

図 1-6 マトリックス STD に対する面積比の比較
(その他の農薬)

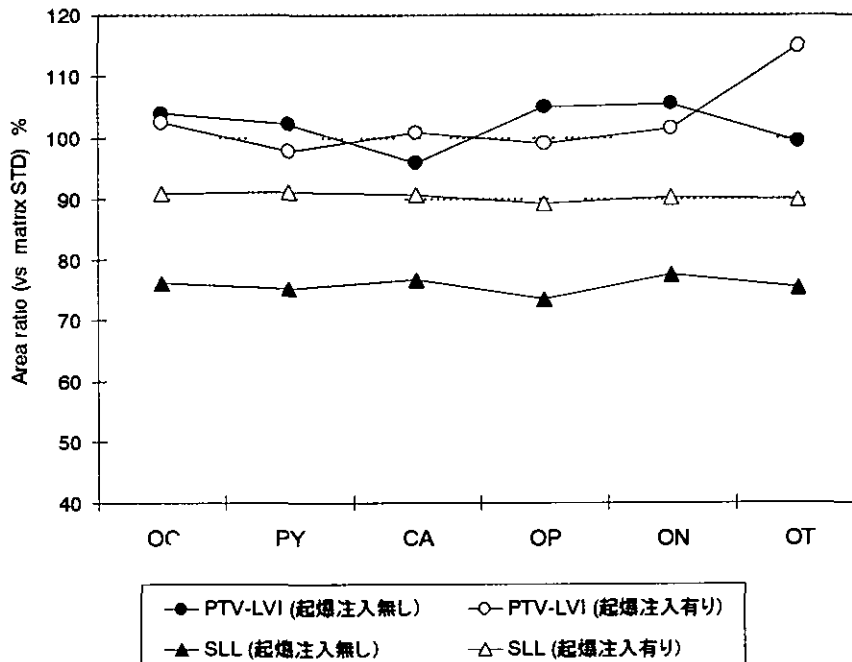


図 1-7 マトリックス STD に対する面積比の比較
 OC 有機塩素系農薬, PY ピレスロイド系農薬
 CA カーバメート系農薬, OP 有機リン系農薬
 ON 有機窒素系農薬, OT その他の農薬

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究
(2)SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction スターラーバー抽出)法を用いた
残留農薬スクリーニング分析法の検討

分担研究者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction スターラーバー抽出)法を用いた残留農薬スクリーニング分析法の検討を行った SBSE 法は液相をコーティングした攪拌子を試料溶液中で攪拌させて目的成分を抽出する手法である 攪拌子に移行した目的成分は、熱脱着(TD)-GC-MSで測定される そこでまず TD-GC-MS 条件について検討し最適な条件を求めた 次いで、様々な種類の約 160 農薬を用いて、SBSE の抽出効率に影響を与える因子について検索を行うとともに、抽出条件の最適化を行った その結果、SBSE 法は極性の高い農薬に対して抽出効率が低く適用できないほか、熱分解しやすい農薬に対しては測定に際して注意が必要であるが、それ以外の農薬に対しては良好な結果が得られた 本法は、濃縮操作無しに、抽出液に攪拌子を入れて攪拌する簡便な操作のみで短時間で分析できるため、残留農薬分析の効率化が期待できる

A 研究目的

SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction スターラーバー抽出)法は、表面に PDMS (ポリジメチルシロキサン) をコーティングした攪拌子(図 1 参照)を試料溶液中で攪拌させて、目的成分を抽出する手法である¹⁾ 図 2 には一般的な SBSE 法の操作の流れを示した SBSE 法は攪拌子を試料に入れて一定時間攪拌後試料から取り出し、攪拌子に分配した目的成分を TD-GC-MS で分析するもので、濃縮やカラム精製などの操作が無く非常に簡便である この SBSE 法は、液-液分配の原理を応用した方法であり、目的物質の分配係数と相比により分配比が決定される SBSE の理論は SPME(solid-phase micro-extraction 固相マイクロ抽出法)とほぼ同じであり、PDMS-水間の分配係数($K_{PDMS/W}$)は、オクタノール-水分配係数(K_{OW})で近似され、(1)式で表すことができる¹⁾

C_{SBSE} SBSE 相中の分析対象物の濃度

$$K_{O/W} = K_{PDMS/W} = \frac{C_{SBSE}}{C_w} = \frac{m_{SBSE}}{m_w} \times \frac{V_w}{V_{SBSE}} \quad (1)$$

C_w 水相中の分析対象物の濃度

m_{SBSE} SBSE 相中の分析対象物の量

m_w 水相中の分析対象物の量

V_{SBSE} SBSE 相の容積

V_w 水相の容積

ここで、 $\beta (= V_w/V_{SBSE})$ を相比とすると(2)式が得られる

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{SBSE}}{m_w} = \frac{m_{SBSE}}{m_0 - m_{SBSE}} \dots (2)$$

m_0 水試料中の分析対象物の初期量

よって、(2)式から抽出効率(回収率)を求める式は(3)式のようなになる

$$\frac{m_{SBSE}}{m_0} = \frac{\left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} \quad (3)$$

(3)式より回収率は、[オクタノール-水分分配係数($K_{O/W}$)]と[攪拌子にコーティングされた PDMS と水試料との相比 $\beta (= V_w/V_{SBSE})$]で決まることがわかる そこで、(3)式から $V_{SBSE} = 0.063$ mL (長さ 10 mm, 膜厚 10 μ m の攪拌子の液相量)及び $V_w = 2$ mL として、検討に用いた農薬のうち Log $K_{O/W}$ の値がわかっている農薬について回収率の理論値を求め、Log $K_{O/W}$ と回収率との関係を図 3 に示した. 同様に図 4 には、各農薬の水溶解度と求めた回収率の理論値との関係を示した 図 3 から Log $K_{O/W}$ 値が約 1.9 より大きければ回収率が

70%以上となることがわかる。この時回収率の理論値が70%以上となったものは、計算に用いた149農薬のうち131農薬と8割以上であった。今回検討対象とした農薬はGC分析が可能な農薬であるが、この大部分は計算上はSBSE法で抽出可能と思われた。また、水溶解度から判断すると、水溶解度が数百mg/Lより小さいものであればSBSE法で抽出可能と思われた。このことから、SBSE法は極性の高い農薬を除きGC分析可能な多くの農薬に適用可能と推察される。SBSE法は水試料に対しては報告例があるが、食品中の残留農薬分析に応用した例はほとんどない。そこで、SBSE法を用いた食品中の残留農薬スクリーニング分析法について検討した。

B 研究方法

1. 試薬及び試液

試料 東京都内で購入したキャベツ、パレシヨ、オレンシ及びホウレンソウを使用した。試料は細切り後ポリトロンでホモジナイズした。

試薬 NaCl及び有機溶媒は残留農薬分析用試薬(和光純薬工業(株)または関東化学(株))を、 K_2HPO_4 及び KH_2PO_4 は特級試薬(和光純薬工業(株))を使用した。BONDESIL PSAはVarian社製のものを使用した。注入口ライナー及びTDU用チューブの不活性化処理にはSurfaSil(ジクロロオクタメチルテトラシロキサン, PIERCE社)を使用した。

リン酸緩衝液 105 gの K_2HPO_4 と61 gの KH_2PO_4 を水に溶かし、1 NのHClまたはNaOHでpH 7に調製して、水を加えて1000 mLとした。

農薬標準品 林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)またはRiedel-de Haen社製の残留農薬試験用試薬を用いた。表1に検討に用いた農薬を示した。なお、アルシカルブはGC注入時に容易に分解するため分解物を測定した。

農薬標準原液 各農薬標準品をヘキサンので溶解して(溶解しにくい場合にはできるだけ少量のアセトンで溶解後ヘキサンで希釈して)1 mg/mLの濃度に調製し冷凍庫(-30℃)に保存した。

農薬標準混液 各農薬標準原液をとり、アセトンを加えて10 µg/mL(アセタミプリド, アセフェート, アルジカルブ, イプロシオン, イプロシオン代謝物, イミヘンコナゾール代謝物 2, カブタホール, メタミドフォス, バミドチオン及びプロパモカルブは50 µg/mL, オキサミルは100 µg/mL)の濃度に調製し、冷凍庫(-30℃)に保存した。適宜アセトンで希釈して使用した。

2 装置

抽出容器 10 mL及び20 mLのヘッドスペース用バイアル(Agilent Technologies社)を用い、抽出時には同社製のヘッドスペース用ブチルセブタム付きアルミキャップをした。

攪拌子 GERSTER社製のPDMS量24 µL(長さ10 mm, 膜厚0.5 mm)及びPDMS量63 µL(長さ10 mm, 膜厚1.0 mm)の攪拌子(Twister™)を用いた。なお、攪拌子の構造を図1に示した。

スターラー 20連マグネスターGMG-20型(柴田科学(株))を使用した。

TD-GC-MS GERSTER社製のTwister専用熱脱着装置TDU, 同社製の昇温気化(PTV)注入口CIS 4及び5973N質量分析計のついたAgilent 6890Nガスクロマトグラフ(Agilent Technologies社)を使用した。TwisterのTDUへの導入にはMPS-2オートサンプラー(GERSTER社)を使用した。CIS 4の冷却には液化炭酸ガス(純度99.99%)を使用した。

3 TD-GC-MS条件

抽出後の攪拌子は水洗後無塵紙で拭いたのち、不活性化処理をしたTDU用チューブに入れた。その後TDU用チューブはオートサンプラーを用いてTDUに導入されて300℃まで加熱され、分析対象物質が熱脱着(TD)された。脱着された物質は-30℃に冷却されたPTV注入口で一旦捕集され、次に注入口を300℃まで加熱しGCカラムへ導入した。表2には最終的に得られたTD-PTV条件を示した。また、図5にはTD-GC-MS分析の流れを示した。

GCカラム J&W Scientific社製のキャピラリーカラムDB-5ms(内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 µm)ガードカラムとして不活性化キャピラリーカラム(内径0.25

mm, 長さ 2 m, Agilent Technologies 社) を接続した

GC-MS 条件 オープン温度 50 °C (3 min) → 25 °C/min → 125 °C → 10 °C/min → 300 °C (65 min), トランスファーライン温度 200 °C (3 min) → 10 °C/min → 300 °C, イオン源温度 220 °C, 四重極温度 150 °C, キャリヤーガス He, キャリヤーガス圧プログラム 定流量モード(流速 1.1 mL/min), イオン化電圧 70 eV (EI モード), 測定モード SIM (selected ion monitoring) モード(モニターイオンは表 1 参照)及び SCAN モード(SCAN 範囲 50-550 amu). エレクトロンマルチプライヤ電圧は, SIM 測定では 2800V, SCAN 測定ではオートチューニングでの設定値を用いた

4. 試料抽出液の調製

試料 20 g にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズ後吸引ろ過し, アセトニトリル 30 mL で残さを洗い洗液を抽出液に合わせた. 抽出液をメスシリンダーに移しアセトニトリルで 100 mL とした. SBSE 条件の検討には, キャベツ, ハレイシヨ, オレンジ及びホウレンソウの各抽出液を 1 : 1 : 1 (v/v) で混合した混合抽出液を用いた. また, 特に記載のない限り混合抽出液 1 mL あたり PSA 25 mg を添加して 1 分間攪拌後遠心分離(3000 rpm, 5 分)して得られた上澄液を検討に用いた. 塩析による水層分離を行う場合には, リン酸緩衝液 20 mL 及び NaCl 10 g を入れた分液ろうとに混合抽出液 20 mL (試料 4 g 相当) をとり, 3 分間振とう後 10 分間静置し, 分離した水層を除き, アセトニトリル層を分取した

5. SBSE 条件

SBSE 条件の検討では, 混合抽出液に農薬標準混液を添加して行った. 最終的に得られた条件は次の通りである. 試料抽出液 1 mL あたり PSA 25 mg を添加して 1 分間よく混合したのち, 3000 rpm で 5 分間遠心分離した. 上澄液を水で 10 倍希釈したのち, その 2 mL を 10 mL のヘッドスペース用バイアルにとり, 攪拌子(長さ 10 mm, 膜厚 10 mm) を入れアルミキャップをした. 室温で 90 分間 1000 rpm で攪拌後, 攪拌子を取り出し水洗し無塵紙で拭いた

のち TD-GC-MS で測定した

6. 定量

攪拌子に農薬標準混液 1 µL 添加し同様に TD-GC-MS 測定し, 得られたピーク面積を用いて絶対検量線法で定量を行った. 0.5 ng ~ 2 ng の範囲で検量線を求めたところ, chlorothalonil, phosmet 及び amitraz を除き相関係数 $r = 0.990 \sim 1.000$ の良好な直線性が得られた

C 研究結果及び考察

1 TD-PTV 条件の検討

1.1 パラメーターの選択及び最適化

TD-PTV に影響を与えるパラメーターとして, 表 3 に示したパラメーターについて検討した. ピーク面積を指標として, 最適な条件を求めたところ, 表 3 に示した条件が得られた.

1.2 TDU 用チューブの不活性化処理

TD-PTV では攪拌子から加熱脱着された農薬は, 冷却された PTV 注入口内のライナーで捕集され, その後ライナーの加熱により気化して GC カラムへ導入される. この時熱に不安定な農薬の分解が予想された. スプリットレス分析では, 注入口ライナーを不活性化処理する事により分解が減少することが知られている. そのため, PTV 注入口で使用するライナーは不活性化処理を行ったものを使用した. しかし, まだ農薬の分解や測定値にばらつきが見られたため, 他の要因について検討した. 攪拌子は, ガラス製の TDU 用チューブに入れられた状態で TDU 内で加熱されて農薬が熱脱着される. 脱着された農薬は, He 気流により PTV 注入口へ送られるが, その際, 加熱された TDU 用チューブ表面に接触する可能性があるため, この過程での分解・吸着が考えられた. 市販の TDU 用チューブは不活性化処理されていないため, チューブを不活性化処理して, 未処理の場合とピーク面積を比較した. その結果, 大部分の農薬は面積比に差は見られなかったが, 表 4 に示したようないくつかの農薬では不活性化処理により 20% 以上の面積増加が見られた. 更に, 繰り返し注入におけるピー

ク面積の相対標準偏差も未処理の場合約10%であったのに対して、不活性化処理を行った場合には約4%と半分以下になり分析精度が向上した。これは、不活性化処理により TDU 用チューブ表面での分解・吸着が減少したためと思われる。この結果から TDU 用チューブは不活性化処理を行うこととした。

2. SBSE 条件の検討

2.1 攪拌子の膜厚及び抽出時間の検討

SBSE 法のこれまでの報告では、一般に攪拌子に膜厚 0.5 mm のものが使用されている。これは、膜厚が厚いほど平衡に達するまでの時間が長くなるためである。しかし、先に述べたように回収率は攪拌子の液相と水試料との相比 ($\beta = V_w/V_{SBSE}$) で決定されるため、相比が小さいほど回収率が高くなる。これは、試験溶液量が一定であれば攪拌子の液相量が多いほど、すなわち膜厚が厚いほど回収率が高くなることを意味する。そこで、攪拌子の膜厚の回収率に対する影響について、膜厚 0.5 mm 及び 1.0 mm の攪拌子を用いて検討した。その際、膜厚が厚いほど平衡に達するまでの時間が長くなるとされていることから、抽出時間の影響も同時に検討した。検討は PSA 処理をしていない混合抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液 10 mL に農薬 10 ng を添加した試験溶液を用いて、30、60、120 及び 180 分における回収率を求めて行った。図 6 には膜厚 0.5 mm で 2 時間抽出時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた時の結果を示した。その結果、回収率が 120% を越えた農薬を除き、いずれの農薬群も検討した抽出時間の範囲では、膜厚 1.0 mm の方が回収率が高かった。そのため攪拌子の膜厚は 1.0 mm を選択した。また、回収率の経時変化については、膜厚 0.5 mm 及び 1.0 mm ともに抽出時間 60 から 120 分でほぼ平衡に達し、180 分で減少が見られた。よって、抽出時間は 90 分を選択した。

2.2 抽出液の前処理及びクリーンアップの検討

試料マトリックスが多いと攪拌子の液相が試料マトリックスに飽和され回収率が低下する可能性があるため、回収率の向上を図るために抽出液の前処理及びク

リーンアップ法について検討した。前処理法としては、混合抽出液に NaCl とリン酸緩衝液を加えて塩析により水層分離する方法を用い、得られたアセトニトリル層を使用した。また、クリーンアップ法としては、混合抽出液 1 mL あたり PSA 25 mg を添加して攪拌後遠心分離 (3000 rpm, 5 分) して得られた上澄液を用いた。検討は水層分離処理及び PSA 処理ともに行わなかった場合、両処理を行った場合及びいずれか一方の処理のみを行った場合について、それぞれの処理で得られた抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液 10 mL に農薬 10 ng を添加して行った。図 7 には水層分離処理及び PSA 処理をともに行わなかった場合の回収率で農薬を分類し平均値を求めた時の結果を示した。その結果、水層分離を行わない方が、また PSA 処理を行った方が回収率が高かった。ここで、混合抽出液の pH は試料として用いたオレンジの影響で 5.0 と弱酸性であったが、PSA 処理を行った場合には pH 7.8 となった。様々な種類の農薬を抽出する場合には、抽出時の pH は中性付近の方が全般的に有利であると思われることから、PSA 処理で回収率が向上したのは、処理により試験溶液の pH が中性付近に変化したことが一因と思われる。PSA 処理の効果としては、脂肪酸等の酸性物質の除去といったクリーンアップ効果のほかに、このような pH 調製の効果も期待された。以上の結果から抽出液は水層分離は行わずにそのまま用い、PSA 処理を行うこととした。

2.3 試験溶液量の検討

水試料を用いた SBSE 法の報告例では、一般に試験溶液量は 10 mL が用いられている。これは、試験溶液量が多くなると平衡に達するまでの時間が長くなるとされているためである。2.1 の項では攪拌子の膜厚を厚くすることで相比を小さくして回収率の改善を図った。相比 (β) = V_w/V_{SBSE} であるから、試験溶液量を少なくすることによっても相比を小さくすることができる。そこで、試験溶液量の回収率に対する影響について検討した。検討は混合抽出液を水で 10 倍希釈して 0.5 ng/mL となるように農薬を添加した試験

溶液を用いて、溶液量 2, 5, 10, 15 及び 20 mL で回収率を求めた 図 8 には試験溶液量 2 mL の時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた時の結果を示した その結果、試験溶液量の減少とともに回収率が増加し、特に回収率 70%未満の群では 2 mL の時が最も回収率が高かった。農薬の種類別ではピレスロイド系農薬でこの傾向が顕著に見られた。図 9 には同様にピレスロイド系農薬の回収率に対する試験溶液量の影響を示した。ピレスロイド系農薬では試験溶液量の減少とともに回収率が増加し 2 mL の時回収率が最大となった。検討に用いたピレスロイド系農薬の Log K_{ow} 値は 3.8 ~ 8.2 であり、膜厚 10 mm の攪拌子を使用して試験溶液 2 mL を用いた場合、回収率の理論値は 99.5% 以上である。しかし、実験で得られた回収率は理論値よりも低く、しかも最も Log K_{ow} 値が大きく回収率が最大となるはずの sulafuofen が反対に最低の回収率となった この原因としては、抽出容器表面や攪拌子の液相への農薬の吸着が考えられる このほか、Log K_{ow} 値が大きな農薬、すなわち水溶解度が小さい農薬では、抽出液を水で希釈すると析出して溶液中に均一に分散できなくなるためではないかと推察される この時、試験溶液量が多いと、攪拌子と析出した農薬が接触する確率が低くなるため低回収率となり、反対に試験溶液量が少ない場合には、析出した農薬と攪拌子との接触確率が高くなるために回収率が増加したのではないかと推察される 以上の検討から試験溶液量は 2 mL を選択した

2.4 希釈倍率の検討

ここまでの検討では、SBSE 法の他の報告例を参考にして、抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液を検討に用いてきたが、次に回収率に対する希釈倍率の影響について検討した 検討は混合抽出液に 5 ng/mL となるように農薬を添加し水で 2, 5, 10, 15 及び 20 倍希釈して試験溶液とし回収率を求めた 図 10 には、農薬の種類毎に回収率の平均値を求めて結果を示した 全体的には 2 倍希釈時に回収率が最低となり、希釈倍率が大きいほど回収率が高くなる傾向が見られた 農薬の種

類別では、有機塩素系農薬では 10 倍希釈以上でほぼ一定の回収率となり、ピレスロイド系農薬では 5 倍希釈で最大となり以後減少した。カーバメート系、有機リン系、有機窒素系及びその他の農薬では 15 倍希釈以上でほぼ一定の回収率となった。以上の検討から、ピレスロイド系農薬の回収率の低下をできるだけ抑えるため希釈倍率は 10 倍を選択した

2.5 攪拌速度の検討

このほか回収率に与える攪拌速度の影響について検討した。検討は混合抽出液に 5 ng/mL となるように農薬を添加し水で 10 倍希釈して試験溶液とし、攪拌速度 500, 750, 1000, 1250 及び 1500 rpm における回収率を求めた 図 11 には攪拌速度 500 rpm の時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた結果を示した。回収率 50-70% の農薬群では 1000 rpm で回収率がやや増加した それ以外の農薬群では一部の農薬で 500 rpm のとき回収率がやや低下した以外は、検討した範囲では攪拌速度の影響はほとんど見られなかった 攪拌速度が 1250 rpm 以上では容器の壁面への試験溶液の跳ねが多くなるため、攪拌速度は 1000 rpm を選択した

2.6 SBSE 条件及び回収率

これまでの検討結果から、SBSE 条件として次の条件が得られた。①抽出液はアセトニトリル抽出液をそのまま使用し塩析による水層分離は行わない ②抽出液は PSA 処理を行う ③攪拌子 長さ 10 mm, 膜厚 10 mm. ④抽出時間 90 min ⑤試験溶液量 2 mL. ⑥抽出液の希釈倍率 10 倍 ⑦攪拌速度 1000 rpm PSA 処理後の混合抽出液に 5 ng/mL (試料中 25 ppb 相当) となるように農薬を添加し、得られた SBSE 条件で抽出し回収率を求めた その結果を表 5 及び図 12-1 ~ 12-6 に示した 検討した 160 農薬中で回収率 70-120% が 89 農薬, >120% が 11 農薬, 50-70% が 13 農薬, <50% が 47 農薬であった。captan, aldicarb, oxamyl, propamocarb, acephate, methamidophos 及び acetamidprid は全く回収されなかった 農薬の種類別で見ると、有機塩素系農薬 (図 12-1) では、captan, pentachlorophenol, captafol 及び dicofol で低回収率であった以外は 80% 以上の回

収率が得られた ピレスロイド系農薬(図 12-2)では, silafluofen 以外は 80%以上の回収率が得られた カーバメート系農薬(図 12-3)では低回収率となる農薬が多く, chlorpropham, EPTC, diethofencarb, butylate, esprocarb 及び thioencarb で 80%以上となった以外は低回収率となった その他の農薬(図 12-4)では o-phenylphenol 及び benfuresate の回収率が低かった以外は 70%以上の回収率が得られた 有機リン系農薬(図 12-5)では, 検討した 46 農薬のうち約 1/4 の 13 農薬以外は 70%以上の回収率が得られた 有機窒素系農薬(図 12-6)では, 検討した 47 農薬中約半分の 24 農薬で回収率が 70%未満となった 回収率が低くなった農薬は, 分析中に分解しやすい農薬あるいは極性が高く攪拌子の液相に分配しにくい農薬と思われる. また, 回収率の相対標準偏差は, 低回収率となった農薬以外は 5%前後であり, 精度

の良い結果が得られた

D 結論

SBSE 法は極性の高い農薬に対して抽出効率が低く適用できないほか, 熱分解しやすい農薬に対しては測定に当たって注意を要するが, それ以外の農薬に対しては良好な結果が得られた 本法は, 濃縮操作無しに, 抽出液に攪拌子を入れて攪拌するといった簡便な操作のみで短時間で分析できるため, 残留農薬分析の効率化が期待できる

E 参考文献

- 1) E Baltussen et al Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples Theory and Principles J Microcolumn Separations, 11(10), 737-747 (1999)

表1 農薬の保持時間(t_r)及び定量用イオン(m/z) (続き)

Pesticides	t_r (min)	m/z (amu)	Pesticides	t_r (min)	r (a)
Organophosphorus pesticides (46)			Organonitrogen pesticides (47)		
Acephate	10.79	136.0	Acetamiprid	20.91	1
Azinphos-ethyl	22.27	160.0	Amitraz	21.87	2
Azinphos-methyl	21.70	160.0	Benalaxyl	19.76	1
Bromophos-ethyl	17.79	302.8	Bitertanol	22.65	1
Butamifos	18.13	286.0	Chinomethionat	17.98	2
Cadusafos	13.56	158.9	Cyproconazole	18.97	2
(E)-Chlorfenvinphos	17.18	266.9	Dichlofluanid	16.39	2
(Z)-Chlorfenvinphos	17.40	266.9	Dicloran	14.11	1
Chlorpyrifos	16.55	198.9	Difenoconazole	25.15	3
Chlorpyrifos-methyl	15.62	285.9	Diphenylamine	12.98	1
Cyanophos	14.56	243.0	Fenarimol	22.14	1
Diazinon	14.62	179.1	Flusilazole	18.62	2
Dichlorvos	8.80	109.0	Flutolanil	18.26	1
Dimethoate	14.07	87.0	Imazalil	18.34	2
(Z)-Dimethylvinphos	16.61	294.9	Imibenconazole	26.99	1
Dioxabenzofos	13.46	215.9	Imibenconazole Met 1 ¹⁾	9.82	1
Disulfoton	14.88	88.0	Imibenconazole Met 2 ²⁾	18.76	2
Edifenphos	19.91	310.0	Iprodione	20.75	3
EPN	20.95	169.0	Iprodione metabolite	21.43	1
Ethion	19.30	152.9	Lenacil	20.01	1
Ethoprophos	13.02	157.9	Mefenacet	21.85	1
Etrnifos	14.97	292.0	Mepronil	19.58	1
Fenitrothion	16.25	277.0	Metalaxyl	15.90	2
Fensulfothion	19.20	292.0	Metolachlor	16.52	1
Fenthion	16.65	278.0	Metribuzin	15.65	1
Fosthiazate	17.09	194.9	Myclobutanil	18.60	1
Isofenphos	17.35	213.0	Paclobutrazol	17.99	2
Isofenphos oxon	16.73	228.9	Pendimethalin	17.19	2
Isoxathion	18.88	105.0	Pretilachlor	18.36	2
Malaixon	15.66	127.0	Procymidone	17.59	2
Malathion	16.40	173.1	Propanil	15.63	1
Methamidophos	8.76	94.0	Propiconazole	20.00	1
Methidathion	17.83	144.9	Pyridaben	22.88	1
Parathion	16.73	291.0	(E)-Pyrifenox	17.91	2
Parathion-methyl	15.77	262.9	(Z)-Pyrifenox	17.40	2
Phenthoate	17.50	273.9	Pyrimidifen	24.32	1
Phosalone	21.59	181.9	Pyriproxyfen	21.73	1
Phosmet	20.94	160.0	Tebuconazole	20.31	1
Pirimiphos-methyl	16.16	290.0	Tebufenpyrad	21.19	3
Prothiofos	18.36	309.0	Thenylchlor	20.21	1
Pyraclofos	22.39	360.0	Thiabendazole	17.67	2
Quinalphos	17.53	146.0	Triadimefon	16.77	
Terbufos	14.53	231.0	Triadimenol	17.61	1
Thiometon	13.92	88.0	Tricyclazole	18.60	1
Tolclofos-methyl	15.78	264.9	Triflumizole	17.60	2
Vamidothion	17.99	145.0	Trifluralin	13.25	3
			Vinclozolin	15.69	2

1) Imibenconazole Met 1 2,4-Dichloroaniline

2) Imibenconazole Met 2 Imibenconazole des benzyl type

表2 TD-PTV 条件

1) TD	TDU
Sample mode	Sample Remove
Flow mode	Splitless
Transfer temp	310°C
Initial temp	40°C
Delay time	1 min
Ramp rate	65°C/min
Final temp	300°C
Final time	6 min
2) PTV	CIS 4
GC injection mode	Solvent vent
Inlet liner	multibaffle liner (deactivated)
Total flow rate	50 mL/min
Vent flow rate	20 mL/min
Vent pressure	0 psi
Vent pressure until	0 min
Purge flow to split vent	50 mL/min
Purge flow to split vent start time	3 min
Initial temp	30°C
Initial time	0 min
Ramp rate	12°C/sec
Final temp	300°C
Final time	10 min

表3 TD-PTV 条件の検討パラメーター

(1) TD条件		
パラメーター	検討範囲	選択条件
1 脱着温度	220~300°C	300°C
2 脱着時昇温速度	30~720°C/min	65°C/min
3 脱着時間	1~9 min	6 min
4 脱着時流速	10~150 mL/min	50 mL/min
(2) PTV条件		
パラメーター	検討範囲	選択条件
1 捕集温度	-50~50°C	-30°C
2 移動温度	200~400°C	300°C
3 移動時昇温速度	2~12°C/sec	12°C/sec
4 移動時間	0.5~4 min	3 min

表4 TDU用チューブの不活性化処理の影響(n=3)

Pesticide	Area ratio* (Mean±SD)
Ethiofencarb	124 ± 6
Azinphos-methyl	125 ± 3
Captafol	129 ± 18
Dichlofluanid	129 ± 18
Propoxur	131 ± 8
Methiocarb	131 ± 9
Acephate	132 ± 5
Captan	137 ± 6
Carbaryl	141 ± 9
Carbofuran	143 ± 13
Bendiocarb	145 ± 11
Iprodione metabolite	183 ± 4
Dicofol	3.55 ± 32

* with deactivation/without deactivation

表5 混合抽出液からのSBSE法による農薬の回収率

Pesticides		Recovery (%)		Pesticides		Recovery (%)		Pesticides		Recovery (%)		Pesticides		
Organochlorine pesticides		Mean	RSD	Pyrethroid pesticides		Mean	RSD	Organophosphorus pesticides		Mean	RSD	Organonitrogen pesticides		
Aldrin	107	5	Acinathrin	96	4	Acephate	0	Acetamiprid						
Captafol	25	52	Bifenthrin	106	1	Azinphos-ethyl	90	3	Amitraz					
Captan	0		Cyfluthrin	119	3	Azinphos-methyl	88	2	Benalaxyl					
Chlorobenzilate	117	2	Cyhalothrin	112	2	Bromophos-ethyl	115	5	Bifentanol					
Chlorothalonil	96	3	Cypermethrin	117	6	Butamifos	118	0	Chinomethionat					
Chlorthal dimethyl	107	5	Deltamethrin	112	10	Cadusafos	101	3	Cyproconazole					
DDD-p,p	124	0	Etofenprox	116	4	Chlorfenvinphos-(E)	101	6	Dichlofluanid					
DDE-p,p	113	4	Fenprothrin	129	1	Chlorfenvinphos-(Z)	90	3	Dicloran					
DDT o,p	111	4	Fenvalerate	112	5	Chlorpyrifos	119	6	Difenoconazole					
DDT p,p	111	12	Flucythrinate	112	4	Chlorpyrifos-methyl	102	7	Diphenylamine					
Dicofol	58	4	Fluvalinate	94	1	Cyanophos	62	10	Fenadimol					
Deltrin	114	3	Halfenprox	84	5	Diazinon	95	8	Flusilazole					
Endosulfan sulfate	114	0	Permethrin	113	4	Dichlorvos	8	2	Flutolanil					
Endosulfan alpha	120	4	Silaflofen	40	2	Dimethoate	2	9	Imsazallil					
Endosulfan beta	114	3	Tefluthrin	111	6	Dimethylinphos (Z)	51	3	Imibenzazole					
Endrin	123	2				Dioxabenzofos	79	9	Imibenzazole Met 1					
HCH alpha	103	5				Dialifofos	95	10	Imibenzazole Met 2					
HCH beta	85	6				Edifenphos	92	2	Iprodione					
HCH-delta	90	3				EPN	126	7	Iprodione metabolite					
HCH-gamma	99	7				Ethion	117	3	Lenacil					
Heptachlor	107	7				Ethoprophos	54	7	Mefenacet					
Heptachlor epoxide	111	4				Etimfos	98	7	Mepronil					
Hexachlorobenzene	114	3				Fenitrothion	104	7	Metaxaryl					
Methoxychlor	119	6				Fensulfotthion	10	6	Metalachlor					
Pentachlorophenol	11	8				Fenthiion	105	7	Metribuzin					
Quintozene	113	5				Forthiazate	6	25	Myclobutanil					
						Isofenphos	132	1	Padobutrazol					
						Isofenphos oxon	14	17	Pendimethalin					
						Isoxathion	117	10	Pretlathlor					
						Malaoxon	3	37	Procymidone					
						Malathion	74	7	Propanil					
						Methamidophos	0		Propiconazole					
						Methidathion	51	5	Pyridaben					
						Parathion	104	5	Pyriflox-(E)					
						Parathion methyl	90	10	Pyriflox-(Z)					
						Phenthoate	108	2	Pyrimidifen					
						Phosalone	118	1	Pyriproxyfen					
						Phosmet	104	4	Tebuconazole					
						Pirimiphos-methyl	106	8	Tebuconazole					
						Prothiofos	115	5	Thiobenzoxazole					
						Pyraclifos	115	2	Thiobenzoxazole					
						Quinalphos	100	6	Triadimenol					
						Terbufos	107	4	Triadimenol					
						Thiometon	91	11	Tricyclazole					
						Tochlorfos-methyl	106	7	Triflumizole					
						Vamidothion	13	14	Trifluralin					
									Vinclozolin					

RSD: Relative standard deviation

RSD: Relative standard deviation

RSD: Relative standard deviation

RSD: Relative standard d

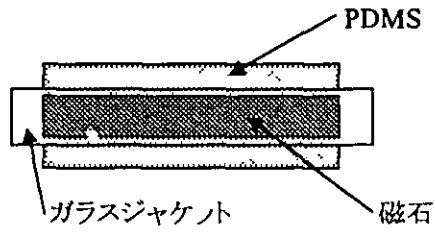


図1 攪拌子の構造



図2 一般的な SBSE 法の操作の流れ

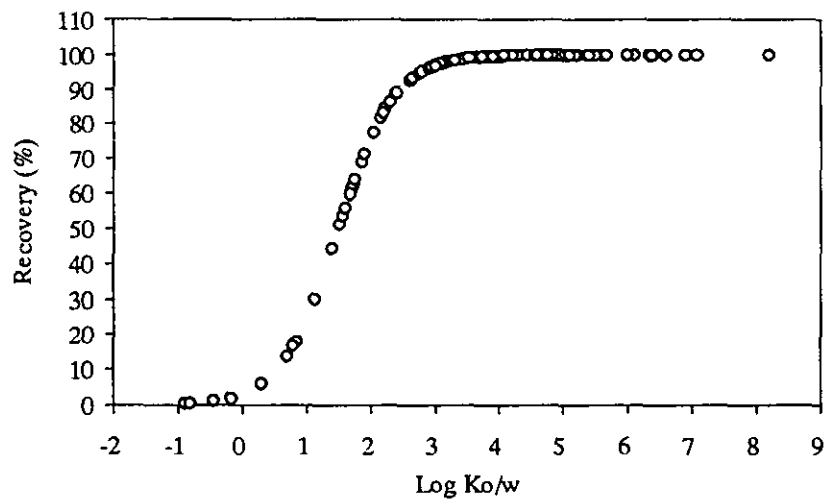


図3 農薬の K_{ow} と回収率との関係

回収率は $V_{SBSE} = 0.063 \text{ mL}^*$, $V_w = 2 \text{ mL}$ として(3)式から求めた計算値.

*長さ 10 mm-膜厚 10 mm の攪拌子の液相量

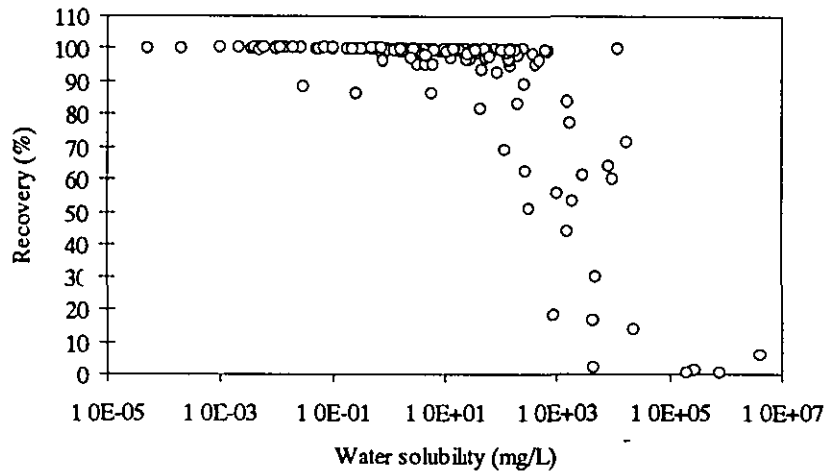


図 4 農薬の水溶解度(2)と回収率との関係

回収率は $V_{SSE} = 0.063 \text{ mL}^*$, $V_w = 2 \text{ mL}$ として(3)式から求めた計算値。

*長さ 10 mm-膜厚 10 mm の攪拌子の液相量

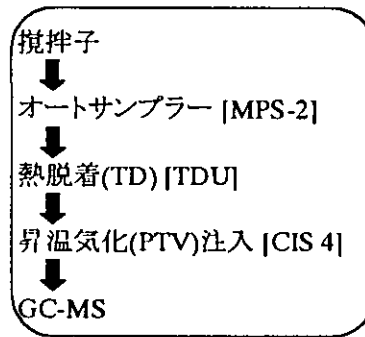


図 5 TD-GC-MS 分析の流れ

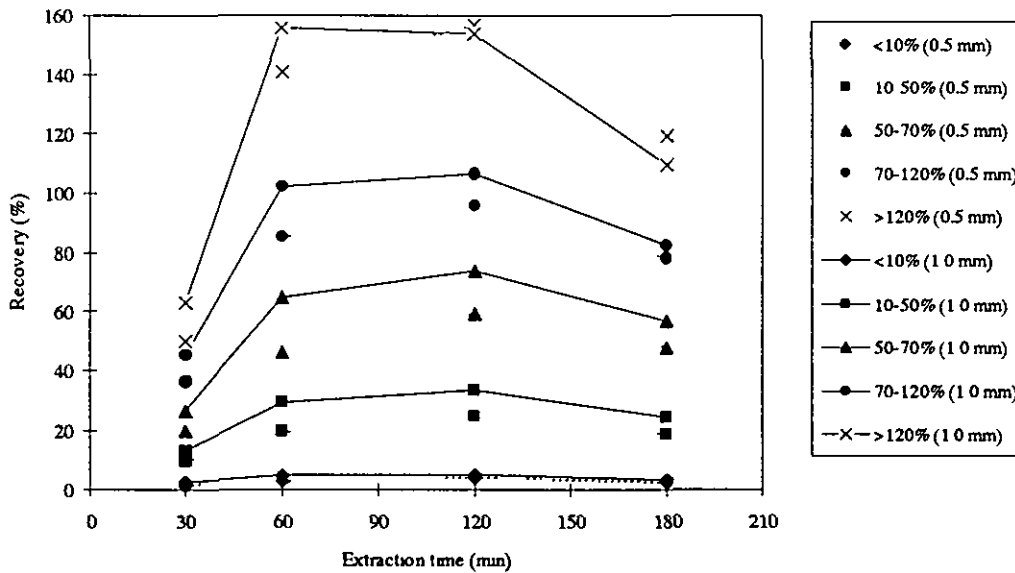


図 6 回収率に対する攪拌子の膜厚と抽出時間の影響

未処理の混合抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液 10 mL に農薬 10 ng を添加膜厚 0.5 mm で 2 時間抽出時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた。攪拌速度 1000 rpm。

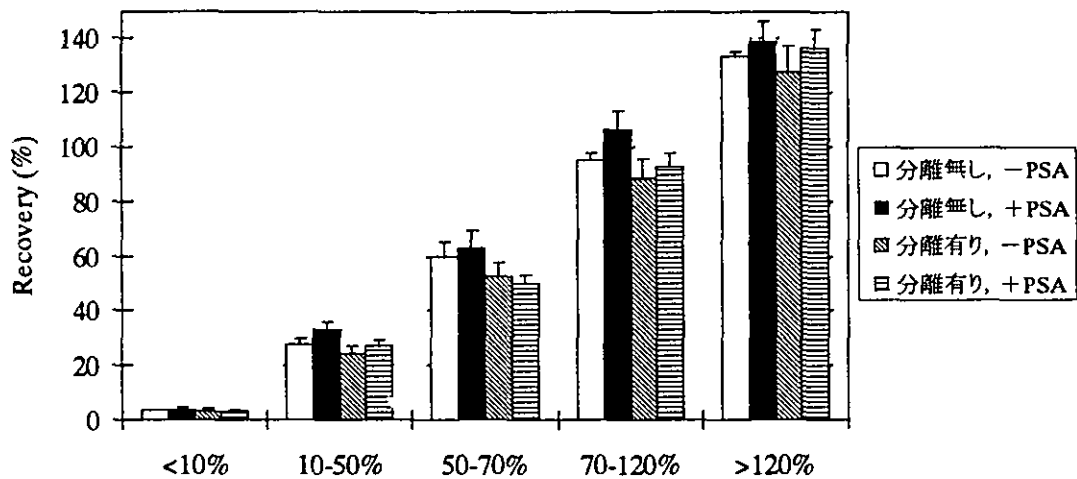


図7 回収率に対する水層分離処理及び PSA 処理の影響
 混合抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液 10 mL に農薬 10 ng を添加
 水層分離無し - PSA 処理なしの時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた。
 攪拌速度 1000 rpm 抽出時間 90 min.

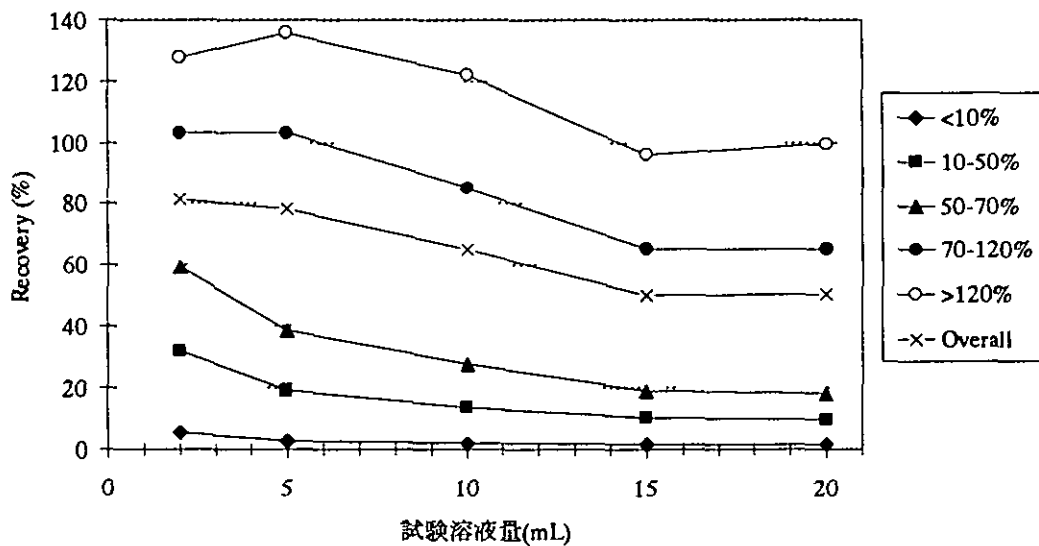


図8 回収率に対する試験溶液量の影響
 混合抽出液を水で 10 倍希釈した試験溶液に 0.5 ng/mL となるように農薬を添加。
 試験溶液量 2 mL の時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた
 攪拌速度 1000 rpm. 抽出時間 90 min

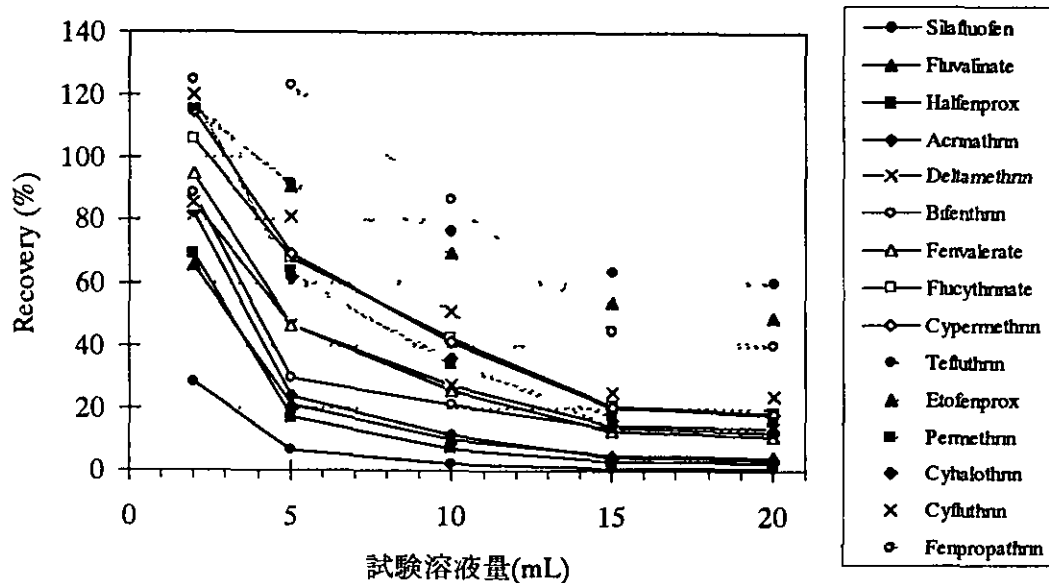


図9 ビレスロイド系農薬の回収率に対する試験溶液量の影響
 混合抽出液を水で10倍希釈した試験溶液に0.5 ng/mLとなるように農薬を添加
 試験溶液量2 mLの時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた。
 攪拌速度 1000 rpm. 抽出時間 90 min

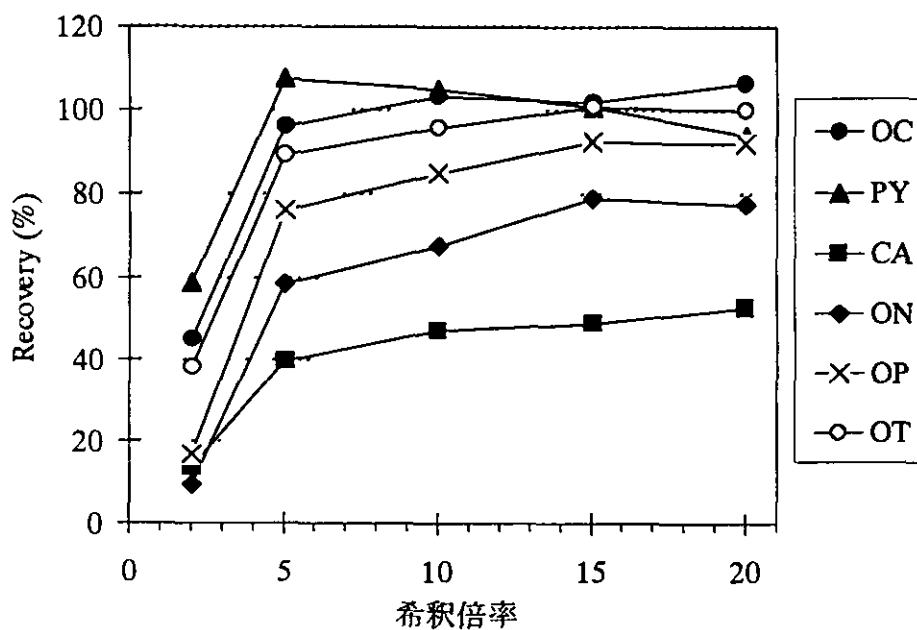


図10 回収率に対する希釈倍率の影響
 混合抽出液に5 ng/mLとなるように農薬を添加し水で希釈して試験溶液とした
 攪拌速度 1000 rpm. 抽出時間 90 min. 試験溶液量 2 mL
 農薬の種類毎に回収率の平均値を求めて結果を示した
 OC 有機塩素系農薬, PY ビレスロイド系農薬, CA カーバメート系農薬,
 OP 有機リン系農薬, ON 有機窒素系農薬, OT その他の農薬

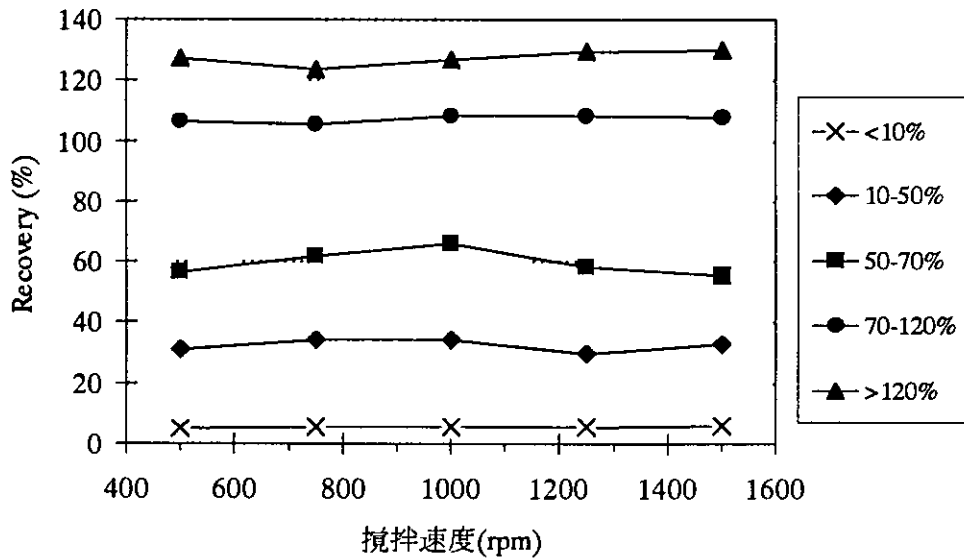


図 11 回収率に対する攪拌速度の影響
 混合抽出液に 5 ng/mL となるように農薬を添加し水で 10 倍希釈して試験溶液とした。
 500 rpm の時の回収率で農薬を分類し平均値を求めた。
 抽出時間 90 min 試験溶液量 2 mL

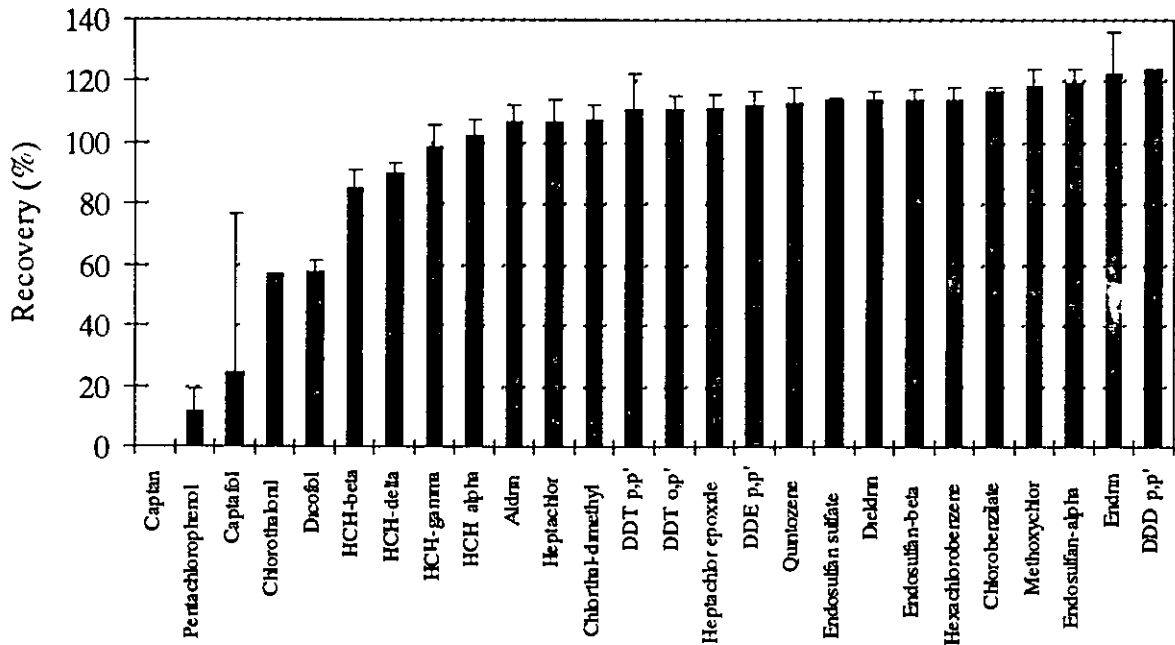


図 12-1 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率
 (有機塩素系農薬)

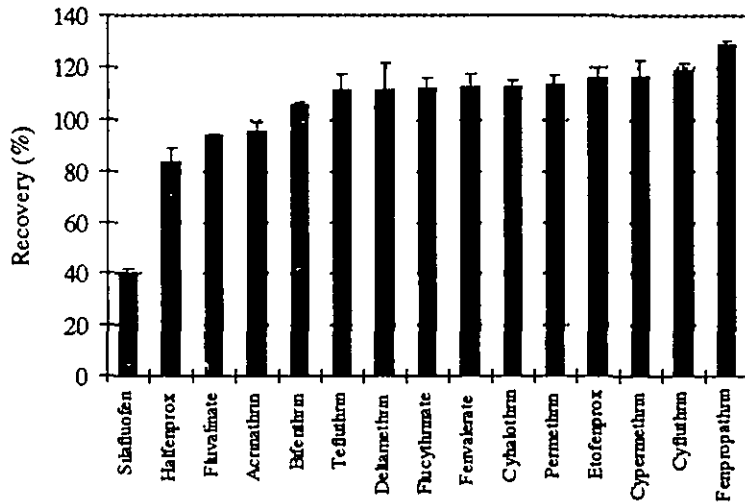


図 12-2 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率 (ピレスロイド系農薬)

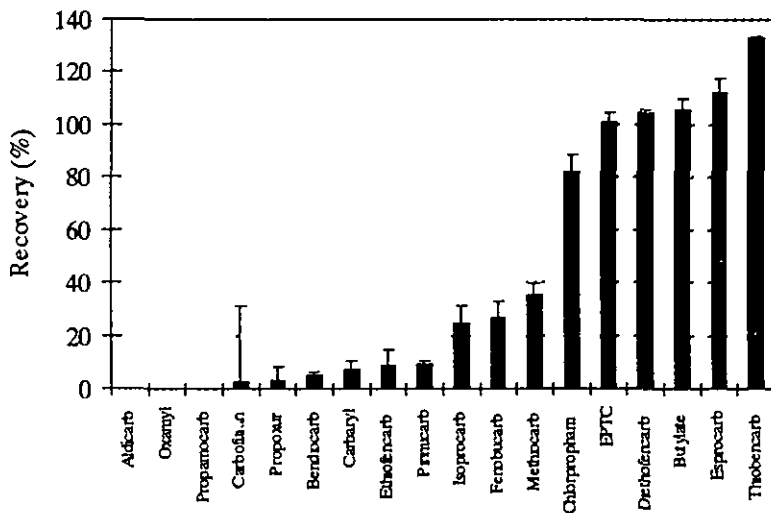


図 12-3 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率 (カーバメート系農薬)

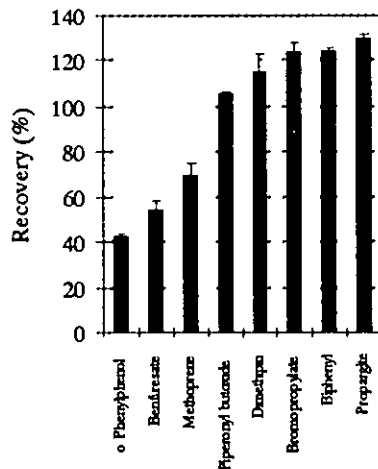


図 12-4 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率 (その他の農薬)

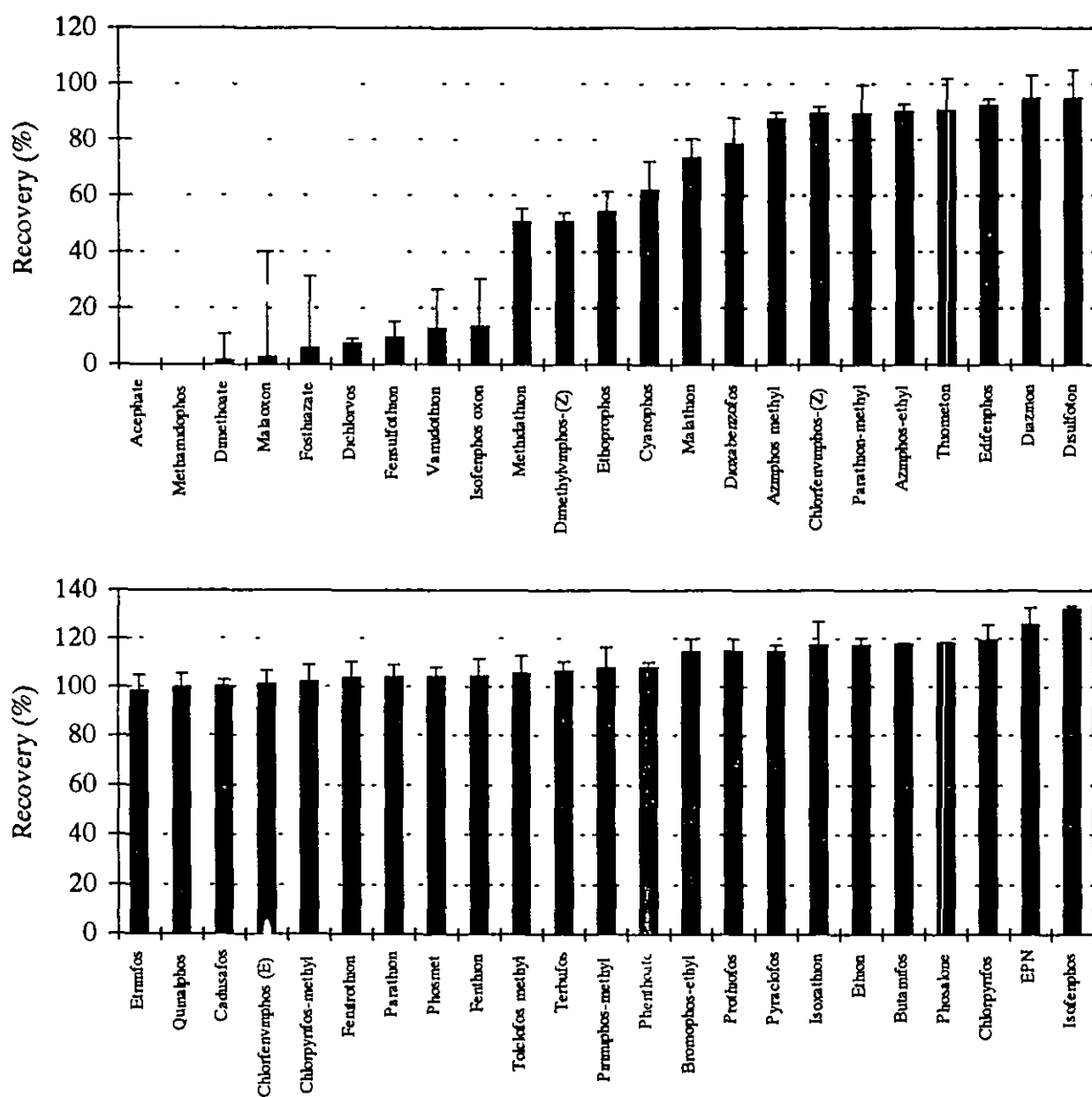


図 12-5 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率
(有機リン系農薬)

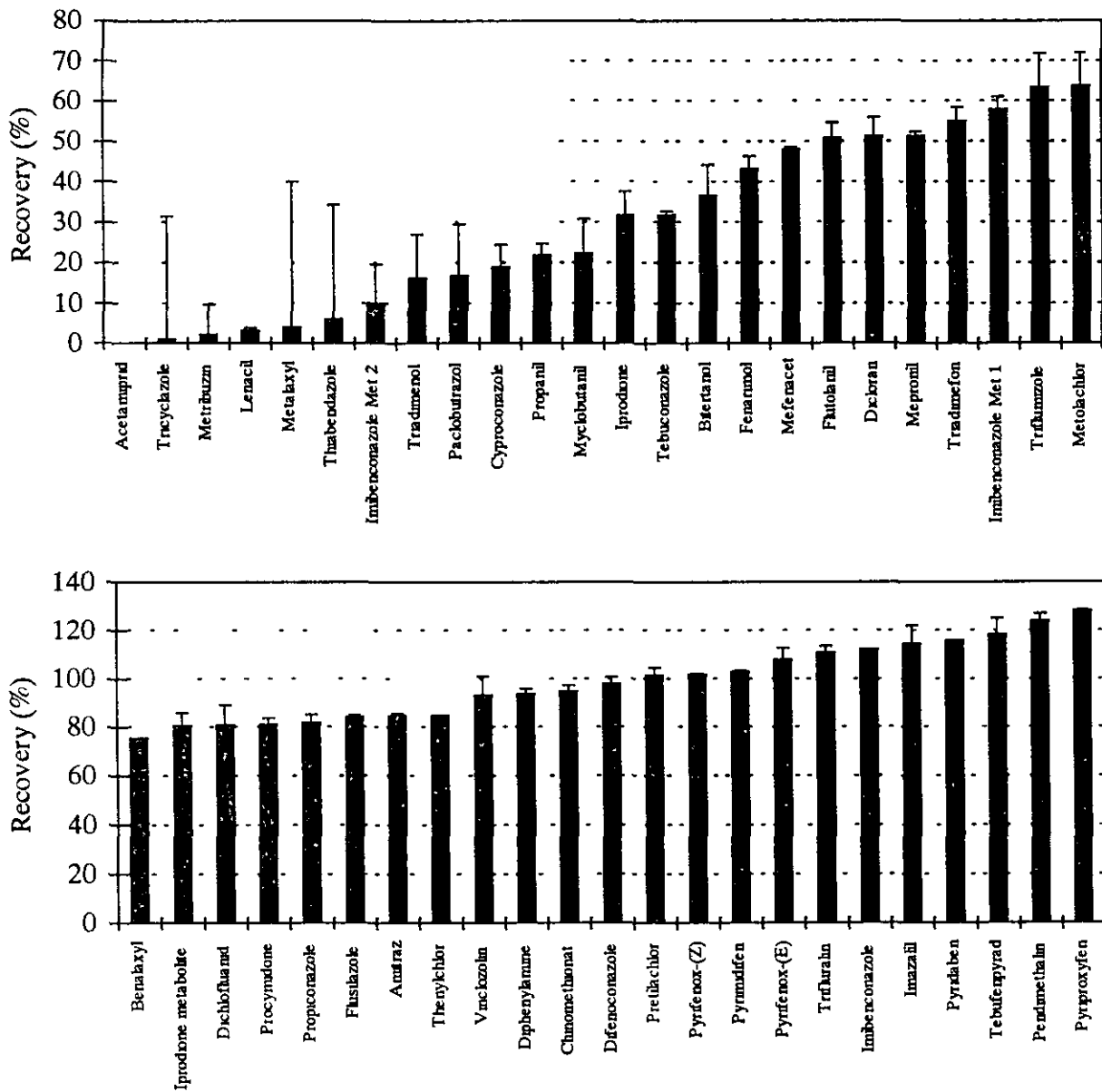


図 12-6 混合抽出液からの SBSE 法による農薬の回収率
(有機窒素系農薬)

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究
(3)GC-AED を用いる残留農薬分析の効率化と精度向上

分担研究者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

GC-ECD あるいは S フィルターを装着した GC-FPD 測定では、妨害が多く残留農薬分析を行う際には煩雑な前処理を行わなければならない、含硫黄作物(ネギ類、キノコ類)中の有機塩素系及び含硫黄農薬を、原子発光検出器付きガスクロマトグラフ(GC-AED)を用いて、簡易な精製により分析する手法を検討した

BHC, DDT など分子内に塩素のみを含む 25 農薬及びキャプタン、エンドスルファンなど塩素及び硫黄を含む 7 農薬の合計 32 種類について検討した。これらの農薬は塩素を測定ターゲットとしてすべて検出でき、これらのうち硫黄を含有する農薬については、その硫黄を測定ターゲットとしても検出が可能であった。

長ネギ、タマネギ及びシイタケに試料中の濃度がクロルフェナビル及びジコホールは 0.2ppm, その他の農薬は 0.1ppm となるように添加し、2 時間放置後、ミニカラムで簡易に精製して回収試験を実施した。抽出時に酸の添加が必要な TPN, キャプタン及びカブタホールを除くほとんどの農薬は 70%以上の回収率であった。

AED と ECD の検出器の違いによる測定結果の違いを ECD/AED の比で比較した。p,p'-DDT で 13~23 倍、クロメトキシニルで 12~19 倍の違いが見られるなど、検出器により定量値に大きな差が見られ、AED に比較して ECD ではより高い検出値が導かれることが多い傾向が観察された。次に、比較的妨害成分の多いカモミールの抽出液について、クロルピリホスを試料中濃度で 0.05ppm となるように添加し、AED(ターゲット元素: 塩素, 硫黄, リン), ECD, FPD 及び NPD を用いて測定し、得られたクロマトグラムを比較したところ、AED(塩素)以外の検出では、いずれも妨害成分の影響を受け、定量が困難であった。AED はやや検出感度は劣るものの、選択性が非常に優れているため、硫黄成分を多量に含む試料中の塩素を有する農薬の分析に有用であった。

研究協力者
永山敏廣 東京都健康安全研究センター

などの妨害物質が多く含まれていることから、残留農薬を試験する際には煩雑な前処理を行わなければならない等、分析が非常に困難であった。そこで、高い選択性を持ち、多くの種類の元素を同時に測定することができる原子発光検出器付きガスクロマトグラフ(GC-AED)を用いて、塩素及び硫黄を含有する農薬 32 種類について、簡易な精製によ

A 研究目的

現在、有機塩素系及び含硫黄農薬は、一般的に GC-ECD あるいは S フィルターを装着した GC-FPD を用いて測定を行っている。しかし、ネギ類、キノコ類は硫黄を含有する成分

り分析する手法を検討した。妨害成分が非常に多く分析が困難な硫黄を多く含む食品などの残留農薬を、簡易な前処理で分析することができれば、残留農薬分析の効率化が図れるとともに、分析精度の向上が期待できる。

B 研究方法

1 試料

東京都内で購入した長ネギ、タマネギ及びシイタケ

2 試薬及び試液

試薬 *n*-ヘキサン(ヘキサン)、アセトン、酢酸エチル及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用(和光純薬工業㈱または関東化学㈱製)を使用した

カートリッジミニカラム Sep-Pak plus Florisil (910 mg, Waters 社製)を使用した

農薬標準品 いずれも林純薬工業㈱、関東化学㈱、和光純薬工業㈱または Riedel-de Haen 社製の残留農薬試験用試薬を用いた。表1に検討に用いた農薬を示した

農薬標準原液 各農薬標準品をヘキサンで溶解して 1 mg/mL の濃度に調製し、冷凍庫(-20℃)に保存した

農薬標準混合溶液 各農薬標準原液をとり、ヘキサンを加えて 10 mg/mL の濃度に調製し、冷凍庫(-20℃)に保存した

3 装置

GC Hewlett Packard(HP)社製 HP5890 SERIES II

AED HP 社製 HP5921 A

4 GC-AED 測定条件

(1)GC 条件

カラム DB-5MS(0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度 50℃(1 min)→ 25℃/min → 125℃→ 10℃/min → 300℃(6.5 min)

試料注入口温度 250℃

ガス流量 ヘリウム 6.5 kgf/cm²

カラムヘッド圧 17.5 psi

注入方法 スプリットレス

注入量 2 μL

(2)AED 条件

ヘリウム供給圧 30 psi

窒素バージ流量 2 L/min

キャビティ圧 1.5 psi

キャビティ温度 250℃

トランスファーライン温度 250℃

検出波長 塩素 479 nm, 硫黄 181 nm

使用ガス 水素 2.1 kgf/cm²

酸素 2.3 kgf/cm²

5 試験溶液の調製

(1)抽出溶液の調製

細切した試料 20 g にアセトン-ヘキサン(2/3)混液 100 mL を加え、5 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過したろ紙上の残渣をヘキサンで洗浄し、吸引ろ過してろ液を合わせ、40℃以下で減圧濃縮した濃縮液に酢酸エチル-ヘキサン(1/4)混液 50 mL 及び 5%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、5 分間激しく振とうした有機層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、40℃以下で減圧濃縮した残留物をヘキサン 2 mL に溶かし、抽出溶液とした

(2)カートリッジミニカラムによる精製

抽出溶液 1 mL を、あらかじめアセトン-ヘキサン(1/9)混液 10 mL でコンディショニングした Sep-Pak plus Florisil カートリッジに負荷し、アセトン-ヘキサン(1/9)混液 10 mL で溶出した溶出液を 40℃以下で減圧濃縮し、残留物にヘキサン 1 mL を加えて溶かし、GC-AED 用試験溶液とした

6 添加回収試験

長ネギ、タマネギ及びシイタケに試料中の濃度がクロルフェナピル及びジコホールは 0.2 ppm, その他の農薬は 0.1 ppm となるように添加し、2 時間放置後、本法に従い回収試験を実施した

7 定性及び定量