

食用ペンタスにおける農薬「フルフェノクスロン」の 作物残留試験のための分析方法の確立

安井俊樹¹⁾・吉村幸江¹⁾・瀧 勝俊¹⁾

摘要：食用ペンタスの農薬登録拡大のため、農薬「フルフェノクスロン」の作物残留試験における残留分析を実施した。厚生労働省通知の試験法に従った分析では、クロマトグラムにベースラインの乱れが認められ、十分な精度が得られないことが明らかとなった。そこで、液液分配を省略し、色素除去のために C18 ミニカラムと GC/NH₂ ミニカラムを用いた精製方法に改良した。その結果、クロマトグラムにフルフェノクスロンの定量を妨害するピークは認められず、0.01 mg/kg を添加したフルフェノクスロンのほぼ 100% を回収できた。さらに、既知濃度のフルフェノクスロン 2 水準を添加し回収試験を行った結果、回収率の平均値と併行相対標準偏差は農林水産省の定める基準値内であった。以上から、本報による改良を行うことで食用ペンタスにおいても十分な分析精度を確保できることが明らかとなった。

キーワード：フルフェノクスロン、作物残留試験、食用ペンタス、農薬登録拡大

緒 言

愛知県では大葉や食用菊などのマイナー作物の生産が盛んである。これらの生産にも農薬による病害虫の防除が必要であるが、マイナー作物には登録農薬が少なく、病害虫の被害を抑えることに生産者は苦慮している。そこで、愛知県はマイナー作物の生産振興を目的として、マイナー作物の農薬登録拡大試験を行ってきた¹⁾。

農薬登録拡大試験に必要な試験として、対象の作物に農薬を散布し経時的な農薬の減衰を調査する作物残留試験がある。また、対象作物の生産量によって登録に必要な試験例数は異なり、マイナー作物では 2 例以上の試験結果を農林水産省に提出することとなっている²⁾。作物残留試験の残留分析は原則として厚生労働省通知の試験法³⁾（以下、通知法）に従って実施される。しかし作物によって通知法では分析精度が低く、分析方法の検討が必要となった例が散見される^{4, 5)}。分析方法については、精度の確認のため、試験ごとの試料に既知濃度の農薬 2 水準を添加し、回収試験を実施することとなっている⁶⁾。この回収試験では、5 回以上の繰り返し分析によって回収率の平均値と併行相対標準偏差を求め、農林水産省の定める基準値と照合する⁶⁾。

これまで食用花を対象として、作物残留試験の残留分析方法を検討した報告は見当たらない。そこで、食用

花での分析方法の知見を得るとともに、今後の食用花等の作物残留試験での分析方法の確立に資するため、食用ペンタスを対象にフルフェノクスロンの分析方法について検討した。

材料及び方法

試験 1 分析方法の検討

(1) 通知法での添加回収試験

ア 供試作物

愛知県豊川市の現地生産ほ場で試料調製した食用ペンタス「バタフライピンク」を供試した。2019 年 4 月 1 日に挿し芽、同年 5 月 2 日に定植し、同年 9 月 11 日に可食部である小花から花柄部分 1 kg を採取した。

イ 供試農薬

残留農薬試験用であるフルフェノクスロン標準品（富士フィルム和光純薬、大阪）を用いた。

ウ 分析試料への農薬の添加

採取した食用ペンタス 1 kg を摩砕均一化して分析試料とした。分析試料 20 g に定量限界濃度である 0.01 mg/kg となるようにフルフェノクスロンを添加した。

エ 抽出

フルフェノクスロンを添加した分析試料 20 g に、ア

¹⁾環境基盤研究部

セトン 100 mL を加えて 30 分間振とうした。吸引ろ過器を用いて抽出液をろ過後、アセトンで 200 mL に定容し、抽出液とした。

オ 精製と分析

抽出液から 100 mL を分取し、減圧濃縮した後、10% NaCl とヘキサンを用いた液液分配により、フルフェノクスロンをヘキサンに転溶した。次に、シリカゲルミニカラムと NH_2 ミニカラムを用いて精製した。ただし、通知法ではシリカゲルを充填したクロマトグラフ管が用いられているが、本報ではシリカゲルミニカラムで代用した。精製後に 60%アセトニトリル 2 mL に定容し、HPLC-UV (日本 Waters、東京) でフルフェノクスロンを測定した (図 1 左)。

使用した精製カラムは Sep-Pak PLUS Silica Cartridges 360 mg (日本 Waters、東京) と Sep-Pak Aminopropyl (NH_2) Plus Short Cartridges (日本 Waters、東京) で、HPLC-UV には Acquity UPLC-PDA (日本 Waters、東京) を用いた。測定条件は、検出器 UV257 nm、使用カラム BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 1.7 μm (日本 Waters、東京))、カラム温度 40°C、移動相水/アセトニトリル (4 : 6、v/v) 混液、流速 0.4 mL/min、注入量 8 μL である。

(2) 精製方法を改良した分析法 (以下、改良法) による添加回収試験

ア 供試作物、供試農薬、分析試料への農薬の添加

及び抽出

試験 1 (1) と同様とした。

イ 精製と分析

抽出液から 100 mL を分取し、減圧濃縮した。この濃縮液を C18 ミニカラム、GC/ NH_2 積層ミニカラム、シリカゲルミニカラムで精製後、60%アセトニトリル 2 mL に定容した。その後、HPLC-UV (日本 Waters、東京) でフルフェノクスロンを測定した。

使用した精製ミニカラムは、Inert-Sep C18 500 mg/6 mL (GL サイエンス、東京)、Inert Sep GC/ NH_2 500 mg/500 mg/6 mL (GL サイエンス、東京) 及び Sep-Pak PLUS Silica Cartridges 360 mg (日本 Waters、東京) で、HPLC-UV の機種と測定条件は試験 1 と同様とした。

ウ 通知法との変更点

10%NaCl とヘキサンを用いた液液分配を省略し、C18 ミニカラムによる精製を加えた。 NH_2 ミニカラムによる精製から、GC/ NH_2 積層ミニカラムによる精製に変更した (図 1 右)。

試験 2 改良法の分析精度

改良法の分析精度の確認のため、試験ごとの試料に既知濃度のフルフェノクスロン 2 水準を添加し、5 回繰り返し分析による回収試験を実施した。

(1) 供試作物

1 例目は試験 1 と同じ試料を供試した。

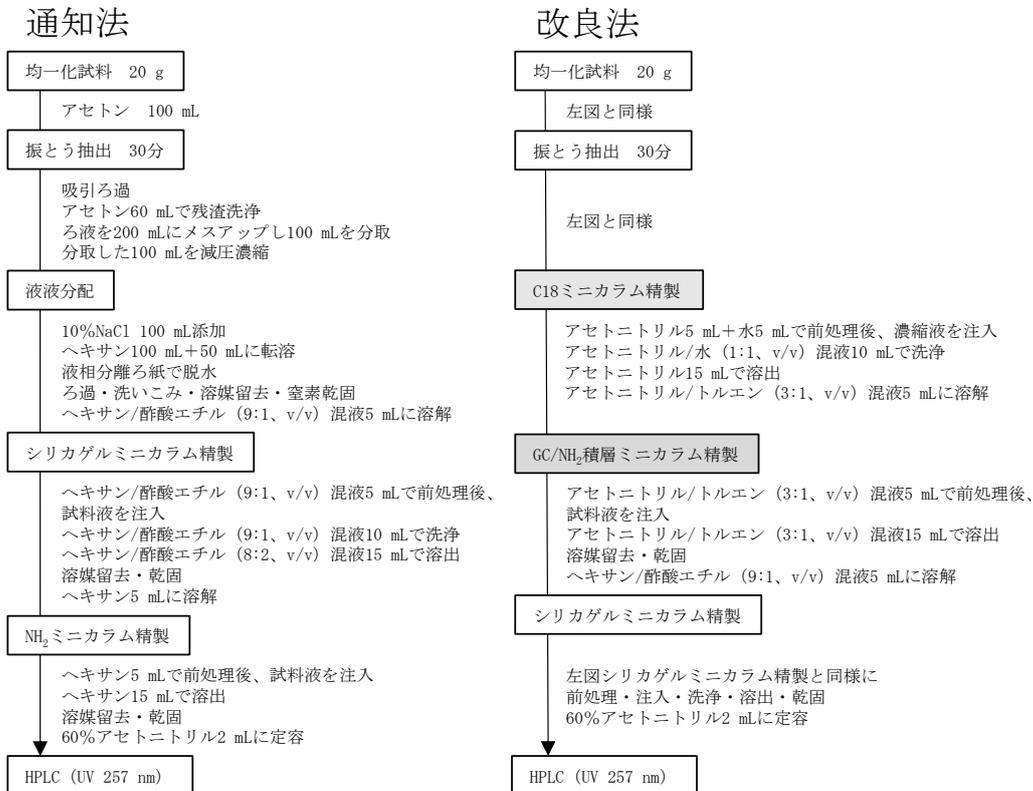


図 1 フルフェノクスロンの残留分析フロー図

左：通知法、右：改良法

通知法は厚生労働省通知の試験法

改良法は通知試験法の精製方法を改良したもの

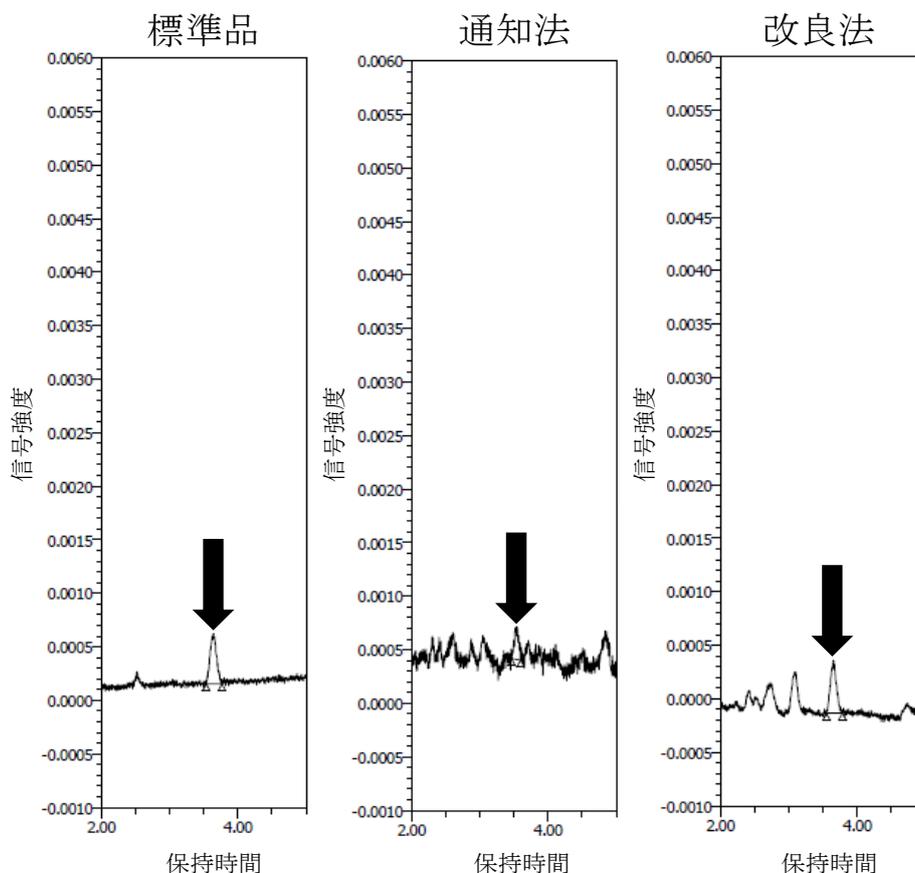


図2 フルフェノクスロンの標準品及び添加回収試験におけるクロマトグラム (0.01 mg/kg添加)
左：標準品、中央：通知法、右：改良法

黒矢印はフルフェノクスロンのピーク

通知法は厚生労働省通知の試験法により、改良法は通知の試験法の精製方法を改良して分析した

2 例目は愛知県豊橋市の現地生産ほ場で試料調製した食用ペンタス「バタフライピンク」を供試した。2019年2月18日に挿し芽、同年6月9日に定植、同年9月25日に可食部である小花から花柄部分1 kgを採取した。

(2) 供試農薬

試験1と同じ標準品を供試した。

(3) 分析試料への農薬の添加

採取した食用ペンタス1 kgを摩砕均一化して分析試料とした。分析試料20 gに定量限界濃度である0.01 mg/kg及び、残留が見込まれる最高値の濃度とした10 mg/kgとなるようにフルフェノクスロンを添加した。

(4) 抽出、精製及び測定

試験1(2)と同様とした。

グラムを比較すると、後者ではベースラインの乱れによってフルフェノクスロンの定量が妨害され、正確なピーク面積は測定不能であった(図2中央、表1)。そのため、通知法に改良が必要であると考えられた。

精製後の抽出液が黄緑色を呈していたことから、グラファイトカーボン(以下、GC)とC18ミニカラムによ

表1 フルフェノクスロンの標準品及び添加回収試験におけるピーク面積 (0.01 mg/kg添加)

分析試料	面積 (μV 秒)
標準品	3065
通知法	— ¹⁾
改良法	2957<96%> ²⁾

1) 測定不能

2) 回収率

通知法は厚生労働省通知の試験法により、改良法は通知の試験法の精製方法を改良して分析した

結果及び考察

試験1 分析方法の検討

通知法では、精製後に2 mLに定容した試料は黄緑色を呈し、色素の除去が不十分であった。フルフェノクスロンの標準品と通知法による回収試験との間でクロマト

表2 改良した精製方法によるフルフェノクスロンの分析精度

採取場所	添加濃度 (mg/kg)			回収率 (%)		平均値 (%)		RSDr ¹⁾ (%)
豊川市	0.01	105,	105,	100,	98,	98	101	3.5
	10	87,	87,	85,	83,	75	83	6.0
豊橋市	0.01	98,	98,	97,	97,	94	97	1.7
	10	90,	89,	89,	88,	86	88	1.7

1) 併行相対標準偏差

る精製過程を加えることとした。GC にはクロロフィル等の色素の除去が、C18 ミニカラムにはクロロフィルやカロテノイド等の色素を含む脂質の除去が期待される⁷⁾。また、C18 ミニカラムによる精製は液液分配の代替として利用可能である⁷⁾。そこで、液液分配から C18 ミニカラムに、NH₂ ミニカラムから GC/NH₂ 積層ミニカラムに変更することとした (図1右)。

改良法では、精製後に 2 mL に定容した試料は無色透明であり、色素を除去できたと考えられた。クロマトグラムでは、フルフェノクスロンのピークの前に複数のピークが認められたが、定量を妨害するピークは認められなかった (図2右)。さらにフルフェノクスロンの標準品と改良法による回収試験で認められたピーク面積は、3065 μ V 秒と 2957 μ V 秒であり、改良法の回収率は約 96%であった (表1)。従って試験1(2)で試みた分析方法 (図1右) は、十分な分析精度を有すると考えられた。

以上から食用ペンタスにおけるフルフェノクスロンの分析では、通知法に色素除去の精製過程を加えることで、定量が可能となることが示された。

試験2 改良法の分析精度

1 例目の豊川市の試料に定量限界濃度である 0.01 mg/kg フルフェノクスロンを添加した試料では、回収率の平均値は 101%であり、併行相対標準偏差は 3.5%であった。残留が見込まれる最高値の濃度とした、10 mg/kg フルフェノクスロンを添加した試料では、回収率の平均値は 83%であり、併行相対標準偏差は 6.0%であった (表2)。

2 例目の豊橋市の試料に 0.01 mg/kg のフルフェノクスロンを添加した試料では、回収率の平均値は 97%であり、併行相対標準偏差は 1.7%であった。10 mg/kg フルフェノクスロンを添加した試料では、回収率の平均値は 88%であり、併行相対標準偏差は 1.7%であった (表2)。

農林水産省の定める分析方法の基準値の範囲について

では、0.01 mg/kg 添加の場合、回収率の平均値が 70~120%以内であり、併行相対標準偏差が 20%以下である必要がある²⁾。また 10 mg/kg 添加の場合、回収率の平均値が 70~110%以内であり、併行相対標準偏差が 10%以下である必要がある²⁾。本結果はいずれも基準値の範囲内であったことから、改良法による分析は作物残留試験成績として要件を満たすことが明らかとなった。

今回確立した分析方法は、色素除去が必要となる食用花等でフルフェノクスロンの分析方法を検討する際に参考になると考えられる。また、フルフェノクスロンと log Pow の値の近似した農薬や、構造の似た農薬の分析方法を検討する際にも参考となる可能性が高いと思われる。

引用文献

1. 大竹敏也, 西脇謙二. 愛知県におけるマイナー作物の農薬登録適用拡大の取り組み. 日本農薬学会誌 39 (2), 174-182 (2014)
2. 農林水産省消費・安全局長通知. 30 消安第 6278 号. 平成 31 年 3 月 29 日
3. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食安発第 0124001 号. 平成 17 年 1 月 24 日
4. 柳瀬杉夫, 松本次郎. ミズナ栽培における各種殺虫剤の残留特性と分析法の改良. 京都府農業研究所研究報告 23, 7-20 (2002)
5. 大竹敏也, 山田真人. 地域特産作物の農薬登録のために作物残留試験における農薬「スピノサド」の分析法の検討. 愛知農総試研報. 37, 147-150 (2005)
6. 農林水産省生産局生産資材課長通知. 13 生産第 3986 号. 平成 13 年 10 月 10 日
7. 武田明治, 小田中芳次, 小松一裕, 前川吉明. 最新農薬の残留分析法 [改訂版] 別冊. 中央法規出版株式会社. 東京. p. 34-43 (2006)