

残留農薬スクリーニング法における HPLC 分析条件の検討

中島 三恵 福田 裕 小串 恭子 佐々木珠生
宮野 高光 山名 正史 萱島 隆之 山本 修
長谷川宏行

前報¹⁾において、食品による健康被害や苦情等に迅速に対処するためガスクロマトグラフィー(GC)による有機リン系農薬一斉分析法について報告した。今回、同様の目的で 61 種(63 物質)の農薬について高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるスクリーニング法の検討を行った。2 種類の HPLC 分析カラムを使用することにより各農薬の分別が可能であった。また、2 種類の固相カラムを用いることにより精製操作を短時間で行うことができた。ほうれんそうによる添加回収実験結果は数種類の農薬を除いて約 70~120%の範囲であり、おおむね良好であった。

キーワード： 残留農薬、高速液体クロマトグラフィー、固相カラム、フォトダイオードアレイ検出器

はじめに

食品衛生法で残留基準が設定されている農薬は平成 14 年 3 月 13 日告示分(平成 14 年 4 月 1 日適用)を含め現在 229 種にのぼり、なかでも近年は HPLC を用いて分析するものが増加している。また昨今、多発傾向にある食品を原因とする健康被害に迅速に対応するには、GC あるいは GC/MS で分析が困難な熱分解性物質等についても迅速に分析・特定する必要がある。

今回、食品に対する健康危機管理体制の整備の一環として、また将来的に LC/MS を導入した際の一斉分析法の足掛かりとして、告示法ではポストカラム蛍光法となっている N-メチルカーバメート系農薬²⁾および HPLC-蛍光法で分析するエトキシキン³⁾を含む 61 種 63 物質の農薬について、HPLC-フォトダイオードアレイ検出器を用いた残留農薬スクリーニング法を検討したので報告する。

方 法

1 試料

添加回収実験用試料としてほうれんそうを使用した。

2 試薬

今回検討した農薬は、食品衛生法で残留基準が設定されている農薬 50 種(52 物質)を含む 61 種(63 物質)であり、すべて市販の農薬標準品を使用した。HPLC 分析時各農薬の保持時間が極力重ならないよう、分析対象農薬を 3 グル

ープ(A, BおよびC)に分けた。なお、メタベンズチアズロンとシプロジニルは保持時間確認の指標として各グループに加えた。表 1 に分析対象農薬および食品衛生法における残留基準の有無を示す。

3 装置

高速液体クロマトグラフ：島津製 LC-10A
フォトダイオードアレイ検出器：

島津製 SPD-M10A

4 HPLC 測定条件

カラム：①Inertsil ODS-2 (4.6mm φ × 150mm)
②Inertsil PH (4.6mm φ × 150mm)
(ジーエルサイエンス社製)

移動相流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

注入量：20 μl

測定波長：① 220nm ② 240nm ③ 253nm
④ 270nm ⑤ 290nm

移動相：A 液 水・アセトニトリル (9:1)

B 液 水・アセトニトリル (1:9)

グラジエント条件を表 2 に示す。

表 2 グラジエント条件

時間 (min)	B液 (%)	
	ODS-2カラム	PHカラム
イニシャル	10	5
1.0	10	5
46.0	95	80
56.0	95	80

表1 分析対象農薬および残留基準の有無

No.	農薬名	残留基準の有無
グループA		
1	オキサミル	
2	メソミル	
3	アルジカルブ	○
4	メトルカルブ (MTMC)	
5	アミノカルブ	
6	ベンダイオカルブ	○
7	メタベンズチアズロン	○
8	カルバリル	
9	エチオフェンカルブ	○
10	イソプロカルブ	○
11	イナベンフィド	○
12	ジクロメジン	○
13	フェノブカルブ (BPMC)	○
14	ミクロブタニル	○
15	シクロスルファミロン	○
16	メバニピリム	○
17	シプロジニル	○
18	テブフェノジド	○
19	トリフルミゾール	○
20	トリクラミド	○
21	テフルベンズロン	○
22	ルフェヌロン	○
23	フルフェノクスロン	○
24	クロルフルアズロン	○
グループB		
25	レナシル	○
26	プロボキスル (PHC)	
27	カルボフラン	
28	キシリルカルブ (MPMC)	
29	XMC	
30	メチオカルブ	○
31	フェナリモル	○
32	クミルロン	○
33	メフェナセット	○
34	ジフルベンズロン	○
35	イプロジオン	○
36	ピラゾキシフェン	○
37	エトベンザニド	○
38	クロフェンテジン	○
39	ヘキサフルムロン	○
40	イソキサチオン	
41	フェンピロキシメート (Z)	○
42	ヘキシチアゾクス	○
43	フェンピロキシメート (E)	○
44	シラフルオフェン	○
グループC		
45	イミダクロプリド	
46	アセタミプリド	○
47	シモキサニル	○
48	チオジカルブ	
49	ピリミカーブ	○
50	チウラム	
51	ベンスルフロメチル	○
52	ジメトモルフ (E)	○
53	ジメトモルフ (Z)	○
54	アゾキシストロビン	○
55	ダイムロン	○
56	クロロタロニル (TPN)	○
57	ピテルタノール	○
58	エトキシキン	○
59	キノメチオネート	○
60	ベンシクロン	○
61	ホキシム	○
62	ペントキサゾン	○
63	エトフェンブロックス	○

5 固相カラム

Sep-Pak Plus tC18 (ウォーターズ社製)

アセトニトリル 5ml でコンディショニングした。

Sep-Pak Plus Silica (ウォーターズ社製)

アセトニトリル 5ml, ジクロロメタン 5ml でコンディショニングした。

6 試験溶液の調製

細切した試料 10g に塩化ナトリウム 4g およびアセトニトリル 20ml を添加し, 10 分間振とう抽出した。その後 2700rpm で 10 分間遠心分離を行い, アセトニトリル層を分取し, フリット付リザーバーに無水硫酸ナトリウム 5g を加え Sep-Pak Plus tC18 に接続したものに全量を負荷した。アセトニトリル 2~3ml で固相カラムを洗い, 両流出液を合わせて約 1ml まで減圧濃縮後, この液にジクロロメタン 3ml を加え Sep-Pak Plus Silica に負荷し, アセトニトリル・ジクロロメタン (3:7) 20ml で溶出した。溶出液を約 0.5 ml まで減圧濃縮後, アセトニトリルで 1ml に定容し, 試験溶液とした。

分析方法のフローチャートを図 1 に示す。

結 果 と 考 察

1 HPLC 分析条件の検討

今回, 2 種類のカラム (Inertsil ODS-2, Inertsil PH) について各農薬の保持時間の検討を行い, 分析時間が 60 分以内になるようグラジエント条件を設定した。移動相については, 今回は多種類の農薬を同一条件で分析することを目的としたため, 塩等を含まない水・アセトニトリル系を用いることとした。表 3 に各農薬の HPLC カラム別保持時間を示す。いずれのカラムにおいても 55 分以内にすべての農薬が溶出した。1 種類のカラムではピ



図 1 分析方法のフローチャート

表3 各農薬のHPLCカラム別保持時間および精製後の回収率

農薬名	Inertsil ODS-2		Inertsil PH		回収率(%)	
	溶出順	保持時間 (min)	溶出順	保持時間 (min)	固相カラム精製	ほうれんそう添加
* オキサミル	1	3.9	1	6.0	97.2	94.8
* メソミル	2	5.3	2	6.4	99.9	84.2
イミダクロプリド	3	8.7	3	12.6	103.2	85.0
アセタミプリド	4	10.2	4	14.1	92.0	78.4
シモキサニル	5	11.7	5	14.1	95.5	75.7
* アルジカルブ	6	13.4	6	14.7	102.0	86.9
* メトルカルブ(MTMC)	7	15.4	7	16.6	101.1	78.3
* アミノカルブ	8	16.5	8	19.3	100.0	81.3
** レナシル	9	16.9	9	19.4	100.6	84.9
** プロボキスル(PHC)	10	17.6	10	19.4	98.9	80.5
** カルボフラン	11	18.1	11	20.2	101.2	95.3
* ベンダイオカルブ	12	18.1	12	20.2	101.0	95.2
チオジカルブ	13	18.2	18	22.4	98.6	83.8
メタベンズチアズロン	14	18.6	13	20.2	99.1	84.7
ピリミカブ	15	19.1	14	20.2	97.8	79.4
** キシリルカルブ(MPMC)	16	19.2	15	20.2	101.1	84.1
カルバリル	17	19.6	17	21.9	100.8	82.5
チウラム	18	19.6	21	24.3	95.6	14.0
** XMC	19	19.9	16	21.0	101.6	90.7
* エチオフェンカルブ	20	20.5	19	22.6	100.9	69.6
* イソプロカルブ	21	22.1	20	23.4	100.5	334.6
ベンスルフロメチル	22	22.4	23	26.8	0.0	69.8
イナベンフィド	23	24.0	24	26.8	98.5	95.5
ジメトモルフ(E)	24	24.5	27	28.1	98.2	74.9
ジクロメジン	25	24.7	22	25.9	95.2	76.5
ジメトモルフ(Z)	26	25.5	28	28.7	97.4	84.9
* フェノブカルブ(BPMC)	27	25.7	25	26.8	98.8	85.2
メチオカルブ	28	25.7	26	27.4	100.2	85.7
フェナリモル	29	27.0	29	29.4	98.2	83.7
アゾキシストロビン	30	27.9	38	32.3	96.6	82.5
クミルロン	31	27.9	32	30.7	98.5	95.8
シクロスルファムロン	32	27.9	35	32.2	7.3	83.5
ミクロブタニル	33	27.9	30	30.2	99.5	84.9
メフェナセツト	34	28.1	34	30.8	98.3	85.9
ダイムロン	35	28.3	33	30.7	98.8	88.0
メバニピリム	36	29.4	31	30.5	96.8	88.5
ジフルベンズロン	37	30.2	36	32.2	99.2	83.6
クロロタロニル(TPN)	38	30.5	47	36.2	97.6	92.0
イプロジオン	39	30.6	42	33.1	97.4	92.5
ビテルタノール	40	30.7	39	32.3	96.0	95.1
シプロジニル	41	32.1	37	32.2	97.8	88.8
エトキシキン	42	32.4	40	32.3	88.7	152.2
テブフェノジド	43	32.5	43	34.4	96.6	87.4
ピラゾキシフェン	44	32.6	44	35.0	97.1	83.8
エトベンザニド	45	34.7	45	35.0	96.3	81.3
# キノメチオネート	46	35.3	41	32.7	107.6	90.7
トリフルミゾール	47	35.4	46	35.8	97.0	94.5
クロフェンテジン	48	35.7	49	37.3	96.4	81.5
トリクラミド	49	36.0	48	36.4	92.3	111.3
ペンシクロン	50	36.0	51	38.0	100.6	108.8
ヘキサフルムロン	51	36.7	53	38.9	97.0	109.4
ホキシム	52	36.7	52	38.7	95.4	95.4
テフルベンズロン	53	36.9	50	37.5	96.1	93.0
イソキサチオン	54	37.2	54	38.9	96.9	97.6
フェンピロキシメート(Z)	55	39.7	55	39.5	95.1	99.2
ベントキサゾン	56	39.8	58	41.3	99.6	92.1
ルフェヌロン	57	40.2	56	40.8	93.8	95.3
ヘキシチアゾクス	58	41.5	59	41.7	93.1	77.5
フルフェノクスロン	59	41.9	60	42.2	93.1	106.9
フェンピロキシメート(E)	60	42.5	57	41.2	93.8	95.6
クロルフルアズロン	61	43.4	61	43.7	95.1	99.5
エトフェンブロックス	62	48.7	62	47.1	107.1	88.3
シラフルオフエン	63	54.0	63	50.7	92.3	119.0

添加量: * 6 μ g, ** 4 μ g, # 1 μ g, それ以外 2 μ g

ークが重なるものがあるが、異なる性質のカラムを併用することによりほとんどの農薬を分離することができた。しかし、今回の分析条件ではカルボフランとベンダイオカルブ、ピリミカーブとキシ

リルカルブ (MPMC) の分離が困難であった。図2および3に各 HPLC カラムの 220nm における農薬標準液のクロマトグラムを示す。また、表4に各農薬の測定波長を示す。

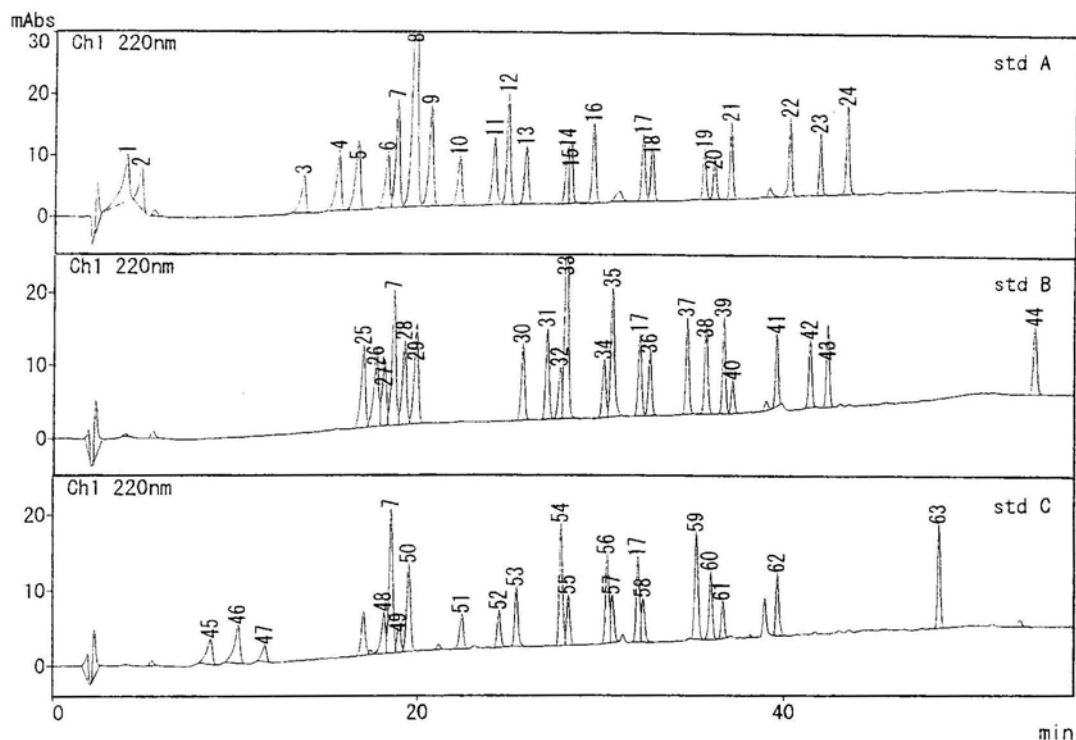


図2 標準液のクロマトグラム (Inertsil ODS-2)
(番号は表1の農薬名に対応)

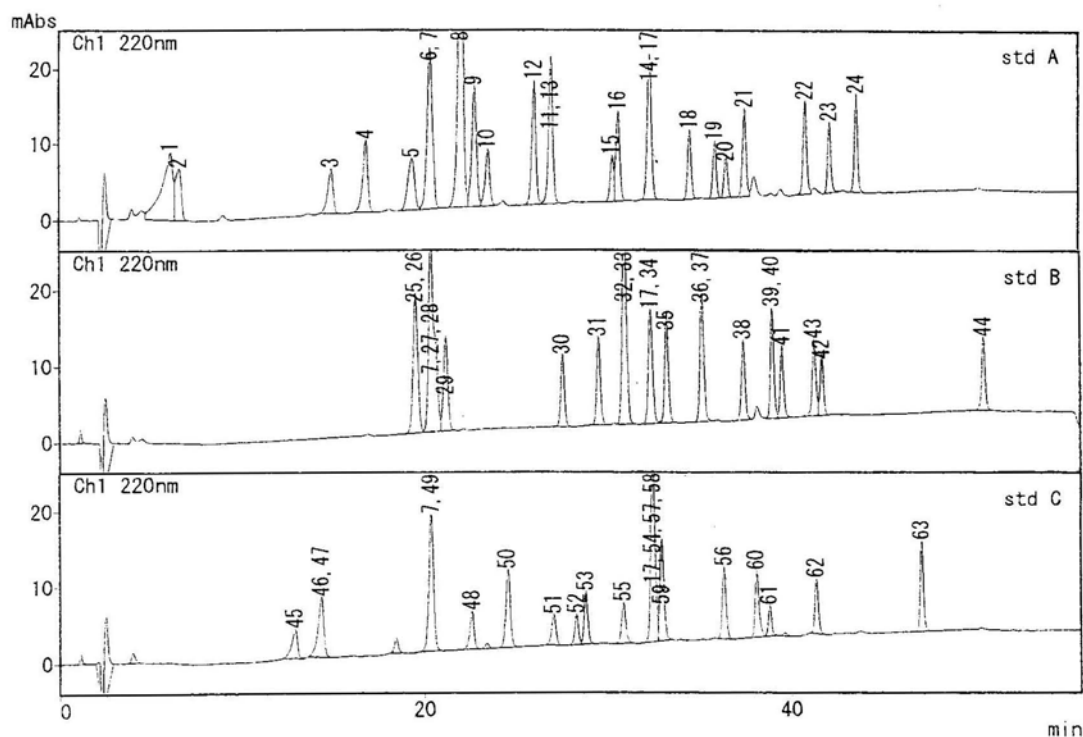


図3 標準液のクロマトグラム (Inertsil PH)
(番号は表1の農薬名に対応)

表 4 各農薬の測定波長

グループA		グループB		グループC	
No. 農薬名	測定波長 (nm)	No. 農薬名	測定波長 (nm)	No. 農薬名	測定波長 (nm)
1 オキサミル	② 240	25 レナシル	④ 270	45 イミダクロプリド	④ 270
2 メソミル	② 240	26 プロボキスル(PHC)	① 220	46 アセタミプリド	② 240
3 アルジカルブ	① 220	27 カルボフラン	① 220	47 シモキサニル	② 240
4 メトルカルブ (MTMC)	① 220	28 キシリルカルブ(MPMC)	① 220	48 チオジカルブ	② 240
5 アミノカルブ	② 240	29 XMC	① 220	49 ビリミカーブ	② 240
6 ベンダイオカルブ	① 220	30 メチオカルブ	① 220	50 チウラム	① 220
7 メタベンズチアズロン	④ 270	31 フェナリモル	① 220	51 ベンスルフロンメチル	② 240
8 カルバリル	① 220	32 クミルロン	① 220	52 ジメトモルフ(E)	② 240
9 エチオフェンカルブ	① 220	33 メフェナセット	① 220	53 ジメトモルフ(Z)	② 240
10 イソプロカルブ	① 220	34 ジフルベンズロン	③ 253	54 アゾキシストロビン	① 220
11 イナベンフィド	④ 270	35 イプロジオン	① 220	55 ダイムロン	② 240
12 ジクロメジン	③ 253	36 ビラゾキシフェン	③ 253	56 クロロタロニル(TPN)	② 240
13 フェノブカルブ (BPMC)	① 220	37 エトベンザニド	④ 270	57 ビテルタノール	④ 270
14 ミクロブタニル	① 220	38 クロフェンテジン	④ 270	58 エトキシキン	① 220
15 シクロスルファムロン	③ 253	39 ヘキサフルムロン	③ 253	59 キノメチオネート	① 220
16 メパニピリム	④ 270	40 イソキサチオン	④ 270	60 ペンシクロン	② 240
17 シプロジニル	④ 270	41 フェンビロキシメート(Z)	③ 253	61 ホキシム	⑤ 290
18 テブフェノジド	② 240	42 ヘキシチアゾクス	② 240	62 ペントキサゾン	③ 253
19 トリフルミゾール	② 240	43 フェンビロキシメート(E)	③ 253	63 エトフェンプロックス	① 220
20 トリクラミド	② 240	44 シラフルオフェン	① 220		
21 テフルベンズロン	① 220				
22 ルフェヌロン	③ 253				
23 フルフェノクスロン	③ 253				
24 クロルフルアズロン	③ 253				

2 精製方法の検討

試料中のきょう雑物の影響を抑えるため、固相カラムを用いた精製条件の検討を行った。今回は分析対象農薬に N-メチルカーバメート系農薬が含まれるため、既報⁴⁾の N-メチルカーバメート系農薬（ポストカラム蛍光検出法）分析法に準じ、Sep-Pak Plus Silica を用いたアセトニトリル・ジクロロメタン系を溶出溶媒とした。また、HPLC カラムへの負荷を軽減するため、抽出液をあらかじめ Sep-Pak Plus tC18 に通すこととした。標準溶液を用いた回収率はベンスルフロンメチル、シクロスルファムロンを除き 88.7~107.6%とおおむね良好であった。表 3 に各農薬の添加回収結果を示す (n=3)。

ベンスルフロンメチル、シクロスルファムロンの回収率が悪かった原因としては、濃縮操作時のロス、固相カラムからの溶出条件の不一致等が考えられる。そこで濃縮、Sep-Pak Plus tC18 精製、Sep-Pak Plus Silica 精製の各段階ごとに添加回収を行ったところ、Sep-Pak Plus Silica 精製時アセトニトリル・ジクロロメタン (3:7) 20ml ではほとんど溶出していないことがわかった。そこで溶出溶媒をアセトン 30ml にしたところ、各農薬の回収率は 85.3%および 94.0%と、良好な結果が得られた。

3 実試料への適用

本法を用い、実試料としてほうれんそうについ

て標準溶液を添加し回収率を求めた結果を表 3 に示す (n=1)。チウラムの回収率が低く (14.0%)、イソプロカルブ、エトキシキンは妨害ピークの影響を受け高めの回収率になったが、その他の農薬の回収率は 69.6~119.0%であり、良好な結果が得られた。

今回、61 種(63 物質)の農薬について HPLC による検討を行った。2 種類の HPLC カラムを用いることによりほとんどの農薬の分離・同定が可能であった。

今後さらに数種の異なる HPLC カラムでの分離の検討、また未検討の HPLC 分析農薬についての保持時間・吸収スペクトル等のデータを蓄積していくことで、分析結果の信頼性が増すものと考え

文 献

- 1) 福田 裕 他：食品中の有機リン系農薬 56 種の迅速一斉分析法，広島市衛研年報，20，38~42(2001)
- 2) 厚生省告示第 199 号，平成 6 年 6 月 9 日
- 3) 厚生省告示第 239 号，平成 4 年 10 月 27 日
- 4) 佐々木珠生 他：高速液体クロマトグラフィーによる新規残留農薬分析法の検討（その 2），広島市衛研年報，15，33~43(1996)