

残留農薬迅速前処理のための多機能ミニカラムを用いたLC/MS対象農薬一斉分析法の検討

Simultaneous analysis of pesticides subjected to LC/MS using multifunctional mini-columns for rapid preparation of pesticide residues.

○国枝 巧、三浦 早紀、太田 茂徳、高柳 学 ジーエルサイエンス株式会社

目的

残留農薬分析において、前処理の作業効率を改善するため、抽出方法及び精製方法の簡略化が望まれている。以前、QuEChERS(EN)法で抽出した2-4 g相当のアセトニトリル抽出液を、溶媒転送することなく簡便に精製できる多機能ミニカラムInertSep AL-N/VRA-PRを作製した。本カラムを用いることで色素や脂肪酸を手軽に除去することができ、GC/MS対象農薬において良好な結果が得られている。今回、LC/MS対象農薬について検討を行うこととした。LC/MS対象農薬の前処理にあたって懸念される点は、酸性官能基を有する農薬類はSAXあるいはPSAなどの陰イオン交換樹脂に吸着してしまうため適用が困難となることである。これらの酸性農薬についてもInertSep AL-N/VRA-PRでの処理が可能であれば、本カラムの利便性をより拡張できると考えた。本検討では、酸性農薬を含めた基礎的な挙動を確認し、農作物における残留農薬一斉分析法の検討を行ったので報告を行う。

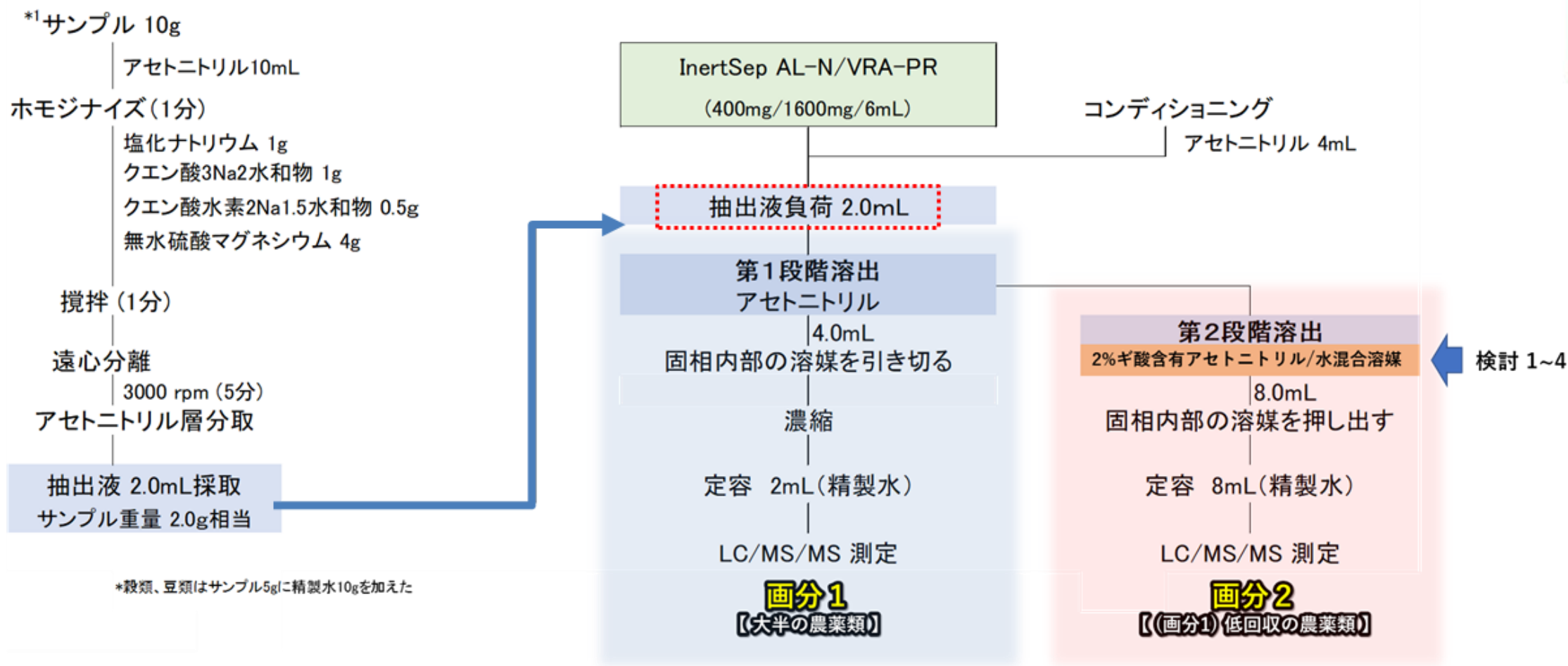
InertSep AL-N/VRA-PRによる前処理

InertSep AL-N/VRA-PR(400 mg/1600 mg/6 mL)とは・・・

- ✓ AL-Nの下にC18・SAX・PSAの3種類のクリーニング剤を混合した充填剤を充填させた精製用固相カラム
- ✓ QuEChERS法に沿った手法で得られたアセトニトリル抽出液 2.0 mL (2.0 g 相当) を、溶媒転送する事無くクリーニングアップするために設計されている



テーマ：酸性農薬を含めたLC/MS対象農薬の処理が可能な条件検討



分析方法

【対象農薬】

LC-MS対象農薬137成分
(LC/MS農薬混合標準液 #1,2,3,4,7,8,9,10 (販売元：ジーエルサイエンス))

【分析条件】

System	LC: Exion LC (サイエックス社製)
Column	MS: QTRAP6500+ (サイエックス社製) InertSustain C18 HP 3μm, 150×2.1mm I.D. (ジーエルサイエンス社製) A) 5mmol/L CH ₃ COONH ₄ in H ₂ O B) 5mmol/L CH ₃ COONH ₄ in CH ₃ OH
Eluent	A/B = 90/10 - 7min - 55/45 - 35min - 20/80 - 4min - 0/100 (5min hold) - 4min - 90/10 (10min hold)
Flow Rate	0.2 mL/min
Injection Vol.	5 μL
Col. Temp.	40°C
	MS/MS (ESI, Positive, Negative, MRM)
Detection	Positive CUR CAD IS TEM GS1 GS2 25 10 4500 400 70 70
	Negative CUR CAD IS TEM GS1 GS2 25 10 -4500 400 70 70

農薬類の回収試験結果①

本法によるLC/MS対象農薬の回収試験を行った。大麦、ほうれん草、にんじん、オレンジの抽出液に農薬の混合標準溶液を100 ng/mLとなるように添加し、InertSep AL-N/VRA-PRで処理を行った(n=3)。第1段階溶出（アセトニトリル）の回収率結果を示す。大半の農薬については良好な結果が得られたが、一部の農薬については回収率が低かった。回収できなかった成分の多くは酸性官能基を有する農薬であった。

表：抽出液スパイクによる第1段階溶出の回収率結果（成分数）

回収率 (%)	大麦	ほうれん草	にんじん	オレンジ
>150	0	1	0	0
120~150	1	1	2	1
70~120	106	110	111	96
30~70	13	8	7	15
<30	17	17	17	25

第1段階溶出で回収できなかった農薬17成分の第2段階溶出（2%ギ酸含有アセトニトリル/水(1:1)）での回収率結果を示した。その結果、酸性官能基を有する農薬の多くが第2段階溶出で溶出できていることが認められた。しかし、Dalapon、Trinexapac-ethyl、Fluazinamについては、回収率が低かった。

表：第1段階溶出で回収率が悪い農薬（17成分）に対する第2段階溶出での回収率（%）

No.	回収率 (%)	第1段階溶出				第2段階溶出			
		大麦	ほうれん草	にんじん	オレンジ	大麦	ほうれん草	にんじん	オレンジ
1	2,4-D	0	0	0	0	84	84	90	110
7	Asulam	0	0	0	0	60	57	74	72
14	Bensulfuron-methyl	0	0	0	0	96	96	98	95
15	Bentazon	0	0	0	0	92	97	104	90
26	Cinosulfuron	0	0	0	0	100	91	104	56
37	Dalapon	0	0	0	0	0	0	0	0
39	Dichlorprop	0	0	0	0	87	86	93	117
48	Ethoxysulfuron	0	0	0	0	91	88	97	76
56	Flazasulfuron	0	0	0	0	87	78	93	48
57	Fluazfop-P	0	0	0	0	77	80	84	65
58	Fluazinam	0	0	0	0	46	43	12	17
59	Flusulfamide	0	0	0	0	85	86	79	79
69	MCPPA	0	0	0	0	81	81	89	106
70	MCPP	0	0	0	0	82	86	89	72
104	Pyrazosulfuron-ethyl	0	0	0	0	91	66	100	49
131	Triclopyr	0	0	0	0	73	100	63	95
135	Trinexapac-ethyl	0	0	0	0	46	39	45	18

第1段階溶出、第2段階溶出を合わせると70~120%の回収率が得られた農薬類は大麦で137成分中119成分、ほうれん草で137成分中123成分、にんじんは137成分中124成分、オレンジでは137成分中106成分と良好な結果が得られた。

表：抽出液スパイクによる各溶出画分の回収率結果（成分数）

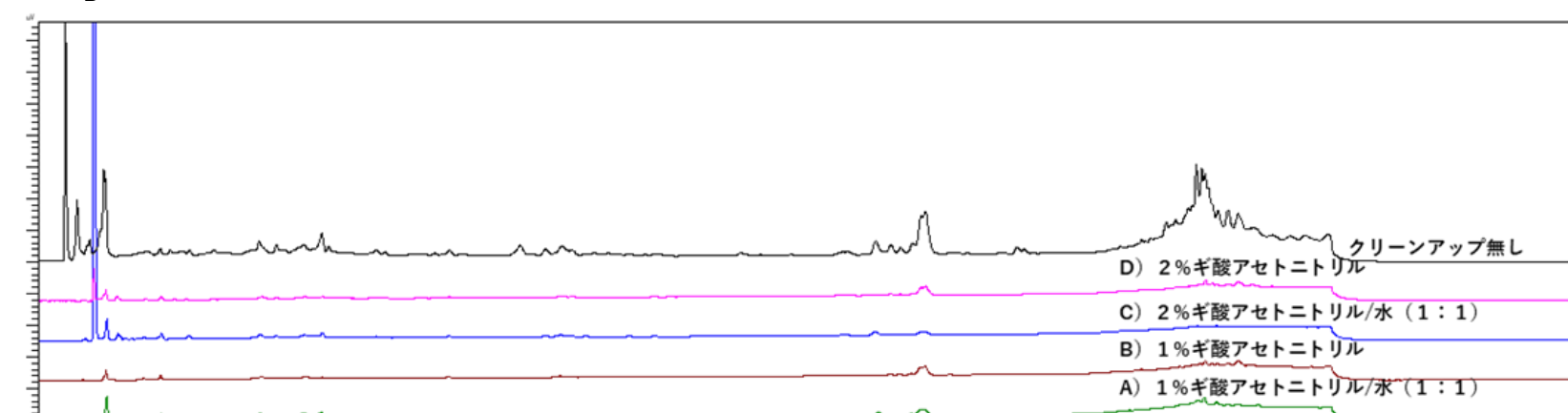
	大麦	ほうれん草	にんじん	オレンジ
第1段階溶出	106	110	111	96
第2段階溶出	13	13	13	10
計	119	123	124	106

一部の農薬の回収率が悪かった要因として溶出時に夾雑成分が漏出することによるマトリックス影響が考えられた。そのため各溶出溶媒を用いた際のバックグラウンドと溶出画分の確認（検討1~4）を行うこととした。

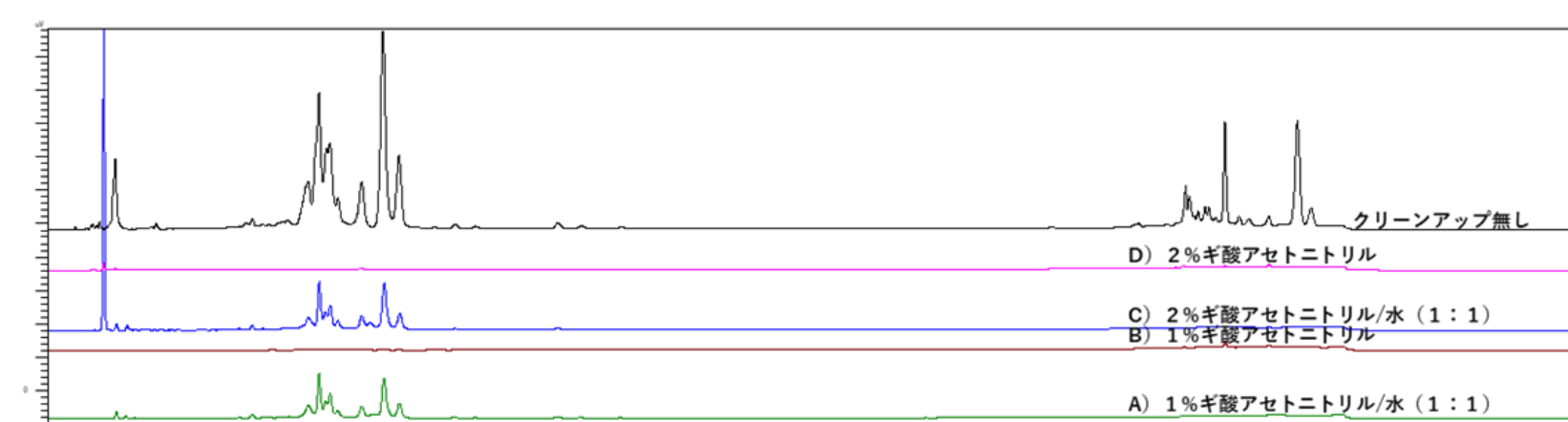
回収率改善に向けた溶出条件の検討1

【各溶出溶媒のバックグラウンドの確認、検討】

大麦、ほうれん草の抽出液を固相抽出カラムに通液後、第2段階で溶出した溶液を定容してHPLC-UV(254 nm)で分析を行った。結果、いずれの溶出溶媒もクリーニングアップをしなかった場合と比較すると一定の精製効果は得られていた。また、50%水を含有させた溶出溶媒(A、C)の方がアセトニトリル100%の溶媒(B、D)と比較してバックグラウンドが高い傾向にあった。溶出溶媒が含水していない方が精製効果が高いと考えられた。



図：大麦抽出液における各溶出溶媒のバックグラウンド比較 (UV:254 nm)

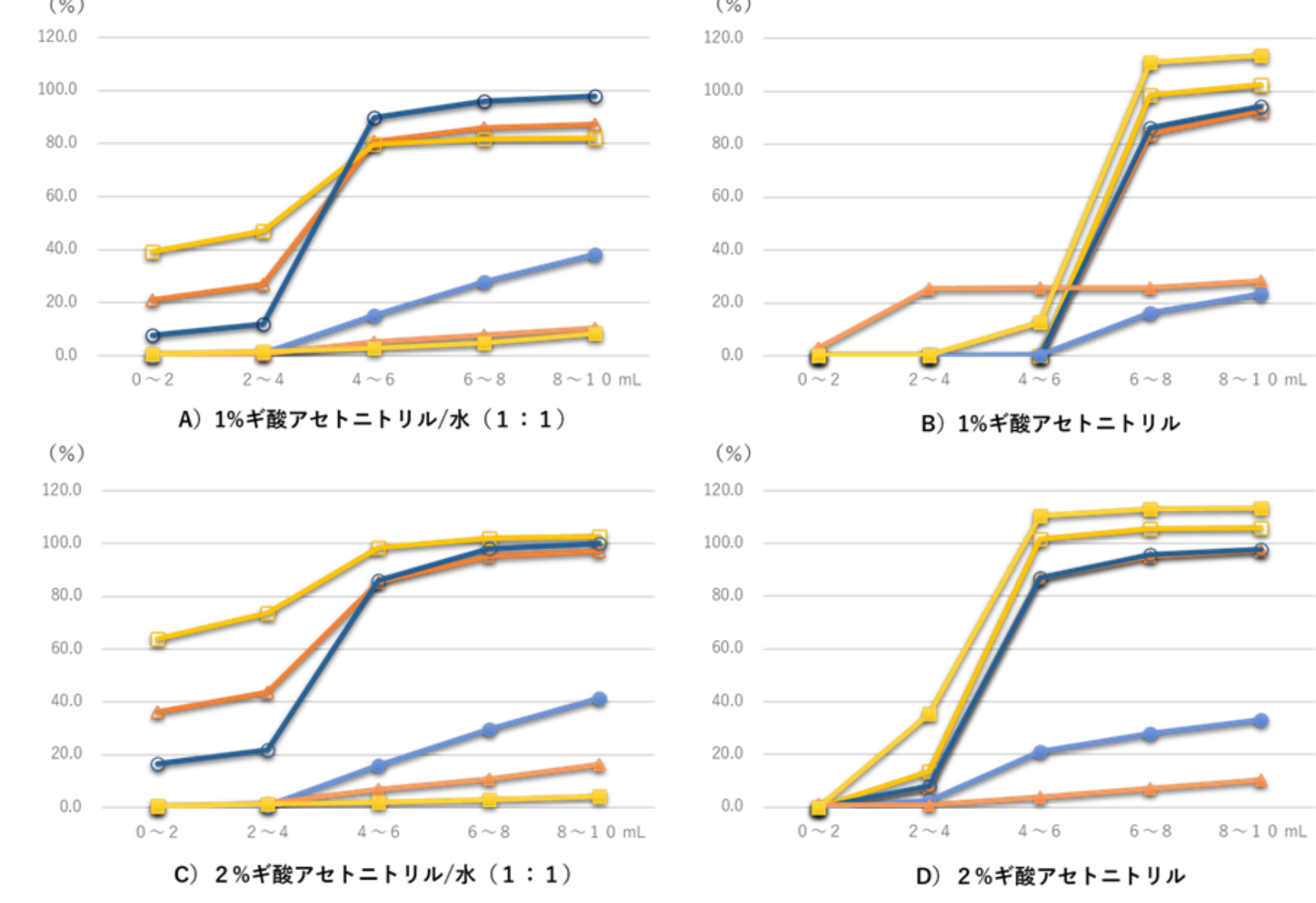


図：ほうれん草抽出液における各溶出溶媒のバックグラウンド比較 (UV:254 nm)

回収率改善に向けた溶出条件の検討2

【各溶出溶媒の溶出画分の確認、検討】

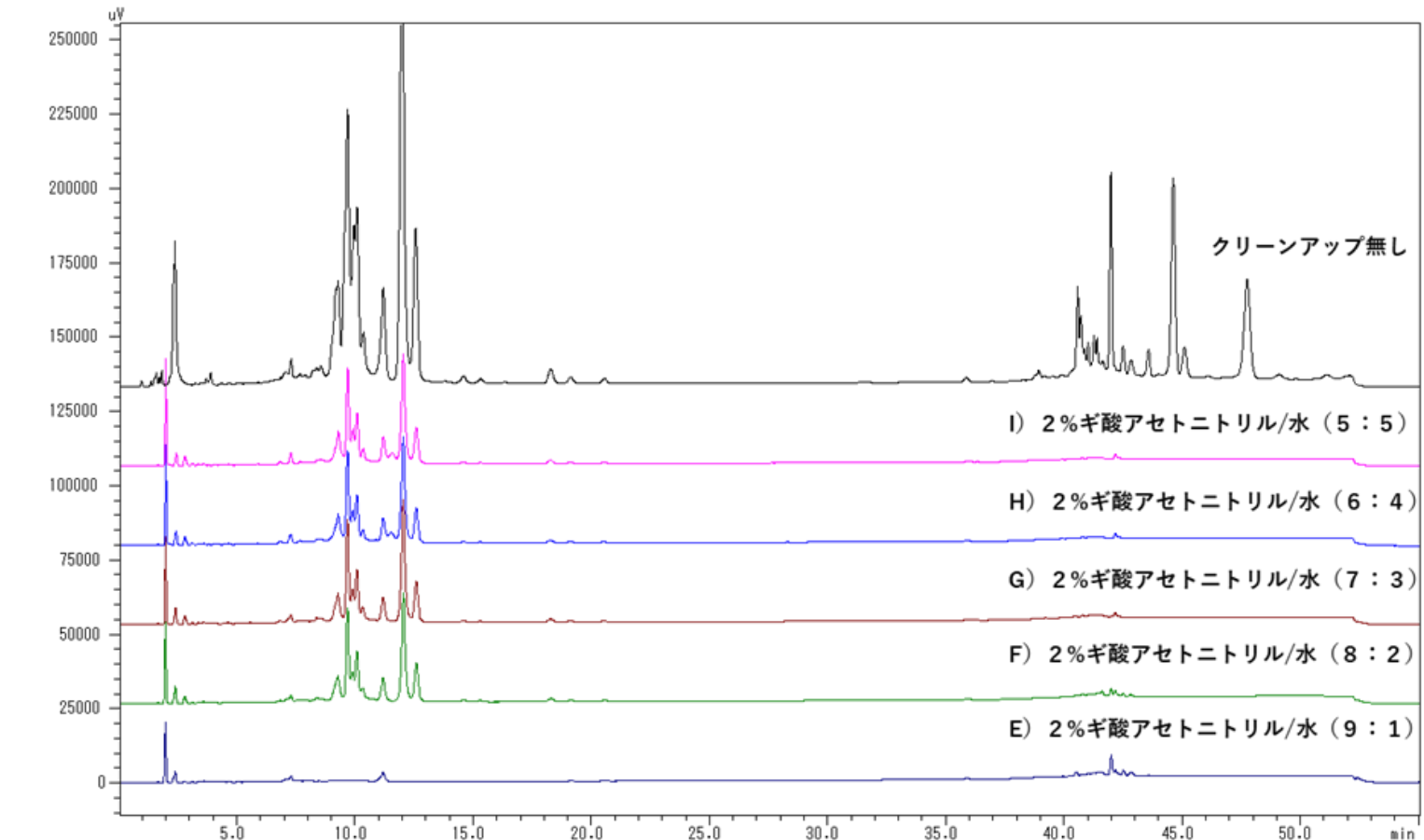
各溶出溶媒における農薬の溶出画分を確認した。アセトニトリルに農薬の混合標準溶液を添加し、第1段階溶出液を通過後の第2段階溶出液を2 mLずつ5回分画し、各溶出溶媒(A~D)における溶出画分の確認を行った。傾向として一定量含水させたアセトニトリル溶媒を用いた方が農薬類の溶出が早かった。最も溶出率の良かった溶出溶媒はC) 2%ギ酸アセトニトリル/水(1:1)であったが、Dalapon、Trinexapac-ethylの2成分については、どの溶出溶媒でも溶出ができなかった。Fluazinamについては50%水を含有したAやCの溶出溶媒では溶出しきれず、水を含まないアセトニトリルを用いたAまたはDの条件下でないと溶出できないことが分かった。



回収率改善に向けた溶出条件の検討3

【各溶出溶媒のバックグラウンドの確認、検討】

検討1、2の結果から、溶出溶媒に50%水を含有させるとバックグラウンドが高くなる傾向にあることが分かった。また、一部の疎水性の高い農薬についてはアセトニトリル比率が高くないと溶出できないことが分かった。この双方の結果を踏まえ、溶出溶媒の水の含有率を変更することでバックグラウンドと農薬回収率のバランスの取れた溶出条件が設定できるのではないかと考え、検討1と同様の方法でほうれん草をサンプルに用いて追加検討を行った。結果、溶出溶媒の含水率が20%以上(F、G、H、I)であると、10 min程度付近に夾雑成分が多く溶出される傾向にあった。しかし含水率が10%であるE) 2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)ではこのような現象は確認されず、精製効果が他と比較して高かった。

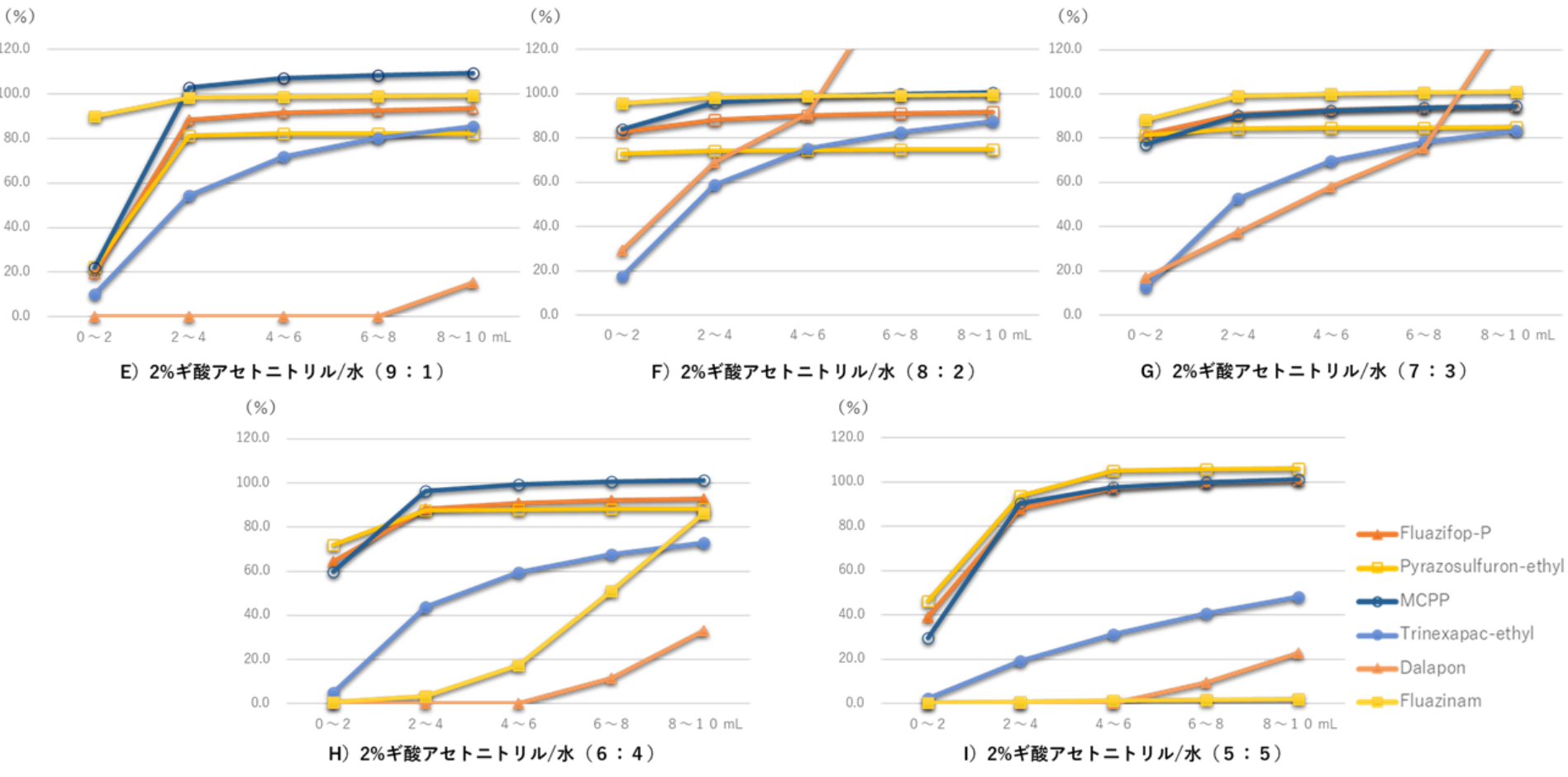


図：ほうれん草抽出液における各溶出溶媒のバックグラウンド比較 (UV:254 nm)

回収率改善に向けた溶出条件の検討4

【各溶出溶媒の溶出画分の確認、検討】

E) 2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)を用いた際、他と比較して最初の画分での回収率は低いものの、8mLの溶出容量で回収できることが分かった。Fluazinamについては含水率が高いと溶出率が低下する現象が確認され、含水率40%以上の溶出溶媒(H、I)では10 mLの溶出容量で全てを回収することができなかった。Trinexapac-ethyl (E、F、G)の溶出溶媒を用いた際に80%程度回収率が得られた。バックグラウンドの結果も踏まえ、溶出溶媒としてE) 2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)を用いることで、バックグラウンドと農薬類回収率の双方の点でバランスの取れた溶出条件であると考えられた。



農薬類の回収試験結果②

溶出条件の検討1~4の結果から、溶出溶媒に2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)を用いてLC/MS対象農薬の回収試験を行った。ほうれん草の抽出液に農薬の混合標準溶液を100 ng/mLとなるように添加し、InertSep AL-N/VRA-PRで処理を行った(n=3)。結果、これまで回収が出来なかったTrinexapac-ethyl、Fluazinamの回収率は良好な結果であった。第1段階溶出、第2段階溶出を合わせると137成分中、126成分が回収率70~120%の範囲内であった。更に多くの農薬に対して適用可能であることが示唆された。

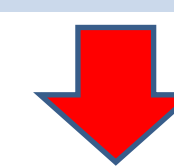
表：抽出液スパイクによる各溶出画分の回収率結果（成分数）

回収率 (%)	第1段階溶出	第2段階溶出	計
>150	3	0	
120~150	1	0	
70~120	112	14	126
30~70	4	2	
<30	17	1	

まとめ

以前から検討してきた多機能固相を用いた方法をベースに、LC/MS対象農薬における作物2 g相当に対応するための手法を検討した。

- (1) InertSep AL-N/VRA-PR(400 mg/1600 mg/6 mL)を用いることで作物相当量2 g中のLC/MS対象農薬の多くを同時に一度の処理で迅速一斉分析を行うことが可能であることが示唆された。
- (2) QuEChERS抽出液2 mL相当を簡便な操作で前処理することが可能となったが更に多くの農薬への適用性を検討するため、追加検討として溶出溶媒の検討1~4を行った。
- (3) 溶出溶媒の含水率を20%以上にすると精製効果が低い傾向にあった。
- (4) 溶出溶媒に2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)を用いることで疎水性の高い農薬を含め、幅広い物性の農薬に対して溶出が可能であった。
- (5) これらの結果よりバックグラウンドと農薬類回収率の双方の点でバランスの取れた溶出条件であると考えられた。



溶出溶媒に2%ギ酸アセトニトリル/水(9:1)を用いて回収試験を行った結果、ほうれん草では以前と比較して良好な結果が得られ、更に多くの農薬に対して適用可能であることが示唆された。他の農作物の回収試験は今後実施する予定である。

参考文献

- 1) 高柳ら, "より簡便な残留農薬分析用固相抽出カラム作成に向けた基礎的検討", 117回日本食品衛生学会要旨集(2021)
- 2) 国枝ら, "小型4層固相を用いた残留農薬分析における LC-MS/MS対象農薬への応用", 第43回農薬残留分析研究会要旨集(2020)