

Report 3 機関Cによる自己点検結果

① 添加濃度より明らかに高い数値を検出した。

1次報告の ほうれん草 チオベンカルブに顕著であった。

これは、GC-FTDでの定量であり、検量線良好 3試行のバラツキなし であったため、数値化しが、添加量の10倍以上を測定してしまった。

それをふまえ2次報告のいちご、ブロッコリー、とうもろこしの定量は GC, GC/MSの定量値を測定した。

しかし、ブロッコリー チオベンカルブ
いちご ペンコナゾール、メフェナセット
コーン メプロニル、レナシル
含窒素系が高めに検出される傾向であった。

GC-ECDのピレスロイド系のようなマトリックスが原因しているのか、含窒素の正確な定量はGC-FTDでは困難？

GC/MSでの定量もマトリックスをふまえインサートの活性度をかなり慎重にすることが必要か？

② ほうれん草からクロルピリホスを検出できなかった。

1次報告でほうれん草 クロルピリホスを不検出としたが、0.012添加されていた。

3試行のGCチャートを再確認したが、3チャートとも痕跡すら見あたらない。
日常の精度管理では0.02ppm回収試験で90%を維持している。

Report 4 機関Dによる自己点検結果

(1)冷凍いちご

()は添加しない農薬

* 3試行の平均値

番号	添加農薬名	添加濃度 (ppm)	検出濃度* ppm	%	考えられる理由
10	アルドリン	0.02	0.0167	83.7	
25	キナルホス	0.03		0.0	FPD で検出していたが GC-MS (ITD-SCAN)で ND とした
47	シメリン	0.1		0.0	GC-MS(ITD)で ND
48	ターバシル	0.1		0.0	GC-MS(ITD)で ND
51	チオメトン	0.05		0.0	FPD で検出→GC-MS(ITD)で ND
85	フェニトロチオン	0.3	0.2897	96.6	
96	フルトラニル	0.1	0.0741	74.1	
102	プロピコナゾール	0.1		0.0	GC-MS(ITD)で ND
105	ペンコナゾール	0.15	0.0795	53.0	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
117	メフェナセット (ビフェントリン)	0.2	0.1170	58.5	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
	(フェンプロパトリン)	-	0.1112		BG に夾雑あり(RT=11.532)提出時未確認 + GC-MS(ITD)でピーク誤認 BG に夾雑あり(RT=11.914)提出時未確認
			0.0776		

(2)冷凍ブロッコリー

()は添加しない農薬

* 3試行の平均値

番号	添加農薬名	添加濃度 (ppm)	検出濃度* ppm	%	考えられる理由
2	p'-DDT	0.2		0.0	ECD で検出→GC-MS(ITD)で ND
13	エスプロカルブ	0.2	0.13408	67.0	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
18	エトリムホス	0.4	0.18961	47.4	70%画分の見落とし(0.01ppm)
27	クレソキシムメチル	0.15	0.07858	52.4	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
29	クロルピリホスメチル	0.06		0.0	FPD で検出→GC-MS(ITD)で ND
30	クロルフェナピル	0.2		0.0	ECD で検出→GC-MS(ITD)で ND
53	ディルドリン	0.02	0.01590	79.5	
56	テブコナゾール	0.1		0.0	GC-MS(ITD)で ND
66	トリフルラリン	0.1	0.03499	35.0	テーリング上に夾雑(ピーク高さ法で 71.4%)
67	トルクロホスメチル	4	2.05493	51.4	検出器の飽和?
111	ホスチアゼート	0.15	0.13911	92.7	
115	メチオカルブ	0.15	0.16633	110.9	
116	メトラクロール	0.03		0.0	

(3)乾燥とうもろこし

()は添加しない農薬

* 3試行の平均値

番号	添加農薬名	添加濃度 (ppm)	検出濃度* ppm	%	考えられる理由
4	EPTC	0.15		0	GC-MS(ITD)で ND
17	エトプロホス	0.03		0	FPD で検出→GC-MS(ITD)で ND
19	エンドリン	0.01		0	std出ず
36	ジコホール	0.2	0.18754	93.8	
60	テルブホス	0.01		0.0	FPD で検出→GC-MS(ITD)で ND
68	バクロブトラゾール	0.1	0.07050	70.5	
73	ビフェノックス	0.1	0.11129	111.3	
78	ピリプロキシフェン	0.1	0.07342	73.4	
82	ピリメタニル	0.2	0.12825	64.1	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
90	フェンバレレート	4	4.18488	104.6	
91	フェンプロパトリン	0.2		0.0	ECD で検出→GC-MS(ITD)で ND

117メフェナセット	0.1	0.04958	49.6	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
118メブロンル	0.15	0.54117	360.8	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
119レナシル	0.15	0.45058	300.4	GC-MS(ITD)のstdは10ppmで誤差大
(ピフェントリン)		0.01201		BGに夾雑あり(RT=11.236)提出時未確認

全般的な理由

各機器ともベストな運転条件ではなかった。(注入口インサート、カラムの入り口側が汚染されたまま分析した)

ECD, FPD項目に関しては、インテグレータのメモリ量の制限から手計算することにしたが、定量計算のため Excel に面積値を入力するのに大半の労力を割き、デジタルデータを追いかけるのが精一杯でクロマトグラムを確認するのが疎かになった。

NPD項目に関しては、機器の制限(=FPD・NPD タンデム機のため FPD 使用条件で NPD は同時運転できない)から GC-MS で測定したが、ITD- s c a n によるために、定量下限は一桁程度落ちた。また s t d を確実に検出させる目的で 10ppm を用いたために、定量誤差が大きくなった。

(実情は GC-MS (SIM) のシーケンスが途中停止しており、期日に間に合わせるため、GC-MS (ITD) による確認データを定量値として流用した)

今後の対応(案)

注入口インサートの交換、カラムの入り口側のメンテナンスなどを、定期的に行う。

新 GC/ECD の導入

NPD 専用機のワークステーション化

*GC-MS は汚染のない状態であれば良好なデータが取れるが、逆に汚染による感度変化が著しく、機器やメソッドによってその変動は負に出たり正に出たりと予想がつかない。回復の為にクリーニング操作も煩雑で長時間を要す。

また、SIM メソッドを作り上げるまでも多くの時間が必要で、検出した場合でも ITD- s c a n での確認は SIM と情報内容は同じである。

今回のようなスクリーニング分析には、NPD-GC で窒素・リン含有物質を選択的に検出したシンプルなクロマトグラムから定性・定量を行い、検出されたものについてのみ GC-MS で確認する手法のほうが分析精度は向上すると考える。

第2回配布の外部精度評価試料のうち、正しく検出できなかった農薬について検討いたしましたので下記のとおりご報告いたします。

1. 検出できなかった農薬

1) 冷凍ブロッコリー

(1) ディルドリン

GCでの3点の測定値は、0.018ppm、0.018ppm、0.016ppmであったが、GC/MS(SIM)でのイオン強度が低かったため数値化しなかった。

後日、同一検液を他のGC/MSで測定したところ検出を確認することができた。

(2) メトラクロール

GC/MS(SIM)で検出を確認できたが、GCでの測定において妨害物質との分離ができなかったため数値化しなかった。

2) 乾燥とうもろこし

(1) エンドリン

GCでの3点の測定値は、0.013ppm、0.015ppm、0.017ppmであったが、上記ディルドリンと同様にGC/MS(SIM)での確認ができなかったため数値化しなかった。後日、同一検液を他のGC/MSで測定したところ検出を確認することができた。

(2) ジコホール

GCでの3点の測定値は、0.140ppm、0.153ppm、0.168ppmであったが、GC/MS(SIM)での確認ができなかったため数値化しなかった。

後日、同一検液を他のGC/MSで測定したところ検出を確認することができた。

2. 誤って検出した農薬

1) 冷凍ブロッコリー

(1) プレチラクロール

GC/MS(SIM)での確認において、標準品と試料のイオン強度比が異なっていたが、GC(DB-17)とGC/MS(DB-5)では異なるカラムを用いているにもかかわらずリテンションタイムが同一であったため、妨害物質の影響によるものと判断し数値化した。

Report 6 機関Gによる自己点検結果

当機関では、外部精度評価において、ブロッコリーのメトラクロルについて検出することができませんでした。

検出できなかった原因は、他に添加された農薬(トルクロホスメチルと思われる)のテーリング部分にメトラクロルのピークが重なっていたためです。

ベースライン上昇部分付近に溶出する農薬については、それ以上の確認(別のカラムやGC/MSによる確認)は、行いませんでした。

メトラクロルについては、先日別の項目の確認用に注入していたブロッコリーのデータについてMSの解析を行ったところ、スペクトルの確認がとれ、検出が可能でした。

したがって、別の極性のカラムを用いるか、GC/MSを用いることにより、検出が可能であったと思われます。

当機関では、今回の外部精度評価において、初回注入における試料溶液のピークが標準溶液とほぼ一致した項目については、チフルザミド以外すべて別の極性のカラムによる確認またはGC/MSによる確認を行いました。誤検出したコーンのチフルザミドについては、溶出画分(第二画分)の一致とGCのR.T.から判断し、検出としました。チフルザミドについては、MSの確認を行いませんでした。

また、ブロッコリーの分析結果が、全体的に添加濃度に比べ50%程度と低い値でした。

ブロッコリーについては、本分析法における添加回収試験を行っていないため、現段階では、低回収率の原因が分析操作によるものなのか、GC測定によるものなのかは不明です。

今回の分析法についての感想ですが、試料液注入後のp,p'-DDT等の急激な感度低下、一部農薬の感度上昇、NPD検出器におけるベースラインの上昇、また夾雑ピークの多さから判断すると、操作法の見直しまたは追加精製が必要と考えます。簡易迅速分析も重要ですが、測定機器の安定維持や誤検出防止のためにもある程度までの精製は重要であると考えます。

Report 7 機関Hによる自己点検結果

問題点：試料中に実際には含まれていない農薬をいくつか検出した。

状況、原因及び対応：

GC測定において検出が疑われた農薬をGC/MSのSIM法で確認した結果、目標とする農薬の保持時間にSIMによる各フラグメントのピークが認められ。それらの強度比が一致したため、検出と判断した。しかし、実際にはその農薬は含まれていなかった。

この判断を誤った原因として、GC/MSによる測定をSIM法でしか行っていないことが考えられる。すなわち、SIM法において選択する農薬のモニターイオンは通常2~3種類であるため、食品中のマトリックス中にもそれらと同じモニターイオンが含まれることが考えられる。したがって、マトリックスに由来する質量数を農薬の質量数と間違えて検出することが考えられる。

GC/MS法によって農薬を正確に同定するためには、TICによる農薬特有のスペクトルパターンを得ることが必要である。しかし、TIC法でスペクトルを得るためには高濃度の農薬が必要となる。したがって、現実的にはTIC法はSIM法でフルスキャンを得るのは難しい。

検出下限値が低い農薬に関しては特にマトリックスの影響を受ける可能性が高い。この影響を受けなくするためには、さらに精製を増すことにより、GC/MS測定溶液中のマトリックスの影響を減らす必要がある。しかし、多数の検査を行う場合には抽出行程が複雑になることで検体数が多い時には検査結果の判定が遅くなることが懸念される。

そこで、マトリックス中の農薬を精度良く検出するためには、従来の抽出法で得られた試験液をGC/MS/MS法で測定する方法もGC/MS法による確認試験を補完する一つの方法であると考えられる。

分担研究報告書

中国産野菜等輸入食品中の残留物質の一斉分析法の開発に関する研究

第二章

イオントラップ型 GC/MS/MS による農作物中の残留農薬分析

研究要旨

食品マトリックスに由来する妨害のため、ガスクロマトグラフ (GC) による測定が困難な農薬の分析精度の向上を目的として、イオントラップ型 GC/MS/MS 法の有用性について検討を行った。検討対象農薬は農作物からの検出頻度が高く、基準値が低いクロルピリホス及びマトリックス由来の妨害のため GC による測定が特に困難な茶抽出液中の 11 種類の有機塩素系農薬とした。これら農薬を冷凍枝豆、とうもろこし、紅茶、ウーロン茶、紅茶抽出液に添加し、GC/MS 法のスキャン法と GC/MS/MS 法で測定した結果、いずれの農薬についても GC/MS 法ではマトリックスの影響のため正確に定性できなかったが、GC/MS/MS 法ではすべての農薬においてマススペクトルパターンが得られ、正確に同定できた。また、これら検討を行った農薬の検量線はいずれも相関係数 0.99 以上で良好な直線性が得られた。さらに、GC/MS (SIM) 法では検出が困難な食品マトリックス中の検出限界レベルの 12 種類の農薬が GC/MS/MS 法では高感度に定量できた。一方、GC/MS/MS 法はプロダクトイオンを得るために電極にかける電圧を適宜変更する必要があるため、GC/MS 法より測定条件の設定が煩雑である。従って、GC/MS 法によって検出が可能な農薬については従来の GC/MS 法で行うことが効率的であると考えられた。

本研究結果は、イオントラップ型 GC/MS/MS 法は従来の GC/MS 法より測定条件の設定が煩雑であるが、食品マトリックスの妨害のため GC/MS 法では検出が困難な低濃度の農薬の定性及び定量に適していることを示した。このことから、GC/MS/MS 法は食品中の残留農薬検査の精度向上に貢献できる有用な検出法の一つであることが明らかになった。

研究協力者

井上智子，佐々木さおり，内川誠二，
駄場正樹，土屋 鍛，右京政補，平原嘉
親，塩見幸博，江本雅三，内田幸憲
(神戸検疫所輸入食品・検疫検査セン

ター)

A. 研究目的

近年，中国野菜等に基準を上回る農薬の残留実態が次々と明らかになり，

野菜をはじめ果実、穀類、茶など様々な作物に対する残留農薬検査の重要性が益々増してきている。残留農薬基準は平成14年現在、130を越える作物に対して229種類の農薬に対して設定されている。これら農薬のかなりの数がガスクロマトグラフ（GC）によって測定されているが、基準値が低い農薬の中には、GC測定時に食品マトリックスの妨害により目的物質の定性及び定量に困難を生ずることが度々ある。一般に、農薬測定時の食品マトリックスの影響を排除するため、ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）のSIM（selected ion monitoring）法が用いられている。¹⁷⁴⁾しかし、SIM法では選択された数種類のターゲットイオンのみを用いて測定するため、マトリックス由来の妨害が多い食品では農薬のターゲットイオンと重なる場合があり、食品マトリックスの影響を完全に排除できないのが現状である。一方、GC/MSのスキアンモードでは農薬の化学構造に由来するマススペクトルパターンが得られるため、農薬の同定が正確に行われる。しかし、このマススペクトルパターンを得るためにはSIM法より2桁以上の高濃度の物質を必要とするため⁹⁾、基準の低い農薬の測定には適していない。これらのことから、低濃度の農薬を精度よく分析するためには、食品マトリックスの影響を受けずにマ

ススペクトルパターンが得られる高感度な測定法が望まれる。

GC/MS/MS法は、農薬のイオン化によって生成したフラグメントイオン中の特定のプリカーサーイオンに不活性ガス（ヘリウム等）を衝突させることによって、衝突解離（CID）を起こさせてプロダクトイオンを生成させる。続いて、このプロダクトイオンのみを連続的にスキアンすることによってスペクトルを検出するきわめて特異性の高い測定法である。⁶⁾従って、この方法では目的の農薬のマススペクトルを選択的に検出することができ、マトリックスの影響を排除できることが期待できる。

このことから、食品マトリックス中に含まれる低濃度の農薬を精度よく検出する方法としてGC/MS/MS法に着目した。GC/MS/MS法による野菜や穀類中の残留農薬分析のほとんどは四重極型質量分析計（tandem-in-space）により検討されている。⁷⁾¹²⁾このMS/MS法は四重極を並列にするために広いスペースを必要とする。一方、イオントラップ型質量分析計（tandem-in-time）は同じ質量分析部において時間経過とともに連続的にMS/MSを行うため、スペースをとらず汎用的に卓上で使用できる。しかしながら、この方法による食品中の残留農薬分析法についてはごくわずかしき報告されていないため、¹³⁾

食品分析への応用性についてはほとんど知られていない。特に、GC測定において食品マトリックスの影響が顕著な茶抽出液中に含まれる有機塩素系農薬の定性及び定量性については全く知られていない。

そこで、本研究では残留農薬試験の分析精度の向上を目的として、一般に四重極型 GC/MS より検出感度が高いことが知られている新型のイオントラップ型の GC/MS/MS 法が、旧型の GC/MS 法を補完できる有用な検出法であるか否かについて検討を行った。すなわち、検出頻度が高く、基準値が低いクロルピリホスやマトリックスによる妨害が多い茶抽出液中の低濃度の有機塩素系農薬の検出に対する GC/MS 法と GC/MS/MS 法との定性及び定量性について比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

試験にはクロルピリホスを含有していない中国産の冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆及び U.S.A 産のとうもろこし及び α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, DDD, o,p-DDT, p,p'-DDT, アルドリン, ディルドリン及びエンドリンが含まれていない中国産のウーロン茶、国産の緑茶及び英国産の紅茶を使用した。

2. 試薬及び試液

農薬標準品：クロルピリホス, α

-BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, DDD, o,p-DDT, p,p'-DDT, アルドリン, ディルドリン及びエンドリン（以上、和光純薬工業、林純薬工業、Riedel-de-Haën 製）

農薬混合標準溶液：クロルピリホスはアセトンで溶解し、各有機塩素系農薬はそれぞれ酢酸エチルで溶解し 1,000 μ g/ml 溶液を調製した。これら溶液を酢酸エチルを用いて適宜希釈し、クロルピリホス, α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, DDD, o,p-DDT, p,p'-DDT, アルドリン及びディルドリンはそれぞれ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 及び 0.125 μ g/ml 溶液を調製した。また、エンドリンは 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.25 μ g/ml 溶液を調製した。

SAX + PSA ミニカラム：Bond Elut (1g, 6ml, Varian 社製) を、アセトン-n-ヘキサン (2:8) 溶液 5ml で洗浄して用いた。

1 mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0)：リン酸二水素カリウム 61g とリン酸水素二カリウム 105g を水に溶解し、1mol/l 塩酸または 1mol/L 水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調製した。

セライト：セライト 545 (和光純薬工業社製)

アセトン, n-ヘキサン, 酢酸エチル及び硫酸ナトリウム (無水) は和光純薬工業社製残留農薬分析用を、その他は試薬特級を用いた。

3. 装置

GC/MS

Agilent Technologies 社製ガスクロマトグラフ HP6890 シリーズ及び質量分析計 HP5973 型

GC/MS/MS

Thermoquest 社製ガスクロマトグラム Trace GC2000 及びイオントラップ型ガスクロマトグラフ質量分析計 PolarisQ

4. 測定条件

GC/MS

カラム：J&W Scientific 社製キャピラリーカラム DB-5MS (30m × 0.25mm i.d., 膜厚 0.25µm), カラム温度：80 °C (2min) → 10 °C/min → 250 °C (10min), 注入口温度：250 °C, インターフェイス温度：280 °C, イオン化電圧：70eV, キャリアーガス：ヘリウム (パルス圧 6.82psi), 注入量：2µl (スプリットレス注入法)

GC/MS/MS

カラム：Restek 社製キャピラリーカラム Rtx-5MS (30m × 0.25mm i.d., 膜厚 0.25µm), カラム温度：85 °C (2min) → 4 °C/min → 250 °C (5min), 注入口温度：250 °C, トランスファーライン温度：280 °C, イオントラップ温度：270 °C, キャリアーガス：ヘリウム (流量 0.8ml/min) 注入量：1µl (スプリットレス注入法)

各農薬の検出条件は Table 1 に示した。

5. 食品マトリックス検討用試験溶液の調製

GC/MS および GC/MS/MS 測定における農作物中のマトリックスの影響について検討するために、冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆及びウーロン茶、紅茶及び緑茶の抽出液を以下の操作によって調製した。

クロルピリホスを測定するための冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆及びとうもろこしの抽出液は第 1 章の残留農薬スクリーニング法 (野菜、果実及び穀類) にしたがって調製した。

有機塩素系農薬測定用のウーロン茶、紅茶及び緑茶は 10g を採り、100 °C の水 300ml に浸した。この浸出液を室温で 5 分間放置し、ろ過した後、冷後ろ液を 300mL とった。内 150mL にアセトン 50mL 及び飽和酢酸鉛溶液 2mL を加え、室温で 1 時間放置した。セライトを 1cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を 500ml 分液ロートに移した。セライト上の残留物をアセトン-水 (50:50) 溶液で洗い、同様に吸引ろ過し、洗液を上記分液ロートに合わせた。これに、塩化ナトリウム 20g 及び酢酸エチル 100ml を加え、振とう機を用いて 10 分間激しく振り混ぜた後、放置し、酢酸エチル層をとった。水層に同様に酢酸エチル 50ml を加え振り混ぜた後、酢酸エチル層を抽出し、先の酢酸エチルと合わせた。この液に

n-ヘキサン 50mL 及び硫酸ナトリウム (無水) を加え約 30 分放置した後、ろ紙ろ過し、ろ液を減圧濃縮した。この液をアセトン-ヘキサン (3:7) に溶解し、SAX + PSA カラムに負荷し、アセトン-ヘキサン (2:8) 溶液約 10ml で溶出した。溶出液を濃縮し、2.5ml に調製した液を有機塩素系農薬用の茶のマトリックス試験溶液とした。

これら冷凍ホウレンソウ、冷凍枝豆及び小麦試験溶液にそれぞれクロルピリホスを添加し、0.01 μ g/ml に調製した。また、ウーロン茶、紅茶及び緑茶抽出液中にそれぞれ α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、アルドリン、ディルドリン、DDD、o,p-DDT、p,p'-DDT 及び DDE を添加し、各 0.01 μ g/ml に調製した。また、エンドリンを 0.02 μ g/ml に調製した。

これら溶液を GC/MS および GC/MS/MS で測定し、測定に及ぼすマトリックスの影響について検討した。

C. 結果及び考察

1. 定性における GC/MS/MS と GC/MS の分析精度の比較

農薬の定性に対する GC/MS/MS 法の有用性について知るため、農薬の定性法として一般に用いられている GC/MS 法と GC/MS/MS 法との分析精度について比較検討した。

(1) 各農薬の標準溶液における検出

感度の比較

① GC/MS/MS のプロダクトイオンのスキャン及び GC/MS のフルスキャン

食品中において検出が疑われた農薬を正確に定性するためには、スキャンモードによるマススペクトルパターンを得る必要がある。そこで、検出頻度の高いクロルピリホスや比較的基準値が低い有機塩素系農薬の標準溶液のマススペクトルパターンが GC/MS や GC/MS/MS によって感度良く得られるか否かについて検討を行った。

その結果、Fig.1 に示すように、クロルピリホス及び 11 種類の有機塩素系農薬の標準溶液を GC/MS/MS 法で測定した結果、クロルピリホス、アルドリン、ディルドリン、 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC; δ -BHC、DDD、o,p-DDT 及び p,p'-DDT は 0.01 μ g/ml、エンドリンは 0.02 μ g/ml の濃度において良好なマススペクトルパターンが得られた。この中で BHC の 4 種類の異性体、アルドリン、ディルドリン、エンドリンの 3 種類及び o,p-DDT、p,p'-DDT の 2 種類は同じプロダクトイオンを持つことからそれぞれ同時に検出が可能であると考えられる。

一方、GC/MS のフルスキャン法で測定した結果、いずれの農薬においてもマススペクトルパターンが全く認められず、100 倍以上の濃度ではじめて良好なマススペクトルパターンが得られ

た (data not shown) .

以上のことから、GC/MS/MS のプロダクトイオンのスキャンによるクロルピリホス及び有機塩素系農薬の検出感度は GC/MS のフルスキャン法より極めて高いことが示された。従って、GC/MS 法では定性が困難な農薬が GC/MS/MS 法によっては精度良く同定できる可能性が示された。

②GC/MS/MSのプロダクトイオンのスキャン法とGC/MS (SIM)法

一般に、GC/MS 測定において、スキャンモードによる検出が困難な場合、高感度分析が可能な SIM 法が用いられる。そこで、GC/MS (SIM) 法と GC/MS/MS 法の各種農薬標準溶液の検出感度について比較検討を行った。

その結果、Fig. 2 に示すように、GC/MS の SIM 法ではクロルピリホス (m/z 286) 及び DDE (m/z 246) においてのみ良好な感度が得られた。しかし、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、*o,p*-DDT 及び *p,p'*-DDT は痕跡レベルしか検出できなかった。さらに、 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC 及び DDD は全くピークが検出されなかった。

一方、これら農薬を同濃度で GC/MS/MS 法で測定した結果、GC/MS (SIM) 法では全く検出できなかった BHC 及び DDD を始め、すべての農薬を高感度に検出することができた。

これらの結果から、クロルピリホス及び有機塩素系農薬に対する

GC/MS/MS 法の検出感度は GC/MS

(SIM) 法よりも高いことが示された。このことから、GC/MS/MS 法のスキャン法は GC/MS (SIM) 法においても検出できない基準値の低い農薬の測定に対して特に有用であることが明らかになった。

(2) 各農薬の抽出液中のマトリックスの影響

食品中の農薬を精度良く測定するためには、農薬の標準溶液の検出感度のみでなく、機器分析に及ぼす食品マトリックスの影響について考慮することが重要である。そこで、クロルピリホス及び 11 種類の有機塩素系農薬を対象として、GC 測定において食品マトリックスの影響を比較的大きく受ける冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆、とうもろこし、ウーロン茶、紅茶及び緑茶抽出液の GC/MS (SIM) 法及び GC/MS/MS 測定に及ぼす影響について検討を行った。

① クロルピリホス

クロルピリホスの検出に及ぼす冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆及びとうもろこしのマトリックスの影響について検討した。その結果、Fig.3 に示すように、冷凍ほうれんそう及び冷凍枝豆抽出液に添加したクロルピリホスは GC/MS (SIM) 法において m/z 286 で検出

できた。しかし、とうもろこし抽出液に添加したクロルピリホスは全く検出されなかった。これは、抽出されたとうもろこしのマトリックスがクロルピリホスの m/z 286 による SIM 測定を妨害することに起因することが考えられた。しかし、とうもろこしの夾雑ピークはクロルピリホスのモニターイオンの m/z 286 ではほとんど検出されなかった。このことから、クロルピリホスの検出を妨害する夾雑物は 286 以外の質量数をもつ化合物であることが推測された。一方、286 の質量数を持つ夾雑物は基準値が最も低い冷凍ほうれんそうの抽出液で特に顕著に認められた。

つぎに、GC/MS/MS 法で各農薬を添加した同試験液を測定した結果、GC/MS (SIM) 法では検出されなかったとうもろこし中のクロルピリホスが感度良く検出できた。また、GC/MS/MS 法では冷凍ほうれんそう及び冷凍枝豆のマトリックスに由来するピークもほとんど認められず、GC/MS (SIM) 法よりクロルピリホスを高感度に検出することができた。

以上のことから、クロルピリホスの検出時における食品マトリックスの影響は GC/MS (SIM) 法に比べて GC/MS/MS 法の方が受けにくいことが判明した。

② 有機塩素系農薬

α -BHC, β -BHC, γ -BHC δ -BHC,

アルドリン, ディルドリン, エンドリン, DDD, p,p -DDT, o,p' -DDT 及び DDE の検出に及ぼす発酵茶の紅茶, 半発酵茶のウーロン茶及び不発酵茶中の緑茶マトリックスの影響について検討を行った。

その結果, Fig.4, 5, 6 に示すように, GC/MS の SIM 法では, DDE のみ茶のマトリックスの影響を受けずに検出できた。しかし, DDE 以外の 10 種類の有機塩素系農薬に対するターゲットイオンではいずれも紅茶, ウーロン茶及び緑茶の夾雑ピークが認められ, 定性を妨害した。この夾雑ピークは不発酵茶の緑茶で最も顕著に認められた。

一方, これら有機塩素系農薬が添加された同試験液を GC/MS/MS 法で測定した結果, いずれの農薬も茶のマトリックスの影響をほとんど受けず, 感度良く測定することができた。すなわち, α -BHC, β -BHC, γ -BHC 及び δ -BHC は m/z 183, アルドリン, ディルドリン及びエンドリンは m/z 193, DDD, p,p -DDT 及び o,p' -DDT は m/z 165 によってそれぞれ同時に高感度に測定することができた。また, これら有機塩素系農薬は茶のマトリックスの存在下においてもいずれも正確なマススペクトルパターンが得られた。この GC/MS/MS 法による高感度な検出は, 第一質量分析でイオン化して得られた農薬特有のプリカーサーイオンをさらにイオン化

することによって農薬以外の茶のマトリックスに由来するイオンは排除でき、目的農薬のイオンのみを選択的に検出することに起因することが考えられる。

以上の結果から、有機塩素系農薬検出時における茶のマトリックスの妨害はGC/MS (SIM) 法では排除することが困難であるが、GC/MS/MS 法では効率的に排除することができた。このことから、GC/MS/MS 法は食品マトリックスの妨害によって測定が困難な農薬の定性に特に有用であることが明らかになった。

2. GC/MS/MSによる定量

GC/MS/MS 法は食品マトリックスに由来する妨害が多い農薬の定性に有用であることが明らかになったので、定性された農薬のGC/MS/MS 法による定量性について検討を行った。すなわち、12 農薬の標準溶液における検出限界、検量線の直線性及びマトリックス中の定量性について検討を行った。

(1) 検出限界

クロルピリホスの標準溶液中での検出限界について検討した結果、クロルピリホスの最も低い残留農薬基準値より4倍低い0.0025ppm (試料中)に相当する濃度が検出できた。また、この濃度は冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆及びとうもろこしのマトリックス中においても検出できた。また、 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、アルドリ

ン、ディルドリン、DDD、p,p-DDT、o,p'-DDT 及び DDE の標準溶液はそれぞれ0.01 μ g/ml、エンドリンは0.02 μ g/mlの濃度が検出できた。さらに、この濃度の農薬は紅茶、ウーロン茶及び緑茶のマトリックス中においても検出することができた。

これらのことから、検討を行った12種類の農薬においては残留農薬基準を十分満足する検出感度が確認された。

(2) 標準溶液の直線性

各農薬の標準溶液の直線性について検討を行った。その結果、Fig.7に示すように、エンドリンは0.02～0.25 μ g/ml (試料中0.01～0.125ppm)、それ以外の11種類の有機塩素系農薬は0.01～0.125 (0.005～0.0625ppm)の濃度範囲において相関係数0.99以上で直線性を示した。また、クロルピリホスは0.01～0.125 μ g/ml (試料中0.005～0.0625ppm)でいずれも0.995の相関係数で良好な直線性を認めた。

以上、検討を行ったいずれの農薬においても検量線の直線性が示されたことから、いずれも定量が可能であることが確認された。

(3) 食品中の定量値

食品マトリックス中に検出限界レベルで含有するクロルピリホス及び有機塩素系農薬のイオントラップ GC/MS/MS 法における定量性について

は全く検討されていない。そこで、特に食品マトリックスに由来する妨害が多い、冷凍ほうれんそう、冷凍枝豆、とうもろこし、紅茶、ウーロン茶及び緑茶抽出液に検出限界レベルの各農薬を添加し、添加回収率を求め、低濃度の農薬が食品マトリックス中で定量できるか否かについて検討を行った。その結果、Table 2 に示すように、いずれの農薬も 60 ~ 130% の範囲の回収率を示した。このことから、夾雑物が多い抽出液中のクロルピリホス及び 11 種類の有機塩素系農薬は検出下限値レベルにおいても良好に定量できることが明らかになった。

D. 結論

本研究により、GC/MS 法では食品マトリックスの妨害により定性が困難であった 12 種類の農薬が GC/MS/MS 法ではマトリックスの影響が排除されるために目的農薬のみを選択的に正確に定性できることが示された。このことから、GC/MS/MS 法は食品マトリックスに由来する妨害が多く存在する農薬の同定に特に有用であることが明らかになった。また、GC/MS (SIM) 法では検出が困難な食品マトリックス中の検出限界レベルの農薬が GC/MS/MS 法では高感度に検出できた。さらに、GC/MS/MS 法では標準溶液の検量線が直線性を示すとともに、食品マトリッ

クスに添加した検出限界レベルの農薬においても良好に定量できた。また、今回検討に用いたイオントラップ型 GC/MS/MS は質量分析部が一つであるため広い設置スペースを必要としないため、卓上において農薬のルーチン検査に汎用できることが考えられる。一方、GC/MS/MS 法はプロダクトイオンを得るために電極にかける電圧を適宜変更する必要がある。そのため、測定条件を設定するまでの過程が GC/MS 法に比べると煩雑である。従って、GC/MS 法によって検出が可能な農薬については従来の GC/MS 法で行うことが効率的であると考えられる。

以上のことから、イオントラップ型 GC/MS/MS 法は食品マトリックスに由来する妨害のため GC/MS 法では検出が困難な低濃度の農薬の定性及び定量には適していることが明らかになった。このことから、GC/MS/MS 法は食品中の残留農薬検査の精度向上に貢献できる有用な検出法の一つであることが明らかになった。

E. 文献

- 1) Miyata, M., Hirahara, Y., Narita, M., Kimura, M., Watanabe, Y., Ito, S., Takeda, H., Kobayashi A., Tonogai, Y., Nakamura, Y., Tsumura, Y. and Shibata, T., Comparison for the simultaneous determination of pesticides residue in food by GC and GC/MS. Shoukuhin

- Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 37, 351-362 (1996).
- 2) Hirahara, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y. and Shibata, T., Analysis of phenothrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid (PBA) in agricultural products by GC and Ion Trap GC/MS. *Journal of Food Protection*, 60 (3), 305-309 (1997).
- 3) Ghassempour, A., Mohammadkhah, A., Najafi, F. and Rajabzadeh, M., Monitoring of the pesticide diazinon in soil, stem and surface water of rice fields. *Anal Sci*, 18 (7), 779-783 (2002).
- 4) Aguera, A., Piedra, L., Hernando, MD., Fernandez-Alba, AR. and Contreras, M., Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *Analyst*, 125 (8), 1397-1402 (2000)
- 5) 丹波利充編著 “最新のマススペクトロメトリー” 京都, (株) 化学同人, 1995, p.49-52.
- 6) 牧野圭祐編 “ライフサイエンスのためのガスクロ・マススペクトル-基礎と実験-” 東京, (株) 廣川書店, 1998, p.29.
- 7) Martinez Vidal, JL., Arrebola and FJ., Mateu-Sanchez, M., Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 959 (1-2), 203-213 (2002).
- 8) Martinez Vidal, JL., Arrebola, FJ., and Mateu-Sanchez, M., Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 16 (11), 1106-1115 (2002).
- 9) Gamon, M., Lleo, C., Ten, A. and Mocholi, F., Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int.*, 84 (4), 1209-1216 (2001).
- 10) Arrebola, FJ., Egea-Gonzalez, FJ., Moreno, M., Fernandez-Gutierrez, A., Hernandez-Torres and ME., Martinez-Vidal, JL., Evaluation of endosulfan residues in vegetables grown in greenhouses. *Pest Manag Sci.*, 57 (7), 645-652 (2001).
- 11) Lehotay, SJ. Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int.*, 83 (3), 680-697.
- 12) Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M., Allelochemicals in wheat (*triticum aestivum* L.): production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-meyhoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *J Chem Ecol.*, 27 (8), 1691-1700.
- 13) Takeda, K., Ishiguro Y., Tanaka, R., Maruyama, J., Kasamatsu, T, Okawa, S. and Hori, S., Study on the determination of pesticides in crops by ion-trap GC/MS/MS.

Shoukuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc.
Japan), 43, 280-288 (2002).

Table 1. GC/MS/MS condition for determination of 12 kinds of pesticides

Pesticide	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Excitation voltage (V)	Maximum excitation energy (V)
Chlorpirifos	314	286	1.65	0.225
α-BHC	219	183	1.00	0.450
β-BHC	219	183	1.00	0.450
γ-BHC	219	183	1.00	0.450
δ-BHC	219	183	1.00	0.450
Aldrin	263	193	1.60	0.450
Dieldrin	263	193	1.50	0.450
Endrin	235	193	1.45	0.450
DDD	235	165	1.20	0.450
o,p-DDT	235	165	1.00	0.450
p,p'-DDT	235	165	1.20	0.450
DDE	235	176	1.65	0.450

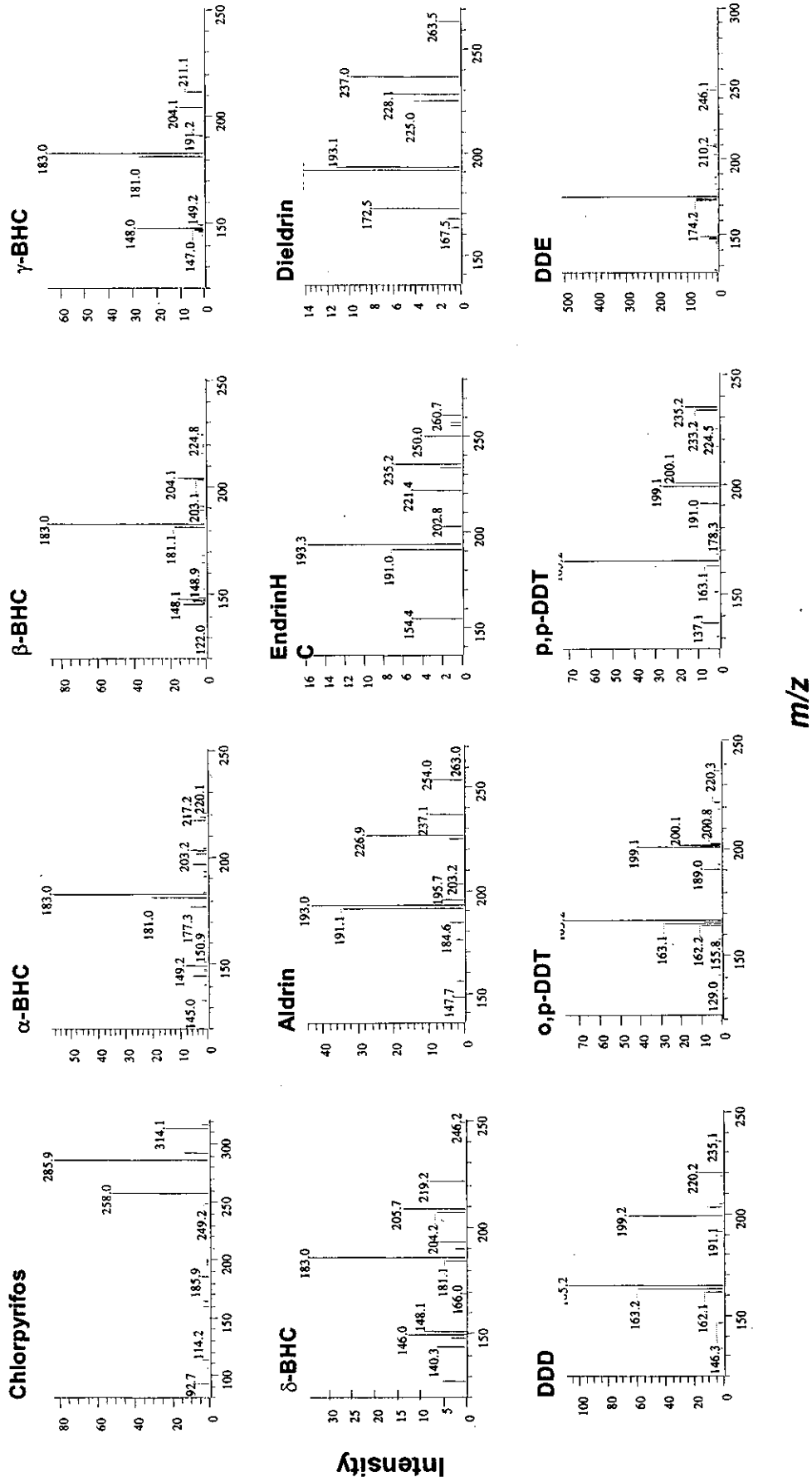


Fig. 1. Mass spectra of chlorpyrifos and 11 kinds of organochlorine pesticides by GC/MS/MS-Scan

The concentration of endrin was 0.02 $\mu\text{g/ml}$ and the other was 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

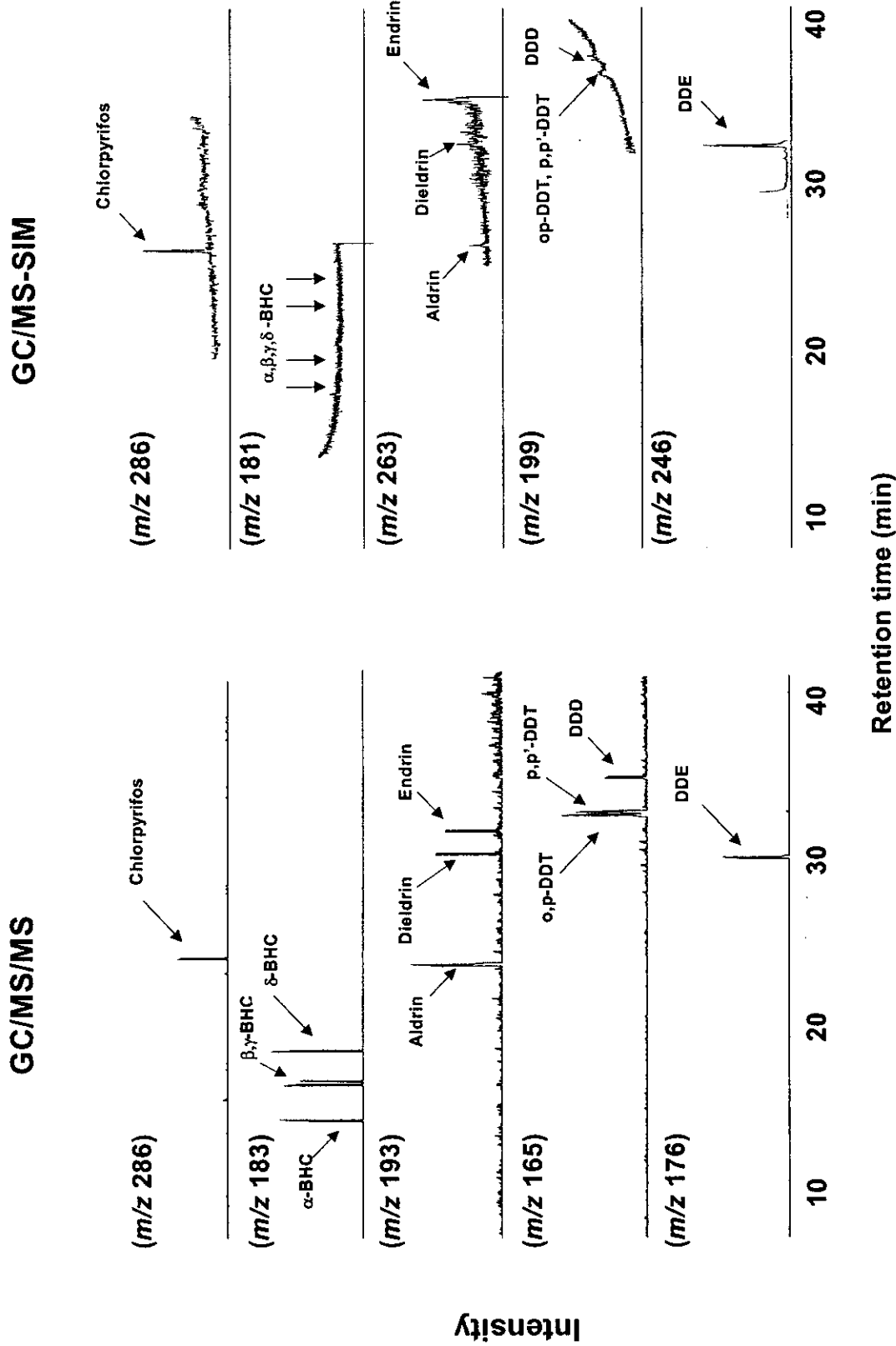


Fig. 2. Mass chromatograms of chlorpyrifos and 11 kinds of organochlorine pesticides by GC/MS/MS and GC/MS-SIM

The concentration of each standard solution was 0.01 μg/ml with the exception of endrin(0.02 μg/ml).