



# GC/MSを用いた食品中残留農薬分析 における検量線に関する検討

株式会社アイスティサイエンス

○佐々野僚一 谷澤春奈

AiSTI SCIENCE

## 目的

厚生労働省が提示している「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従い、比較検討している分析手法の妥当性評価を行っていたところ、検量線の作成方法により回収率や精度の評価が異なることがわかった。

今回、検量線の作成方法に着目し、GC/MSを用いた食品中残留農薬分析における各種検量線の比較検討を行ったので報告する。

- 同じ前処理や測定でも  
「検量線の作成方法」により回収率や精度の評価が異なる !?

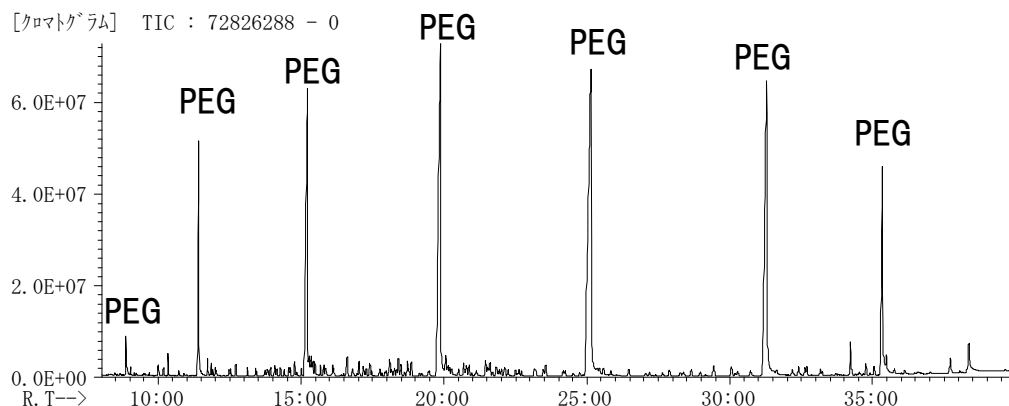
# 検量線の種類

- 絶対検量線法
- 内部標準法
  - ✓ 測定対象物質と内標準物質との物性の違いなどからその補正に関して問題視されることもあるが、前処理工程や測定による影響を除去する手段として採用されている
- 標準添加法
  - ✓ 1)すべての検体について2回ずつ注入しなければならない、2)添加した標準溶液の濃度よりも極端に高い濃度の農薬を検出した場合に誤差が大きくなり、正確な試料濃度が求められない、などの理由により難しい面もあるが、マトリックスの影響を除去して測定する手段としては有用であると報告されている
- マトリックス検量線法
  - ✓ 前処理後の検液（マトリックス）に標準液を添加して検量線を作成するため、マトリックスの影響を除去して測定することが可能となるが、標準液を添加する検液に測定対象農薬を含んでいないことが大前提となる

# 検量線の種類

## ➤ PEG共注入検量線法

- ✓ 標準液にマトリックスのかわりにPEG（ポリエチレングリコール）を添加して検量線を作成する手法。マトリックス検量線の欠点である残留農薬の影響を受けない。



## 効果

- ・マトリックスによる異常回収率の低減
- ・感度向上
- ・ピーク形状の改善
- ・カラム劣化の防止
- ・検量線の直線性の向上

### ☆PEG300を使用

- ・ほとんどの農薬のリテンションタイムをカバーしている。
- ・フラグメントイオンは主に100以下しか持たないため、農薬のマスペクトルと重なりにくい。

### ☆標準溶液だけでなく最終試験溶液にもPEG共注入

- ・マトリックスによる活性点の増大をPEGのコーティングにより防ぐことができる。

# 実験方法

添加回収試験(ほうれん草: 添加濃度 0.01ppm)を行い、同一の測定結果のピーク面積から次の各検量線を用いて定量し、それぞれの回収率を求めた。

- A. 絶対検量線法
- B. 絶対検量線法 (PEG有)
  - : Aで作成した検量線用標準溶液にPEG300を20ug/mLになるように添加し、再度検量線を作成。
- C. 内部標準法 (PEG有)
  - : Benfuresateを内部標準物質 (I.S.) として相対検量線を作成。
- D. マトリックス絶対検量線 (PEG有)
  - : 前処理後の検液に混合標準液を添加してマトリックス標準液を作成し、検量線を作成。
- E. マトリックス内部標準法 (PEG有)
  - : Benfuresateを内部標準物質 (I.S.) として相対検量線を作成。

# 実験方法

添加回収試験(ほうれん草:添加濃度 0.01ppm)を行い、同一の測定結果のピーク面積から次の各検量線を用いて定量し、それぞれの回収率を求めた。

## ポジティブリスト制 GC/MS対象農薬

製品名	農薬数	濃度	
農薬混合標準液 22	50種	10ppm	(アセフェート、 メタミドホスは50ppm)
農薬混合標準液 34	46種	10ppm	
	合計 281種		

\*いずれも関東化学社製

# 本法前処理フロー

## 抽出

試料 10g

— アセトニトリル 10 mL

ホモジナイズ

— NaCl(食塩) 1g

— クエン酸3Na2水和物 1g

— クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

— MgSO<sub>4</sub>(無水硫酸マグネシウム)4g

撈拌(手で振とう 1分間)

遠心分離(3000rpm 5分間)

## 精製

アセトニトリル層分取 0.5mL (試料 0.5 g 相当)

C18-50mg

— 洗液 アセトニトリル 0.5mL

流出液

— 添加 トルエン 0.3mL

GCS-20mg/PSA-30mg

— 洗液 トルエン・アセトニトリル(1/3) 0.6mL

減圧濃縮/乾固

— 転溶 アセトン・ヘキサン(3/7) 2 mL

— 添加 フェナントレン-d+1%PEG300 4uL

定容(2 mL)

GC/MS(大量注入25uL注入)



## GC/MS条件

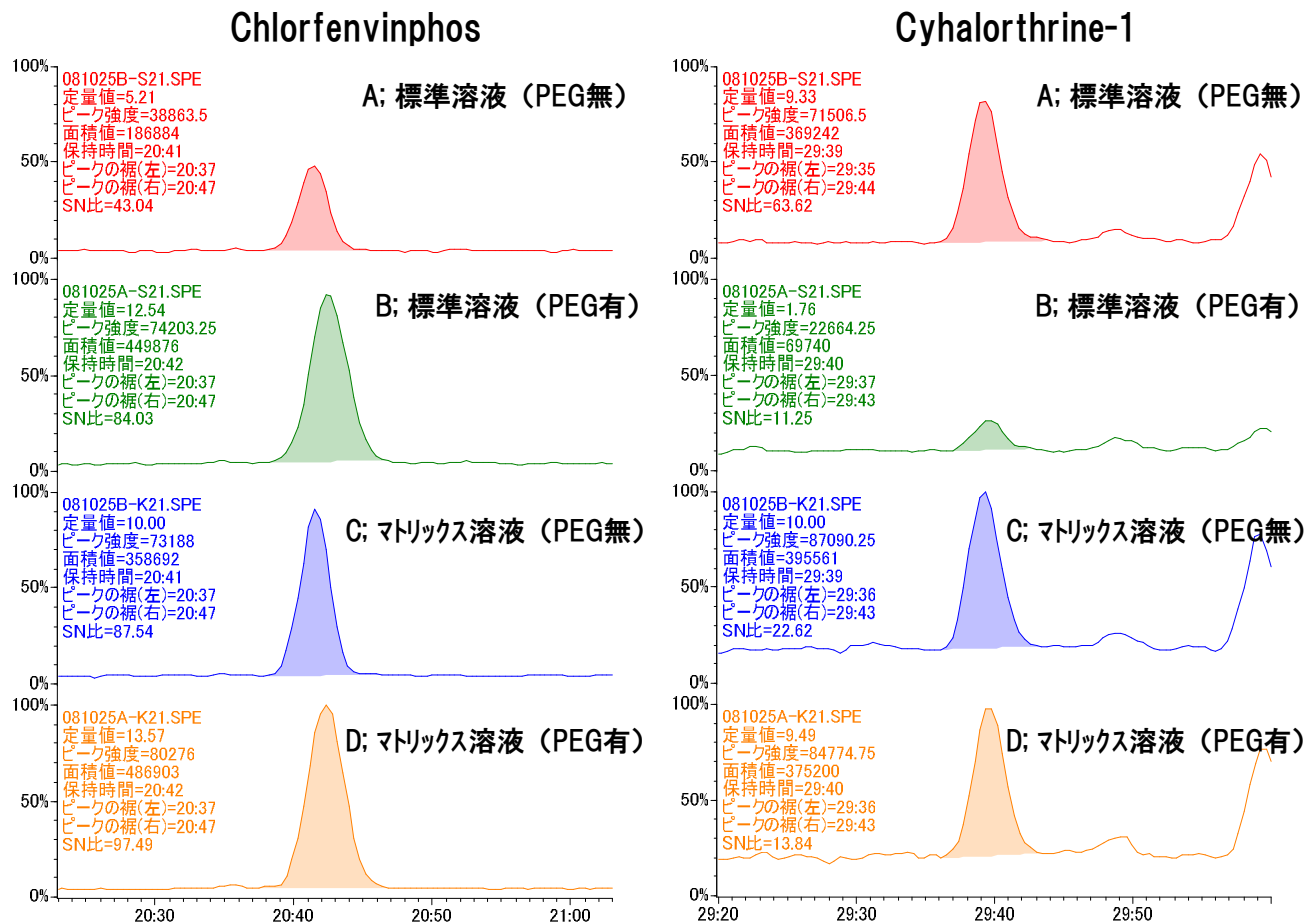
---

PTV Injector	LVI-S200(AISTI Science); Stomach Insert
Injector Temp.	90°C-120°C/min-240°C(1min)-50°C/min-270°C(30min)
Auto Samplor	Agilent 7683; 50 µL Syringe
Injection Volume	25 µL
GC/MS	JMS-Q1000GC(JEOL)
Pre-column	Deactivated silica capillary tube, 0.25mm × 0.3m
Column	ENV-5MS, 0.25mm i.d. × 30m, df: 0.25µm
Column Oven Temp.	60°C(4min)-20°C/min-160°C-5°C/min-220°C-3°C/min-235°C-7°C/min-310°C(8min)
Inlet Mode	Solvent Vent Mode
Vent Flow	150 mL/min
Vent Press	70 kPa
Vent End Time	0.42 min
Purge Flow	50 mL/min
Purge Time	4 min
Gas Saver Flow	20 mL/min
Gas Saver Time	6 min
Detector Temp.	280°C
MS Method	SCAN; 50 - 450 m/z, SIM

---



# PEG共注入の評価



Chlorfenvinphosが示すように多くの農薬においてB標準溶液(PEG共注入標準溶液)やDマトリックス標準液と比べるとA標準溶液(PEG無)の標準溶液のピークが小さい。そのためA標準溶液で検量線を作成すると、異常回収率が多くなることが予想される。しかし、Cyhalothrine-1が示すようにPEGを共注入することで逆にピークが減少する農薬がいくつかあるので注意が必要である。

Fig. PEG共注入有無によるクロマトグラム比較 (バイアル中濃度を統一)

## 添加回収試験(回収率分布)

検量線種類 溶液 PEG添加の有無 算出方法	検量線 A 標準液 PEG無 絶対検量線	検量線 B 標準液 PEG有 絶対検量線	検量線 C 標準液 PEG有 内部標準法	検量線 D マトリックス PEG有 絶対検量線	検量線 E マトリックス PEG有 内部標準法
50%未満	10	7	9	14	14
50-70%	3	6	3	11	15
70-120%	12	31	62	87	83
120-150%	29	41	24	1	2
150%以上	60	29	16	1	0
合計	114	114	114	114	114

試料;ほうれん草、 添加濃度 ;0.01ppm、 添加農薬成分数;114成分

## 結果と考察

標準液-絶対検量線のPEG無とPEG有を比較するとPEG有の方が異常回収率(120%以上)の分布が少ないことがわかった。また、標準液-絶対検量線法と標準液-内部標準法では内部標準法の方が異常回収率の分布がさらに少ないことがわかった。PEG有標準液とマトリックスではマトリックス検量線の方が良好な結果を得ることができた。マトリックス検量線において、絶対検量線と内部標準法の違いはあまり見られなかったが、分取などの前処理での操作や機器での感度変動を考慮すると、内部標準法を取り入れておく方が望ましいと考えられる。

今回の結果から、妥当性評価を行う場合、同じ分析手法でも検量線の種類が異なるとその評価まで大きく異なることがわかった。また、今回比較検討を行った検量線ではマトリックス検量線が最も良い評価を得ることがわかった。

## 今後の課題

しかし、マトリックス検量線は本当に最適なのだろうか？

### □ マトリックス検量線の問題点

マトリックス検量線法はマトリックス標準液に測定対象農薬を含んでいないことが大前提となり、実際の定量分析で検出された時の定量方法が問題となる。

- 標準添加法で定量
  - ✓ マトリックス検量線法での妥当性評価を行った意味が薄れてしまいかねない。
- 農薬を含んでいない測定対象検体と同じ種類の検体の抽出液でマトリックス検量線を作成
  - ✓ その抽出液を常に準備しておかなければならない。



### □ 今後の課題

極性PEG共注入検量線法のように農薬を含んでおらず、どのような測定対象物にも対応できるPEG共注入検量線も有効のように思われる。すなわち、このPEG共注入を改良して、PEGよりも効果があり、農薬に影響を与えないPEGに代わる添加物質を探求することが必要なのかもしれない。

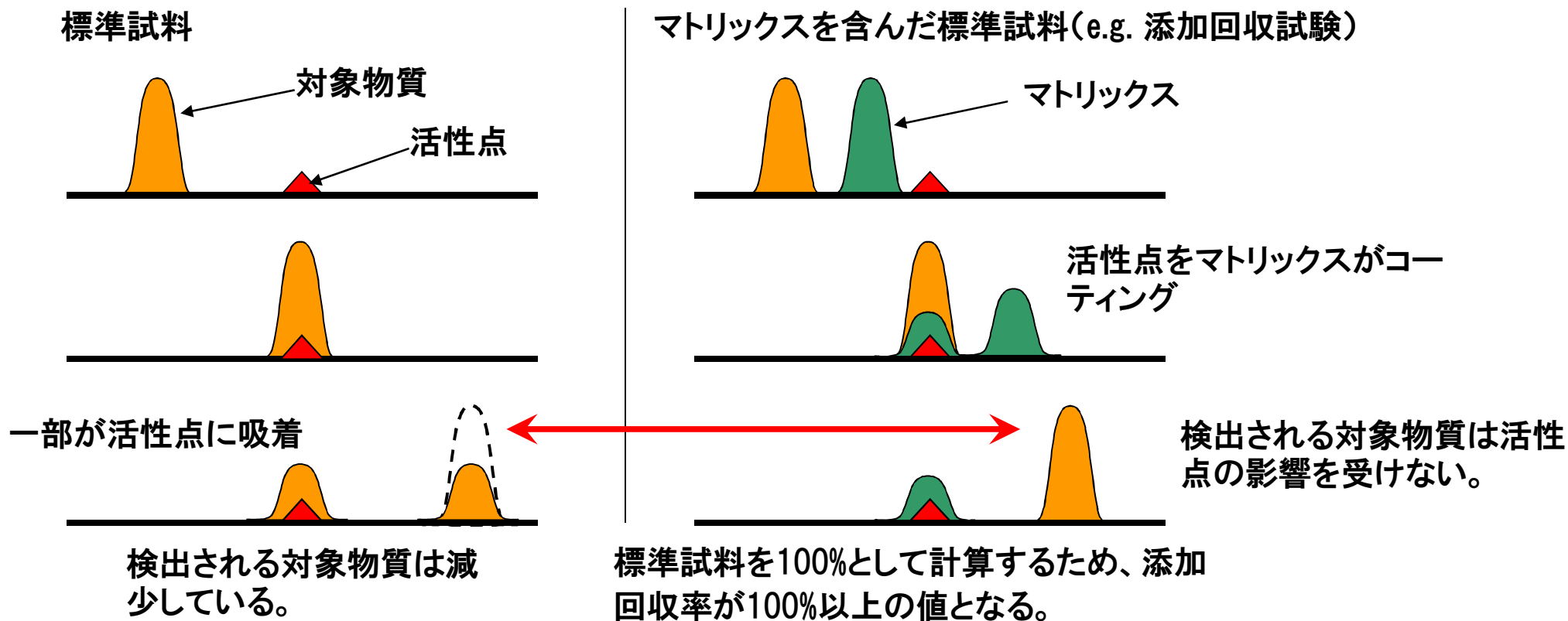
## 今後の課題

**検量線の役割とは？**

**真の値はどこに？**

# 異常回収率の原因は？

この原因として注入口やカラムやイオン化室(MSの場合)などの活性点が異常回収率を引き起こしていると考えられる。



溶液 PEG添加の有無 算出方法 添加濃度 単位	標準液	標準液	標準液		標準液		マトリックス		マトリックス	
	PEG無	PEG無	PEG有		PEG有		PEG有		PEG有	
	絶対検量線	絶対検量線	絶対検量線		内部標準法		絶対検量線		内部標準法	
	0.1 ppm	0.01 ppm	0.01 ppm		0.01 ppm		0.01 ppm		0.01 ppm	
回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	
Methamidophos	104.6	175.5	113.4	1.9	97.8	2.1	87.4	1.9	83.3	2.1
Dichlorvos	76.8	105.5	83.7	10.9	72.2	11.9	70.2	10.9	66.8	11.9
EPTC	51.2	56.7	67.6	18.8	58.3	18.8	62.9	18.8	59.9	18.8
Butylate	63.7	69.8	87.0	12.2	75.0	12.0	78.0	12.2	74.3	12.0
Acephate	117.6	258.3	157.7	7.1	136.0	7.3	80.4	7.1	76.6	7.3
Isoprocarbe	93.2	153.7	134.6	2.8	116.1	2.8	99.8	2.8	95.0	2.8
Fenobucarb	92.1	155.3	148.2	2.6	127.7	1.4	99.9	2.6	95.1	1.4
Ethoprophos	89.1	141.7	129.9	2.1	112.0	1.2	97.1	2.1	92.4	1.2
Chlorpropham	92.8	150.3	135.5	3.7	116.8	2.2	102.9	3.7	97.9	2.2
Bendiocarb	108.1	226.6	524.2	17.5	452.6	18.2	63.8	17.5	60.8	18.2
Cadusafos	89.4	128.8	122.7	2.2	105.8	3.0	94.7	2.2	90.2	3.0
BHC-alpha	84.8	131.1	136.5	2.3	117.7	2.2	97.4	2.3	92.7	2.2
Thiometon	30.4	46.7	54.6	21.5	47.3	23.4	46.1	21.5	44.0	23.4
Terbufos	76.6	118.9	119.3	1.6	102.9	1.4	95.0	1.6	90.4	1.4
BHC-beta	91.0	123.9	110.8	3.5	95.5	2.2	102.9	3.5	97.9	2.2
Dimethipin	88.4	134.1	116.2	2.3	100.2	2.9	93.3	2.3	88.9	2.9
Diazinon	89.1	130.1	114.7	1.8	98.9	1.6	102.6	1.8	97.6	1.6
BHC-gamma	80.6	124.4	127.0	4.4	109.5	4.8	97.4	4.4	92.7	4.8
Tefluthrine	86.3	120.1	111.4	2.4	96.0	0.5	101.6	2.4	96.7	0.5
Etrimphos	89.2	139.2	113.3	2.1	97.7	1.3	103.7	2.1	98.7	1.3
Pirimicarb	87.3	126.8	112.9	2.4	97.4	0.9	100.1	2.4	95.3	0.9
BHC-delta	85.3	138.4	1240.5	16.8	1071.1	17.6	66.2	16.8	63.1	17.6
Ethiofencarb	2.1	6.7	64.6	43.3	56.1	44.7	7.2	43.3	6.9	44.7
Benfuresate	87.9	127.9	116.0	2.7	I.S.		105.1	2.7	I.S.	
Tolclofos-methyl	87.4	135.1	121.0	2.0	104.3	1.1	101.9	2.0	97.0	1.1
Methyl-parathion	101.6	250.9	166.1	3.5	143.2	3.9	105.4	3.5	100.3	3.9
Carbaril	114.4	375.7	2516.1	29.4	2172.9	29.8	44.6	29.4	42.6	29.8
Pirimiphos-methyl	97.4	166.9	144.5	3.4	124.6	1.0	107.8	3.4	102.6	1.0
Fenitrothion	107.3	221.1	164.2	2.9	141.6	3.5	104.1	2.9	99.1	3.5
Methiocarb	113.2	272.1	684.6	22.6	591.2	23.2	55.4	22.6	52.8	23.2
Malathion	101.8	213.8	171.6	2.9	148.0	3.0	100.8	2.9	95.9	3.0
Esprocarb	90.6	136.1	131.7	2.1	113.6	1.2	103.6	2.1	98.6	1.2
Dichlofluanid	0.0	4.1	25.0	23.1	21.6	23.5	3.3	23.1	3.1	23.5
Metolachlor	94.4	145.8	132.0	2.6	113.8	1.3	106.3	2.6	101.2	1.3
Chlorpyrifos	89.3	156.7	134.8	3.4	116.2	2.6	106.0	3.4	100.9	2.6
Diethofencarb	96.1	177.2	136.3	3.6	117.5	1.4	109.9	3.6	104.5	1.4
Dimethylvinphos	128.9	287.5	150.1	3.6	129.5	4.3	98.2	3.6	93.6	4.3
Thiobencarb	88.3	140.3	127.0	1.9	109.5	1.3	104.6	1.9	99.6	1.3
Fenthion	76.7	128.8	115.5	3.0	99.7	4.3	94.1	3.0	89.7	4.3
Isofenphos-oxon	120.7	227.9	143.6	2.0	123.9	2.5	99.9	2.0	95.2	2.5
Parathion	94.0	170.4	143.3	5.0	123.5	4.6	105.6	5.0	100.5	4.6
Fosthiazate-1	138.6	336.4	146.0	7.0	125.8	6.2	95.8	7.0	91.2	6.2
Fosthiazate-2	163.4	336.3	171.7	5.9	148.1	6.5	101.3	5.9	96.4	6.5
Chlorfenvinphos-E	106.9	224.8	135.6	7.4	116.8	5.9	104.6	7.4	99.5	5.9
Pendimethalin	96.3	167.3	148.9	3.1	128.3	1.1	101.7	3.1	96.8	1.1
Isofenphos	91.4	141.9	126.0	4.9	108.6	2.7	105.9	4.9	100.7	2.7
Chlorfenvinphos-Z	108.7	220.2	114.5	2.5	98.7	2.5	106.5	2.5	101.4	2.5
PyrifenoX-Z	89.2	152.7	106.3	2.5	91.6	0.8	101.2	2.5	96.4	0.8
Phenthoate	85.8	206.7	105.9	4.7	91.3	3.7	156.0	4.7	148.5	3.7
Quinalphos	88.6	153.6	112.3	2.3	96.8	1.0	104.7	2.3	99.7	1.0
Triadimenol-1	93.6	119.0	147.7	7.7	127.2	5.3	139.9	7.7	133.0	5.3
Captan	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Triadimenol-2	97.9	164.4	124.3	3.6	107.2	2.7	108.8	3.6	103.6	2.7
PyrifenoX-E	91.9	183.3	125.6	2.8	108.3	1.7	108.5	2.8	103.3	1.7
Paclbutrazol	94.5	155.5	109.3	2.1	94.2	0.6	113.2	2.1	107.8	0.6
Quinomethionate	1.8	23.2	14.2	61.9	12.3	62.4	3.4	61.9	3.3	62.4
Flutolanil	95.8	167.0	134.3	3.0	115.7	1.0	107.3	3.0	102.1	1.0
Pretilachlor	99.3	175.0	140.2	2.5	120.9	2.4	107.2	2.5	102.1	2.4
Prothiofos	92.7	163.6	135.7	2.4	117.0	2.2	101.2	2.4	96.4	2.2
DDE-p,p'	80.5	125.4	113.6	1.9	98.0	1.8	99.2	1.9	94.5	1.8

溶液 PEG添加の有無 算出方法 添加濃度 単位	標準液	標準液	標準液		標準液		マトリックス		マトリックス	
	PEG無	PEG無	PEG有		PEG有		PEG有		PEG有	
	絶対検量線	絶対検量線	絶対検量線		内部標準法		絶対検量線		内部標準法	
	0.1 ppm	0.01 ppm	0.01 ppm		0.01 ppm		0.01 ppm		0.01 ppm	
回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	
Flusilazole	90.7	150.5	129.3	2.6	111.5	1.0	108.5	2.6	103.3	1.0
Myclobutanil	91.7	146.8	130.6	1.5	112.6	1.9	110.0	1.5	104.8	1.9
Tricyclazole	115.5	N.D.	168.4	3.1	145.1	1.5	96.0	3.1	91.4	1.5
Cyproconazole-1	97.7	163.3	137.2	2.1	118.4	3.7	108.3	2.1	103.1	3.7
Cyproconazole-2	94.2	164.0	136.9	2.9	118.1	3.2	105.2	2.9	100.2	3.2
Chlorobenzilate	97.3	163.7	144.0	1.9	124.2	1.4	108.1	1.9	102.9	1.4
Fensulfothion	126.0	251.8	161.9	3.5	139.6	2.4	111.8	3.5	106.4	2.4
DDD-p,p'+DDT-o,p'	92.2	153.7	152.9	1.7	131.9	1.7	103.3	1.7	98.4	1.7
Mepronil	105.2	182.3	118.9	4.4	102.5	4.0	112.4	4.4	107.0	4.0
Propiconazole-1	98.6	150.8	112.5	2.3	97.0	1.7	103.6	2.3	98.6	1.7
Edifenphos	212.3	2318.8	235.2	18.9	203.1	19.6	65.5	18.9	62.4	19.6
Propiconazole-2	95.7	160.4	112.6	2.2	97.1	3.3	100.3	2.2	95.5	3.3
Lenacil	107.6	182.1	112.4	1.8	96.9	1.4	106.7	1.8	101.6	1.4
Thenylchlor	114.1	190.6	125.0	1.6	107.8	1.5	107.9	1.6	102.7	1.5
Tebuconazole	96.4	158.9	118.8	2.9	102.5	2.7	109.3	2.9	104.1	2.7
Captafol	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Iprodione	97.9	174.7	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
EPN	105.0	209.7	148.0	3.8	127.6	3.4	100.5	3.8	95.6	3.4
Acetamipride	184.5	N.D.	N.D.		81.9	137.4	N.D.		N.D.	
Tebufenpyrad	94.8	149.3	128.8	1.4	111.1	1.8	111.8	1.4	106.4	1.8
Phosalone	96.6	188.9	146.2	13.2	126.1	13.7	74.3	13.2	70.7	13.7
Cyhalothrin-1	73.5	112.8	236.5	15.9	204.1	16.4	73.2	15.9	69.8	16.4
Pyriproxyfen	96.0	154.9	123.8	2.1	106.7	1.9	105.6	2.1	100.5	1.9
Cyhalothrin-2	92.8	133.7	212.8	13.6	183.6	14.3	72.8	13.6	69.4	14.3
Mefenacet	119.4	217.7	132.9	2.4	114.6	2.4	105.9	2.4	100.8	2.4
Acrinathrin	42.7	53.4	355.6	24.3	306.9	24.7	47.5	24.3	45.3	24.7
Fenarimol	94.0	137.8	102.3	4.2	88.2	3.8	110.5	4.2	105.2	3.8
Pyraclufos	175.1	400.1	126.2	11.2	108.9	11.9	77.7	11.2	74.0	11.9
Bitertanol-1	127.5	214.8	133.4	1.9	115.1	1.0	109.6	1.9	104.3	1.0
Permethrin-cis	103.8	173.4	132.0	1.5	113.8	1.4	104.6	1.5	99.6	1.4
Bitertanol-2	132.6	196.0	118.9	2.0	102.5	2.1	109.4	2.0	104.1	2.1
Permethrin-trans	103.7	155.2	120.0	1.7	103.5	1.2	103.6	1.7	98.6	1.2
Pyridaben	101.2	163.6	122.4	2.2	105.5	0.8	106.4	2.2	101.3	0.8
Cyfluthrin-1	73.8	201.8	235.3	18.4	203.5	19.9	90.9	18.4	86.8	19.9
Cyfluthrin-2	55.4	78.5	151.2	26.6	130.7	27.2	56.8	26.6	54.2	27.2
Cyfluthrin-3	84.7	112.4	186.1	31.4	160.9	32.2	65.5	31.4	62.5	32.2
Cyfluthrin-4	99.8	122.4	190.5	19.5	164.1	19.1	59.6	19.5	56.7	19.1
Cypermethrin-1	80.1	115.0	158.7	18.0	136.8	17.7	64.5	18.0	61.3	17.7
Halfenprox	93.0	152.6	118.4	3.1	102.1	1.9	97.5	3.1	92.8	1.9
Flucythrinate-1	85.8	126.9	210.8	7.8	181.9	8.8	85.3	7.8	81.2	8.8
Cypermethrin-2	76.7	127.2	*		*		*		*	
Cypermethrin-3	80.0	118.6	50.6	28.5	43.6	28.5	67.3	28.5	64.1	28.5
Cypermethrin-4	73.4	102.3	163.8	25.2	141.5	25.9	48.2	25.2	46.0	25.9
Flucythrinate-2	93.2	128.0	204.9	8.6	176.8	9.4	82.2	8.6	78.3	9.4
Silafluofen	83.7	125.4	109.7	1.8	94.6	1.8	98.8	1.8	94.0	1.8
Pyrimidifen	56.1	80.3	59.3	4.3	51.1	3.2	59.2	4.3	56.3	3.2
Fenvalerate-1	71.2	90.5	154.9	12.1	133.7	12.7	82.2	12.1	78.3	12.7
Fluvalinate-1	41.7	45.9	226.9	41.9	195.9	42.1	28.9	41.9	27.5	42.1
Fluvalinate-2	40.2	40.7	269.2	44.0	232.3	44.1	28.0	44.0	26.6	44.1
Fenvalerate-2	94.2	130.5	185.4	12.8	159.8	12.8	80.7	12.8	76.9	12.8
Difenoconazole-1	106.0	152.4	112.3	1.3	96.8	2.8	104.9	1.3	99.9	2.8
Difenoconazole-2	102.2	164.4	118.3	3.7	102.0	2.8	110.5	3.7	105.2	2.8
Deltamethrin	40.4	84.9	57.5	22.5	49.6	23.4	71.3	22.5	68.0	23.4
Imibenconazole	100.5	184.2	101.9	8.3	87.8	7.5	85.3	8.3	81.2	7.5
回収率分布										
50%未満	10	10	7		9		14		14	
50-70%	4	3	6		3		11		15	
70-120%	90	12	31		62		87		83	
120-150%	6	29	41		24		1		2	
150%以上	4	60	29		16		1		0	
合計	114	114	114		114		114		114	