	241.9	239.8	0.2	17.67	21.08	0.02	28–33	97	98	0
Chlorfenapyr	21.98	6	348.9	346.9	0.006	19.83	21.14	0.02	23–28	100	97	0
Ethion	22.35	6	185.0	187.0	0.08	18.24	21.49	0.07	24–28	101	104	0
<i>p,p'</i> -DDT	22.99	6	70.9	72.9	0.3	18.35	22.10	0.02	26–30	96	98	0
Endrin aldehyde ^d	23.36	6	271.9	269.9		19.25	22.44					
Iprodion metabolite	23.79	6	294.0	292.0	3	19.48	22.93	0.6	28–33	96	34	61
Endosulfan-sulfate	24.50	7	385.8	387.7	0.1	20.88	23.58	0.06	28–33	97	96	0
Bifenthrin	24.96	7	386.1	241.0	0.3	20.75	24.05	0.07	20–25	98	92	0
Bromopropylate	25.41	7	78.9	80.9	0.5	21.06	24.44	0.04	24–28	98	79	16
Dicofol	25.69	7	262.0	264.0	0.4	20.22	24.71	0.04	25–29	96	93	0
Iprodion	25.80	7	301.0	303.0	3	22.25	24.85	0.3	28–33	99	31	63
Fenpropathrin	26.25	7	141.1	142.1	0.05	22.37	25.29	0.1	23–28	102	98	0
Endrin-ketone ^d	26.67	7	307.9	305.9		21.87	25.64					
Tetradifon	27.71	8	319.9	317.8	0.008	23.46	26.68	0.02	31–36	98	102	0
Cyhalothrin 1	27.87	8	241.0	243.0	0.07	24.76	26.90	0.1	21–26	94	93	0
Acrinathrin 1	27.87	8	333.0	167.0	0.08	25.59	26.92	0.3	19–24	98	92	0

Table 1. Continued

Compound	NCI mode GC/MS					Dual-column GC- μ ECD			GPC elution volume (mL)	Elution rate ^b (%)		
	RT (min)	Ion set	Monitor ion (<i>m/z</i>)		Detection limit ^a (ng/g)	RT (min)		Detection limit (ng/g)		Carbotrap C/ Bondesil-PSA column	Presep-C Florisil	
			Target	Qualifier		Stx-CLP (μ ECD1)	Stx-CLP2 (μ ECD2)				Frac. 1	Frac. 2
Cyhalothrin 2	28.41	8	241.0	243.0		25.37	27.42		21–26	96	92	0
Acrinathrin 2	28.43	8	333.0	167.0		26.18	27.46		19–24	98	96	0
Fenarimol	29.00	8	276.0	278.0	0.06	23.77	27.92	0.04	28–33	86	25	69
Permethrin 1	29.49	8	207.0	209.0	2	24.01	28.45	0.1	23–28	98	97	0
Acetamiprid	29.88	8	96.1	97.1	2	27.43	28.80	0.7	40–45	83	0	67
Permethrin 2	29.92	8	207.0	209.0		24.58	28.87		23–28	96	95	0
Pyridaben	30.31	8	217.0	219.0	0.4	25.14	29.23	0.2	23–28	97	97	0
Cyfluthrin 1	31.73	9	207.0	209.0	0.3	27.74	30.65	0.3	23–28	96	98	0
Cyfluthrin 2	32.03	9	207.0	209.0		28.19	30.95		23–28	98	97	0
Cyfluthrin 3	32.19	9	207.0	209.0		28.30	31.11		23–28	97	96	0
Cyfluthrin 4	32.33	9	207.0	209.0		28.62	31.25		23–28	100	98	0
Cypermethrin 1	32.40	9	207.0	209.0	0.5	27.82	31.31	0.3	23–28	98	95	0
Cypermethrin 2	32.72	9	207.0	209.0		28.29	31.65		23–28	99	97	0
Cypermethrin 3	32.87	9	207.0	209.0		28.36	31.80		23–28	97	97	0
Cypermethrin 4	33.02	9	207.0	209.0		28.70	31.96		23–28	96	98	0
Flucythrinate 1	33.17	9	243.0	199.1	0.2	29.09	32.13	0.2	23–28	94	98	0
Flucythrinate 2	33.66	9	243.0	199.1		29.59	32.69		23–28	99	96	0
Fenvalerate 1	34.70	9	211.0	213.0	0.1	29.72	33.94	0.2	23–28	104	100	0
Fluvalinate 1	34.96	9	294.0	296.0	0.1	31.37	34.34	0.5	20–25	103	97	0
Fluvalinate 2	35.12	9	294.0	296.0		31.47	34.58		20–25	101	106	0
Fenvalerate 2	35.22	9	211.0	213.0		30.28	34.66		23–28	99	102	0
Tralomethrin 1	36.07	9	296.8	216.9	4	30.69	35.90	0.3	26–31	101	100	0
Difenoconazole 1	36.22	9	310.0	312.0	3	30.61	36.11	0.9	30–35	99	0	81
Difenoconazole 2	36.33	9	310.0	312.0		30.73	36.27		30–35	98	0	78
Tralomethrin 2	36.62	9	296.8	216.9		31.32	36.79		26–31	97	100	0
Azoxystrobin	39.24	9	371.0	356.0	0.8	32.37	41.13	0.2	36–41	85	0	93

^a Detection limits calculated for a signal-to-noise ratio of 3 for standard solution ($S/N=3$).

^b Average of 3 experiments.

^c Degradation product of dicofol.

^d Degradation product of endrin.

類、牛乳、卵類などの畜水産物 120 検体を対象として、GC/MS や LC/MS/MS などを用いて実施した約 300 種農薬成分の残留実態調査では、46 検体から DDT 類、エンドスルフェンおよび HCH 類など 41 種/延べ 143 成分が検出されている。そのうち 36 種/延べ 133 成分（全体の 93%）は、比較的残留性の高い塩素などのハロゲン原子を含むものや、同様に電子親和性を有するカルボニル基などを有するものであり、これらを選択的に検出可能な NCI モード GC/MS の有用性が示唆された。しかし、NCI モード GC/MS は、検量線の直線範囲が 2 オーダー程度と狭く、その上、GC 注入部の活性部位で生じるマトリックス効果⁶⁾によるピーク強度の上昇や、イオン化部で生じるマトリックスの共存下でのイオン化効率の変動によるものと考えられる測定値のばらつきも認められたことから、定量性の点で問題があると考えられた*³、*⁴。そこで、NCI モード GC/MS に比べて選択性の点では劣るが、類似の検出特性を有し、従来の GC-ECD に比べて高感度かつ再現性に優れている GC- μ ECD⁷⁾を用いて定量することにした。

*⁴ 日本食品衛生学会第 94 回学術講演会講演要旨集, p42 (2007)。

今回、対象成分として、上述の実際に検出された成分に加えて、農薬の使用量^{8), 9)}、安定性および脂肪組織への蓄積性 ($\log P_{ow}$ がおよそ 2 以上)¹⁰⁾ を考慮した上で、NCI モード GC/MS および GC- μ ECD で検出可能な 78 種成分 (Table 1) を選択した。

2. 抽 出

固体試料には、通知法と同様に脂肪組織を溶解しながら農薬成分を効率良く分配抽出するアセトン/ヘキサン抽出法を採用した。なお、アゾキシストロビンのような中程度の極性 ($\log P_{ow}$ でおよそ 2~3) を示す農薬成分の多くは、通知法での抽出率が 60~80% とやや低かった。そこで、抽出率を高めるために、実験方法に示したように水を減らしアセトンの割合を多くした。

液体試料には、脂質成分の抽出が少ないアセトニトリルを用いても農薬成分を効率良く分配抽出することが可能と考えられた。そこで、実験方法に示したように 125 mL 容の円筒形分液漏斗中に直接吸引ろ過する簡便なアセトニトリル抽出法⁴⁾を採用した。なお、アセトニトリルが少ないと *pp'*-DDE のような極性の低い農薬成分の抽出率が 60~80% とやや低かった。そこで、試料量を 10 g に減ら

し、アセトニトリルの割合を多くした。また、本抽出法では極性の高い夾雑物を減少させるために、アセトニトリル抽出液を濃縮後、酢酸エチルと無水硫酸ナトリウムを加えて脱水抽出する方法²⁾を追加した。

3. GPC による精製

従来の GPC では、内径 20 mm、長さ 40 cm 程度の分離カラム、溶出液として 20% 程度のアセトンを含むシクロヘキサンなどが用いられる^{*2, 2)~4)}。しかし、通知法のように溶出の速いアクリナトリンの保持時間から分取する条件では、試料注入時の粘度効果¹¹⁾による溶出の遅れもあり、中～長鎖脂肪酸類などの夾雑物を十分に除去できない。アセトンの割合を低くすることによって分配吸着作用が働き、分離能力は向上するが、溶出の遅いトリシクラゾールまで分取する条件^{*2)}では処理時間が長くなり、溶出液も多量に使用する。

そこで、粘度効果などを低減させるために、試料注入後、直ちにカラムオープン内に装着した金属コイルを通過させて加温するポストヒート配管を追加した。そして、溶媒の変化により膨潤度がほとんど変わらないとされるハードタイプゲルを充てんした内径 10 mm、長さ 50 cm の分離カラム (25 cm カラムを 2 本連結)、および溶出液としてアセトン-シクロヘキサン (15:85) を用いることで、上述の夾雑物と農薬成分との分離を向上させるとともに、溶出液の使用量を従来のおよそ 35% と大幅に削減した。なお、GPC の過負荷による分離能力の低下を防ぐために、残さの GPC への負荷量を 0.25 g までとした。本 GPC における代表的な夾雑物および農薬成分の溶出画分を Table 1 に示した。

4. GPC の選別画分と SPE による精製

分析上問題となるアスタキサンチンなどのカロテン類や脂肪酸類などの夾雑物は、本 GPC において 14 分 (28 mL) までに溶出する (Table 1)。一方、14 分以降に溶出する農薬成分の中には、フサライドやクロロタロニルなどグラファイトカーボンに保持されやすいものや、本報での対象成分ではないがトリクロロホンやホルクロルフェニロンなど PSA に保持されやすいものも少なくない¹²⁾。

そこで、農薬成分の損失が少なく、かつ上述の夾雑物を除去するために、Fig. 1 に示したように GPC において夾雑物が重なって溶出する 10.2～14 分 (20.4～28 mL) の農薬画分のみを選別して、グラファイトカーボンと PSA を積層した二層式 SPE カラムにより精製する方法を考案した。なお、市販のグラファイトカーボンカートリッジカラムは保持が強く、人体に有害とされるトルエンを使用しない溶出条件では多くの農薬成分で損失が認められたことから^{12), 13)}、保持の弱いものを微結晶セルロースで 5 倍に希釈して用いた。また、通知法に採用されている PSA (500 mg) カートリッジカラムは、サケなど脂肪酸類の多い試料において、脂肪酸類の影響と考えられる GC における保持時間の遅れが認められたことから 1,000 mg を用いた。処理時間は、本 SPE カラムへ負荷したのち、GPC の

流速を 1.6 倍に上げることでトリシクラゾールの溶出まで 23 分と短縮した。Table 1 に本 SPE カラムからの試料成分および農薬成分の溶出率を示した。

5. フロリジル SPE による追加精製

NCI モード GC/MS を用いて測定した結果、上述の精製法によって得られた試料溶液は、保持時間の遅れ、クロマトグラム上の妨害もほとんどなく多成分分析に供することが可能であった。しかし、GC- μ ECD は選択性の点で劣るため、試料によっては妨害ピークが出現し、定量が困難となる場合も見受けられた。

そこで、妨害ピークを大幅に減少させるために、フロリジルカートリッジカラムを用い、低～中程度の極性を有する農薬成分を溶出しながら多くの妨害成分を保持する第 1 画分の溶出溶媒としてジエチルエーテル-ヘキサン (50:50) 20 mL、次いでフロリジル固相に保持されているジメトエートなどの農薬成分を溶出させる第 2 画分の溶出溶媒としてアセトン-ヘキサン (30:70) 20 mL を用いる分画/精製法を追加した。Table 1 にフロリジルカートリッジカラムからの農薬成分の溶出率を示した。

6. GC による定性および定量

対象とした農薬成分に対して NCI モード GC/MS を採用した本分析法の感度、選択性は高く、多くの農薬成分において数 ppb レベルでもほとんど妨害のない MS スペクトルが得られた。そこで、SIM/ スキャン同時取込モードを採用した。また、GC- μ ECD には、1 回の注入による測定で 2 種類のクロマトグラムが得られ、より確実な定性および定量を可能とするシングルインジェクション-デュアルカラム方式^{2), 5)}を採用した。

著者らが用いた GC/MS 装置は、MS 部に導入される試薬ガスにより真空度が低下した。このため GC 注入部でのマトリックス効果を低減するために有効な高圧注入^{6), 7)}には限界があった。これに対して、GC- μ ECD では 300 kPa の高圧注入を採用した。これによりシングルインジェクション-デュアルカラム方式と相まって、カラム流量が 15 mL/min と非常に多くなり、高度に不活性化処理されたインサートなどの採用と、それを汚さない試料調製法との相乗効果もあって、ピーク強度の上昇、変動を大幅に抑えることができた⁷⁾。なお、特に妨害ピークが見当たらない場合には、極性の高い成分の保持が強く、対象成分を良好に分離した Stx-CLPesticides 2 カラムにより得られた μ ECD クロマトグラムにより定量した。Table 1 に農薬成分の保持時間、SIM 測定におけるイオンセットおよびモニターイオン、標準溶液のクロマトグラムから S/N 比が 3 を示す農薬量 (異性体の場合、合計量) を求め、これを試料中の濃度に換算した検出限界値を示した。

実際の分析例として、残留実態調査^{*4)}においてエンドスルファンスルファートが 4.3 ng/g 検出されたサケの MS クロマトグラム (EI および NCI モード) と MS スペクトル (NCI モード) を Fig. 2 に、 μ ECD クロマトグラムを Fig. 3 に示した。このように、種々の畜水産物を対象とし

Table 2. Recoveries of spiked pesticides from animal and fishery products

Compound	Spiking level ($\mu\text{g/g}$)	Group	Recovery ^a (%)									
			Beef		Salmon		<i>Shijimi</i> clam.		Milk		Egg	
			Av.	RSD ^b (%)	Av.	RSD (%)	Av.	RSD (%)	Av.	RSD (%)	Av.	RSD (%)
α -HCH	0.005	1	95.9	0.5	95.7	1.1	89.7	2.0	83.3	0.8	82.8	1.9
Diazinon	0.05	2	90.3	3.0	95.2	3.8	89.8	1.4	87.8	4.4	83.2	2.8
γ -HCH	0.005	1	98.7	1.0	96.9	1.7	93.6	1.2	87.0	1.1	87.1	1.5
β -HCH	0.005	1	93.8	3.4	91.2	1.7	94.6	1.1	87.8	3.4	86.0	2.0
Dimethoate	0.025	2	31.0	3.8	29.7	7.4	35.1	13.3	85.9	3.6	86.2	0.3
Cyanophos	0.005	2	90.0	3.9	93.5	3.7	85.5	3.3	89.2	0.7	82.9	2.7
δ -HCH	0.005	1	98.3	1.2	93.4	3.1	91.8	1.5	86.7	1.7	85.1	1.2
Chlorothalonil	0.005	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	68.0	7.2	0.0	0.0
Chlorpyrifos-methyl	0.01	1	97.0	0.4	89.4	1.8	88.1	1.8	91.3	2.9	85.6	3.5
Vinclozolin	0.01	2	92.3	0.9	94.5	1.1	86.1	2.5	98.5	1.8	91.2	2.0
Tolclofos-methyl	0.01	2	95.6	4.1	92.1	6.1	87.4	4.4	93.5	0.9	87.4	0.6
Chlorpyrifos	0.01	1	95.7	1.0	89.7	0.8	87.8	1.8	89.0	1.5	86.6	3.1
Fenitrothion	0.01	1	89.7	1.3	87.5	1.1	83.3	2.2	89.1	0.3	85.4	4.4
Malathion	0.025	2	84.5	8.8	84.3	1.8	83.1	2.1	85.8	3.4	83.3	1.9
Triadimefon	0.01	2	84.2	3.0	89.7	4.3	88.1	1.9	102.6	1.1	82.5	2.0
Phthalide	0.005	1	87.7	6.9	79.4	1.1	78.7	2.0	94.5	2.2	90.9	2.2
Bromophos-ethyl	0.01	1, 2	97.0	0.3	93.3	2.0	93.1	1.1	90.5	2.3	92.3	3.3
Phenthoate	0.025	2	90.7	7.1	86.4	0.8	84.9	0.9	81.8	2.2	85.8	2.8
Triflumizole	0.025	1	101.3	2.6	91.9	2.4	98.9	4.3	96.9	8.9	93.1	8.8
α -Endosulfan	0.005	2	86.0	1.9	91.5	0.7	86.2	5.9	87.5	5.8	83.7	1.7
Procymidone	0.025	2	88.3	2.7	90.6	1.7	93.3	1.2	98.9	1.6	89.7	2.8
Captan	0.01	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	47.9	5.6	0.0	0.0
<i>p,p'</i> -DDE	0.005	1	97.6	0.7	95.5	2.4	92.4	1.2	86.1	1.9	84.6	1.7
Prothiophos	0.01	1	97.0	0.8	91.4	0.8	88.6	1.2	82.5	0.9	89.3	5.6
Hexaconazole	0.01	2	78.0	0.9	83.4	2.3	90.4	1.4	99.2	5.4	90.6	2.7
Dieldrin	0.005	1	99.3	2.5	92.2	1.3	90.3	1.4	88.1	3.6	87.0	1.0
Buprofezin	0.05	1	93.9	2.4	88.4	2.3	85.6	3.7	82.1	1.6	88.0	1.3
Flutolanil	0.05	1	93.9	1.8	92.8	3.2	88.4	2.5	93.7	0.7	87.9	2.6
Oxadiazone	0.01	2	90.8	1.2	91.5	2.8	90.8	2.6	98.0	1.9	85.4	1.1
Kresoxim-methyl	0.01	2	90.7	1.7	93.4	1.5	88.5	4.1	99.2	1.0	82.1	2.3
Endrin	0.01	1	100.1	2.5	91.6	1.0	90.2	1.5	97.6	1.6	92.5	1.8
Isoprothiolane	0.025	2	82.9	3.0	87.6	1.4	86.7	4.2	93.0	1.2	84.8	2.2
Isoxathion	0.025	1	94.4	1.7	87.4	1.3	86.3	2.7	91.6	3.6	88.3	4.8
Myclobutanil	0.05	2	76.8	2.3	88.7	2.0	79.5	2.3	88.8	5.0	90.0	3.2
<i>p,p'</i> -DDD	0.005	1	94.7	1.1	89.0	2.9	93.7	1.6	89.0	1.3	86.0	3.4
β -Endosulfan	0.005	2	88.0	3.3	92.7	3.8	86.3	5.8	97.1	1.4	86.5	4.7
Chlorfenapyr	0.025	1	97.5	2.3	95.3	1.0	95.3	0.6	92.9	1.8	94.6	1.5
Ethion	0.025	2	89.5	2.5	89.5	1.1	81.5	1.9	81.1	4.4	86.7	2.7
<i>p,p'</i> -DDT	0.005	1	95.3	1.7	88.5	1.5	88.5	1.4	90.2	1.9	85.4	2.0
Endosulfan sulfate	0.005	2	91.6	3.8	100.3	4.4	91.0	0.7	98.9	4.9	90.5	2.2
Bifenthrin	0.025	1	94.1	0.9	86.6	2.0	94.4	2.7	91.6	2.7	89.1	1.8
Bromopropylate	0.025	1	94.2	1.4	84.6	1.1	95.7	3.0	93.1	3.9	89.0	1.8
Dicofol	0.025	1	101.5	2.5	90.2	0.6	107.9	1.6	99.5	2.5	98.0	4.3
Iprodion	0.05	2	86.4	6.1	83.4	3.8	99.7	2.5	104.8	3.1	97.5	8.3
Fenpropathrin	0.05	1	96.3	1.6	88.6	2.3	100.6	1.8	93.0	2.4	93.2	1.1
Tetradifon	0.01	1	97.2	0.9	87.8	6.8	98.8	1.3	102.7	3.2	89.1	2.0
Cyhalothrin	0.025	2	91.1	1.5	95.7	3.5	95.3	3.7	98.9	2.0	93.0	1.9
Acrinathrin	0.025	1	52.3	4.0	51.1	4.0	52.7	2.6	54.8	2.5	53.1	3.7
Fenarimol	0.01	2	81.5	3.0	90.0	7.5	98.9	2.3	105.3	2.9	93.0	7.0
Permethrin	0.05	1	95.5	0.8	85.7	1.4	98.6	0.7	100.6	2.6	87.7	7.6
Acetamiprid	0.05	2	10.6	7.4	12.6	19.2	11.9	17.2	60.8	9.5	63.6	5.6
Pyridaben	0.05	1	94.3	1.0	83.9	1.3	98.1	3.4	98.3	0.5	88.9	2.5
Cyfluthrin	0.05	2	84.2	3.6	94.6	2.7	97.2	8.3	99.6	2.7	92.3	4.3
Cypermethrin	0.05	1	92.5	2.9	85.1	1.6	90.7	3.7	84.4	1.0	89.0	1.7
Flucythrinate	0.025	2	81.5	4.4	92.1	0.7	103.9	5.0	91.5	3.4	89.0	3.2
Fenvalerate	0.025	1	92.5	1.1	82.3	1.8	90.3	4.6	81.6	2.4	86.1	3.5
Fluvalinate	0.025	2	82.6	3.2	82.3	1.5	96.6	4.1	102.3	1.4	85.5	1.5
Difenoconazole	0.05	2	94.8	3.0	94.8	5.3	87.2	9.1	92.9	9.7	91.9	1.4
Tralomethrin	0.025	1	105.7	3.3	95.7	7.9	99.7	1.9	102.5	5.0	101.5	5.8
Azoxystrobin	0.05	1	101.7	4.5	99.0	3.0	96.8	5.8	103.4	5.1	102.9	4.5

^a Average of 5 experiments.^b RSD=relative standard deviation.

Fig. 2. MS chromatograms and MS spectrum of endosulfan sulfate found in a salmon extract: (A) EI-SIM mode GC/MS; (B, C) NCI-SIM/Scan mode GC/MS

Fig. 3. μ ECD chromatograms of pesticide standard mixture and a salmon extract: (A) Stx-CLPesticides column (μ ECD1); (B) Stx-CLPesticides 2 column (μ ECD2)

た残留実態調査において妨害となるようなピークは少なく、また、GC 注入部の汚染によるピーク強度の減衰なども低いレベルであった。

7. 添加回収試験

代表的な畜水産物として牛肉、サケ、シジミ、牛乳および鶏卵に混合標準溶液 1 mL (試料中濃度 0.005~0.05 μ g/g) を添加後、1 時間放置したものについて、GC- μ ECD により測定し、回収率を求めた。その結果、Table 2 に示したように、クロロタコニル、キャプタン、ジメトエート、アセタミプリド、および GPC での溶出が速いアクリナトリンを除く農薬成分で、76.8~107.9% (中央値 90.7%) の回収率、0.3~9.7% (中央値 2.2%) の相対標準偏差が得られ、本分析法の良好な定量性が確認された。クロロタコニルとキャプタンは試料成分の共存下での分解^{14), 15)}、ジメトエートとアセタミプリドは $\log P_{ow}$ が 0.7~0.8 (25°C)¹⁰⁾ と極性が高く、アセトン/ヘキサン抽出およびフロリジル SPE での抽出率が低いと考えられた。

ま と め

NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC- μ ECD による畜水産物中残留農薬の頑健性を有し、高感度かつ定量性に優れた多成分分析法を構築した。

1. 比較的残留性の高い、電子親和性を有する農薬成分を選択した上で、試料からアセトン/ヘキサンまたはアセトニトリルにより簡便に効率良く抽出する方法を考案した。
2. 内径 10 mm, 長さ 50 cm の分離カラムなどを用いることで GPC の分離能力を向上させ、溶出液の使用量を大幅に削減することができた。
3. GPC の選別分画とグラファイトカーボン/PSA 二層式カラム SPE を組み合わせて精製することにより、多くの農薬成分で損失が少なく、かつ夾雑物を効率よく除去することができた。
4. フロリジルカートリッジカラム SPE により精製し、2 画分とすることで、GC- μ ECD クロマトグラム上に出現する妨害ピークを大幅に減少させることができた。
5. NCI-SIM/スキャン同時取込モード GC/MS により確実に定性し、デュアルカラム GC- μ ECD により精度よく定量するシステムが構築できた。

本論文の一部は、日本食品衛生学会第 94 回学術講演会 (2007 年、静岡) において発表した。

謝 辞

本研究は、平成 18, 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (食の安心・安全確保推進事業) により実施したものである。(財)残留農薬研究所の加藤保博氏、国立医薬品食品衛生研究所の根本了氏始め関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Yamada, S., Saito, I., Oshima, H., Hayakawa, J. Application of silica gel column chromatography to analysis of PCBs, chlordanes, and organochlorine pesticides in fish and shellfish and meat. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **46**, 13–21 (1996).
- 2) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. Multiresidue analysis of pesticides in foods using acetonitrile extraction, GPC and mini-column cleanup, and dual-column GC-ECD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 178–187 (2000).
- 3) Kabashima, Y., Ueno, E., Oshima, H., Ohno, T. Application of gel permeation chromatography and silica gel column chromatography for analysis of PCBs, chlordanes, and organochlorine pesticides in stock farm and marine products. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **57**, 55–64 (2007).
- 4) 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).
- 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).
- 6) Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M., Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr.*, **638**, 57–63 (1993).
- 7) Ueno, E., Kabashima, Y., Oshima, H., Ohno, T. Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with micro-electron capture detector. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **58**, 19–27 (2008).
- 8) 日本植物防疫協会編 (農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修) “農薬要覧 2005” 東京, (社)日本植物防疫協会, 2005.
- 9) 日本植物防疫協会編 (農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修) “農薬要覧 2006” 東京, (社)日本植物防疫協会, 2006.
- 10) Tomlin, C. D. S. eds. *The Pesticide Manual 14th ed.*, UK, British Crop Protection Council, 2006.
- 11) Lesec J., Flow fluctuations in GPC-viscometry. *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1011–1028 (1994).
- 12) 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).
- 13) Kakimoto, Y., Ohtani, Y., Funaki, N., Joh, T. Simultaneous determination of pesticide residues in fruits and vegetables by GC/MS (SCAN mode) and HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 253–262 (2003).
- 14) Kobayashi, H. The approach to pesticide performance in analytical procedure. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, J-331–J-336 (2001).
- 15) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法” 東京, 中央法規出版, 2006, p. 142–144, 189–191. (ISBN 4–8058–2782–3).