

クロルフルアズロン等7農薬に対する一斉分析法の適用

鈴木 恵子 坪井 弘 大川 一美 藤田 晃三

要 旨

平成18年5月、食品に残留する農薬等にポジティブリスト制が導入されることになり、新たに分析可能である農薬を増やす必要がある。そこで、クロルフルアズロン等7農薬について、当所が実施している一斉分析法の前処理法が適用可能か検討した。その結果、2種類のミニカラムを使用した精製法を用いることにより一斉分析が可能であった。また、回収率は69.3%～93.1%と良好であった。

1. 緒 言

平成18年5月に食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制が導入されるため、新たに分析可能である農薬を増やす必要がある。当所では、おもにガスクロマトグラフ(GC)で測定する項目を中心に一斉分析法¹⁾による残留農薬検査を行っているが、農薬の種類によっては、GCでは熱分解する等の理由で測定が難しいものがある。

そこで、公定法²⁾で高速液体クロマトグラフで測定する農薬のうち、クロルフルアズロン、ジフルベンズロン、テブフェノジド、テフルベンズロン、フルフェノクスロン、ヘキサフルムロン、ルフェヌロンの7農薬(以下CFA7とする)について検討したところ、2種類のミニカラムを組み合わせた精製法を用いて一斉分析が可能であり報告する。

2. 方 法

2-1 試 薬

酢酸エチル、n-ヘキサン(ヘキサン)、ジエチルエーテル(エーテル)、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬試験用試薬

アセトニトリル：残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用試薬

シクロヘキサン：高速液体クロマトグラフィー用試薬

水：Milli-Q SP TOC(ミリポア社製)で精製した。

AccuBOND SILICA 1000mg 6ml

(AccuBOND SILICA)：Agilent technologies社製

Mega Bond Elut NH₂1g6ml

(Bond Elut NH₂)：Varian社製

混合標準原液：Riedel-de Haën、和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)社製の農薬分析用標準品10mgを精秤し、アセトニトリルまたはアセトンで10mlにして、それぞれ1mg/mlの標準原液を調製した。各農薬の濃度が20µg/mlとなるよう標準原液をそれぞれ混合し、アセトニトリルで希釈した。

混合標準溶液：混合標準原液をアセトニトリルで0.05～2µg/mlとなるよう希釈した。

2-2 試 料

市内を流通する農産品11種類(オレンジ、りんご、いちご、ぶどう、ねぎ、きゅうり、だいこん、トマト、茶、玄米、落花生)を用いた。

2-3 装 置

フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ(PDA/HPLC)：Alliance HPLCシステム

(Waters社製)

technologies社製)

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) :

吸引マニホールド : J&W Scientific社製

Agilent1100シリーズ LC/MSD SLシステム (Agilent

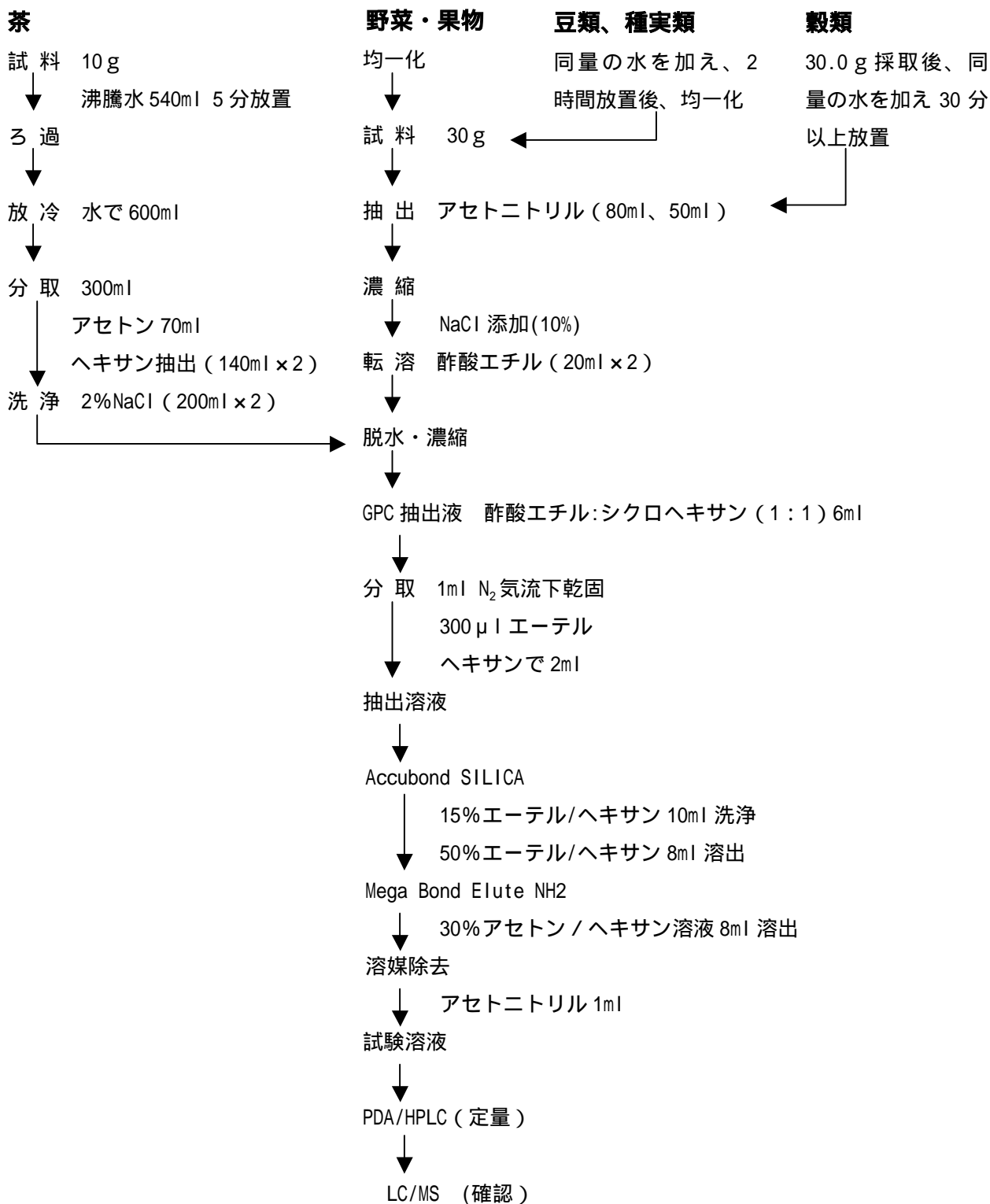


図 1 CFA7 分析法

2-4 方 法

(1) 試験溶液の調製

ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）で精製する直前の抽出液を調製するまでは既報¹⁾のとおり。

GPC抽出液1mlを10ml遠沈管にとり、窒素気流下で溶媒を完全に留去しエーテル300μlで溶解した後、ヘキサンで2mlにメスアップする。あらかじめ15%エーテル/ヘキサン10mlで洗浄したAccuBOND SILICAに負荷する。15%エーテル/ヘキサン1mlで遠沈管を2回洗いこれも負荷した後、15%エーテル/ヘキサン10mlで洗浄する。洗浄後、AccuBOND SILICAの出口側にBond Elut NH₂を連結し、50%エーテル/ヘキサン8mlで洗浄する。50%エーテル/ヘキサンが連結カラム内に残らないよう吸引マニホールドを用いて下部から吸引する。AccuBOND SILICAをはずし、30%アセトン/ヘキサン8mlで溶出させる。溶出液は窒素気流下で溶媒を完全に留去した後、アセトニトリル1mlで溶解し、試験溶液とした。図1に分析法の概要を示す。

(2) PDA/HPLC分析条件

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6mm i.d. × 250mm)

カラム温度：40

移動相：アセトニトリル-水 (7 : 3)

流速：1.0ml/min

測定波長：210nm-350nm、注入量：30μl

(3) LC/MS分析条件

カラム：Inertsil ODS-3 (2.1mm i.d. × 150mm)

カラム温度：40

移動相：アセトニトリル-水 (7 : 3)

流速：0.5ml/min

注入量：5μl

Ionization mode：API-ES(negative)

Fragmentor Voltage：150V

Drying Gas Temp.:350

Drying Gas Flow:10L/min

Nebulizer Pressure:40psig

Capillary Voltage：3000V

(4) 定 量

試験溶液及び標準溶液のピーク面積から、算出した。

3. 結果及び考察

3-1 ミニカラムによる精製法の検討

(1) AccuBOND SILICA溶出条件

公定法ではシリカゲルカラムで比率の異なる酢酸エチル-ヘキサン混液で、洗浄・溶出しているが、エーテル-ヘキサン溶液での洗浄・溶出条件を検討した。

混合標準原液を100μl窒素気流下で溶媒を留去した後、15%エーテル/ヘキサンで2mlにメスアップし、15%エーテル/ヘキサン10mlで洗浄したAccuBOND SILICAに負荷後、15%エーテル/ヘキサンを10mlで洗浄した後、30%エーテル/ヘキサンを12ml流し2mlごとに分取し回収率を求め、溶出状況を確認したが、テブフェノジドがほとんど回収されなかった。（表1-1）

表1-1 Accubond SILICA 溶出状況 (30%エーテル/ヘキサン)

溶出溶媒 流出量 (ml)	15%E/H		30%E/H				
	-10	-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12
diflubenzuron	-	-	-	-	12.2%	32.5%	30.2%
tebufenozid	-	-	-	-	-	-	3.7%
hexaflumuron	-	-	-	4.5%	24.7%	32.8%	18.1%
teflubenzuron	-	-	-	25.1%	38.1%	16.7%	3.6%
lufenuron	-	-	-	20.9%	38.1%	19.8%	4.5%
flufenoxuron	-	-	-	-	6.6%	24.3%	34.0%
chlorfluazuron	-	-	-	12.7%	33.6%	23.3%	7.5%

E/H：エーテル/ヘキサン

表1-2 Accubond SILICA溶出状況 (50%エーテル/ヘキサン)

溶出溶媒 流出量 (ml)	15%E/H	50%E/H		
	-10	-8	8-10	10-12
diflubenzuron	-	90.8%	-	-
tebufenozid	-	88.2%	-	-
hexflumuron	-	91.1%	-	-
teflubenzuron	-	90.7%	-	-
lufenuron	-	90.0%	-	-
flufenoxuron	-	91.2%	-	-
chlorfluazuron	-	90.5%	-	-

E/H : エーテル/ヘキサン

そこで、30%エーテル/ヘキサンを50%エーテル/ヘキサンに変更し、8mlまではまとめて分取し、それ以降は2mlごとに分取して、それぞれ回収率を求め、溶出状況を確認したところ、30%エーテル/ヘキサン8mlで7種類すべての農薬がほぼ溶出された。(表1-2)

(2) Bond Elut NH₂溶出条件

公定法では、エーテル-ヘキサン混液(3:7)で洗浄し、アセトン-ヘキサン混液(3:17)で溶出している。そこで、同様にエーテル-ヘキサン溶液で洗浄し、アセトン-ヘキサン溶液で洗浄・溶出する条件を検討した。

混合標準原液を100μl窒素気流下で溶媒を留去した後、30%エーテル/ヘキサンで2mlにメスアップし、30%エーテル/ヘキサン10mlで洗浄したBond Elut NH₂に負荷後、30%エーテル/ヘキサンを10mlで洗浄し、その後30%アセトン/ヘキサンを12ml流した。溶出液は、

8mlまでまとめて分取し、それ以降は2mlごとに分取して、それぞれ回収率を求め溶出状況を確認した。しかし、ヘキサフルムロン、ルフエヌロン、フルフェノクスロン、クロルフルアズロンがほとんど回収されなかった(表2-1)。そこで、15%アセトン/ヘキサンを30%アセトン/ヘキサンに変更し、同様に溶出状況を確認したところ、30%アセトン/ヘキサン8mlで7種類すべての農薬がほぼ溶出された(表2-2)。

また、AccuBOND SILICAの溶出液をAccuBOND SILICAとBond Elut NH₂を連結して直接負荷することが可能であるか確認するため、混合標準原液を100μl窒素気流下で溶媒を留去した後、50%エーテル/ヘキサンで8mlにメスアップ後、Bond Elut NH₂に直接負荷し、30%アセトン/ヘキサン8mlで溶出したところ、負荷時の流出液には溶出されず、30%アセトン/ヘキサン8mlの画分で、ほぼ回収されることを確認した。

表2-1 Bond Elut NH₂溶出状況 (15%アセトン/ヘキサン)

溶出溶媒 流出量 (ml)	30%E/H	15%A/H	15%A/H	15%A/H
	-10	-8	8-10	10-12
diflubenzuron	-	-	16.7%	50.5%
tebufenozid	-	87.0%	11.0%	0.7%
hexflumuron	-	-	-	-
teflubenzuron	-	8.4%	51.1%	37.3%
lufenuron	-	-	10.7%	40.7%
flufenoxuron	-	-	7.4%	35.2%
chlorfluazuron	-	-	0.8%	7.6%

E/H : エーテル/ヘキサン、A/H : アセトン/ヘキサン

表2-2 Bond Elute NH₂ 溶出状況 (30%アセトン/ヘキサン)

溶出溶媒	30%E/H	30%A/H	30%A/H	30%A/H
流出量 (ml)	-10	0-8	8-10	10-12
diflubenzuron	-	102.2%	-	-
tebufenozid	-	102.2%	-	-
hexflumuron	-	103.8%	-	-
teflubenzuron	-	95.2%	-	-
lufenuron	-	92.0%	-	-
flufenoxuron	-	100.2%	-	-
chlorfluazuron	-	103.9%	-	-

E/H : エーテル/ヘキサン、A/H : アセトン/ヘキサン

3-2 添加回収試験

添加回収試験は、ブランク及び添加していない試料と同時に行った (n=3)。混合標準原液を野菜、果物、穀類で0.1 µg/g相当、豆類、種実類で0.2 µg/g相当、茶は0.2 µg/g相当となるよう熱水抽出液に添加し、30分放置後、試験検査に供した。

CFA7混合標準溶液の250nmにおけるPDA/HPLCクロマ

トグラムを図2に示す。検量線は0.05~2 µg/mlで良好な直線性を示した。最も低い濃度である0.05 µg/mlに対応する試料濃度は、野菜、果物、茶、穀類については0.01 µg/g、豆類、種実類については0.02 µg/gであり、これを定量限界とした。いずれの農薬についても公定法の定量限界²⁾と同等であるが、下回っている。

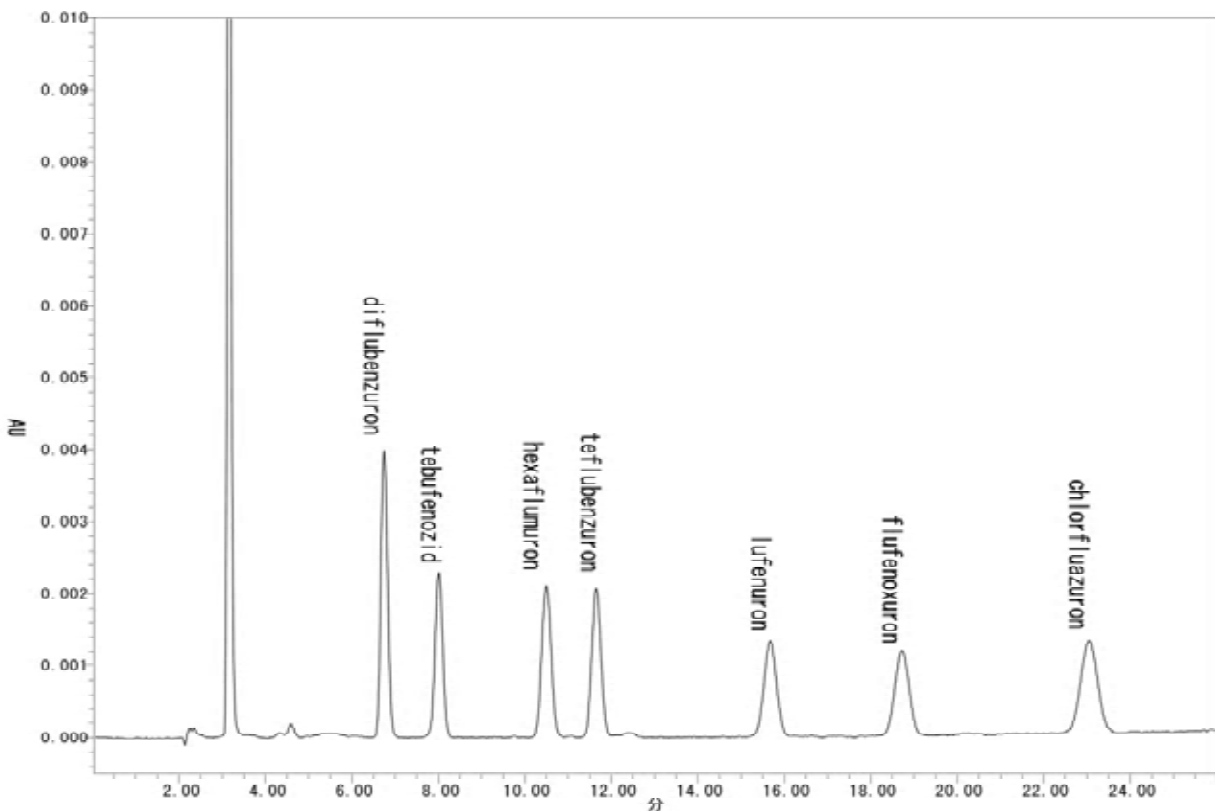
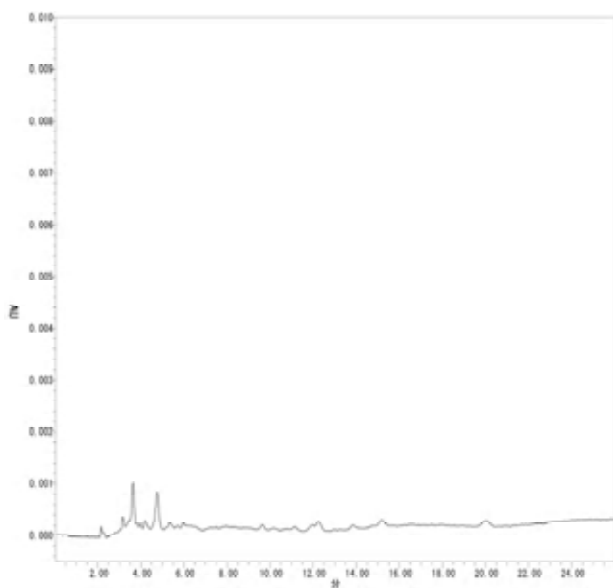


図2 CFA7混合標準溶液(0.5 µg/ml each) PDA/HPLCクロマトグラム

(a) : ねぎ試験溶液



(b) : CFA7 (3 µg each) 添加ねぎ試験溶液

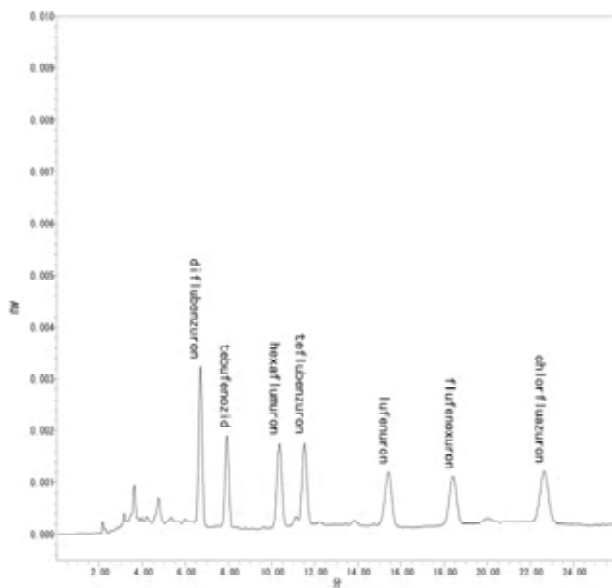


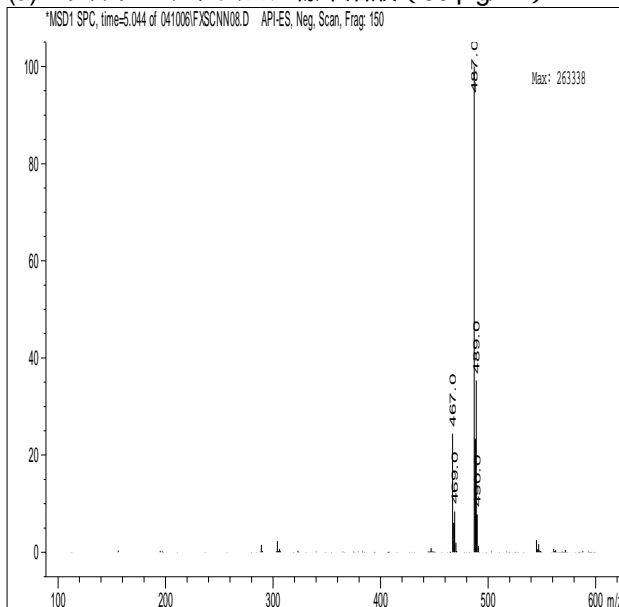
図3 試験溶液PDA/HPLCクロマトグラム

図3にねぎの250nmにおけるPDA/HPLCクロマトグラムを示す。ほとんどの試料で妨害となるようなピークは検出されなかったが、オレンジでジフルベンズロン及びテフルベンズロンの保持時間近くにオレンジ由来と思われるピークが見られた。また、トマトでフルフェノクスロン0.02 µg/g、茶でテブフェノジドが0.05 µg/g検出された。

検出されたフルフェノクスロンとテブフェノジド

について、LC/MSで確認を試みた。LC部の測定条件については、PDA/HPLC測定条件を準用した。MS部の測定条件のうちFragmentor Voltageは、50から200Vの間で50VごとにTICを測定し、最も感度のよい150Vに設定した。それ以外はLC/MSの初期条件のとおりである。図4にフルフェノクスロンとテブフェノジドの標準溶液のマススペクトルを示す。

(a) : フルフェノクスロン標準溶液 (50 µg/ml)



(b) : テブフェノジド標準溶液 (50 µg/ml)

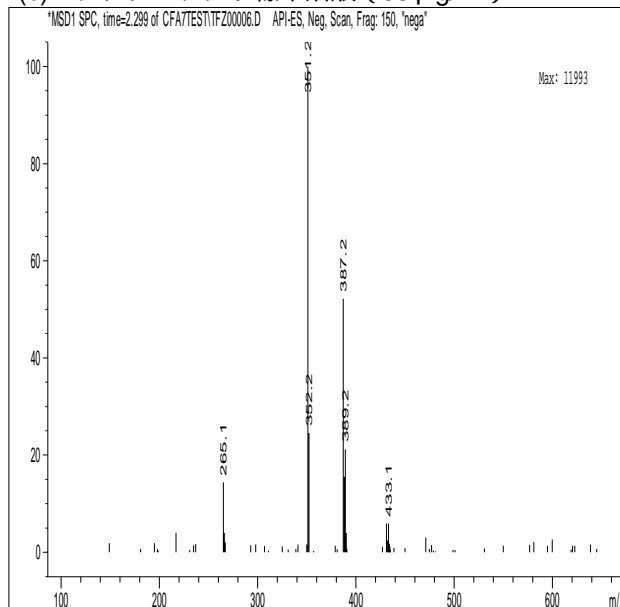
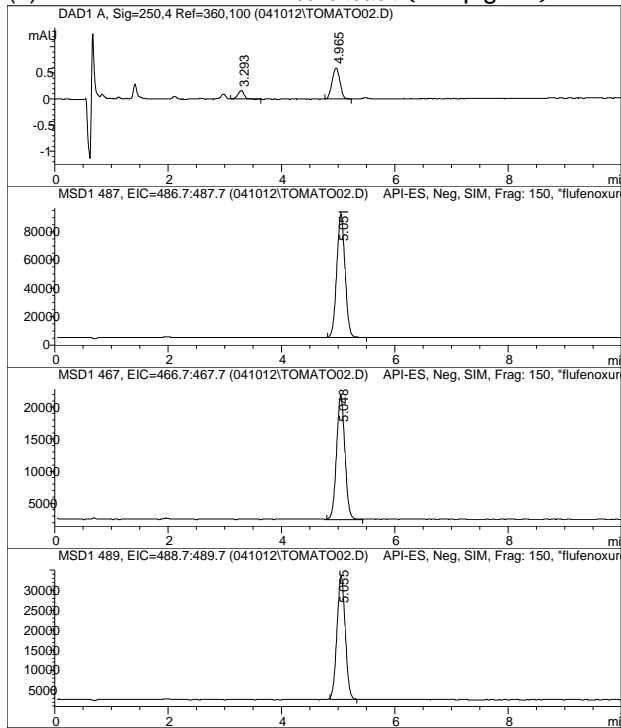


図4 標準溶液のマススペクトル

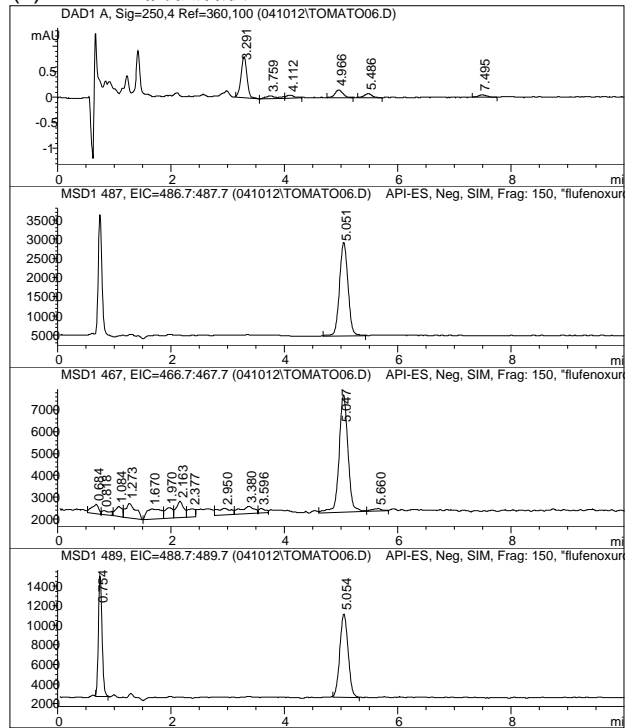
マススペクトルから[M-H]⁻と、特徴的なイオンを選択し、SIMで測定したところ、それぞれ確認すること

ができた。図5にSIMクロマトグラムを示す。

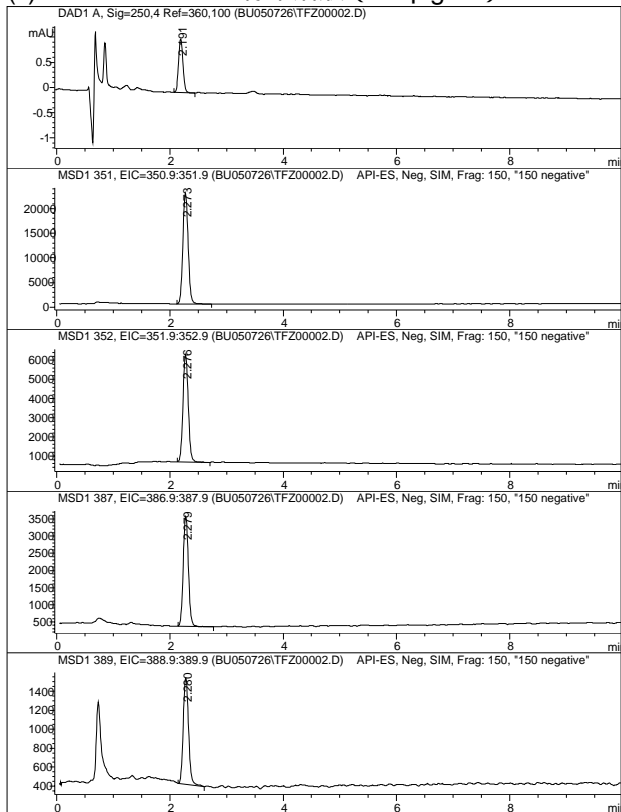
(a) : フルフェノクスロン標準溶液 (0.5 μg/ml)



(b) : トマト試験溶液



(c) : テブフェノジド標準溶液 (0.5 μg/ml)



(d) : 茶試験溶液

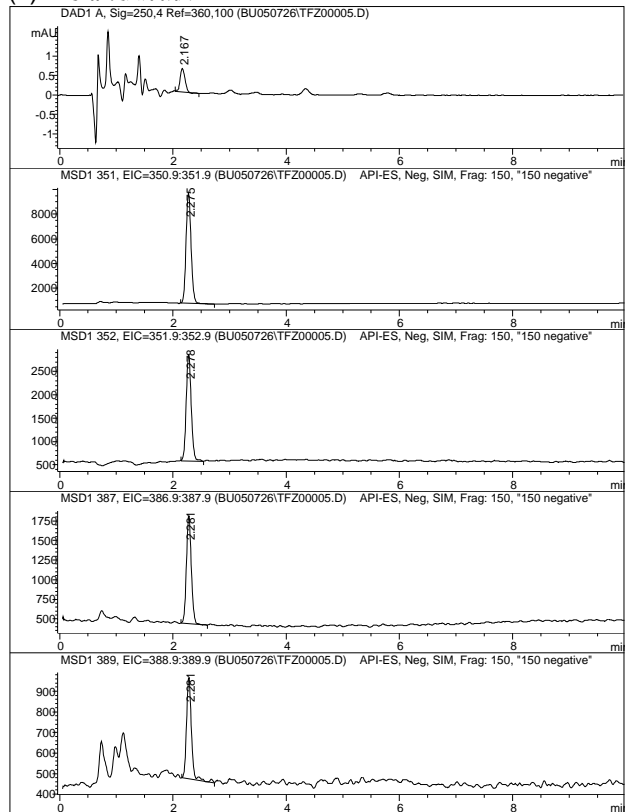


図5 SIMクロマトグラム

添加回収試験結果を表3に示す。

1999年、ハンガリーで開催されたJoint of FAO/IAEA Expert Consultation で動物用医薬品および残留農薬の通常業務で実施している一斉分析法をバリデーションするため、濃度ごとに併行再現性及び室内再現性の変動係数(CV%)、添加回収率の基準を示しているが³⁾⁴⁾、それによると、濃度が > 0.1mg/kg

1mg/kgでの基準は添加回収率が70～110%、併行再現性のCV%が15%である。表3から、回収率は69.3～93.1%、CV%はオレンジのジフルベンズロン、テブフェノジド及び茶のフルフェノクスロン以外は15%を大きく下回っており、おおむね良好な結果が得られたと考える。

表3 添加回収試験結果

		Recovery (n=3)						
		Diflubenzuron	Tebufenozid	Hexaflumuron	Teflubenzuron	Lufenuron	Flufenoxuron	Chlorfluazuron
Orange	Average	83.1%	75.0%	74.4%	70.7%	89.8%	78.9%	80.8%
	CV	16.4%	18.0%	5.3%	5.7%	3.9%	4.7%	5.7%
Apple	Average	74.2%	69.5%	69.6%	71.0%	78.3%	72.2%	71.5%
	CV	2.8%	2.1%	7.9%	6.4%	3.4%	4.2%	3.1%
Strawberry	Average	83.0%	81.2%	88.4%	85.8%	83.3%	81.5%	81.4%
	CV	5.8%	7.0%	10.3%	8.3%	10.5%	10.5%	9.0%
Grape	Average	86.1%	81.1%	85.4%	79.1%	81.5%	85.0%	82.9%
	CV	4.2%	5.0%	6.0%	6.8%	8.0%	6.1%	6.5%
Leek	Average	71.5%	70.3%	73.7%	72.1%	69.7%	74.3%	69.3%
	CV	1.8%	2.9%	7.1%	6.1%	5.5%	2.8%	0.9%
Cucumber	Average	82.7%	78.8%	92.5%	92.1%	79.3%	89.7%	82.5%
	CV	5.4%	4.0%	6.3%	7.4%	8.9%	5.0%	5.9%
Radish	Average	75.1%	72.4%	79.7%	75.5%	70.3%	76.4%	76.3%
	CV	2.1%	4.3%	6.1%	4.5%	2.8%	4.2%	0.3%
Tomato	Average	81.2%	74.1%	83.5%	87.6%	86.9%	93.1%	79.0%
	CV	2.6%	1.2%	2.3%	2.4%	3.0%	14.1%	4.5%
Tea	Average	73.3%	77.9%	77.7%	80.8%	78.7%	80.7%	77.1%
	CV	7.3%	10.6%	5.6%	6.9%	9.9%	17.0%	6.7%
Rice	Average	74.6%	70.1%	82.2%	87.8%	76.5%	77.0%	73.9%
	CV	7.9%	13.3%	14.9%	8.2%	9.2%	7.0%	8.1%
Peanut	Average	82.9%	77.4%	85.3%	86.4%	81.6%	81.4%	81.6%
	CV	2.9%	3.5%	3.1%	0.6%	0.7%	5.2%	2.1%

CV: 併行再現性の変動係数

4. 結 語

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制の導入にともない、これまで以上に検査可能である農薬を増やす必要に迫られている。今回、通常業務で実施している一斉分析法の精製条件を検討することで、CFA7を容易に分析することが可能となった。

今後は、一斉分析法の適用が可能であると考えられる農薬の分析法について幅広く検討し、日常業務に役立てていきたい。

5. 文 献

- 1) 阿部敦子, 鈴木恵子, 川島清輝 他: 平成9年度の札幌市における残留農薬の検出状況について . 札幌市衛生研究所年報, 25:43-51, 1998.
- 2) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知: 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検査法について (食安発 124001号 平成17年1月24日) .

- 3) Conclusions and Recommends of Joint FAO/IAEA Expert Consultation on Practical Procedures to Validate Method Performance of Pesticides and Veterinary Drug Residues, and Trace Organic Contaminants in Food . (Miskolc, Hungary, 8-11 November, 1999) (http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val3.htm)
- 4) Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals . (http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val2.htm)

Application of Multi-residue Method to Determine Chlorfluazuron, Diflubenzuron, Tebufenozid, Teflubenzuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron and Lufenuron

Keiko Suzuki, Hiroshi Tsuboi, Kazumi Okawa and Kozo Fujita

Chlorfluazuron, diflubenzuron, tebufenozid, teflubenzuron, flufenoxuron, hexaflumuron and lufenuron (CFA7) are pesticides, those belong to a kind of insect growth regulator. We applied multi-residue method to determine CFA7 .

The samples were treated in the same way until preparing the extract for gel permeation chromatography. The extract was cleaned up on Accubond SILICA and Mega Bond Elute NH₂, and determined by HPLC with PDA detector.

In this method, recoveries of CFA7 from 11 agricultural products to which we applied at the level of 0.1 μ g/g or 0.2 μ g/g ranged from 69.3 to 93.1%. The determination limits were 0.02 μ g/g in beans and nuts, and 0.01 μ g/g in vegetables, fruits, cereals and tea, respectively