

農薬の登録拡大申請に伴う作物残留試験結果

中村正規

福岡市保健環境研究所保健科学課

Determination of Azoxystrobin Residues in Garland Chrysanthemum

Masanori NAKAMURA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

農薬の登録拡大申請を行うため作物残留試験における農薬分析を実施した。対象作物はしゅんぎくで対象農薬はアゾキシストロビンを成分とするアミスター20フロアブルである。試験法は厚生労働省の通知法に準じミニカラムを用いた精製法を検討した。その結果、試料に0.5 mg/kg および5 mg/kg 添加し回収率を求めたところ平均回収率が87.9%～100.5%、変動係数が1.1%～3.7%と良好な結果が得られた。この試験法を用いて分析した結果は、散布後1日目が12.0 ppm～15.2 ppmで食品衛生法の残留基準値30 ppm未満であり、14日目では3.1 ppm～7.1 ppmと基準値の1/4～1/10の濃度であった。

Key Words: しゅんぎく garland chrysanthemum, アゾキシストロビン azoxystrobin, 残留農薬 pesticide residues

1 はじめに

福岡市では都市型農業として野菜の生産額は4割を占め、しゅんぎくは福岡県内第1位の産地である。平成14年12月に農薬取締法が改正（平成15年3月施行）され適用作物以外の農産物に農薬を使用することができなくなった。しゅんぎくはメジャー作物に分類されてはいるが使用できる農薬が少なくなり、安定生産に支障をきたしている。

そこで、農薬登録拡大に向けて福岡県が中心となり福岡県、広島市および福岡市が連携し、登録申請に必要な試験を実施することとなった。

対象農薬は殺菌剤として登録されているアミスター20フロアブルでアゾキシストロビンを20%含有しており、食品衛生法ではしゅんぎくに30 ppmの残留基準値が設定されている。作物残留試験を単年度で完了するために2つの県の圃場で試料の調製を行い、農薬分析は2機関で行った。その1機関として当所が担当したのでその内容を報告する。

アゾキシストロビンの試験法は厚生労働省から個別試験法が通知¹⁾されているが、クロマトグラフ管を用いた精製法のため多量の試薬を要し操作も煩雑なため、ミニカラムによる精製法を検討したので併せて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

作物残留試験計画書に基づき、表1に示した広島市および福岡市の圃場で栽培されたしゅんぎくに対象農薬を2回散布後1日目、7日目および14日目に採取されたものを試料とした。

薬剤の散布は対象農薬の2,000倍希釈液を一回に10 a当たり200 L使用した。

添加回収試験等に用いる無処理試料はそれぞれの圃場で栽培されたものを用いた。

表1 試料の採取年月日

圃場名 (品種等)	処理 年月日	経過 日数	試料採取 年月日
	無処理		H20/10/15
広島市 (広島在来)	H20/10/7 10/14	1日	H20/10/15
		7日	H20/10/21
		14日	H20/10/28
	無処理		H20/12/9
福岡市 (在来博多 中葉系)	H20/11/25 12/2	1日	H20/12/3
		7日	H20/12/9
		14日	H20/12/16

2.2 分析対象

アミスター20 フロアブルの成分であるアゾキシストロピンが分析対象である。

2.3 装置

液体クロマトグラフ：Hewlett PACARD 社製 1100 シリーズを使用した。

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 POLYTRON PT3100 を使用した。

ミキサー：HITACHI 社製 VA-895MIXER を使用した。

2.4 測定条件

分離カラム：Agilent社製 Zorbax SB-C18 5 μm，内径 3 mm，長さ150 mm

カラム温度：40

移動相：アセトニトリルおよび水(55:45)混液

移動相流量：0.3 mL/min

測定波長：UV260 nm

保持時間：約 8.1 min

2.5 定量方法

アゾキシストロピン標準原液をアセトニトリルおよび水で希釈して 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/L のアセトニトリルおよび水(1:1)混液を調製した。各溶液 10 μL を前記条件の液体クロマトグラフに注入し、アゾキシストロピンのピーク面積を用いて絶対検量線を作成し定量した。

2.6 試験方法

2.6.1 標準品および試薬

アゾキシストロピン標準品：シグマ アルドリッチ ジャパン社製(含有量 99.9%) を使用した。

アゾキシストロピン標準原液：アゾキシストロピン標準品 10.0 mg (純度換算相当量) を正確に量りとり、アセトニトリルに溶解し、50 mL に定容して 200 mg/L 標準原液を作成した。

アセトニトリル：市販の高速液体クロマトグラフ用を使用した。

アセトン、n-ヘキサン、酢酸エチル、塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム：市販の残留農薬・PCB 試験用を使用した。

オクタデシルシリル化シリカゲル(C18)ミニカラム：Varian 社製 Bond Elut C18HF 1 g/6 mL を使用した。

合成ケイ酸マグネシウム(フロリジル)ミニカラム：ジーエルサイエンス(株)製 InertSep FL-PR 1 g/6 mL を使用した。

シリカゲルミニカラム：ジーエルサイエンス(株)製 InertSep Si FF 1 g/6 mL を使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 No.5A を使用した。

その他の試薬：市販特級品を使用した。

2.6.2 試験溶液の調製

1) 抽出方法

送付されてきた試料は農薬作物残留試験の手引き²⁾ および農林水産省通知³⁾ に従い受領し処理した。

試料の写真を撮影した後、2 分割し、一方に試料重量の 1/2 量の 3%リン酸を加え、ミキサーで磨砕均一化した。分割したもう一方の試料は-20 で保存した。

磨砕均一化試料 30 g (試料 20 g 相当) を採り、アセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、2,000 rpm で 10 分間遠心分離し上澄みをろ紙でろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えて再度ホモジナイズしてろ過し、先のろ液と合わせ、アセトンを加えて全量を 200 mL とした。

2) 精製

抽出液 40 mL をナス型フラスコに採り、20 mL 程度まで減圧濃縮し、アセトン 5 mL および水 5 mL でコンディショニングを行った C18 ミニカラムに濃縮液を注入し流出液を採った。さらにナス型フラスコをアセトン 2 mL および水 1 mL を加え洗浄し、洗浄液を C18 ミニカラムに注入する操作を 2 回繰り返して先の流出液と合わせた。得られた流出液に 10%塩化ナトリウム水溶液 40 mL と酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:1) 混液 30 mL を加えて振とうした。静置後、酢酸エチルおよび n-ヘキサン層を採り、水層に酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:1) 混液 30 mL を加えて振とうした。静置後、酢酸エチルおよび n-ヘキサン層を採り、合わせて無水硫酸ナトリウムで脱

水後、ろ過し、濃縮乾固した。残留物にアセトンおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 2 mL を加え溶解した。

この溶液をアセトンおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 10 mL でコンディショニングを行ったフロリジルミニカラムに負荷した後、アセトンおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を濃縮乾固し、酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 2 mL で溶解した。

これを酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 10 mL でコンディショニングを行ったシリカゲルミニカラムに注入し酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 20 mL を注入し流出液は捨て、次いで、酢酸エチルおよび n-ヘキサン (4:6) 混液 30 mL を注入し流出液を濃縮乾固した。

これにアセトニトリルおよび水 (1:1) 混液を加えて溶かし、正確に 4 mL として、これを試験溶液とした。

濃縮乾固の操作は 40 以下で数 mL を残して減圧濃縮し、その後窒素ガスを用いて溶媒を除去した。

2.6.3 添加回収実験

アゾキシストロピン標準原液をアセトニトリルで希釈し 100 mg/L と 10 mg/L および 2 mg/L を調製した。試料重量の 1/2 量の 3% リン酸を加えて磨砕均一化した無処理試料 30 g (試料 20 g 相当) に各 1 mL ずつ加え十分混合し、濃度が 5 mg/kg と 0.5 mg/kg および 0.1 mg/kg の標準液添加試料を調製した。抽出操作は混合後 30 分間放置し行った。

試験は各圃場および各濃度ごとに 3 回行った。

2.6.4 保存中の安定性試験

試料は受け入れた日から分析を始めたため、保存安定性試験は実施していない。

3 結果および考察

3.1 試験方法の検討

試験方法は公定法での実施が必要であり、食品衛生法の残留基準が設定されているため厚生労働省通知の個別試験法¹⁾ (以下、通知法) に準じて行った。

試料の磨砕均一化の方法は通知法に従いアゾキシストロピンの分解防止のため、試料量の 1/2 量の 3% リン酸を加えて行った。

精製方法はフロリジルカラムクロマトグラフィーおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が通知法に示されているが、クロマトグラフ管に湿式充填する必要があり、充填剤の活性度の調整も煩雑である。

このため、市販のミニカラムを用いた方法を検討した。

通知法では試料 20 g 相当に対し、C18 ミニカラムやフロリジルカラムおよびシリカゲルカラムは 5 g の充填剤量を使用されているが、今回の試験では通知法の 1/5 量である 4 g 相当の試料量で試験を行ったため、ミニカラムの充填剤量も 1/5 量の 1 g で検討した。

C18 ミニカラムでは 60% 以上のアセトン濃度ではカラムに保持することもなく溶出したため溶出方法は通知法と大きな違いは見られなかったが、フロリジルミニカラムおよびシリカゲルミニカラムでは充填剤量が異なるためカラムからの溶出率を測定した。フロリジルミニカラムでは表 2 に示す溶出率が得られたためアセトンおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 20 mL で溶出した。シリカゲルミニカラムでは表 3 に示すとおり、酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 混液 20 mL で洗浄後、酢酸エチルおよび n-ヘキサン (4:6) 混液 30 mL で溶出した。

液体クロマトグラフの移動相は通知法ではアセトニトリルおよび水 (45:55) 混液が用いられているが、定量に支障を与える妨害ピークが見られなかったため分析時間が短縮できるアセトニトリルおよび水 (55:45) 混液を用いた。

表 2 フロリジルミニカラムからの溶出率 単位: %

アセトンおよび n-ヘキサン (2:8) 混液				
InertSep	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	Total
FL PR	86	9	0	95

表 3 シリカゲルミニカラムからの溶出率 単位: %

酢酸エチルおよび n-ヘキサン (4:6) 混液				
InertSep	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	Total
Si FF	59	38	2	99

酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 混液
20 mL で洗浄後

3.2 標準溶液の検量線

0.1 mg/L ~ 20 mg/L に調製したアセトニトリルおよび水 (1:1) 混液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積での検量線は相関係数 $r=1.000$ と良好な直線性を示した。

3.3 検出限界および定量限界

液体クロマトグラフでの最小検出量は 1 ng で、試料では 0.1 mg/kg の検出が可能であった。表 4 に 0.1 mg/kg の添加回収試験結果を示したが無処理試料でアゾキシストロピンの保持時間に小さな妨害ピークが見られ、広島市の平均回収率が 124% と適正範囲の 70% ~ 120%³⁾ を超えたため、定量下限は、残留基準値が 30 ppm であること

を考慮し 0.5 ppm に設定した。

4 まとめ

3.4 添加回収試験結果

広島市と福岡市の圃場で得られた無処理試料に定量下限の 0.5 mg/kg とその 10 倍量の 5 mg/kg になるようアゾキシストロピンのニトリル溶液を加えて 2.6.2 試験溶液の調製で得られた濃度から試験操作の回収率を測定した。結果を表 4 に示したとおり、平均回収率は 87.9 ~ 100.5% で変動係数は 1.1 ~ 3.7% と良好な結果であった。

表 4 添加回収試験結果 単位：%

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	回収率			平均 回収率	変動 係数
		92.1	95.4	92.1		
広島市	5	92.1	95.4	92.1	93.2	2.0
	0.5	99.3	101.5	100.7	100.5	1.1
	0.1	118	131	124	124	5.2
福岡市	5	87.1	88.9	88.9	88.3	1.2
	0.5	89.4	84.2	90.1	87.9	3.7
	0.1	116	111	111	112	2.8

3.5 分析結果

試料はそれぞれ 2 回並行で測定し、結果を表 5 に示した。2 回目に散布された 1 日後での残留濃度は広島市圃場が 12.1 ppm、福岡市圃場で 15.2 ppm が検出された。残留濃度は散布後の経過日数で減少し、14 日目では広島市圃場が 3.1 ppm、福岡市圃場で 7.1 ppm であった。

表 5 分析結果

圃場名	経過 日数	分析値 (ppm)		
		No.1	No.2	平均値
広島市	BL*	<0.5	<0.5	<0.5
	1	12.2	12.0	12.1
	7	11.7	11.4	11.6
	14	3.1	3.1	3.1
福岡市	BL	<0.5	<0.5	<0.5
	1	15.2	15.1	15.2
	7	11.6	11.3	11.4
	14	7.1	7.1	7.1

BL*：無処理試料

ミニカラムによる精製法を検討し、しゅんぎく中のアゾキシストロピンの分析を行った。

- 1) 本法における平均添加回収率は 0.1 mg/kg 添加で 112% ~ 124% で適正範囲を超えていたが、0.5 mg/kg と 5 mg/kg の添加では 87.9% ~ 100.5%、変動係数は 1.1% ~ 3.7% と良好であった。
- 2) 分析結果は、散布後 1 日目が 12.0 ppm ~ 15.2 ppm で食品衛生法の残留基準値 30 ppm 未満であり、14 日目では 3.1 ppm ~ 7.1 ppm と基準値の 1/4 ~ 1/10 の濃度であった。

謝辞

本分析を行うにあたり、貴重なご助言等を頂きました福岡県農業総合試験場土壌・環境部環境保全チームの森山弘信氏に深く感謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第 0124001 号：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試験法「アゾキシストロピン試験法（農産物）」、平成 17 年 1 月 24 日
- 2) 社団法人日本植物防疫協会：農薬作物残留試験の手引き、平成 15 年 2 月
- 3) 農林水産省生産局生産資材課長通知 13 生産第 3986 号：「農薬登録申請に係る試験成績について」の運用について、平成 13 年 10 月 10 日