

食品中残留農薬分析における固相抽出法を用いた自動前処理装置の開発 -第2報-

株式会社アイスティサイエンス ○谷澤春奈, 佐々野僚一

【目的】食品中の残留農薬分析においてはポジティブリスト制度の導入以降、多種多様な食品と大幅に増加した農薬数に迅速に対応すべく、効果的かつ効率的な手法が求められている。前回演者らは、効率化を目指し、抽出操作以降の前処理操作の自動化について報告した。今回は自動前処理装置を用いた分析と手分析で精製効果の違いについて知見が得られたので報告する。

- 【方法】1. 自動前処理装置：STQ-L200，固相カートリッジ：SAIKA-SPE（アイスティサイエンス社製）
2. 検討作物：緑茶葉
3. 対象農薬：ポジティブリスト制度GC/MS対象268種（農薬混合標準液22, 31, 34, 48, 51, 関東化学

- 緑茶葉 2g + 水 10mL
 - ├ アセトニトリル 10mL
- ホモジナイズ
 - ├ 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
 - ├ 無水硫酸マグネシウム 4g
- 攪拌（手で振とう, 1分）
- 遠心分離（5分, 3000rpm）
 - ├ アセトニトリル層を50%アセトニトリル水で倍希釈

抽出液（75%アセトニトリル試験溶液）

【自動前処理装置】または【手分析】

- 分取 1mL（試料0.1g相当）
- 固相 C18-30mg（精製）
 - ├ 洗液 80%アセトニトリル水 1mL
- 下液
 - ├ 食塩水20mLを加え希釈
- 固相 PBC*-20mg（保持） *ポリマー-系コンビネーションカラム
- 乾燥（Heガス），手分析では吸引乾燥
- 連結固相 SI-30mg+PSA-30mg（精製）
 - ├ 溶出 アセトン/ヘキサン（15/85）または（3/7） 1mL
- 溶出液
 - ├ 添加 フェナトレンド体+PEG（300）
 - ├ アセトン/ヘキサン（3/7）で1mLに定容

GC/MS 大量注入（25 μ L：試料2.5mg相当）

Scheme 1. 試験溶液の調製法

社製），添加濃度：試料中0.1ppm

4. 測定条件：前回と同様（第97回日本食品衛生学会講演要旨参照p. 33）

【結果と考察】自動化装置と手分析の比較：抽出操作は共通で行い、同じ抽出液をscheme1.に従い自動前処理装置と手分析でそれぞれ前処理を行った。精製カラムにはカフェイン除去効果のあるシリカゲル（SI）と脂肪酸等の除去効果のあるPSAを用いた。それぞれのGC/MSスキャンクロマトグラムをFig.1に示す。溶出条件がアセトン/ヘキサン（15/85）の場合は自動化装置と手分析ともにカフェインが完全に除去できたが、アセトン/ヘキサン（3/7）の場合は自動化装置のほうがカフェインの除去効果があった。装置での加圧により固相の活性化が促され、手分析よりも精製効果が高まったためと考えられた。アセトン/ヘキサン（15/85）ではテトラオゾールなど一部の農薬がカラムから溶出されず回収率が低下する。自動化装置を用いることで、溶出力の高いアセトン/ヘキサン（3/7）を使用することができ、カフェインの妨害をほとんど受けず、上記農薬の回収率も向上し同時分析が可能になった。

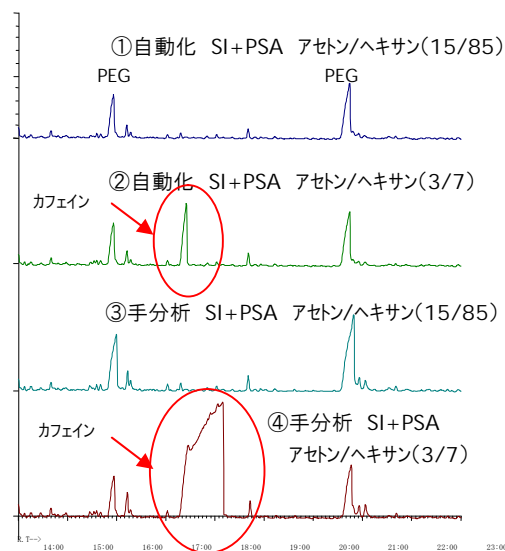


Fig.1. 緑茶のGC/MSスキャンクロマトグラム

食品中残留農薬分析における固相抽出法を用いた自動前処理装置の開発 -第2報-

株式会社アイスティサイエンス ○谷澤春奈 佐々野僚一

Q目的

食品中の残留農薬分析においてはポジティブリスト制度の導入以降、多種多様な食品と大幅に増加した農薬数に迅速に対応すべく、効果的かつ効率的な手法が求められている。前回報告は、効率化を目指し、抽出操作以降の前処理操作の自動化について報告した。今回、自動前処理装置を用いた手分析と併せて、緑茶葉の分析において精製効果の違いについて知見が得られたので報告する。

Q測定条件

自動前処理装置	STQ-L200 (AISTI Science)
使用溶媒	アセトン
	アセトン:ヘキサン (15:85)
	アセトン:ヘキサン (3:7)
	アセトン:水 (80:20)
	超純水 (オルガノジェン)
	食塩水 (1.0%)
乾燥ガス	ヘリウム (圧力 0.6MPa)

GC/MS	LVI-S200(AISTI Science) : Stomach Insert
PTV Injector	70°C-120°C/min-240°C-50°C/min-290°C(38min)
Solvent Purge Time	0.3 min
Auto Sampler	CombIPAL: 50 µL Syringe (AMR)
Injection Volume	25 µL
GC	Agilent 6890N
Column	ENV-MS, 0.25mm i.d. x 30m, df: 0.25mm
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(8.3min)
MS	JMS-Q1000GC(JEOL)
MS Method	SCAN: 70 - 400 m/z(8:30min~30:50min) SIM(30:50min~40:00min)

Q結果と考察

Fig.1 自動化装置と手分析のスクランクロマトグラムの比較

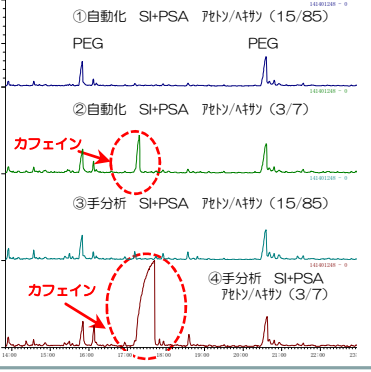
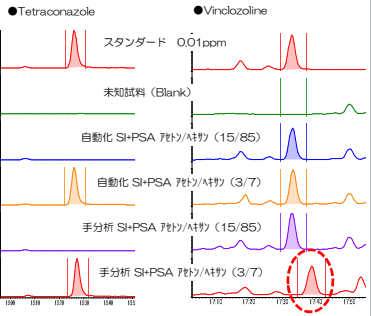
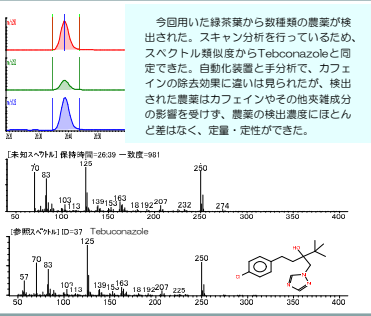


Fig.2 異なる溶出液媒によるカラムからの農薬溶出率の違い

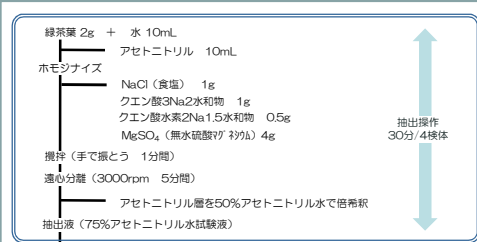


SH+PSAカラムからの溶出液媒が農薬に与える影響として、アセトン/ヘキサン(15/85)を用いた場合、カフェインは完全に除去できるが(Fig.1参照)、Tetraconazoleなど一部の農薬がカラムから溶出されなくなる(左図)。溶出の高いアセトン/ヘキサン(3/7)を用いるとこれらの農薬はカラムから溶出されるが、手分析の場合、カフェインも大量に溶出されるため、Vinclzolineなどカフェインと保持時間が近い農薬は影響を受け、保持時間がずれる現象が見られた(右図)。

Fig.3 緑茶葉からの抽出農薬の特定 (Tebuconazole)



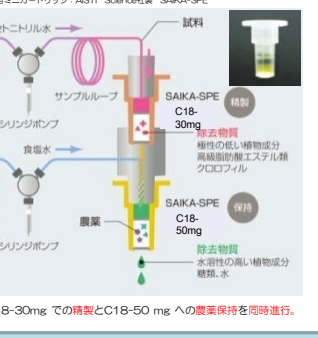
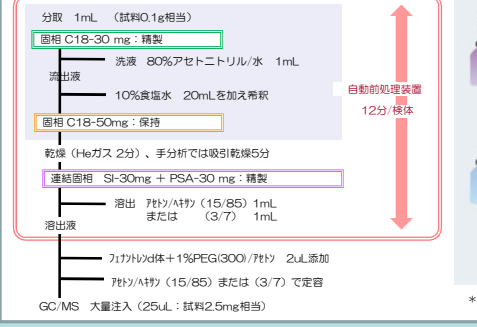
Q前処理フロー (試料: 緑茶葉)



●試料: 緑茶葉
●対象農薬
ポジティブリスト制度GC/MS対象268種
農薬混合標準液22,31,34,48,51
(関東化学社製)

各試薬を計量スプーンで添加

【自動前処理装置】または【手分析】



緑茶葉を用いて、抽出操作は共通で行い、同じ抽出液を上記フローに従い自動前処理装置と手分析で前処理を行った。精製カラムにはカフェイン除去効果のあるシリカゲル(S)と脂肪族等の除去効果のあるPSA(アノオン交換カラム)を用いた。それぞれのGC/MSトータルスクランクロマトグラムをFig.1に示した。抽出条件がアセトン/ヘキサン(15/85)の場合は、自動化装置と手分析ともカフェインが完全に除去できたが(①と③)、アセトン/ヘキサン(3/7)の場合は、自動化装置のほうがカフェイン除去効果が高かった。これは、装置での加圧による固相中のエア抜きが促進されることで固相の活性化が促され、手分析よりも精製効果が高まったと考えられた。

Table 1. 緑茶葉を用いた添加回収試験 (自動前処理装置と手分析の比較) 一部抜粋

農薬名	自動前処理装置 (3/7)				手分析 (3/7)						
	回収率 (%)	検出率 (%)	検出限界 (ppm)	検出率 (%)	回収率 (%)	検出率 (%)	検出限界 (ppm)	検出率 (%)			
1 Acephate	0	107	0	0	107	0	109	16	6	124	
2 Acetamiprid	0	115	0	0	100	0	110	0	0	106	
3 Acetochlor	95	2	105	0	90	92	88	92	96	2	107
4 Azinphos	110	8	139	0	111	89	107	89	84	117	94
5 Atrachlor	104	4	109	0	92	97	90	91	101	3	109
6 Atrazine	170	5	182	0	173	168	185	17	200	97	104
7 Atrazine-3,6	97	5	104	0	78	96	89	95	84	104	94
8 Atrazine-3,6	90	5	108	0	78	98	86	108	73	4	112
9 Azinphos	102	3	108	0	82	93	106	110	84	5	113
10 Azinphos	80	6	102	0	82	91	73	97	75	6	103
11 Azinphos-2	76	12	112	0	64	76	87	99	89	9	113
12 Azinphos-3	87	7	112	0	85	101	96	111	5	121	102
13 Azinphos-4	89	6	104	0	88	102	94	101	100	4	107
14 Atrazine	71	7	113	0	54	96	95	103	100	0	112
15 Azinphos	84	6	105	0	80	97	97	94	0	108	106
16 Azinphos-Methyl	128	4	129	0	64	95	123	125	48	8	114
17 Benalaxyl	101	3	105	0	92	94	96	96	100	3	108
18 Bentazocarb	44	10	117	0	22	108	118	128	47	11	108
19 Bentazocarb	78	6	111	0	76	99	92	104	93	4	108
20 Bentazocarb	111	4	113	0	94	97	101	105	100	3	108
21 Benzocarb	94	6	102	0	77	99	103	95	93	1	110
22 BHC-alpha	90	4	106	0	82	97	95	99	96	4	109
23 BHC-beta	85	2	99	0	84	94	92	97	93	4	105
24 BHC-gamma	104	7	114	0	77	99	103	98	94	0	109
25 BHC-gamma	88	5	94	0	79	89	76	85	82	3	106
26 Bifenox	99	17	124	0	81	95	98	106	95	3	112
27 Bifenox	92	11	75	0	67	97	102	103	85	3	112
28 Bifenox	145	8	153	7	2	95	149	155	2	207	107
29 Bifenox	105	10	105	0	4	109	114	0	0	108	108
30 Bromofenox	7	6	105	0	7	95	94	7	4	7	112
31 Bromofenox	101	3	108	0	94	99	93	97	102	4	113
32 Bromofenox	80	5	104	0	71	98	93	98	94	0	108
33 Bromofenox-ethyl	72	5	104	0	66	94	84	99	88	4	106
34 Bromopropylate	85	4	109	0	74	97	102	98	94	0	110
35 Bupirimate	96	6	108	0	102	102	102	102	102	0	107
36 Bupirimate	204	4	224	97	191	210	202	207	209	3	231
37 Butan(TCMB)	112	8	142	0	75	113	87	122	66	7	120
38 Butachlor	96	4	109	0	90	95	101	100	92	4	106
39 Butachlor	82	7	99	0	78	88	87	90	91	3	106
40 Butylate	84	6	103	0	76	90	90	95	97	5	108
41 Butylate	41	113	104	0	37	105	91	110	0	114	
42 Cafenstrolol	130	20	122	0	37	100	114	114	20	14	114
43 Captan	89	8	108	0	49	91	84	96	95	2	99
44 Captan	0	0	0	0	16	101	87	90	30	4	114
45 Carbaryl	76	12	142	0	16	99	145	178	0	86	105
46 Carbaryl	32	12	107	0	16	101	87	90	30	4	114
47 Carbaryl	58	11	114	0	44	102	86	114	57	6	117
48 Carfentrazon-ethyl	97	4	108	0	94	99	99	101	104	2	111
49 Chlorobenzilate	75	4	103	0	71	101	84	102	90	4	110
50 Chlorobenzilate	88	4	101	0	102	112	115	101	3	130	110
51 Chloroxyphos	78	7	101	0	78	99	92	104	95	4	110
52 Chloroxyphos	447	5	464	339	478	480	469	545	2	557	478
53 Chlorpyrifos	100	3	116	0	89	101	113	120	107	13	117
54 Chlorpyrifos-E	106	7	107	0	97	98	93	97	77	9	97
55 Chlorpyrifos-Z	96	3	103	0	81	94	90	92	77	3	106
56 Chlorobenzilate	94	3	111	0	84	99	99	104	101	3	112
57 Chlorobenzilate	98	5	105	0	89	92	86	95	92	2	105
58 Chlorobenzilate	98	3	105	99	89	92	86	95	92	2	105
59 Chlorpyrifos	83	6	113	0	78	101	95	105	100	3	114
60 Chlorpyrifos-methyl	90	4	110	0	84	101	112	121	98	3	112
61 Chlorpyrifos	91	4	109	0	90	95	101	100	94	2	110
62 Clodan-ethyl	96	5	118	0	84	101	103	104	104	3	114
63 Clomazone	101	4	109	0	90	95	101	100	94	2	110
64 Cypermethrin	23	16	115	0	0	103	94	114	0	0	117
65 Cyanothiazole	101	4	104	0	91	94	91	98	96	3	109
66 Cyfluthrin-1	213	28	208	110	96	113	237	237	98	6	113
67 Cyfluthrin-2	95	7	127	0	67	97	102	111	99	5	108
68 Cyfluthrin-3	80	7	110	0	66	94	98	106	92	4	106
69 Cyfluthrin-4	79	7	108	0	71	94	83	94	88	6	98
70 Cyhalothrin-butyl	91	4	110	0	82	93	104	101	105	4	108
71 Cyhalothrin-1	92	7	123	0	73	99	102	109	103	5	114
72 Cyhalothrin-2	72	7	108	0	69	96	95	105	106	6	106
73 Cypermethrin-1	83	6	115	0	69	98	95	100	91	3	111
74 Cypermethrin-2	96	7	121	0	77	100	112	119	109	5	120
75 Cypermethrin-3	85	6	112	0	64	89	91	100	92	4	106
76 Cypermethrin-4	85	7	112	0	69	96	94	101	97	3	108
77 Cypermethrin-5	96	3	112	0	16	100	84	94	13	8	112
78 Cypermethrin	83	6	110	0	67	96	97	105	96	4	110
79 DCPA	89	4	104	0	81	95	95	98	98	4	108
80 DDE-p,p'	103	4	110	0	88	100	99	104	103	3	116
81 DDE-p,p'	63	6	105	0	57	95	73	96	78	4	107
82 DEF(Trifluoromethyl)	81	5	110	0	69	94	95	104	99	8	110
83 Deltamethrin	83	6	109	0	65	99	97	105	96	4	110
84 Deltamethrin-S-methyl	33	5	111	0	18	106	93	117	25	20	121
85 Deltamethrin-S-methyl	84	5	107	0	82	104	95	102	100	3	114
86 Deltamethrin-S-methyl	87	6	111	0	88	100	99	104	103	3	116
87 Dieldrin	93	3	111	0	87	100	88	99	98	3	114
88 Dichlorofenanthrene	80	5	105	0	77	104	91	101	94	4	110
89 Dichlorofenanthrene	0	0	0	0	67	0	61	0	0	0	92
90 Dichlorobenzotrifluoride	88	4	110	0	79	99	100	107	98	6	113

Table 2. 緑茶葉を用いた添加回収試験の回収率分布

農薬名	自動前処理装置 (3/7)				手分析 (3/7)			
	回収率 (%)	ND_0-50	50-70	70-120	120-単位	合計		
アセトン/ヘキサン (3/7)	33	15	236	13	297			
アセトン/ヘキサン (15/85)	19	8	255	15	297			

※回収率 120%以上の成分は、7成分検出されなかったため省略。

まとめ

自動前処理装置を用いることで、装置での加圧により固相ミニカラムの活性化が促され、精製効果が高まったことがわかった。その結果、緑茶葉の分析において、SH+PSAからの溶出液媒による高いアセトン/ヘキサン(3/7)を使用することができ、カフェインの除去をほとんど行なうことなく、236成分/297成分中が70~120%の良好な回収率が得られた。また自動化の長所の一つである再現性(n=5)も、255成分/297成分中(約86%)がRSD10%未満と良好な結果が得られた。

手分析でもアセトン/ヘキサン(3/7)を用いた場合、回収率は良好な結果が得られたが、大量のカフェインがGC/MSに導入されるため、機器の負荷を考えると、手分析の場合は回収率が低下する農薬は増加するが、アセトン/ヘキサン(15/85)を用いることが好ましいと考える。