

HPLCによる飼料中のクロルフルアズロンの定量

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
巻/号	382
掲載ページ	p. 92-96
発行年月	1997年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ノート

HPLC による飼料中のクロルフルアズロンの定量

(平成 8 年 9 月 20 日受理)

白井裕治*¹ 鈴木茂孝*² 関口若菜*²

Determination of Chlorfluazuron in Feed by HPLC

Yuji SHIRAI*¹, Shigetaka SUZUKI*² and Wakana SEKIGUCHI*²

(*¹Fukuoka Fertilizer and Feed Inspection Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: 3-11-15, Chihaya, Higashi-ku, Fukuoka 813, Japan; *²Tokyo Fertilizer and Feed Inspection Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: 1-3-3, Ote-machi, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan)

An analytical method for chlorfluazuron (CFA) in feed by HPLC was established. Water was added to a sample, and CFA was extracted with acetonitrile. The extract was cleaned up on a porous diatomite cartridge, followed by a Florisil column and a silica cartridge. The CFA was determined by HPLC on an ODS column of Mightysil RP18 (4.6 mm i.d. × 250 mm) with a UV detector (260 nm). The recovery test was conducted with 3 kinds of feed spiked with CFA at levels of 0.02~2.0 ppm. The mean recovery values were in the range of 78.7~95.7%, and the relative standard deviations of repeatability (RSD_r) were within 14.1%. A collaborative study (7 laboratories) was conducted with mixed feed spiked with CFA at the level of 1.0 ppm. The mean recovery was 87.7%, and the relative standard deviation of reproducibility (RSD_R) was 3.7%. The detection limit was 0.02 ppm in a sample.

(Received September 20, 1996)

Key words: クロルフルアズロン chlorfluazuron; キチン合成阻害剤 inhibitor synthesizing chitin; 農薬 pesticide; 飼料 feed; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 多孔性ケイソウ土カートリッジ porous diatomite cartridge; フロリジルカラム Florisil column; シリカカートリッジ silica cartridge; 共同試験 collaborative study

緒言

クロルフルアズロン (CFA) は、キチン合成阻害殺虫剤として大豆、てんさいなどに使用されている^{1), 2)}。

平成 6 年 11 月、オーストラリアにおいて干ばつによる飼料穀物などの凶作のため、通常飼料として用いていない綿の葉をウシに給与したところ、綿の葉に残留した CFA が牛肉に移行し、検出された^{3)~5)}。このことから、CFA による汚染状況を早急にモニタリングすることが飼料及び畜産物の安全性確保上、緊急の課題となった。

CFA の分析法として、従来 GC⁶⁾ が用いられたが、

メチル化を必要とするため、最近 HPLC^{7)~9)} が報告されている。穀物中の CFA 分析法としては食品添加物等の規格基準⁹⁾があるが、液液分配及びガラスカラムによる精製をそれぞれ繰り返している。著者らは、多孔性ケイソウ土カートリッジカラムなどを用いて精製方法を簡素化し、HPLC を用いて迅速に定量する方法を検討したところ、公定分析法 (飼料分析基準)¹⁰⁾ として満足する成績を得たのでその概要を報告する。

実験方法

1. 試薬

1) CFA 標準液: CFA 標準品は林純薬工業より購入し、アセトニトリルを加えて溶かし、200 μg/mL の CFA 標準原液を調製した。使用に際して、CFA 標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、0.1~2

*¹ 農林水産省福岡肥飼料検査所: 〒813 福岡市東区千早 3-11-15

*² 農林水産省東京肥飼料検査所: 〒100 東京都千代田区大手町 1-3-3

μg/mL を含む CFA 標準液を調製した。

2) フロリジル: Floridin 製 フロリジル PR (粒径 149~250 μm (60~100 メッシュ)) を 130°C で 16 時間乾燥させた。

3) HPLC においては HPLC 用のアセトニトリルを用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。

2. 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC9A ポンプ, SPD-10AV 紫外吸光光度検出器及び C-R4AX インテグレーター

多孔性ケイソウ土カートリッジ: Analytichem International 社製 エクスチューブ™ ケムエルト™ CE 1020

シリカカートリッジ: Waters 社製 Sep-Pak シリカ™ カートリッジプラス型

フロリジルカラム: 無水硫酸ナトリウム 5 g, フロリジル 5 g 及び無水硫酸ナトリウム 5 g をそれぞれヘキサン-アセトン (9:1) に懸濁させてカラム管 (内径 15 mm) に順次流し込み, 溶媒を流出させてカラムを調製した。

3. 定量方法

1) 抽出: 試料 5.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 0.1 g 及び水 5 mL を加え, 30 分間放置した後, アセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL のメスフラスコを桐山漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (No. 5B) で吸引ろ過した後, 容器及び残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄し, 洗液をろ液に合わせ, アセトニトリルを標線まで加えた。この液 100 mL を 300 mL のなす形フラスコに入れ, 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した。

2) クリーンアップ: 飽和塩化ナトリウム溶液 20 mL を加えて残留物を溶かし, 多孔性ケイソウ土カートリッジに負荷し, 5 分間放置した。300 mL のなす形フラスコを多孔性ケイソウ土カートリッジの下に置き, 容器をシクロヘキサン 25 mL ずつで 4 回洗浄し, 順次多孔性ケイソウ土カートリッジに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ, 更にシクロヘキサン 50 mL を加えて CFA を溶出させた。溶出液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン-アセトン (9:1) 5 mL を加えて残留物を溶かし, フロリジルカラムに負荷した。容器をヘキサン-アセトン (9:1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 流出させた。カラムをヘキサン-アセトン (9:1) 35 mL で洗浄した後, 200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き, CFA をヘキサン-アセトン (7:3) 100 mL で溶出させた。溶出液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送

Table 1. HPLC Conditions

Column	Puresil (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
Eluent	Acetonitrile-water (4:1)
Detection	UV (260 nm)

Table 2. Elution Pattern of CFA from Florisil Column with Acetone-Hexane (7:3)

Fraction volume (mL)	Recovery (%)
0~ 20	0.0
20~ 40	0.0
40~ 60	55.5
60~ 80	31.1
80~100	11.1
100~120	0.0
Total	97.7

て乾固した。

ヘキサン-ジエチルエーテル (17:3) 3 mL を加えて残留物を溶かし, ヘキサン-ジエチルエーテル (17:3) でコンディショニングしたシリカカートリッジに負荷し, 容器をヘキサン-ジエチルエーテル (17:3) 3 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 流出させた。50 mL のなす形フラスコをシリカカートリッジの下に置き, CFA をヘキサン-ジエチルエーテル (7:3) 10 mL で溶出させ, 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル 2.5 mL を正確に加えて残留物を溶かし, メンブランフィルター (孔径 0.45 μm, 非水系) でろ過して試験溶液とし, HPLC で CFA を測定した。

結果及び考察

1. 抽出方法の検討

色素などの抽出を抑制するため, 抽出溶媒を含水アセトニトリルとしたが, 綿実中に 0.2 ppm 添加した CFA が回収されなかった。

この原因を綿実中の過酸化脂質の影響と考え, 抽出の際に抗酸化剤の BHT を 0.05~0.2 g 加えて以下本法により CFA の回収率を求めたところ, 95~98% と良好な結果を得た。BHT の添加量は 0.05 g で十分であったが, 試料の相違による検率を見込んで, 0.1 g とした。

2. クリーンアップの検討

2.1 多孔性ケイソウ土カートリッジの検討

食品添加物等の規格基準⁹⁾では抽出液を減圧濃縮した後, 液液分配を 2 回行っているが, 多孔性ケイソウ土カートリッジを用いて精製を簡素化する目的で次の検討を行った。

アルファルファの抽出液に CFA 標準液 (50 μg 相当量) を添加した後濃縮し, 本法により多孔性ケイソウ土

Table 3. Result of Recovery Test of CFA

Spiked (ppm)	Mix feed for swine	Alfalfa hay	Cotton seed
	Rec.* ¹ (RSD _r * ²)	Rec. (RSD _r)	Rec. (RSD _r)
0.02	82.6 (8.4)	83.7 (1.8)	82.4 (11.8)
0.2	88.3 (14.1)	78.7 (3.3)	91.3 (1.0)
2	95.7 (3.8)	86.0 (6.6)	82.2 (5.4)

*¹ Mean recovery ($n=3$)*² Relative standard deviation of repeatability**Table 4.** Result of Collaborative Study and Using Instrument

Laboratory No.	Rec.* ¹ (RSD _r * ²)	HPLC system (UV detector) Column (i.d.×length, particle size)
Lab. 1	93.3 (4.3)	LC-10AD series (SPD-10 AV) TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 2	86.0 (1.1)	800 series (Uvidec-100-VI) Mightysil RP-18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 3	85.3 (1.3)	GULLIVER series (Lambda-Max Model 481) Wakosil-II 5C18 HG (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 4	87.0 (3.0)	LC-6AD series (SPD-6AV) Mightysil RP-18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 5	91.0 (0.0)	GULLIVER series (UV-970) Shodex C18-5B (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 6	85.0 (1.1)	GULLIVER series (UV-970) Shodex C18-5B (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Lab. 7	86.0 (2.0)	LC-10AD series (SPD-10 AV) Inertsil ODS-2 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Mean	87.7 (2.3) (RSD _R * ³ =3.7%)	

*¹ Mean recovery (% , $n=3$). Mix feed for cattle was spiked at 1 ppm of CFA.*² Relative standard deviation of repeatability within same laboratory*³ Relative standard deviation of reproducibility between different laboratory

カートリッジに負荷した。5分間放置した後、溶出溶媒としてヘキサン、アセトニトリル飽和ヘキサン、シクロヘキサン及び酢酸エチルそれぞれ150 mLを用いてCFAを溶出し、以下本法により回収率を求めた。その結果、ヘキサンではCFAの溶解度が小さいことから78.4%と若干低い回収率であったが、その他の溶媒では104~109%と良好な回収率であった。ここでは共存する極性物質の溶出を抑えるためシクロヘキサンを溶出溶媒とした。

多孔性ケイソウ土カートリッジカラムクロマトグラフィーにおいて、CFAの溶出する画分を確認するため、次の検討を行った。

上記と同様にCFAを添加した抽出液を多孔性ケイソ

ウ土カートリッジに負荷し、シクロヘキサン200 mLを加え、はじめの流出液100 mL及びその後の流出液50 mLごとに分画し、各画分のCFAの回収率を求めた。その結果、各画分での回収率は0~100 mLで91.2%、100~150 mLで3.3%、150~200 mLで0.0%であり、CFAは150 mLまでに溶出された。

2.2 フロリジルカラムの検討

食品添加物等の規格基準⁹⁾ではフロリジルカラムからCFAをヘキサン-アセトン(7:3)70 mLで溶出しているが、溶出が不十分であったため、CFAの溶出する画分を確認することとした。

ヘキサン-アセトン(9:1)で調製したCFA標準液(5 μg)をフロリジルカラムに負荷し、本法に従って洗浄及

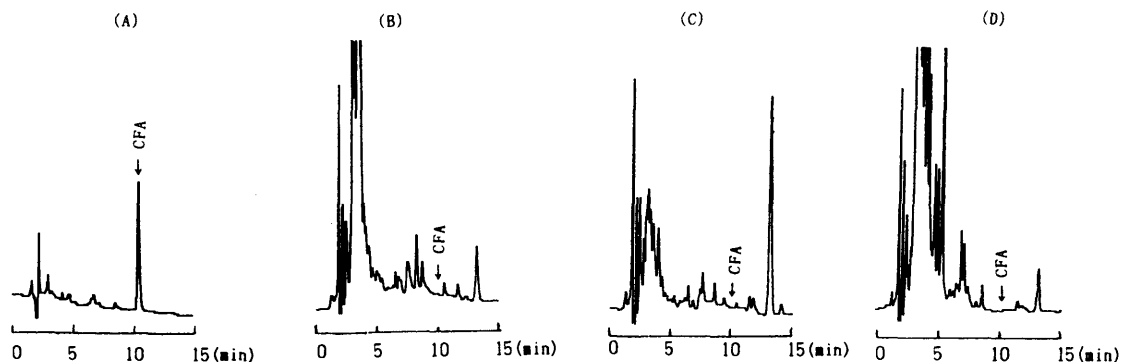


Fig. 1. Chromatograms of chlorfluazuron (CFA) of standard and sample solution
HPLC conditions are as shown in Table 1.
(A) chlorfluazuron 4 ng; (B) mix feed for swine; (C) alfalfa hay; (D) cotton seed

び溶出操作を行い、その溶出液を20 mLごとに分画し、それぞれの画分のCFAの回収率を求めた。Table 2に示したように、CFAが溶出し終わるまでには、ヘキサン-アセトン(7:3)100 mLを必要とした。

2.3 シリカカートリッジの検討

2.2で得られた試料溶液を高速液体クロマトグラフに供したところ、試料によってはCFAの定量を妨害するピークが現れたので、更にシリカゲルによる精製が必要であった。

シリカゲルによる精製にはガラスカラムを用いた食品添加物等の規格基準⁹及びシリカカートリッジを用いた厚生省の豪州産牛肉中の検査法(暫定法)⁷があるが、著者らは簡便な後者の精製法を用いて、鶏用配合飼料(2種類)、豚用配合飼料(3種類)、牛用配合飼料(2種類)、アルファルファ(2種類)、スーダングラス、オーツヘイ、綿実(2種類)を分析した結果、いずれもCFAの定量を妨害するピークは認められなかった。なお、クロマトグラムの一例をFig. 1に示した。

3. 定量限界及び添加回収試験

本法による回収率及び繰り返し精度を確認するため添加回収試験を実施した。

豚用配合飼料、アルファルファ及び綿実にCFAとしてそれぞれ0.02, 0.2, 2 ppm相当量を添加した試料について、本法に従って日を変えて3回分析を繰り返し、その回収率を求めた。Table 3のとおり、CFAの平均回収率は78.7~95.7%で、その繰り返し精度(RSD_r)は14.1%以内であった。

また、0.01 ppm相当量を添加した試料について、同様に試験したが、CFAを定量できない試料があったことから、本法の定量限界は試料中0.02 ppmとした。

4. 共同試験

本法による再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

綿実及びアルファルファハイキュー入り牛用配合飼

料にCFAとして1 ppm相当量を添加した試料を用い、7試験室((財)日本食品分析センター、農林水産省札幌肥飼料検査所、仙台肥飼料検査所、東京肥飼料検査所、名古屋肥飼料検査所、大阪肥飼料検査所及び福岡肥飼料検査所)において、本法に従って共同試験を実施した。Table 4に示したように、CFAの平均回収率87.7%であり、その室内繰り返し精度及び室間再現精度(RSD_r及びRSD_R)は2.3及び3.7%であった。

なお、参考のため各試験室で使用した機種等をTable 4に示した。

まとめ

飼料中のCFAの定量法を検討したところ、食品添加物等の規格基準⁹で精製に用いている液液分配及びシリカゲルカラムを、多孔性ケイソウ土カラム及びシリカカートリッジに変え精製を簡素化することにより、定量限界(0.02 ppm)は厚生省生活衛生局乳肉衛生課事務連絡⁷(0.2 ppm)より大幅に改善され、分析精度についても公定分析法(飼料分析基準)¹⁰として満足しうる成績を得た。

謝辞

共同試験にご協力いただいた試験室の各位に感謝の意を表します。

文献

- 1) 農業の手引き, p. 684 (1990) 化学工業日報社。
- 2) 富澤長次郎, 上野雅子, 腰岡政二編: "1989年版最新農業データブック" p. 73 (1989) ソフトサイエンス社。
- 3) 日本経済新聞: 平成6年11月11日朝刊(1994), 同年11月19日朝刊(1994)。
- 4) 日本農業新聞, 平成6年11月11日(1994), 同年11月19日(1994)。
- 5) 読売新聞, 平成6年11月18日, 朝刊(1994)。
- 6) 農業環境保全対策協議会編: "農業登録保留基準ハンドブック" p. 616 (1990) 化学工業日報社。
- 7) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課事務連絡: "豪州産牛肉中のクロルフルアズロン検査法について" 平成6年11月15

-
- 日 (1994).
- 8) 笹本剛生, 宮崎奉之, 橋本常生, 小久保彌太郎: 食衛誌, 36, 622~626 (1995).
- 9) 厚生省告示第 161 号, 1995 年 8 月 14 日.
- 10) 農林水産省畜産局長通達: “飼料分析基準制定について” 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).