ノート

GC-NPD による農産物中のヒメキサゾール分析法

(平成 20 年 1 月 18 日受理)

田村 康宏* 高野伊知郎 小林 麻紀 富澤 早苗 立石 恭也
酒井 奈穂子 上條 恭子 井部 明広 永山 敏廣

Determination of Hymexazol in Agricultural Products by GC-NPD

Yasuhiro TAMURA*, Ichiro TAKANO, Maki KOBAYASHI, Sanae TOMIZAWA, Yukinari TATEISHI,
Naoko SAKAI, Kyoko KAMIJO, Akihiro IBE and Toshihiro NAGAYAMA

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-0073, Japan; * Corresponding author

A method for the determination of hymexazol in agricultural products by gas chromatography with a highly sensitive nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD) was investigated. Hymexazol was extracted with acetonitrile, and the acetonitrile layer was separated by salting-out. The water layer was loaded onto a Chem-Elut™ column. Hymexazol in the water layer was adsorbed on the column, and eluted with ethyl acetate. The acetonitrile layer and the eluate were mixed and evaporated. The residue was dissolved in ethyl acetate, and the sample solution was cleaned up on a C18 column. Hymexazol in the eluate was analyzed by GC-NPD with a high-polarity capillary column (DB-FFAP) and highly deactivated inlet liner.

Recoveries of hymexazol spiked in agricultural products (tomato, lemon, soybean and other samples) at the level of 0.1 µg/g ranged from 65.0 to 84.7%. The limit of detection was 0.02 µg/g.

(Received January 18, 2008)

Key words: 農産物 agricultural product; 分析法 analytical method; 残留農薬 pesticide residue; ヒメキサゾール hymexazol; 高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ GC-NPD

緒言

ヒメキサゾールは 1969 年に農薬登録された各種作物の苗木枯病の防除に適用される土壌殺菌剤である。平成 17 年 11 月 29 日に公布された平成 17 年厚生労働省告示第 499 号において暫定基準値として 0.02~0.5 ppm が設定された。ヒメキサゾールは厚生労働省通知 GC/MS 一斉試験法で、その精製法で用いられている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積層ミニカラム (EnviCarb/NH₂) からの回収率が低いなどの理由でこの試験法は適用できず^{*1}、個別試験法での分析が必要となる農薬である。これまでに報告されている試験法として、GC 誘導体化法¹⁾や環境省告示分析法 (平成 18 年 5 月 29 日

Fig. 1. Chemical structure of hymexazol

付で廃止)^{*2} などがあるが、排水規制のあるジクロロメタンを使用することや測定時における感度変動などの問題があった。著者らはこれら問題点の改善を図るため種々条件を検討し、高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC-NPD) を用いて安定した定量が可能である試験法を作成したので報告する。

実験方法

1. 試料

玄米、大豆、こまつな、きゅうり、トマト、にんじん、レモン、りんご、キウイの計 9 種類の農産物を対象とした。

* 連絡先

東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*¹ 厚生労働省、農作物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC/MS 一斉分析法、並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法の検討結果 (平成 15・16 年度), <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/positivelist/dl/040806-113.pdf>

*² 環境庁告示第 28 号: “ヒメキサゾール試験法” 昭和 53 年 5 月 12 日 (1978)

2. 試 薬

1) 農薬標準品: (株)林純薬工業製残留農薬分析用標準品 (純度 99% 以上) を用いた.

2) 農薬標準溶液: 農薬標準品 10.0 mg をアセトンで 10 mL に溶解し, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を作製した. これを酢酸エチルで適宜希釈したものを用いた.

3) アセトニトリル, *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 無水硫酸ナトリウムおよび塩化ナトリウム: 残留農薬試験用を用いた.

4) 塩酸: 試薬特級を用いた.

5) 多孔性ケイソウ土カラム: Varian 社製 Chem ElutTM 20 mL Unbuffered (保持水量 20 mL) を用いた.

6) C18 ミニカラム: Varian 社製 Bond Elut[®] C18 (500 mg) を用いた.

3. 装 置

1) 高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC-NPD): Agilent 5890 II (Agilent 社製)

2) ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS): Agilent

6890-5973inert (Agilent 社製)

4. GC-NPD 測定条件

カラム: DB-FFAP (0.32 mm i.d. $\times$ 15 m, 膜厚 0.50 μm) (Agilent 社製); カラム温度: 60°C (2 min) $\rightarrow$ 20°C/min $\rightarrow$ 180°C (0 min) $\rightarrow$ 5°C/min $\rightarrow$ 200°C; キャリヤーガス: ヘリウム 1.9 mL/min (定流量モード); 注入口温度: 230°C; 検出器温度: 230°C; インサート: Focus LinerTM スプリット/スプリットレス用 (SGE 社製); 注入量: 1 μL (スプリットレス)

5. GC/MS 測定条件

カラム: DB-5MS (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μm) (Agilent 社製); カラム温度 50°C (1 min) $\rightarrow$ 25°C/min $\rightarrow$ 125°C (0 min) $\rightarrow$ 10°C/min $\rightarrow$ 250°C; キャリヤーガス: ヘリウム 1.0 mL/min (定流量モード); 注入口温度: 250°C; トランスファーライン温度: 250°C; イオン化エネルギー: 70 eV; イオン化モード: EI; 注入量: 1 μL (スプリットレス)

Scheme 1. Analytical method for hymexazol in agricultural products

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を Scheme 1 に示した。

果実、野菜：試料 20.0 g にアセトニトリル 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズし、吸引ろ過した。残留物はアセトニトリル 20 mL を加えて同様に処理した。ろ液を合わせて、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。このろ液 20 mL に塩化ナトリウム 10 g および 0.01 mol/L 塩酸 20 mL を加えて振とうした後、静置し、アセトニトリル層と水層を分取した。アセトニトリル層は無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。また、水層は多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に負荷し、15 分間放置した後、酢酸エチル 100 mL で溶出した。溶出液をアセトニトリル層と合わせて濃縮し、残留物を酢酸エチルに溶解し、2 mL としたものを抽出溶液とした。

豆、穀類：試料 10.0 g に水 20 mL を加え、2 時間放置後、上記と同様にして吸引ろ過した後、残留物をアセトニトリルで 100 mL とした。このろ液 20 mL に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回振とう抽出し、抽出液を合わせて、約 20 mL に濃縮した。この溶液に塩化ナトリウム 10 g および 0.01 mol/L 塩酸 20 mL を加えて振とう後、アセトニトリル層と水層を分取し、上記と同様に処理し残留物を酢酸エチルに溶解し、1 mL としたものを抽出溶液とした。

抽出溶液 0.5 mL をあらかじめ酢酸エチル 10 mL でコンディショニングした C18 ミニカラムに負荷し、酢酸エチル 5 mL で溶出した。窒素気流下で濃縮し、酢酸エチルに溶解し、正確に 0.5 mL としたものを試験溶液とした。

結果および考察

1. GC 測定条件の検討

イソキサゾール構造を有するヒメキサゾールは GC 注入口での加熱により、ヒドロキシル基が異性化し、安定なオキサゾロンに変化すると考えられる。汎用される微極性の 5% フェニルメチルシリコンを液相とする GC 用キャピラリーカラムでは顕著なテーリングが認められ、安定した測定が困難であった。そこで各種の高極性カラムを検討し、良好なピーク形状が得られたポリエチレングリコール系カラムでケトン類の測定に適しているとされる DB-FFAP を採用した (Fig. 2)。このカラムを用い標準品およびマトリックス添加標準品を繰り返し測定したところ、感度変動が認められ、特にマトリックス添加標準品は数回の測定で約 40% の感度低下が認められた。これはヒメキサゾールが試料マトリックスの影響でインサートへ吸着したためと考えられた。そこでインサートに高度な不活性処理を施している SGE 社製 Focus Liner™ を採用したところ、感度変動を減少させることができた。

2. 検量線および定量限界

本条件によりヒメキサゾールのピーク面積から 0.02~1.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線を作成したところ、相関係数

Fig. 2. Gas chromatogram of hymexazol standard (0.2 $\mu\text{g/mL}$)

Fig. 3. Calibration curve of hymexazol

Fig. 4. Mass spectrum of hymexazol by GC/MS

は 0.99921 と良好な直線性を示した (Fig. 3)。なお、GC クロマトグラムから S/N 比が 10 となる値として 0.0343 $\mu\text{g/mL}$ が導かれた。これを試料中濃度に換算すると 0.0171 $\mu\text{g/mL}$ が得られたことから、本法の定量限界は 0.02 $\mu\text{g/g}$ とした。

3. GC/MS による確認

GC/MS の SCAN モードにより 1.0 $\mu\text{g/mL}$ のヒメキサゾール標準品を測定したところ、分子イオン m/z 99 を含むスペクトルが得られ (Fig. 4)、GC/MS は確認手法とし

Table 1. Partition of hymexazol between acetonitrile and brine

Sample	Acetonitrile layer (%)	Brine layer (%)
Tomato	82.9	17.1
Lemon	73.1	26.9

て有効であった。本条件のような DB-5MS などの微極性カラムで測定した場合トータルイオンクロマトグラム上で顕著なテーリングが認められるため、基準値レベルの確認が困難な場合がある。カラムを高極性の DB-FFAP に換えれば問題はないと思われるが、残留農薬分析で用いる GC/MS は極性が低いカラムを装着していることが多く、カラム交換をするのは現実的ではない。この場合、試験溶液を濃縮するなどして対応できると考える。

4. 抽出方法の検討

厚生労働省通知 GC/MS 一斉試験法においてヒメキサゾールは精製方法の適用は困難であるが、抽出溶液の調製は酸性下で行えば適用することでき、操作の効率化が図れると考えた。そこで、標準品をアセトニトリル 50 mL に添加し、水 20 mL を加えた後アセトニトリルで 100 mL とし、その 20 mL を分取して塩析し、得られたアセトニトリル層を濃縮したものを試験溶液として測定したところ、回収率は 50% 前後と低かった。ヒメキサゾールは水・オクタノール係数 (K_{ow}) が $\log P=0.48$ と小さく水にも可溶であるため²⁾、塩析時に水層部分にヒメキサゾール

Table 2. Recovery of hymexazol spiked in samples

Sample	Recovery ¹⁾ (%)
Rice	66.6±3.3
Soybean	65.0±4.7
Lemon	79.9±8.0
Apple	79.6±8.3
Kiwi fruit	76.3±8.6
Komatuna	83.0±8.8
Carrot	66.2±8.0
Tomato	70.0±6.1
Cucumber	84.7±8.0

¹⁾ The values are mean±S.D. ($n=3$)

が溶け込み、これが十分回収されていないものと思われた。これを確認するため、実試料にヒメキサゾールを添加し、アセトニトリル抽出後、塩化ナトリウムおよび 0.01 mol/L 塩酸を加えて塩析し、分離した各層についてヒメキサゾールを測定し、その割合を算出した。その結果、水層部分には約 20% 程度が移行しており (Table 1)、これを回収する方法として多孔性ケイソウ土カラムを用いる方法を検討した。極性の高いヒメキサゾールは多孔性ケイソウ土カラムから酢酸エチルで溶出できると考え³⁾、標準溶液を多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、酢酸エチル 100 mL で溶出したときの回収率を求めたところ、92.8% とほぼ完全に回収できるとがわかった。以上の結果、塩析後の水層部分に移行したヒメキサゾールを多孔性ケイソウ土

Fig. 5. Gas chromatograms of sample extracts spiked with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of hymexazol

(a): unspiked, (b): spiked

カラムを用いて捕集し、これを酢酸エチルで溶出し、有機層とを合わせるにより、回収率を向上させることができた。また、厚生労働省通知 GC/MS 一斉試験法の抽出方法を一部改良することにより操作の効率化を図ることができた。

5. 精製方法の検討

脂質や脂肪酸が多い玄米などの試料では、高度不活化処理を施したインサートを装着した GC で測定しても、顕著な感度変動が見られ、測定ごとにピーク面積の減少が認められた。これは *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配を行っても完全に除去できない脂質や脂肪酸が注入口部分でヒメキサゾールの吸着を促進したためと考えた。これらの除去には NH₂ カラム、PSA カラムおよび C18 カラムが広く用いられており⁴⁾、これらカラムを用いての精製方法を検討したところ、NH₂ カラムおよび PSA カラムはヒメキサゾールの保持が強く、溶出させることが困難であった。C18 カラムでは酢酸エチル 5 mL で溶出されるのが確認された。そこで玄米を用い精製を行った試験溶液を GC で測定したところ、ピーク面積の変動が低減され、比較的安定した測定が可能となったため、C18 カラムを用いた精製を行うこととした。

6. 添加回収試験

ヒメキサゾールを玄米等 9 種類の農産物に 0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加し、30 分放置後、本法に従い添加回収試験を行った。測定を妨害するような夾雑ピークがなく、良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 5)。3 回試行による回収率は 65.0~84.7% であり、おおむね良好な結果が得られた (Table 2)。

ま と め

ヒメキサゾールを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析後、水層部分に一部移行したヒメキサゾールを固相カラムに負荷して酢酸エチルで溶出した。アセトニトリル層および酢酸エチル溶出液を合わせるにより、ヒメキサゾールの回収率を向上させた。測定は DB-FFAP を装着した GC-NPD を用いた。また、GC の試料注入口における吸着防止のため高度不活化処理を施したガラスインサートを使用し、さらに C18 ミニカラムによる精製を加えることにより、安定した定量が可能となり、測定を妨害するような夾雑ピークがなく測定することができた。

本分析法は平成 18 年 3 月 15 日付け食安発第 0315001 号において通知試験法として採用された。

文 献

- 1) Nakamura, T., Yamaoka, K., Ueda, T., Tsujino, Y., Oh-tsuka, T., Saitoh, T., Tojigamori, M. Gas chromatographic determination of hymexazol in plants and soils. Ann. Rep. Sankyo Res. Lab., **28**, 130-141 (1976).
- 2) C D S TomLin: "The Pesticide Manual" Fourteenth Edition. UK, British Crop Production Council, 2006, p. 581. (ISBN 1-901396-14-2)
- 3) 残留農薬分析法研究班 "最新農薬の残留分析法改訂版別冊", 東京, 中央法規出版, 2006, p. 45.
- 4) Takano, I. Shokuhin-tyu-zanryunouyaku no bunseki. Bunseki, 337-341 (2006).