

GC/MSによる農産物中揮発性農薬の一斉分析法の検討

生活衛生部門

Studies on Simultaneous Determination of Volatile Pesticide Residues in Crops by GC/MS

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

A method for the simultaneous determination of volatile pesticide in agricultural product was studied by Dean-Stark distillation method and QuEChERS method. Dean-Stark method involved the distillation of 50g sample with 500ml of water for an hour using Dean-Stark apparatus and concentration into 10 ml of n-hexane. QuEChERS method involved the extraction of 10g sample with 10ml acetonitrile, followed by a salting-out step with anhydrous MgSO₄ and NaCl. Removal of residual water and cleanup were performed with dispersive solid phase extraction. In this method 600 mg anhydrous MgSO₄ and 100 mg PSA solvent were mixed with 6ml acetonitrile extract. GC/MS was used for quantitative analysis of pesticides. Twenty eight volatile pesticides were spiked at 0.1-0.2 µg/g into 5 agricultural products for the recovery test and calibration were performed using matrix-matched standards. Eight to 16 pesticides showed good recoveries (70-120%, RSD ≤ 20%, n=3) by Dean-Stark distillation method, but hydrophilic pesticides such as dichlorvos and allidochlor were hardly recovered. Twenty two to 25 pesticides showed good recoveries by QuEChERS method. The detection limits of tested pesticides were 0.0004 - 0.008 µg/g in Dean-Stark distillation method and 0.004 - 0.08 µg/g in QuEChERS method.

Key Words : 残留農薬 pesticide residue, ディーンスターク蒸留装置 Dean-Stark distillation, QuEChERS 法 QuEChERS method, ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS, 揮発性農薬 volatile pesticide

1 はじめに

平成18年度に食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制度が施行され、約800種類の農薬等が規制の対象となった。この制度に対応して監視を行うためには、より多数の農薬について効率よく高精度に分析することが求められる。

当所では、現在、厚生労働省医薬食品安全部長通知（食安発1129002号：平成17年11月29日）を基にした方法⁽¹⁾で青果物の残留農薬の一斉分析を行っているが、この方法ではEPTC、ジクロロボス、ブチレートなどの蒸気圧が高く、揮発性が高い農薬については前処理でのエバポレーターによる減圧濃縮や窒素バージによる濃縮操作の過程での損失により回収率が低くなる傾向があった⁽²⁾。

今回、これらの揮発性が高い農薬の一斉分析について、Dean-Stark 蒸留装置を用いる蒸留抽出による方法と迅速簡便な前処理法である QuEChERS 法による方法で検討した。

Dean-Stark 蒸留装置は、蒸留された物質を少量の溶媒に捕集する装置であり、ethylene dibromide の通知法による分析に用いられている。溶媒の使用量が少なく、簡

便な操作で抽出、精製、濃縮を同時に行うことができ、精製度の高い検液が直接得られる利点がある⁽³⁾。

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 法は Anastassiades らのグループが開発した前処理手法⁽⁴⁾であり、従来の前処理方法と異なり、濃縮過程がなく、固相抽出に用いられている充填剤を試料抽出液に直接混合してクリーンアップを行う、迅速簡易な残留農薬分析法である。

今回、濃縮操作時に損失しやすい、蒸気圧が高く揮発性の高いと考えられた28種の農薬について Dean-Stark 蒸留法と QuEChERS 法による2種類の前処理方法で添加回収試験 (n=3) を行い、一斉分析への適応を検討した。定量には GC/MS を用いた。

2 方法

(1) 試料

京都市内に流通していたりんご、キャベツ、トマト、にんじん、ほうれんそうを添加回収試験に使用した。

(2) 対象農薬及び標準物質

蒸気圧が高く揮発しやすいと考えられる農薬を中心に、表1に示した28種類の農薬について検討した。

表1 Monitoring Ions for GC/MS Analysis and Physical Chemistries of 28 pesticides

No. Pesticide name	M. f	Mol. wt	monitering ion	vapor pressure 5)6)7)	log Pow 5)6)7)	solubility in water 5)6)7)
			m/z			
1 allidochlor	C ₈ H ₁₂ ClNO	173.6	56, 138	1250mPa/25°C	0.97	20g/l (25°C)
2 biphenyl	C ₁₂ H ₁₀	154.21	154	133Pa/71°C		6.94mg/l (25°C)
3 butylate	C ₁₁ H ₂₃ NOS	217.4	146	1730mPa/25°C	4.1	36mg/l (20°C)
4 chloretoxyphos	C ₆ H ₁₁ Cl ₄ O ₃ PS	336	153, 263	106mPa/20°C	4.59	<1mg/l (25°C)
5 chlorneb	C ₈ H ₈ Cl ₂ O ₂	207.1	191, 206	400mPa/25°C		8mg/l (25°C)
6 DCIP	C ₆ H ₁₂ Cl ₂ O	171.1	45	3.28 x 10 ⁵ mPa/25°C	2.14	2.07g/l (25°C)
7 diallate	C ₁₀ H ₁₇ Cl ₂ NOS	270.2	234	20mPa/25°C	3.21	14mg/l (25°C)
8 dichlobenil	C ₇ H ₃ Cl ₂ N	172.0	100, 136, 171	144mPa/25°C	2.70	21mg/l (25°C)
9 dichlormid	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ NO	208.1	108, 124, 172	800mPa/25°C	1.84	5g/l (25°C)
10 dichlorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	221.0	109, 185	2100mPa/25°C	1.9	18g/l (25°C)
11 dithiopyr	C ₁₅ H ₁₆ F ₅ N ₂ O ₂ S ₂	401.4	286, 306	0.53mPa/25°C	4.75	4mg/l (20°C)
12 EPTC	C ₉ H ₁₉ NOS	189.3	86, 128	1 x 10 ⁴ mPa/25°C	3.2	375mg/l (25°C)
13 ethalfluralin	C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄	333.3	276, 316	11.7mPa/25°C	5.11	0.3mg/l (25°C)
14 ethylene dibromide	C ₂ H ₄ Br ₂	187.9	107, 109	1.5kPa/25°C	1.76	4.3g/kg (30°C)
15 etridiazole	C ₅ H ₅ Cl ₃ N ₂ OS	247.5	183, 211, 248	1430mPa/25°C	3.37	117mg/l (25°C)
16 HCB	C ₆ Cl ₆	284.81	284	1.45mPa/20°C		0.005mg/l (25°C)
17 heptachlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373.34	272	53mPa/25°C	4.4-5.5	0.056mg/l (25°C)
18 methacriphos	C ₇ H ₁₃ O ₅ PS	240.2	180, 208, 240	160mPa/20°C		400mg/l (20°C)
19 molinate	C ₉ H ₁₇ NOS	187.3	126, 187	746mPa/25°C	2.88	880mg/l (25°C)
20 nitrapyrin	C ₆ H ₃ Cl ₄ N	230.9	194, 196	450mPa/25°C	3.32	72mg/l (25°C)
21 peblate	C ₁₀ H ₂₁ NOS	203.36	128	4.7Pa/25°C	3.87	60mg/l (20°C)
22 phorate	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260.38	75, 231, 260	85mPa/25°C	3.92	50mg/l (25°C)
23 propachlor	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	211.7	120, 176, 211	10mPa/25°C	1.4-2.3	580mg/l (25°C)
24 propham	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.2	137, 179	3.28 x 10 ⁵ mPa/25°C		250mg/l (20°C)
25 tecnazen	C ₆ HCl ₄ NO ₂	260.9	203, 215, 261	240mPa/15°C		0.44mg/l (25°C)
26 terbfos	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	288.4	153, 231	34.6mPa/25°C	2.77	4.5mg/l (27°C)
27 thiometon	C ₆ H ₁₅ O ₂ PS ₃	246.35	60, 88, 125	39.9mPa/20°C	3.15	200mg/l (25°C)
28 tolclphosmethyl	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	301.1	250, 265	57mPa/20°C	4.56	1.1mg/l (25°C)

農薬標準品はDr. Eherenstorfer GmbH社, Riedel-deHaën社, 和光純薬工業, 林純薬工業社製を用いた。各農薬標準品から 1000 μg/ml 溶液を調製し, 混合, 希釈して添加回収試験用に 10 μg/ml 標準混合溶液を調製した。Dean-Stark 蒸留法用にはヘキサン溶液を QuEChERS 法用にはアセトニトリル溶液を調製した。

(3) 試薬

ヘキサン, アセトニトリル, アセトンは残留農薬分析用を, 塩化ナトリウム, 無水硫酸マグネシウム, クエン酸三ナトリウム, クエン酸水素二ナトリウムは試薬特級のものを使用した。QuEChERS 法で用いる PSA 充填剤は, Varian 社製 Bondesil-PSA40 μm(PARTS#12213024)を, GCB(グラファイトカーボン)充填剤には, Supelco 社製 SupelcleanENVI-Carb 120/400(PARTS#57210-U)を使用した。蒸留法で用いる液相分離ろ紙には, Whatman 1 PS11.0cm を使用した。

(4) 装置

ア ディーン・スターク蒸留装置

柴田科学製のものを使用した。蒸留フラスコ, 冷却管, 蒸留トラップを図1のように組み立てて使用した。蒸留フラスコはスライダックスに接続したマントルヒーターで加熱した。

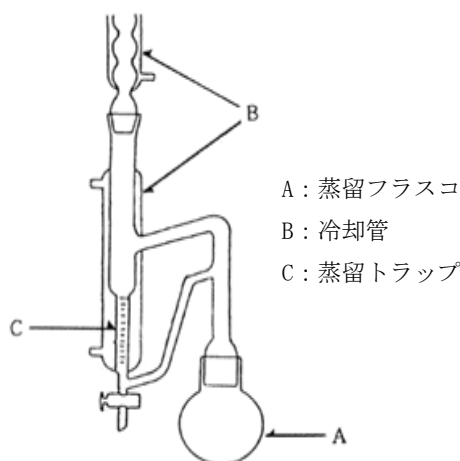


図1 Dean-Stark 蒸留装置

イ ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

GC は, ThermoQuest 社製 TRACE GC Ultra を, 質量分析計は同社製 PolarisQ を使用した。測定条件は以下のとおりである。

GC カラム: 関東化学製 ENV-5MS (30m, 0.25mm id, 膜厚 0.25 μ m),

カラム温度: 50°C (1min)-20°C/min-150°C-10°C/min-300°C (7min)

注入口温度: 50°C (0.1min)-14.5°C/sec-260°C (5min)

キャリアガス: He 1ml/min

イオン源温度: 230°C

イオン化法: EI

注入方法: PTVsplitless 注入法,
splitlesstime3min splitless flow
50ml/min

注入量: 1 μ l

測定: SCAN, segment1 (RT3.5-5min) :m/z=90-500,
segment2 (RT5-6.5min) :m/z=42-500
segment3 (RT6.5-30min) :m/z=50-500

ウ 高速遠心機

コクサン H-9R 4000rpm で使用

(5) 試験溶液の調製

今回の添加回収試験は図 2, 図 3 のフローチャートに従って行った。

ア 前処理方法 1 (図 2 :Dean-Stark 蒸留法)

細切均一化した試料 50g を 1000ml の蒸留フラスコに量り採り, 水 500ml 及び n-ヘキサン 10ml を加えた。これに消泡用シリコン数滴を加えた後, Dean-Stark 蒸留装置に取り付け, 一時間加熱還流を行った。冷却後, 蒸留トラップ内の水をほとんど除去した後, n-ヘキサン層を液相分離ろ紙を用いて 10ml メスフラスコにろ過し, トラップ内を少量の n-ヘキサンで洗浄し, 洗液を上記のろ紙でろ過後, n-ヘキサン層に合わせて全量を正確に 10ml としこれを試験溶液として, GC/MS で測定した。

イ 前処理方法 2 (図 3 :QuEChERS 法)

細切均一化した試料 10g をキャップ付きポリプロピレン製の 50ml 容遠心管にとり, アセトニトリル 10ml を加え, 1 分間激しく振とうした。これに無水硫酸マグネシウム 4g, 塩化ナトリウム 1g, クエン酸三ナトリウム 1g, クエン酸水素二ナトリウム 0.5g を加え, 1 分間激しく振とうした。その後, 4000rpm, で 5 分間遠心した。

試料 50g 蒸留フラスコ

蒸留水 500ml
n-ヘキサン 10ml

蒸留抽出

Dean-Stark 蒸留装置で加熱還流 60min

冷却後, 蒸留トラップ内の n-ヘキサン
及び水を分取
液相分離ろ紙で脱水

n-ヘキサン層分取

n-ヘキサンで 10ml に定容

GC/MS 用試験溶液

図 2 前処理方法 1 Dean-Stark 蒸留抽出法

試料 10g 50ml 容遠心チューブ

アセトニトリル 10ml

振とう 抽出 1min

4g 硫酸マグネシウム
1g 塩化ナトリウム
1g クエン酸三ナトリウム
0.5g クエン酸水素二ナトリウム

振とう 1min

遠心分離 4000rpm 5min

上清 4ml

600mg 硫酸マグネシウム及び,
100mg PSA 充填剤入りの
10ml 容遠心チューブ※に移す
※クロロフィルやカロテノイドの多い
サンプルは上記に 30mg ENVI-Carb 充填剤を追加

遠心分離 4000rpm 5min

上清 1ml

GC/MS 用試験溶液

図 3 前処理方法 2 (QuEChERS 法)

遠心後の上清のアセトニトリル層 4ml を PSA 充填剤 100mg, 無水硫酸マグネシウム 600mg の入ったキャップ付きポリプロピレン製 10ml 遠心管に移した。ほうれんそう, にんじん等の, クロロフィルやカロテノイドの多いサンプルについては, 上記に,

ENVI-Carb 充填剤 30mg を加えたものを使用した。これを 4000rpm, 5 分間遠心し, 上層 1ml を試験溶液として GC/MS で測定した。

3 結果及び考察

(1) Dean-Stark 蒸留による添加回収試験の結果

表 1, 表 3 に各農産物の Dean-Stark 蒸留抽出による添加回収試験の結果を示す。回収率の算出にあたっては, 各農産物のブランクサンプルから, 試料マトリックス濃度 5g/ml のマトリックス添加標準を調製し, 定量を行った。

検討した 28 種類の農薬のうち, Dean-Stark 蒸留抽出法で回収率が 70~120%, RSD が 20%以下であった農薬は, りんごで 8, キャベツで 15, トマトで 15, にんじんで 16, ほうれんそうで 12 種類であった。(表 3)

biphenyl, butylate, chlotethoxyphos, DCIP, diallate, EPTC, peblate, tecnazene については, 5 種類の農産物全部で, また, chlornob, dichlobenil, dithiopyr, EDB, etridiazole, HCB については, 3 種類以上の農産物において, 回収率 70~120%かつ RSD20%以下の結果が得られた。これらの農薬については, 今回検討した Dean-Stark 蒸留抽出法が適用できると考えられた。また, heptachlor, molinate, tolclophosmethyl については, 回収率の平均が 50%以上であった。

dichlorvos, allidochlor は, 回収率の平均が 10%以下であり, dichlormid, propham, methacriphos, propachlor, phorate, thiometon, terbufos などの回収率は平均で 30%以下であった。これらの農薬については, Dean-Stark 蒸留での回収が困難であると考えられた。

回収率が低かった農薬の水への溶解度は, dichlorvos で 18g/l(25℃), allidochlor で 20g/l(25℃), dichlormid で 5g/l(25℃), propachlor で 580mg/l(25℃)であり, 回収率が高かった農薬の水への溶解度と比べて, 大きい値のものが多かった。また, 回収率の悪かった農薬のオクタノール/水分分配係数は回収率の良かった農薬に比べて小さい値のものが多かった(表 1)。これらの極性が高く, 水溶性の高い農薬については, 農薬蒸留トラップ内でヘキサン層から水層に農薬が移行してしまうことが低回収率の一因であると考えられた。

その他の低回収率の原因として, 装置の冷却不足により蒸留装置外に揮散した可能性や加熱による熱に不安定な農薬の分解等が考えられた。

以上の結果より, Dean-Stark による蒸留抽出は, 蒸気圧が高く, 揮発性の高い熱に安定な農薬のうち, 極性が低く, 脂溶性が高い農薬について適用できると考えられた。

(2) QuEChERS 法による添加回収試験の結果

表 4, 表 5 に, 各農産物の QuEChERS 法による添加回収試験の結果を示した。回収率の算出にあたっては, 各農産物のブランクサンプルから, 試料マトリックス濃度 1g/ml のマトリックス添加標準を調製し, 定量を行った。

検討した 28 種類の農薬のうち, QuEChERS 法で回収率が 70~120%, RSD が 20%以下であった農薬は, りんごで 25, キャベツで 27, トマトで 23, にんじんで 26, ほうれんそうで 22 種類であった。

QuEChERS 法では, Dean-Stark 蒸留抽出法で回収率が悪かった, dichlorvos, propachlor 等の農薬についても良好な回収率が得られた。一部を除き全体的に良好な回収率が得られたが, RSD%の値が 20%を超えるものも見られ, データのばらつきが大きかった。

また, 精製でグラファイトカーボンを使用したほうれんそうとにんじんについては, HCB の回収率が 70%以下であった。また, ほうれんそうでの tecnazene の回収率も 70%以下であった。これは, グラファイトカーボンに平面構造を有する農薬が吸着したためであると考えられた。このため, 精製時にグラファイトカーボンを使用するにあたっては, 平面構造を有する農薬の回収については注意が必要であると考えられた。図 4 に HCB と tecnazene の構造式を示す。

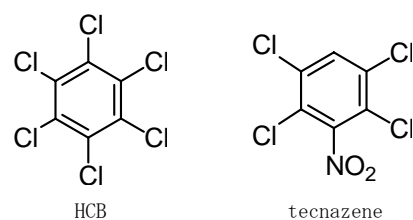


図 4 HCB と tecnazene の構造式

(3) 検出限界の検討

今回検討した農薬の標準混液を, Dean-Stark 蒸留抽出法用にヘキサンで, QuEChERS 法用にアセトニトリルで希釈し, 0.002 μ g/ml から 1 μ g/ml の範囲で標準系列を作成し, GC/MS で測定をおこない, 検出限界を求めた。検出限界は, 標準溶液 1 μ l を GC/MS に注入した時にピークが S/N=10 の条件で確認できる最低濃度を検出限界とした。Dean-Stark 蒸留抽出法の検出限界

表2 Recoveries of 28 Pesticides Added to Agricultural Products by Dean-Stark Distillation Method

Pesticide Name	Recovery (%)*1										LOD*2 μg/ml	LOD*3 μg/g
	Apple		Cabbage		Tomato		Carrot		Spinach			
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD		
allidochlor	5.8	2.9	6.7	10.0	8.8	13.2	7.4	9.4	5.4	3.9	0.04	0.008
biphenyl	70.9	4.9	76.3	9.2	74.5	1.7	72.8	2.7	73.5	2.3	0.002	0.0004
butylate	72.9	8.1	83.1	3.1	73.0	1.3	87.5	11.5	72.9	5.3	0.004	0.0008
chlortoxyphos	71.8	5.6	76.5	10.5	71.7	1.3	77.2	4.3	72.3	0.6	0.005	0.001
chloroneb	55.8	6.1	70.5	7.9	76.1	2.9	74.7	4.0	66.8	3.6	0.005	0.001
DCIP	70.6	3.0	77.8	13.2	74.9	2.0	76.2	8.8	70.6	0.9	0.02	0.004
diallate	74.2	7.5	73.9	8.2	75.9	2.9	82.1	5.9	71.6	3.7	0.004	0.0008
dichlobenil	52.3	9.7	72.2	3.6	75.8	3.7	72.2	3.6	65.8	5.6	0.004	0.0008
dichlormid	23.3	13.1	25.7	13.0	47.9	8.3	25.8	3.6	26.4	2.9	0.01	0.002
dichlorvos	6.4	2.4	6.0	3.4	7.4	5.4	5.9	4.7	6.8	7.6	0.04	0.008
dithiopyr	66.4	9.1	80.8	8.5	81.5	3.1	80.7	4.6	74.2	4.0	0.002	0.0004
EPTC	72.9	2.5	81.3	4.1	80.9	2.1	78.4	6.0	71.2	3.7	0.006	0.0012
ethalfuralin	59.1	5.3	74.1	10.9	69.9	6.1	75.0	8.6	72.6	10.8	0.02	0.004
ethylene dibromide	66.6	3.7	70.1	6.0	73.0	3.7	71.3	3.9	70.7	4.2	0.008	0.0016
etridiazole	55.4	4.5	75.7	6.3	77.0	1.7	70.2	1.8	68.8	4.2	0.04	0.008
HCB	67.0	5.9	75.1	10.8	70.4	4.1	73.3	3.8	71.3	1.5	0.002	0.0004
heptachlor	40.7	9.9	61.9	13.2	57.4	1.8	62.7	4.9	55.8	8.1	0.04	0.008
methacriphos	20.6	11.3	28.4	9.6	38.2	10.9	22.5	5.9	24.9	6.5	0.01	0.002
molinate	43.6	7.2	63.6	7.6	73.2	2.3	61.8	3.6	50.4	3.5	0.008	0.0016
nitrapyrin	28.8	26.7	36.5	12.2	42.0	2.4	26.3	4.2	38.3	5.2	0.04	0.008
peblate	70.0	7.1	78.2	2.9	75.9	7.2	72.0	5.2	73.3	8.7	0.006	0.0012
phorate	12.9	8.2	25.9	10.0	33.7	5.0	15.9	1.5	28.2	5.1	0.008	0.0016
propachlor	6.8	19.5	9.2	12.5	19.4	11.0	9.7	6.4	8.5	1.9	0.008	0.0016
propham	23.9	35.3	26.0	12.4	50.5	12.1	27.3	2.1	21.6	4.2	0.04	0.008
tecnazen	70.9	5.5	72.8	7.1	75.0	1.3	74.9	7.1	71.0	1.9	0.008	0.0016
terbfos	20.5	7.7	36.3	9.8	45.4	1.1	28.0	0.9	37.4	2.7	0.005	0.001
thiometon	15.2	17.1	23.2	15.5	36.3	10.3	24.7	6.9	30.1	4.0	0.005	0.001
tolclophosmethyl	59.5	7.7	63.5	1.7	67.9	1.7	71.6	1.9	57.8	5.7	0.004	0.0008

*1 添加濃度0.1 μg/g, n=3での平均回収率

*2 検出限界 (Limit Of Detection) ヘキサン標準溶液1μlをGC/MSに注入したときS/N=10を示す最低標準濃度

*3 検出限界 μg/mlを試料中濃度μg/gに換算したもの

*4 □は回収率が70%未満または120%を超過, またはRSDが20%を超えたもの。

表3 Dean-Stark 蒸留法による各農産物の添加回収試験結果の比較

	Apple	Cabbage	Tomato	Carrot	Spinach
回収率 50~150%の農薬数	15	18	19	18	17
回収率 70~120%, RSD≤20%の農薬数	8	15	15	16	12
回収率 50~70%の農薬数	7	3	4	2	5
回収率 <50%の農薬数	13	10	9	10	11

表4 Recoveries of 28 Pesticides Added to Agricultural Products by QuEChERS Method

Pesticide Name	Recovery (%) *1										LOD*2 μg/ml	LOD*3 μg/g
	Apple		Cabbage		Tomato		Carrot		Spinach			
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD		
allidochlor	83.3	17.9	92.6	2.9	84.3	4.4	95.5	2.5	62.7	7.2	0.05	0.05
biphenyl	92.7	4.5	96.6	1.3	77.4	11.5	97.2	5.8	72.2	7.7	0.004	0.004
butylate	91.0	8.0	89.2	5.8	85.8	6.8	97.8	1.4	75.0	13.9	0.04	0.04
chlortoxyphos	89.2	9.4	87.4	3.7	87.4	7.0	93.4	5.5	71.1	4.1	0.01	0.01
chloroneb	83.7	8.0	91.6	2.9	75.2	4.1	98.9	4.2	77.4	7.3	0.01	0.01
DCIP	79.0	24.0	83.9	4.1	82.3	26.8	97.7	4.0	87.5	7.5	0.05	0.05
diallate	90.1	3.8	93.5	8.7	85.8	12.2	95.3	0.7	69.8	6.1	0.01	0.01
dichlobenil	95.4	3.9	97.0	4.8	72.6	3.6	96.3	3.4	70.3	11.1	0.01	0.01
dichlormid	82.5	10.7	95.3	2.2	81.5	6.4	95.1	3.1	72.0	9.2	0.05	0.05
dichlorvos	77.4	14.0	97.0	1.5	90.2	7.8	97.3	1.3	85.9	14.0	0.05	0.05
dithiopyr	96.3	8.7	101.0	1.4	87.2	24.4	97.5	1.4	82.9	35.7	0.004	0.004
EPTC	73.4	13.5	88.4	2.2	81.5	10.5	93.6	2.3	69.1	5.4	0.04	0.04
ethalfuralin	75.6	27.3	99.8	1.3	83.0	10.7	94.6	1.6	72.3	1.2	0.08	0.08
ethylene dibromide	83.1	9.8	64.8	0.4	65.4	3.8	68.9	5.6	89.1	5.1	0.02	0.02
etridiazole	93.5	1.8	93.2	4.5	86.6	15.5	100.4	2.2	83.2	7.7	0.05	0.05
HCB	85.1	8.5	89.1	1.1	66.0	12.4	67.5	10.9	40.2	7.0	0.008	0.008
heptachlor	62.4	11.5	101.8	2.9	81.1	17.1	95.4	5.5	84.0	8.5	0.08	0.08
methacriphos	82.2	7.0	98.1	3.3	84.7	9.3	96.4	1.9	75.6	4.5	0.05	0.05
molinate	80.2	14.0	91.5	3.3	79.0	1.5	93.8	5.5	76.2	4.6	0.04	0.04
nitrapyrin	89.3	4.9	95.8	2.8	92.0	23.0	99.8	1.9	79.9	12.9	0.06	0.06
peblate	71.2	12.7	94.8	1.7	93.5	10.8	93.5	3.4	72.3	14.7	0.05	0.05
phorate	88.0	1.3	96.8	3.0	91.1	8.1	95.1	2.6	71.2	8.7	0.02	0.02
propachlor	86.4	5.9	93.3	2.2	90.4	16.6	95.0	2.1	75.4	4.4	0.04	0.04
propham	75.6	19.7	87.8	3.1	89.4	3.0	96.3	3.1	61.7	6.8	0.05	0.05
tecnazen	79.7	10.5	86.9	3.1	76.8	5.6	94.5	6.2	67.6	9.9	0.04	0.04
terbufos	92.2	14.7	97.4	1.3	83.6	17.4	93.9	0.8	85.8	6.5	0.01	0.01
thiometon	96.2	2.0	93.1	5.2	82.5	18.0	96.3	1.4	88.0	6.8	0.02	0.02
tolclophosmethyl	94.2	2.7	97.1	2.9	86.0	16.2	95.5	0.9	90.5	11.6	0.01	0.01

*1 添加濃度0.2 μg/g, n=3での平均回収率

*2 検出限界 (Limit Of Detection) アセトニトリル標準溶液1 μl をGC/MSに注入したときS/N=10を示す最低標準濃度

*3 検出限界 μg/mlを試料中濃度 μg/gに換算したもの

*4 □は回収率が70%未満または120%を超過, またはRSDが20%を超えたもの。

表5 QuEChERS法による各農産物の添加回収試験結果(n=3)の比較

	Apple	Cabbage	Tomato	Carrot	Spinach
回収率 50~150%の農薬数	28	28	28	28	27
回収率 70~120%, RSD ≤ 20%の農薬数	25	27	23	26	22
回収率 50~70%の農薬数	1	1	5	2	1
回収率 <50%の農薬数	0	0	0	0	0

を表2に、QuEChERS法の検出限界を表4に示す。表中に検出限界を試料中濃度に換算した値を示した。

Dean-Stark 蒸留抽出法での検出限界の試料中濃度換算値は、0.0004 $\mu\text{g/g}$ から 0.008 $\mu\text{g/g}$ の範囲であり、QuEChERS 法での検出限界の試料中濃度換算値は、0.004 $\mu\text{g/g}$ から 0.08 $\mu\text{g/g}$ の範囲であった。

ヘキサン溶液の方がアセトニトリル溶液よりも、検出感度が良好であり、検出限界の値は小さかった。

また、Dean-Stark 蒸留抽出法は 5g 試料相当/ml の濃縮率であるため、検出限界の試料中濃度換算値は、検討した 28 農薬すべてにおいてポジティブリスト制度における一律基準 0.01ppm 以下の値が得られた。

一方、QuEChERS 法の場合、アセトニトリル溶液の検出下限がヘキサン溶液に比べて高く、また前処理操作で濃縮の過程がなく、1g 試料相当/ml の濃縮率であるため、検出限界の試料中濃度換算値が 0.01ppm 以下の値であった農薬は、検討した 28 農薬中 biphenyl, dichlobenil, chlorneb, chlorethoxyphos, diallate, HCB, terbufos, dithiopyr, tolclophosmethyl の 9 農薬であった。これら以外の農薬について、一律基準 0.01ppm 付近の濃度をスクリーニングするためには、GC 注入量を増やす、サンプルの濃縮をする等、より高感度を得るための工夫が必要であると考えられた。

(4) GC/MS 測定時のマトリックス効果の検討

今回検討した Dean-Stark 蒸留抽出法と QuEChERS 法の 2 つの前処理方法によって得られた抽出溶液の試料マトリックスが、GC/MS 測定時の定量値にどの程度影響を与えるかを検討した。

Dean-Stark 蒸留抽出法については、各農産物の試料サンプルを前処理し、得た試験溶液に、0.5 $\mu\text{g/ml}$ になるように混合標準溶液を添加し、試料マトリックス濃度 5g 相当/ml のマトリックス添加標準液を調製した。ヘキサン溶液で調製した 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 混合標準溶液とともに、GC/MS で測定し、ピーク面積値を比較した。各検討対象農薬のマトリックス添加標準液中のピーク面積値とヘキサン溶媒中のピーク面積値との比をパーセントで表示した結果を表6に、グラフにプロットした結果を図5に示す。

Dean-Stark 蒸留抽出法のマトリックス添加標準液ではピーク面積比が、80.6%から 159.9%の範囲であった。

dithiopyr のピーク面積比は、各農産物で 130%~160%であり、また、リンゴ中の nitrapyrin の面積比が 130%以上であった。これらの農薬については試料

表6 Matrix effect of Dean-Stark Distillation method in GC/MS

Pesticide Name	Apple	Cabbage	Tomato	Carrot	Spinach
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
allidochlor	110.2	101.1	104.5	100.5	107.1
biphenyl	101.6	99.3	97.8	98.7	100.8
butylate	108.9	96.9	95.9	110.7	104.4
chloretoxyphos	111.3	108.0	100.3	106.7	102.0
chloroneb	105.6	105.2	95.1	107.3	100.0
DCIP	102.7	100.5	101.7	98.0	96.4
diallate	110.6	104.5	96.9	98.8	102.1
dichlobenil	102.2	104.4	98.7	101.6	102.6
dichlormid	100.6	106.5	107.6	95.4	100.4
dichlorvos	118.0	112.3	105.5	107.7	113.5
dithiopyr	140.2	159.5	129.6	153.8	131.0
EPTC	109.1	99.8	106.3	106.4	98.2
ethalfuralin	94.4	87.2	87.2	80.6	81.9
ethylene dibromide	113.5	118.9	109.9	107.2	99.5
etridiazole	117.8	113.9	110.9	122.4	106.7
HCB	101.1	103.1	98.7	103.7	101.0
heptachlor	93.6	101.9	94.8	121.5	92.0
methacriphos	109.7	105.4	102.3	109.5	105.9
molinate	106.5	102.1	100.9	107.9	101.7
nitrapyrin	134.8	117.7	115.4	119.2	109.6
peblate	105.5	101.8	99.6	102.5	100.5
phorate	118.6	108.1	102.5	108.6	104.5
propachlor	109.8	99.1	101.5	104.8	105.1
propham	103.1	109.1	106.5	112.4	111.5
tecnazen	114.0	98.9	107.2	106.0	98.7
terbufos	112.2	109.9	101.0	108.3	102.2
thiometon	122.5	110.1	105.8	110.9	107.1
tolclophosmethyl	118.7	109.6	106.6	114.5	103.3

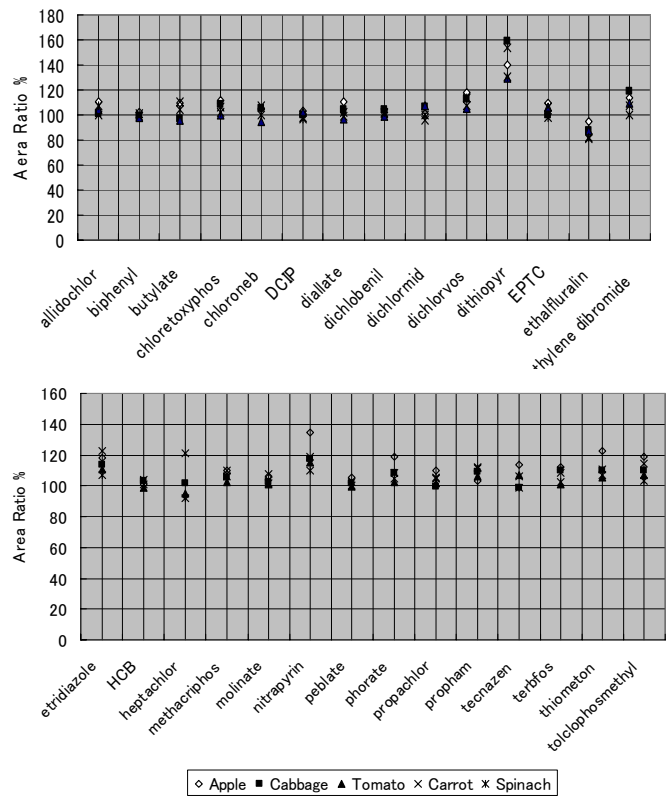


図5 Matrix Effect Of Dean-Stark Distillation Method in GC/MS

マトリックスにより感度が上昇したと考えられた。また、ethalfuralinの面積比は80%~95%であり、感度が低下した。その他の農薬については、ピーク面積比は90%~125%であった。

Dean-Stark 蒸留抽出法では、不揮発性のマトリックスがヘキサン層に回収されにくく、高い精製効果が得られるために、試料中のマトリックスがピーク面積に与える影響が比較的少なかったと考えられた。葉緑素の多いほうれんそうや、カロテノイドの多いにんじんなどの検体でも、抽出液に着色は認められず、色素成分は、蒸留によって、十分除去されていたと考えられた。

図7に、Dean-Stark 蒸留抽出法でのりんごとにんじんのマトリックス添加標準液の GC/MS-SCAN 測定トータルイオンクロマトグラムを示す。

QuEChERS 法については、各農産物の試料サンプルを前処理して得た試験溶液に、0.2 μg/ml になるように混合標準溶液を添加し、試料マトリックス濃度 1g 相当/ml のマトリックス添加標準液を調製した。アセトニトリル溶液で調製した 0.2 μg/ml 混合標準溶液とともに、GC/MS で測定し、ピーク面積値を比較した。各検討対象農薬のマトリックス添加標準液中のピーク面積値とアセトニトリル溶媒中のピーク面積値との比をパーセントで表示した結果を表7に、グラフにプロットした結果を図6に示す。

QuEChERS 法のマトリックス添加標準液ではピーク面積比が、93.0%から295.5%の範囲であった。

面積比が120%を超える農薬が多く、全体的に感度が上昇していた。これはQuEChERS法での精製が、PSA充填剤と無水硫酸マグネシウムによる簡易な精製法であったために試料のクリーンアップが十分でなかったためであると考えられた。ほうれんそうやにんじんの試験溶液では、肉眼による観察でも色素の残留が認められた。また、各農産物の試験溶液のTICクロマトグラムからは脂肪酸やコレステロール由来と考えられるピークが認められた。図8に、QuEChERS法でのりんごとにんじんのマトリックス添加標準液のGC/MS-SCAN測定トータルイオンクロマトグラムを示す。

QuEChERS法での正確な定量のためには、マトリックス添加標準液やサロゲートによりマトリックス効果を補正することが必要であると考えられた。

表7 Matrix effect of sample solution from quechers method in GC/MS

Pesticide Name	Apple (%)	Cabbage (%)	Tomato (%)	Carrot (%)	Spinach (%)
allidochlor	144.1	150.5	266.2	189.2	202.0
biphenyl	145.9	245.5	205.7	176.7	152.6
butylate	131.0	150.5	153.6	140.8	142.2
chloretoxphos	144.8	115.3	178.9	130.8	137.2
cloroneb	133.6	143.9	203.1	225.1	147.1
DCIP	104.4	93.0	146.3	95.0	110.8
diallate	120.4	109.0	130.3	132.4	145.9
dichlobenil	161.1	173.9	224.0	158.5	147.7
dichlormid	146.1	107.0	185.7	116.0	131.7
dichlorvos	152.5	254.4	295.5	261.3	221.6
dithiopyr	106.9	113.7	136.7	139.8	142.4
EPTC	156.8	112.0	168.1	122.7	147.0
ethalfuralin	108.7	138.3	159.6	118.3	108.4
ethylene dibromide	99.0	96.4	101.0	109.0	277.9
etridiazole	135.6	181.4	200.8	197.0	229.8
HCB	110.0	120.6	142.4	125.0	118.8
heptachlor	110.7	134.8	147.0	115.9	137.3
methacriphos	123.0	151.2	202.9	157.5	167.1
molinate	145.2	144.1	174.1	144.0	123.2
nitrapyrin	161.5	225.0	265.7	236.4	254.7
peblate	135.9	150.1	174.0	145.5	193.0
phorate	116.4	122.5	155.8	166.3	146.5
propachlor	147.1	154.0	219.7	156.9	173.2
propham	144.1	198.6	194.7	151.6	182.7
tecnazen	128.5	116.4	198.4	137.7	134.2
terbufos	123.1	127.5	154.6	127.6	138.3
thiometon	145.0	146.3	200.4	146.2	146.3
tolclophosmethyl	119.5	149.3	156.8	135.8	164.3

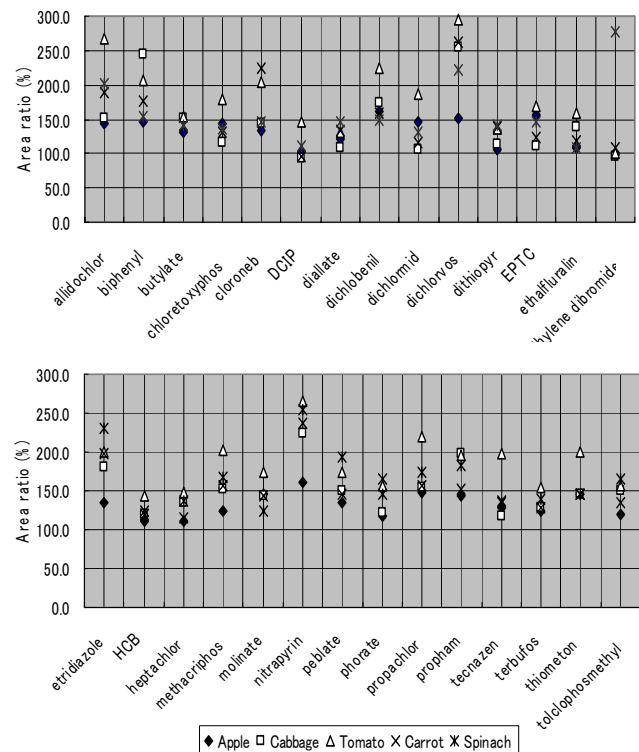


図6 Matrix Effect of QuEChERS Method in GC/MS

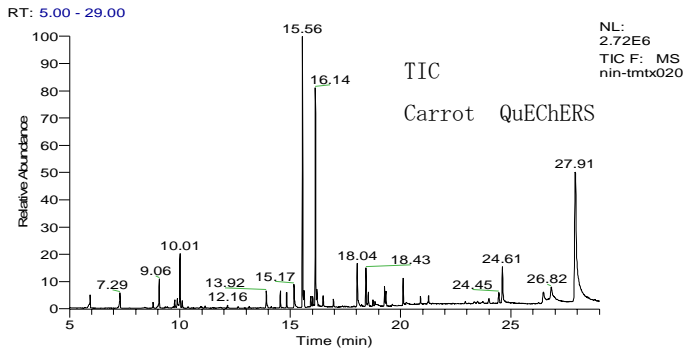
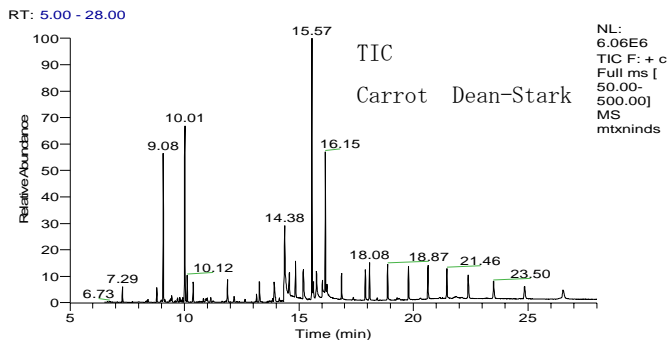
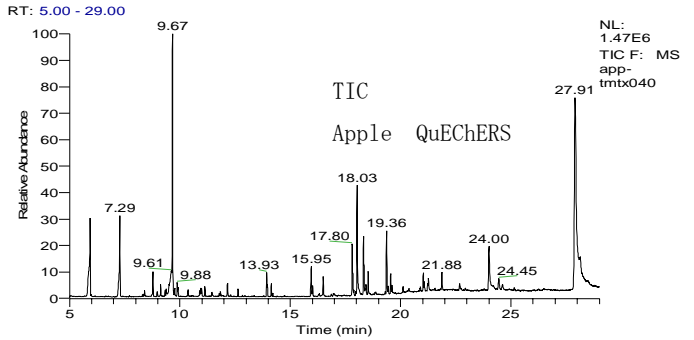
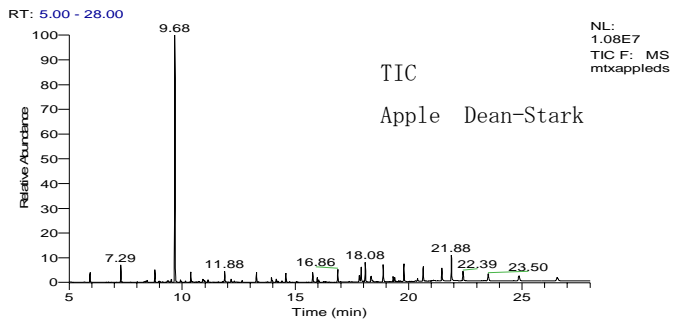


図7 Dean-Stark 蒸留抽出法によるマトリックス添加標準の GC-MS SCAN 測定 TIC クロマトグラム

図8 QuEChERS 法によるマトリックス添加標準液の GC-MS SCAN 測定 TIC クロマトグラム

4 まとめ

揮発性が高い農薬 28 種の一斉分析について Dean-Stark 蒸留装置を用いる蒸留抽出による方法と迅速簡便な前処理法である QuEChERS 法による方法で検討した。

Dean-Stark 蒸留法は、簡便な操作で濃縮率が高く、精製度の高い試験液が得られた。揮発性の高い農薬のうち、熱に安定で、極性が低く、脂溶性が高い農薬について適用できると考えられた。水溶解度の高い、極性の高い農薬については回収率が低く適用が困難であると考えられた。測定対象の 28 農薬について、検出限界は 0.01ppm より小さい値であった。今回の検討で、良好な回収率が得られた農薬については、日常検査のスクリーニング法として適用可能であると考えられた。

QuEChERS 法では、検討対象の農薬全体について概ね良好な回収率が得られたが、試料のクリーンアップが十分でなく、GC/MS 測定時に試料マトリックスの影響を受けやすかった。そのため、正確な定量のためには、マトリックス添加標準やサロゲートを用いる等の工夫が必要であると考えられた。また、QuEChERS 法では、検討対象の農薬のうち、検出限界が 0.01ppm より小さかった農薬は 28 農薬中 9 種類であった。ポジティブリスト制度の一律基準付近の濃度をスクリーニングするために GC 注入量

を増やす、サンプルの濃縮をする等、より高感度を得るための工夫が必要であると考えられた。

5 参考文献

- (1) 厚生労働省医薬食品局安全部長通知：“食品に残留する農薬，試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”
- (2) 伴創一郎，他：京都市衛生公害研究所年報，**72**，105-115(2006)
- (3) 長谷川ゆかり，他：衛生化学，**34**(6)，508-517(1988)
- (4) Anastassiades, M., Lehotray, S. J., et al: AOAC Int., **86**, 412-431(2003)
- (5) 上杉康彦，他：最新農薬データブック第3板 ソフトサイエンス社，(1997)
- (6) 日本植物防疫協会：農薬ハンドブック 2005 年版
- (7) British Crop Protection Council: The Pesticide Manual, 14th Edition, (2006)
- (8) 農薬残留分析法研究班：農薬の残留分析法 (改訂版)，中央法規，(2006)
- (9) 日本食品衛生会：食品衛生検査指針 残留農薬編