

農産物中ジクロルミド試験法の検討

鈴木昭彦 金成徹 竹村悦子 斎藤和男
理化学課

要 旨

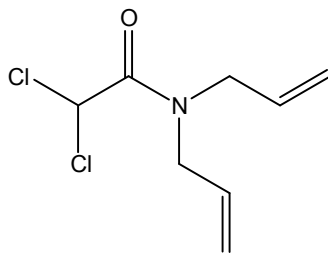
現在食品中の公定試験法が示されていない農薬ジクロルミドについて、農産物中ジクロルミド試験法の検討を行った。

検討の結果、アセトン抽出、*n*-ヘキサン転溶、分液、脱水後、穀類等については脱脂し、Florisil カラム精製又は Florisil カラム後 GC/NH₂ カラム精製を行い、GC-ECD 又は GC/MS で測定することにより、ジクロルミドの一律基準値濃度の測定が可能であった。

キーワード：ジクロルミド，試験法，農産物，GC-ECD，GC/MS

はじめに

ジクロルミドは、Stauffer Chemical Co. (現 Syngenta AG) により開発された、除草剤の薬害軽減剤である。



Dichloromid の構造式
分子量：208.1

日本では農薬として登録されていないが、ポジティブリスト制度に伴い、とうもろこしに暫定基準値 0.05ppm が設定された。(なお、平成 21 年 6 月 4 日付食安発第 0604002 号により平成 21 年 12 月 4 日施行で一律基準適用となる。) 現在、食品中に残留するジクロルミドの一律基準値濃度が測定可能な公定試験法は確立されておらず、平成 17 年度の GC-MS 一斉試験法(農産物)の検討において、揮発性が高く添加回収率が 70 %未満であったため、分析対象化合物から除外された¹⁾。今回、農産物に適用可能なジクロルミド試験法を検討し、良好な結果を得たので報告する。

方 法

1 試料

農産物から、暫定基準値の設定されているとうもろこしを含め、玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、未成熟いんげん、りんご、オレンジ及び茶の 10 種類を選択し、試料とした。

2 試薬

1) 試薬

ジクロルミド標準品：Dr.Ehrenstorfer 社製 (純度 96 %以上)

アセトニトリル，アセトン，塩化ナトリウム，*n*-ヘキサン，無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業社製残留農薬試験用

ジエチレングリコール (DEG)：和光純薬工業社製特級

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (GC/NH₂ カラム)：GL サイエンス社製 GL-Pak GC/NH₂ (500mg/500mg)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (Florisil カラム)：Waters 社製 Sep-Pak Plus Florisil (910mg)

ジクロルミド標準原液 (200mg/L)：ジクロルミド標準品 20.0mg を精秤し、*n*-ヘキサンに溶解して正確に 100mL とした。

検量線用標準溶液：標準原液を適宜希釈

して調製した。

3 装置

GC-ECD : Hewlett-Packard 社製 6890 を使用した。

GC/MS : Agilent 社製 6890N GC/5975 inert MSD を使用した。

4 測定条件

1) GC-ECD

カラム : Agilent 社製 HP-5 (0.25mm i.d. × 30m, Film 0.25μm)

カラム温度 : 60 °C (1分) - 10 °C/分 - 300 °C (5分)

注入口温度 : 250 °C

検出器温度 : 300 °C

キャリアーガス : ヘリウム 1.2mL/分

メイクアップガス : 窒素

注入方法 : スプリットレス

注入量 : 2μL

2) GC/MS

カラム : Agilent 社製 HP-5ms (0.25mm i.d. × 30m, Film 0.25μm)

カラム温度 : 60 °C (1分) - 10 °C/分 - 300 °C (5分)

注入口温度 : 250 °C

インターフェース温度 : 280 °C

イオン源温度 : 230 °C

イオン化モード : EI (70eV)

キャリアーガス : ヘリウム 1.2mL/分

主なイオン (*m/z*) : 174, 172 (定量用), 168, 166 (オレンジ定量用), 124 (確認用)

注入方法 : スプリットレス

注入量 : 2μL

5 試験溶液の調製

既通知試験法²⁾を参考に試験溶液調製を以下のように行った。

1) 抽出

(1) 野菜及び果実

試料 20.0g にアセトン 100mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、セライトを敷いたろ紙でろ過し、ろ紙上の残留物にアセトン 50mL を加えて同様に操作し、得られたろ液

を合わせて、40 °C 以下で約 30mL に減圧濃縮した。これを分液ロートに移し、10 % 塩化ナトリウム溶液 100mL, *n*-ヘキサン 100mL を加えて、5 分間振とうした。静置後、水層を分取し、*n*-ヘキサン 50mL を加えて 5 分間振とうした。静置後、*n*-ヘキサン層を合わせて、無水硫酸ナトリウムを適量加えて 15 分間放置した。これをろ過し、*n*-ヘキサンで容器及びろ紙上の残留物を洗浄し、ろ液を合わせて 40 °C 以下で減圧濃縮し、窒素ガスを用いて溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 2mL を加えて溶解した。

(2) 穀類, 豆類及び種実類

試料 10.0g に水 20mL を加えて 30 分間放置後アセトン 100mL を加え、以下(1)と同様に操作し、溶媒除去後の残留物を、*n*-ヘキサン 30mL で分液ロートに洗い移し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL を加えて 5 分間振とうした。静置後、*n*-ヘキサン層を分取し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL を加え、同様に分液操作を 2 回行った。アセトニトリル層を合わせ、2 % DEG・アセトン溶液 0.1mL を加えて、40 °C 以下で減圧濃縮し、窒素ガスで溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 2mL を加えて溶解した。

(3) 茶

試料 5.00g に水 20mL を加えて 30 分間放置後、(1)と同様に操作し、ろ液を合わせてアセトンを加え正確に 200mL とした。この 40mL を分取し 40 °C 以下で約 6mL に減圧濃縮した。これを分液ロートに移し、10 % 塩化ナトリウム溶液 20mL を加え、*n*-ヘキサン 50mL 及び 20mL で分液操作 (振とう 5 分間) を 2 回行い、以下(1)と同様に操作した。

2) 精製

あらかじめ *n*-ヘキサン 10mL で前処理した Florisil カラムに、1) で得られた溶液を負荷し、*n*-ヘキサン 10mL で洗浄し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 15mL で溶出した。揮散性が原因と考えられる添加回収率の低下が報告³⁾されていることを考慮し、以下の溶媒除去操作にはキーパーとして 2 % DEG・アセトン溶液 0.1mL を添加することとした。40 °C 以下で溶媒を除去後、残留

物を *n*-ヘキサン 20mL で溶解した。さらに、キャベツ、ばれいしょ、未成熟いんげん、茶の場合は、GC/NH2 カラムによる精製を追加した。

結果及び考察

1 測定条件の検討

1) GC-ECD

(1) 定量限界

0.05µg/L 標準溶液 2µL を 3 回繰り返し注入し、S/N = 10 となる濃度を求めたところ、0.074µg/L (0.15pg) であった。よって、0.01mg/L (一律基準値相当) の定量が可能であった。

(2) 検量線

ピーク面積法及びピーク高法により検量線の直線性を確認した (図 1)。

0.0025 ~ 0.05mg/L の範囲で検量線を作成したところ、直線よりも二次曲線でよく近似され、 $R^2 \geq 0.99$ であった。また、ピーク面積法とピーク高法で差は認められなかった。

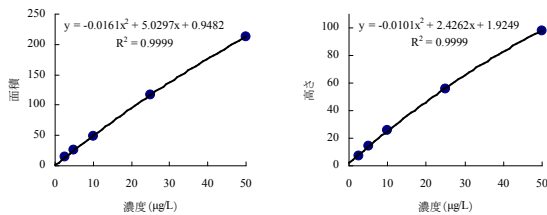


図 1 GC-ECDによる検量線

2) GC/MS

(1) ジクロルミドのマススペクトルの確認

SCAN モードで、0.05mg/L 標準溶液を測定しマススペクトルを確認した。

ライブラリと高い一致率を示した (図 2)。

(2) SIM 測定

定量は、SIM で測定することとし、(1)で得られたジクロルミド標準品のマススペクトルから、強度の大きい順に m/z : 172 を定量イオン、 m/z : 124 を確認イオンとした。さらに、参考として高質量かつ高感度の m/z : 174, 168, 166 を加え、これら 5 イオンを SIM 測定イオンとした。なお、分子イオンである m/z : 207 は、バックグラウンド (カ

ラムブリード) の影響が大きかったため、測定イオンから除外した。

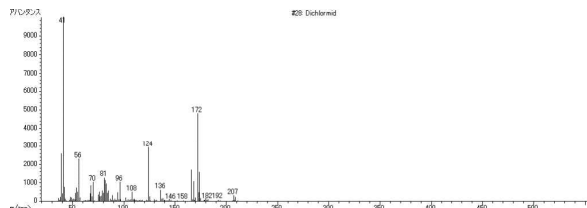
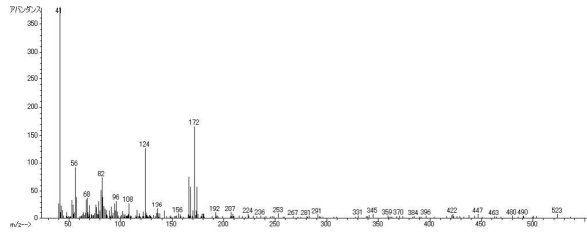


図 2 ジクロルミドのマススペクトル (上: 標準溶液, 下: ライブラリ)

(3) 定量限界

1µg/L 標準溶液 2µL を 3 回繰り返し注入し、 m/z : 172 を用いて S/N = 10 となる濃度を求めたところ、1.4µg/L (2.9pg) であった。

また、 m/z : 166 (オレンジでの定量イオン) の場合、2µg/L 標準溶液 2µL を 3 回繰り返し注入し、S/N = 10 となる濃度を求めたところ、5.5µg/L (11pg) であった。

いずれのイオンを用いた場合でも、0.01mg/L の測定は可能であった。

(4) 検量線

ピーク面積法及びピーク高法により検量線の直線性を確認した (図 3)。

0.0025 ~ 0.05mg/L の範囲で良好な直線性が認められ、 $R^2 \geq 0.99$ であった。また、ピーク面積法とピーク高法で差は認められなかった。

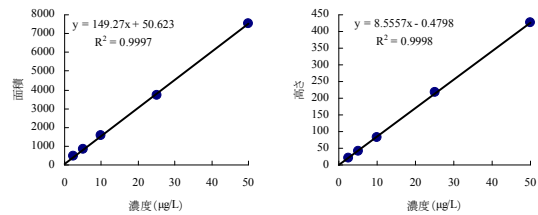


図 3 GC/MSによる検量線

2 精製用ミニカラムの検討

種々のミニカラムと溶媒を用いて回収試験を行った(表1)。

表1 ミニカラムの回収試験結果

カラム種類	溶出溶媒	溶媒量 (mL)	回収率 (%)
GL-Pak GC/NH2 (500 mg/500 mg)	n-ヘキサン	40	0.0
	アセトニトリル	15	71.8
	アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液	15	75.4
	アセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液	15	63.2
Sep-Pak Plus Florisil (910 mg)	n-ヘキサン	20	0.0
	アセトン及びn-ヘキサン(1:19)混液	15	97.3
Sep-Pak Plus Silica (690 mg)	n-ヘキサン	20	0.0
	アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液	15	80.9
Mega Bond Elut C18 (1,000 mg)	n-ヘキサン	20	58.8
	アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液	15	88.5
Supelclean Envi-Carb (300 mg)	n-ヘキサン	20	89.5
	アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液	15	86.4

その結果、Florisil カラムが、n-ヘキサン 20mL まで注入してもジクロロミドは溶出せず、その後アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液 15mL で溶出すると、回収率 97.3 %と最も回収率が高かった。よって、精製は Florisil カラムを用い、n-ヘキサン 10mL で洗浄後アセトン及びn-ヘキサン (1:19) 混液 15mL で溶出することとした。

これらの精製法によって、GC-ECD により農産物に添加回収試験を試みたところ、キャベツ、ばれいしょ、未成熟いんげんについて、ジクロロミドの保持時間と重なる妨害ピークが認められた(図4-A)。

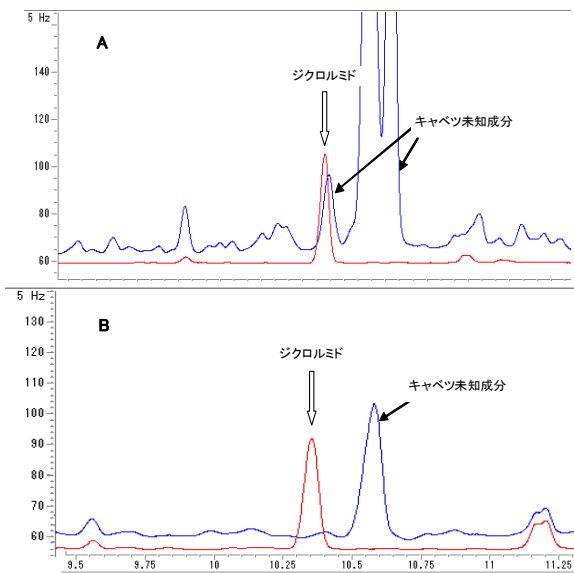


図4 無添加キャベツの GC-ECDクロマトグラム

A:Florisil B:Florisil+GC/NH2

検討した結果、Florisil カラム精製後、GC/NH2 カラムによる精製を追加することで、妨害ピークを除去することが可能となった(図4-B)。

3 添加回収試験

ジクロロミドを含有していないことを確認した農産物 10 種類について、0.01ppm 相当のジクロロミドを添加し、添加回収試験 (n=5) を実施した。結果を表2に示した。

測定は GC-ECD 及び GC/MS (SIM) で行い、GC/MS (SCAN) で確認した。

表2 添加回収試験結果

農産物名	試料量 (g)	GC-ECD		GC/MS	
		添加回収率 (%)	併行精度 (%)	添加回収率 (%)	併行精度 (%)
とうもろこし	10.0	72.1	5.7	97.6	7.4
玄米	10.0	75.4	6.4	85.6	3.4
大豆	10.0	72.2	19.7	79.2	11.8
ばれいしょ	20.0	* 87.0	4.5	89.7	5.2
ほうれんそう	20.0	89.5	8.9	82.4	3.2
キャベツ	20.0	* 73.8	3.2	88.1	6.0
未成熟いんげん	20.0	* 94.6	7.1	93.7	6.7
りんご	20.0	76.3	8.1	91.0	4.8
オレンジ	20.0	75.9	6.7	106.5	7.0
茶	5.00	98.7	7.4	106.2	3.4

試行回数: n=5

添加濃度: 0.01ppm

*: 精製にGC/NH2カラムを追加

(1)GC-ECD

キャベツ、ばれいしょ及び未成熟いんげんでは、Florisil カラム精製後に GC/NH2 カラム精製を追加して行った。

10 農産物全てで、添加回収率 70 ~ 120 %、併行精度 25 %未満の範囲にあり、良好な結果であった。

大豆については、初回の添加回収試験において、添加回収率が低く、併行精度が 25 %を超えた。その原因として、分液操作で乳化が生じ、分離が悪かったことが考えられた。

分離時間を長くして再試験を行ったところ、添加回収率、併行精度ともに改善された。大豆等、乳化しやすい農産物においては、分液の際注意する必要があると考えられた。

(2)GC/MS

とうもろこし、玄米、キャベツ、ばれい

しよ、未成熟いんげん及びりんごでは、添加回収率 85.6 ~ 97.6 %，併行精度 3.4 ~ 7.4 % の範囲にあり良好な結果であった。

大豆では、(1)と同様に、初回の添加回収試験において評価基準を満たさなかったため、再試験を行ったところ、添加回収率 79.2 %，併行精度 11.8 % と、ともに改善された。

m/z : 172 を定量イオン， m/z : 124 を確認イオンとしてピーク面積法で定量したが、ほうれんそう及び茶では、ジクロロミドのピーク付近に分離できない妨害ピークが認められ、ピーク面積法では肩となつてピーク面積を増加させる原因となつていた。そこで、ピーク高法によって定量したところ、それぞれ 82.4 %，106.2 % と良好であった。また、オレンジでは、定量イオンが妨害ピークと重なるため、より影響を受けにくい m/z : 166 を定量イオンとした。その結果、回収率 106.5 %，併行精度 7.0 % と良好な結果であった。

まとめ

農産物中ジクロロミド試験法を検討した結果、アセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶後、野菜、果実及び茶についてはそのまま、穀類、豆類及び種実類についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、Florisil カラムで精製し、茶及び一部の農産物についてはさらに GC/NH₂ カラムで精製した後、GC-ECD 又は GC/MS で定量することにより、一律基準濃度 (0.01ppm) のジクロロミドの測定が可能であった。

また、この方法によって、とうもろこしを含む 10 農産物について、添加回収試験 (n=5) を行ったところ、GC-ECD, GC/MS のいずれによつても、10 農産物全てで、良好な結果が得られた。

謝 辞

本研究は、平成 20 年度残留農薬等分析法検討会 (ポジ化分析法検討会) における「食品中に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業 (厚生労働省)」として実施した。

本研究の遂行にあたり、ご指導いただきました、関係機関の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省：分野別施策 [残留農薬] 平成 17 年度農薬一斉分析法検討結果 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/index.html> 2009/2/27
- 2) 食安発第 0124001 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：2005/1/24
- 3) 伴創一郎，伴埜行則，出口夫美子，他．GC/MS, LC/MS/MS を用いた農産物中の残留農薬分析条件の検討．京都市衛生公害研究所年報 2006；72：105-115.