



【既報】第 39 回農薬残留分析研究会、岡本みなみ、ポスター発表(姫路;2016 年)

膜ろ過精製を利用した残留農薬の簡易、迅速、一斉分析法の開発

○岡本みなみ¹⁾、川嶋文人²⁾、濱田典明¹⁾

- 1) 三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所 (〒799-2430 愛媛県松山市北条辻 864-1)
- 2) 愛媛大学大学院 農学研究科 (〒790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7)

Development of simple and rapid pretreatment method for the pesticides residues analysis by membrane filtration.

○Minami Okamoto, Ayato Kawashima, Noriaki Hamada

- 1) MIURA CO. LTD. , 864-1, Tsuji, Hojo, Matsuyama City, Ehime, 799-2430, Japan,
TEL: +81-89-960-2350, FAX: +81-89-960-2351, E-mail: okamoto_minami@miuraz.co.jp
- 2) Environmental Science for Industry, Ehime University, 3-5-7, Tarumi, Matsuyama City, Ehime,
790-8566, Japan, TEL: +81-89-946-9970, FAX: +81-89-946-9980

【はじめに】

農作物の残留農薬分析において厚生労働省により通知されている一斉試験法(以下通知法という)は、手順が多く膨大な分析時間を必要とするため、迅速性に問題を抱えている。一方で QuEChERS 法は、短時間で分析する事が可能となったが、精製が簡易的であるため農作物由来の妨害成分の除去が不十分な場合があり、マトリックス効果による測定値の変動や、GC/MS や LC/MS 等の測定機器への負担が大きといった問題を抱えている。現在では、QuEChERS 法の抽出に、グラファイトとアミノプロピルの積層カラム等による精製を組み合わせる方法(以下 QuEChERS + SPE 法)も多く見受けられる。これに

よって通知法よりも分析時間は短縮されたが、積層カラムで精製後の濃縮や器具の洗浄等、いまだ多くの時間を必要とする。

そこで本研究では膜ろ過による精製法に着目し、QuEChERS 法のような簡易・迅速性を備え、かつ積層カラムと同等あるいはそれ以上の精製効果を兼ね備えた分析法の開発を行ったので報告する。

【評価方法】

今回、以下の 3 つの分析法と本法を比較し、分析時間、精製効果、農薬添加回収試験の回収率、溶媒使用量の 4 項目で評価を行った。

1. 通知法 1) 2. QuEChERS 法(EN)
3. QuEChERS + SPE 法

【材料】

標準品

関東化学(株)の農薬混合標準液 70 (GC/MS 対象 83 種混合)をアセトニトリルを用いて 2ppm となるように調整した。和光純薬工業 (株)の 5 種混合農薬内部混合標準液をアセトンを用いて 1ppm となるように調整した。

試料

にらをフードプロセッサーで粉碎し、均一化したものを使用した。にらは予め、試料中の濃度が QuEChERS 法は 300ppb、それ以外は 150ppb となるよう農薬混合標準液を添加した。なお今回使用したにらは、事前に分析対象農薬が検出されない事を確認した。

試薬

アセトニトリル、アセトン、トルエン、ヘキサンは和光純薬工業(株)の残留農薬・PCB 試験用を使用した。クエン酸 3Na2 水和物と無水硫酸マグネシウムは関東化学(株)の特級を、クエン酸水素 2Na1.5 水和物は関東化学(株)の一級を、塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)の一級を使用した。積層カラムはジーエルサイエンス(株)の InertSep GC/NH₂ (500mg/500mg)を使用した。QuEChERS 法の精製に使用した PSA は、スペルコの Supelclean PSA SPE Bulk を、グラファイトカーボンは日本ウォーターズ(株)の Dis QuE Graphitized Carbon Black を使用した。

【実験方法】

1.通知法

厚生労働省の GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)に従って前処理を行った。

2. QuEChERS 法

EN 法で前処理を行った。(図 1)

3. QuEChERS + SPE 法

抽出操作は 2 と同様の操作を行い、精製は GC/NH₂ 積層カラムを用いて行った。(図 2)

試料10gを秤量

アセトニトリル10mL

ホモジナイズ 1分

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
クエン酸3Na2水和物 1g
塩化ナトリウム 1g
無水硫酸マグネシウム 4g

振とう 1分

遠心分離 3500rpm 10分

アセトニトリル層 1mL分取

無水硫酸マグネシウム 150mg
PSA 25mg
グラファイトカーボン 7.5mg

攪拌 30秒

遠心分離 13000rpm 2分

上澄み液分取 0.5mL

内標準物質添加 50 μL

定容 0.5mL

GC/MS測定

図 1 QuEChERS 法(EN)

試料10gを秤量

アセトニトリル10mL

ホモジナイズ 1分

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
クエン酸3Na2水和物 1g
塩化ナトリウム 1g
無水硫酸マグネシウム 4g

振とう 1分

遠心分離 3500rpm 10分

アセトニトリル層 2mL分取

GC/NH₂積層カラムコンディショニング
アセトニトリル：トルエン (3 : 1) 10mL

GC/NH₂積層カラムへ注入

アセトニトリル：トルエン (3 : 1) 20mL

減圧濃縮 (40℃、100hPa)

アセトン 10mL

減圧濃縮 (40℃、100hPa)

窒素濃縮

内標準物質添加 100 μL

定容 1mL

GC/MS測定

図 2 QuEChERS + SPE 法

4. 膜ろ過法 (本法)

抽出操作は 2 と同様の操作を行い、精製は膜ろ過法にて行った (図 3)。膜ろ過法は大きく 3 つの工程からなる。まず初めに分取した抽出液と水を混合し膜ろ過容器へ入れ遠心分離した。次に、ろ過液に水を

追加して混合し、吸着剤を充填したカラムに混合液をのせ遠心分離した。最後に吸着剤カラムの下に脱水剤カラムを連結し、アセトンで吸着剤カラムへ添加し遠心分離を行った。溶出液を濃縮し、最終調整液とした。

試料 10g を秤量

アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ 1分

クエン酸水素 2Na 1.5水和物 0.5g

クエン酸 3Na 2水和物 1g

塩化ナトリウム 1g

無水硫酸マグネシウム 4g

振とう 1分

遠心分離 3500rpm 10分

抽出液 1mL + 水 0.82mL 混合

PP製 15mL 遠沈管に膜ろ過容器を挿入し混合液を入れる

遠心分離 2800rpm 10分

ろ過液 + 水 0.4mL 混合

吸着剤カラムを先ほどの 15mL 遠沈管に挿入し、混合液を入れる

遠心分離 2000rpm 5分 + 3500rpm 3分

透過した液は廃棄

吸着剤カラムの下に脱水剤カラムを連結させ、これを PP製 50mL 遠沈管に挿入

溶出 アセトン 6mL

遠心分離 400rpm 8分

減圧濃縮 (40°C、100hPa)

窒素濃縮

内標準物質添加 50 μ L

定容 0.5mL

GC/MS測定

図 3 膜ろ過法

【装置及び測定条件】

GC:TRACE GC / MS:PolarisQ (Thermo Fisher Scientific)

注入量:2 μ L

注入口温度:220 $^{\circ}$ C

キャピラリーカラム:VF-5MS 長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25 μ m (Agilent)

キャリアガス:ヘリウム

GC 昇温:50 $^{\circ}$ C(1 分)→30 $^{\circ}$ C/分→125 $^{\circ}$ C(0 分)→5 $^{\circ}$ C/分→200 $^{\circ}$ C(0 分)→10 $^{\circ}$ C/分→300 $^{\circ}$ C(11 分 30 秒)

測定モード:Scan モード

イオン源温度:250 $^{\circ}$ C

【結果と考察】分析時間

残留農薬分析では、食品が流通する前に効率的

に検査する方法が求められている。また食品の種類も様々であるため、より多くの検体を迅速に分析する必要がある。そこで、例として 16 検体を前処理する際に要する時間を算出し、表 1 に示した。膜ろ過法の分析時間は 2 時間 10 分 (実働時間のみ)で、QuEChERS 法と同程度の迅速性を有している。膜ろ過法は、主な操作として遠心分離機を使用するため、同時に多検体を処理する事ができ、分析者も操作に付き切りになる必要はない。使用する器具は PP 製遠沈管のみであり、ガラス器具を必要としないため器具の洗浄等の手間も省く事ができる。分析者が行う操作としては液の移し入れのみであり、それ以外は遠心分離機で行うため専門的な知識や経験がなくとも、誰でも簡単に操作を行う事が出来るといった利点がある。

表 1 各分析法における前処理に要する時間

	通知法	QuEChERS 法	QuEChERS + SPE 法	膜ろ過法
実働時間のみ	17 時間	2 時間 20 分	9 時間 50 分	2 時間 30 分
非実働時間を含む	18 時間	2 時間 40 分	10 時間 20 分	3 時間 10 分

精製効果

農薬を添加していないにらを用いて、それぞれの分析法にて前処理を行い、最終試料濃度がいずれも 2g/mL となるように調整した。これらをスキャンモード(m/z 50.0–500.0)にて測定を行った時のクロマトグラムを図 4 に示す。膜ろ過法は他法と比べ、21 分付近に見られるピークが減少し、また 32 分付近のピー

クはほとんど検出されなかった。これらのピークをライブラリ検索したところ、フィトール(RT : 21min 付近)や、シトステロール(RT : 32min 付近)であった。これらの成分は水に難溶の性質があるため、膜でろ過する際に抽出液と水を混合させた事により凝集し、膜で保持され精製効果が得られたのだと考えられる。

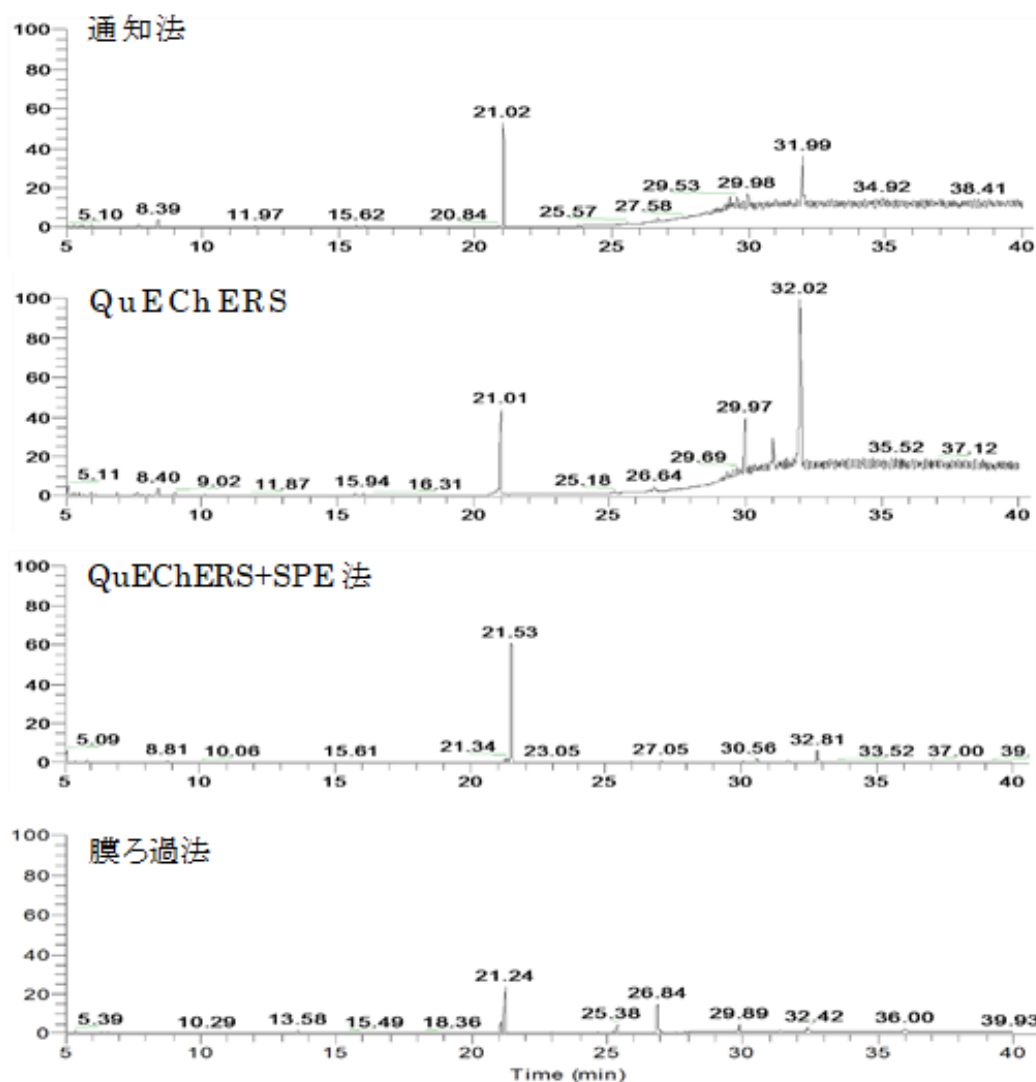


図 4 にらにおけるスキヤンクロマトグラム

農薬回収率

次に、農薬の添加回収試験の結果を表 2 に示す。なお回収率は標準添加法を用いて算出した。膜ろ過法において 70～120%の回収率を示した農薬の数は 85 農薬中 78 農薬と 9 割以上の農薬が良好な回収率を得る事が出来た。残留農薬分析における膜での精製は、一般的に農薬の回収率が低下する事が懸念されるが 2) 3)、本法の膜ろ過容器を使用する事によってそれらの問題を解消する事が出来た。また膜

ろ過処理によって精製効果が高くなった事により、妨害成分による定量不可の農薬数も 1 農薬のみであり、他方に比べ最も少なかった。一方で、回収率が 70% 未満の農薬は 6 農薬であった。この原因を検討したところ、モノクロトホスや、ホスファミドンは吸着剤への吸着力が弱く、廃棄する液中へ溶出していた。それとは逆にフェンプロピモルフやキノクラミンは、吸着剤への吸着力が強く、アセトン 6mL では溶出が不十分であった。

表 2 ならにおける農薬回収率 (%)

農薬名	通知法	QuEChERS法	QuEChERS+SPE法	膜ろ過法
ab_Propargite	77.5	85.3	81.9	94.5
Acetochlor	87.4	97.4	83.0	91.5
Allethrin-3	N.A.	N.A.	-	90.6
Allethrin-4	N.A.	N.A.	-	89.5
Ametryn	78.5	93.4	98.3	86.8
Atrazine	81.7	100.8	79.9	84.6
Azaconazole	78.7	92.1	85.0	94.6
Benalaxyl	81.6	90.7	84.4	106.3
Benfluralin	91.5	102.7	79.7	85.7
Benoxacor	97.0	107.0	94.5	95.4
Bromacil	72.1	107.0	102.7	75.7
Bromobutide	94.7	109.1	84.0	92.8
Bromophos-methyl	92.0	95.5	85.9	80.3
Bromopropylate	77.8	89.2	72.8	91.6
Bupirimate	84.2	91.3	88.3	96.6
Buprofezin	85.2	75.8	86.9	92.0
Carbofuran	84.1	140.6	84.3	76.5
Carfentrazone-ethyl	78.4	93.9	87.4	99.0
Chlorpyrifos-methyl	90.9	96.7	88.0	88.7
Chlorthal-dimethyl	89.2	100.0	86.8	86.0
Clomazone	103.1	93.9	82.1	96.4
Cyanophos	90.5	86.4	84.8	95.3
DEF	84.2	88.8	90.3	76.9
Diclofop-methyl	75.3	82.2	84.8	90.7
Dicloran	91.0	97.9	81.8	90.3
Dimepiperate	73.7	83.2	96.6	90.8
Dimethametryn	84.0	100.0	92.0	89.9
Diphenamid	86.6	104.7	95.1	93.8
E-Metominostrobin	87.0	87.8	76.1	96.1
Ethion	84.3	86.8	86.3	89.8
Ethofumesate	86.4	98.0	98.8	97.5
Fenamiphos	72.9	87.8	97.9	93.1
Fenbuconazole	73.1	82.5	96.5	93.4
Fenothiocarb	83.9	75.1	N.A.	99.1
Fenpropimorph	88.8	89.1	85.3	2.4
Flamprop-methyl	82.9	93.5	87.9	98.0
Fluacrypyrim	82.4	91.6	79.8	94.3
Flumiclorac-pentyl	77.8	86.3	71.9	92.4
Flumioxazin	61.3	N.A.	74.2	92.2
Flutriafol	79.5	N.A.	90.9	92.6
Fthalide	82.4	97.9	94.6	80.4
Hexazinone	68.4	100.3	96.6	71.1
Imazamethabenz-methyl	-	-	77.3	71.8
Iprobenfos	92.4	100.5	91.3	93.6
Isazofos	93.5	105.8	83.8	98.3
Isoprothiolane	82.0	79.2	78.9	96.8
Isoxathion	84.6	102.6	84.1	94.0
Isoxathion_oxon	-	-	85.5	104.0
Metalaxyl	83.1	97.9	91.5	83.4
Methidathion	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Methoxychlor	81.5	91.3	78.7	93.8
Monocrotophos	-	-	101.0	35.4

表 2 にらにおける農薬回収率 (%) 続き

農薬名	通知法	QuEChERS法	QuEChERS+SPE法	膜ろ過法
Napropamide	81.2	87.7	92.0	92.8
Nitrothal-isopropyl	87.9	96.5	84.9	90.5
Norflurazon	68.9	87.9	97.2	97.9
Oxadiazon	81.1	89.9	82.0	91.8
Oxadixyl	75.7	98.4	96.3	78.7
Oxyfluofen	85.6	77.3	91.0	93.4
Phenothrin-1	90.6	N.A.	76.1	80.0
Phenothrin-2	90.6	65.3	68.2	76.4
Phosmet	81.8	N.A.	85.9	92.1
Phosphamidon	77.3	93.0	92.8	61.7
Piperophos	84.7	86.8	78.8	97.8
Profenofos	71.8	78.4	79.1	95.2
Prometryn	83.0	94.5	92.2	90.0
Propachlor	96.9	100.6	100.7	88.3
Propanil	82.8	100.0	95.5	85.8
Propoxur	90.8	120.4	77.5	81.2
Propyzamide	87.5	99.9	87.0	93.3
Pyrazophos	68.1	73.6	82.7	85.1
Pyridaphenthion	77.8	89.1	87.1	103.2
Quinoclamine	68.9	99.6	89.2	56.3
Quinoxifen	82.8	76.5	79.4	72.6
Quintozene	91.4	101.2	73.2	59.0
Simazine	93.1	115.3	89.8	72.9
Tecnazene	87.4	89.2	77.0	66.6
Tetrachlorvinphos	N.A.	70.0	N.A.	95.0
Tetradifon	85.8	73.2	86.3	86.2
Tolfenpyrad	94.2	N.A.	76.9	96.7
Triadimefon	88.3	82.1	92.7	93.7
Triallate	90.5	89.3	81.5	76.9
Trifloxystrobin	86.4	93.4	90.8	103.0
Vinclozolin	86.2	103.9	90.1	93.5
XMC	94.7	111.7	80.2	89.2
Z-Metominostrobin	81.7	98.7	90.5	102.0
70%未満(農薬数)	5	1	1	6
70~120%(農薬数)	73	72	79	78
120%以上(農薬数)	0	1	0	0
妨害により定量不可(農薬数)	4	8	3	1

NA : 妨害ピークにより定量不可

— : 感度不良により定量不可

溶媒使用量

残留農薬分析において有機溶媒は必要不可欠であるが、環境への負荷が懸念されるため、より少量で分析を行う事が望まれる。そこで今回の検討において、1検体あたりに使用した有機溶媒量を比較した(表 3)。

QuEChERS 法が開発された事で抽出時の量は大幅に削減されたが、積層カラムでの精製ではコンディショニングや溶出等に未だ多くの量を必要とする。本法は精製に膜を使用する事で、積層カラムに必要な溶媒量を削減する事が可能となったため、処理に要した溶媒量は 1 検体あたり 16mL であった。

表 3 各分析法における有機溶媒使用量 (mL)

	通知法	QuEChERS 法	QuEChERS + SPE 法	膜ろ過法
アセトニトリル	124	10	32.5	10
トルエン	8	0	7.5	0
アセトン	15.5	0	15.5	6
ヘキサン	0.5	0	0.5	0
Total	148	10	56	16

【まとめ】

本研究は QuEChERS 法のような迅速・簡易性と積層カラムのような精製効果を合わせ持つ分析法の開発を目的とし、膜ろ過に着目して研究を行った。迅速性においては、全ての操作を遠心分離機で操作可能な前処理法の開発を行い、それにより多検体を同時に処理をする事が可能となった。また容器は使い捨ての PP 製遠沈管を使用するため、ガラス器具の準備・洗浄の手間を省く事ができ、分析者の負担も軽減される。本法は液の移し入れを行う操作のみであるため、専門的知識や技術を必要とせず誰でも簡単に処理する事ができる。精製効果についても、抽出液と水を混合する事で精製度を高め、積層カラムの精製効果と同等以上の結果を得る事が出来た。

本法は、さまざまな食品中の残留農薬に対する簡易・迅速な一斉分析法として有効であり、食品が流通する前に効率的な検査が期待できる。

今後、緑茶や大豆等の精製が困難として知られている食品についても検討していく予定である。

【参考文献】

- 1) GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物):「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号)」
- 2) 山下和之ら、第 36 回農薬残留分析研究会要旨、150-164 (2013)
- 3) 岡本みなみら、第 25 回環境化学討論会要旨、474-475 (2016)



グリーンテクノロジーを創成する
三浦環境科学研究所

愛媛県松山市北条辻864番地1 〒799-2430
TEL 089-960-2350 FAX 089-960-2351

三浦工業株式会社
<http://www.miuraz.co.jp>