

.....  
 実験技術講座  
 .....

.....  
 農薬残留分析編  
 .....

## 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの 農薬残留分析への利用

上野 英二\*

愛知県衛生研究所

(平成 21 年 11 月 27 日受理)

*Keywords:* macroporous diatomaceous earth, column chromatography, food, pesticide, residue analysis.

### はじめに

ケイソウ土（珪藻土, diatomaceous earth, diatomite）は、藻類の一種である珪藻の殻の化石である。日本では珪藻土層をそのまま切り出して整形し、焼結した七輪を始めとして、今日、ろ過助剤や触媒など幅広い用途に用いられている。ノーベル賞で有名な Alfred Bernhard Nobel が非常に不安定な液体であるニトログリセリンを安全に扱うためにケイソウ土粉末に吸着させて使用したことは有名な話である。なお、ダイナマイトの語源はダイアトマイト（diatomite）とも言われている。

特に、多孔性ケイソウ土は数  $\mu\text{m}$  以下の細孔が無数に開いており、広大な表面積を有することから様々な物質を保持・固定化するための基材（担体, support）として注目されている。主成分は二酸化ケイ素（ $\text{SiO}_2$ ）で化学的に活性が低く安定していることから、農薬の残留分析分野においても、試料を精製するためのカラムクロマトグラフィー（column chromatography, 以下 CC）用担体として用いられている<sup>1-6)</sup>。

多孔性ケイソウ土 CC は、農薬取締法による登録保留基準の試験法など<sup>3,4)</sup> に採用されてきており、特に、作物残留試験を行っている分析者にとってはなじみ深い手法と考えられる。また、平成 9 年に厚生省（現・厚生労働省）より通知された農産物中残留農薬の迅速分析法<sup>5)</sup> にも採用されている。迅速分析法は、農薬を有機塩素系農薬、有機リン系農薬、およびカーバメート系農薬などのグループに分け、それぞれ異なる選択検出器を装備したガスクロマトグ

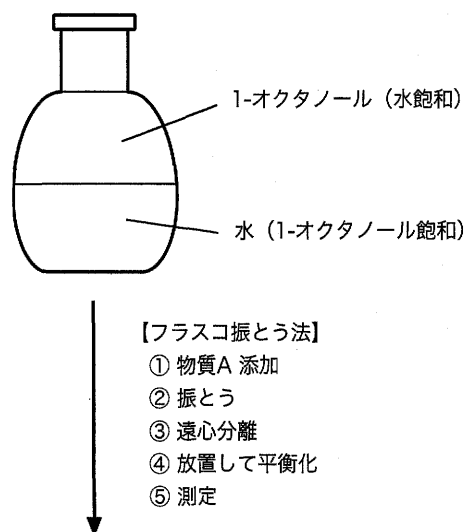
ラフィー（gas chromatography, GC）または液体クロマトグラフィー（liquid chromatography, LC）で測定するスクリーニング法である。今でもその手法に評価すべき点が多いが、煩雑さは否めない。その後、食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度（平成 18 年 5 月 29 日施行）の導入<sup>7)</sup> に伴い、多孔性ケイソウ土 CC を用いることなく試料を調製し、質量分析計（mass spectrometer, MS）を装備した GC または LC で測定するより効率的な一斉試験法<sup>8)</sup> が通知されている。また、昭和 40~50 年代から技術を蓄積してきた団塊の世代が残留分析の第一線から退きつつある。このため食品衛生法による試験を行っている検査施設を始めとして、多孔性ケイソウ土 CC の経験を積んでいるスタッフは少数になりつつあるものと考えられる。

著者は、日本の厳格なポジティブリスト制度に対応する試験法を開発するにあたって、分析上の問題点の多い多成分残留農薬をジクロロメタンなどの塩素系溶媒を用いることなく、複雑な成分で構成される加工食品を始めとする様々な食品中から抽出し、精製を可能とする多孔性ケイソウ土 CC の優れた効率性や環境性能などに着目している<sup>9,10)</sup>。そこで今回は、多孔性ケイソウ土 CC の具体的な応用例を紹介しながら、分析上のノウハウなどについて解説する。

### 1. オクタノール/水分分配係数

農薬の残留分析を行うにあたって、オクタノール/水分分配係数（octanol/water partition coefficient as  $\log P_{ow}$ ）を理解しておくことが重要である。オクタノール/水分分配係数は、化学物質が親油性物質である 1-オクタノールと水の二相に分配されたときの濃度比であり、対数値で示される（図 1）。化学物質の疎水性または親水性を表す指標にされる。この数値が大きいと生体内の脂肪組織に蓄積されやすく（例え

\* 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6  
 衛生化学部医薬食品研究室（食品安全化学）  
 E-mail: eiji\_ueno@pref.aichi.lg.jp  
 © Pesticide Science Society of Japan



$$\text{分配係数 (Pow)} = C_o / C_w$$

$C_o$ : 1-オクタノール層中の物質Aの濃度 (mol/L)

$C_w$ : 水層中の物質Aの濃度 (mol/L)

$$\log Pow = \text{Log}_{10} Pow$$

図1. オクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ )

ば,  $\log P_{ow} > 3 \sim 4$  程度), 数値が小さいと排泄されやすいことから, 生物濃縮性を予測する指標になっている。また, 土壌, 地下水などでの移動予測にも利用されている。

残留分析では, 農薬成分の抽出・精製から測定まで分配の原理がよく利用されており,  $\log P_{ow}$  は農薬成分や夾雑物の挙動を予測するための重要な指標になっている。“The Pesticide Manual”<sup>11)</sup> には, 多くの農薬の  $\log P_{ow}$  が記載されている。また現在では, コンピュータ上で分配係数を予測するソフトウェアも開発されてきており, 利用することができる<sup>2)</sup>。

## 2. 多孔性ケイソウ土 CC の基本

図2に示したように, ①試料液をカラムに負荷すると, 試料液は化学的に活性の低い担体表面上に液体固定相として均一に分散し, 保持される。その後, ②試料液と混和しない, すなわち界面を形成する溶媒を移動相として流下し, 対象物質を固定相から移動相へと液/液分配の原理によって抽出する。このため多孔性ケイソウ土 CC は, オンカラム液/液分配法とも言われる。分液ロートを用いて振とう, 静置 (または遠心分離) などの操作は不要であり, 抽出溶媒の量も削減できる。特に, 分配率の低い対象物質を効率良く転溶させる場合や, 界面が確認できない, あるいは強固なエマルジョンを形成して液/液分配が困難な場合には有効な手法である。

現在, ポリエチレン性の注射筒に顆粒状の多孔性ケイソウ土を充てんしたカートリッジカラムが EXtrelut<sup>®</sup>, Chem Elut<sup>®</sup>, K-solute などの商品名で市販されている。また, 多孔性ケイソウ土のみでも販売されており, 必要量をオープンカラムに充てんして用いることもできる。K-solute などは比較的大きな粒子が整粒して充てんしてあることから目詰まりしにくい, 流速が速くなりやすくストップコック (図3) による調節をより慎重に行う必要がある。なお, 原則として, 重力により流下させる。過度に吸引 (加圧) を行うと試料液も流下してしまうので注意が必要である。

## 3. 多孔性ケイソウ土 CC による脱水・抽出

従来, 残留農薬の一斉分析法として, 試料からアセトンや含水アセトンで抽出し, アセトンの大部分を減圧留去後, 塩化ナトリウムを添加した水系試料液から, ジクロロメタンで液/液分配により抽出する手法が汎用されてきた<sup>12)</sup>。その後, アセフェート, メタミドホスを始めとして, ジク

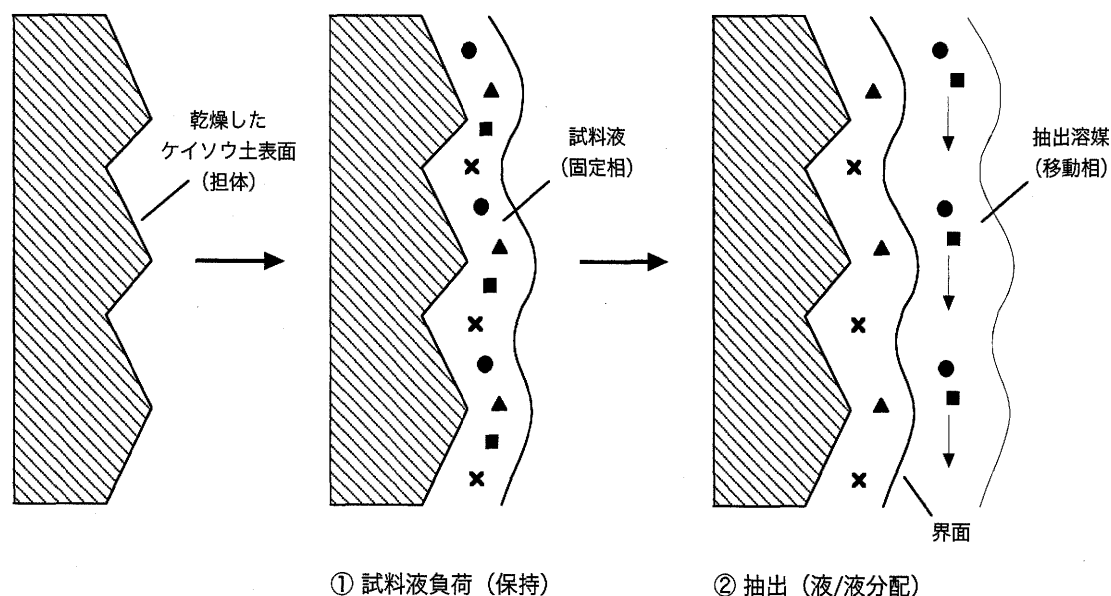


図2. 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの原理 (イメージ)

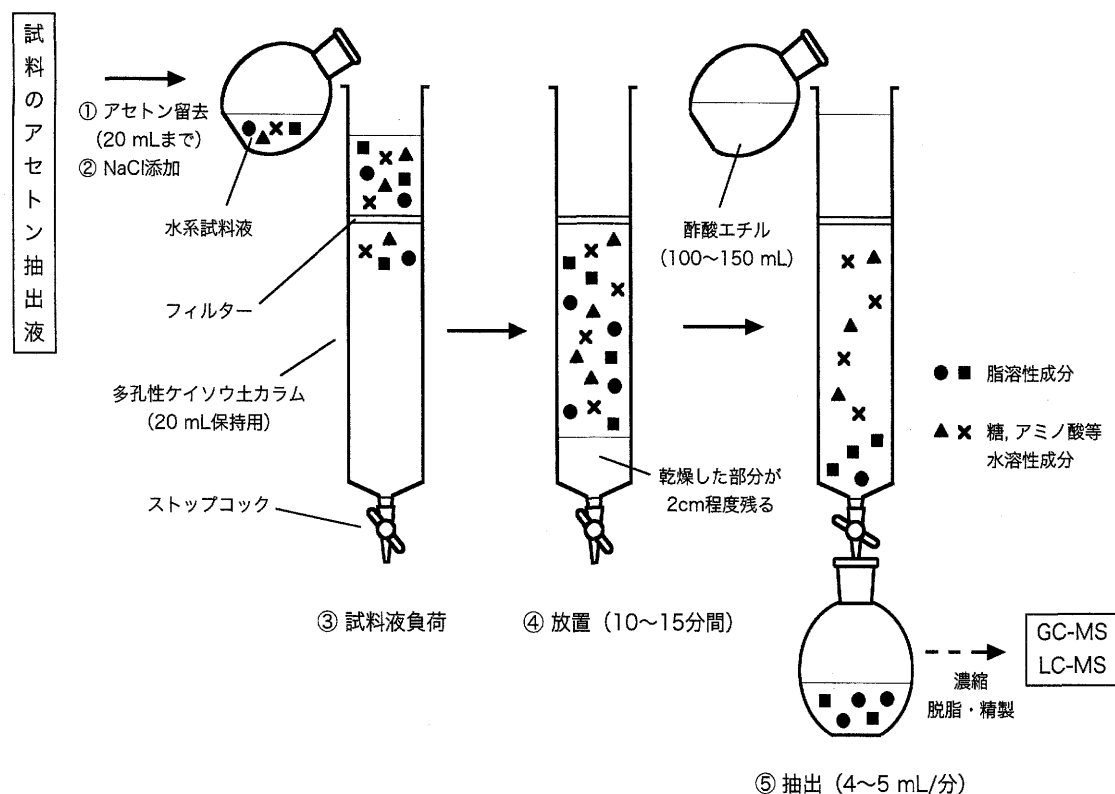


図3. 多孔性ケイソウ土カラムを用いた脱水・抽出操作の一例

ロロメタンでは十分に抽出できない極性の高い農薬にも残留基準が設定されていった，そのうえ，ジクロロメタンは人体に有害であるばかりでなく，環境への負担軽減の見地から排水規制が厳しくなったこともあり，ジクロロメタンを用いることなく，極性等の異なる多成分残留農薬を効率良く抽出可能とする手法が必要とされた．そこで，上述の迅速分析法に採用されたのが，多孔性ケイソウ土CCを利用した脱水・抽出法である．その操作<sup>5)</sup>を多少変更して以下に詳述する．

細切試料 20g (水分の少ない玄米などは 10g に，水 20ml を加えて 30 分間放置したもの) にアセトン 100ml を加えてホモジナイズ抽出し，3000 回転/分で 3 分間遠心分離後，上清を吸引ろ過する．残さはさらにアセトン 50ml を加えてスパテルでよくかき混ぜたのち，吸引ろ過する．図 3 に示したように，ろ液を 500ml 容ナスフラスコ中に合わせ，① 20ml 以下 (18ml 程度が望ましい) まで減圧濃縮する．これに，② 塩化ナトリウム 5~6g を添加して超音波溶解し，飽和させる．③ この水系試料液を多孔性ケイソウ土カラム (20ml 保持用) に負荷し，④ 10~15 分間放置して十分しみ込ませる．この時点で，水系試料液のしみ込んでいない乾燥した部分が 2cm 程度残らなければならない (残っていないければ，水分が流出する可能性がある)．次に，⑤ 酢酸エチル 100~150ml を用いて上記の 500ml 容ナスフラスコを洗い，洗液をカラム上部からゆっくり注入しておよそ 5ml/分 で流下させ，抽出液を 200~300ml 容ナスフ

ラスコに採る．

この手法では，負荷する水系試料液に塩化ナトリウムを飽和させることで，塩析効果により極性の高いアセフェート，メタミドホスなどの抽出率を高めている．表 1 に極性の高い有機リン系農薬の  $\log P_{ow}$ ，水溶解性，および多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率を示した．このようにアセフェート，メタミドホスを始めとして，デメトン-S-メチル，およびその酸化体であり極性の高いオキシデメトンメチル (デメトン-S-メチルスルホキシド)，デメトン-S-メチルスルホンなどの農薬成分を一斉に抽出することができる<sup>9)</sup>．脂肪の多い食肉およびその加工品などでは，粘性が高くなり，まれに目詰まりして抽出率が低下することがある．その場合には，液量を増やして一部を負荷することで抽出率の低下を防ぐことができる．

比較的極性の低い農薬のみがターゲットであれば，必ずしも塩化ナトリウムを飽和させる必要はない．また，酢酸エチルに代えて，ヘキサンや 5% アセトン/ヘキサン (ジクロロメタン相当) などで抽出してもよい<sup>3)</sup>．このような変更により，極性の高い糖分 ( $\log P_{ow} = -5 \sim -2$  程度) やアミノ酸 ( $\log P_{ow} = -5 \sim -1$  程度，pH に依存) などの妨害成分が抽出されにくくなり，精製効果が高まる．なお，ヘキサンの抽出する場合，カラムによっては，ピレスロイド系農薬など極性の低い農薬成分 ( $\log P_{ow} > 4$  程度) が担体表面に吸着することによって抽出率が低下するとの報告がある<sup>1)</sup>．その場合，負荷する水系試料液に少量のアセトンま

表 1. 農薬成分の  $\log P_{ow}$ , 水溶解性, および多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率

成分名	$\log P_{ow}$ (20°C)	水溶解性 mg/l (20°C)	多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率, %		
			酢酸エチル (脱水・抽出)		
			0-50 ml	-100 ml	-150 ml
アセフェート	-0.89	790,000	71	20	5
メタミドホス	-0.8	>200,000	78	14	2
オメトエート	-0.74	—	81	16	1
ジクロルボス	1.42	18,000	94	0	0
デメトン-S-メチル	1.32	22,000	96	0	0
オキシデメトンメチル	-0.74	—	73	24	7
デメトン-S-メチルスルホン	—	—	91	6	4
ホレート	3.92	50	95	0	0
ホレートスルホキシド	—	—	78	16	3
ホレートスルホン	—	—	92	4	1

たはアセトニトリルを加えると農薬成分の溶解性が高まり、抽出率が改善すると報告されている<sup>2)</sup>。

また、ジフェンゾコート試験法<sup>8)</sup>のように、④の操作のうち、カラムをヘキサンで洗浄し、4%ギ酸/酢酸エチルで抽出するなど、イオン性物質の解離度を調整することで精製効果と抽出率を高める手法もある。

#### 4. 多孔性ケイソウ土 CC による脱脂・精製

脂質を多く含む穀類、豆類および種実類を対象とする一斉試験法<sup>8)</sup>では、ODS (オクタデシルシリル化シリカゲル) カートリッジカラムを用いた脱脂・精製法<sup>13)</sup>が採用されている。この手法は簡便であるが、カラムの保持容量が少ないことから、アボカドなど脂質を多量に含む農産物や畜水産物およびその加工品などには適用が困難となる場合がある。そのため、畜水産物を対象とする一斉試験法<sup>8)</sup>には、ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC)<sup>14,15)</sup>が採用されている。GPCは、脂質などの高分子成分を効率良く除去できる上に、自動化されており夜間処理も可能なことから、日常の残留分析には有効な手法と考えられる。しかし、装置がやや高価なこともあって、十分に普及しているとはいえないのが現状である。また、

検体の処理に時間を要することから、緊急性の高い試験に際して、特に検体数の多い場合には対応が困難となることがある。

穀類など脂質を多く含む農産物の個別・グループ試験法<sup>8)</sup>では、ヘキサン/アセトニトリル分配による脱脂・精製法がよく採用されている。この手法では、通常、脱水後の試料液を濃縮し、得られた残さをヘキサンに溶解して分液ロートに移したのち、等量のヘキサン飽和アセトニトリルを加えて振とうする。静置後、脂質成分はヘキサン層に、極性を有する農薬成分はアセトニトリル層に分配される。しかし、サポニンを多く含む大豆、レシチンを多く含む卵、そして熟成された食肉およびその加工品などでは強固なエマルジョンが生成し、分配が困難となる場合がある。また、*pp'*-DDE、アルドリリンなど極性が低くアセトニトリルに分配しにくい農薬成分を対象とする場合には、ヘキサン飽和アセトニトリルの量および分配回数を増やす必要があり、操作が煩雑になるうえに、脱脂効率も低下する。

このようなヘキサン/アセトニトリル分配による脱脂・精製操作も多孔性ケイソウ土 CC により行うことができる。通常、カラムの保持容量の50~70% (20 ml 保持用であれば10~14 ml) 程度のヘキサンに溶解した試料を多孔性ケイソ

表 2. クマホス等の  $\log P_{ow}$ , 水溶解性, および多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率

成分名	$\log P_{ow}$ (20°C)	水溶解性 mg/l (20°C)	多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率, %			
			ヘキサン飽和アセトニトリル (脱脂・精製)			
			0-20 ml	-40 ml	-60 ml	-80 ml
牛脂	—	—	2	2	2	1
クマホス	4.13	2	72	21	3	0

ウ土カラムに負荷して、およそ10分間放置したのち、適量(40~60ml程度)のヘキサン飽和アセトニトリルで抽出する<sup>3)</sup>。著者らが、緊急性の高い試験に際して、GPCに代わる脱脂・精製法としてSOP(standard operating procedures, 標準作業書)に採用している操作を多少変更して以下に詳述する。

脱水後の試料液(試料20g相当)を減圧濃縮し、得られた残さをアセトニトリル飽和ヘキサンに溶解して20mlに定容する。その10ml(試料10g相当)を多孔性ケイソウ土カラム(20ml保持用)に負荷し、10分間放置したのち、さらに10分間吸引する。次に、ヘキサン飽和アセトニトリル80mlをカラム上部からゆっくり注入しておよそ4ml/分で流下させ、抽出液を200ml容ナスフラスコに採る。

この手法では、アセフェート、メタミドホスなど極性の高い農薬を対象とするために、残さをアセトニトリル飽和ヘキサンに溶解している。さらに、*pp'*-DDE、アルドリンなど極性の低い農薬も対象とするために、カラムを吸引(あるいは窒素加圧)して大部分のヘキサンを除去しており、脱脂効率もGPCに劣るが、多くの農薬成分を抽出可能である。また、カラムを並べて同時に処理できるので、特に検体数の多い場合には迅速に対応することができる。表2に有機リン系農薬のクマホス(牛などの外部寄生虫駆除剤、日本では農薬登録されていない)および牛脂の多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率を示した。このように食肉から抽出されてくるトリグリセライド( $\log P_{ow} > 20$ 程度)など脂肪の大部分を除去できる。また、カラムから溶出してくる比較的極性の高い脂肪酸などは、陰イオン交換相を有するPSA(primary secondary amine, エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル)などを充てんしたカラムを用いることで除去することができる<sup>16)</sup>。なお、負荷する脂肪量が多すぎると、極性の低い農薬成分などで抽出率が低下することがある。上記のSOPでは、残さが4gを超える場合には、残さのカラムへの負荷量が2gになるようにアセトニトリル飽和ヘキサンで希釈することで、抽出率の低下を防ぐこととしている。

## おわりに

平成20年1月に中国製冷凍ギョーザ中メタミドホスによる健康被害が発覚した。メタミドホスのような極性の高い農薬成分を対象にする場合、無水硫酸ナトリウムで脱水しながら酢酸エチルで抽出する手法<sup>17)</sup>がよく知られている。しかし、この手法を用いた場合、試料によっては脂肪分、糖分、アミノ酸などの妨害成分も多量に抽出されることから、GC/MSなどの装置を汚染し、測定が困難となる事例がみられている。また、抽出時に硫酸ナトリウムの粘性が高まり、抽出率が低下することも知られている。このような点で、ここに紹介した残留分析への適用範囲の広い多孔性

ケイソウ土CCは、今後、冷凍ギョーザを始めとして脂質など複雑な成分で構成される加工食品の試験にも耐えられる分析法を開発していくうえで、検討すべき手法の一つと考えられる。

以上、多孔性ケイソウ土CCの農薬残留分析への具体的な応用例を紹介しながら、分析上のノウハウなどについて解説させていただいた。この実験技術講座が、読者、特に残留分析の現場において実際に業務に携わっている若手スタッフの参考になれば幸いである。なお、本内容の一部は、第7回欧州残留農薬ワークショップ(7th European Pesticide Residue Workshop, 2008, Berlin, Germany)で発表したものである。

## 引用文献

- 1) K. Iijima, M. Saka, Y. Odanaka and O. Matano: *J. Pestic. Sci.* **22**, 17-26 (1997).
- 2) 飯島和昭, 坂 真智子, 小田中芳次, 加藤保博, 高田誠, 細見正明: 農薬誌 **31**, 190-202 (2006).
- 3) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法 改訂版, 中央法規出版, 2006.
- 4) 「今月の農薬」編集室編: 農薬登録保留基準ハンドブック 改訂4版 作物・水質残留基準と試験法, 化学工業日報社, 2003.
- 5) 厚生省生活衛生局長通知, 衛化第43号, 平成9年4月8日.
- 6) 日本農薬学会環境委員会 残留農薬分析検討委員会編: 残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ 改訂2版, 日本農薬学会, 2005.
- 7) 永山敏廣: 農薬誌 **30**, 418-425 (2005).
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発第0124001号, 平成17年1月24日.
- 9) 上野英二, 梶島由佳, 大島晴美, 大野 勉, 根本 了, 米谷民雄: 食衛誌 **50**, 64-69 (2009).
- 10) 上野英二, 大野春香, 棚橋高志, 大島晴美, 三上栄一: 日本農薬学会第32回農薬残留分析研究会講演要旨集, pp. 100-104, 2009.
- 11) British Crop Protection Council: "The Pesticide Manual 14th Edition" ed. by C. D. S. Tomlin, UK, 2006.
- 12) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法, 中央法規出版, 1995.
- 13) J. Fillion, F. Sauve and J. Selwyn: *J. AOAC Int.*, **83**, 698-713 (2000).
- 14) E. Ueno, H. Oshima, I. Saito, H. Matsumoto and H. Nakazawa: *J. Pestic. Sci.* **28**, 422-428 (2003).
- 15) 上野英二, 斎藤 勲: 食衛誌 **48**, J-273-J-277 (2007).
- 16) 上野英二, 梶島由佳, 大島晴美, 大野 勉: 食衛誌 **49**, 390-398 (2008).
- 17) 小川貴史, 岡本尚子, 谷口勝彦, 山下健司, 西田政司, 樋口初良: 食衛誌 **38**, 204-210 (1997).

## 略歴

上野英二

職歴等: 愛知県衛生部食品獣医務課技官を経て1997年より現職, 2002年国立保健医療科学院衛生科学特論コース修了, 農学博士

研究テーマ: 農薬の残留分析

趣味: スキー, 温泉