

# HPLCによる農作物中の14農薬の 同時分析法の検討について

長律子<sup>1</sup>・西田政司<sup>1</sup>

## Simultaneous Determination of 14 Pesticides in Agricultural Products by HPLC

Ritsuko CHO and Masashi NISHIDA

### 要 旨

告示法で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定が定められている農薬のうち、残留基準の6次及び7次改正で基準が設定されたものを中心とした14農薬 (告示法では12種類の検査法で検査される) について、HPLC-UVによる同時分析法を検討した。

農作物より各農薬を酢酸エチルで一斉抽出し、フロリジルカラムで精製後、HPLC-UV (測定波長235nm) で測定した。玄米、大豆、キャベツ、みかんを用いた添加回収実験の結果、添加濃度0.25ppmでの回収率は41~104%であり、0.05ppmでは39~145%であった。また、穀類、豆類、野菜、果実等の16農作物について測定妨害の有無を検討した結果、小麦、大豆、オレンジ、レモンを除く農作物については測定可能であった。大豆は一斉抽出後にニトリル分配による脱脂操作をすることで妨害除去できた。小麦はエトフェンプロックスが、オレンジ、レモンはシラフルオフェン、ヘキシチアゾクス、テブフェノジド、クロルフルアズロン、ベンスルフロンメチル、トリベヌロンメチル、イマゾスルフロンが妨害ピークの影響を受けた。

**Key Words :** 高速液体クロマトグラフィー High Performance Liquid Chromatography, HPLC  
農薬 pesticides, 農作物 agricultural products

### I はじめに

従来26農薬について定められていた残留基準は、平成4年から平成9年までの間に7次にわたって改正が行われ、現在161農薬に基準が設定されている<sup>1)</sup>。これらの農薬は食品衛生法により分析法が定められている (以下「告示法」) が、その多くは個別試験法であるため告示法での分析には多大な労力と時間を要する。特に測定にHPLCを採用している分析法では抽出、精製、測定法が多岐にわたっており、迅速且つ省力化を目的とした多成分分析法は現状ではあまり見られない<sup>2)~4)</sup>。

そこで告示法でHPLCによる測定が採用されている農薬のうち近年の改正 (6次改正;平成8年9月2日告

示,7次改正;平成9年9月1日告示)により新たに基準が設定された農薬を中心とした14農薬を一斉抽出し、同時分析する方法を検討した。併せて15種類16農作物で測定妨害の有無を検討した。

### II 実験方法

#### 1. 試料

添加回収実験には玄米、大豆、キャベツ、みかんを、測定妨害の有無の検討には小麦、小豆、だいこん、はくさい、ばれいしょ、きゅうり、トマト、ピーマン、たまねぎ、ほうれんそう、オレンジ、みかん、レモン (国産品と輸入品の2試料)、パイナップル、いちごを用いた。

1. 福岡市保健環境研究所 理化学課

## 2. 試薬

・農薬標準品：ベンスルフロンメチル，イマゾスルフロ  
ン，ジクロメジン，クロリムロンエチル，テブフェノジ  
ド，ヘキサフルムロン，ヘキシチアゾクス，フルフェノ  
クスロンは林純薬工業(株)製，トリベヌロンメチル，クロ  
ルフルアズロン，シラフルオフエンは Riedel-de Haen 社  
製，ペンシクロン，エトフェンブロックスは和光純薬工  
業(株)製，ジフルベンズロンはジーエルサイエンス(株)製の，  
農薬標準品を用いた。測定対象農薬の残留基準が設定さ  
れた改正次と現在農作物に定められている基準値につい  
て表1に示す。

・各農薬標準原液：各標準品 15mg を精秤し，アセトニ  
トリル 30ml に溶解した。

・農薬標準 A 混液：ベンスルフロンメチル，トリベヌ  
ロンメチル，ジクロメジン，クロリムロンエチル，ジフ  
ルベンズロン，テブフェノジド，ペンシクロン，ヘキサ  
フルムロン，ヘキシチアゾクス，フルフェノクスロン，  
クロルフルアズロンの各農薬標準原液をアセトニトリル  
で 25ppm となるように調製し，混合溶液を作製した。

・農薬標準 B 混液：イマゾスルフロン，エトフェンブ  
ロックス，シラフルオフエンの各農薬標準原液をアセト  
ニトリルで 25ppm となるように調製し，混合溶液を作  
製した。

・各種有機溶媒：酢酸エチル，アセトン，ヘキサン，ア  
セトニトリル，ジエチルエーテル（以下「エーテル」）  
は関東化学(株)製，残留農薬試験用を用いた。ただし HPLC  
移動相の調製用アセトニトリルは関東化学(株)製，高速液  
体クロマトグラフィー用を用いた。

・HPLC 移動相用蒸留水：和光純薬工業(株)製，高速液体  
クロマトグラフィー用を用いた。

・無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製，残留農薬試  
験用を用いた。

・5%含水フロリジル：Floridin Co.製，Floridil 100～200  
mesh Lot No.EPR7566 を 500℃で1時間加熱処理したも  
のに重量あたり 5%となるように蒸留水を加え，室温で  
一夜放置した後使用した。

・フロリジルカラム：内径 10mm，長さ 150mm のカラ  
ム管に5%含水フロリジル 3g をヘキサンで湿式充填し，  
ヘキサン 30ml で洗浄後使用した。

## 3. 装置

・高速液体クロマトグラフ：ヒューレットパッカード社  
製，1100 Series

・データ処理装置：ヒューレットパッカード社製，ケミ  
ステーション

表1 対象農薬の改正次と農作物の現基準

農薬名	改正	基準値範囲		備考
		(ppm)		
		Min.	Max.	
ベンスルフロンメチル	6次		0.1	米のみ
イマゾスルフロン	6次		0.1	米のみ
トリベヌロンメチル	7次	0.05	0.1	麦類のみ
ジクロメジン	6次		2.0	米のみ
クロリムロンエチル	7次	0.02	0.05	大豆，落花生のみ
ジフルベンズロン	1次	0.1	20	農作物全般
テブフェノジド	6次	0.1	25	7農作物のみ
ペンシクロン	6次	0.5	1.0	米，いも類，野菜
ヘキサフルムロン	7次	0.02	15	7農作物のみ
ヘキシチアゾクス	7次	0.2	35	農作物全般
フルフェノクスロン	7次	0.02	15	農作物全般
クロルフルアズロン	5次	2.0	10	農作物全般
エトフェンブロックス	6次	0.1	10	農作物全般
シラフルオフエン	7次	0.5	35	6農作物のみ

## 4. 試験溶液の調製

### 1) 抽出

重量あたり 2%となるようにりん酸を加えながら粉碎  
した<sup>5)</sup> 試料 10g に無水硫酸ナトリウムを穀類，豆類の場  
合は 25g，野菜，果実の場合は 50g 加え，さらに酢酸エ  
チル 50ml を加えて1分間ホモジナイズし，上清を無水  
硫酸ナトリウムで脱水ろ過した。残渣に酢酸エチル 50ml  
を加えホモジナイズし，3000rpm で10分間遠心分離し，  
上清を無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し，酢酸エチル層  
を合わせ，濃縮乾固した。大豆等油分を多く含有する試  
料は，さらにアセトニトリル-ヘキサン分配を行った。  
得られた残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)4ml に溶解  
し，抽出液とした。

### ・アセトニトリル-ヘキサン分配

残留物をアセトニトリル飽和ヘキサン 10ml に溶解  
し，アセトニトリル 40ml で抽出を行い，アセトニトリ  
ル層を濃縮乾固した。

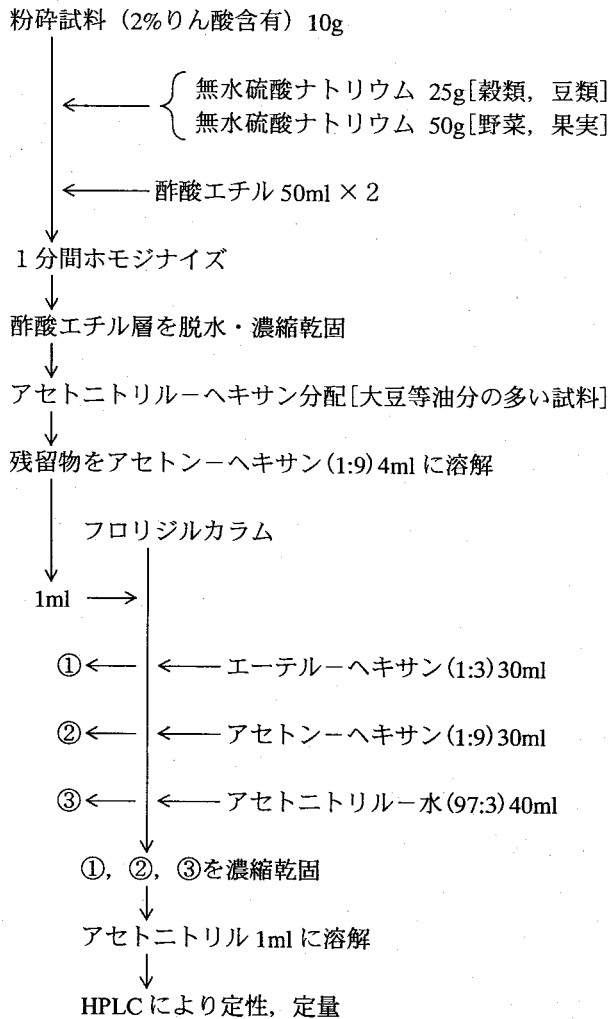
### 2) 精製

フロリジルカラムに，抽出液 1ml を負荷し，エーテ  
ル-ヘキサン(1:3)30ml でヘキシチアゾクス，エトフェ  
ンブロックス，シラフルオフエンを溶出した(画分①)。  
次いでアセトン-ヘキサン(1:9)30ml でジフルベンズロ  
ン，テブフェノジド，ペンシクロン，ヘキサフルムロン，  
フルフェノクスロン，クロルフルアズロンを溶出した(画  
分②)。さらにアセトニトリル-水(97:3)40ml でベンス

ルフロンメチル, イマゾスルフロン, トリベヌロンメチル, ジクロメジン, クロリムロンエチルを溶出した(画分③).

画分①, ②, ③を濃縮乾固した後, 残留物をアセトニトリル 1ml に溶解し, HPLC 用試験溶液とした.

以上の試験操作の概要を図 1 に示す.



#### 各農薬の溶出画分

- ①: ヘキシチアゾクス, エトフェンプロックス, シラフルオフェン
- ②: ジフルベンズロン, テブフェノジド, ペンシクロン, ヘキサフルムロン, フルフェノクスロン, クロルフルアズロン
- ③: ベンスルフロンメチル, イマゾスルフロン, トリベヌロンメチル, ジクロメジン, クロリムロンエチル

図 1 14 農薬の同時分析法のフローシート

#### 3) 測定

各試験溶液 10  $\mu$  l を高速液体クロマトグラフに注入し, 以下に示す HPLC 条件で各農薬の定性, 定量を行った. 画分①はタイムプログラム I で, 画分②及び③はタイムプログラム II で測定した.

#### HPLC 条件

カラム: 和光純薬工業(株)製, Wakosil 3C18 HG (4.6mm i.d. × 150mm)

カラム温度: 40 °C

流速: 1.0ml/min

測定波長: 235nm

移動相: A) 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3) - アセトニトリル (95:5)

B) 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3) - アセトニトリル (2:8)

タイムプログラム: I) 0min A-50%, B- 50%

30min A- 0%, B-100%

45min A- 0%, B-100%

46min A-50%, B- 50%

55min stop

II) 0min A-50%, B- 50%

30min A- 0%, B-100%

31min A-50%, B- 50%

40min stop

#### 4) 添加回収実験

試料 10g に農薬標準混液 A 又は B を 0.1ml (試料中 0.25ppm 相当) 及び 0.02ml (0.05ppm) の 2 段階で別々に加え, 1 時間放置した後, 本法に従って抽出, 精製し, HPLC で測定して回収率を求めた.

### III 結果と考察

#### 1. HPLC条件についての検討

14 種類の農薬を同時に分析するために逆相系のシリカゲルカラムを使用し, グラジエント溶出法によって一斉分析を行った. 14 農薬標準混液 (0.125ppm) のタイムプログラム I による HPLC クロマトグラムを図 2 に示す. エトフェンプロックス, シラフルオフェンはピークの保持時間が他の 12 農薬に比べて遅く, タイムプログラム II では溶出しきれなかったため, 両農薬を含む画分①は, 移動相 B のみを 15 分間長く流すタイムプログラム I で測定した. また, ベンスルフロンメチルとイマゾスルフロンとトリベヌロンメチルはピークの保持時間が近似したため, 添加回収実験は A グループと B グループに分けて実施した.

## 2. 精製についての検討

まずシリカゲルミニカラムによる精製を検討したが、各農薬標準品の回収は良好であったものの、妨害ピークの除去が困難であった。そこでフロリジルカラムによる精製を検討した結果、柑橘類等の一部の農作物を除いて妨害ピークの影響はみられなかった。大豆のように油分を多く含有する試料は、フロリジルカラムでは油分を除去できなかったため、事前にアセトニトリル-ヘキサン分配を行うことにした。

## 3. 試料由来の妨害ピークの有無について

本法に従い、15種類16農作物を用いて妨害ピークの有無について検討した。小豆、だいこん、はくさい、ばれいしょ、きゅうり、トマト、ピーマン、たまねぎ、ほうれんそう、みかん、パイナップル、いちごでは①、②、③全ての画分で妨害ピークの影響はみられなかった。小麦ではエトフェンブロックスの保持時間に近似するピークが検出されたが、これはHPLCのグラジエント条件を改善することによる妨害ピークとの分離を検討する必

表2 4農作物における14農薬の添加回収実験結果

(n=3)

No.	農薬名	試料換算した 添加濃度 (ppm)	玄米		大豆		キャベツ		みかん	
			回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
1	ベンスルフロメチル	0.05	80	1.3	56	4.5	81	7.9	43	5.3
		0.25	65	4.1	81	0.7	69	5.0	56	1.0
2	イマゾスルフロメチル	0.05	67	3.4	49	11.7	78	6.5	45	1.3
		0.25	41	2.8	54	1.1	62	4.7	45	4.4
3	トリベヌロンメチル	0.05	112	1.0	66	10.4	87	5.3	57	5.1
		0.25	49	6.1	77	2.6	60	12.4	63	1.6
4	ジクロメジン	0.05	77	0.7	53	0.0	86	4.2	53	8.8
		0.25	79	2.5	74	1.4	78	2.9	72	3.2
5	クロリムロンエチル	0.05	81	2.9	63	4.8	86	8.1	66	1.7
		0.25	74	2.3	74	2.1	88	6.4	84	2.1
6	ジフルベンズロン	0.05	80	4.5	78	1.5	108	5.1	103	3.5
		0.25	83	2.5	79	2.9	88	0.7	94	3.2
7	テブフェノジド	0.05	93	3.1	79	2.6	103	8.3	86	1.2
		0.25	98	2.0	85	3.8	87	0.7	91	0.6
8	ベンシクロン	0.05	74	5.5	74	3.4	82	16.9	87	1.7
		0.25	93	10.9	66	6.8	86	1.2	94	0.6
9	ヘキサフルムロン	0.05	70	4.9	86	1.8	100	5.8	79	3.3
		0.25	75	4.0	75	2.8	90	0.8	92	1.1
10	ヘキシチアゾクス	0.05	88	8.4	98	2.9	107	4.6	99	1.2
		0.25	101	1.7	82	4.6	87	5.3	104	2.5
11	フルフェノクスロン	0.05	101	4.3	67	3.0	132	8.0	86	3.1
		0.25	86	7.4	79	4.5	96	0.6	94	5.3
12	クロルフルアズロン	0.05	39	13.3	92	0.6	145	8.4	72	4.2
		0.25	87	4.6	71	2.9	95	0.6	92	4.1
13	エトフェンブロックス	0.05	84	8.2	85	4.9	128	0.0	107	1.6
		0.25	77	6.2	72	1.6	102	3.9	97	1.8
14	シラフルオフエン	0.05	71	10.2	65	0.0	139	3.3	90	3.3
		0.25	87	2.6	81	7.2	101	1.7	86	0.7

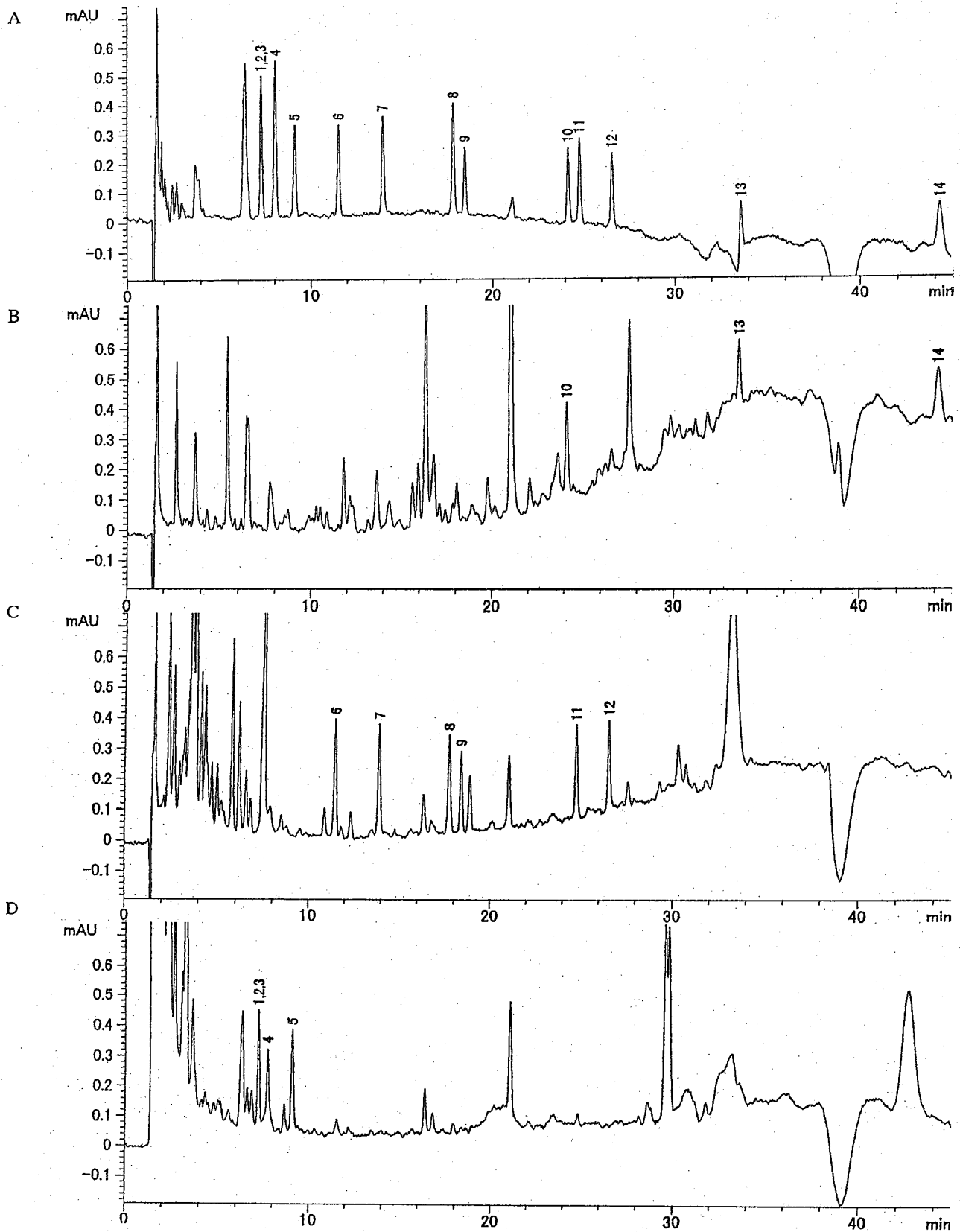


図2 14農薬標準混液(0.125ppm)のHPLCクロマトグラムとみかん10gに0.5 $\mu$ g添加したときの画分①, ②, ③のHPLCクロマトグラム(タイムプログラムI)

A: 14農薬標準混液(0.125ppm)

B: みかん10gに0.5 $\mu$ g添加したときの画分①

C: みかん10gに0.5 $\mu$ g添加したときの画分②

D: みかん10gに0.5 $\mu$ g添加したときの画分③

ピークNo.: 表2に示す農薬のNo.に一致する.

要がある。オレンジ、レモンについてはシラフルオフェン、ヘキシチアゾクス、テブフェノジド、クロルフルアズロン、ベンスルフロンメチル、イマゾスルフロン、トリベヌロンメチルの溶出位置に大きな妨害ピークが検出され、更にカラム処理などによる妨害除去を検討する必要があることがわかった。

#### 4. 添加回収実験について

玄米、大豆、キャベツ、みかんにそれぞれ試料中濃度として 0.05ppm 及び 0.25ppm となるように添加した各農薬の回収率と変動係数を表 2 に、14 農薬標準混液をみかんに 0.05ppm 添加した場合の画分①、②、③のタイムプログラム I による HPLC クロマトグラムを図 2 に示す。

0.25ppm 添加した場合の回収率は、ベンスルフロンメチル、イマゾスルフロン、トリベヌロンメチルの 3 農薬と大豆に添加したペンシクロンを除き、全て 70%以上と良好であり、変動係数も玄米に添加したペンシクロンとキャベツに添加したトリベヌロンメチルを除いた大部分で 5%未満であった。

大豆とみかんでは 0.05ppm 添加した場合の回収率は 0.25ppm の場合と比べて低くなった農薬が多く、全般的に変動係数も大きくなっていった。キャベツに 0.05ppm 添加した場合は 7 農薬で回収率が 100%を超え、変動係数も 0.25ppm の場合に比べて 5 倍以上になった農薬が多かったが、これは感度を上げて測定したため妨害ピークの影響を受けたと考えられる。よって本法における定量限界は 0.05ppm とした。

## IV ま と め

告示法により HPLC による測定が定められている 14 農薬について、酢酸エチルにより一斉抽出しフロリジルカラムで精製後、HPLC-UV によって測定する迅速分析法を検討した結果、大豆のように油分を多く含む試料についてはアセトニトリル-ヘキサン分配による脱脂操作が必要であり、小麦、オレンジ、レモンでは HPLC 測定時に妨害ピークの影響がみられたが、その他の農作物については本法による測定が可能であることがわかった。これにより、12 種類の個別試験法によって検査しなければならぬ告示法に比べて労力、時間共に著しく短縮することができた。

今後は本法によって 14 農薬が全ての農作物で一斉分析できるように小麦及びオレンジ、レモンの妨害ピークの除去を中心に検討していきたいと考えている。

## 文 献

- 1) 平成 9 年 9 月 1 日厚生省告示第 179 号
- 2) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会：食品衛生研究 45, 9, 31～49, 1995
- 3) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会：食品衛生研究 47, 5, 27～41, 1997
- 4) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会：食品衛生研究 47, 6, 27～41, 1997
- 5) 長南隆生：食衛誌, 33, 543～547, 1992