

輸入食肉からの残留クロルフルアズロン 検出事例について

園田 要¹・木内 佳伸¹・藤本 和司¹

Determination of Residual Chlorfluazuron in imported Beef.

Kaname SONODA, Yoshinobu KIUCHI, Kazushi FUJIMOTO

平成6年11月、豪州産の牛肉に有機塩素系農薬であるクロルフルアズロンの残留が問題となり、暫定指導基準が食肉（脂肪中）1.0 ppmに設定され、厚生省から残留の疑いのあるものについて検査を実施するよう指示があった。通知された分析法をもとに、精製方法、ガスクロマトグラフィー（ECD）による方法、逆相及び順相液体クロマトグラフィーによる方法を検討し検査を行った。福岡市内流通の豪州産牛肉32件を検査したところ、2件から暫定指導基準の5分の1である0.2 ppmを検出した。

Key Words : クロルフルアズロン chlorfluazuron, 農薬 Pesticide,
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography,
ECD ガスクロマトグラフィー ECD gas chromatography

I はじめに

平成6年11月17日、厚生省生活衛生局乳肉衛生課から、豪州産の牛肉にクロルフルアズロンが残留しているおそれがあるとの通知¹⁾があった。クロルフルアズロンはキチン合成を阻害するベンゾイルフェニル尿素系の昆虫成長制御剤で農薬として使用されている。牛肉中への残留原因は豪州東部の干ばつによる飼料不足のため、綿くず及び綿の切り株を飼料として与えたところ、綿くずに残留していたクロルフルアズロンが牛に移行したものと報告されている。

クロルフルアズロンの残留基準は豪州では食肉（脂肪中）1 ppm、内臓に0.1 ppmと設定されているが、日本では食品衛生法による基準は設定されていないため、暫定的な指導基準が食肉（脂肪中）1.0 ppmに設定され、残留の疑いがあるものについて検査を実施するよう厚生省から指示があった。分析法についてはGC（ECD）による暫定的な分析法が通知²⁾され、後にHPLCによる方法が通知³⁾された。これらの検査法をもとに検査方法の検討を行い福岡市内流通の牛肉について検査を行ったところ、2検体より暫定指導基準の5分の1の0.2 ppmを検出した。その検査の概要について報告する。

II 実験方法

1. 試料

平成6年11月21～28日に保健所の食品衛生監視員により福岡市内で収去された豪州産牛肉32件を検査した。

2. 試薬等

- ・クロルフルアズロン標準品：Riedel-de Haën社製
- ・標準原液：標準品15 mgを精秤し、アセトンで30 mlに定容して標準原液（500 μg/ml）とした。
- ・標準溶液（GC用）：標準原液を適宜アセトン及びn-ヘキサン（以下ヘキサンと略）で希釈してGC用の標準溶液とした。
- ・標準溶液（HPLC用）：標準溶液（GC用）の溶媒を窒素ガスで留去し、HPLC用の移動相に溶解したものを標準溶液とした。
- ・5%含水フロリジル：和光純薬工業製フロリジル60～100メッシュを450℃1夜加熱後、130℃で1時間放冷し、フロリジルの5%（w/w）の水を加え、十分攪拌混合し、48時間以上放置後に使用した。
- ・フロリジルカラム：5%含水フロリジル3 gを内径1 cmのガラスカラム管にジエチルエーテル（以下エーテルと略）-ヘキサン（3：7）で湿式充填し、無水

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

硫酸ナトリウムを約1 cmの高さに積層し、エーテル-ヘキサン(3:7) 30 mlで洗浄後使用した。

- ・水: 蒸留水をヘキサンで2回洗浄して使用した。
- ・有機溶媒類: 和光純薬工業製残留農薬試験用を使用した。

3. 装置

1) GC (ECD):

GC (ECD): ヒューレットパッカード社 (HP)
製 5890 シリーズ II
インテグレータ: HP 3396 型
オートサンプラー: HP 7673 型

2) 逆相 HPLC:

ポンプ: 島津 LC-5 A 型
UV 検出器: 島津 SPD-6 A 型
インジェクター: RHEODYNE 7125 型

3) 順相 HPLC:

ポンプ: Waters 510 型
UV 検出器: Waters 490 型
インジェクター: RHEODYNE 7125 型

4. 試験方法

フードプロセッサーでホモジナイズした食肉 40 g を 250 ml の共栓付き遠沈管に取り、水 40 ml、アセトン 40 ml、ヘキサン 80 ml を加え、振とう後、遠心分離し、上層のヘキサン層を共栓比色管に移した。更にヘキサン 80 ml を加え同様に操作し、ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。脱水したヘキサン層を重量既知のナシ型フラスコに移し、ロータリーエバポレーター及び窒素ガスを用いて溶媒を完全に除去し脂肪重量を測定した。脂肪約 1 g をヘキサン 10 ml に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml を加え、5 分間振とうした。アセトニトリル層を分取し、再度ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml を加え同様の操作を行った。アセトニトリル層を合わせ、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。残渣を少量のヘキサンで溶解し、フロリジルカラムに負荷した。エーテル-ヘキサン(3:7) 20 ml で洗浄後、エーテル-ヘキサン(5:5) 20 ml で溶出させたものを GC (ECD) により測定した。クロロフルアズロンの分解物と同等の保持時間にピークを検出した場合、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去後、残渣を HPLC の移動相 1 ml に溶解し HPLC (逆相及び順相) による確認と定量を行った。

5. 測定条件

1) GC (ECD):

カラム: QUADREX 社製 MP 50 HT 0.25 mm ϕ \times

25 m, df = 0.1 μ m

キャリアーガス: ヘリウム 1 ml/min

メイクアップガス: 窒素 60 ml/min

温度: 100°C (3min) - 10°C/min. - 270°C (10min)

注入量: 1 μ l

注入方法: スプリットレス 3 min

2) 逆相 HPLC:

カラム: Inertsil ODS-2 (5 μ m) 4.6 mm ϕ \times 15 cm

注入量: 20 μ l

移動相: アセトニトリル: 水 (75:25) 1 ml/min

検出条件: UV 260 nm, 0.01 AUFS

3) 順相 HPLC:

カラム: Unisil Q NH₂ (5 μ m) 4.6 mm ϕ \times 25 cm

注入量: 20 μ l

移動相: n-ヘキサン: エタノール (9:1) 1 ml/min

検出条件: UV 265 nm, 0.01 AUFS

III 試験結果及び考察

1. 前処理方法の検討

脂肪の抽出、脱脂の操作については通知²⁾に準じて行った。通知による分析法では精製にシリカゲルミニカラムを用いている。しかしミニカラムを用いると GC (ECD) 測定時にミニカラムの容器からと思われるフタル酸エステル等の妨害ピークが出現し、また精製も不十分と思われた。そこで当試験所で従来から食肉中の残留農薬検査⁴⁾に用いている 5% 含水フロリジルカラムを用いて精製法の検討を行った。2 種類の溶離液を用いたクロロフルアズロンの溶出パターンをみたところ表 1 に示す結果となった。そこでエーテル-ヘキサン(3:7) 20 ml による洗浄後にエーテル-ヘキサン(5:5) 20 ml でクロロフルアズロンを溶出することにした。

表 1 フロリジルカラムにおける溶出パターン (%)

溶離液 (ml)	0~10	10~20	20~30
エーテル-ヘキサン(3:7)	0	0	13
エーテル-ヘキサン(5:5)	68	32	0

クロロフルアズロン: 0.2 μ g

2. GC (ECD) 測定について

GC (ECD) による測定においてクロロフルアズロンは熱分解を起こし分解物のピークしか検出できない²⁾、当試験所の GC (ECD) 条件でのクロマトグラムは図 1 (A) に示すように 13.14 分と 15.86 分に 2 本の分解物のピークが出現した。図 1 (D) に示す試料ではクロ

マトグラム上の早い時間に夾雑ピークが多くみられたが、クロルフルアズロンの2本のピーク的位置には妨害物のピークは認められなかった。

クロルフルアズロンを3試料の牛脂肪に対して1 ppm になるように添加し、試験操作における回収について検討した。標準品の2本のピーク高さをそれぞれ1.0とした時のピーク高さの比を表2に示した。

2本の分解物のピーク高さ(ピーク1, ピーク2)は試料3を除き標準品と大きく異なる比を示した。標準品

表2 標準とのピーク高さの比較

	ピーク1	ピーク2
標準	1.0	1.0
試料1	0.81	2.1
試料2	1.4	3.3
試料3	0.98	1.0

試料: 牛脂肪 1g + 標準 1 μg

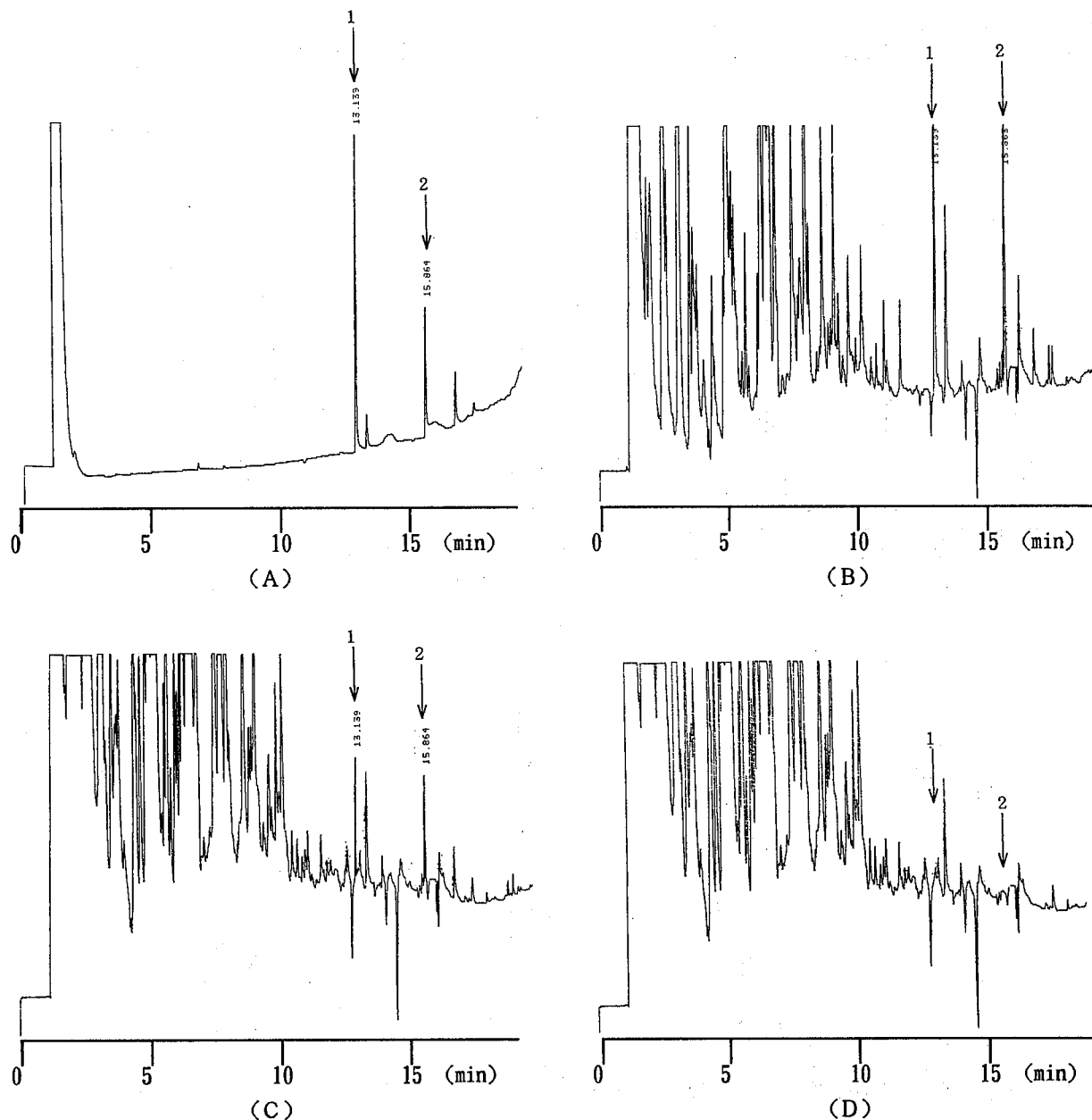


図-1 GC (ECD) クロマトグラム

- (A) 標準 : 0.05 ppm
- (B) 標準添加 : (牛脂肪 1g + 標準 1 μg) / 20 ml
- (C) 検出試料 : 牛脂肪 1g / 20 ml
- (D) ブランク : 牛脂肪 1g / 20 ml

においては両方のピーク高さについて再現性が得られることから、サンプル中の共存物質の影響で分解率が変動するものと考えられた。このようにGC (ECD) 法は定量性には欠けるものの検出感度(検出下限が検体として0.05 ppm程度)がよいことからカラム精製後の濃縮操作が不要で迅速に結果を得ることが可能であった。よってスクリーニング試験として十分活用できるものと判断した。

3. HPLC 測定について

HPLCの測定条件としては2つの条件を設定した。1つは通知³⁾に示された逆相HPLC法であり、もう1つ

は順相HPLC法である。順相HPLCの条件は寺師ら⁵⁾のジフルベンズロンの分析法を参考に検討したところII実験方法5.3)順相HPLCに示した条件となった。ジフルベンズロンは同じベンゾイルフェニル尿素系の昆虫成長制御剤でクロルフルアズロンと似た構造を持っている。

逆相HPLCのクロマトグラムを図2に示した。クロルフルアズロンの保持時間は14.8分であった。試料においては他の夾雑ピークとの分離は良好であったがクロルフルアズロンの保持時間以後、数十分にわたって夾雑ピークが出現することがあり、多検体の連続分析には不向きと思われた。

順相HPLCのクロマトグラムを図3に示した。クロ

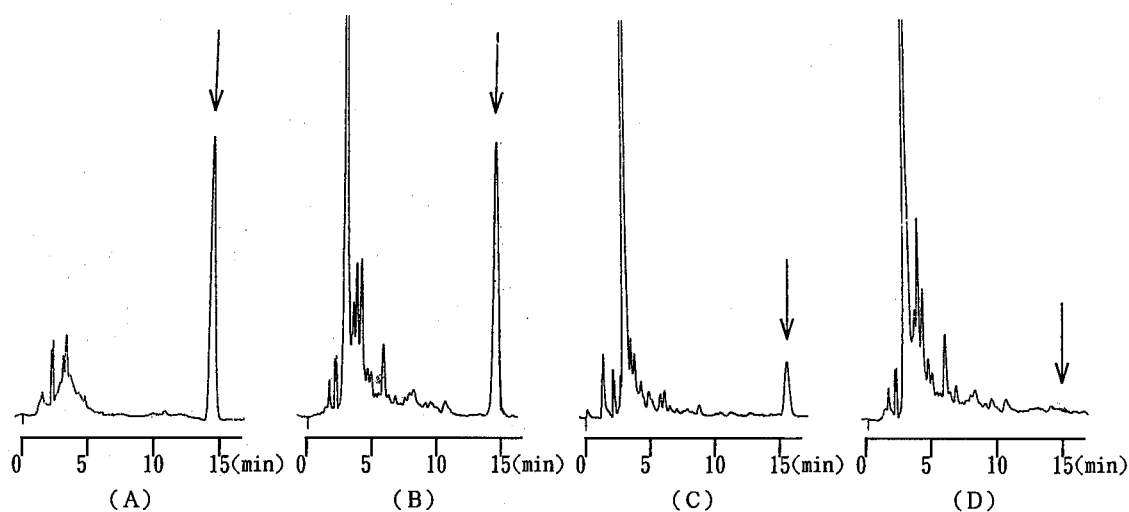


図-2 逆相HPLCクロマトグラム

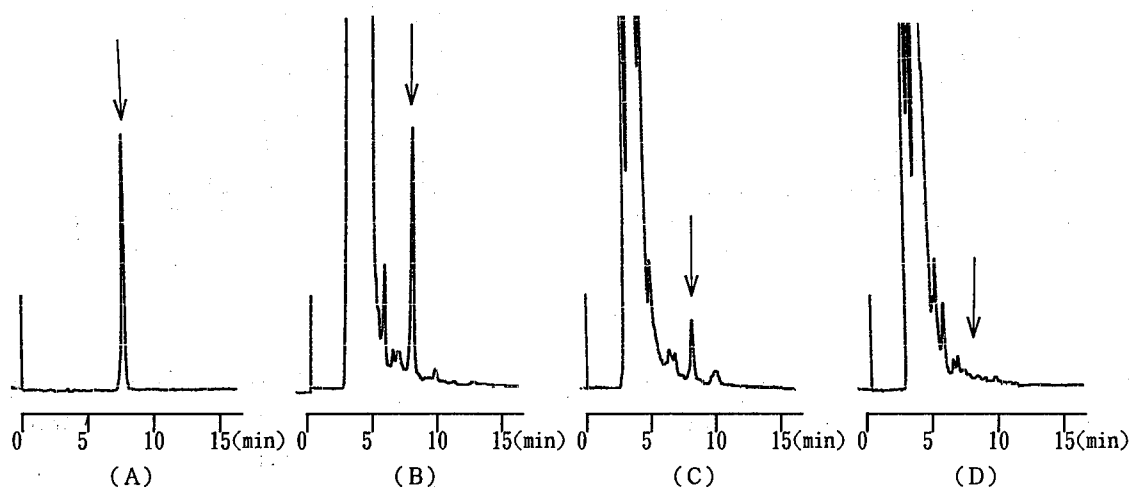


図-3 順相HPLCクロマトグラム

- (A) 標準: 1 ppm
- (B) 標準添加: (牛脂肪 1g + 標準 1 μg) / 1 ml
- (C) 検出試料: 牛脂肪 1g / 1 ml
- (D) ブランク: 牛脂肪 1g / 1 ml

ルフルアズロンの保持時間は8.1分であった。

順相 HPLC は逆相 HPLC に比べ目的ピークの後に夾雑ピークがなく、連続分析が可能であったがクロルフルアズロンとジフルベンズロンの保持時間が一致し、今後さらに溶離条件の検討が必要であった。

試験操作における添加回収実験の HPLC による結果を表 3 に示した。回収率は逆相及び順相 HPLC とともに良好でその値も一致した。

表 3 添加回収実験結果

	回 収 率 (%)	
	逆 相	順 相
試 料 1	9 6	9 7
試 料 2	9 8	9 5
試 料 3	8 9	8 6

牛脂肪 1g + 標準 1 μg

4. 牛肉中のクロルフルアズロンについて

試料 32 件について本法を用いて分析を行った。GC (ECD) 測定の結果、2 件についてクロルフルアズロンの分解物と同等の保持時間にピークを検出した。そこでこの 2 件について逆相及び順相による HPLC で測定を行ったところ、2 つの HPLC 条件で保持時間が一致し、定量値も表 4 に示すように一致した。

表 4 検出試料の HPLC での測定結果 (脂肪中 : ppm)

	逆 相	順 相
牛 肉 1	0.2 0	0.2 1
牛 肉 2	0.1 8	0.2 0

通知²⁾による分析方法での定量下限は 0.2 ppm であるが、GC 法、HPLC 法ともに測定は十分可能であった。

以上の結果から、はじめに GC (ECD) でスクリーニング試験を行い検出された試料について HPLC で確認及び定量を行う本法は、牛肉中のクロルフルアズロン検査法として迅速且つ有効な方法といえる。

前述のように順相 HPLC 法においてクロルフルアズロンの保持時間がジフルベンズロンと一致していたが、GC (ECD) 測定では両者の分解物のピークはそれぞれ異なっており、スクリーニング試験において GC (ECD) 分析が有用であることを確認している。また逆相 HPLC 法においてもジフルベンズロンはクロルフルアズロンと保持時間が大きく異なった。このように逆相及び順相の 2 種類の HPLC で確認することにより、定性及び定量の信頼度をさらに高めることが出来た。

また本法は 5% 含水フロリジルカラムでの精製の際に、クロルフルアズロンの溶出の前に分画をとることにより、食肉中の暫定基準項目である DDT、ディルドリン等との系統分析も可能であり、それらの項目も合わせた検査の迅速化にも貢献できる。

クロルフルアズロンは平成 7 年 8 月 14 日、112 の農産物に対して残留基準が告示⁶⁾された。これらの農産物への残留も危惧される場所であるが、農産物の残留試験法としても本法は効率的且つ精度の高い分析法として活用が期待出来る。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：豪州産牛肉の取扱いについて、衛乳第 165 号，平成 6 年 11 月 17 日
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長：豪州産牛肉中のクロルフルアズロン検査法について，平成 6 年 11 月 18 日
- 3) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：豪州産牛肉中のクロルフルアズロン検査法について，平成 6 年 11 月 28 日
- 4) 中村正規，木内佳伸：食肉中の残留農薬検査結果について，福岡市衛試報，15，73～85，1990
- 5) 寺師朗子，衛藤修一，鷹野謙二：農産物中のジフルベンズロン（殺虫剤）の分析，食衛誌，34（2），114～119，1993
- 6) 厚生省告示：食品・添加物等の規格基準の一部改正について，第 161 号，平成 7 年 8 月 14 日，1995