

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

GC/MSによる残留農薬試験法に関する研究

分担研究者 外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所 食品試験部長

研究要旨

アセトニトリル抽出液を食塩飽和リン酸緩衝液と分配し、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）及びSep-Pak Silica + Bond Elut PSAでクリーンアップ後、GC/MSで定性・定量する農薬の多成分一斉分析法を検討した。本研究ではこの試験法のさまざまな問題点を明らかにするとともに、実用性に沿った解決策について提案を行った。玄米、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご、キャベツ、オレンジからの添加回収率は一部の農薬を除いておおむね良好な結果を得たが、バラツキの大きなものも見られた。110種の農薬を同時にGC/MS（SIM）で測定すると、データ解析を手動にせざるを得ないため所要時間が長くなった。また、多数の検体を連続測定すると、GC/MSの感度や保持時間の変動も問題となった。測定農薬数を減らすために、対象作物ごとにSIMスケジュールを組むことを解決策の一つとして提案した。

A. 研究目的

食品衛生法に基づく残留農薬の試験法は、各農薬について農作物ごとに設定されており、最大残留基準値(MRL)と同時に分析法が告示されている。基準設定された農薬数及び農作物数の増加に対応し、輸入時の検査及び地方公共団体等における食品衛生監視業務を効率的に行うため、多数の農薬を一括して迅速に分析できる試験法の開発が進められてきた。平成6年から9年度において残留農薬迅速分析法検討委員会が検討した結果を、平成7年及び9年度に残留農薬迅速分析法として公表し、平成9年度分は課長通知された。

公表された迅速分析法の骨子は以下の通りである。平成7年度法ではアセトン抽出、酢酸エチル/ヘキサン再抽出、カートリッジカラムでクリーンアップ、GCまたはHPLCで定性・定量する。平成9年度法では、アセトン抽出、固相再抽出、GPC及びカートリッジカラムでクリーンアップ、GCまたはHPLCで定性・定量する。これらの方法において改良を要する点は

親水性農薬の回収率が低いこと、カートリッジカラムによる精製の際に農薬を分画するため試験液数が増えること、農薬グループごとに分析するためGCの検出器を替えて数回測定する必要があることなどである。

昨年度より、より速やかに残留農薬分析を行うことを目的として、従来の迅速分析法に改良を加え超迅速分析化に関する調査研究を始めた。すなわち、アセトニトリル抽出/塩析分配することにより、親水性農薬にも適用できる方法としたこと、カートリッジカラムによる精製は全ての農薬が同一画分に来るように必要最小限にしたこと、GCで分析可能な全ての農薬を同時に検出するため、測定をGC/MSで行うことなどである。本法を110種の農薬に適用し、代表的な農作物である玄米、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご、キャベツ、オレンジからの添加回収率を求め、本法の妥当性を評価した。しかし、7機関でこの方法を用いて添加回収試験を行ったところ、各試験機関間で結果に差が見られた。そして、この

主因が試験溶液の調製段階にあるのか、測定段階にあるのか特定できなかった。そこで本研究では、この試験法のさまざまな問題点について明らかにするとともに、より実用性に基づいた解決策について提案を行う。

B. 研究方法

1. 試料

ほうれんそう、ばれいしょ、キャベツ、りんご、オレンジ、玄米

2. 試験機関

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所

3. 試薬及び材料

1) 農薬標準品

林純薬工業または、和光純薬工業製の残留農薬試験用標準品を用いた。表1-1及び1-2に検討対象とした農薬のモニターイオン、検出限界を示した。

2) 農薬標準原液

各農薬標準品を n-ヘキサンで溶解して(溶解しにくい場合にできるだけ少量のアセトンで溶解後 n-ヘキサンで希釈して)1 mg/mLの濃度に調製し、冷蔵庫(-20°C)に保存した。

3) 農薬標準混液

各農薬標準原液をとり、アセトンで10 mg/L(但しアセフェート、メタミドホス、バミドチオン、アルジカルブ、ジフェンゾコート及びアセタミプリドは50 mg/L)の濃度に調製し、冷蔵庫(-20°C)に保存した。

4) 定量用農薬標準混液

農薬標準混液をアセトンで適宜希釈して、定量用の農薬標準混液を調製した。

5) カートリッジミニカラム

Sep-Pak. plus Silica(690 mg, Waters製)

Bond Elut. PSA(3 mL/500 mg, Varian社製)

6) リン酸緩衝溶液

105 gのKH₂P₀₄と61 gのK₂H₂P₀₄を水で溶かし、1Nの塩酸又は1NのNaOHでpH7.0に調製し、

水を加えて1000 mLとした。

4. 装置及び測定条件

1) ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)装置及び操作条件

装置：Waters社製510型 HPLC ポンプ、717プラスチック型オートサンプラー、486型 Tunable紫外可視吸光度計、フラクションコレクター及びSIC社製 Chromatocorder 21、GPCカラム：Phenomenex 社製 Envirosep-ABCTM (内径21.2 mm、長さ350 mm)、注入量：2 mL、流速：5 mL/min、分取画分：70~140 mL、移動相：酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1)

2) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)及び測定条件

装置：島津製作所製 QP-5050、GCカラム：J&W Scientific 社製 DB-5(内径0.25mm、長さ30 m、膜厚0.25um)、カラム温度：50°C(1 min)-25°C/min-125°C-10°C/min-300°C(3.5 min)-25°C/min-310°C(4.6 min)、分析時間：30 min、注入口温度：250°C、注入口インサート：Restec社製スプリットレスガラスインサート(シリル化試薬により不活性化処理をしたガラスインサートに、同様に不活性化処理した石英ウールを少量詰めたもの)、トランスファーライン温度：260°C、イオン化方法及び電圧：EI (1.1 kV)、選択イオン検出(SIM: Selected ion monitoring)モード：対象農薬のモニターイオンは表1-1及び1-2に示した。キャリアーガス：ヘリウム、キャリアーガス圧力プログラム：100 kPa-400 kPa/min-276 kPa(0.1 min)-400 kPa/min-100 kPa (29.02 min)、注入量：2μL(スプリットレス)

5. 試験溶液の調製法

試料：米は10 gに水20 mL添加、2時間放置。その他は20 gを採取。

アセトニトリル抽出：50 mLで1回ホモジナイズ後、吸引ろ過し、アセトニトリル30 mLで

ろ紙上の残さを洗浄。

水層分離：アセトニトリル抽出液に食塩7 gとリン酸緩衝液10 mL添加。振とう後静置し、分離した水層を除く。

濃縮：アセトニトリル層(脱水はしない)を濃縮し、アセトニトリルを除く。

脱水：残った少量の水に酢酸エチル30 mLと無水Na₂SO₄(脱水に必要な量)添加(酢酸エチルを先に加える)し、超音波処理。

濃縮：Na₂SO₄をろ過で除き、容器とNa₂SO₄を酢酸エチル約20 mLで洗浄し、遠心分離またはフィルターろ過、溶媒除去、酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1)4 mLに溶解する。

GPC：2 mL(玄米2.5 g相当、その他は5 g相当)をGPCに注入する。分画後、溶媒除去、50%アセトン/ヘキサン2 mLに溶解。

シリカゲル+PSA精製：Sep-Pak. plusシリカゲルを上、Bond Elut. PSAを下に連結したカートリッジを、50%アセトン/ヘキサン10 mLでコンディショニングし、1 mL(玄米1.25 g相当、その他2.5 g相当)を負荷し、50%アセトン/ヘキサン20 mLで溶出。

濃縮：溶媒を除去し、アセトン1 mLに溶解。

定量：GC/MS(SIM)測定。

6. 添加回収実験

試料に0.2 ppmになるように定量用農薬標準混液を添加し、以後、試験溶液の調製法に従って操作した。ブランク試料の試験溶液で農薬標準品を溶解したいわゆるマトリックススタンダードを用いた補正は行わないで、回収率を求めた。無添加試料から農薬に相当する信号が検出された場合には、添加試料から差し引いて回収率を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. 回収率の問題点

今回、検討した結果は昨年度の他の機関の結果とおおむね同様となり(表2)、大多数の農

薬及び農作物の組み合わせにおいて良好な結果を得たが、やはり回収率データのばらつきが目立った。本報告では、回収率をより細かく区分し、表3に回収率不適の農薬数(120%以上、70%以下)を、表4-1に本機関において、最も回収率不適の農薬(140%以上、50%以下)、表4-2に本機関において回収率不適の農薬(120~140%、50~70%)について示した。

昨年度各機関で共通して低回収率であった農薬は、本報告でもほぼ同様であり、その低回収率農薬と考えられる原因について以下に示した。

回収率が50%以下の農薬 (表4-1参照)

エチオフェンカルブ	分解
カブタホール	分解
アミトラズ	液性
ジクロロボス	揮発性が高い
ブチレート	揮発性が高い
EPTC	揮発性が高い
ジフェンゾコート	GPCで回収されない
アクリナトリン	GPCからの溶出が速い
フェンチオン	酢酸エチルの影響、酸化されやすい
テルブホス	酢酸エチルの影響、酸化されやすい
チオメトン	酸化されやすい
フェントエート	酸化されやすい
バミドチオン	酸化されやすい
アセフェート	極性
メタミドホス	極性
キノメチオネート	PSAを使用すると回収率が低くなる。
トリシクラゾール	シリカゲルを使用すると回収率が低くなる。

回収率が50~70%の農薬 (表4-2参照)

キャプタン	分解
ジクロフルアニド	分解
フルバリネート	GPCの分取画分の影響

表3について：本機関で再度検討した測定値は、各試験機関で求めた測定値と比較すると回収率100%を超えるものは少なく、70%以下の農薬が多かった。

表4-1について：各農作物間で共通しているものが多かった。エチオフェンカルブ、キノメチオネート、ジフェンゾコート、アクリナトリンについては、すべての農作物で低回収であった。例外として、EPTC、アセフェートはりんごについてのみ、エンドリンは玄米についてのみ低回収であった。テブコナゾールがりんごで140%を超えたのは、夾雑物ピークと重なったためと考えられる。

表4-2について：各農作物間で低回収率農薬にばらつきが見られたが、表4-1と共通するものが多く見られた。オレンジについて120~140%となるケースの多いのは、測定時におけるマトリックス効果のためと推察された。

この他、回収率への影響は少なかったがジコホールは、アセトン、光により容易に分解するため、GC/MSでの測定の際、その分解物のピークを用いて回収率を求めなければならなかった。

以上の結果より、低回収率となりうる原因は分析法によるものとは一概に言えず、農薬自身の持つ性質が大きく関与しているものと考えられる。

2. 測定時の問題点

測定時における問題点を以下に挙げる。

①110種を同時に測定すると、数種の農薬間でピークの重なりがみられるため2グループに分ける必要がある。(図1)

②110種すべてを同時に測定すると、測定対象農薬の種類が多いため、他の農薬ピークや農作物由来のピークが混み合うため、解析を目視による手動で行わなければならない、比較的時間を要する。また、農薬によりピーク強度やピーク形状が大きく異なるため、波形処理

のパラメータを同一に出来ないことも、手動解析に頼らなければならない一因である。

③同時に測定するモニターイオン数が多い事によりGC/MS(SIM)の感度が下がる

④多数のサンプルを連続注入すると、GC/MS自体の感度の変動が起こりやすい。

⑤ピーク数が多く、混み合っているためカラムの劣化等による保持時間(RT)のずれが問題となる。そのため、測定前に標準混液を測定して、あらかじめ農薬のRTを確認してからでないと、測定を開始できない。

(注)本機関では、アルジカルブについては保持時間が小さいため、溶媒ピークと重なり測定不能であった。

3. 試験溶液調製時の問題点

①添加回収試験の際には、1回に調製する各農作物あたりのサンプル数が最低7個と多い。

②GPCに要する時間が1試料あたり50分程度かかる。

③アセトニトリルを用いるために、溶媒留去に時間がかかったり、GPCを行うなどの理由により試験溶液の調製に約2日間と時間を要する。

④上記②、③の理由によっても、操作上での農薬の回収率低下の機会が多くなると考えられる。

4. 改善策についての提案

「1. 回収率の問題点」については、農薬の性質によるものが多く、やむを得ないと考えられ、そのような農薬を本試験法の対象農薬から外す方が、混乱をふせぐ意味では実際的かもしれない。しかし、回収率が極端に低くない限り(30%以下など)、スクリーニング法としては十分使用に耐え得ることから、そのような農薬(回収率が30%~50%)については、低回収率である旨の情報を把握しておけば、本試験法から外す必要はないと考えられる。

「2. 測定時の問題点」5点のうち、最も重大な

問題は、⑤のRTのずれの問題である。たとえば、何らかの原因で、前回の測定からRTが30秒ずれただけでも、測定ができなくなってしまう。経時的にRTのずれが見られないGCカラムは開発されていないことから、測定装置にコンピュータのソフト面で改良を加えた装置が必要と考えられる。すなわち、「RTのずれを、RTの標準となるような基準物質のRTと、その基準物質に対する農薬の相対的RTによって、ずれたRTを計算する。その計算結果から、農薬のピーク時間とピーク開始及び終了時間を更に計算して、自動的にSIMスケジュールを書き換えて測定を行う。」といったプログラムが必要となる。本研究で用いた島津製作所製QP-5050のソフトウェアであるClass-5000では、解析の際のずれを、基準となるピークと相対的なRTから自動的に求めることはできる。しかし、測定の際のずれ（特に重要なのは、SIMのグループの切り替え時間である。）を補正するにはできていない。また、ヒューレットパッカード社のリテンションタイムロッキングプログラムを用いるのも改善策のひとつである。次に重要なのが、測定時間と解析時間の短縮である。試料を測定する際には、試料の種類は既知であり規制対象となっている農薬が各作物ごとに異なることから、各農作物ごとのSIMスケジュールを組み、規制対象農薬のうちGC/MSで測定できるもののみを測定する方が実際的である。そのため今回、21種の農作物*について、表〈検討農薬の保持時間(RT)及びGC/MS(SIM)測定に用いるモニターイオン〉及び図〈標準混液A、B、C**のGC/MSクロマトグラム(SIM)〉を作成した(表6~26、図2)。また、各農作物のGC/MSによる対象農薬数について表5に示した。この案の利点は、分析の対象農薬を各農作物ごとにしぼることにより、GC/MSの感度の変動が減少し、解析時間が短縮できること、また高回収率農薬について

は定量を、それ例外の農薬についてはスクリーニングを目的として、標準混液を1グループとすることにより、測定時間が短縮できることにある。

「3. 試験溶液調製時の問題点」については測定の超迅速化にそぐわないGPCを行わないで、カートリッジカラムで脱脂を行うことによって解決すると考えられる。

D. 結論

玄米、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご、キャベツ、オレンジからの添加回収率は、一部の農薬を除いておおむね良好な結果を得たが、バラツキの大きなものも見られた。回収率の低い農薬については検液調製法の問題よりも、揮発性、水溶性など農薬自身の性質に起因した。分析法の迅速化のためには、GPCをやめてカートリッジカラムによるクリーンアップのみとする方が好ましい。110種の農薬を同時にGC/MS (SIM) で測定すると、データ解析を手動にせざるを得ないため所要時間が長くなった。また、多数の検体を連続測定すると、GC/MSの感度や保持時間の変動も問題となった。測定農薬数を減らすために、対象作物ごとにSIMスケジュールを組むことを解決策の一つとして提案した。

研究発表

1. 論文発表

吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光進, 外海泰秀, 土屋鍛, 木村実加, 関口幸弘: 超臨界流体抽出及びGC, HPLCによる穀類中残留農薬の多成分一斉分析法, 食品衛生学雑誌, 40, 68-74(1999)

2. 学会発表

外海泰秀, 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: 超臨界流体抽出 (SFE) -GC(GC/MS)による穀類中残留農薬の一斉分析法(2),

*21種の農作物：米、米以外の穀類、豆類、核果果実、柑橘類、仁果果実、バナナ、バナナ以外の熱帯産果実、ベリー類、果実、あぶらな科野菜、うり科野菜、きく科野菜、せり科野菜、なす科野菜、ゆり科野菜、野菜、ばれいしょ、ばれいしょ以外のいも類、きのこ

類、茶

**各標準混液A、B、C：A、Bについては、超迅速分析の際に以前から使用しているもの。Cについては、平成10年度に告示された分でGC/MSで測定可能な農薬の混液(12種)を新たに作製。12種とはTriflurarin、Dimethenamide、A lachlor、Chlorfenapyr、Pyrinobac-Me(Z)、Pyrinobac-Me(E)、Pyributicarb、Bifenthrin、Furametpyr、Cyhalofop butyl、Cafenstrole、Fludioxonilである。