

残留農薬の一斉分析におけるデータ解析の客観性確保について

生活衛生部門

Operative Management on the Survey of Pesticide Residues in Agricultural products

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

In the positive list system, gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) are adopted for analysis of pesticide residues. However, the conventional method has the common problem that compounds are not accurately identified when some of the compound peaks overlap. For accurate compound identification and quantification, handwork analysis of chromatograms is necessary. Meanwhile, the GLP (Good Laboratory Practice) Principles require that all processes must be recorded and reproducible. We discussed operative management of objective analysis of chromatograms in according to the GLP Principles.

Key Words

pesticide residue analysis 残留農薬分析, GC/MS ガスクロマトグラフ質量分析計,
LC/MS 液体クロマトグラフ質量分析計, analysis of Chromatograms データ解析,
GLP : Good Laboratory Practice 適正試験所規範

1 はじめに

ポジティブリスト制度施行時に厚生労働省が示した残留農薬の一斉試験法では、ガスクロマトグラフ質量分析計（以下GC/MS）及び液体クロマトグラフ質量分析計（以下LC/MS）が採用された。GC/MS及びLC/MS測定は、時系列に成分を分離すると同時にマススペクトルデータを集めるため、膨大なデータ量となる。そのため、コンピュータを用いて自動解析処理を行う必要があるが、通常の測定結果は、複雑にピークが重なり合い、自動処理では正しい測定結果を得ることが困難である。したがって、解析者は、画面上で解析結果を補正し、正しく判断する必要がある。

一方、食品分野の検査は、GLPに基づく厳密な精度管理が要求され、データの解析においても客観性の確保が求められる。つまり、画面観察を行う解析者の判断にも、客観的な妥当性のある基準を設定する必要があるといえる。しかし、残留農薬一斉検査のデータ解析は、コンピュータの運用管理に関わる制限の中、限られた情報処理装置で膨大な処理をしていかなければならない。

そこで、当部門の解析作業の現状について分析し、過度な作業負担のかからない効率的な管理基準作成のための基礎データとした。

2 方法

(1) GC/MS 測定用対象農薬

表1 GC/MS 測定用混合標準溶液

名称	メーカー名
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix I	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix II	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix III	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix IV	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix V	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix VI	林純薬
農薬混合溶液 PL2005 農薬 GC/MS Mix VII	林純薬
PESTICIDE MIXTURE SOLUTION	AccuStandard 社製 PL-11-1

上記以外に当所調製混合農薬3種（合計約520種、重複を含む。）を使用した。

(2) LC/MS 測定用対象農薬

表2 LC/MS 測定用混合標準溶液

名称	メーカー名
農薬混合標準液 53	関東化学
農薬混合標準液 54	関東化学
農薬混合標準液 58	関東化学
農薬混合標準液 45	関東化学
農薬混合標準液 55	関東化学

上記以外に当所調製混合農薬を使用した（合計約230種）。

なお、LC/MS 測定対象とした一部の成分は、GC/MS 測定対象分と重複している。

(3) 測定装置

GC/MS：ポラリス Q, サーモクエスト株, 四重極イオントラップ質量分析装置

LC/MS：LCQ-DECA, サーモクエスト株, 四重極イオントラップ質量分析装置

(4) 解析ソフト

Xcalibur

(5) 測定試料と前処理

青果物については、QuEChERS 法を応用した方法で前処理を行った。詳細については、別途報告の予定である。

なお、前処理は、下図のような作業手順を定めたチェックシートを作成し、検査日ごとに承認者の確認を求めている。

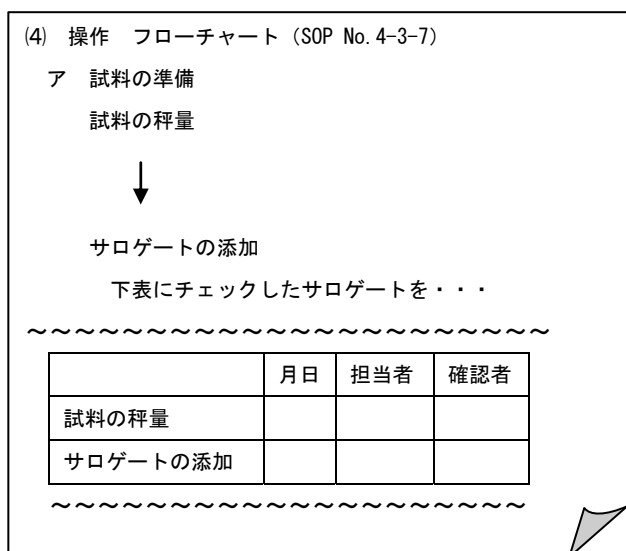


図1 前処理のフローシート

(6) サロゲート化合物の添加と定量値の補正

表3 サロゲート化合物一覧

有機塩素系	α-HCH-d6, pp'-DDD-d4, pp'-DDE-d4 等
有機リン系	MEP-d6, chlopyriphos-d10, EPN-d5 等
ピレスロイド系	esfenvalerate-d7 等
カーバメート系	thiobencarb-d10 等

各試料に表3のサロゲート化合物を 0.1 μg/g 添加後、前処理を行い試験溶液を調製した。

GC/MS の定量は、サロゲート化合物を用いた内部標準法により求めた。LC/MS の定量は、外部標準法によ

り求めた。

(7) 測定条件

GC/MS の測定条件は、表4に示すとおりである。質量分析部の設定はフルスキャンによる測定で、確認試験を行う場合はMS/MS 測定を併用する。

表4 GC/MS の測定条件例

カラム	ENV-5MS, 0.25mmID×30m×0.25 μm : Cicc.
カラム温度	50°C, 1分-25°C/分-150°C-10°C/分-300°C, 7分
注入口温度	PTV : 50°C, 1分-14.5°C/秒-260°C
注入量	1 μl
検出器温度	230°C
MASS 部設定	50~600amu

LC/MS の測定条件は、表5に示すとおりである。質量分析部の設定は、MS/MS 測定を基本とするため、測定成分ごとに設定した。

表5 LC/MS の測定条件例

カラム	Inertsil ODS-3 2.1mmID×150mm
移動相	0.5%酢酸水溶液 (A) : アセトリル(B) のグラジュエント 0分 B=15% - 20分 B=95% - 30分
流速	0.2ml/min
カラム温度	40°C
注入量	5 μl
MASS 部設定	Tune Method:ESI-200 μl Flow 分析ファイル (MS/MS 又は SIM) Divert Valve 5分:To Source, 30分:To Waste

3 結果と考察

(1) 解析作業の実際

定量メソッドは、グループ別に作成した測定メソッドごとに作成する。GC/MS 測定で標準混液のグループ数と同じ11個、LC/MS 測定で13個作成している。解析対象化合物数は、GC/MS 測定で約670、LC/MS 測定で約230となり(重複及びサロゲート化合物等を含む。)1つの試料で約900成分の解析を行うことになる。

測定終了後、数人で複数のパソコンを使用して解析作業を分担する。その手順は以下に示すとおりである。

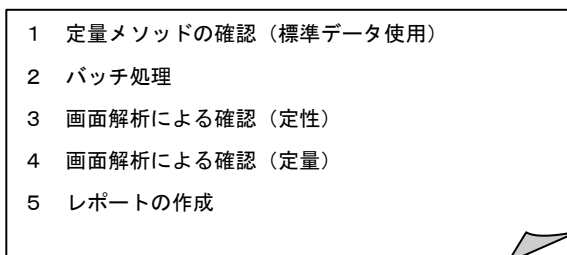


図2 解析作業のフローシート

ア 定量メソッドの確認

定量メソッドは、各標準混液の測定データを用い、リテンションタイム（以下 RT）とマススペクトルの確認を行う。

イ 装置のメンテナンス

装置の状態は、使用状況により変化するため、注入口セプタム、インサート管及びカラムの交換を定期的に行う必要がある。これらのメンテナンスは、測定結果にも影響するため、メンテナンス後の定量メソッドは、通常より大幅な変更が必要になる。

ウ バッチ処理

確認した定量メソッドを用いて測定データのバッチ処理を行う。解析処理されたデータは、定量メソッドごとに自動的に結果がまとめられる。

エ 画面解析

解析結果について、画面を見ながら 1 成分ごとに検量線の直線性、検出下限値、試薬ブランク、検出試料のマススペクトル及び定量値等の確認をしていく（図 3 参照）。この一連の確認作業を 1 回とすると、14 検体の青果物の作業量は、GC/MS 測定で 14000 回及び LC/MS 測定で 6000 回近くになる。

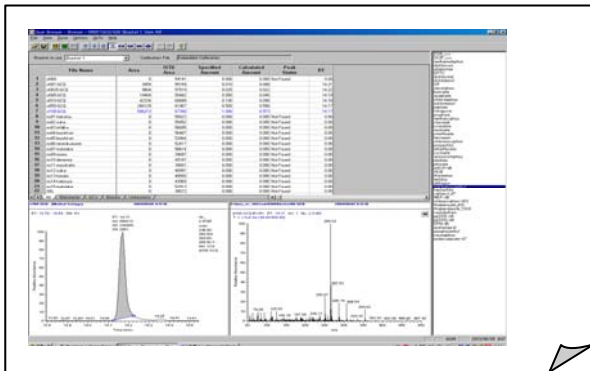


図 3 バッチ処理の解析結果

オ 解析作業の客観性

定量メソッドによるバッチ処理の結果を画面上で変更すると Integration Type が自動的に切り替わり、データに記録される。Integration Type は 3 種あり、Method setting は自動処理、User setting はパラメータ値の変更、Manual integrate はピークを選択等を手動で行った場合を表す。しかし、自動的に記録されるのは、修正の有無と方法のみのため、修正理由等は、解析者が記録する必要がある。

徳島県保健環境センターでは、クロマトグラムの

波形処理管理表を作成し、その記入作業を解析と並行して行われている⁽³⁾。しかし、この作業は、煩雑で、解析者の負担が問題となる。

カ 解析結果の報告書

当部門では、オートレポート機能を利用したデータ解析結果一覧及び検出したピークの解析レポートを作成し（図 4 参照）、確認者の承認を得ている。

検出データのレポートは、未知試料と標準試料のクロマトグラム及びマススペクトルを対比して表示し、判断結果及び理由を明記したものである。

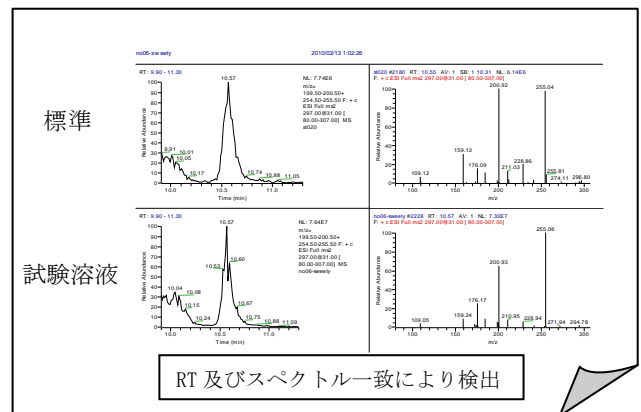


図 4 検出ピークのレポート

キ 解析作業の経過の記録

波形処理管理表に代わり実行可能なものとして、定量メソッドの成分ごとの解析条件及び留意点の一覧表を作成した。そして、一覧表で示した解析条件で正しく定量出来ないケースに遭遇した時、その内容を記入することで解析作業経過の記録とすることを考えた。さらに、解析条件の変更を行う原因をパターン化出来ないかを考察した。

(2) 定量メソッドの変更を考慮する事例

ア 重なりあった標準同士の影響

グループ別に作成した定量メソッドを用いて、他のグループの標準混液を解析し、特異性及び定量値の正確性に対する影響を検討した。図 5 及び 6 は、RT が一致する metolachor(C15H22ClNO2)と chlorpyrifos (C9H11Cl3NO3PS)のクロマトグラムである。

metolachor は m/z162, 238 を、chlorpyrifos は 197, 286, 314 モニターイオンとして選択した。上段及び下段のクロマトグラムは、両成分をそれぞれの定量メソッドで選択したモニターイオンで観察したものである。

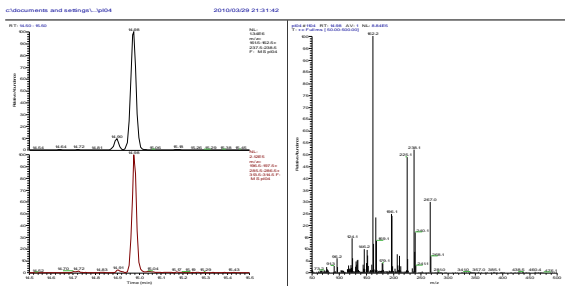


図5 metolachlor のクロマトグラムとマススペクトル

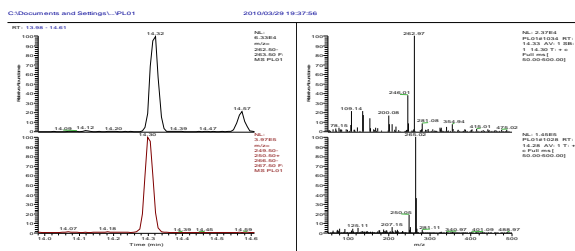


図8 同一グループでRTが重複する農薬
(上段:parathion_methyl, 下段:tolclophos_methyl)

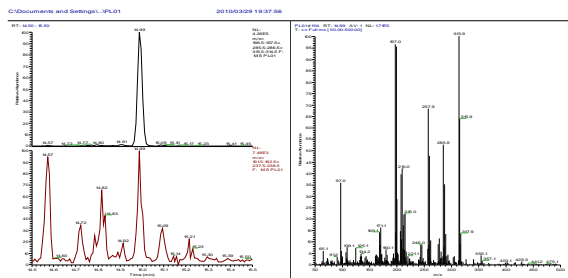


図6 chlorpyrifos のクロマトグラムとマススペクトル

両成分共どちらのモニターイオンでもピークとして観察できる。metolachlor のモニターイオンを 238 のみにすると、chlorpyrifos をピークとして検出することはない(図7)。同様に、chlorpyrifos のモニターイオンを 314 のみにすると、影響を小さくすることができる。

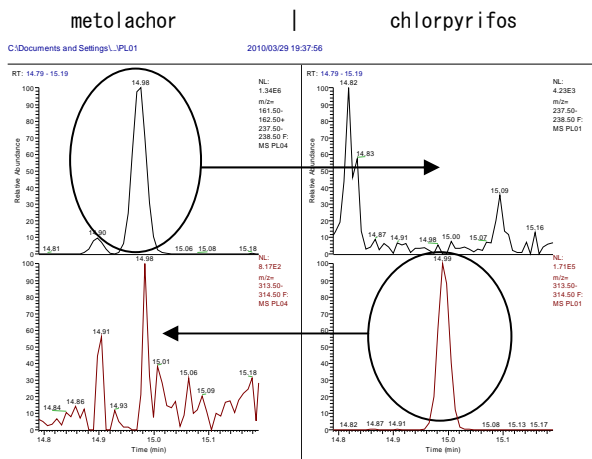


図7 モニターイオン 238 と 314 のクロマトグラム

定量用フラグメントイオンが重複していない場合でも、近辺に同位体パターン又は水素の脱離等によるフラグメントイオンが存在する可能性があり注意が必要である。

図8は、同一標準混液にある parathion_methyl と tolclophos_methyl のクロマトグラムとマススペクトルである。両成分で共通するm/z 79 及び 125 を外すことで分離定量している。

他の定量メソッドで検出した成分は、表6に示す32成分であった。

表6 共通のフラグメントイオンを有する不分離成分

成分名	m/z	成分名
Naled(Dibrom)	127	dicrotophos
salithion(Dioxabenzofos)	78	promcarb
Thiometon	(246)	HOB(249)
Terbufos	(231)	Terbutylazine(229)
Tolylfluanid_metabolite	(214)	b-BHC(219)
cyromazin	109	fonofos
r-BHC	(111)	fonofos(109)
isazophos	97	disulfoton
tolclophos_methyl	79, 125	parathion_methyl
metolachlor	197	chlorpyrifos
fenamiphos	303	trans_chlordane
oxyfluorfen	252	pp_DDE_d4
TCMTB	252	pp_DDE_d4
Chlorpropylate	75, 139	nitrofen
op'_DDT	235	pp'_DDD
Edifenphos	(309)	Quinoxyfen(310)
phosalon	182	triconazole

他の標準グループの定量メソッドにある成分を含む試験溶液を解析する場合は、留意する必要がある。

イ 測定成分の RT の変動

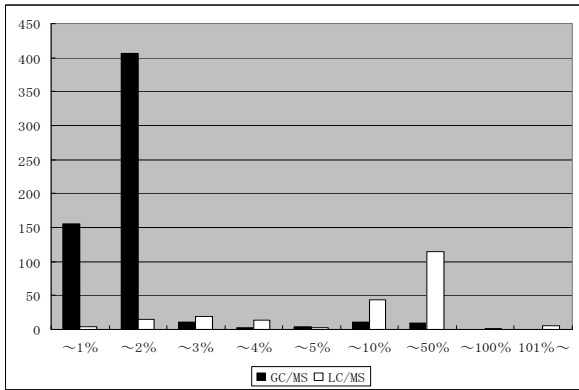


図9 RTの変動率と成分数

平成 21 年 6 月～平成 22 年 4 月に測定した標準混液のデータを用い、成分ごとの RT の変動を観察した。

GC/MS は 1ppm, LC/MS は 0.5ppm の標準混液を対象とした。RT の変動率は、得られたデータの範囲（最大値-最小値）を平均値で除し％で表示した。図 9 に変動率の区分と成分数のヒストグラムを示す。

GC/MS 測定は、年間を通して 2% 以下の変動率の成分が大半を占めた。LC/MS 測定は、10%～50% の変動率を示すものが多い結果となった。

LC/MS 測定は、MS/MS データを採取する成分が大半を占めるため、測定時間を区切り（以下セグメントという）1 セグメント内に 4～8 個の測定条件（以下イベントという）を設定している。そのため、RT の変動に合わせてセグメントの区切りも変更しないと測定できない。実際、測定ごとに RT の変動を確認し、セグメントの調整を行っている。

なお、カラム交換後は、GC/MS 測定においても変動率が大きく、RT の確認を行う必要がある。

ウ 測定成分のピーク面積の変動

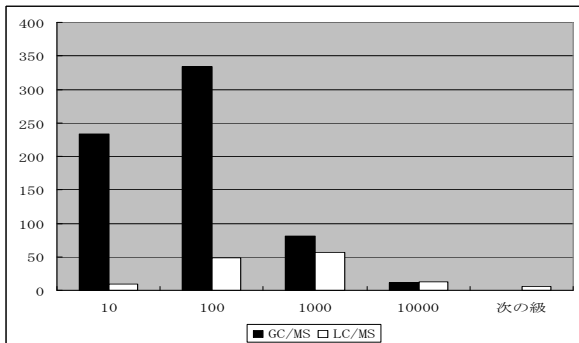


図 11 測定成分のピーク面積変動率

平成 21 年 6 月～平成 22 年 4 月に測定した標準混液のデータを用い、成分ごとのピーク面積の変動を

観察した。ピーク面積の変動率は、得られたデータの範囲（最大値-最小値）を平均値で除し％で表示した。図 11 に変動率の区分と成分数のヒストグラムを示す。GC/MS 測定及び LC/MS 測定ともに変動率は大きく、測定ごとに検量線を引き直す必要があった。

また、変動率の大きい成分は、もともと感度の低いものが多く、測定できなかった場合を含んでいる。

(3) 解析を妨害する要因

ア カラムの劣化

RT 変動の一因として、カラム、注入口及びインサート管の劣化によるピーク形状の非対称化が考えられる。

図 10 は、上段が 2,6-dichlorobenzamide, 下段が phorate のクロマトグラムで、それぞれ左側が劣化したカラム、右側は新しいカラムのデータである。

劣化したカラムでは、2,6-dichlorobenzamide はピーク幅が広がり大きくテーリングしているが、phorate はカラム劣化の影響は観察されない。

また、新しいカラムでは、両成分のピークは分離しているが、劣化したカラムでは、両成分の RT が重なっている。両成分は、m/z 75 が共通しているため、劣化したカラムでは phorate の定量用イオンから 75 を除くと分離定量することが出来る。

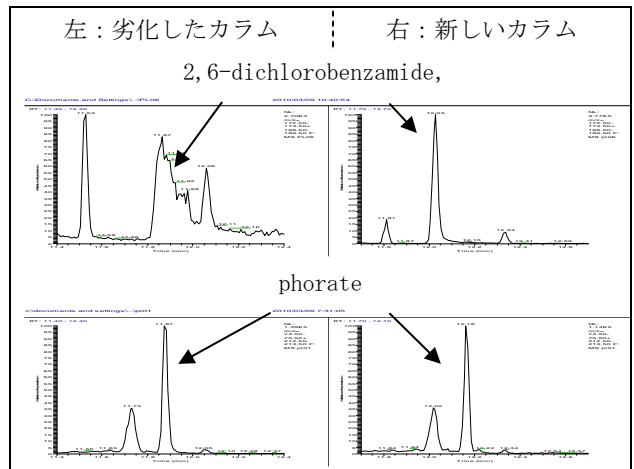


図 10 カラムの劣化により生じた不分離ピーク

しかし、カラム劣化の影響を受けピーク形状が崩れた場合は、カラム交換をして再測定することが基本である。

岡村嘉之⁴⁾らの報告によると、トリアゾール系農薬等は、装置の汚染に強く影響を受けにくいですが、有機リン系農薬、カーバメート系農薬、イプロジオン及びイミダゾール等は汚染の影響を受け易い農薬としている。

イ バイアルのセプタム (GC/MS 測定)

図 12 のクロマトグラムは、同一のバイアルビンに

溶媒を入れ、繰り返し GC/MS で測定をしたものである。左側がアセトニトリル、右側がアセトン：n-ヘキサン（1：1）混液で、上段が1回目、中段が3回目、下段が5回目の測定結果である。

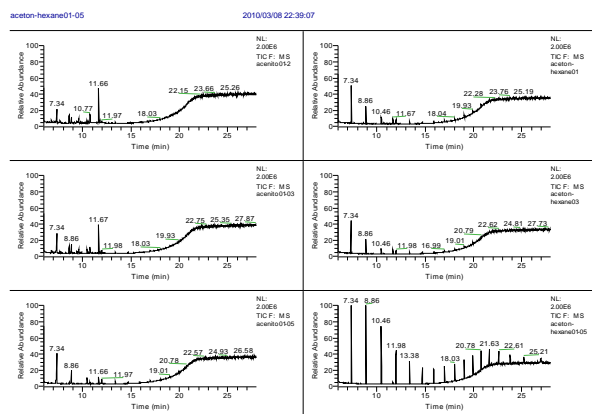


図 12 セプタム由来成分(左:AcCN, 右:Acetone:hexane=1:1)

特にアセトン：n-ヘキサン（1：1）混液でセプタムからの溶出成分が測定回数を増すごとに増加していくことが確認できる。

図 13 にセプタム由来成分のマススペクトルを示す。下段ほど RT が遅いデータである。74u ごとにフラグメントイオンが出現し、 $[O-Si(CH_3)_2]$ の特徴を示した。

表 7 にセプタム由来のピークの影響が見られた GC/MS 測定対象農薬（119 成分）の一覧を示す。

セプタム由来の影響は、解析結果であらゆる試料から検出するという結果を招き、manual integrate で逐一スペクトルを確認していく必要がある。

バイアルビンに保存している試験溶液を再測定すると、セプタム由来成分の妨害が増大する。再測定をする場合に備え、試験溶液は、少量ずつ小分けしてバイアルビンに移すことが望ましい。

ウ バイアルのセプタム (LC/MS 測定)

図 14 のクロマトグラムは、アセトニトリルにバイアルセプタムの小片を入れた溶出液を LC/MS で測定をしたものである。

右側の上段がポジティブモード、下段がネガティブモードのクロマトグラムで左側はそれぞれの RT23~25 近辺のピークのスペクトルである。LC/MS は、セプタム由来の溶出成分の妨害が少ない結果となった。

エ キャピラリーカラムからのポリイミドの溶出

GC/MS のキャピラリーカラムからは、ポリイミドの溶出が観察される。しかし、溶出量は、カラム槽温度に依存しており、モニターイオンの選択でその影響を除去する

のは比較的容易である。よく観察されるイオンは、73, 191, 207, 208, 209, 281m/z 等である。

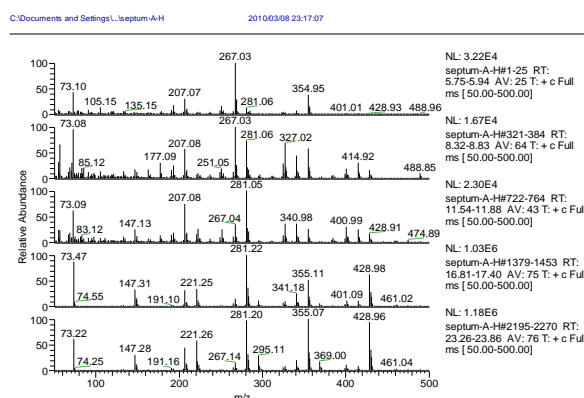


図 13 セプタム由来成分のマススペクトル

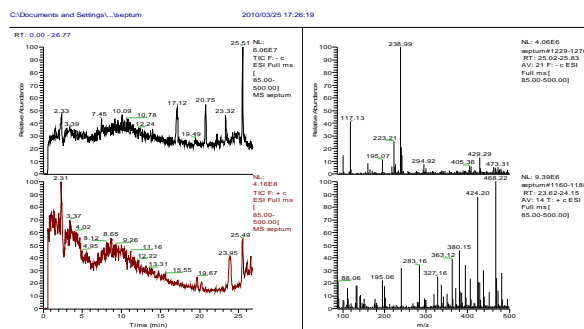


図 14 LC/MS 測定時のセプタム由来成分

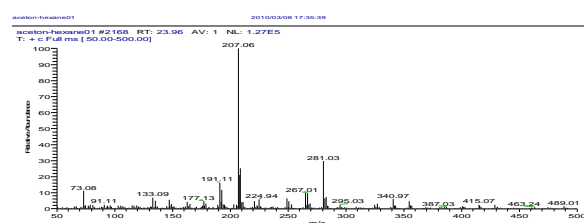


図 15 ポリイミド由来のマススペクトル

(4) まとめ

解析作業の客観性確保のために、従来の検出データレポートに加え、測定成分すべての解析経過記録の作成を目指した。しかし、作業量は膨大で、実行可能な内容にする必要がある。

そこで、波形処理に影響を及ぼす妨害要因を明らかにすることで出来るだけ定量メソッドの変更を少なくし、記入内容の定型化を試みた。

しかし、GLP に基づく業務管理は、ゴールのない膨大な作業の繰り返しであり、効率化という名目の抜け道は存在しないといえる。単調な作業の中に新たな発見を求める持続力が求められる。

4 参考文献

- (1) 京都市衛生公害研究所年報, 74, 121-127 (2008)
 (2) 残留農薬検査における業務管理について: 徳保環七
 年報 No.18 9-17, 2000

- (3) 残留農薬検査における業務管理について (その3):
 徳保環七年報 No.25 7-9, 2007
 (4) ポジティブリスト制度残留農薬一斉分析における農薬の
 挙動評価: 岡村嘉之他 島津評論 Vol.65 No1-2, 2008

表7 セブタム由来イオンに共通の定量イオンを持つ成分一覧

Compound Name	セブタム由来	Compound Name	セブタム由来	Compound Name	セブタム由来
2_(1_naphthyl)acetamide	141	diafenthuron-urea	254	monocrotophos	192
acephate	136	dichlocymet_1	221	monocrotophos	164
acrinathrin	289	dichlorvos	145	monolinuron	61
aldicarb-sulfone	143	diclobutrazol	270	myclobutanil	150
allidochlor	56	dicofol	251	naproanilide	171
aramite	191	dieldrin	263	oxabetrinil	73
azaconazole	217	diethofencarb	267	oxadixyl	163
azamethiphos	215	difenoconazole_1	265	pendimethalin	281
azinphos_methyl	132	difenoquat_methyl_sulfate	234	pentoxazone	285
azinphosethyl	160	dimepiperate	145	perthane	223
bromacil	207	dimethylvinphosZ	295	phorate	75
Bromoconazole_2	295	dinoseb	166	phosphamidon	264
bromophos_ethyl	359	dinoterb	177	piriminobac-methylE	302
bromopropylate	341	diofenolan_1	300	propachlor	211
captan	149	diphenamid	239	propamocarb	188
carbophenothion	342	dithiopyr	286	propetamphos	194
carboxine	225	DP	154	propham	179
carfentrazone_ethyl	312	endosulfan-a	241	propham	179
chlomethoxyinil	266	endosulfan-b	237	propiconazol_1	259
chlorbufam	223	fenpropathrin	265	prothiofos	267
chloretoxyphos	263	fluazifop_butyl	282	pyraflufen_ethyl	349
chlorfenvinphos(a)	267	fluridon	328	pyridaphenthion	340
chlorfenvinphos(b)	267	flutoranil	281	pyrimidifen	184
chlorpyrifos	286	flutriafol	164	pyriproxyfen	136
cinidon_ethyl	358	fluvalinate_1	252	quintozene	237
cis_nonachlor	409	furametpyr_metabolite	296	spirodiclofen	312
cloroneb	191	HCB	284	Swep	187
CNP	287	heptachlor_epoxide_A	353	tecnazen	203
Cyanofenphos	303	Imazalil	173	tefluthrin	177
cyflufenamid	312	indoxacarb_mp	150	tepraloxdim_DMP	213
cyfluthrin_1	163	iprobentophos	204	tepraloxdim_OH_DMP	175
cyhalofop_butyl	357	iprodition	314	terbacil	117
cyhalothrin_2	197	isoxathion_oxon	297	tetradifon	356
cypermethrin_1	163	linuron	61	thiometon	125
d-BHC	219	methamidophos	141	tolclophos_methyl	267
dcip	77	methoprene	73	triallate	268
deltamethrin	253	metominostrobin_Z	191	tricyclazole	189
di_allate_2	86	metominostrobin_e	238	triflumizole	73
diafenthuron	279	mevinphos	192	triticonazole	299
diafenthuron-methnimidamide	251	molinate	55		