

超臨界流体抽出分離技術を用いた残留農薬分析技術の開発

安藤 孝

はじめに

農薬の分析には、新薬開発、農薬登録、環境動態調査、食品監視、自主検査、品質管理、摂取量調査などさまざまな目的があり、目的ごとに分析に求められる精度や規模、作業性が異なる。

私が宮崎県総合農業試験場（以下、試験場）に異動してきた1994年当時、農業生産現場における自主検査では、多くの工程を手作業で行うために、検査に2週間近くかかってしまうほか、コストも1検体あたり十数万円と高額であった。これでは、生産者が適正に農薬を使用した農産物であるにもかかわらず、生産者はその確認検査に高額の経費を負担し、消費者は食べた後にしか検査の結果がわからない。

このように、農業生産現場における自主検査では、分析精度、検査検体数、分析対象農薬数など、農薬分析に一般的に求められることに加え、結果が出るタイミングや分析コストも重要になってくる。

そこで、試験場が残留農薬分析技術を開発するにあたっては、農産物を出荷する前に結果がわかるよう分析時間を短縮することが第一に求められた。加えて、約5万戸の本県生産者から日々、収穫・出荷される農産物の内、どれくらいをサンプリングして検査すれば十分なのかという議論をし、有効な検査実施方法についても検討を行った。さらに、県内で使用する農薬を可能な限り網羅することも重要であった。検討の結果、次の6点を研究目標として掲げた。

- ・出荷前判定が可能なまでに分析時間を短縮する。
- ・県内流通農薬を主体に分析対象農薬を選定する。
- ・技術移転しやすいよう分析操作を簡便にする。
- ・検査員の健康に配慮して有機溶剤使用量を低減する。
- ・公定法と同等の分析精度を確保する。
- ・生産者団体などが運営可能な低コストとする。

これらのコンセプトを満たすことができる技術として、短時間で有機物を抽出する超臨界流体二酸化炭素抽出（以下、SFE）法に的を絞り、1996年に残留農薬分析技術の開発に着手した。

SFEによる農薬抽出

研究を開始してすぐ、SFEでは、次のような現象が起

きることを把握した¹⁾。

- ・二酸化炭素の温度と圧力を最適に設定することで、農薬を選択的に抽出できる。
- ・試料中の水分が多いと、農薬抽出率が低減する。
- ・色素や油脂も同時に抽出される場合がある。

以上の現象を踏まえ、試料に吸水性の添加剤をあらかじめ加えておくことで、水分の影響を低減し、色素や油脂の抽出を抑制することを試みた。

また、食品衛生法で基準が定められた農薬成分すべてをSFEで抽出できるわけではないので、SFEを補完する別の分析技術の確立も随時検討しながら、次のように研究を進めていった。

農産物の水分が農薬抽出に及ぼす影響の低減 SFE装置は、米や大豆など乾燥した固形物を想定した設計であり、きゅうりやトマトなど水分の多い農産物を充填すると、装置内で目詰まりが発生して実用に耐えなかった。また、水分が多い農産物ほど、農薬の抽出率が低下した。これは、残存する水と抽出に用いる超臨界流体二酸化炭素の極性の違いによると推察された。

そこで、ケイソウ土や高分子吸収ポリマーなど吸水性の添加剤を農産物試料に加えることによって、試料中の水分をあらかじめ添加剤に保持し、全体を固形状にしてからSFE装置に充填することを検討した。

まず、試験した3種類の添加剤いずれも、用いることで装置内の目詰まりは起きなくなった。次に、添加剤ごとの農薬回収率を表1に示す。植物繊維系のMiyazaki Hydro-Protect（2005年 特許3645552）を用いると、全体的に農薬回収率が高い結果となり、水分による影響を低減できたと考える¹⁾。

SFE装置の改良 当初導入したSFE装置を使用していくうちに、ハードウェアとしていくつかの改善すべき点が見えてきたので、日本分光（株）に依頼して改良型の装置を開発した。

表1. 添加剤ごとの農薬回収率（%）

添加剤	ジメトエート	農薬100成分平均
Miyazaki Hydro-Protect	71	91
ケイソウ土	55	86
高分子吸収ポリマー	17	67

- ・ 工具を使わずに開閉できる抽出管キャップの開発
- ・ 工具を使わずに着脱できる抽出管装填レバーの開発
- ・ 公定法試料量 20 g を充填できる抽出管容量の確保
- ・ 二酸化炭素の実流量を記録する計器の装着
- ・ 複数サンプルを並行抽出可能な実用システムの開発

「宮崎方式」残留農薬分析系の構築 これらの研究過程で、各種分析装置の長所と短所を整理し、分析工程を最適化することで、県内流通農薬を主体に過去に問題のあった農薬など430種類の農薬分析を2時間で完了できる分析体系を構築した(図1)。

具体的には、誘導体化を必要とせず、かつ $\log P_{ow}$ が2以上の農薬のみ、農産物試料を吸水剤とあらかじめ混和してSFEで抽出後、GC-MSで計測することとし、それ以外の農薬は、農産物を粉碎後、有機溶剤で希釈し、物理フィルターを通すだけの抽出で、LC-TOF/MSによる定性分析を行い、検出された農薬をLC-MS/MSで定量することとした。

このスクリーニング分析系の構築により、分析時間の大幅な短縮を図ることができ、年間の検査件数を大幅に増加させることが可能になった。そして、結果として、1件あたりの減価償却費などが抑えられ、検査経費も軽減することができた。

- ・ 分析時間の短縮→2週間で2時間
- ・ 分析対象農薬→県内流通農薬の8割をカバー
- ・ 簡単な操作→県内4機関への技術移転を実現
- ・ 有機溶剤の低減→約 1/1000
- ・ 精度→繰り返し精度10%以内、回収率70~120%、定量限界0.01 ppm (一部満たないもの有り)
- ・ 低コスト→1検体30,000円程度

SFCによる農薬分離

2010年に日本生物工学会年次大会が宮崎市で開催されたことをきっかけに、大阪大学工学研究科福岡研究室が取り組んでいる超臨界流体クロマトグラフィー(以下、

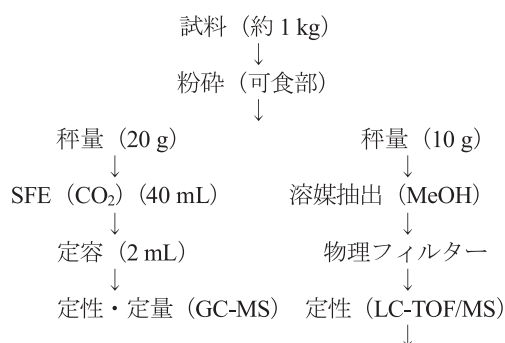


図1. 「宮崎方式」残留農薬分析系の工程

SFC) 技術を知ることができた。

当時のSFC装置は、背圧弁の開閉動作により発生するノイズのために微量成分の測定が困難であり、主に分取に用いられていたが、2012年に(株)島津製作所が開発した新設計の背圧弁のおかげで、ノイズを抑えた農薬分析用クロマトグラフィーとして十分な装置性能に至った。

SFCで頻用される二酸化炭素は、*n*-ヘキサン程度の低極性であるが、農薬には、低極性から高極性までの幅広い極性の化合物が存在する。そこで、石橋らは、SFCの残留農薬分析への適応を探るために、分子量(112~887)、 $\log P_{ow}$ (-4.6~7.05)、基本骨格の異なる農薬17成分(主にGC-MSで分析されている農薬、主にLC-MS/MSで分析されている農薬、イオンペア試薬またはイオンクロマトグラフィーといった特殊な分析を必要とする高極性農薬を含む)について、SFCによる農薬分離を研究した²⁾。

その結果、ODS基の根本に極性基のスペーサーを介した極性基内包逆相カラムを用いた場合に、すべての化合物の保持、分離が最良で、ピークの幅も狭くテーリングが抑えられており、この方法がさまざまな極性の化合物を一斉に分析する際に有用であることを明らかにした(図2)。

従来、低極性成分はGC-MSで、高極性成分はLC-MS/MSでと、別々に分析されてきた農薬が、SFC-MSを用いることで同時に分離・検出でき、さらに、イオンペア蛍光誘導体化分析法、あるいはイオンクロマトグラフィー法といった特殊な分析法を必要とするジクワットジプロミド($\log P_{ow} = -4.6$)が、一般的にGC-MSで分析されるシベルメトリン($\log P_{ow} = 6.6$)と同時に単一移動相条件で分析できたことは、SFCが移動相に極性溶媒を添加することで溶出力を大きく変化できるという特性によるものであると考えられる。

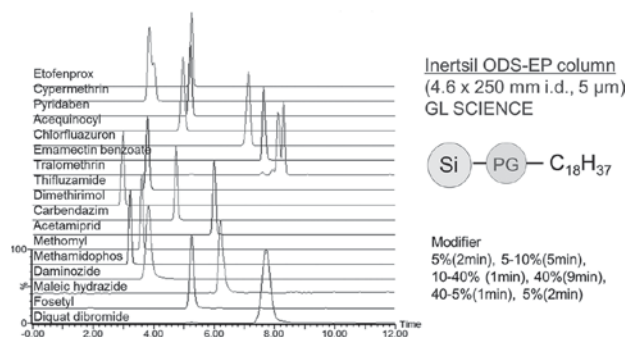


図2. SFC 農薬成分クロマトグラム

SFE-SFCによる農薬抽出分離

2012年、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）による先端計測分析技術・機器開発プログラムとして、大阪大学大学院工学研究科の馬場健史准教授（現九州大学生体防御医学研究所教授）、神戸大学大学院医学研究科の吉田優分野長、（株）島津製作所、宮崎県による共同研究チームで、多成分を一斉に高速かつ全自動で測定する画期的な分析システムの開発に着手した。

従来、食品のように複雑で多くの成分を含む検体を分析する際には、抽出や精製といった熟練を要する前処理を人手で行う必要があったため、自動化が困難なうえに、人為ミスによる回収率の低下や結果のばらつきが発生していた。また、この前処理工程において、空気に触れることで成分が酸化や分解してしまうこともあり、正確な測定が困難になる場合があった。

2015年に完成した世界初のSFE-SFC-MSシステムは、一体型となったSFE、SFC、質量分析計により、熟練の技術を要せずに前処理、分離および計測を高感度・高速かつ自動で行うことができる。また、装置全体が暗黒無酸素下の密閉系であるため、大気中で不安定な成分であっても、酸化や分解することなく、本来の状態を計測することができる。

たとえば、食品中の残留農薬分析において、代表的な前処理法であるQuEChERS法では、攪拌や遠心分離などで約35分かかっていたところを、わずか5分に短縮できる上、有機溶媒の使用量をおよそ10分の1に削減することができる。

市来らは、この装置を用いてメタノールをモディファイアとした場合の農薬抽出能を調べたところ³⁾、超臨界流体二酸化炭素だけの抽出に比べ、高極性成分の抽出能が上昇することを確認した(図3)。

前述のモディファイア添加SFCと組み合わせることで、幅広い極性の農薬成分を抽出し分離できるようになった。

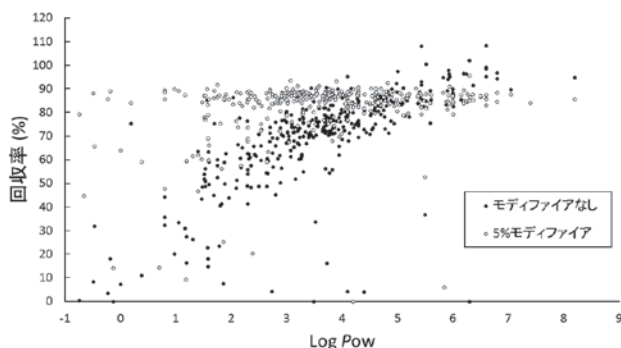


図3. モディファイアによる農薬回収率の変化

MSによる農薬測定

これまで水性農薬はLC-MS/MSで測定し、油性農薬はGC-MSで測定することが一般的であったが、幅広い極性の化合物を一斉に計れるSFE-SFC-MSの登場で、水性農薬も油性農薬も一斉に測定できるようになった。さらには、SFE-SFC-MSを中心に、既存のGC-MSやLC-MS/MSを併用することで、高速性を保ったままの二重定性も可能になる。

しかし、SFE-SFCで抽出分離できた高極性成分から低極性成分をMSの単一イオン化法ですべてイオン化できるわけではない(図4)。

ESI, APCI, APPIの利点を併せ持つ新しいイオン化法の登場に大きな期待を寄せる。

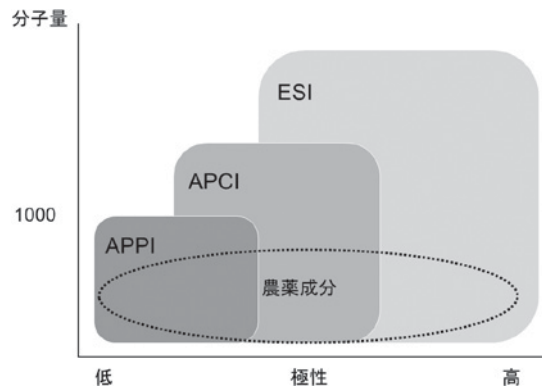


図4. 各種イオン化法と農薬成分の範囲

おわりに

分析装置の性能が飛躍的に向上すると、得られた結果(数値)を盲信してしまいがちだが、装置の原理を正しく理解し、従来法における抽出・精製・分離・計測・解析との比較検証を怠ることなく、何のために分析を行うのかをしっかりと明確にし、ニーズに応じた検査工程を構築しながら、適切な精度管理や運用方針を定めることが、一層重要になってくると思われる。

また、これらの技術に限らず、あらゆる農業分野で、これまで以上に生産者のニーズに即した新しい分析技術を開発し、得られた科学情報を効果的に活用していくことが、日本の農業の厳しい状況を乗り越える手立ての一つであると考えられる。

文 献

- 1) 安藤 孝：日本農薬学会誌，**32**, 317 (2007).
- 2) Ishibashi, et al.: *J. Chromatogr. A*, **1266**, 30 (2012).
- 3) 市来弥生ら：日本食品衛生学会講演会要旨集，p. 34 (2015).