

野菜中のジクワット・パラコート等分析における ミックスモード型イオン交換固相を用いた精製方法

増田葉・常松順子・木下誠

福岡市保健環境研究所保健科学課

Purification Method using Mixed-Mode Ion Exchange Solid-Phase for Analysis of Diquat, Paraquat, etc. in Vegetables

Shiori MASUDA, Junko TSUNEMATSU and Makoto KINOSHITA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

ジクワット、パラコート等の高極性農薬は、食品中の残留農薬分析で用いられる LC-MS/MS による多成分一斉分析が困難である。福岡市においても測定に対応できておらず、農薬の適正使用を確認するためには、迅速且つ簡便な分析法の確立が急がれる。そこで今回、野菜中に残留する高極性農薬の一斉分析法の開発を目的として、ミックスモード型イオン交換固相を用いた精製方法を検討した。抽出方法は個別試験法を参考に水を用いた抽出を選択し、水のみでは遠心分離の際に固形物が沈殿しなかったためアセトニトリルを添加した。分離精製はミックスモード型弱陽イオン交換固相カラムである WCX FF を選択し、アセトニトリル/水/ギ酸 (5:4:1) を溶出溶媒にすることで良好な回収が得られた。水を用いた抽出液における精製方法の検証として、ブロッコリー抽出液への低濃度 (0.01 ppm : 一律基準値相当) 及び高濃度 (0.1 ppm 相当) の添加回収試験を行った結果、検討した 7 成分中 6 成分で選択性、真度及び併行精度が目標値を満たした。

Key Words : 農薬 pesticides, ジクワット diquat, パラコート paraquat, ミックスモード型弱陽イオン交換固相 mixed-mode weak cation exchange solid-phase, 高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

1 はじめに

ジクワット及びパラコートは、強塩基性を持つ極性農薬であり、水溶解度が非常に高いのが特徴である¹⁾。非選択性除草剤として野菜で登録があり、作物を枯らしにくく安価であることから広く使用されている。ジクワット、パラコート等の高極性農薬は通常の食品中の残留農薬分析で用いられる LC-MS/MS による多成分一斉分析が困難なため、福岡市においても測定に対応できておらず、出荷前の青果物における農薬の適正使用を確認するためには、迅速且つ簡便な分析法の確立が急がれる。そこで今回、野菜中に残留するジクワット、パラコート等の高極性農薬の一斉分析法の開発を目的として、ミックスモード型イオン交換固相を用いた精製方法を検討した。

2 実験方法

2.1 試料

市販品 (輸入冷凍野菜) のブロッコリーを用いた。

2.2 標準品・試薬等

標準品：メルク社製アシュラム標準品、富士フィルム和光純薬社製 CPMF 標準品、富士フィルム和光純薬社製フロニカミド標準品、関東化学社製ニテンピラム標準品を用いた。

混合標準品：富士フィルム和光純薬社製 農薬混合標準液水質-7 (イミノクタジン, ジクワット, パラコート 各 20 µg/mL) を用いた。

標準原液：標準品及び混合標準品をアセトニトリルに溶解し、適宜希釈した。

検量線用混合標準溶液：各標準原液を混合し、超純水：アセトニトリル（8:2）で希釈して 1~1000 ng/mL の溶液を調製した。

アセトニトリル：LC-MS 用を用いた。

メタノール：LC-MS 用を用いた。

酢酸アンモニウム：LC-MS 用を用いた。

ギ酸：LC-MS 用を用いた。

蒸留水：アドバンテック東洋社製 RFD240 により製造した蒸留水を用いた。

超純水：アドバンテック東洋社製 RFU666HA により製造した超純水を用いた。

2.3 装置・器具等

ホモジナイザー：IKA 社製 T18 digital UL-TRA-TURRAX®

振とう機：タイテック社製 RECIPRO SHAKER SR-2w

遠心機：トミー工業（株）製 冷却遠心機 CAX-571

ろ紙：ADVANTEC®東洋濾紙（株）製定量ろ紙 5 種 A

固相カラム：ジーエルサイエンス社製 InertSep WCX FF（500 mg / 20 mL）

窒素吹付式濃縮装置：Biotage 社製 TurboVap LV

0.2 μm メンブレンフィルター：アドバンテック東洋社製 13HP020AN

PP 製遠沈管：エッペンドルフ社製コニカルチューブ（50 mL 容，15 mL 容）

バイアル：ジーエルサイエンス社製 1.5 mL 褐色目盛り付き PP 製バイアル

LC-MS/MS：

LC 部；アービー・サイエックス社製 EXION LC AD SYSTEM

MS 部；アービー・サイエックス社製 QTRAP6500+

2.4 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に、対象化合物の測定イオン等を表 2 に示す。MS/MS 条件は、MRM 条件を最適化し、イオン強度の強い MS/MS トランジション、DP 及び CE の組み合わせを測定条件として選定した。

2.5 試験溶液の調製

抽出フローを図 1 に、精製フローを図 2 に示す。試料 10 g に蒸留水を 25 mL 加え、10000 rpm で 1 分間ホモジナイズした。その後アセトニトリルを 10 mL 加え、1 分間横振とうし、10000×g で 5 分間遠心分離を行った。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

分析カラム	GLサイエンス株式会社製 InertSustain AX-C18 (150 mm×2.1 mm I.D., 3 μm)
流速	0.2 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
移動相	A液：20 mM 酢酸アンモニウム in (水/アセトニトリル (1:1)) B液：0.5% ギ酸
グラジエント条件	B液：98% (0 min) →98% (2 min) →50% (5 min) →50%(10.00 min)→98%(10.10 min)→98%(16 min)
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI (ポジネガスイッチング)
カーテンガス (CUR)	35 psi
脱溶媒温度 (TEM)	300°C
ネブライザーガス (GSI)	70 psi
ターボガス (GS2)	70 psi
コリジョンガス (CAD)	9 psi
イオンスプレー電圧 (IS)	4,500 V

表 2 対象化合物の測定イオン等

No.	化合物名	保持時間 (min)	Q1(m/z)	定量イオン			確認イオン		
				Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)	Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)
1	アシュラム	8.1	231.0	92.0	61	31	155.9	61	17
2	CPMF	2.4	212.0	126.0	36	31	99.1	36	59
3	ジクワット	1.3	182.9	157.0	86	31	130.1	86	45
4	フロニカミド	8.6	227.9	80.9	-45	-12	146.0	-45	-30
5	イミノクタジン	2.4	178.6	100.0	81	21	69.0	25	8
6	ニテンピラム	6.8	271.0	126.0	60	37	237.2	60	23
7	バラコート	1.3	186.1	171.0	46	27	77.0	46	51

DP : Declustering Potential

CE : Collision Energy

上層を 5A ろ紙でろ過し、ろ液を蒸留水で 50 mL に定容したものを抽出液とした。抽出液 5 mL を分取して溶媒除去し、蒸留水で 10 mL に定容したものを精製用抽出液とした。WCX FF は、メタノール 5 mL 及び蒸留水 10 mL で予めコンディショニングして使用した。精製用抽出液 10 mL を WCX FF に負荷し、固相を超純水 2 mL で洗浄した。アセトニトリル/水/ギ酸（5:4:1）5 mL で溶出し、窒素吹付濃縮装置で 5.5 mL まで濃縮した後、超純水で 10 mL に定容したものを 0.2 μm フィルターでろ過し、WCX 処理試験溶液とした。

2.6 定量

検量線用混合標準溶液 100 μL に、試料から調製した WCX 処理試験溶液 900 μL を加え、マトリックス添加混合標準溶液とした。低濃度（0.01 ppm：一律基準値相当）添加（以下、「低濃度」とする。）は 0.5~5 ng/mL の範囲で、高濃度（0.1 ppm 相当）添加（以下、「高濃度」とする。）は 1~15 ng/mL の範囲でマトリックス添加混合標準溶液を調製した。マトリックス添加混合標準溶液及び試験溶液 20 μL を LC-MS/MS へ注入し、ピーク面積値を用いた絶対検量線法で各成分を定量した。

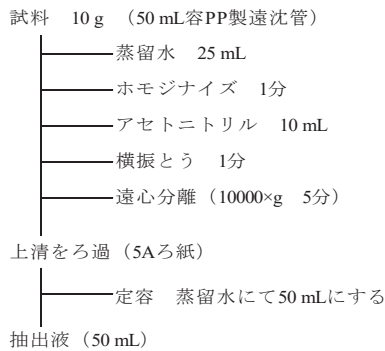


図1 抽出フロー

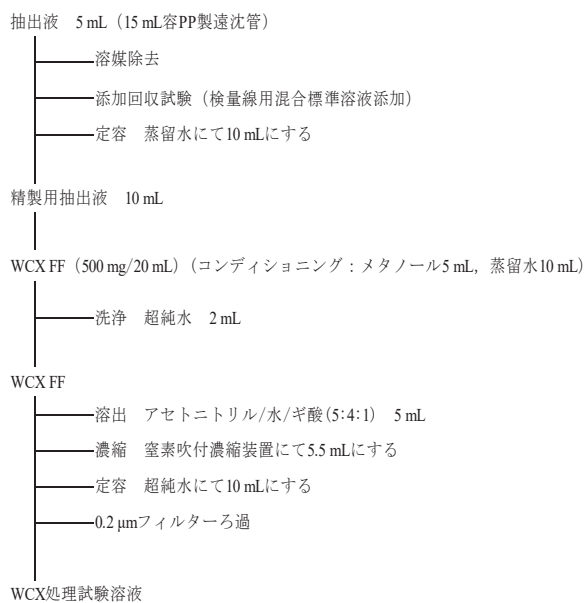


図2 精製フロー

2.7 抽出液への添加回収試験

抽出液 5 mL を分取して溶媒を除去し、低濃度は 100 ng/mL 検量線用混合標準溶液を、高濃度は 1000 ng/mL 検量線用混合標準溶液を各 100 μ L 添加後、蒸留水で 10 mL に定容したものを精製用抽出液とした。精製用抽出液を 10 mL 分取し、図 2 に示す方法で精製した。低濃度は 5 併行、高濃度は 3 併行で操作を行い、調製した WCX 処理試験溶液を LC-MS/MS で測定した。

3 結果及び考察

3.1 LC 条件の検討

分析カラムは InertSustain AX-C18 を用いた。シリカゲルに C18 基と第三級アミノ基を化学結合させたミックスモードの逆相カラムであり、疎水性相互作用と陰イオ

ン交換の両方の保持機構が働くため、通常の C18 カラムでは保持が難しい高極性化合物の分析が可能であった。検量線用混合標準溶液を水：アセトニトリル (8:2) で調製したところ、0.5 ng/mL マトリックス添加混合標準溶液の全ての対象成分においてピーク形状が良好なクロマトグラムが得られた。表 1 の測定条件における適切な注入量を、20 μ L と 40 μ L で検討した結果、注入量 20 μ L で良好な形状且つ S/N 比が 10 以上の十分な感度のピークが得られた。マトリックス効果低減のためにも、今回検討した最小量である 20 μ L を注入量とした。

3.2 前処理方法の検討

3.2.1 抽出方法

ジクワット及びパラコートはガラスに吸着することが報告されているため¹⁾、試験器具はポリプロピレン製を用いた。

抽出方法は、ジクワット、パラコート等の個別試験法を参考に、水を用いた抽出を選択した。水のみでは遠心分離の際に固形物が沈殿しなかったため、佐々野らの方法²⁾を参考にアセトニトリルを添加した。固相抽出への影響を考慮し、抽出液 5 mL から精製用抽出液を調製する際に窒素吹付濃縮装置で溶媒を除去することとした。

3.2.2 精製方法

小林らの報告¹⁾を参考に、前処理に用いる固相カラムとして WCX FF (500 mg / 20 mL) を用いた。WCX FF は弱陽イオン交換及び逆相分配の 2 つの保持能を併せ持つミックスモード固相カラムであり、第四級アンモニウム等の強塩基性化合物の選択的抽出に適しているとされている。精製用抽出液の負荷溶液量について、10 mL と 25 mL で検討した結果、負荷量が多い方が回収率は低かったため、10 mL を選択した。溶出溶媒について、小林らはアセトニトリル/ギ酸 (9:1) で検討している。当所の操作フローでは固相カラム通過後の溶出液を濃縮する工程があるため、濃縮時間短縮のために小林らの検討よりも溶出溶媒中のアセトニトリル量を減らし、アセトニトリル/水/ギ酸で溶出することとした。溶出溶媒の比率について、アセトニトリル/水/ギ酸 (5:4:1) と (2:7:1) で検討したところ、(2:7:1) ではイミノクタジンが回収できなかったため、(5:4:1) を採用した。溶出溶媒量について、5 mL と 3.5 mL で比較したところ、5 mL で回収率が向上したため、5 mL を採用した。

以上のことから、固相カラム WCX FF に 10 mL の精製用抽出液を負荷し、アセトニトリル/水/ギ酸 (5:4:1) 5 mL で溶出することとした。

3.3 検量線

全ての対象成分において、低濃度範囲（0.5～5 ng/mL）及び高濃度範囲（1～15 ng/mL）で直線性が確認でき、決定係数は 0.99 以上であった。ジクワット及びパラコートの低濃度範囲での検量線を図 3 に示す。

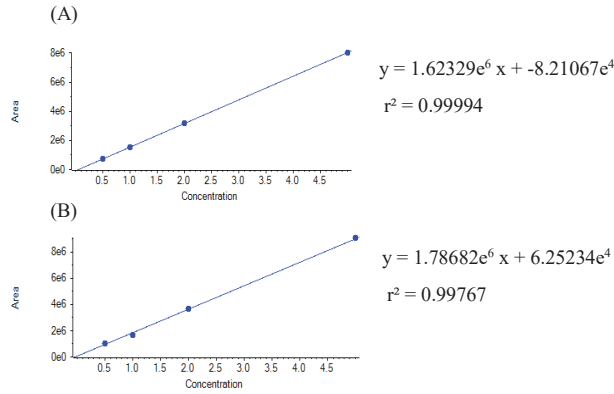


図 3 検量線

(A) ジクワット (B) パラコート

3.4 抽出液への添加回収試験結果

「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」における性能パラメーター³⁾に準じて、表 3 に示すとおり選択性、真度（回収率）及び併行精度を設定し、評価した。添加濃度は、他の野菜への適用も考慮し、0.01 ppm（一律基準値相当）と 0.1 ppm の 2 濃度とした。結果を表 4 に、添加回収試験により得た試験溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。

表 3 性能評価パラメーターの目標値等

選択性	添加濃度に相当するピークの面積の 1/3未満
真度（回収率）	70～120%
併行精度	25 RSD%未満

表 4 抽出液への添加回収試験結果

No.	化合物名	選択性	0.01ppm (n=5)		0.1ppm (n=3)	
			真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
1	アシュラム	○	<50	7.9※	77	3.6
2	CPMF	○	95	3.7	99	1.9
3	ジクワット	○	87	2.9	94	5.6
4	フロニカミド	○	88	6.9	99	4.1
5	イミノクタジン	○	85	15.6	76	1.9
6	ニテンピラム	○	80	3.9	89	13.7
7	パラコート	○	78	2.2	97	2.2

※ 面積値で算出

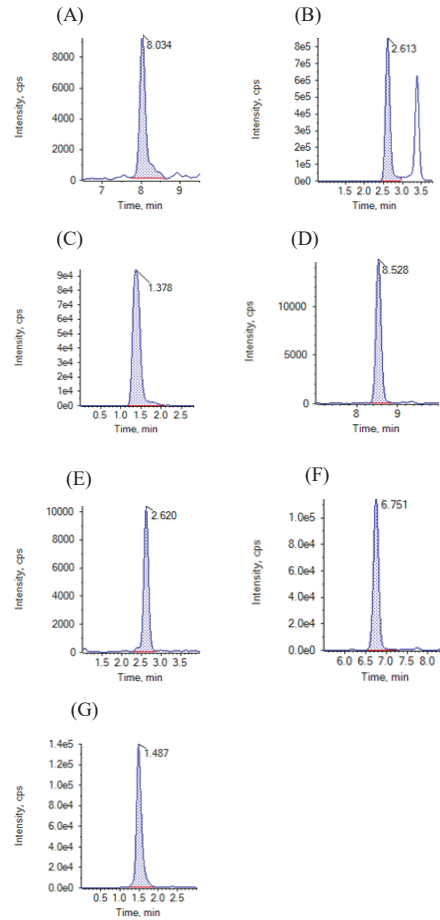


図 4 抽出液への 0.01 ppm 添加回収試験における各成分のクロマトグラム

- (A) アシュラム (B) CPMF
- (C) ジクワット (D) フロニカミド
- (E) イミノクタジン (F) ニテンピラム
- (G) パラコート

試料については、全ての成分において定量を妨害するピークは認められなかった。いずれの添加回収試験でも 7 成分中アシュラムを除く 6 成分において、選択性、真度及び併行精度いずれも目標値等を満たした。アシュラムについては、低濃度では真度が目標値を満たさなかったが、高濃度では目標値を満たした。

4 まとめ

野菜中に残留するジクワット、パラコート等の高極性農薬の一斉分析法の開発を目的として、水を用いた抽出液に対してミックスモード型弱陽イオン交換固相である WCX FF を用いた精製方法を検討した。ブロッコリー抽出液への低濃度及び高濃度の添加回収試験を行った結果、

選択性では妨害するピークは認められず，低濃度では 7 成分中ジクワット，パラコートを含む 6 成分で，高濃度では全ての成分で選択性，真度及び併行精度いずれも目標値を満たした．以上の結果から，今回検討した WCX FF を用いた精製方法はジクワット，パラコート等の一斉分析法の検討に対し有効な方法であることが確認できた．今後，試験法の妥当性を検証するため，野菜試料への添加回収試験等について検討予定である．

文献

- 1) 小林憲弘，他：水道水中のイミノクタジン・ジクワット・パラコートの LC/MS/MS 一斉分析法の開発，環境科学会誌，28(2)，117～125，2015
- 2) 佐々野僚一，他：グリホサートおよびグルホシネートの分析の自動化の検討 -第 2 報-，第 42 回農薬残留分析研究会講演要旨集，117～124，2019
- 3) 厚生労働省通知食安発 1224 第 1 号：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，平成 22 年 12 月 24 日