

残留農薬分析における前処理方法の検討について

橋口 祥子、林 由美^{※1}、衛藤 加奈子、岡本 盛義、高橋 尚敬、二宮 健、長谷川 昭生

Study of Pretreatment Method in Pesticide Residue Analysis

Shoko Hashiguchi, Yumi Hayashi, Kanako Eto, Moriyoshi Okamoto
Naotaka Takahashi, Takeshi Ninomiya, Akio Hasegawa

Key Words : 残留農薬 pesticide residue, 前処理 pretreatment method

要 旨

当センターではガスクロマトグラフ質量分析装置（以下、「GC-MS」）および高速液体クロマトグラフ質量分析装置（以下、「LC-MS/MS」）の2種類の分析機器を用いて、厚生労働省が通知している一斉分析法に従い、約250種類の残留農薬について検査を行っている。食生活の多様化により輸入農作物や加工食品が多くなった今般、さらに多種多様な食品に含まれる数多くの農薬分析が必要となり、簡便で迅速な一斉分析法が求められる。

このことから、迅速簡易な前処理方法¹⁾であるQuEChERS法等を参考に残留農薬の抽出及び一部精製方法の検討を行った。この結果、GC-MSにおいて農薬の回収率の改善、器具準備及び前処理時間の短縮、試薬使用量の減少等に伴うコストの削減が可能になった。また、今回の検討法により、数次加工食品についても添加回収試験を行ったところ、80%~108%と非常に良好な結果が得られた。

はじめに

平成18年のポジティブリスト制度の導入に伴い、残留農薬の分析は、一度に多数の農薬を分析する一斉分析法が広まった。また、食生活の多様化に伴う輸入食品及び加工食品の増加により、多種多様な食品の分析が要求されるようになった。

当センターは、厚生労働省が示している「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」（以下、「現行法（GC）」）および「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（以下、「現行法（LC）」）により、残留農薬の試験検査を行っている。検量線には、マトリックス検量線を採用しているため、食品の種類が増加に伴い、操作検体数が増大する。このため、多種多様な食品の、迅速な一斉分析法が求められている。

そこで、現在使用している試薬等を変更または追加することなく、迅速簡易かつ広範囲に適用可能な一斉分析法を、QuEChERS法を参考に検討した。

材料および方法

1 試料および試薬

試料は過去5年間で最も収去頻度が高いだいこん及び冷凍加工食品9種類を用いた。

GC-MSを用いた検査について、試薬は標準品および混合標準品として、食品分析用、残留農薬試験用を使用した。標準原液はアセトン：ヘキサン(1：1)を用いて、1000 μ g/mL若しくは500 μ g/mLに調整した。混合標準原液は、アセトン：ヘキサン(1：1)を用いて1 μ g/mLに調製した。有機溶媒については、残留農薬分析用を使用した。その他の試薬については、特級を使用した。

LC-MS/MSを用いた検査について、試薬は標準品および混合標準品として、食品分析用、残留農薬試験用、LC/MS用、HPLC用を使用した。標準原液は、メタノールを用いて、100 μ g/mLに調製した。混合標準原液は、メタノール：水(1：1)を用いて、1.0 μ g/mLに調整した。有機溶媒については、残留農薬分析用およびLC/MS用を使用した。その他の試薬については、特級を使用した。

※1 福祉保健部豊肥保健所

2 方法

2.1 装置と測定条件

測定機器はAgilent Technologies社製GC部6890N、MS部5975MSDのガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）、およびAgilent Technologies社製1200 seriesおよび6460のタンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ（LC-MS/MS）を用いた。測定に係るカラム等の測定条件は表1のとおりとした。

使用する水はすべて当センターが所有する超純水製造装置から採水した超純水を使用した。

試料の精製を目的として、GL-Sciences社製GL-Pak GC/PSAカラム（以後、「GC/PSAカラム」）、同社製GL-Pak SAXカラム（以後、「SAXカラム」）、Waters社製Sep-pak C18カラム（以後、「C18カラム」）およびMillipore社製フィルターDISMIC-13HP020 ANを使用した。

2.2 検量線の作成

検量線用標準溶液は、GC-MSで0.04、0.1、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、LC-MS/MSで0.002、0.005、0.01、0.02、0.03 $\mu\text{g/mL}$ となるよう調製した。いずれもマトリックス検量線を採用した。GC-MSについては、測定対象農薬を含有していないことを確認済みの試料の

前処理最終段階でアセトン：ヘキサン1mLを添加するところ、各検量線用標準溶液を1mL添加することにより作成した。LC-MS/MSについては、HPLC注入プログラムにより、測定対象農薬を含有していないことを確認済みの試料を、各濃度の検量線用標準溶液に等量混合する方法により作成した。

2.3 試料溶液の調製

現行法に従い、フードプロセッサーにより細切、均一化した試料10.0gを50mL遠沈管に量りとり、抽出用アセトニトリル10mLを添加し、2分間ホモジナイズした。その後、M. Anastassiadesらが提唱したQuEChERS法を参考に、塩化ナトリウム1.0g、クエン酸三ナトリウム二水和物1.0g、クエン酸水素二ナトリウムセスキ水和物0.5g、無水硫酸マグネシウム4.0gを加え、1分間激しく振とうし、3000rpm、5分で遠心分離を行った。上澄み液を分取し、適宜固相カートリッジカラムによる精製を行い、濃縮後、GC-MSにおいてはアセトン：ヘキサン（1：1）を添加、LC-MS/MSにおいてはメタノール：水（1：1）を添加、溶解したものを試験溶液とした。（図1参照）

表1 GC-MSおよびLC-MS/MSの測定条件

GC-MS条件	
カラム	Agilent J&W GC Columns HP-5MS (0.250mm i.d. × 30m、膜厚0.25 μm)
昇温条件	50°C(1min)→25°C/min(0min)→10°C/min→300°C(10min)
注入口温度	250°C
注入量	2 μL (パルスドスプリットレス)
キャリアーガス	He (コンスタントフローモード)
MSイオン源温度	230°C
イオン化法	Electron Ionization(ED)法
イオン化電圧	70eV
四重極温度	150°C
測定モード	ScanおよびSelective Ion Monitoring(SIM)モード
LC-MS/MS条件	
カラム	L-column ODS (2.1mm i.d. × 150mm、5 μm 、財団法人化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
移動相	A液 0.05%ギ酸水溶液 B液 0.05%ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント条件	B液：25%(1min)→95%(12min)→95%(13min)→25%(0.2min)→25%(4.8min)
注入量	4 μL
流量	0.2mL/min
イオン化法	ESI+
測定法	MRM
キャピラリー電圧	3500V

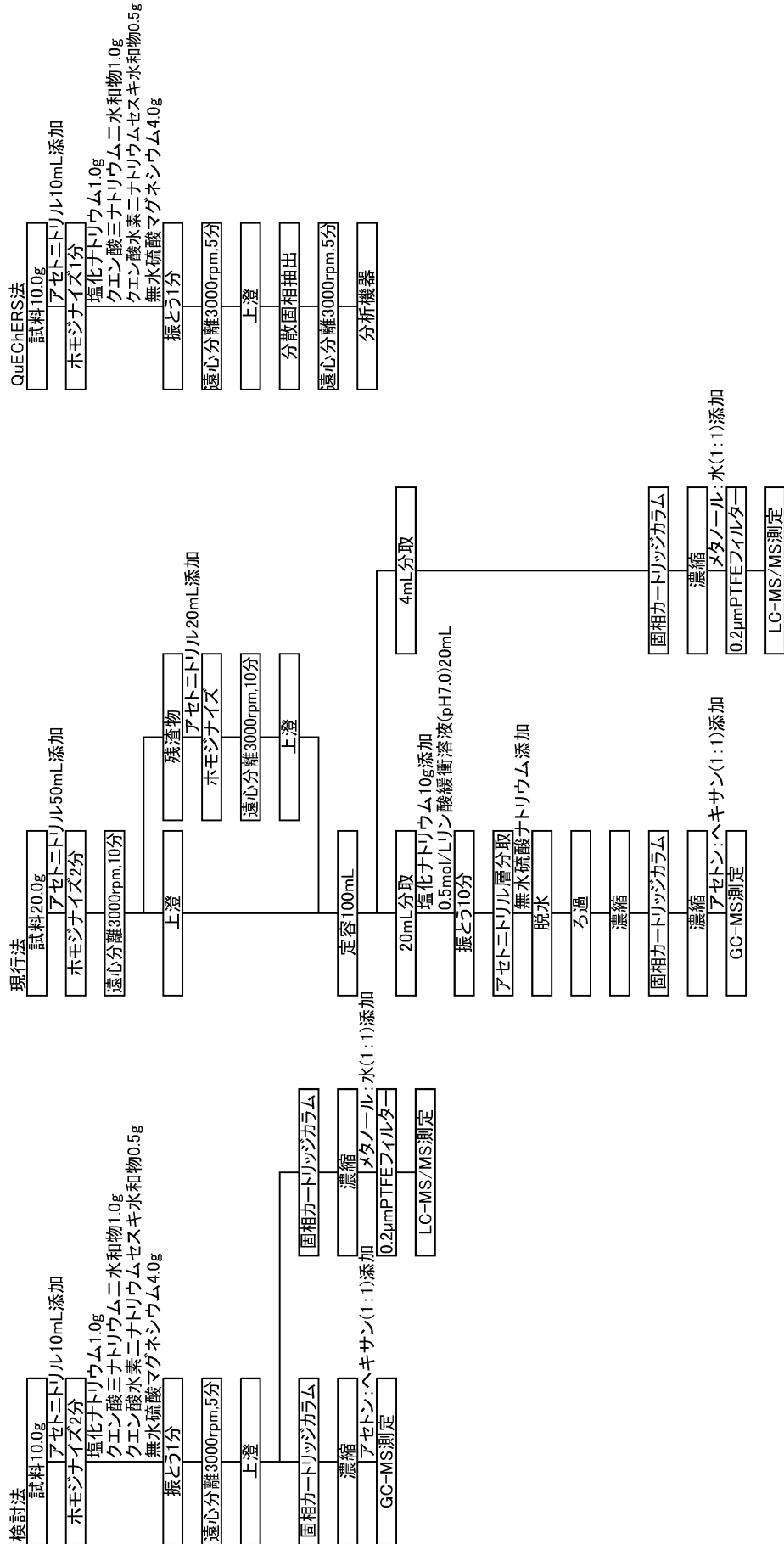


図1 各前処理のフローの比較

結果と考察

1 結果

1.1 LC/MS/MSの移動相の検討

現行法では5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液および5mmol/L酢酸アンモニウム-アセトニトリル溶液によるグラジエント分析を行っていた。移動相として、0.05%ギ酸水溶液およびアセトニトリルを使用する頻度が多いことから、安定化の時間を短縮する目的で、0.05%ギ酸水溶液および0.05%ギ酸-アセトニトリル溶液で検討を行った。0.05%ギ酸水溶液および0.05%ギ酸-アセトニトリル溶液を移動相として使用したものについて、同等あるいは同等以上の添加回収試験の結果が確認されたので、以降この移動相で分析を行った。

1.2 抽出および一部精製操作の検討

QuEChERS法を参考にして、前処理方法の検討を行った。QuEChERS法の分散固相抽出を、現行法で使用している固相カートリッジカラムを用いた精製方法に変更したものを、検討法とし、添加回収試験を実施し、現行法と比較を行った。(図2)

この結果、GC-MSによる検討法は現行法に比べ、添加回収結果が良好な農薬成分が増加し、前処理時間の短縮、試薬及び溶媒の削減、使用器具の削減等、非常に良好な結果が得られた。

LC-MS/MSによる検討法は、現行法に比べて添加回収結果が良好な農薬成分の増加、使用溶媒の削減等、良好な結果が得られた。

このことから、以降この方法で抽出および一部精製操作を行うこととした。

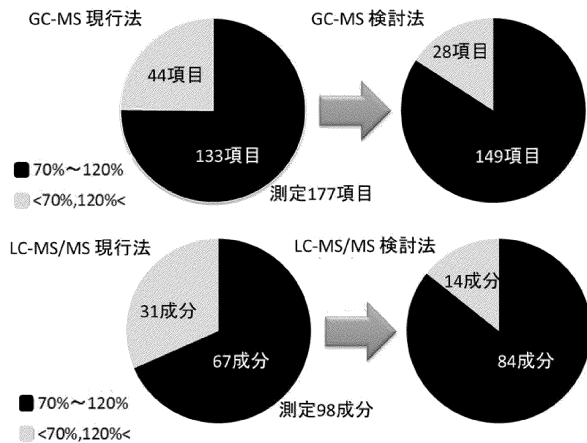


図2 現行法および検討法の添加回収率比較

1.3 カートリッジカラムによる精製の検討

GC/PSAカラムの試料溶液負荷量 (GC: 2mLまたは4mL, LC: 1mLまたは2mL) 及び溶出溶液量 (GC-MS: 5、10、20、25mL, LC-MS/MS: 5、10、15、20mL) を検討した。(図3、図4-1、図4-2)

GC-MSについて、GC/PSAカラムへの試料溶液アプライ量は2mLと4mLで比較を行った。

結果、回収率の差はあまり見られなかったが、ピークの形状が4mLの方が良好であった。また、溶出溶液量は5ml及び10mlの回収率に比べて、20mL及び25mLの回収率は良好であった。溶出溶液量20mLと25mLについては、差が見られなかった。

従って、検討法では使用溶媒削減のため、溶出溶液量は20mlとした。

LC-MS/MSについて、GC/PSAカラムへの試料溶液アプライ量は1mLと2mLで比較を行った。

結果2mLで良好であった。また、溶出溶液量は5mL及び10mLの回収率に比べて、15mL及び20mLの回収率は良好であった。溶出溶液量15mLと20mLについては、差が見られなかった。しかし、回収率が改善される可能性のある成分が、溶出溶液量20mLの方が多かったことから、溶出溶液量は20mlとした。

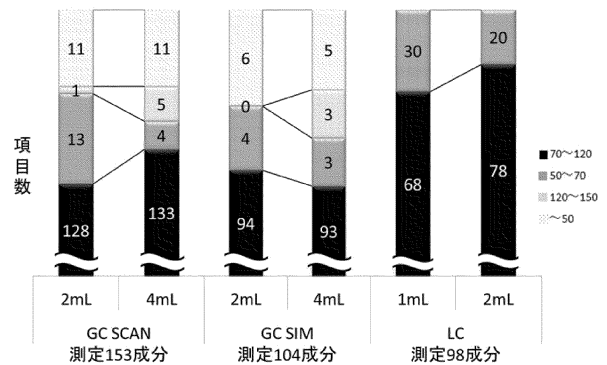


図3 試料溶液アプライ量の検討

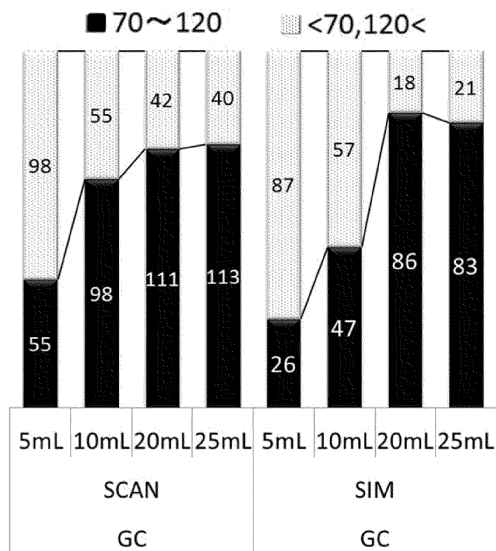


図4-1 GC-MSにおける溶出溶液量の検討

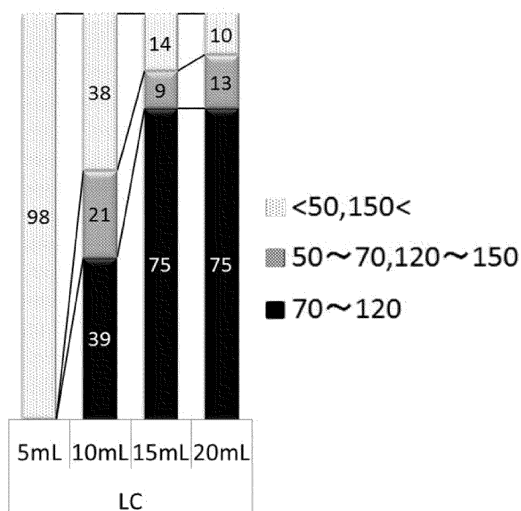


図4-2 LC-MS/MSにおける溶出溶液量の検討

1.4 夾雑が少ない試料を用いた検討

試料として、過去5年間で最も収去頻度の多いだいこんを用いて、検体数5の並行試験を現行法と検討法で実施し、結果書に記載可能な項目数の比較を行った。結果、検査項目246項目中、現行法183項目、検討法210項目であった。一方、LC-MS/MSにおいて、重要項目であるチアベンダゾール、メタミドホス、アセフェートについて、回収率が低下した。時間の短縮および溶媒等のコスト削減について、LC-MS/MSを用いた検討法では顕著な結果が得られなかったことから、以降GC-MSについてのみ検討を行うこととした。

1.5 数次加工食品を用いた検討

当センターでは、平成26年1月に発生した冷凍食品のマラチオン混入事件を受けて、平成25年3月26日付事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」（以後、「事務連絡法」）に準じて有症状冷凍食品のマラチオンの検査を行った。これに伴い、新たな試薬の購入や事務連絡法の検討等に多大な時間を要した。これに対し、検討法は汎用性を兼ね備えており、加工食品についても一部操作を加えることにより検査が可能である。

(図5) 今回依頼のあった9種類の冷凍食品について、試料濃度0.05 μ g/gとなるように添加回収試験を行った。その結果、回収率は80%~108%となり、事務連絡法で目標とされている回収率の50~200%に比べ、非常に良好な結果であった。(図6)

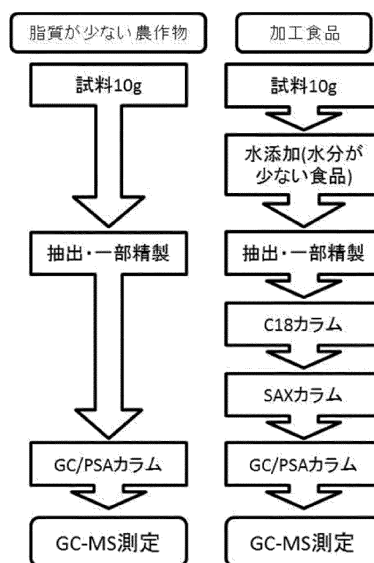


図5 農作物(だいこん)と加工食品の操作比較(抽出および精製)

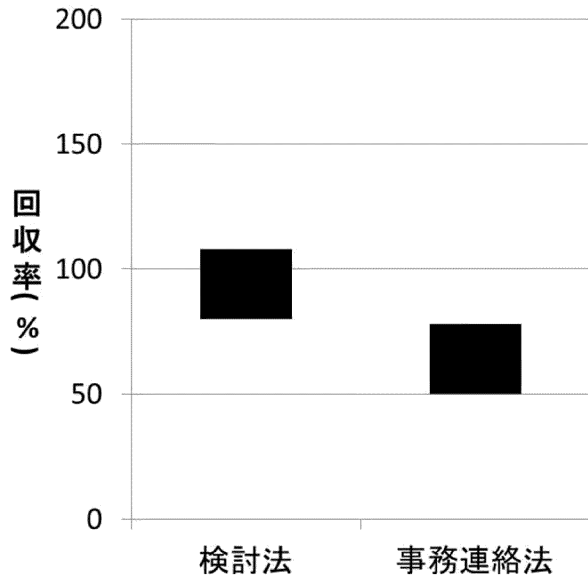


図6 検討法と事務連絡法の加工食品(9種類)添加回収率の比較

参 考 文 献

- 1) 林由美ら：LC/MS/MSによる動物用医薬品の簡易一斉分析法検討，大分県衛生環境研究センター年報, 40, 39 - 45 (2012)

2 まとめ

GC-MSによる残留農薬分析について、抽出法及び精製操作の検討により抽出時間の短縮、使用器具の減少、使用溶媒量の削減が可能となった。これに伴い器具への付着等による農薬の減損が押さえられ、回収率の向上にもつながったと考えられる。また、LC-MS/MSによる残留農薬分析については、わずかな時間の短縮とコストの削減を可能にしたが、一部使用頻度が高い農薬の回収率が悪くなった。このことから本検討法はGC-MSを用いた残留農薬分析について有効な方法であると考ええる。

加えて検討法は汎用性があり、今回の有症苦情冷凍食品の緊急性の高い検査では、マラチオンのみではあるが、当センターで常備している試薬および器具を利用できる迅速かつ簡易な方法であることが分かり、さらに回収率も良好であった。このことから、検討法は緊急性の高い農薬検査における前処理法として有用であると考ええる。

今後も様々な食品について、適用可能かを継続して確認していきたい。