

4層カラムを用いた二段階溶出による残留農薬分析法の検討

～LC分析農薬を対象として～

Analysis Method of Pesticide Residue by Two Step Elution Using 4-phase Column ～For LC analysis pesticides～

姉齒 健太郎 新貝 達成 千葉 美子 大槻 良子

Kentaro ANEHA, Tatsunari SHINGAI, Yoshiko CHIBA, Ryoko OTSUKI

LC分析対象農薬の一斉分析法において、これまで採用してきた方法は感度の低さや試験液に色素等が溶出してしまうなどの問題があった。それらの問題点を改善すべく、4層カラムを用いた二段階溶出による精製法を検討した。精製後に濃縮操作の追加及び固相カラムにグラファイトカーボンを追加した。また同時に精製に最適な溶媒量を検討した。一部の試料から色素や脂肪酸の溶出が見られたが、その影響は小さく、アセトニトリル/トルエン(3:1)2.5mL、2%ギ酸アセトニトリル 2.5mLでの溶出で分析対象とした162農薬のうち、約90%の農薬で回収率70～120%を満たすことを確認した。

キーワード：残留農薬；一斉分析；液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計

Key words：Pesticide Residue；STQ；QTOFMS

1 はじめに

LC-MS/MSによる農産物中の残留農薬検査は、厚生労働省から「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I及びII(農産物)」(以下「通知法」)が通知されている。しかし、通知法は前処理に時間を要することから、これまで当所では操作がより簡便なSolid Phase Extraction Technique with QuEChERS method(STQ法：アイスティサイエンス(株))の変法を採用していた。この方法は溶出後の濃縮操作を必要としない分感度が低く、また、精製カラムにグラファイトカーボンを使用していなかったため、農産物の種類によっては試験液に色素が溶出してしまうなどの問題があった。

今回それらの問題点を改善するため、精製方法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

表1に示す有機栽培もしくは農薬8割減栽培の試料を予冷式ドライアイス凍結粉碎法¹⁾で処理した後、用いた。

2.2 分析対象農薬

富士フィルム和光純薬(株)製農薬混合標準液 PL-7-2, PL-8-1, PL-14-2, PL-15-1, PL-16-2, PL-17-2を使用

した。(168成分、165農薬のうち162農薬を対象。)

2.3 試薬等

試薬類はアセトニトリル300(残留農薬試験用；関東化学(株)製)、トルエン(残留農薬試験用；関東化学(株)製)、ギ酸(LC-MS用；富士フィルム和光純薬(株)製)を使用した。QuEChERS法試薬はQ-sep QuEChERS抽出塩(European EN 15662；RESTEK(株)製)を使用した。

固相カラムは、InertSep LSC C18/GC/SAX/PSA(100/50/100/100mg；ジーエルサイエンス(株)製カスタムメイド固相)(以下「4層カラム」)を使用した。

2.4 装置及び測定条件

装置及び測定条件を表2に示す。

2.5 試料溶液の調製

抽出方法は抽出フローの通りに行った(図1参照)。なお、ブルーベリーは5N-NaOHを適量添加して試料のpHを6～7とした後、抽出を行った。今回は精製効率を確認するため、抽出液に農薬標準液を抽出液中濃度12.5ppbになるように添加後、20mLに定容したものを抽出液とした。検討した精製方法を図2、従来の精製方法を図3に示す。精製に最適な溶媒量を検討するため、各試料の試料液1mLをコンディショニングした4層カラ

表1 使用した試料と試料区分

試料区分	試料
葉緑素を多く含む試料	ほうれんそう
硫黄化合物を含む試料	キャベツ
でん粉を多く含む試料	とうもろこし
果実	ブルーベリー

表2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ	SCIEX Exion LC/MS ADシステム
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8µm 2.1×100mm(Waters(株)製)
移動層A	5mM酢酸アンモニウム水溶液
移動層B	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: 10%(0min)→50%(2min)→80%(11min)→98%(12.5min→14min)
流速	0.3mL/min
注入量	5µL
カラムオープン	40°C
質量分析計	SCIEX X500R QTOFシステム
イオン化法	ESI法
測定モード	IDA(Information Dependent Acquisition)

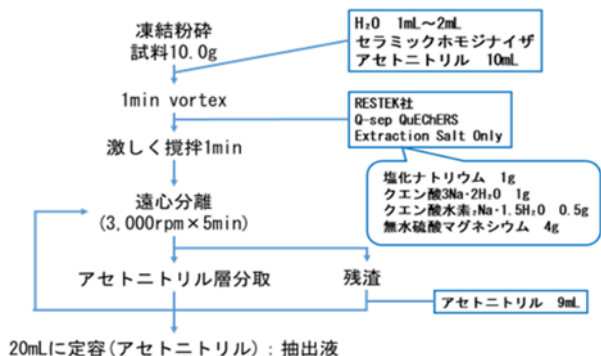


図1 抽出フロー

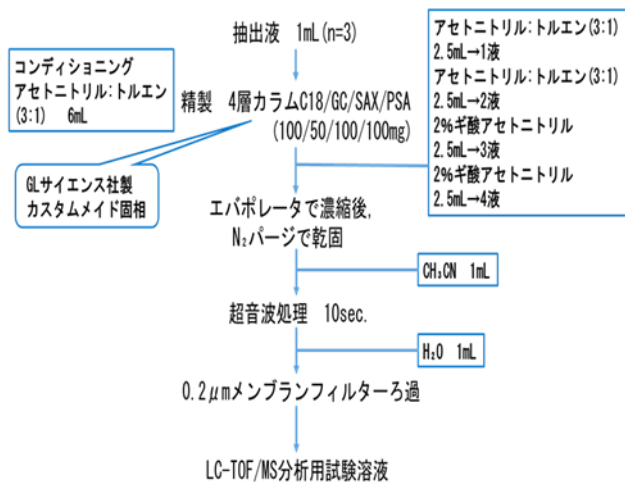


図2 検討した精製フロー

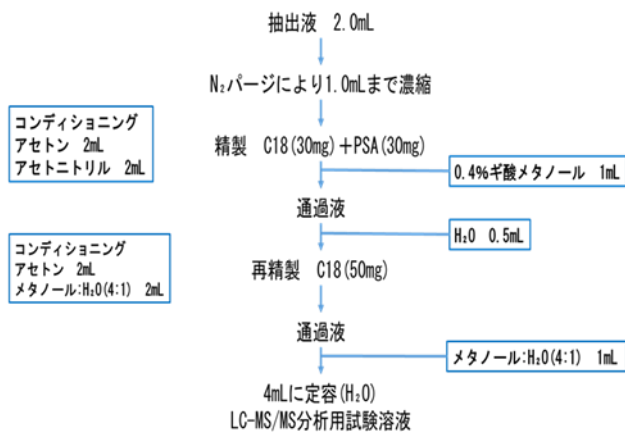


図3 従来の精製フロー

ムに通液し、アセトニトリル/トルエン(3:1)2.5mLで2回、(アセトニトリル/トルエン(3:1)による1回目の溶出液を1液、2回目の溶出液を2液)、2%ギ酸アセトニトリル2.5mLで2回(2%ギ酸アセトニトリルによる1回目の溶出液を3液、2回目の溶出液を4液)により溶出した。

3 結果

3.1 精製後の溶出液

1液では色素の溶出は見られなかった。2液ではほうれんそうから色素の溶出が見られた(図4参照)。3液ではほうれんそうとブルーベリーから色素の溶出が見られ

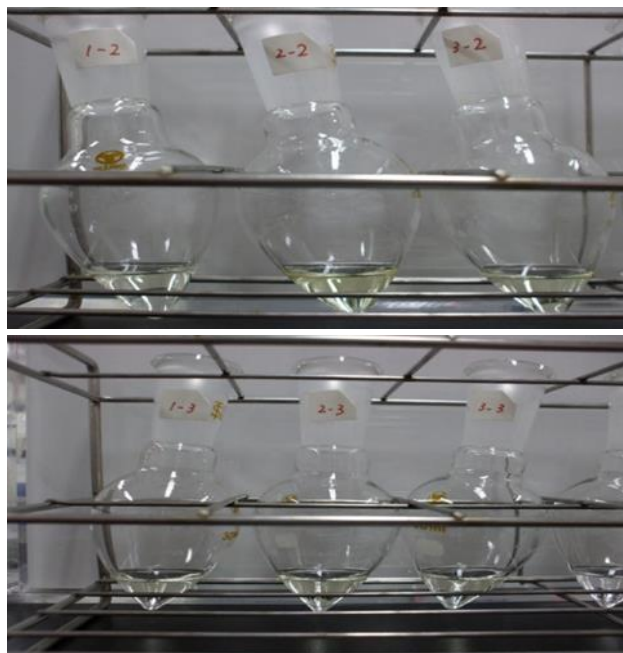


図4 ほうれんそうの溶出液
(上段：2液，下段：3液)

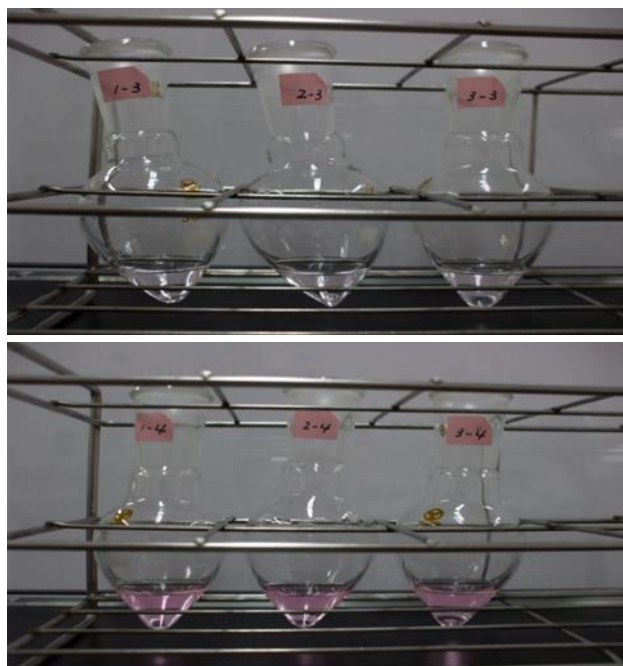


図5 ブルーベリーの溶出液
(上段：3液，下段：4液)

た(図4及び図5参照)。4液ではブルーベリーから色素の溶出が顕著に見られた(図5参照)。全液を通してキャベツ及びとうもろこしでは色素の溶出は見られなかった。

3.2 回収率

1液から4液の回収率の結果を表3に示す。(各試料(n=3)の平均より表作成。上段：回収率70~120%を満たした農薬数，下段：分析した農薬のうち、回収率70~120%を満たした農薬数の割合)

いずれの試料においても、大部分が1液及び3液から回収され、2液及び4液から回収される農薬はほとんど確認されなかった。また妥当性評価ガイドライン²⁾に示す真度等の目標値(回収率70~120%)を満足した農薬数を1液及び3液の合計と1液から4液の全液合計で比

較した結果を表4に示す。(上段：回収率70~120%を満たした農薬数, 下段：分析した対象農薬のうち, 回収率70~120%を満たした農薬数の割合)

162農薬のうち, 1液から4液の全液合計でほうれんそうでは93.2%(151農薬), キャベツでは92.6%(150農薬), とうもろこしでは98.1%(159農薬), ブルーベリーでは91.4%(148農薬)が回収率70~120%を満たした。一方で, 1液及び3液の合計でほうれんそうでは88.3%(143農薬), キャベツでは89.5%(145農薬), とうもろこしでは96.9%(157農薬), ブルーベリーでは87.7%(142農薬)が回収率70~120%を満たし, 1液から4液の全液合計と比較して回収率を満たす農薬数は多少減少するものの, 大きな差は見られなかった。

3.3 マトリックス

マトリックスの影響を確認するため, 各試料のブランクについてスキャン分析を行った。ポジティブモード測定では, 1液から4液いずれも農薬標準よりもアバンダンスが低かったものの, ほうれんそうの3液から農薬以外のピークが検出された。ネガティブモード測定では1液から4液全てでミリスチン酸などの脂肪酸が検出された。またポジティブモード測定と同様にほうれんそうの3液から農薬以外のピークが検出された。検出された農薬以外のピークについてライブラリ検索を行ったものの, 脂肪酸以外に合致したものはなかった。LCにおいて脂肪酸のマトリックス効果はイオ

ン化抑制に働き, 見かけ上の回収率が低下するとされているが, 今回の結果では回収率は良好であり, 脂肪酸によるマトリックス効果の影響は少なかったと考えられる。

4 まとめ

4層カラムを用いた二段階溶出による残留農薬分析法を検討した結果, アセトニトリル/トルエン(3:1)2.5mL, 2%ギ酸アセトニトリル 2.5mLでの溶出で対象農薬の約90%を分析できることを確認した。脂肪酸や色素の溶出が見られた試料もあったが, 分析結果に大きく影響するほどのマトリックス効果は確認されなかった。ほうれんそうにおいても, 農薬以外のピークが検出されたものの, 回収率が著しく低下することはなかった。今後は抽出操作も含めて試験法を検討していく予定である。

5 参考文献

1) 株式会社アイスティサイエンス. “STQ法ガイドブック2021”

<http://www.aisti.co.jp/wp/wp-content/uploads/2021/07/stqguidebook2021.pdf>

2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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の一部改正について」(平成22年12月24日食安発1224第1号)

表3 各分画の回収率

	ポジティブモード測定(147農薬)				ネガティブモード測定(15農薬)				合計(162農薬)			
	1液	2液	3液	4液	1液	2液	3液	4液	1液	2液	3液	4液
ほうれんそう	98農薬 66.7%	1農薬 0.7%	33農薬 22.4%	0	4農薬 26.7%	0	6農薬 40.0%	0	102農薬 63.0%	1農薬 0.6%	39農薬 24.1%	0
キャベツ	100農薬 68.0%	1農薬 0.7%	32農薬 21.8%	1農薬 0.7%	4農薬 26.7%	0	10農薬 66.7%	0	104農薬 64.2%	1農薬 0.6%	42農薬 25.9%	1農薬 0.7%
とうもろこし	106農薬 72.1%	0	37農薬 25.2%	0	4農薬 26.7%	0	10農薬 66.7%	0	110農薬 67.9%	0	47農薬 29.0%	0
ブルーベリー	102農薬 69.4%	0	27農薬 18.4%	0	4農薬 26.7%	0	9農薬 60.0%	0	106農薬 65.4%	0	36農薬 22.2%	0

表4 回収率の比較

	ポジティブモード測定(147農薬)		ネガティブモード測定(15農薬)		合計(162農薬)	
	1液+3液	全液	1液+3液	全液	1液+3液	全液
ほうれんそう	132農薬 89.8%	140農薬 95.2%	11農薬 73.3%	11農薬 73.3%	143農薬 88.3%	151農薬 93.2%
キャベツ	131農薬 89.1%	136農薬 92.5%	14農薬 93.3%	14農薬 93.3%	145農薬 89.5%	150農薬 92.6%
とうもろこし	143農薬 97.3%	145農薬 98.6%	14農薬 93.3%	14農薬 93.3%	157農薬 96.9%	159農薬 98.1%
ブルーベリー	129農薬 87.8%	135農薬 91.8%	13農薬 86.7%	13農薬 86.7%	142農薬 87.7%	148農薬 91.4%