

資料

ガスクロマトグラフィー(GC)による野菜・果実中の フェンヘキサミドの分析法に関する検討

杉村 光永, 豊田 安基江, 井手吉 範久

Determination of Fenhexamid in Fruits and Vegetables by Gas-chromatography

MITSUNORI SUGIMURA, AKIE TOYOTA and NORIHISA IDEYOSHI

(Received, Oct. 5, 2001)

ヒドロキシアニリド系殺菌剤フェンヘキサミドの高感度窒素・リン検出器付ガスクロマトグラフ(NPD)による分析方法を検討した。

本農薬を農産物からアセトンで抽出し、ヘキササンに転溶後、トリメチルシリルジアゾメタン(TMS-DM)でメチル化した。フロリジルPRを充填したカラムで精製し、GCで分析したところ、妨害のない良好なクロマトグラムが得られた。8農産物への添加回収試験では、回収率が92.8~102.2% (CV%=0.7~4.3, n=3)と良好な結果が得られた。また、ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC-MS)でスキャン分析したところ、分子イオンm/z=315が確認できた。

キーワード：フェンヘキサミド, トリメチルシリルジアゾメタン(TMS-DM), フロリジルPR, NPD, GC-MS

緒 言

フェンヘキサミドはヒドロキシアニリド系の農薬で、ぶどう、かんきつ類の灰色かび病やももの灰星病に有効な殺菌剤である。

本農薬は、平成11年8月に農薬取締法で新規に登録され、農薬登録保留基準(保留基準)が定められた。さらに平成13年3月には、薬事・食品衛生審議会で、新たに農産物中の残留基準設定が了承された。

保留基準に示されている分析方法[1]では、農薬のメチル化の溶媒に、ジクロロメタンを使用している。ジクロロメタンは、加水分解してホスゲンを生成したり、吸入暴露で発がん性が認められたりしている[2]。また、排水基準値も定められている。

このため、我々は、農薬のメチル化剤を市販のTMS-DMに変えるとともに、近い将来、食品衛生法に基づく残留基準の設定が予想されることから、食品衛生法の告示分析法(告示法)[3]を参考に、NPDによる本農薬の分析方法を検討したので報告する。

実験方法

1 試 料

広島県内市場で購入したいちご、キウイ、すいか、なつみかん、ぶどう、みかん、メロン及びももの計8農産物。

2 標準物質：和光純薬工業(株)製

3 TMS-DM：ジーエルサイエンス(株)、東京化成工業(株)及びAldrich Chem.Co.製。

4 装 置

- (1) NPD装置：Hewlett Packard社製HP-6890
- (2) GC-MS装置：Hewlett Packard社製HP-5971A

5 分析条件

(1) NPD定性・定量分析条件

カラム：DB-5 (J&W社製) 0.25mm×30m (d.f. : 0.25μm), 注入口温度：250℃, 検出器温度：300℃, カラム温度：80℃ (2 min) - (30℃/min) - 250℃ (1 min) - (5℃/min) - 270℃ (3 min), 注入方法：スプリットレス, 注入量：2μL

(2) GC-MS定性分析条件

カラム: DB-5ms (J&W社製) 0.25mm×30m (d.f.: 0.25 μm), 注入口温度: 250℃, トランスファーライン温度: 280℃, カラム温度: 80℃ (2min) - (30℃/min) - 250℃ (1min) - (5℃/min) - 270℃ (3min), イオン化電圧: 70eV, 注入方法: スプリットレス, 注入量 1 μL

6 分析方法

図1に示す方法で, 農産物の添加回収試験を行った。

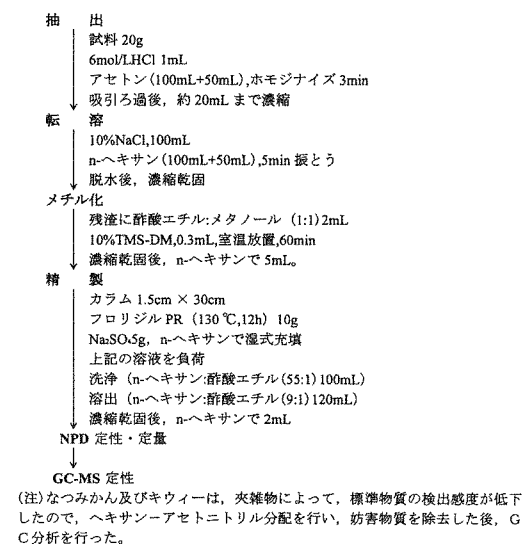


図1 分析方法

結果及び考察

フェンヘキサミドは, pH 3 ~ 9 で水溶性であるため, 試料からの抽出は塩酸でpH 2 以下とした後, アセトンを加えてホモジナイズした。

また, NPDによる分析は, フェンヘキサミドをメチル化することで, 高感度で行える。告示法には, メチル化剤にTMS-DMを用いる分析方法が示されており, これに準じて検討した。

1 転溶溶媒の検討

転溶溶媒は, 告示法では主にヘキサン, 酢酸エチル或いはヘキサン: 酢酸エチル混合液を用いている。上記のいずれの溶媒も回収率が良好であったことから, 今回, 我々はヘキサンを用いることとし, 2回(100mL + 50mL)抽出した。回収率は102% (n=3)であった。

2 メチル化条件の検討

メチル化の溶媒は, 告示法に準じ, 酢酸エチル: メタノール混液(1:1)とし, 条件を検討した。TMS-DMは告示法と同様に10%ヘキサン溶液を用いた。

(1) メチル化反応

フェンヘキサミドのメチル化は, マススペクトルから-NH-又は-OHの-Hが置換されると考えられる(図2中①及び②)。

フェンヘキサミド(メチル化前)のマススペクトルを見ると, 分子イオンm/z=301と他にフラグメントイオンm/z=177が検出された。このフラグメントイオンは, -CO-NH-結合が開裂した176[M(301)-C₈H₁₃O(125)]⁺に-Hが付加した177[176+H]イオンピークと思われる。

一方, メチル化後のフェンヘキサミドのマススペクトルを見ると, フェンヘキサミドがメチル化された分子イオンm/z=315[301+CH₃-H]⁺の他にフラグメントイオンm/z=191及びm/z=176が検出された。m/z=191は先と同様に-CO-NH-結合が開裂した190[M(315)-C₈H₁₃O(125)]⁺に-Hが付加した191[190+H]イオンピークと思われる。m/z=176はm/z=191のメチル化によって置換された-CH₃が開裂したものと思われた。

-NH-がメチル化されると, m/z=191は[CH₃NH-R]⁺であり, -CH₃が開裂した場合, m/z=177[191-CH₃+H]⁺の検出が予想される。

-OHがメチル化されると, m/z=191は[NH₂R-O-CH₃]⁺であり, -CH₃が開裂した場合, m/z=176[191-CH₃]⁺の検出が予想される。

したがって, 今回, メチル化後のマススペクトルでm/z=176 [191-CH₃]⁺が検出されたことから, -OHがメチル化されたと推定した。

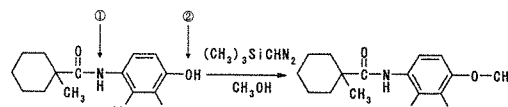


図2 フェンヘキサミドのメチル化反応

(2) 添加量

メチル化剤の添加量を検討するため, 添加量(0.05 ~ 0.5mL)を変えて, 60分間室温で反応させたところ, 0.2mL以上でメチル化が完了した(図3)。

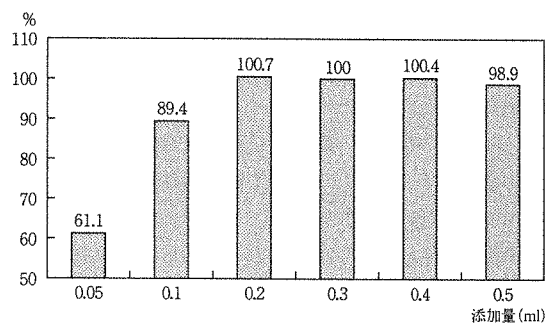


図3 TMS-DMの添加量と標準物質の生成量

TMS-DM0.3mL添加の生成量を100%としたときの, 添加量毎の生成量。室温で60分間反応させた。

(3) 反応時間

反応時間を検討するため、メチル化剤を0.3mL添加し、反応時間(5~120分間)を変えて室温で反応させた。反応開始から60分後にメチル化が完了した。このときの生成量の変動係数は1.3%(n=3)と安定していた(図4)。

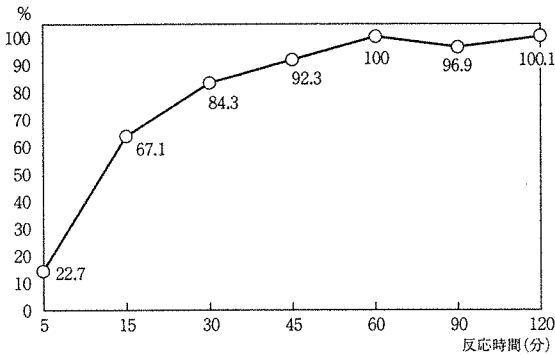


図4 反応時間と標準物質の生成量
 反応時間60分後の生成量を100%としたときの、反応時間毎の生成量。
 TMS-DM0.3mLを添加し、室温で反応させた。

(4) クロマトグラム

メチル化剤は、複数のメーカーから市販されている。各メーカーのメチル化剤を用いた場合のクロマトグラムを比較した。メーカーによって、メチル化剤の精製度が異なっていた。フロリジルカラムによる精製操作でA社及びB社のメチル化剤は精製可能であった(図5, 図6)。

C社のメチル化剤では、標準物質のピークの前後に夾雑物のピークが現れ、フロリジルカラム精製後も除去できなかった(図7)。しかしながら、フェンヘキサミドの定性・定量分析には、GC条件を適切に設定することで、影響はなかった。

以上のことから、メチル化剤の添加量は、今回、各試料の夾雑物の影響を考慮し、メチル化が完了する1.5倍量の0.3mLとした。また、反応時間を、室温で60分間とした。

3 精製条件の検討

フロリジルPRの充填カラムを図1にしたがって調製し、溶媒にヘキサン・酢酸エチル混液を用い、精製条件を検討した。

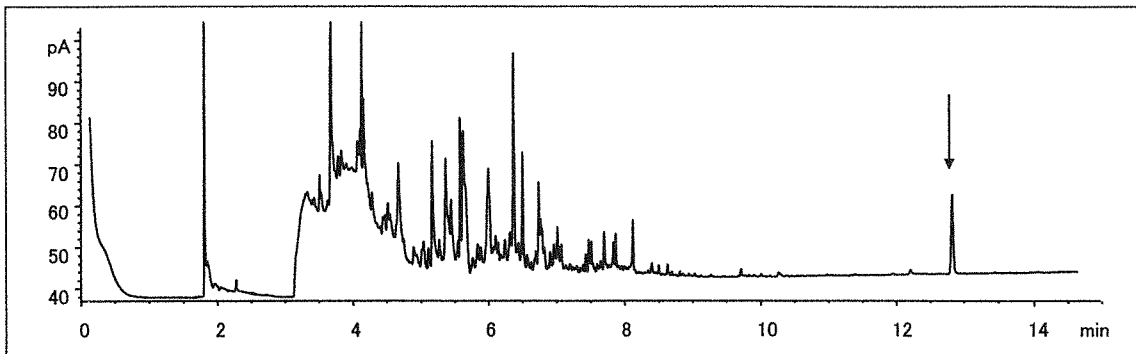


図5-1 カラム精製前クロマトグラム

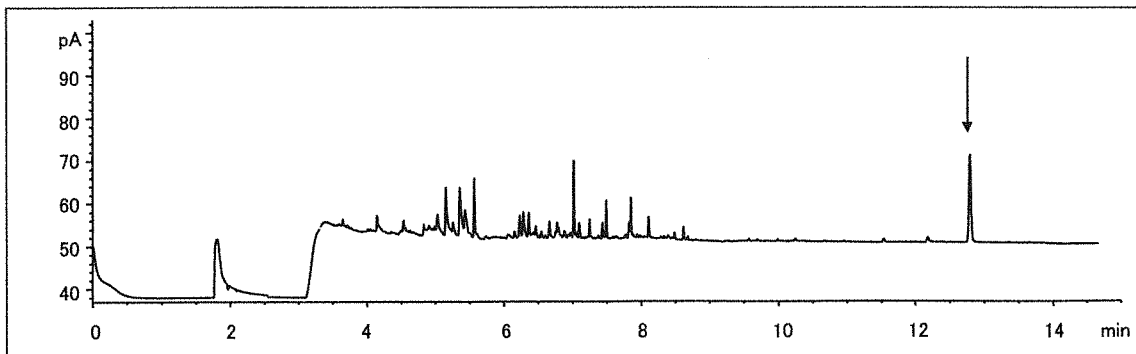


図5-2 カラム精製後クロマトグラム

図5 A社メチル化剤使用時の標準物質のクロマトグラム

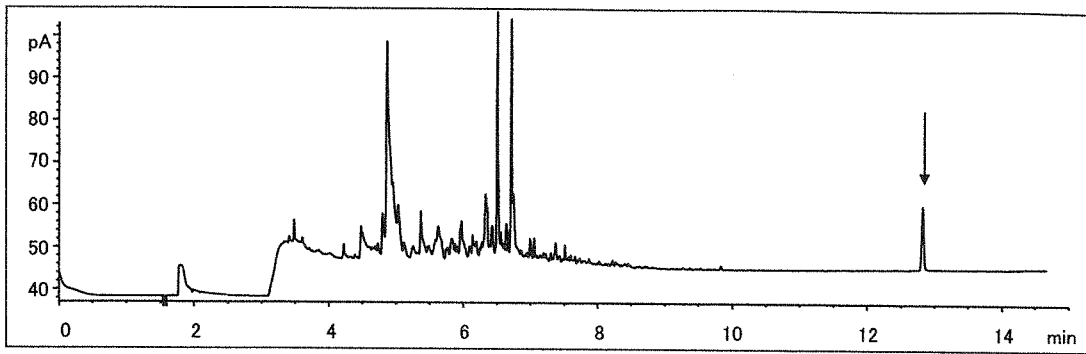


図6-1 カラム精製前クロマトグラム

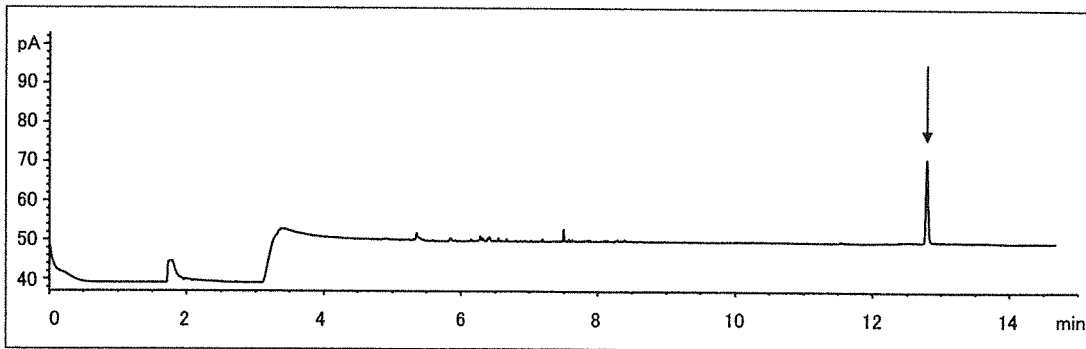


図6-2 カラム精製後クロマトグラム

図6 B社メチル化剤使用時の標準物質のクロマトグラム

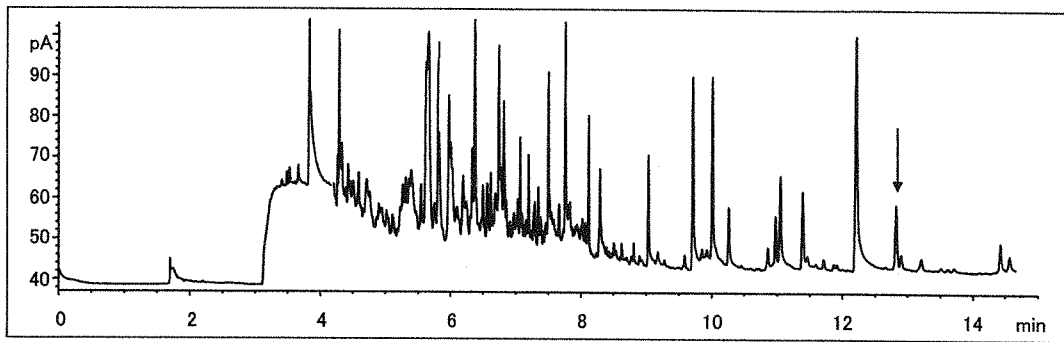


図7-1 カラム精製前クロマトグラム

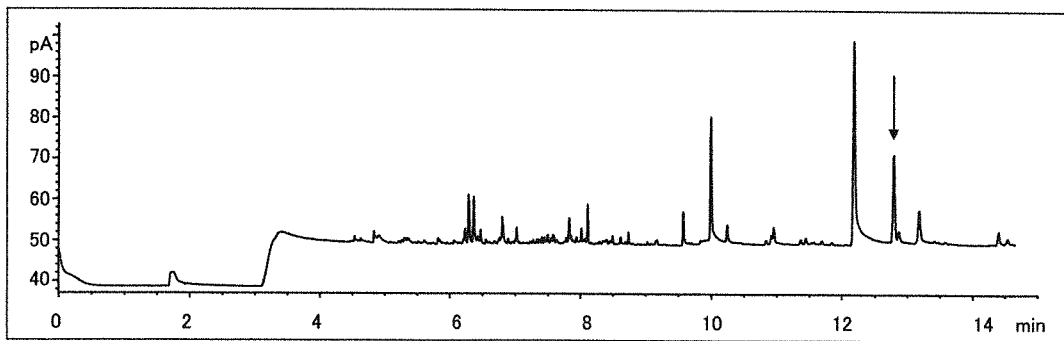


図7-2 カラム精製後クロマトグラム

図7 C社メチル化剤使用時の標準物質のクロマトグラム

(1) 洗浄溶媒の混合比

標準物質をカラムに負荷した後、ヘキサン：酢酸エチルの混合比(40：1～60：1)を変え、液量100mLでカラムを洗浄し、溶出溶媒で標準物質を溶出させた。洗浄溶液の混合比50：1で回収率93.3%、55：1で95.5%、60：1で98.0%であった。

(2) 溶出溶媒の混合比

標準物質をカラムに負荷した後、ヘキサン：酢酸エチルの混合比(4：1～19：1)を変えて展開した。9：1の混合比で回収率94.6%、4：1の混合比では97.4%であった。

以上のことから、ヘキサン：酢酸エチルの混合比60：1で洗浄後、4：1で溶出させると他の溶媒比に比べて、回収率が最大であった。しかし、溶媒比を変えて洗浄・溶出させたクロマトグラムを比較すると、溶媒比55：1で洗浄後、9：1の混液で展開したものが、他の溶媒比に比べて、夾雑物の少ない良好なクロマトグラムが得られた。

(3) 溶出溶媒量

溶出溶媒量を検討するため、ヘキサン：酢酸エチルの混合比9：1について、溶媒量(50～150mL)を変えて展開した。80mLで回収率75.1%、100mLで95.6%、120mLで98.8%であった。

したがって、今回、試料の精製には、ヘキサン：酢

酸エチルの溶媒比55：1の混液100mLで洗浄後、9：1の混液120mLで展開することにした。

4 アセトニトリル・ヘキサン分配による妨害物質の除去

なつみかん及びキウイを試料とした場合、夾雑物によって、標準物質の感度低下が起きた。したがって、次の方法で試料の妨害物質を除去した。カラム精製後の試料を、ヘキサン30mLに溶解後、アセトニトリル(ヘキサン飽和)で3回(各30mL)抽出した。標準物質をヘキサン30mLに溶解し、上記と同様の操作を行ったところ、回収率96.7%であった。

5 検量線

標準物質100 μ gをTMS-DMでメチル化後、ヘキサンで順次希釈し、2 μ LをGCに注入し測定した。0.1～1ppmの範囲で検量線を作成したところ $r=0.9997$ であった。この時の定量下限値は0.01ppmである。

6 GC-MSによる定性

標準物質100 μ gをTMS-DMでメチル化後、ヘキサンで順次希釈し、1 μ LをGC-MSに注入し測定した。分子イオン $m/z=315$ が確認できた(図8)。

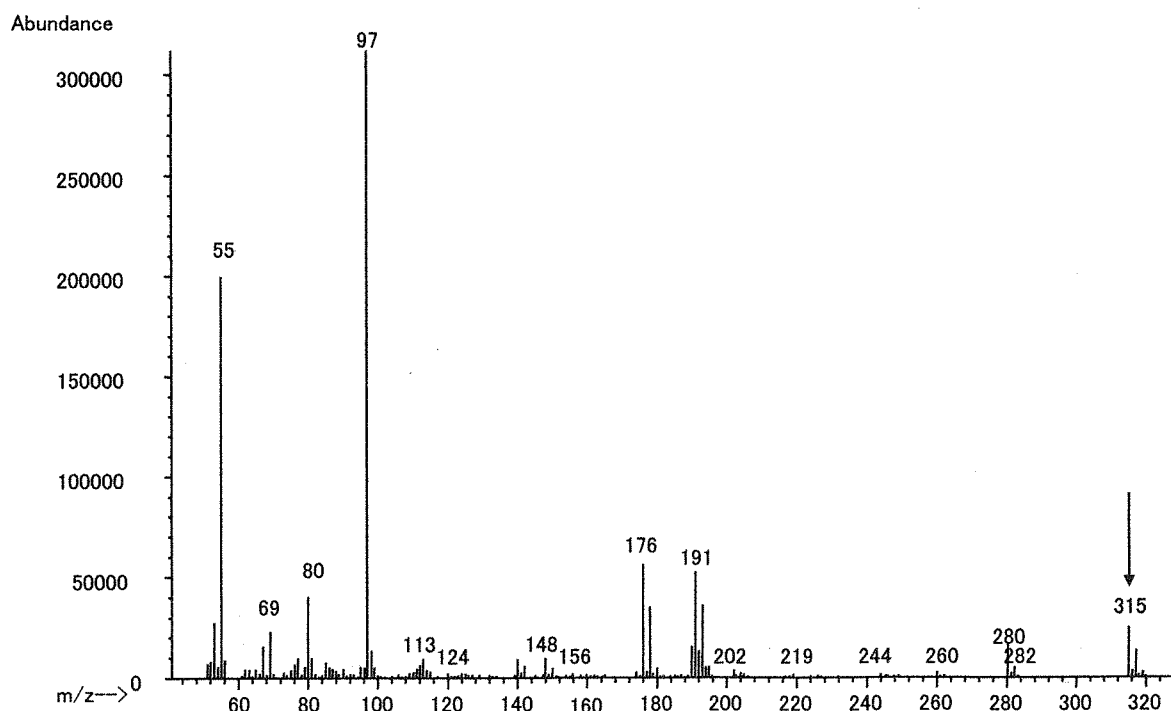


図8 標準物質のマススペクトル(メチル化)

7 試料のクロマトグラム

今回の分析方法にしたがって操作した試料のクロマトグラムを見ると, 分析に支障を来す妨害ピークは現れなかった(図9-1, 図9-2).

8 添加回収試験

保留基準が定められている農産物に, 0.1ppmとなるよう標準物質を添加し, 添加回収試験を行った. 回収率92.8~102.2%(CV%=0.7~4.3, n=3)と良好な結果が得られた(表1).

文 献

- [1] 化学工業日報社: 改定3版農薬登録保留基準ハンドブック追録, 82-83, 1999.
- [2] 新日本法規出版株式会社: 食品衛生小六法平成12年版, 食品の規格基準(D条).
- [3] 日本水道協会: 上水試験方法解説編, 615-617, 2001.

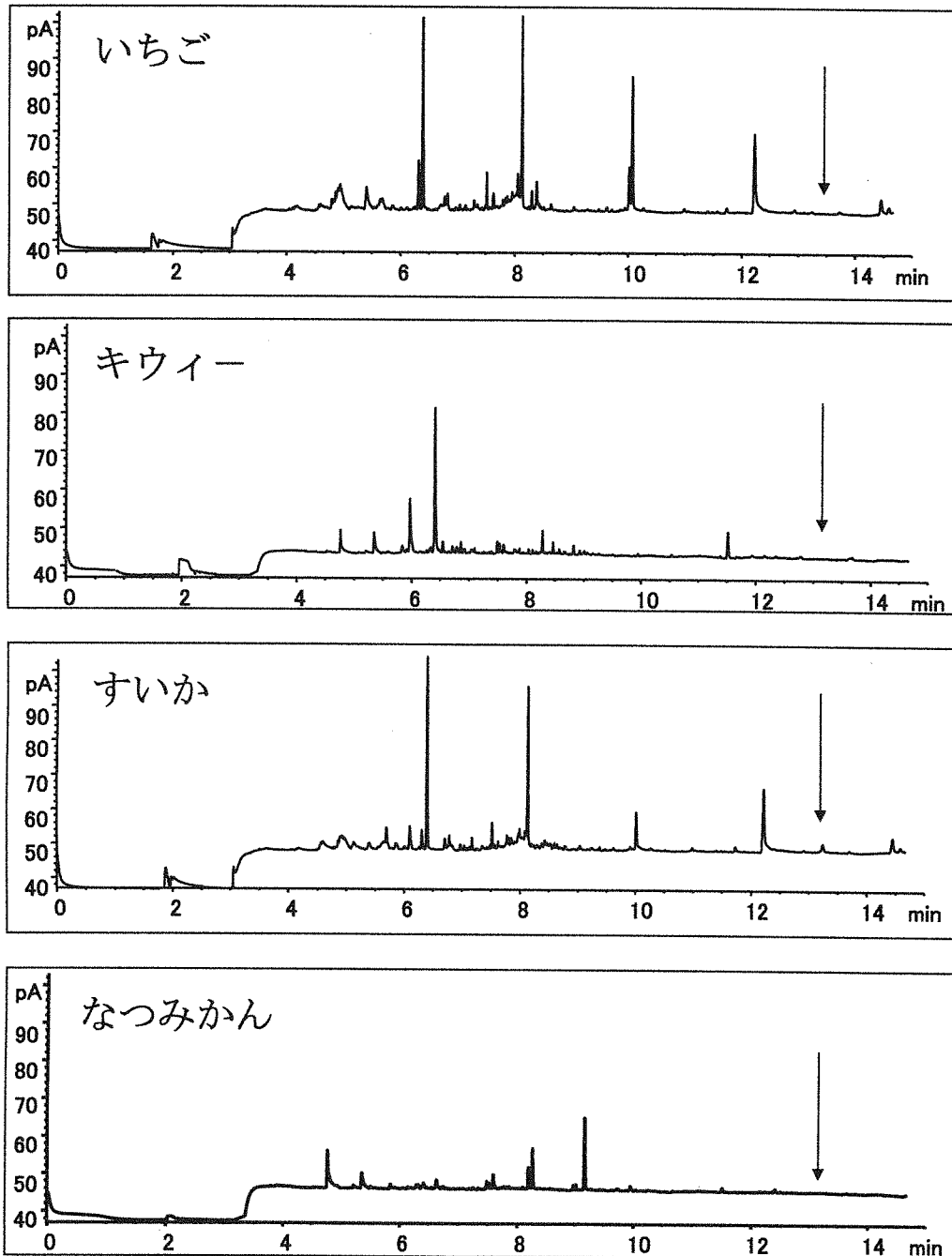


図9-1 各試料のクロマトグラム

表1 添加回収試験

農産物名	回収率 (%) ¹⁾	変動係数 (%) ¹⁾
いちご	98.6	1.7
キウイ	92.8	0.9
すいか	100.7	4.3
なつみかん	98.4	3.7
ぶどう	99.9	0.7
みかん	101.4	1.3
メロン	98.5	1.4
もも	102.2	3.4

¹⁾n=3

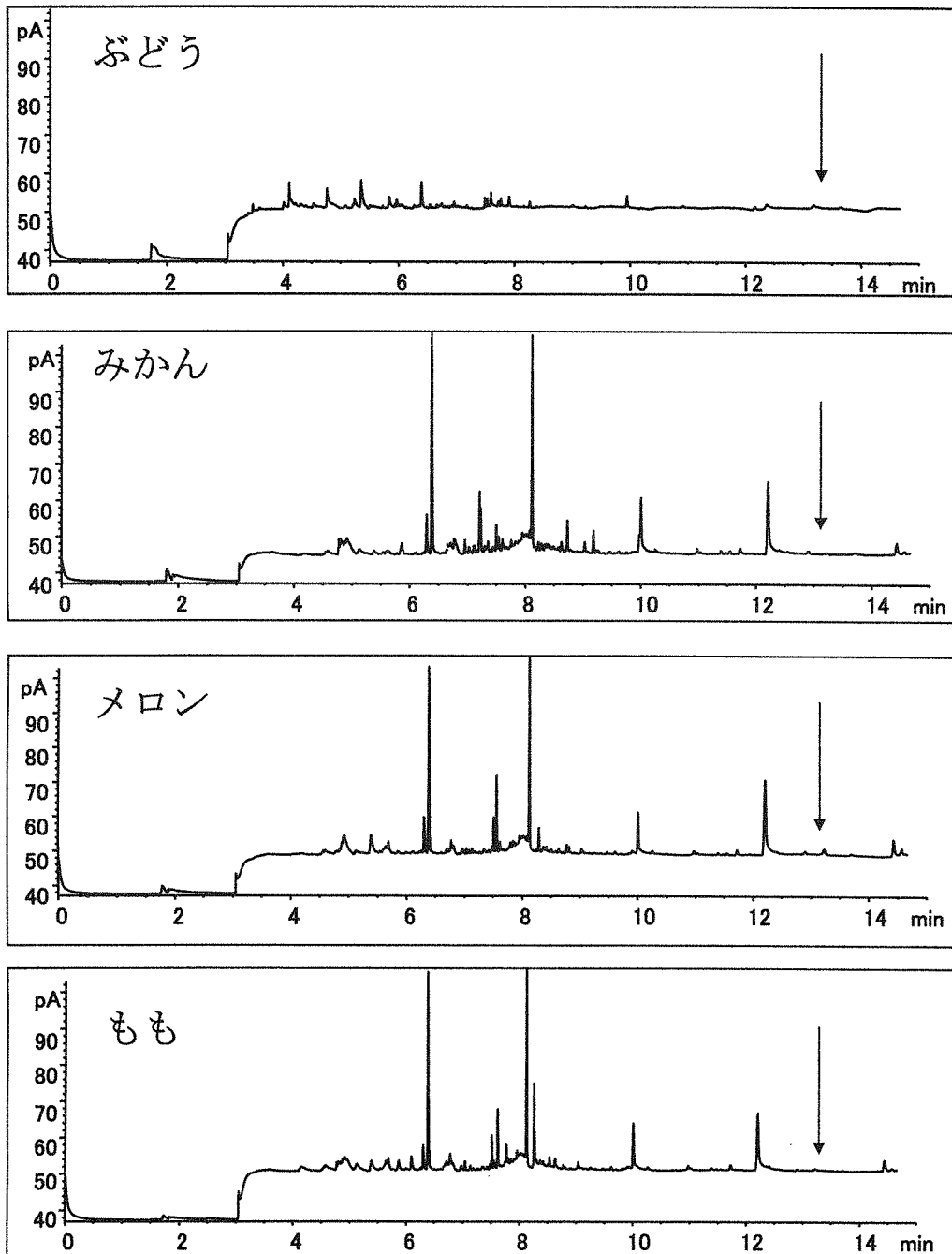


図9-1. 各試料のクロマトグラム

