

報 文

GC-MS による食品中の残留農薬一斉分析におけるキャリアガス中への保護剤導入法の評価

藤吉智治^{1, 2)}, 伊神貴仁²⁾, 佐藤孝史¹⁾, 菊川浩史¹⁾, 小林政人¹⁾, 伊藤宏³⁾, 山本敦²⁾

1) 一般財団法人 食品分析開発センターSUNATEC

2) 中部大学大学院 応用生物学研究科

3) 株式会社 豊田中央研究所

要 旨

GC-MS による食品中の残留農薬分析ではマトリクス効果による定量精度の低下が大きな問題である。多成分一斉分析ではマトリクス効果の低減を目的としてアナライトプロテクタント(保護剤)を試験溶液に添加する方法が広く用いられているが、マトリクス効果を完全に抑制することは困難である。保護剤添加法によるマトリクス効果の低減効果は保護剤の保持時間に依存的である。筆者らはこれまでの研究により、キャリアガス中に保護剤として微量のエチレングリコールを導入し続ける方法により効果的にマトリクス効果を低減する方法を評価した。本研究では、微量の保護剤をキャリアガス中へ導入する方法の有効性を検証するため、従来から保護剤として用いられているポリエチレングリコール(PEG)を試験溶液中に添加する方法と比較した。キャリアガス中へエチレングリコールを導入した結果、ほうれんそう、オレンジ、玄米、大豆の抽出液において、検討した全ての農薬でマトリクス効果が低減した。試験溶液へ PEG を添加した結果、保持時間の遅い農薬に対してマトリクス効果の低減効果が低い結果であった。本実験で得られた結果より、キャリアガス中に微量のエチレングリコールを導入する方法は保護剤添加法と同等以上の効果が得られることが確認された。

1. はじめに

GC-MS による食品中の残留農薬分析では、試験溶液に含まれる食品成分に起因したピーク強度の増大が頻繁に生じることにより、分析精度が著しく低下することが問題となる。この現象は「マトリクス効果(Matrix Effect)」と呼ばれており、D.R. Erney ら(D.R. Erney, *et al.*, 1993)によって初めて報告された。マトリクス効果のメカニズムは、溶媒標準溶液の測定では注入口ガラスライナー表面やカラム液相上に存在する活性部位(主にシラノール基)を介した目的成分の吸着、分解により検出器への到達量が減少するのに対し、試料溶液ではマトリクス成分が活性部位を隠蔽することにより、目的成分の検出器への到達量が増加するため、ピーク強度が増大する。このため、溶媒標準溶液で作成した検量線を定量に用いた場合に

は正誤差を引き起こすこととなり、定量値、及び回収率の信頼性が低下する。従来から使用されているマトリクス効果低減法としては内部標準物質の添加、マトリクス検量線による定量(D.R. Erney, *et al.*, 1997, C.F. Pool, *et al.*, 2007), GC 注入方式の改良(J. Zrostlíková, *et al.*, 2001, J. Hajšlová, *et al.*, 2003), 試験溶液へのアナライトプロテクタント(保護剤)の添加が挙げられる。コストと労力、得られる効果を考慮すると多成分一斉分析においては保護剤を試験溶液に添加する方法が実用であると考えられる。GC に注入された保護剤は活性部位と相互作用することにより活性部位を介した農薬の分解、吸着量を低減させる。この結果、マトリクス効果が低減するが、GC に注入した保護剤が溶出する時間付近の農薬に対して効果が得られるため、多成分一斉分析においては測

定対象農薬の保持時間に合わせて試薬を選択しなければならない。幅広い保持時間に適用可能な保護剤の組み合わせとしてエチルグリセロール、グロノラクトン、ソルビトールの混合溶液が報告されている(K. Maštovská, *et al.*, 2005)。しかしながら、これらの保護剤は高極性物質であるため、試薬を溶解するためにアセトニトリルや水を使用しなければならない。アセトニトリルや水は気化体積が大きいので、GC 注入量が制限される。水はカラム、イオン源への負荷が懸念されるため出来る限り使用しないことが望ましい。その他の保護剤としてはポリエチレングリコール(PEG)が用いられている(X. Xu, *et al.*, 2009)。PEG は GC による分析において分子量に依存した幅広い保持時間で溶出するため、保護剤としてよく使用されるが、繰り返し注入することによりカラム先端部に PEG が蓄積し、カラム性能が著しく低下することが課題である(M. Anastassiades, *et al.*, 2003)。

筆者らは、GC のキャリアガス中にモディファイアを導入することで、カラムの保持特性が変化することを報告した(H. Ito, *et al.*, 2007)。この技術を用いて保護剤をキャリアガス中に導入することにより、農薬の保持時間に依存することなくマトリクス効果を低減する方法を検討し、GC-MS のキャリアガス中に微量のエチレングリコールを継続的に導入し続けることで効果的にマトリクス効果が低減することを報告した(T. Fujiyoshi, *et al.*, 2016)。キャリアガス中への保護剤導入法は簡易かつ低コストで効果が得られることから、残留農薬分析におけるマトリクス効果低減法として有効であると考えられる。しかしながら、これまでに従来法と比較した知見はない。キャリアガス中への保護剤導入法の有効性を評価するため、従来からマトリクス効果低減法として用いられてきた PEG を試験溶液に添加する方法と比較した結果について報告する。

2. 材料と方法

2. 1. 試料

市販の玄米、大豆、ほうれんそう、オレンジを用いた。ほうれんそう、オレンジはフードプロセッサーで細切均一化した。玄米、大豆はアブソリュートミルで粉碎して均一

化した。

2. 2. 試薬、試液類

有機溶媒は、和光純薬工業(株)製または関東化学(株)製の残留農薬試験用を用いた。塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウムはナカライテス製の特級試薬を用いた。無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を用いた。リン酸二水素カリウムは関東化学(株)製の特級試薬を用いた。エチレングリコール、ポリエチレングリコール 300 (PEG300) は和光純薬工業(株)製の特級試薬を用いた。InertSep C-18 FF (1000 mg) は GL サイエンス製を用いた。Supelclean ENVI-Carb/NH₂ (500 mg/500 mg) はスぺルコ製を用いた。

農薬混合標準溶液 PL-1-1 は和光純薬工業(株)製を用いた(各 20 µg/mL アセトン溶液)。

2. 3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は厚生労働省通知「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」に従った(食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 別添)。ほうれんそう、オレンジの場合は試料 20.0 g を秤量し、アセトニトリルによるホモジナイズ抽出を行い、アセトニトリルで 100 mL に定容した。20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g、リン酸緩衝液(pH=7.0) 20 mL を加え、塩析分配後、アセトニトリル層を Supelclean ENVI-Carb/NH₂ へ注入し、アセトニトリル/トルエン(3:1, v/v) 混液 20 mL で溶出した。溶出液を濃縮し、アセトン/ヘキサン(1:1, v/v) 混液 4 mL に溶解したものを試験溶液とした(試料 1 g/mL)。玄米、大豆の場合は試料 10.0g を秤量し、水 20 mL を加え、15 分放置した後抽出操作を行った。Supelclean ENVI-Carb/NH₂ による精製の前に InertSep C-18 FF による精製を加え、溶出液を濃縮し、アセトン/ヘキサン(1:1, v/v) 混液 2 mL に溶解したものを試験溶液とした(試料 1 g/mL)。

2. 4. GC-MS 条件

GC-MS は QP-2010(島津製作所製)及び HP6890(アジレントテクノロジー製)を用いた。プレカラム:無極性不活性化カラム(長さ 2 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 µm, GL サイエンス製), カラム:DB-5ms (30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚

0.25 μm , アジレントテクノロジー製), プレカラムとカラムはプレスタイトコネクタ(RESTEC 製)で接続した. 注入口: 250°C, キャリアガス: ヘリウム(1 mL/min), 注入方式: スプリットレス(高圧注入, 200 kPa, 1 min), 注入量: 2 μL , オーブン: 60°C (1min) $\rightarrow$ 25°C/min $\rightarrow$ 150°C $\rightarrow$ 10°C/min $\rightarrow$ 300°C (10 min), イオン源: 250°C, 質量分析計は SIM モードで測定した. 評価に用いた農薬の保持時間, 及び測定イオンを表 1 に示した.

Table 1. List of analytes, their retention time, and SIM ions.

analytes	Monitor ion <i>m/z</i>	Retention time / min
omethoate	156	9.159
trifluralin	306	9.753
dimethoate	87	10.524
atrazine	200	10.700
terbufos	231	10.991
tefluthrine	177	11.298
chlorpyrifos-methyl	286	12.036
spiroxamine-1,2	100	12.150, 12.656
terbutryn	226	12.610
malathion	173	12.779
thiobencarb	100	12.994
fenpropimorph	128	13.066
pendimethalin	252	13.576
penconazole	248	13.720
procymidone	283	13.967
methidathion	145	14.204
fenamiphos	303	14.558
oxadiazon	175	14.852
kresoxim-methyl	116	14.994
chlorfenapyr	247	15.157
endosulfan- β	195	15.691
norflurazon	303	16.214
diflufenican	266	16.659
bifenthrin	181	17.253
azinphos-methyl	160	18.076
fenarimol	139	18.531
Permethrin(trans, cis)	183	19.081, 19.207
cyfluthrin-1,2,3,4	163	19.602~19.804
flucythrinate-1,2	199	20.125, 20.341
fluvialinate-1,2	250	21.133, 21.212

2. 5. 保護剤導入装置

保護剤導入装置は以前の報告と同じ条件で稼働させた(T.Fujiyoshi, *et al.*, 2016). アクリルファイバーにエチレングリコール 1 mL を含浸したものを装置内に充填し, キャリアガス配管へ接続した. 保護剤の導入はエチレングリコールのモニターイオン(*m/z* 31, 62)において, ベースラインが安定していることを確認した後に実験を開始した.

2. 6. マトリクス効果の評価

保護剤未導入, エチレングリコール導入, PEG300 添

加の各条件下で実験を行い, マトリクス効果を評価した. 実験手順はアセトン/ヘキサン(1:1, v/v)混液で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ に調製した溶媒混合標準溶液, 及び各作物から得られた試験溶液で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ に調整したマトリクス標準溶液を用意し, 各条件下において以下に示した順番で注入した. 1) 溶媒混合標準溶液(連続 5 回注入), 2) マトリクス標準溶液(連続 5 回注入), 3) 注入した試験溶液の影響を排除するため, アセトン/ヘキサン(1:1, v/v)混液を数回注入. PEG300 添加の場合は, 試験溶液中の PEG300 濃度が 500 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製した(導入量 1 μg /注入). マトリクス効果は以下の式で算出した.

$$\text{ME (\%)} = A1/A2 \times 100$$

A1: マトリクス標準溶液のピーク面積平均値

A2: 溶媒混合標準溶液のピーク面積平均値

3. 結果と考察

3. 1. マトリクス効果低減法の評価

ほうれんそう, オレンジ, 玄米, 大豆の抽出液を用い, キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法, 及び試験溶液中に PEG300 を添加する方法, それぞれの方法によるマトリクス効果の低減効果を評価した(図 1A). PEG300 を添加した結果, ほぼ全ての農薬でマトリクス効果が低減したが, フルシトリネート, フルバリネートはマトリクス効果が増加した. 一方で, キャリアガス中にエチレングリコールを導入した場合は全ての農薬でマトリクス効果が低下した. さらに, GC-MS の機種による効果の差を評価するため, ほうれんそう抽出液を用いて同様の実験を行った(図1B). その結果, PEG300 は GC-MS の機種によらず保持時間の遅い農薬に対してマトリクス効果の低減効果が低い傾向が確認された. 図 1A において PEG300 によりフルシトリネート, フルバリネートのマトリクス効果が増加した原因は, PEG300 により溶媒混合標準溶液のピーク強度が低下したためである. しかし, GC-MS の機種を変更した場合(図 1B), 感度低下は生じなかった. これは GC-MS の機種に依存した結果であると考えられるため, 明確な要因を特定することは困難である. キャリアガス中にエチレングリコールを導入した結果では, 農薬の保持時間, GC-MS の機種によらず PEG300 と同等以上のマトリクス効果の低減効果が得ら

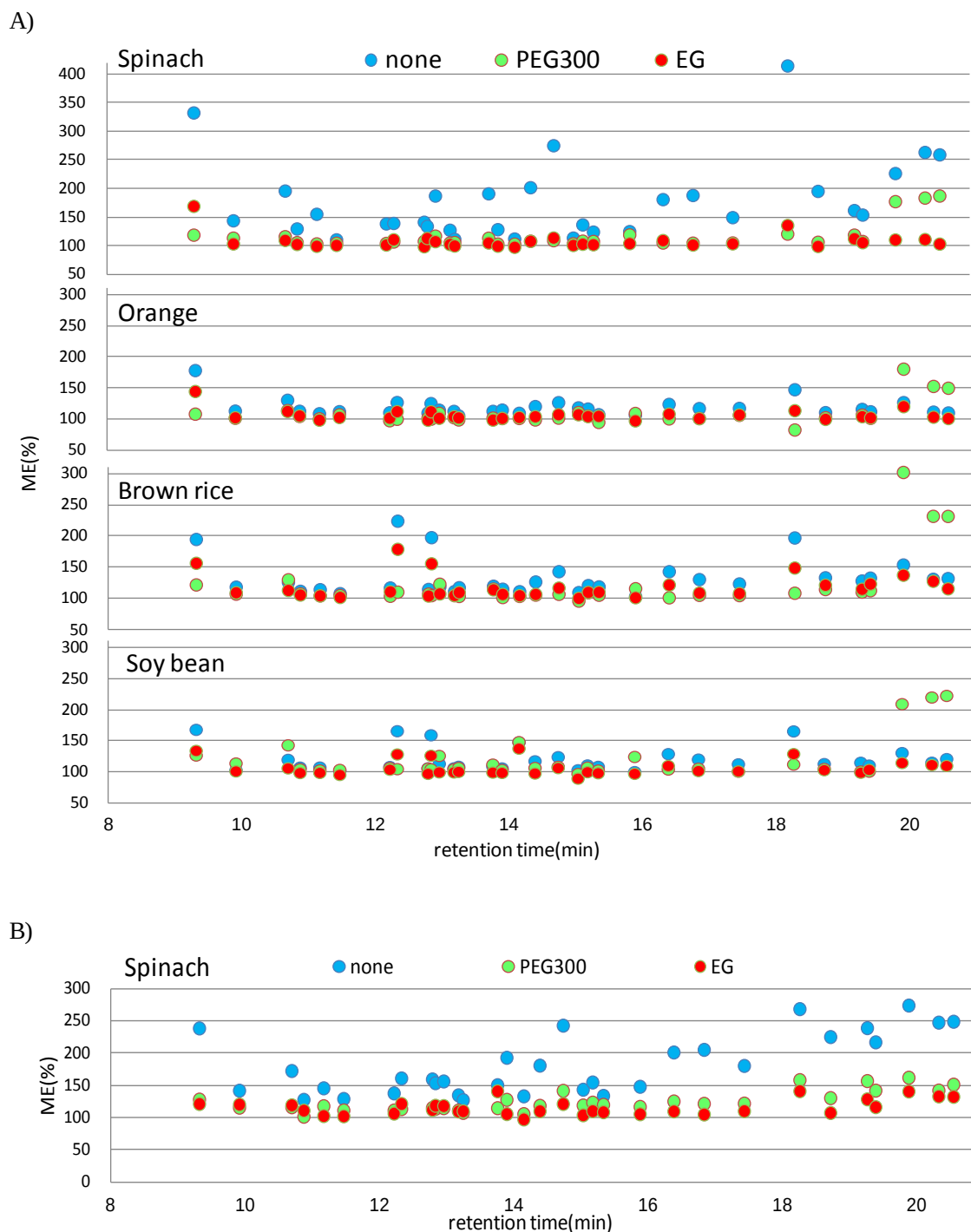


Figure 1. Compensation of the matrix effects ($n=5$) of agricultural product extracts by without and with analyte protectants on GC-MS QP-2010 (A) and HP6890 (B). none : without analyte protectant, PEG300 : polyethylene glycol 300, EG : ethylene glycol.

れた。保護剤によるマトリクス効果の低減は、保護剤が溶出する時間付近において効果が高い。PEG300を添加した場合は、PEG 由来の複数のピークが溶出する範囲内に効果が限定されるのに対し、キャリアガス中に保護剤を導入する方法では分析中、常に保護剤が存在する状

態であるため、農薬の保持時間によらず効果が得られることが利点である。従って、キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法はPEG300を添加する方法の欠点を補うことが可能であり、食品中の残留農薬一斉分析において有効な方法であることが確認された。

3. 2. 保護剤と活性部位の相互作用

GCは試験溶液の注入を繰り返すことにより、装置内に試料由来の汚れが蓄積する。蓄積した汚れが新たな活性部位となりマトリクス効果が増加する。活性部位が増加することにより、標準溶液ではピーク形状の異常、感度の低下が引き起こされる。汚染状態のGC-MSにおいて標準溶液を注入し、保護剤無し、及び保護剤有り(エチレングリコール又はPEG300)、それぞれの場合のオメートのクロマトグラムを図2に示した。保護剤無しの場合はピークテーリングが認められるが、キャリアガス中にエチレングリコールを導入した場合の標準溶液においては、ピーク強度は増加したが、ピーク形状に変化は確認されなかった。PEG300を添加した標準溶液ではピーク強度が増加し、ピーク形状が改善した。保護剤によるマトリクス効果の低減は、保護剤の活性部位との反応性、及び活性部位に対する保護剤の量が重要であると考えられる。エチレングリコール、PEGはいずれも官能基にヒドロキシル基を有するため、活性部位との反応機構は類似していると考えられる。GCへの保護剤の導入量はエチレングリコールで4.2 µg/h、PEG300は1 µg/注入である。エチレングリコールはキャリアガス中に一定量で存在すると考えられるが、PEG300は試験溶液中に含まれるため、GC注入後、カラム分離によりPEGが分離され分子量に応じた複数のピークが生じる。PEG由来のピークが溶出する時間付近は活性部位に対する保護剤の量がエチレングリコールと比較して相対的に多くなると考えられる。

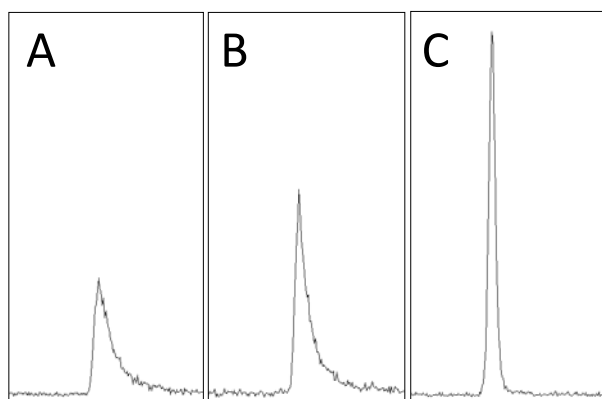


Figure 2. Comparison of peak shape of 0.1 µg/mL omatoate (m/z 156) obtained by deteriorated state GC-MS. (A) without and (B) with ethylene glycol in the carrier gas, and (C) addition of PEG300.

この結果、PEG300を添加した標準溶液ではオメートのピーク形状が改善したと考えられる。

4. まとめ

本研究ではGC-MSにおけるマトリクス効果の解決を目的として、キャリアガス中に保護剤としてエチレングリコールを導入する方法の有効性を確認した。PEG300を試験溶液に添加する方法と比較した結果、検討した全ての農薬でPEG300と同等以上のマトリクス効果の低減効果が確認された。本研究で得られた結果は、キャリアガス中への保護剤導入法は新たなマトリクス効果低減法として食品中の残留農薬分析において利用価値が高いことを示唆している。しかしながら、マトリクス効果を完全に抑えることはできていないため、各農薬に最適な保護剤を選定する必要がある。また、保護剤を連続的に導入し続けることによる装置への負荷を評価することが必要である。

5. 謝辞

本研究は“知の拠点あいち”重点研究プロジェクトの支援により実施することができました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- C. F. Poole. *et al.*, (2007) Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1158, 241-250
- D.R.Erney.*et al.*, (1993) Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection, *J. Chromatogr.* 638 57-63.
- D.R.Erney.*et al.*, (1997) Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography:

Is there a solution?, J. High. Resolut. Chromatogr. 20, 375–378.

H.Ito. *et al.*, (2007) Specific separation of polar analytes on a medium polar stationary phase by gas chromatography with carrier gas containing vaporous modifiers, Chromatography, 28, 25-28.

J.Zrostlíková. *et al.*, (2001) Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices, J. Chromatogr. A, 937, 73-86.

J.Hajšlová. *et al.*, (2003) Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, J. Chromatogr. A, 1000, 181-197.

K.Maštovská. *et al.*, (2005) Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. Anal. Chem. 77, 8129-8137.

M.Anastassiades. *et al.*, (2003) Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides, J. Chromatogr. A, 1015, 163-184.

T.Fujiyoshi. *et al.*, (2016) Evaluation of the matrix effect on GC-MS with carrier gas containing ethylene glycol as an analyte protectant. J. Chromatogr. A, 1434, 136-141.

X.Xu, *et al.*, (2009) Rapid GC-MS analysis of pesticide residues using analyte protectants, Anal. Lett. 42, 2578-2591.

「食品に残留する農薬、飼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」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)別添「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」

Title : Evaluation of an analyte protectant generator in pesticide residue analysis using a GC-MS system

Author(s) : Tomoharu Fujiyoshi¹⁾, Takahito Ikami²⁾, Takashi Sato¹⁾, Koji Kikukawa¹⁾, Masato Kobayashi¹⁾, Hiroshi Ito³⁾, Atsushi Yamamoto²⁾

Address(es) : 1) Food Analysis Technology Center SUNATEC.

2) Collage of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

3) Toyota Central R&D Labs., Inc.,

Keywords : analyte protectant generator, ethylene glycol, GC-MS, matrix effect, pesticide residue analysis.

Summary

Evaluation of an analyte protectant generator in pesticide residue analysis using a GC-MS system

Tomoharu Fujiyoshi^{1,2)}, Takahito Ikami²⁾, Takashi Sato¹⁾, Koji Kikukawa¹⁾, Masato Kobayashi¹⁾, Hiroshi Ito³⁾, Atsushi Yamamoto²⁾

1) Food Analysis Technology Center SUNATEC.

2) Collage of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

3) Toyota Central R&D Labs., Inc.,

The consequences of matrix effects in GC are a major issue of concern in pesticide residue analysis. We proposed novel analyte protectant generator in pesticide residue analysis using a GC-MS system to compensate the matrix effect. The aim of this study was to compare both method of the introduction of ethylene glycol as an analyte protectant into the carrier gas with the addition of polyethylene glycol 300 (PEG300) into test solutions. Ethylene glycol in the carrier gas effectively compensated the matrix effects in agricultural product extracts, but PEG300 in the test solution was less effective for late eluting pesticides.