

振とう条件の違いによる塩析効果と農薬の挙動について

○谷澤春奈、佐々野僚一（株式会社アイスティサイエンス）

【はじめに】

食の安全・安心を求める声が高まる中、食品中の残留農薬分析においては、より多くの農薬を効率よく早く正確に分析することが求められている。QuEChERS 法¹⁾は、多成分迅速一斉分析法として 2003 年に発表されて以降、現在ヨーロッパでは Official Method として採用され、日本でもいろいろな分析機関で検討されている^{2),3),4)}。

抽出後すぐに、同じ条件で酸性・中性・アルカリ性の農薬をアセトニトリル層へ移行させ、液液分配（アセトニトリル層と水層を分離）までできることは、Quick, Easy である QuEChERS 法の大きなメリットであるが、同時に、再現性の良い分析を行うためにはこの塩析操作が最も重要になってくる工程であると思われる。QuEChERS 法では食塩をはじめとする 4 種類の塩を一定量添加した後、勢いよく（vigorously）振って塩析を行うとなっているが、手で振って塩析を行うため、その振り方は人により異なる。もし勢いよく振らなかった場合、抽出効率に変動するのかどうか疑問に思い、今回、いくつかの振とう条件において塩析効果と農薬の挙動について違いが見られるかどうか検討を行ったので報告する。またアセトニトリル抽出液の精製については、自動前処理装置を用いて精製効果を高めた固相ミニカラム法による検討を行ったので併せて報告する。

【実験方法】

1. 試料

水分量の多いきゅうりやトマトなどに比べて、枝豆は水分量が少なくかさ高いため、振とう時に差が出やすいのではないかと考え、枝豆を用いることとした。

2. 塩析時の振とう条件

4 種類の塩を添加後、下記内容で検討を行った。

- ① 手で勢いよく振とう（以下、手強い）
- ② 手でゆるく振とう（以下、手弱い）
- ③ 振とうせず、薬さじで混合（以下、振とう無）

*①②は 1 分間実施、③は塩と試料が軽く混ざる程度に 10 秒ほど実施。

また、①（手強い）については農薬を、A:振とう前に添加、B:振とう後に添加、C:振とう後固相ミニカラム精製を行った後（GC/MS、LC/MS/MS 測定直前）に添加を行い、農薬の添加位置を変更することで振とう条件が回収率に及ぼす影響を確認した。（農薬の添加位置は 6.試料の調製方法を参照）

3. 対象農薬

GC/MS で 268 成分、その内、アセフェートなどの高極性農薬 26 成分は LC/MS/MS でも分析を行った。

4. 試薬および標準品

農薬標準品；GC/MS 対象農薬混合標準溶液 22、31、34、48、51（計 268 成分）

関東化学社製) を用い、アセフェートなどの高極性農薬 26 成分は、単品から混合標準溶液を作成したものを、(林純薬社製)、LC/MS/MS で条件検討を行った。その他試薬 ; 食塩、無水硫酸マグネシウム、クエン酸 3Na₂ 水和物、クエン酸水素 2Na_{1.5} 水和物 (関東化学社製)

固相ミニカラム ; Smart-SPE C18-30mg、Smart-SPE C18-50mg、Smart-SPE PSA-30mg (アイスティサイエンス社製)

5. 装置および測定条件

5.1 自動前処理装置

自動前処理装置 : STQ-L200 (アイスティサイエンス社製)

使用溶媒 : アセトニトリル、アセトニトリル/水 (8/2)、アセトン、アセトン/ヘキサン (15/85)、メタノール、メタノール/水 (8/2)、10%食塩水

乾燥ガス : 窒素

精製方法 : GC 法および LC 法

5.2 GC/MS

GC 注入口 : 大量注入口装置 LVI-S200 (アイスティサイエンス)

注入口温度 : 70°C (0.3min) -120°C/min-240°C (0.5min) -50°C/min-290°C (30min)

注入量 : 25 μL

GC : 6890N (Agilent)、MS : JMS-Q1000GC (JEOL)

カラム : BPX5 0.25mm i.d.×30m, 膜厚 0.25 μm (SGE)

カラム温度 : 60°C (4min) -20°C/min-160°C-5°C/min-220°C-3°C/min-235°C-7°C/min-310°C (8min)

キャリアガス : コンスタントフロー 1mL/min

スプリット流量 : 150mL/min (0.25min) -0mL (4min) -30mL/min

5.3 LC/MS/MS

LC : Prominence (島津)、MS/MS : API3200 (AB SCIEX)

カラム : L-column2 2.1×150mm 粒子径 3 μm (化学物質評価研究機構)

移動相 : A 液 0.5mM 酢酸アンモニウム水溶液

B 液 0.5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール

グラジエント条件 : B 液 初期値 10%→50% (0-1min) →98% (1-15min) →98% (15-20min) →10% (20.1-33min)

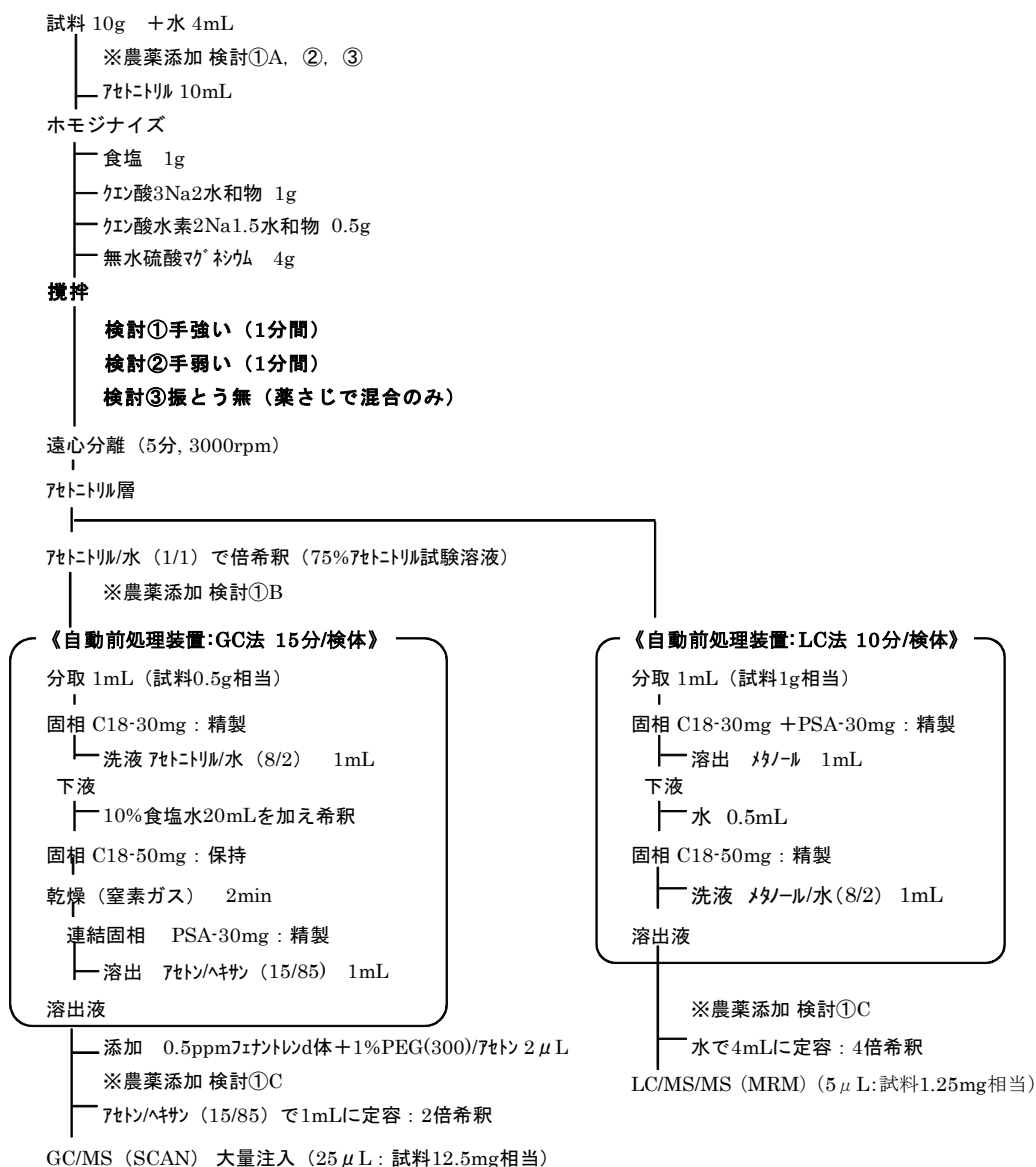
流速 : 0.2mL/min, 注入量 : 5 μL

イオン化モード : ESI (Positive), イオンスプレー電圧 : 5500V

イオンソース温度 : 350°C, イオン化モード : MRM Positive

6. 試料の調製方法

枝豆をフードプロセッサーで粉碎後 10g 量り取り、水分調整のため水を 4mL 加え、Scheme1. に従い試料溶液の調製を行った。



Scheme 1. 試験溶液の調製法

【結果および考察】

1. 抽出法について

QuEChERS法では試料を冷凍粉砕によりパウダー状にし、アセトニトリルで振とう抽出を行っているが、振とう抽出で農薬の抽出効率を上げるためにはパウダー状かペースト状になるまで試料を十分に細かく粉砕均一化する必要がある。家庭用のフードプロセッサーによる粉砕では振とう抽出では抽出効率が下がると起橋ら^{2,3)}は報告しており、特に枝豆など皮の堅い作物では細かく粉砕ができないため、抽出効率の高いジェネレーターによるホモジナイズ抽出を行った。

2. 塩析時の振とう抽出条件の違いについて

2.1 塩の添加順序について

4種類の塩の添加は、食塩→クエン酸 3Na2水和物→クエン酸水素 2Na1.5水和

物→無水硫酸 Mg の順序で行った。食塩とクエン酸塩は特に順序は関係ないと思われるが、無水硫酸 Mg は添加した途端に吸水し、塩が固化し発熱が始まるため、他の塩より早く添加すると振とう時に塩が均一に混ざらない可能性が示唆された。そこで無水硫酸 Mg を最後に添加し、添加直後に振とうまたは混合を行った。

2.2 振とう時の状態について

① 手強い、②手弱いについては1分間振とう、遠心分離後は、見た目の塩の溶解度合いや析出度合いはほとんど同じであった。③振とう無は葉さじで混合しただけなので、塩と試料の混ざりが悪く、特に無水硫酸 Mg が試料層に固まって残っているように見受けられた。上層のアセトニトリルを別容器に全量分取したところ、②③に比べて①が約 1mL 多かったため、塩析が十分に行われ、アセトニトリルと水の分離が促進されたのではないかと思われた。

また気になる点として、枝豆の場合、ホモジナイズ抽出後の試料に塩を添加し振とうすることで、塩と試料が混合しモチのような大きな塊になった。このように試料がひと固まりになると、適切に振とうできているのかどうか、またアセトニトリル抽出された農薬が再び試料のほうへ移行していないかが懸念されたが、添加回収試験結果から問題ないことが分かった (3.添加回収試験を参照)。

3. 添加回収試験

枝豆に混合標準溶液を試料中濃度 0.02ppm (GC : バイアル中濃度 0.01ppm、LC : バイアル中濃度 0.005ppm) となるように添加し、Scheme1.に従い振とう条件①手強い、②手弱い、③振とう無について各 n=2、また①については添加位置を変えた A, B, C について各 n=1 で添加回収試験を行い、農薬の挙動を確認した。結果を Table1, 2 に示す。

3.1 振とう条件に違いによる塩析効果と農薬の挙動について

QuEChERS 法では勢い良く振って塩析を行うとなっているので、振とうの強さによって回収率に差が見られるのではないかと思っていたが、GC/MS 測定、LC/MS/MS 測定ともに、ほとんどの農薬で振とう条件①②③で大きな差は認められなかった。③は10秒ほど混合したのみで振とうしなかったもので、①②に比べて遠心分離後の塩の残り具合が均一ではなかったが、塩析の影響を受けやすそうな高極性農薬のアセフェートやメタミドホスなどでも①②③でほとんど同じ結果が得られた。しかし③では Carbaryl や Carbofuran などのカルバメート系農薬や Deltamethrin などのバラつきが大きく、これらの農薬は酸性条件下で安定だが、塩の混合が不十分な③では pH が酸性に安定せずバラつきが大きくなったのではないかと思われた。アルカリ条件下で不安定とされる Captafol、Captan、Dichlofluanid は、①②③のどの方法でも回収されなかった。またアルカリ条件下や照明下で不安定とされる Resmethrin は、分析日によってバラつきが見られた (①②③と①ABC は実験日が異なる)。

3.2 塩析操作によるロスの有無について

①の農薬の添加位置 (A,B,C) を変更して検討した結果、Captan、Dichlofluanid は振とう後に添加 (B) では回収されており、塩析時に分解したものと考えられた。また Bifenthrin や、Endosulfan、Quintozen、Silaflofen など LogPow が 5 以上ある

ような疎水性の高い農薬が、振とう前 (A) より振とう後に添加 (B) したほうが回収率がやや向上した。塩析により疎水性農薬の回収率が少し低下する原因としては、塩析時のアセトニトリル/水 (1:1) の比率と、今回用いた枝豆は脂性成分が多いためではないかと考えられたが、全体的な回収率から考えて問題ない範囲と思われた。一方で塩析の影響を受けやすそうな高極性農薬は回収率に差が認められなかった。測定前に添加した (C) 結果は、GC/MS 測定、LC/MS/MS 測定ともにほぼ 70~120%以内と、機器測定におけるマトリックス効果をあまり受けずに良好な結果が得られており、固相ミニカラムにより精製が十分に行われていることが証明できた。

アセフェートやメタミドホス、ジクロロポスなど高極性農薬は GC 法では固相 C18-50mg に逆相モードで保持されにくく回収率が悪かったが、これらを含む高極性農薬 26 成分は LC 法で分析できることが分かった。また LC/MS/MS で分析したこれらの農薬は、添加位置 (A,B,C) で違いは見られなかった。以上から、塩析操作によるロスはほぼないものと考えられた。

4. バッチ精製とミニカラム精製について

QuEChERS 法では抽出後、アセトニトリル抽出液に固相充填剤を直接粉の状態に混合して精製 (以下バッチ精製) を行う。同じ種類の充填剤 (C18、PSA、グラファイトカーボン) を用いてバッチ精製と固相ミニカラムによる精製 (以下ミニカラム精製) を比較したところ、ミニカラム精製のほうがより精製効果が高い結果が得られた。バッチ法とミニカラム法を比較検討した他の機関も同様の結果を述べている^{2),3),4)}。その理由として、バッチ精製では固相充填剤と試料溶液 (アセトニトリル抽出液) 中の成分が特異的に吸着することで精製が行われ、また異なる種類の充填剤に対して試料溶液は常にアセトニトリルであるため、それぞれの固相充填剤により良い条件で精製が行えない点が考えられる。一方、ミニカラム精製では特異的な吸着だけでなく固相と液相の間で分離分配が行われ、また試料溶液 (液相) をアセトニトリルだけでなく水や他の溶媒との混液としたり、固相に農薬をトラップさせることでアセトン/ヘキサン混液など他の溶液に転溶できるなど、それぞれの固相充填剤に対してより良い条件で精製を行うことができるため、バッチ精製よりも精製効果が高まると考えられた。そこで、振とう抽出後の精製はバッチ精製ではなくミニカラム精製を用いて検討を行った。

5. ミニカラム精製工程の自動化について

抽出後のミニカラム精製は、自動前処理装置 STQ-L200 を用いて GC 法および LC 法でそれぞれ分析を行った。ミニカラム精製では、精製効果を高めるために水や他の溶媒を用いて試料溶液の条件を変更するため、試料溶液しか用いないバッチ精製と比べて試料が希釈される。そのため、測定感度を上げるためには試料の濃縮が必要になるが、エバポレーターや窒素パージによる濃縮操作は時間がかかり、前処理の効率を下げる要因となる。そこで、試料の希釈により足りなくなる感度を GC/MS は大量注入により補うことで、ミニカラム精製を行いながら濃縮操作のない迅速な前処理法を確立した。LC/MS/MS は試料が希釈されても感度に問題はなかった。また試料の分取

量を少量にし（GC：0.5g 相当、LC：1g 相当）、充填量の少ない固相ミニカラムを用いることで溶媒使用量を減らし、前処理のスケールを小さくしたことにより自動化が可能になった。抽出後の精製工程は GC 法では 15 分/検体、LC 法では 10 分/検体で自動分析を行うことができた。

【まとめ】

今回、枝豆を用いて異なる振とう条件で塩析効果と農薬の挙動について違いが見られるかどうか検討を行った結果、もっとも影響が出ると思われた高極性農薬をはじめ、ほとんどの農薬で回収率に差が認められなかった。このことから、振とうの強さは塩析効果と農薬の分配に大きな影響はないものと考えられた。しかし、振とうが不十分な場合、一部の農薬でバラつきが見られたため、振とうの強弱にかかわらず 4 種の塩の溶解度合いなどの均一化は必要であると思われた。QuEChERS 法において、1 分間手で勢い良く振とうする作業は、検体数が多い場合は辛く感じる工程でもあったが、振とうの強弱が回収率に大きな影響を与えないことが分かった。しかしながら均一化は必要なため、再現性の良いデータを得るためには、振とう機などを用いて一定条件で振とうすることが好ましいと考える。今回は、枝豆のみ検討したため、今後は水分量の多い作物など他の作物でも同様の検討を行い、結果を確認していきたいと思う。

また、QuEChERS 法と固相ミニカラム精製を組み合わせることで、精製効果をより高めた濃縮操作のない迅速で簡便な多成分一斉分析法を確立することができ、抽出後 10～15 分/検体の精製工程の自動化も可能になった。

【参考文献】

- 1) Michelangelo Anastassides et al., J.AOAC Int.,86,412-431(2003)
- 2) M.Okimashi,Y.Kitagawa,et al., J Pesticide Sci., 30, 368-377(2005)
- 3) M.Okimashi,Y.Kitagawa,et al.,Food 1,101-110(2007)
- 4) 永井雄太郎ら、第 30 回農薬残留分析研究会講演要旨集、102-114