

残留農薬ポジティブリスト制度導入に向けた GC/MS, LC/MS/MS 同時一斉分析法

Simultaneous Quantification of Multiresidue Pesticide by Gas Chromatography/Mass Spectrometry
and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

氏家 愛子 佐藤 信俊*¹

Aiko UJIIE, Nobutoshi SATO

ポジティブリスト制度導入により、食品に残留する約800種類の農薬等に暫定基準または一律基準が設定される。この規制に対応するため、現行の分析法であるGC/MS-SIM測定及びLC/MS-SIM測定に代え、同定性に優れたGC/MS-SCAN測定及びLC/MS/MS-MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定による分析法の検討を行った。この結果、180農薬(異性体等含200種類)の分析時間が現行法の1/3~1/2に短縮可能となり、GC/MS-SCAN測定では検出下限値を0.01ppm、LC/MS/MS-MRM測定では検出下限値を0.001ppmとすることができた。また、精製法においては、SAX/PSAと活性炭カラムを直列に使用することにより、二層カラムカートリッジENVI-Carb/LC-NH₂及びSAX/PSAで除去できなかった脂肪酸や色素成分を定量に妨害のない程度まで除去することができた。

キーワード：残留農薬；一斉分析法；ガスクロマトグラフ質量分析計；
液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；精製

Keywords : Multiresidue Pesticide ; Simultaneous Quantification ; Gas Chromatography
/Mass Spectrometry ; Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry ; Cleanup

1 はじめに

近年、無登録農薬使用や輸入食品中の残留農薬等の基準違反多発などにより、食の安全性に対する国民の関心が高まっている。平成15年5月30日に食品衛生法等の一部を改正する法律¹⁾が公布され、国民の健康保護の最優先を目的とする、農薬、動物用医薬品及び飼料添加物についてのポジティブリスト制度が、公布日から3年以内に施行¹⁾される予定である。対象となる農薬等は約800種類にのぼる。

現在、GC/MS-SIM及びLC/MS-SIM法により125種類の農薬を分析対象としているが、ポジティブリスト制度の導入に向けて農薬数を拡大し、迅速且つ高精度に測定するため、今年度導入された高感度GC/MS及びLC/MS/MSを使用した同時一斉分析法の検討を行った。また、同時一斉分析をするための色素成分、脂肪酸等妨害成分の精製法についても検討を行い若干の知見を得たので報告する。

2 方法

2.1 装置および測定条件

(1) GC/MS : Agilent 社製 GC/MS6890/5973inert
・イオン化法 ; EI

- ・測定モード ; SIM及びSCAN
- ・カラム ; HP-5MS, 25m × 0.25mm i.d., 0.25 μm, コンスタントプレッシャーモード, 平均線流量 ; 50cm/sec
- ・温度 ; 70 (2分) 25 /分 150 (0分) 3 /分 200 (0分) 8 /分 280 (10分)
- ・注入口温度 ; 180 , パルスドスプリットレス注入, パルス圧 ; 30psi, 注入量 ; 3 μl
- ・注入口インサート ; 石英製

表1 LC/MS/MS 測定条件

	Positiveモード	Negativeモード
ネブライザーガス(l/min)	12	15
カーテンガス(l/min)	10	10
イオンブレイ電圧(V)	5000	-4500
イオン源温度()	500	450
コリジョンガス(l/min)	8	6
ターボイオンブレイガス(l/min)	6.5	6.5
LCグラジュエント条件	0 (min) B: 0%	0 (min) B: 0%
	5 (min) B:100%	5 (min) B:100%
	16 (min) B:100%	14 (min) B:100%

* 現 原子力センター

(2) LC/MS/MS-MRM : Applied Biosystems社製 API3000

- ・カラム ; 資生堂 CAPCELL PAK C18 , 150mm × 2mm i.d. , AQ 3 μm , 注入量 ; 10 μl
- ・移動相 A ; 0.1mM-酢酸アンモニウム / B ; メタノール系のグラジュエント測定 , 流速 ; 0.2ml/分
- ・装置条件及びLCグラジュエント条件は表1に示す。

2.2 対象農薬

- ・GC/MS 対象農薬 : 139農薬 (異性体等含153種類)
- ・LC/MS/MS 対象農薬 : 41農薬 (異性体等含47種類)

2.3 試料調製及び精製法

ミキサーで均一化した試料20gにアセトニトリル50ml, 食塩6gを入れ5分間振とう抽出し, 2500rpmで遠心分離をしてアセトニトリル層を分取する。残さにアセトニトリル50mlを入れ同様に処理し, アセトニトリル層を分取して先のアセトニトリル層と合わせ無水硫酸ナトリウム10gで15分間脱水する。ガラスフィルターで過後, 40 以下で濃縮乾固する。これを精製に用いるカートリッジカラム負荷溶媒3mlに溶解し, 精製前溶液とした。

精製用カートリッジの検討は, 厚生労働省で残留農薬一斉分析法²⁾の精製法として提示している ENVI-Carb/LC-NH₂ (SUPELCO:500mg/500mg), 当所での現行法³⁾の Bond Elut SAX/PSA (VARIN:500mg/500mg), 更にSAX/PSAとCARBOGRAPH (ジーエルサイエンス株): 300mg) を接続した3種類で行った。溶出液は濃縮乾固後, アセトン2mlで溶解しGC/MS試料液とし, その100 μlをN₂パージ乾固後, メタノール1mlに溶解してLC/MS/MSの試料液とした。

2.4 標準添加量

ポジティブリスト制度における一律基準が0.01ppm⁴⁾に設定された場合を想定し, 添加濃度を試料換算0.01ppmとした。試料20gに標準混合溶液(1 μg/ml)200 μlを添加し, 精製後の最終試料溶液量を2ml(10g 試料/ml)とした。測定対象マトリックスで希釈した標準溶液で検量線を作成して定量を行った。評価基準として分析値(回収率)が60~140%, 相対標準偏差(RSD)が20%以内であることを条件とした。

3 結果

3.1 GC/MS-SCAN測定

GC/MS-SIM測定では1グループで設定可能なイオン数の限度があるため, 100種以上の農薬を1メソッドで測定するのは感度の面から困難である。また, GC/MS注入口, イオン源, カラム等の汚れが原因で, 保持時間のシフトが生じることによるメソッド修正が不可欠となる。そこで, GC/MS-SCAN測定による139農薬(異性体等含153種類)の一斉分析の有用性⁵⁾を検討するために, ほうれん草の抽出液をマトリックスとした50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml混合標準溶液の各

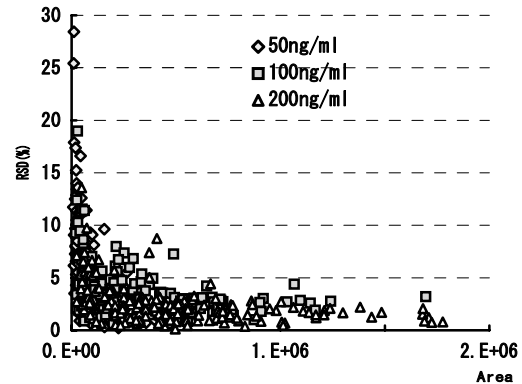


図1 各農薬の濃度別相対標準偏差 (GC/MS-SCAN測定, n=3)

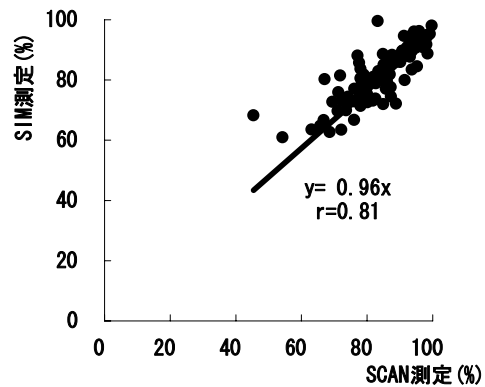


図2-1 SIM測定及びSCAN測定による回収率 (ほうれん草標準添加回収試験; 0.01ppm, n=3)

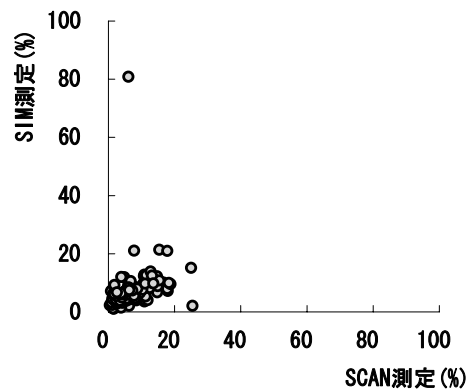


図2-2 SIM測定及びSCAN測定によるRSD値 (ほうれん草標準添加回収試験; 0.01ppm, n=3)

3回繰り返し測定を行い, 平均値(M), 標準偏差(S)及びRSDを計算した。SCAN質量範囲は m/z=30~500とした。この濃度は試料換算で0.005ppm, 0.01ppm, 0.02ppmである。

標準偏差の3倍(3S)を検出下限値とすると, 各濃度でのRSDが30%以下(3S相当)であれば測定濃度を検出下限値とすることが可能である。RSDは概ね対象農薬のGC/MS-SCAN測定での面積が小さければ高くなる傾向があると考えられ, 実測定においても図1に示す同様な傾向が認められた。50ng/mlではRSDが全て

30%以下であったものの、S/Nが3未満の農薬数が20あり、50ng/mlを全ての農薬の検出下限値とすることはできなかった。100ng/mlでは6農薬（クロルフェンピホス、シマジン、シフルトリン、シベルメトリン、デルタメトリン、メトスルフロンメチル）のRSDが10%~20%であったが、その他の農薬では10%未満でありS/Nも3以上であることから、100ng/ml(試料換算0.01ppm)を検出下限値とすることが可能であった。

また、精製法にENVI-Carb/LC-NH₂を使用し、アセトニトリル/トルエン(3/1)を負荷・溶出溶媒としたほうれん草の標準添加回収試験(0.01ppm)では、SIM測定とSCAN測定のどちらかの回収率が60%~140%に入っている農薬の回収率について、両者の関係を図2に示した。両者にほぼ良好な対応が認められたが、ENVI-Carb/LC-NH₂精製ではディルドリン、イソプロチオランの定量を妨害するマトリクス由来の夾雑物を除去しきれず、ディルドリンの定量はSIM測定ではできなかった。しかし、SCAN測定では妨害イオンを避けたイオンを使用することで定量可能であり、夾雑物の多いマトリクス中の残留農薬一斉分析ではSCAN測定が有効であると考えられた。

SIM測定からSCAN測定に変更する長所としては、SIM測定ではイオン取込限度数により複数メソッドを併用している所を、SCAN測定では1メソッドで良いため、分析時間と解析時間が短縮されることがある。しかし、反面、SCAN測定では感度面でSIM測定に劣っており、感度保持のためのGC注入口やカラム切断、MSのイオン源洗浄などメンテナンスが常時必要となるため、ルーチン分析においては煩雑さから免れない短所もある。

3.2 LC/MS/MS-MRM測定

当所で現在採用しているLC/MSによる測定⁶⁾では、ソフトイオン化のため、概ね分子量にH⁺またはNH₄⁺、Na⁺が付加またはH⁺がはずれた親イオンだけをモニターし定量イオンとしている。このため、ピークの分離を十分にすることが必要であり、多成分一斉分析では一試料の測定時間70分程度を要している。また、抽出液マトリクス中の夾雑物が定量イオンを妨害する場合、LC/MSだけではピークの同定が困難である。

そこで、親イオンと娘イオンをペアで測定することにより、ピークの同定が容易なLC/MS/MS-MRM測定について検討を行った。

LC/MS/MS-MRM測定では、数pgの濃度を測定できる高感度のため、キャリオーバーの程度を把握しておく必要がある。インジェクターの洗浄時間を15秒として、33農薬(異性体等含40種類; 図中農薬)の混合標準溶液(メタノール溶液)100ng/mlを10μl分析後に、メタノール10μlを分析し残留濃度を測定した(図3)。この結果、クロルフルアズロン、フルフェノクスロン、ジクロメジン、エトベンザニドに、0.1%~0.2%のキャリオーバーが認められた。

次に、分析条件における移動相の水比率が多いことから、試料溶解溶媒の検討を行った。ピーツ20gに1μg/mlの41農薬(異性体等含47種類)混合標準溶液400μlを添加し、試料調製(精製はSAX/PSA使用⁶⁾)したものをメタノール/水(8/2)、メタノール、アセトニトリルを溶解溶媒として各々調製し、回収率の比較を行った(図4)。メタノール/水(8/2)で溶解した場合、エトベンザニドの回収率が38%(RSD:20%)と他2溶媒に比べ低いものとなった。アセトニトリルではシモキサニルの回収率が190%(RSD:6%)、アルジカルブスルホキシドの回収率が160%(RSD:65%)と高くなり、全体としてメタノールが最適であった。

検出下限値を検討するため、白菜をマトリクスとした1ng/mlの41農薬(異性体等含47種類)の混合標準溶液の各5回繰り返し測定を行い、GC/MS-SCAN測定

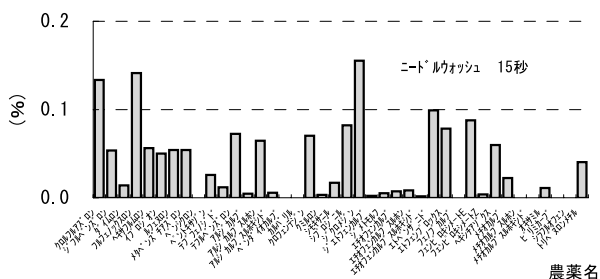


図3 100ng/ml 打ち込み後の Carryover

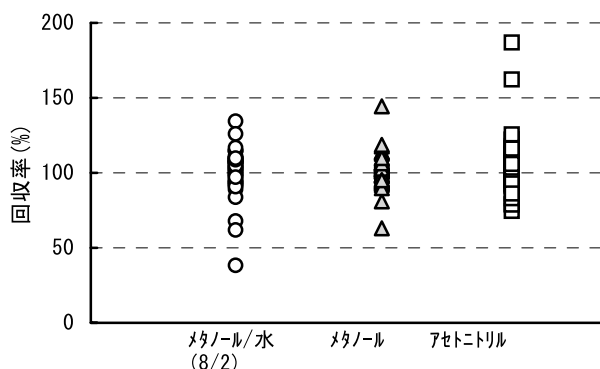


図4 溶解溶媒別回収率 (ピーツ標準添加回収試験; 0.01ppm, n=3)

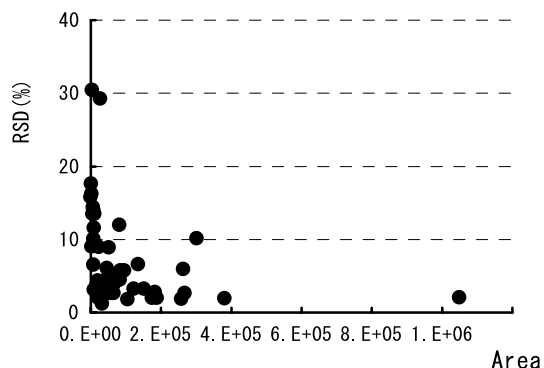


図5 LC/MS/MS-MRM 測定による RSD 値 (1ng/ml, n=5)

と同様な評価を行った(図5)。トリベヌロンメチル、シクロキシジムはRSDが30%, 29%, アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド、アルジカルブスルホン、オキサミル、シモキサニル、ジクロメジン、スピノサド、テルブホス、ニテンピラム、フェノブカルブ、ペントキサゾン(11農薬)のRSDが10%~20%であったが、全ての農薬でRSDが30%以下であり、S/Nも10以上であることから、1ng/ml(試料換算:0.001ppm)を検出下限値とすることが可能であった。

また、LC/MS/MS-MRM分析による測定時間は、現行法のLC/MSによる2つのメソッドの測定時間(各々70分, 45分)と比較すると、Positiveモードが19分、Negativeモードが14分となり、約3分の1に短縮でき、また、物質の同定も容易に可能となったことから、解析時間も大幅に短縮することができた。

3.3 精製法の検討

当所の残留農薬一斉分析法³⁾で使用しているSAX/PSAによる精製では、色素の多い緑黄色野菜等を対象とした場合、緑黄色色素の除去が十分にできない。

色素除去に有効に働く活性炭系カートリッジとして、ENVI-Carb/LC-NH₂精製によるほうれん草の標準添加回収試験を行ったところ、GC/MSでのディルドリン、イソプロチオランの保持時間付近に大きな妨害ピークがあり、定量を妨害することが判明した。GC/MS-SCAN測定を行い、そのスペクトルから脂肪酸であることが推定された(図6)。

これらのことから、脂肪酸の除去に有効なSAX/PSAと、色素除去に有効なCARBOGRAPHを直列に組み合わせ、ほうれん草の標準添加試験により、負荷・溶出溶媒の検討を行った。負荷液にアセトン/ヘキサン(3/7)5ml、溶出液にアセトン10mlを使用した場合とアセトニトリル/トルエン(3/1)を負荷(5ml)・溶出液(15ml)として使用した場合を比較すると、回収率が60%未満または140%超過、またはRSDが20%を超過した農薬は、前者では32農薬(GCMS:18, LCMS/MS:14)、

後者では9農薬(GC/MS:7, LC/MS/MS:2)であった。

この結果をもとに、アセトニトリル/トルエン(3/1)を負荷・溶出液に使用し、ほうれん草、ブロッコリー、白菜、大根の標準添加回収試験を行ったところ、表2に示すとおり概ね良好な結果を得た。

4 ま と め

ポジティブリスト制度導入に向け、現在の分析対象農薬125種類から180種類に対象農薬を増やし、同定性に優れたGC/MS-SCAN測定及びLC/MS/MS-MRM測定による分析法の検討を行った。この結果、約50種類の農薬を増加しても分析時間が現行法の1/3~1/2に短縮可能となり、GC/MS-SCAN測定では検出下限値を0.01ppm、LC/MS/MS-MRM測定では検出下限値を0.001ppmとすることができた。

また、精製法においても、二層カラムカートリッジENVI-Carb/LC-NH₂及びSAX/PSAをそれぞれ単独で使用して精製を行ったときに残る脂肪酸や色素成分を、SAX/PSAと活性炭カラムを直列使用することで、定量に妨害のない程度まで除去することが可能となった。

引用文献

- 1) 平成15年法律第55号, 平成15年5月30日公布
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課: "食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制に係る分析法(案)の検討について" 平成16年8月6日
- 3) 長船達也, 氏家愛子, 佐藤信俊: 宮城県保健環境センター年報, 22, 64(2004).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課: "食品中に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度における暫定基準の設定(最終案)" 平成17年6月3日
- 5) 雅楽川憲子, 近藤園江絵, 丸山浩一, 酒井洋: 新潟県保健環境化学研究所年報, 19, 76(2004).
- 6) 氏家愛子, 長船達也, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 21, 126(2003).

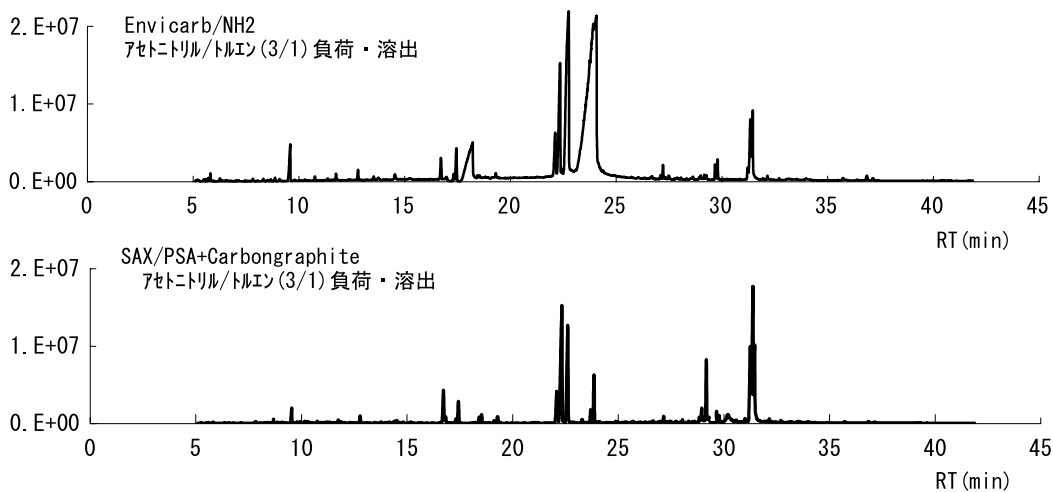


図6 GC/MS-SCAN測定トータルイオンクロマトグラム(ほうれん草:0.01ppm)

