

## HPLC分析対象農薬の多成分一斉分析法の開発

### The Development of Multicomponent Simultaneous Analysis Method of HPLC Analysis Object Pesticides

長船 達也 氏家 愛子 曾根 美千代  
大江 浩

Tatsuya OSAFUNE, Aiko UJIIE, Michiyo SONE  
Hiroshi OOE

キーワード：残留農薬，HPLC，一斉分析法

Key Words : Pesticide Residue , HPLC , Simultaneous Analysis Method

平成13年度告示法により HPLC 分析対象となっている農薬について，一斉分析法の開発を検討したところ，16種農薬の分析が可能となった。8種農産物からの標準添加回収率は，ほぼ60～110%の範囲内であり，変動係数も良好であった。なお，この方法での定量下限値は，各農薬とも0.005 µg/g以下であった。

#### 1 はじめに

食品衛生法では，平成13年5月現在217種（平成14年4月現在229種）の農薬について残留基準が定められているが，これらを告示法に従い分析することは，膨大な時間と労力が必要とされる。そのため理化学部では，従来よりGC/MSおよびHPLC（ポストカラム蛍光分析）を用いた簡便かつ迅速な一斉分析法の検討<sup>1,2)</sup>を行っており，上記農薬のうち85種（異性体，代謝物を含め101種）についての分析が可能となっている。また，他の検査機関においても同様の検討がなされているが，報告の多くはGCまたはGC/MSによる一斉分析法についてであり，ポストカラム法でのN-メチルカーバメート系農薬を除き，HPLCによる一斉分析法の報告<sup>3)</sup>は数少ない。

そこで筆者らはHPLC分析対象農薬（紫外光検出）51種のうち加水分解，置換基修飾，pH調整等の特別な方法によらず，抽出工程を併せることが可能と考えられる24種の農薬について，一斉分析法の開発を検討し，良好な結果を得たので報告する。

#### 2 分析対象農産物・農薬および試薬・装置

##### 2.1 分析対象農産物

いちご，きゅうり，トマト，馬鈴薯，日本なし，大根，白菜，ほうれん草の8種類農産物

##### 2.2 検討対象農薬

エトフェンプロックス，エトベンザニド，シクロスルファミロン，ヘキシチアゾクス，ペンシクロン，ペントキサゾン，テブフェノジド：関東化学㈱

クミルロン，クロフェンテジン，クロリムロンエチル，クロ

ルフルアズロン，ジクロメジン，ダイムロン，フェンピロキシメート(E)，メタベンズチアズロン：和光純薬工業㈱

ジフルベンズロン，ヘキサフルムロン，ルフェヌロン：Dr. Ehrenstorfer

トリベヌロンメチル，シプロジニル，シラフルオフェン：Riedel-de Haen

フルフェノクスロン：林純薬工業㈱

各農薬標準品について，1000 µg/mlの標準原液（メタノール溶液，但しクロフェンテジン，クロルフルアズロン，シクロスルファミロン，テフルベンズロンについてはアセトニトリル溶液）を調製，冷蔵保存をし，検量線作成用には0.05，0.1，0.25，0.5，1.0 µg/mlのメタノール溶液を用時調製した。

##### 2.3 装置

HPLC：島津LC-10A

検出器：フォトダイオードアレイ検出器SPD-M10AV  
カラム：Inertsil ODS-3（4.6mm i.d x 250mm）

##### 2.4 試薬

アセトニトリル，アセトン，n-ヘキサン，メタノール：残農分析用，関東化学㈱

メタノール：HPLC用，和光純薬工業㈱

塩化ナトリウム，硫酸ナトリウム（無水）：残農分析用，関東化学㈱

Mega Bond Elut SAX/PSA：Varian

#### 3 方法

##### 3.1 HPLC分析条件の検討

24種の農薬標準品について，まずアイソクラティック

分析により保持時間，吸収スペクトル，吸収極大を確認したのち，すべての農薬を60分程度で分析できるような分離条件（グラジュエントおよび検出波長）を検討した。

3.2 定量下限値の同定

標準溶液のクロマトグラムにおけるS/N比（S/N=10）から算出した。

3.3 精製用ミニカラムSAX/PSAでの溶出条件の検討

ルーチン分析で使用している精製用ミニカラム，SAX/PSA（陰イオン交換カラム）での溶出条件を検討した。

3.4 農産物での添加回収試験

当部での検査対象品である8種類の農産物（平成12年度検査品を主に）を用いて添加回収試験を行った。

3.5 平成13年度農産物の残留農薬検査

平成13年度の8種農産物における対象農薬物における分析対象農薬の残留調査を実施した。

4 結 果

4.1 HPLC分析条件

24種の農薬のうち，検討した分離条件下では感度もしくはピーク形状の悪いもの4種（クミルロン，クロリムロンエチル，シクロスルファミロン，ルフェヌロン），保持時間が重なりピークの分離ができなかったものうち，二者択一で除外したものの4種（当部の検査対象品に残留基準値の設定がなかった農薬：エトベンザニド，ジクロメジン，ダイムロン，テブフェノジド）を除く16種農薬を60分の分析時間に収めることができた（図1）。

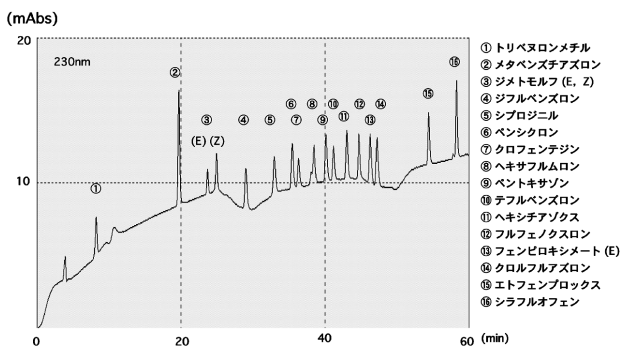


図1 16種農薬クロマトグラム

カラム温度：50

測定波長：230～270nm

流 速：0.8ml/min

移動相：A- 精製水，B-MeOH

グラジュエント：	A	B
0 min	60%	40%
20min	30%	70%
25min	30%	70%
40min	15%	85%
45min	15%	85%
55min	0%	100%
60min	0%	100%

4.2 定量下限値

上記のHPLC分析条件において，最も感度の高い測定波長から算出した定量下限値は，各農薬とも0.005 μg/g以下であった。この値は，当部検査対象品での残留基準値をすべて下回るものであった。

4.3 精製用ミニカラムSAX/PSA溶出条件

16種農薬が，ルーチンで用いているカラム溶出条件（アセトン/n-ヘキサン：70%）で十分に溶出されるかを確認するため，混合標準をSAX/PSAに添加し，アセトン/n-ヘキサン濃度を30%，50%，70%に変え10mlで溶出を行った。その結果，すべての農薬について50%濃度画分までに溶出が確認された（図2）。

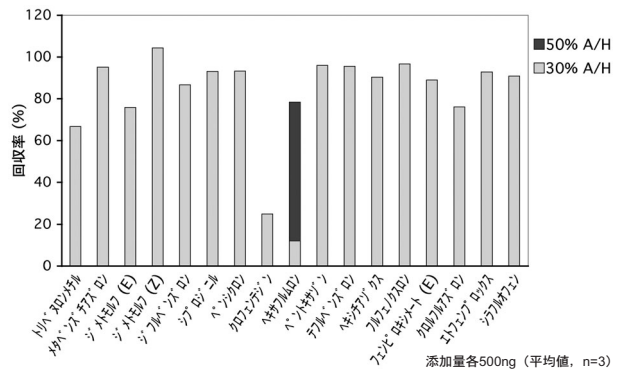


図2 SAX/PSA溶出条件検討結果

ここでトリベヌロンメチルの回収率の低さについては溶液濃縮乾固時の揮発損失によるもの，クロフェンテジンについてはカラム間でのバラツキが非常に大きく，全く回収されない場合があったことによるものと考えられた。

これらについては，試料中に添加したときにマトリクスの影響により改善される場合があるため，手法を変更せずルーチンでの条件で溶出を行うこととした。

4.4 添加回収試験

以下に示したルーチン操作に基づき，8種農産物での添加回収試験を行ったところ，16種農薬の農産物からの回収率は作物種によって違いはあったが，ほぼ60～110%の範囲内であり，変動係数も良好なものであった（表1）。

操作手順

試料秤量 20 g + 各農薬 1 μg添加

CH<sub>3</sub>CN抽出 50ml × 2

遠心分離

塩析・脱水 NaCl 7 g，Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20g

濃縮乾固

ミニカラム精製（SAX/PSA）

試料負荷 30% Acetone/Hexan 5 ml

溶 出 70% Acetone/Hexan 10ml

濃縮乾固・定容 Methanol 2 ml

HPLC分析

4.5 残留農薬検査

8種農産物における残留農薬検査の結果，作物由来の夾雑ピークに妨害されない分析対象農薬について，検出されたものはなかった（表2）。

5 ま と め

- (1) 検討対象とした24種の農薬のうち16種について，一斉分析法を開発することができた。
- (2) この方法を用い，平成13年度農産物の残留検査を実施したところ，16種農薬について検出されたものはなかった。

(3) しかし問題点として，農産物の種類や個体によっては，農薬ピークが作物由来の妨害ピークの影響をかなり受けることがあった。

(4) 上記問題を解決するためには，試薬類を用いた夾雑物のクリーンアップやLC/MSの導入による高精度な分析等の検討が必要である。

6 参 考 文 献

- 1) 菊地秀夫 氏家愛子 新目眞弓 大江浩：宮城県保健環境センター年報，19，173（2001）
- 2) 菊地秀夫 氏家愛子 新目眞弓 大江浩：宮城県保健環境センター年報，18，70（2000）
- 3) 高附巧 根本了 豊田正武他：食品衛生学雑誌，40（4），314（1999）

表1 16種農薬の添加回収率（n=3）

	いちご		きゅうり		トマト		馬鈴薯		日本なし		大根		白菜		ほうれん草	
	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)
1 トリベヌロンメチル	-	-	-	-	-	-	-	-	62	13	-	-	-	-	69	5
2 メタベンズチアズロン	90	3	94	2	89	3	91	5	89	6	-	-	93	8	95	3
3 ジメトモルフ(E)	79	5	-	-	103	10	50	9	71	21	-	-	-	-	89	8
ジメトモルフ(Z)	85	4	105	8	97	7	89	8	98	8	-	-	-	-	84	5
4 ジフルベンズロン	93	11	73	14	73	7	61	10	73	9	106	10	87	8	90	6
5 シプロジニル	74	4	88	4	94	3	76	7	86	5	97	2	83	3	94	3
6 ペンシクロン	88	9	-	-	86	8	89	6	89	9	103	9	80	8	79	5
7 クロフェンテジン	53	12	79	11	61	13	31	96	76	5	75	12	85	4	71	4
8 ヘキサフルムロン	77	5	81	4	67	4	77	6	63	8	-	-	87	2	79	3
9 ペントキサゾン	88	4	77	6	109	7	112	6	91	5	91	5	82	2	76	2
10 テフルベンズロン	95	7	102	9	95	7	70	8	94	5	99	3	84	3	90	2
11 ヘキシチアゾクス	-	-	98	3	-	-	-	-	74	5	75	7	82	10	107	2
12 フルフェノクスロン	101	4	92	3	107	6	74	9	87	5	112	3	84	5	85	5
13 フェンピロキシメート(E)	88	8	-	-	-	-	-	-	83	7	89	2	-	-	-	-
14 クロルフルアズロン	94	3	70	9	106	8	-	-	75	8	84	3	81	7	82	3
15 エトフェンブロックス	95	3	-	-	93	10	75	9	89	6	97	9	79	5	-	-
16 シラフルオフェン	85	6	-	-	-	-	-	-	-	-	78	27	-	-	-	-

- : 妨害ピークと重なり検出不能

表2 平成13年度農産物の残留農薬検査（n=3）

	いちご			きゅうり			トマト			馬鈴薯			日本なし			大根			白菜			ほうれん草		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 トリベヌロンメチル																								
2 メタベンズチアズロン																								
3 ジメトモルフ(E)																								
ジメトモルフ(Z)																								
4 ジフルベンズロン																								
5 シプロジニル																								
6 ペンシクロン																								
7 クロフェンテジン																								
8 ヘキサフルムロン																								
9 ペントキサゾン																								
10 テフルベンズロン																								
11 ヘキシチアゾクス																								
12 フルフェノクスロン																								
13 フェンピロキシメート(E)																								
14 クロルフルアズロン																								
15 エトフェンブロックス																								
16 シラフルオフェン																								

□ N.D.    □ 妨害ピークと重なり検出不能