

## 食品残留農薬試験において固相抽出カラム GCB/PSA のロット変更により生じた回収率低下

坂元美智代、眞壁祐樹、宮田純枝、石井俊靖

### 要旨

GC-MS/MS による食品の残留農薬一斉試験において、キャプタン及びジクロフルアニドの回収率の大幅低下が起こったため、原因究明のための検討を行った。その結果、農薬の損失はグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (GCB/PSA) による精製段階で起こっていることが分かった。GCB/PSA の農薬溶出にロット差が認められ、回収率低下はロット差に起因するものと推測された。ロット差が生じた原因は、GCB/PSA のグラファイトカーボン (GCB) にあることが示唆された。

キーワード: 残留農薬、固相抽出カラム、グラファイトカーボン、GCB/PSA、回収率、キャプタン、ジクロフルアニド

Key words : Pesticide residue, Solid phase extraction column, Graphite carbon, GCB/PSA, Recovery, Captan, Dichlofluanid

### はじめに

2006年に、食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（以下、農薬等とする）について、一定量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度が施行され、食品に残留した農薬等は対象外物質を除いてそのすべてが規制されることになった<sup>1)</sup>。これに伴い農薬等の試験法の整備が進められ、一斉試験法及び個別試験法が通知された<sup>2)</sup>。また、通知法以外にも多くの試験法が開発され報告されている<sup>3~5)</sup>。これら食品衛生法に定められている規格基準への適合性について判断を行う試験は、「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」<sup>6, 7)</sup>（以下、妥当性評価ガイドラインとする）の基準を満たしていることを確認することとされている。

当研究所検査第二課においては、QuEChERS法<sup>8)</sup>を改変した一斉分析法<sup>9)</sup>にて食品の残留農薬試験を行っており、ガイドラインに従って妥当性評価を行うとともに、内部精度管理として添加回収試験を実施している。2010年度に試験法を導入して以来、妥当性評価及び添加回収試験における真度、回収率は概ね良好であったが、2014年よりキャプタン及びジクロフルアニドの回収率の大幅低下を認めた。そこで、回収率低下の原因究明を目的として検討を行ったところ若干の知見が得られたので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

千葉県産ほうれんそうを用いた。

#### 2. 試薬及び標準液等

##### 1) 試薬

リン酸は関東化学(株)製特級を、ポリエチレングリコール (PEG) 300 は和光純薬工業(株)製一級を、塩化ナトリウム (NaCl) 及び硫酸マグネシウム (MgSO<sub>4</sub>) は Agilent 社製 QuEChERS 抽出 SPE キットを、その

他の試薬は関東化学(株)製残留農薬試験用を使用した。

##### 2) 固相抽出カラム

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (C18) はジールサイエンス(株)製 InertSep C18 (1 g/6 mL) を用いた。その他、X社製のグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (GCB/PSA) 及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル単層ミニカラム (PSA) を用いた。

##### 3) 標準溶液

農薬標準品はキャプタン、ジクロフルアニドともに和光純薬工業(株)製残留農薬試験用標準品を用いた。各々の標準品をアセトンに溶解して 1000 µg/mL の標準原液を調製して、適宜アセトンまたは 0.025% PEG/アセトン：ヘキサン(1:1)で希釈・混合して使用した。

##### 4) 最終試験溶液

0.025% PEG/アセトン：ヘキサン (1:1) 溶液で定容した。高濃度の検体は PEG を 0.025% になるように添加してアセトン：ヘキサン (1:1) で希釈定容した。

#### 3. 装置および測定条件

GC-MS/MS : TSQ Quantum GC (サーモフィッシャーサイエンティフィック製)

カラム : Rxi-5SilMS (Restek 製 : 全長 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm)

昇温条件 : 50 °C (1 min) → 25 °C/min → 125 °C → 10 °C/min → 300 °C (5 min) → 10 °C/min → 310 °C (4 min)

He 流速 : 1 mL/min

注入口温度 : 240 °C

トランスファーライン温度 : 280 °C

イオン源温度 : 250 °C

注入量 : 2 µL (高圧スプリットレス)

イオン化法 : EI

測定モード : Timed SRM (サイクルタイム 0.3 sec)

## 4. 試験方法

## 1) 回収率低下要因の整理

回収率の低下要因（分析機器の異常、担当者の変更、手技の誤り等の人的要因等）を整理するために、2013年1月からこれまでの農産物に対する添加回収試験の回収率の変化を調べた。

## 2) 減圧濃縮及び窒素気流下乾固による農薬損失の有無の確認

前処理過程の減圧濃縮による農薬の損失の有無を確認するために、0.2 µg/mL 標準溶液 2 mL（添加回収試験の 0.1 µg/g 添加相当量）をアセトン：ヘキサン（1:1）25 mL に添加したものを減圧濃縮して、その後に窒素気流下で乾固して定容した。キャプタン及びジクロフルアニドを定量して回収率を求めた。

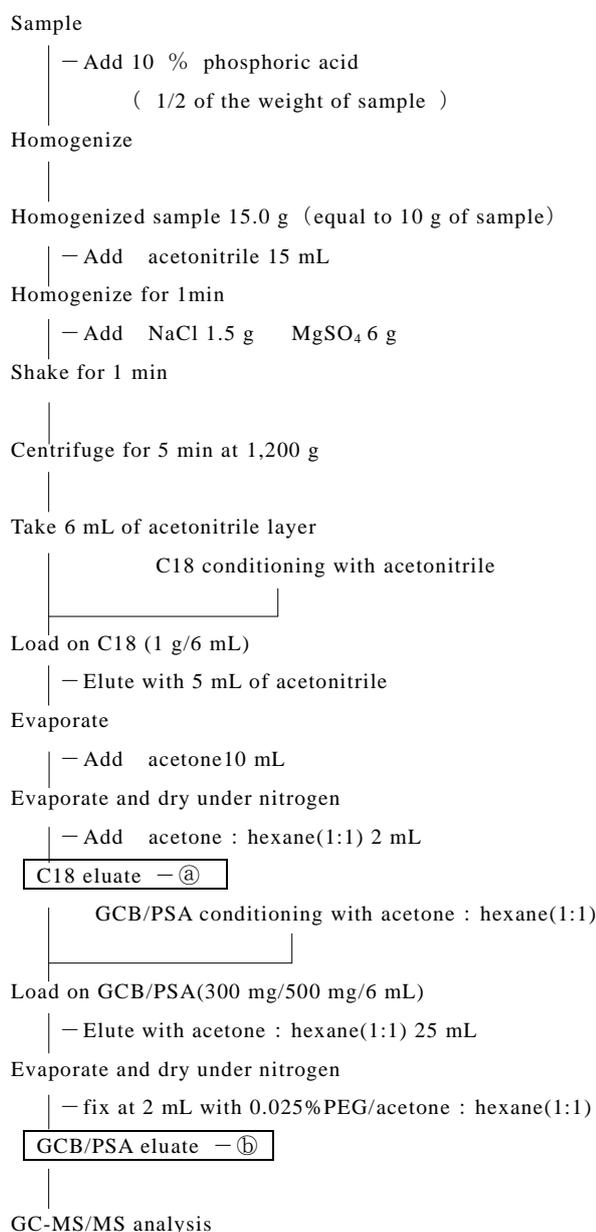


Fig.1 Analytical procedure for pesticides

## 3) 前処理過程における農薬の損失箇所の特定

ほうれんそうに標準溶液を添加して当所の試験法（Fig.1）のとおり前処理を実施し、①C18 溶出液、②GCB/PSA 溶出液におけるキャプタン及びジクロフルアニドの回収率を求めた。2 農薬の基準値が多く、多くの作物で 5 ppm であることから添加濃度は 5 µg/g とその 1/10 である 0.5 µg/g とした。

## 4) GCB/PSA カラムの新旧ロットの回収率比較

GCB/PSA の新旧ロットのキャプタン及びジクロフルアニド負荷時の溶出を比較した。比較対象として①新ロット GCB/PSA:2 農薬の回収率が 0% になった時期のもの（2014 年製造、300 mg/500 mg/6 mL）、②旧ロット GCB/PSA: 回収率が安定していた時期に製造されたもの（2010 年製造、500 mg/500 mg/6 mL）を用いた。旧ロットは新ロットと同一充填量のものが入手できなかったため、グラファイトカーボン充填量の多い 500 mg/500 mg/6 mL で代用した。また、③PSA 単層カラム：新ロットの GCB/PSA と同時期に製造されたもの（2014 年製造、500 mg/6 mL）との比較も行った。各ミニカラムに標準溶液 2 mL を 2 濃度（0.1 µg/g 添加相当量及び 5 µg/g 添加相当量）で負荷した。アセトン：ヘキサン（1:1）25 mL で溶出させ、減圧濃縮後に定量して回収率を求めた。

## 5) GCB 充填量、粒径及び GCB 供給元の違いが回収率に及ぼす影響

粒径 120-400 mesh の GCB（通常使用している GCB/PSA と同粒径の GCB）を 50、100、200、300 mg 充填した GCB/PSA 及び粒径 100-200 mesh の GCB を 50、100、200、300 mg 充填した GCB/PSA（いずれも PSA 充填量は 500mg）に、添加回収試験における 0.1 µg/g 添加相当量の標準溶液を負荷した。アセトン：ヘキサン（1:1）25 mL で溶出して、減圧濃縮後に定容して定量を行い、各々の回収率を比較した。また、GCB/PSA の構成材料となる GCB の、供給元の違いによる差を調べるために、通常使用している GCB/PSA（A 社供給 GCB を充填）と、それとは異なる供給元の GCB を充填した GCB/PSA（B 社供給 GCB を充填）にも同様に標準溶液を負荷して回収率を比較した。B 社供給 GCB を充填した GCB/PSA は、容量 300 mg/500 mg/6 mL、粒径 100-200 mesh のものを使用した。

## 結果および考察

## 1. 回収率低下要因の検討

回収率の変化を Table 1 に示した。作業工程に誤りはなく、分析機器等に異常は認められなかった。2013 年 4 月及び 2014 年 4 月に人事異動による担当者の変更があったが、変更時期と回収率低下の時期にずれがあるため原因として考えにくいと思われた。

Table 1 Recovery of Captan and Dichlofluanid (Spiked concentration : 0.1 µg/g)

Date	team	Sample	Recovery (%)		Lot of GCB/PSA (Date of manufacture)	
			Captan	Dichlofluanid		
2013/01	I	Rape blossoms	63.6	50.2	A (2012/10)	
		Rape blossoms	70.9	60.3		
		Taro	70.9	63.0		
2013/02		Strawberry	92.9	72.3		
		Strawberry	70.6	50.6		
2013/04		Potato	39.2	45.3		B (2013/01)
		Cabbage	78.1	30.8		
		Cabbage	81.4	64.4		
		Komatsuna	62.2	57.4		
2013/05		Carrot	82.0	74.8		C (2013/04)
	Cucumber	70.3	65.5			
	Onion	70.4	25.3			
2013/07	Melon	84.7	70.4	D (2013/05)		
	Tomato	90.5	58.2			
	Melon	84.5	64.1			
2013/08	Eggplant	82.0	78.0	E (2013/09)		
	Pumpkin	90.1	86.3			
	Japanese pear	88.8	70.5			
2013/09	Japanese pear	75.9	27.6	F (2013/11)		
	Japanese pear	103.8	75.4			
	Japanese pear	94.0	70.6			
2013/10	Burdock	91.3	86.2	G (2013/12)		
	Lotus root	93.3	75.0			
	Nira	85.6	62.7			
2013/11	Lotus root	83.4	72.9	H (2014/05)		
	Sweet potato	102.5	83.8			
	Chinese cabbage	70.9	6.5			
2013/12	Cabbage	79.6	22.0	I (2014/06)		
	Welsh onion	80.3	28.5			
	Chinese cabbage	52.3	8.5			
	Welsh onion	83.5	24.4			
	Chinese cabbage	36.4	0.0			
2014/01	Taro	74.0	27.4	J (2014/08)		
	Rape blossoms	59.6	5.6			
2014/02	Strawberry	75.6	29.5	J (2014/08)		
2014/03	Spinach	34.7	0.0			
	Japanese radish,root	95.6	50.4	J (2014/08)		
2014/04	Turnip,leaf	0.0	0.0			
	Spinach	32.9	0.4			
	Bamboo shoot	9.2	0.0			
	Zucchini	18.0	0.0			
2014/05	Spinach	13.1	3.1	J (2014/08)		
	Kidney bean, immature	88.7	1.7			
	Pea,immature	41.6	7.7			
2014/06	Broad bean	71.7	11.9	J (2014/08)		
	Tomato	40.9	6.3			
2014/07	Cucumber	38.2	2.2	J (2014/08)		
	Watermelon	0.0	1.2			
	Watermelon	0.0	1.3			
2014/08	Watermelon	0.0	1.7	J (2014/08)		
	Japanese pear	0.0	0.0			
	Japanese pear	0.0	0.9			
2014/09	Grape	0.0	0.0	J (2014/08)		
	Fig	0.0	0.0			
	Fig	0.0	0.0			
2014/10	Sweet pepper	0.0	0.0	J (2014/08)		
	Green soybean	0.0	0.0			
	Pineapple	0.0	0.0			
	Pineapple	0.0	1.9			
2014/11	Mushroom	0.0	0.0	J (2014/08)		
	Asparagus	0.0	4.3			
2014/12	UNSHU orange	0.0	0.0	J (2014/08)		
	Kiwifruit	0.0	0.0			

Table 2 Recovery of eluate during the preparation process (spiked sample : spinach)

	Recovery (%)			
	Captan		Dichlofluanid	
	Spiked 0.5 µg/g	Spiked 5 µg/g	Spiked 0.5 µg/g	Spiked 5 µg/g
① C18 eluate	125.3 (35.5)	111.4 (22.7)	85.4 (0.4)	95.7 (0.2)
② GCB/PSA eluate	6.4 (2.6)	52.2 (12.7)	1.5 (2.8)	33.4 (16.1)

Value : mean (RSD%)、n=3

Table 3 Comparison of current and previous GCB/PSA

Compound	Recovery (%)					
	① Current lot GCB/PSA 300mg/500 mg/6 mL		② Previous lot GCB/PSA 500 mg/500 mg/6 mL		③ PSA 500 mg /6 mL	
	Spiked 0.1 µg/g	Spiked 5 µg/g	Spiked 0.1 µg/g	Spiked 5 µg/g	Spiked 0.1 µg/g	Spiked 5 µg/g
Captan	0.0 (-)	80.1 (5.3)	70.2 (11.5)	96.3 (1.0)	84.8 (1.6)	102.4 (4.2)
Dichlofluanid	0.0 (-)	56.0 (13.3)	13.0 (82.5)	92.8 (1.6)	87.3 (3.1)	100.6 (2.1)

Value : mean (RSD%)、n=5

## 2. 減圧濃縮及び窒素気流下乾固による農薬の損失

減圧濃縮及び窒素気流下乾固のみを行った場合の回収率はキャプタンが 101.0 %、ジクロフルアニドが 111.6 %であったことから、減圧濃縮及び窒素気流下乾固の回収率への影響はないと考えられた。

## 3. 前処理過程における農薬の損失箇所

前処理過程の回収率を Table 2 に示した。①C18 溶出液の回収率は、5 µg/g 及び 0.5 µg/g の両添加濃度で 2 農薬ともに 85%以上と良好であったが、② GCB/PSA 溶出液のキャプタンの回収率は、5 µg/g 添加で 52.2%、0.5 µg/g 添加で 6.4%と低値であった。また、ジクロフルアニドも同様に低値傾向を示した。このことから、農薬の損失は①C18 溶出液の調製より後の、GCB/PSA への負荷、減圧濃縮、窒素気流下乾固及び最終試験溶液調製の工程で起こっていることが分かった。2. の結果より、減圧濃縮及び窒素気流下乾固の回収率低下への影響はないと考えられたため、GCB/PSA への負荷が回収率低下要因として最も疑われた。

GCB/PSA については、Table 1 に示したようにロット E への変更時にジクロフルアニドの回収率低下が認められ、ロット F への変更時にはキャプタン及びジクロフルアニドの回収率低下が認められた。ロット H 以降への変更時には回収率は継続してほぼ 0%となっており、GCB/PSA のロット変更が回収率の低下に何らかの関連があるものと思われた。

## 4. GCB/PSA 新旧ロットの回収率比較

各比較対象カラムの回収率を Table 3 に示した。新ロット GCB/PSA の 5 µg/g 添加相当濃度のキャプタンの回収率は 80.1 %、ジクロフルアニドは 56.0 %であった。0.1µg/g 添加相当濃度では両農薬とも 0 %

であった。旧ロットの回収率は、5 µg/g 添加相当濃度で両農薬とも 90 %以上、0.1µg/g 添加相当濃度のキャプタンが 70.2 %と比較的良好であり、0.1µg/g 添加相当濃度で新ロットとの間に差を認めた。新ロットと同時期に製造された PSA 単層ミニカラム (2014年製造) の回収率は、両農薬で 2 濃度ともに 80 %以上で良好であった。これらのことから新ロットの GCB/PSA の GCB 部分が、キャプタンおよびジクロフルアニドの回収率に影響を与えた可能性が示唆された。

## 5. GCB 充填量、粒径及び GCB 供給元の違いが回収率に及ぼす影響

GCB の充填量及び粒径ごとの回収率を Fig.2 に示した。充填量が増加するに従って回収率が低下して

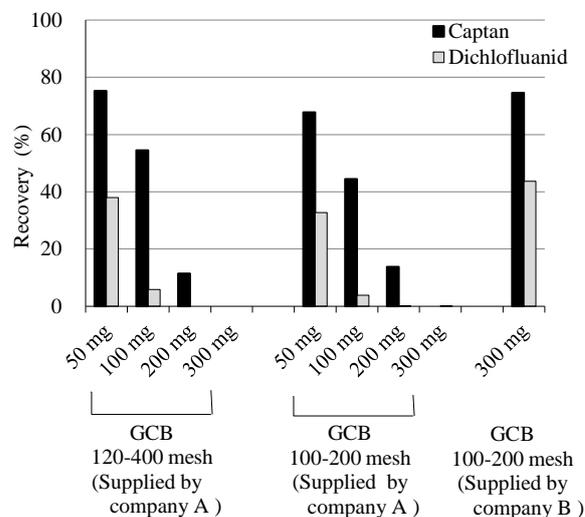


Fig.2 Effect of GCB particle size, filling volume, and supplier on recovery

おり、GCB が回収率に与えた影響が大きいことが分かった。粒径については、120-400 mesh と 100-200 mesh では明らかな差は認められなかった。粒径 100-200 mesh、充填量 300 mg の同一条件で、GCB の供給元が異なる場合の回収率を比較すると、A 社供給 GCB を使用した GCB/PSA では 2 農薬とも 0% であるのに対して、B 社供給 GCB を使用した GCB/PSA ではキャプタンで 75%、ジクロフルアニドで 44% と、供給元の違いにより差が認められた。同一の供給元で製造された GCB であっても、製造過程の変更があった場合は物性が変化して、回収率に影響するおそれがある。そこで、GCB/PSA 製造メーカーである X 社に聞き取り調査を行ったが、Table 1 に示した GCB/PSA の A 社供給 GCB の物性値に変更はなかったということであった。しかし、A 社での GCB 製造過程の詳細は X 社側が把握することができない事項とのことで、ロット差を生じた原因について確認することはできなかった。

### まとめ

食品の残留農薬試験において、2014 年より生じたキャプタンおよびジクロフルアニドの回収率低下は、GCB/PSA による精製過程で起こっていることが分かった。GCB/PSA にロット差が認められ、回収率低下はロット差に起因するものと推測された。GCB/PSA の PSA 部分の回収率への影響は認められず、GCB 部分が回収率に何らかの影響を与えたと考えられた。GCB の粒径の回収率への影響は認められなかった。一方で、GCB の供給元の違いによる回収率の差を認めたが、GCB 製造過程の情報を得ることはできなかった。

固相抽出カラムの使用にあたっては、製品のロット差を考慮して使用前にロット毎の溶出状況の確認を行うことが勧められている<sup>10)</sup> ことから、ロット差の存在の認識はあったものの、今回のような顕著なロット差は事前に想定し得なかった。また、このロット差は連続する複数のロットで起こっており、安定したロットの確保は不可能であった。

GCB を含む複層ミニカラムは農薬一斉分析で多用されているが、ロットによって農薬の保持・溶出挙動が大きく変化することがあるので選定・使用には十分な注意が必要である。妥当性評価だけでは発見が困難な、長期間の傾向分析を必要とする事例については、継続的な内部精度管理が発見に有効な対策と考えられる。また、このようなロット差を発見した場合は、妥当性確認済みの試験法であっても、試験法の性能をそのまま維持、保証することは困難となるため、何らかの対策が必要になると考えられる。

### 文献

- 1) 食品衛生法の一部を改正する法律，法律第 55 号，平成 15 年 5 月 30 日
- 2) 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について（別添），食安発第 0124001 号，平成 17 年 1 月 24 日
- 3) 畠山えり子，梶田弘子，菅原隆志，佐々木陽，高橋悟，小向隆志：限外ろ過法を用いた LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析，食品衛生学雑誌，47，137-145（2006）
- 4) 石井里枝，高橋邦彦，堀江正一：LC/MS/MS による農作物中の残留農薬一斉分析法，食品衛生学雑誌，47，201-212（2006）
- 5) 田村康宏，高野伊知郎，小林麻紀，富澤早苗，立石恭也，酒井奈穂子，他：GC 及び GC/MS による食品中残留農薬の系統別分析法，東京都健康安全研究センター研究年報，57，173-178（2006）
- 6) 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について，食安発第 1115001 号，平成 19 年 11 月 15 日
- 7) 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，食安発 1224 第 1 号，平成 22 年 12 月 24 日
- 8) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J. :Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int., 86, 412-431（2003）
- 9) 眞壁祐樹，高橋洋，榎本智子，相川建彦：GC-MS/MS による農産物中のリン酸処理残留農薬一斉分析法の妥当性評価，食品衛生学雑誌，55，188-192（2014）
- 10) 日本農薬学会：残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ，改訂 3 版 2012，89-91（2012）