

資料

デュアルカラム GC/MS およびパルス式 FPD による 食品中の有機リン系農薬の同時分析

宮本伊織、仲谷 正、角谷直哉、山口之彦、大垣寿美子
大阪市立環境科学研究所

Simultaneous Determination of Organophosphorous Pesticides in Foods by Dual-column GC with Mass Spectrometer and Pulsed FPD

Iori MIYAMOTO, Tadashi NAKATANI, Naoya KAKUTANI,
Yukihiko YAMAGUCHI, Sumiko OGAKI

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences: 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

Abstract

We evaluated a simultaneous analytical method for organophosphorous pesticides in foods using dual-column gas chromatography (GC) with a mass spectrometer (MS) and pulsed flame photometric detector (PFPD, P mode). The pesticides were extracted with ethyl acetate in the presence of anhydrous Na_2SO_4 using a homogenizer. The extract was concentrated and reconstituted in acetonitrile, followed by clean-up with a tandem C18 column and double-layered SPE cartridge column (graphite carbon black/aminopropyl). The test solution, divided into two vials, was measured simultaneously with two automatic liquid samplers. Mass spectra and selective detection of PFPD were obtained from the results of a single measurement. By comparing the data from various types of detectors, it is possible to obtain more qualitative information. This method was useful for the analysis of organophosphorous pesticides in foods.

Keywords: dual-column, organophosphorous pesticides, pulsed FPD,

I. はじめに

農薬、飼料添加物および動物用医薬品について、平成18年度5月から施行されたポジティブリスト制度により、およそ800種類の残留農薬などについて食品中の残留基準が設定され、食品の安全性が強化されるようになった。食品における試験法として、GC/MSまたはLC/MSを用いた一斉試験法と個別試験法が厚生労働省から通知されている。この一斉試験法で適用できない農薬については、各検査機関が一斉試験法の改良を検討している [1-4]。

2007年12月から2008年1月に起きたメタミドホスが混入された中国産冷凍餃子のような加工食品では、多量に含まれる脂質などの夾雜成分によって分析結果に支障をきたす場合が多い。このような加工食品の試験においては、現状の一斉試験法で採用されている固相カラムによる試料の精製では、夾雜物と目的物質の分離は困難であり、多くの目的成分を同時に分析するためには、多種のデータが得られる検出システムの利用が有効である。

一般的な残留農薬検査で用いられる質量分析計 (MS) は、SCAN測定で得られたマススペクトルにより農薬成分が確認でき、SIM測定により選択的な測定を行うことが可能であるが、妨害成分が重なった場合、四重極の質量分解能では十分に妨害物質と測定対象物質を

1) 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34
E-mail: i-miyamoto@city.osaka.lg.jp

質量分離することは難しい。また、炎光光度計(FPD)はリンや硫黄を選択的に検出できるため、有機リン系農薬の測定に活用されているが、ダイナミックレンジが狭く、試料由来のリンや硫黄の影響を受けるため、んにくやたまねぎなどのアリウム属野菜の測定は困難である。そこで、従来の連続炎ではなく断続炎(パルス炎)を用いたパルス式FPD(PFPD)が開発された。PFPDは、元素が発光する時間差を利用し分割測定を行うことで、ノイズやバックグラウンドを減少させ、さらに発光する全ての波長を取り込むブロードバンドフィルターを取り付けることで、従来のFPDよりも高感度かつ選択性に優れた検出が可能である。

MSとPFPDを用いることで、それぞれの特性を生かした分析が可能であるが、個別に測定すると試料の調製やデータの解析などが煩雑になり、データの一貫性も得られにくい。そのため、MSと複数の検出器を取り付けたGCによる同時測定が検討されてきた。これは、1本のキャピラリーカラムを途中で分岐させ、PFPDやアルカリ熱イオン化検出器(FTD)などの検出器につなげて同時測定するシステムである[4]。しかし、分岐することで注入した物質がそれぞれのカラムに分流されてしまい、各検出器に到達する物質の絶対量が減少するため、十分な感度が得られないという問題があった。特に、MSはPFPDに比べて感度が低いため、MSにつなげるカラムは分岐せずに測定することが必要である。今回我々が使用した機器は、2つの注入口にそれぞれカラムをつなげ、同時に同一の試料液を注入するデュアルインジェクションおよびデュアルカラムシステムである。注入口圧力を制御して2つのカラムの保持時間を同一にすることで、一度の測定でMSとPFPDのデータの相互利用を可能にした。本報では、このシステムを用いた有機リン系農薬のMSおよびPFPDの同時分析の実用例を報告する。

II. 研究方法

1. 試料および試薬

試料：市販の冷凍餃子および米を購入し、冷凍餃子は解凍後、マルチブレンダーミルで粉碎し均一にした。米はミルサーを用いて粉碎し均一にした。

標準品：農薬標準品および内部標準品は林純薬工業(株)の混合標準液および関東化学(株)、和光純薬工業(株)製を用いた。測定対象の農薬を表1に示す。内部

標準物質として、ナフタレン-d8、アセナフタレン-d8、フェナンスレン-d10、フルオランテン-d10、クリセン-d12、ペリレン-d12を用いた。メタミドホスは50 mgを

表1 測定対象農薬および測定イオン

Peak No.		定量イオン	確認イオン	
*	Methamidophos	141	126	94
1	Dichlorvos	109	185	220 145
2	Mevinphos	192	127	109 164
3	Methacrifos	240	208	180 125
4	Ethoprophos	158	139	200 242
5	Dioxabenzofos	216	183	153 201
6	Cadusafos	159	213	270 127
7	Phorate	121	260	231 75
8	Dimethoate	125	229	87 143
9	Cyanophos	243	109	125 180
	Terbufos	231	153	288 186
10	Fonofos	109	137	246
11	Diazinon	179	304	199 276
12	Isazophos	161	313	285 257
13	Etrimesfos	292	181	277 153
14	Dichlofenthion	279	223	251 162
	Phosphamidon	127	264	193 227
15	Chlorpyriphos methyl	286	125	288 323
16	Tolchlofos methyl	265	250	125 267
17	Fenitrothion	277	125	109 260
18	Pirimiphos methyl	290	305	276 233
19, 21	Dimethylvinphos	295	109	206 297
20	Malathion	173	158	125 256
21	Fenthion	278	125	169 109
22	Chlorpyriphos	314	199	258 286
	Parathion	291	109	139 235
23, 24	Fosthiazate	195	283	227 166
25, 26	Chlorfenvinphos	267	323	295
26	Isofenphos	213	255	185 121
	Phentooate	274	246	125 107
27	Quinalphos	146	241	270
28	Methidathion	145	125	85 93
29	Propaphos	304	220	262 140
30	Tetrachlorvinphos	331	109	329 333
	Butamifos	286	200	258 232
31	Fenamiphos	139	219	303
32	Prtothiofos	309	267	162 239
33	Profenophos	337	208	374 297
34	Fensulfothion	292	308	156 236
35	Ethion	231	384	153 125
36	Triazophos	257	161	313 285
37	Edifenfos	310	109	173 201
38	Pyridafenthion	340	199	188 125
39	EPN	157	169	323 185
40	Piperophos	320	140	122 278
41	Anilophos	226	334	125 184
	Azinphos methyl	160	132	93 77
42	Phosalone	182	367	121 154
43	Pyraclofos	360	194	138 111

* Methamidophosは個別で測定した

秤量し、アセトンで 50 ml にメスアップし、1000 µg/ml 溶液に調製した。さらにアセトンを用いて 20 µg/ml 溶液まで希釈した。このメタミドホス標準液とそれ以外の農薬混合標準液（林純薬工業（株）製：20 µg/ml）を 2.5 ml ずつ分取し、アセトンで 50 ml にメスアップを行い、1 µg/ml の混合標準液とした。内部標準物質はそれぞれ 50 mg 秤量し、アセトンまたはトルエンで 50 ml にメスアップし、1000 µg/ml 溶液に調製した。この溶液をアセトンで 10 µg/ml 溶液まで希釈した。1 µg/ml 溶液の混合標準液からアセトンを用いて、0.01、0.05、0.1、0.5 µg/ml 溶液になるように希釈した。この検量線の標準液に、内部標準物質を 0.1 µg/ml になるように添加した。

試薬：アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル、ヘキサン、トルエン、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウムは PCB・残留農薬試験用を用いた。精製に用いた固相カラムは、VARIAN 社製の Bond Elut C18（充填量 2 g）および SUPELCO 社製の Envi-Carb/NH₂ を用いた。C18 固相カラムはアセトニトリル 10 ml で、Envi-Carb/NH₂ はトルエン：アセトニトリル（1:3）10 ml、アセトニトル 10 ml でコンディショニングを行い、Envi-Carb/NH₂ 固相カラムの上部に C18 固相カラムを取り付けた。

2. 装置および測定条件

測定に用いたシステムの概要図を図 1 に、測定条件を表 2 に示す。ただし、図では NPD も検出器として取り付けているが、本報ではデータとして示していない。本システムでは、試料液を 2 つのバイアルに分割し、2 台のオートサンプラーで同時に注入し、MS と PFPD によって検出を行う。測定に際しては、予めクロルピ

リホスメチルを測定してそれぞれのカラムの保持時間を確認し、注入圧力と保持時間の関係から、クロルピリホスメチルの保持時間が 18.13 min になるようにそれぞれの注入圧力を求めた。

3. 試験溶液の調製

本報で用いた残留農薬の分析法は、メタミドホスの個別試験法に準拠し、精製方法を一部変更した。餃子試料は 20 g、米試料は 10 g を分析に供した。米試料は蒸留水 20 ml を添加し、2 時間静置した。酢酸エチル 50 ml および無水硫酸ナトリウム 100 g を加え、ブレンダーミルで 3 分間ホモジナイズ抽出した。抽出後、上澄み液をろ過し、残渣に酢酸エチルを 50 ml 加えて再度 3 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液をろ過後、先の抽出液と合わせ、40°C の湯浴でロータリーエバポレーターにて濃縮を行った。抽出液を 1 ml 以下にして、アセトニトリルを加えて 10 ml にした。コンディショニングした C18 固相カラムと Envi-Carb/NH₂ 固相カラムを C18 固相カラムが上部になるようつなげ、粗抽出液を全てカラムに負荷した。その後、4 ml のアセトニトリルで洗浄し、C18 固相カラムを外して Envi-Carb/NH₂ 固相カラムにトルエン：アセトニトリル（1:3）20 ml を流して農薬成分を溶出させた。溶出液を濃縮し、ヘキサン 2 ml になるように定容を行った。また、精製した試料と比較するため、固相カラム処理を省いた未精製の測定溶液も作成した。

表 2 GC/MS および PFPD の測定条件

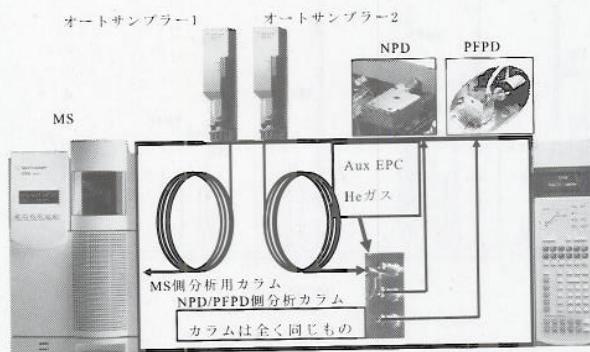


図 1 GC システムの概念図

Gas chromatograph	Agilent 7890A
Capillary Column	HP-5MS, 30 m length×0.25 mm i.d., 0.25 µm thickness
Carrier gas	He
Injection temp.	280°C
Injection mode	Splitless
Oven temp.	60°C (2 min Hold) – 25°C/min (150°C) – 3°C/min (200°C) – 5°C/min (300°C, 7.73 min Hold)
MS	Agilent 5975C inert XL MSD
SCAN	50-550 m/z
SIM	See Table 1
PFPD	OI Analytical 5380
Detector Temp.	300°C
H ₂ Flow rate	11.3 ml/min
Air Flow rate	7.7 ml/min
Make Up Gas (He)	10.5 ml/min

各試料液を 0.5 ml ずつ分取し、窒素気流下で濃縮・乾固させ、農薬標準液を試料液濃度で 0.25 µg/ml になるように加えた後、内部標準物質を 0.1 µg/ml になるよう添加して、測定溶液とした。

III. 結果および考察

1 µg/ml の標準液を測定した MS および PFPD のクロマトグラムを図 2 に示す。MS と PFPDにおいて、各農薬の保持時間がほぼ同一であることが分かる。さら

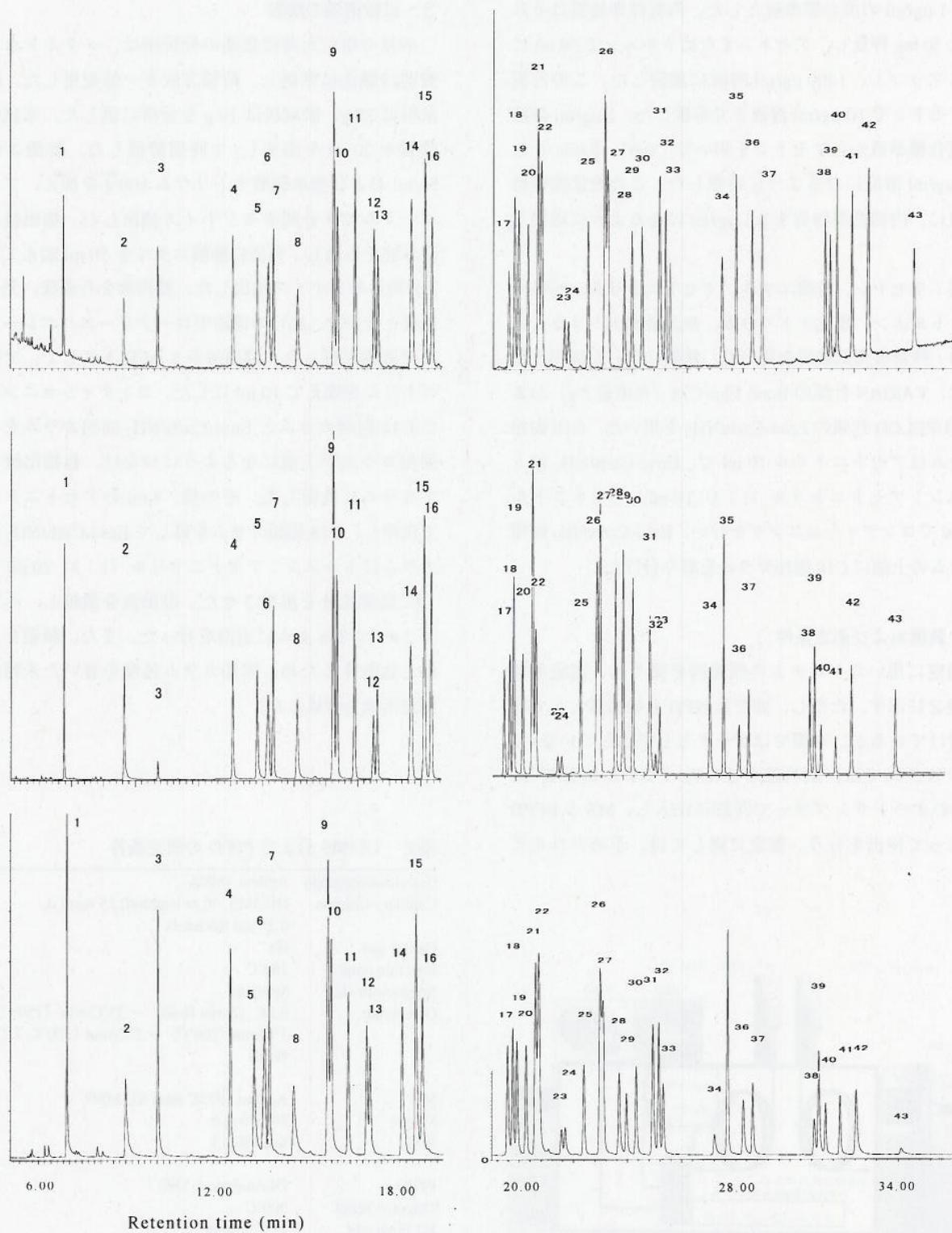


図2 標準液(1 µg/ml)のクロマトグラム
(上段:SCAN、中段:SIM、下段:PFPD ピーク番号は表1に対応し、19 min以降は尺度を変えている)

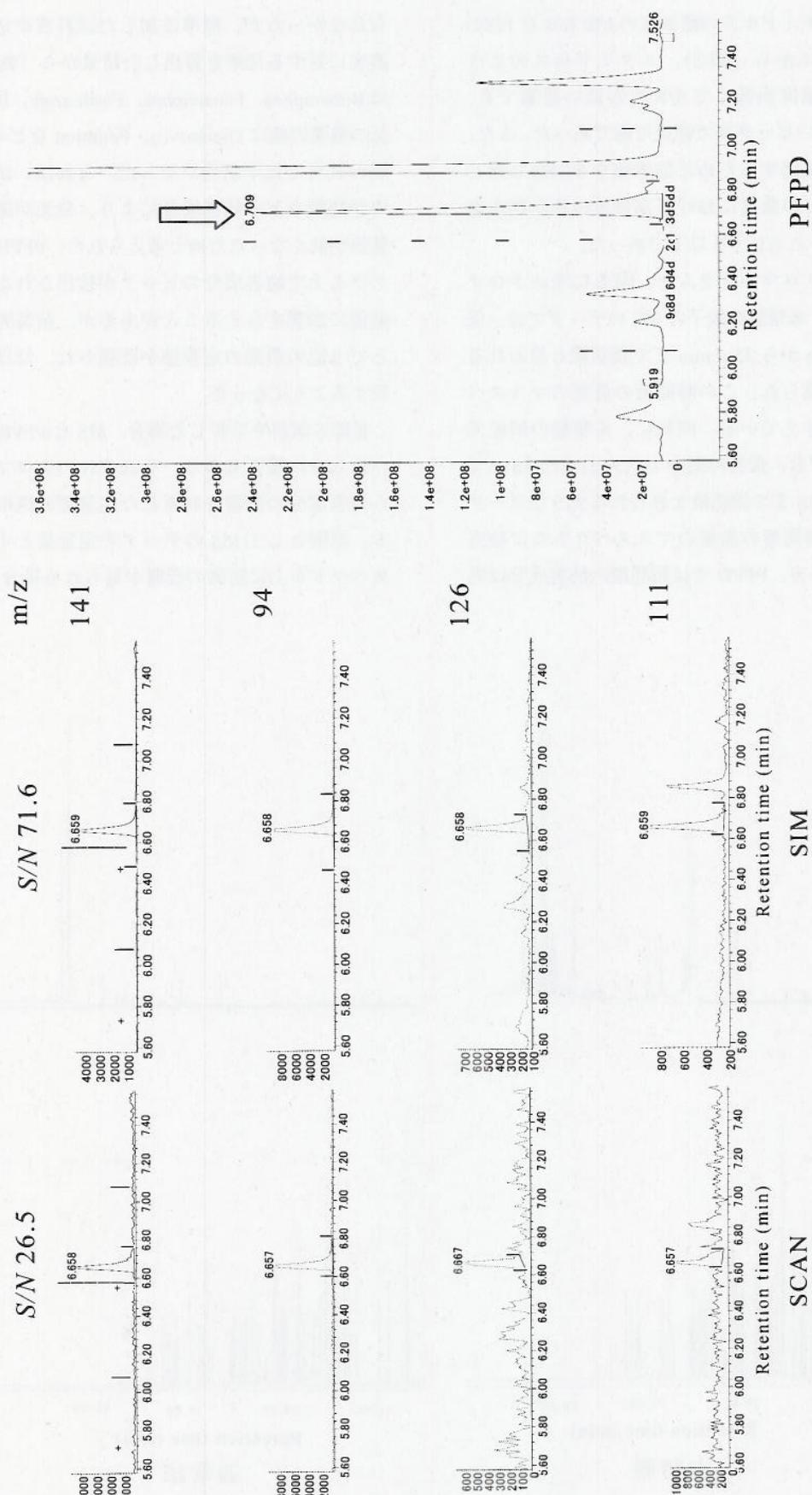


図3 各検出器におけるメタミドホス (1 µg/ml) のクロマトグラム

に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のメタミドホスの標準液の MS および PFPD のクロマトグラムから（図 3）、メタミドホスのような MS に対して感度が低くて S/N 比が低い農薬でも、PFPD ではより高いピーク高で測定可能であった。また、装置の安定性を確認するために標準液を 5 回繰り返し測定すると、全ての農薬における定量値の相対標準偏差は、MS、PFPD ともに 5% 以下であった。

図 4 に餃子のクロマトグラムを、図 5 に米のクロマトグラムを示す。未精製の餃子の MS のデータでは、保持時間が 24.2 min から 25.4 min まで脂肪酸と思われる大きなピークが見られ、この時間帯の農薬のマススペクトルに妨害を与えていた。同様に、未精製の国産米の MS のデータでも、保持時間が 19.13~21.57 min および 24.25~26.43 min まで脂肪酸と思われる大きなピークが見られ、この時間帯の農薬のマススペクトルに妨害を与えていた。一方、PFPD では脂肪酸の妨害成分は見

られなかったが、標準添加した試料液の定量値の添加濃度に対する比率を算出した結果から（表 3）、餃子では Butamiphos、Fenamiphos、Fosthiazate、国産米では上記の農薬の他に Dichlorvos、Fenthion などの農薬が未精製の試料で比率が低くなっていた。これは、試料中の多量の脂肪酸などの妨害成分により、発光が阻害されて定量値が低くなつたためと考えられた。PFPD のクロマトグラム上で妨害成分のピークが検出されなくても、定量値に影響を与えることがあるが、精製処理を行うことで上記の農薬の定量値が改善され、ほぼ添加量と一致するようになった。

実際に試料を分析した場合、MS と PFPD で定量値が一致しない場合もあり、それぞれのクロマトグラムから妨害成分の影響を判断した定量値の採用が必要となる。原則として MS のデータを定量値とするが、マススペクトル上に妨害の影響が見られる場合には、PFPD

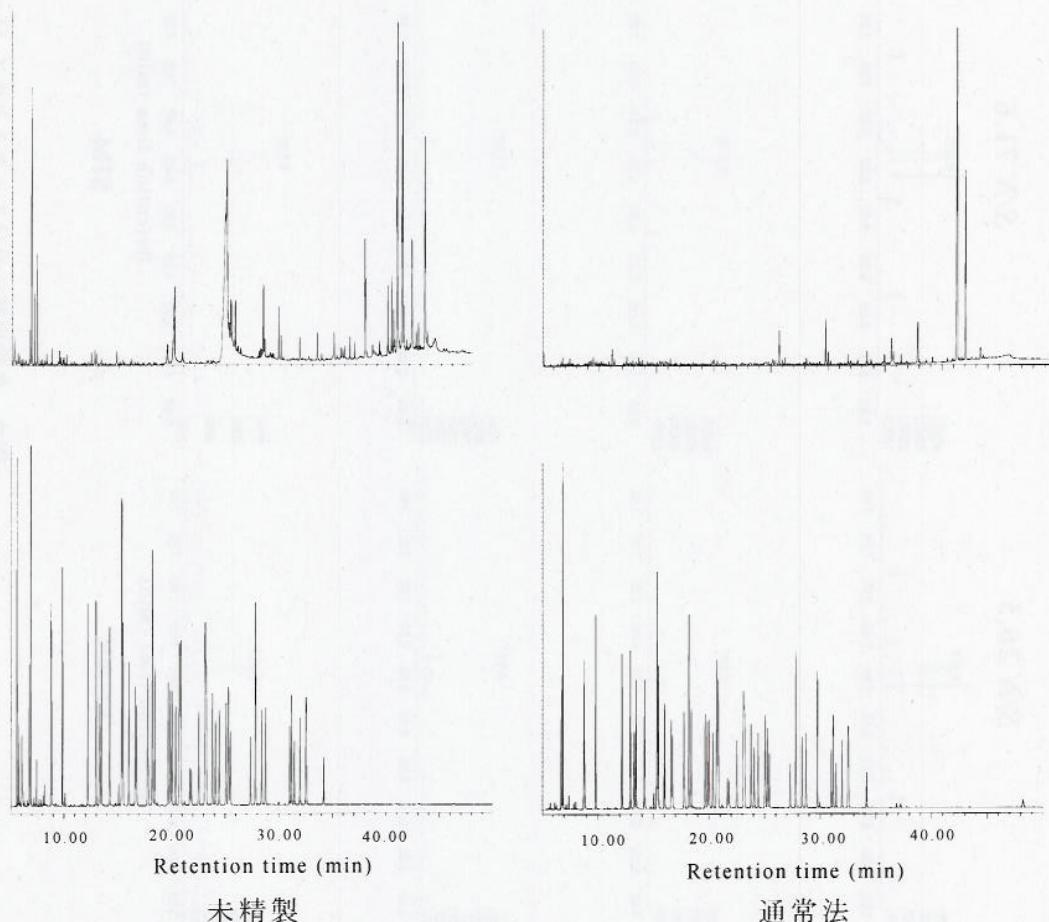


図 4 餃子の測定結果（上段：SCAN、下段：PFPD）

の測定値を採用することが望ましいと思われる。また、どちらの測定法でも妨害の影響が排除できない試料の場合には、精製法の検討が必要となる。さらに、MS と PFPD のダイナミックレンジが異なるため、MS で得られたピークが PFPD ではサチュレーションが起きる可能性もあり、それぞれで試料の濃縮率を考慮しなければならない場合もあると思われる。

IV. おわりに

PFPD は、従来の連続炎と異なり断続的（パルス）炎であり、各元素の発光時間差を利用して、炭素などの干渉を受ける波長と分けることでノイズを減少させ、感度を向上させることができる。また、従来の FPD よりも水素および空気の流量が少なく、各種ガスの節約にもつながる。1つのカラムを用いて複数の検出器で測定を行う場合、注入した物質をそれぞれの検出器に分

岐させる必要があるため、検出器に到達する物質の絶対量は減少し、感度が低下してしまう。しかし、デュアルカラムによる測定により、それぞれの検出器に対して注入量を減らすことなく測定するため、感度を維持して測定することが可能である。

特に PFPD に比べ MS の感度は低いため、デュアルカラムによる測定は効果的であると思われる。SCAN、SIM および PFPD により複数のデータを比較することで、マススペクトルによるライブラリーサーチや、SIM 測定による高感度な測定が行え、PFPD、NPD などの選択性の高い検出器による測定により、相補的にデータを比較することで定性に関する情報が多く得られるようになった。

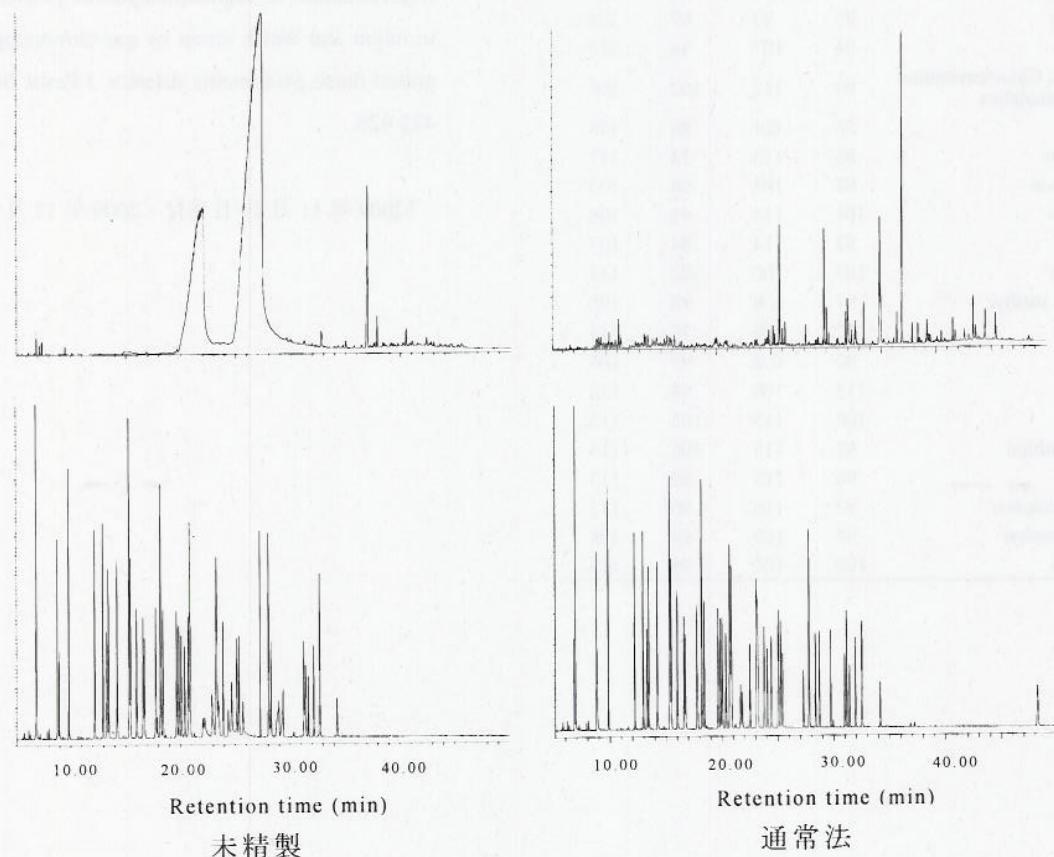


図5 米の測定結果（上段：SCAN、下段：PFPD）

表3 PFDD 測定における未精製試料と通常法試料に標準液を添加した定量値の添加濃度に対する比率
(添加濃度 0.25 µg/ml)

農薬名	餃子		国産米	
	未精製	通常法	未精製	通常法
Anilofos	97	122	107	125
Azinphos ethyl and Phosalone	97	114	107	117
Butamiphos and Fenamiphos	58	121	59	129
Cadusafos	94	111	89	108
Chlorfenvinphos (E)	96	111	97	109
Chlorpyrifos and Parathion	95	111	124	110
Chlorpyrifos methyl	93	114	93	114
Diazinon	96	106	93	112
Dichlofenthion	95	106	95	106
Dichlorvos	99	130	62	111
Dimethoate	97	119	100	112
Dimethylvinphos (E)	101	106	96	110
Dioxabenzofos	95	117	91	111
Edifenphos	99	120	93	118
EPN	90	112	101	115
Ethion	96	115	104	111
Ethoprophos	95	115	89	112
Etrimfos	91	105	87	107
Fenitrothion	94	112	102	110
Fensulfothion	106	109	117	112
Fenthion and Dimethylvinphos (Z)	95	109	64	112
Fonofos	95	112	91	109
Fosthiazate	75	93	67	104
Isazophos	94	107	94	110
Isofenphos, Chlorfenvinphos (Z) and Quinalphos	99	112	102	109
Malathion	96	111	98	108
Methacrifos	86	113	74	117
Methidathion	97	105	98	103
Mevinphos	101	113	95	108
Phorate	93	114	84	107
Piperophos	103	100	102	114
Pirimiphos methyl	97	108	98	108
Profenos	97	109	96	114
Propaphos	97	102	95	104
Prothiofos	115	108	94	112
Pyraclofos	106	115	105	115
Pyridaphenthion	97	115	106	115
Terbufos	94	115	90	113
Tetrachlorvinphos	93	116	96	115
Tolclofos methyl	95	109	94	108
Triazophos	100	107	98	112

参考文献

- 柿本芳久, 大谷有二, 舟木紀夫, 梶 照雄. GC/MS (SCAN モード) および HPLC による野菜・果実中残留農薬の多成分一斉分析法. 食品衛生学雑誌 2003; 44: 253-262.
- 柿本芳久, 苗床義隆, 岩寄吉哉, 中村 茂, 龍口久子. GC/MS(SCAN) および LC/MS(SIM) による野菜・果実中残留農薬の多成分一斉分析法. 食品衛生学雑誌 2005; 46: 153-160.
- Okihashi M, Kitagawa Y, Akutsu K, Obana H, Tanaka Y. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. J Pestic Sci 2005; 30: 368-377.
- 松本苗緒, 吉川真弓, 江田邦章, 小林あゆみ, 横島真澄, 村上正人, 他. GC/MS および LC/MS/MS による加工食品原材料中 235 農薬分析における簡易前処理法. 食品衛生学雑誌 2008; 45: 211-222.
- Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H, Nakazawa H. Determination of organophosphorus pesticide residues in onion and Welsh onion by gas chromatography with pulsed flame photometric detector. J Pestic Sci 2003; 28: 422-428.

(2009年11月19日受付・2009年12月22日受理)