

分取 HPLC および GC-ECD を用いた Deltamethrin および Tralomethrin の分別定量法

高附 巧[#]・根本 了・佐々木久美子・豊田 正武

Specific Determination of Deltamethrin and Tralomethrin by Preparative HPLC and GC-ECD

Satoshi Takatsuki[#], Satoru Nemoto, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda

Tralomethrin quickly changes to deltamethrin in gas chromatograph by debromination. Therefore deltamethrin and tralomethrin are not able to be distinguished by gas chromatographic determination. A method for specific determination of deltamethrin and tralomethrin was established. The method consists of fractionation by high performance liquid chromatography and determination by gas chromatography.

Recoveries of deltamethrin and tralomethrin spiked to three agricultural products were from 42 to 78% and from 18 to 76%, respectively with relative standard deviations ranging from 0.3 to 15%.

From the analysis of samples spiked with tralomethrin, it was found that a part of tralomethrin quickly changed to deltamethrin in homogenate of agricultural products. The addition of phosphoric acid to the homogenate did not prevent the change of tralomethrin.

Keywords : specific determination, deltamethrin, tralomethrin, pyrethroid pesticides, HPLC, GC
(Received May 30, 1997)

Deltamethrin (Delta) と tralomethrin (Tralo) はいずれもフランスのルセル・ユクラフ社が開発した果樹、野菜などの広範囲の害虫に効果を示すピレスロイド系農薬であり、GC-ECD で高感度に測定することが可能である¹⁾。

しかし、Tralo はガスクロマトグラフ (GC) 中ではほぼ定量的に Delta に変化するため、GC では Tralo と Delta を分別定量することが出来ない²⁾。また、植物に適用された Tralo が栽培中に植物体内で Delta に変化すること³⁾、SH 基を有する化合物により Tralo が Delta に変化すること⁴⁾が知られている。

食品衛生法では Delta と Tralo にそれぞれに残留基準が設定されており、両者を分別定量できる分析法の確立が必要である。そこで今回、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と GC を用いた Delta と Tralo の分別定量法について検討を行ない、更に農産物ホモジネート中での Tralo の安定性を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

東京都世田谷区で購入したりんご、だいこん、きゅうりおよび当所で保存していた大豆 (米国産) を試料とした。

2. 試薬・試液

標準品：deltamethrin (99%) ; Riedel-de Haën 製, tralomethrin (98.8 および 97%) ; 林純薬工業 (株) 製および和光純薬工業 (株) 製の農薬標準品を用いた。() 内は純度。

HPLC 用有機溶媒：アセトニトリルは、片山化学 (株) 製の HPLC 用溶媒を用いた。

各種有機溶媒：アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテルおよびヘキサンは、関東化学 (株) 社製の残留農薬試験用のものを使用した。

セライト：セライト No. 545 (和光純薬工業 (株) 製)
フロリジル：Florasil PR (和光純薬工業 (株) 製) を 130°C で 1 昼夜加熱し、デシケーター中で放冷した後、使用した。

その他の試薬：塩化ナトリウムおよびリン酸は和光純薬工業 (株) 製試薬特級、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用を用いた。

農薬標準原液：Delta および Tralo 各 10.0mg をそれぞれ 100ml のメスフラスコにとり、ヘキサンを加えて 100ml とした。

添加用 deltamethrin 溶液：Delta の含量が 4.0μg/ml となるようにヘキサんで希釈調製した。

添加用 tralomethrin 溶液：Tralo の含量が 4.0μg/ml となるようにヘキサんで希釈調製した。

HPLC 用農薬標準混合溶液：Delta および Tralo を 1.0μg/ml および 5.0μg/ml になるように各農薬標準原液を混合

[#] To whom correspondence should be addressed: Satoshi Takatsuki; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: takatsuk@nihs.go.jp.

し、窒素気流中でヘキサンを除去した後、70%アセトニトリル溶液で希釈調製した。

C₁₈カートリッジ：Sep-Pak Plus[®] C18 cartridge (Waters社製)、Clean-up CEC181M6 cartridge (1g/6ml) (United Chemical Technologies, Inc. 製)

3. 装置

ガスクロマトグラフ：電子捕獲型検出器 (ECD) 付き GC-14A (島津製作所(株)製)

オートインジェクター：AOC-14 (島津製作所(株)製)

データ処理装置：クロマトパック C-R4A (島津製作所(株)製)

送液ポンプ：LC-6A (島津製作所(株)製)

カラムオープン：CTO-6A (島津製作所(株)製)

検出器：UV 検出器 SPD-6A (島津製作所(株)製)

デガッサー：ERC-3320 (Elma Optical Works Ltd. 製)

データ処理装置：クロマトパック C-R2AX (島津製作所(株)製)

4. GC 条件

カラム：DB-1 (ID. 0.25mm x 30m, 膜厚：0.25 μ m) (J & W Scientific 社製)

キャリアーガス：ヘリウム (2.0kg/cm³)

カラム温度：50 $^{\circ}$ C (1 min) -25 $^{\circ}$ C/min-175 $^{\circ}$ C (0 min) -10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (4 min)

検出器：ECD (320 $^{\circ}$ C)

メイクアップガス：窒素 (30ml/min)

注入口：スプリットレス (サンプリング時間 1 min; 280 $^{\circ}$ C)

注入量：1.0 μ l

5. HPLC 条件

カラム：Inertsil ODS 2 (ID. 4.6mm x 150mm) (GLサイエンス(株)社製)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：70%アセトニトリル溶液 (1 ml/min)

検出器：UV (220nm)

注入量：100 μ l

6. 試料抽出溶液の調製

(1) 野菜・果実

破碎した試料20.0gにアセトン100mlを加え2分間ホモジナイズした後、セライトを厚さ約1cmに敷いたろ紙 (No. 5B) を用いて吸引ろ過し、セライト上の残渣にアセトン50mlを加えて同様に操作し、ろ液を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で約30mlとなるまで濃縮した。これに10%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、ヘキサン100mlおよび50mlで2回抽出した。ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。この残渣を5%エーテル含有ヘキサンに溶解して正確に4mlとして試料抽出溶液とした。

(2) 大豆

破碎した試料10.0gに水20mlを加え2時間放置した。これにアセトン100mlを加え2分間ホモジナイズした後、セライトを厚さ約1cmに敷いたろ紙 (No. 5B) を用いて吸引ろ過し、セライト上の残渣にアセトン50mlを加えて同様に操作し、ろ液を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で約30mlとなるまで濃縮した。これに10%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、ヘキサン100mlおよび50mlで2回抽出した。ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。

この残渣をヘキサン30mlに溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで3回抽出した。アセトニトリル層を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固し、残渣を5%エーテル含有ヘキサンに溶解し正確に4mlとして試料抽出溶液とした。

7. 精製

内径1.5cmのガラスカラムに活性化フロリジル5.0gをヘキサンで湿式充填し、その上部に無水硫酸ナトリウム5gをフロリジルと同様に充填しカラムを作成した。

上記6で調製した試料抽出溶液1.0mlを注入し、5%エーテル含有ヘキサン80mlで溶出し、溶出液は捨てた。次に25%エーテル含有ヘキサン80mlで溶出し、この溶出液を濃縮乾固した。残渣をヘキサンに溶解して正確に2mlとして、分別前のGC分析用試験溶液とした。

8. Delta と Tralo の分別定量

前述7で得られたGC分析用試験溶液を窒素気流中で乾固した後、残渣を70%アセトニトリル溶液400 μ lに溶解し、0.5 μ mのフィルターでろ過し、100 μ lをHPLCに注入し、DeltaとTraloの溶出画分をそれぞれ分取した。分取画分は、Fig. 1を例にとると、Deltaは19.3~21.0分、Traloは21.0~22.5および25.5~27.5分であり、予めHPLCに農薬標準混合溶液を注入してDeltaおよびTraloの溶出時間を調べて決めた。分取した各画分に10%塩化ナトリウム溶液50mlを加え、ヘキサン50mlで2回抽出した。これを無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。この残渣をそれぞれヘキサンに溶解し、正確に0.5mlとして分別後のGC分析用試験溶液とした。

9. 添加回収実験

だいこん、りんご20gまたは大豆10gに添加用農薬溶液各1.0ml (試料あたり0.2または0.4ppm相当)を別々に添加し、上記操作6,7および8を行った。

結果および考察

1. HPLC および C₁₈カートリッジによる Delta および Tralo の分離条件の検討

TraloはGC中ではほぼ定量的にDeltaに変化することから、GCによる分析ではDeltaとTraloの判別はできない。そこでHPLCによる分別定量を検討したところ、実験方

法 5 に示した条件で, Delta と Tralo を分離することができた. その時のクロマトグラムを Fig. 1 (A) に示した.

Tralo が HPLC 上で 2 つのピークとして観測されるのは Tralo が Fig. 2 に示した 2 種の異性体混合物のためである. 保持時間の短い異性体を Tralo A, 長い異性体を Tralo B とし, 文献から Tralo A は 1'S - 体, Tralo B は 1'R - 体と推定された^{5,6)}.

HPLC では Delta と Tralo を分離できたが, Table 1 に示したように検出感度は GC に比べて低く, 定量限界も残留基準値とほぼ同じであった. また, Fig. 1 に示した各農産物のクロマトグラムからわかるように Tralo は作物成分の妨害を受けやすいため, 実試料を HPLC のみで定量することは不可能であった.

そこで予め C₁₈ カートリッジで Delta と Tralo を分離した後, GC 分析することを考え, C₁₈ カートリッジによる両者の分離を検討した. しかし, 80~50% のアセトニトリル溶液を溶出溶媒として検討を行った結果, C₁₈ カートリッジでは Delta と Tralo を分離することはできなかった. そこで, HPLC により分離した Delta と Tralo を分取し, それぞれの画分を濃縮後十分な感度の得られる GC により分析することが適当であると判断した.

Delta または Tralo の 2.5ppm 標準溶液 (野菜・果実試料 20g あたり 0.2ppm に相当) を 100 μ l ずつ HPLC に注入し分取した後, GC で測定した結果, それぞれ 77.8, 110.2% の回収率が得られた (n=1). よって, 本法のように HPLC で分取し, 十分な感度の得られる GC で測定することにより, Delta では残留基準値の約 1/3, Tralo では約 1/8 の定量限界で分別定量が可能なが判明した.

2. Delta および Tralo の添加回収実験

HPLC による Delta と Tralo の分離・分取と GC による定量について実験方法 9 に従い, だいこん, りんごおよび大豆に Delta と Tralo を別々に添加して添加回収試験を行い, その結果を Table 2 に示した.

分別前の Delta と Tralo の回収率は, それぞれ 80.4 から 97.5% および 81.0 から 115.3% で標準偏差は 2 から 10% と良好な結果を得た.

分別後の結果については, Delta を添加した農産物のうち, 大豆から Tralo が約 1% 検出されたが, これは HPLC において Delta と Tralo A の保持時間が近いために Delta の一部が Tralo の画分に混入したためと考えられる.

一方, Tralo を添加した全ての農産物で, 3 から 30% が Delta として検出され, とくに Delta への変化が大きかっただいこん, 大豆においては, HPLC 上でも Delta としてのピークが認められたことから, Tralo の一部が農産物に含まれる成分, 光および分析操作などにより Delta に変化したものと推定された. だいこんホモジネートに Tralo を添加して直ちに抽出した場合, Tralo の回収率は 39.8%

Table 1. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of deltamethrin and tralomethrin

Pesticides	LOD (ng) ^{a)}		LOQ (ppm) ^{b)}	
	GC	HPLC	GC	HPLC
Deltamethrin	0.002	3	0.003	0.01
Tralomethrin	0.004	16	0.006	0.06

a) : S/N = 3, b) : S/N = 12, LOQ for vegetables and fruits

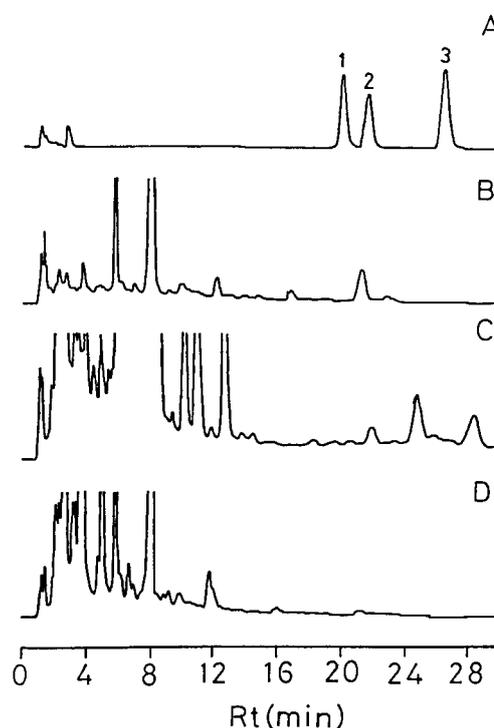


Fig. 1. High performance liquid chromatograms of standard (A), and unspiked samples (B-D)

A : 1. deltamethrin (50ng), 2. tralomethrin A, 3. tralomethrin B (tralomethrin A + B ; 250ng)
B : Japanese radish, C : apple, D : soybean

で, Delta が 31.1% 生成していた (Table 2). 添加 3 時間後に抽出したときの Tralo の回収率は 40.7% で, Delta の生成率は 26.2% であったことから Tralo はホモジネートに添加後直ちに Delta に変化し, その後は変化しにくいものと考えられる.

大豆では分別後の回収率が低いが, これは試験溶液中に残った大豆の脂質の影響により 70% アセトニトリル溶液に農薬が完全には溶解しなかったためと推定された. HPLC に注入する試料溶液は Delta と Tralo A の良好な分離をはかるため, 移動相の 70% アセトニトリル溶液で調製する必要があった.

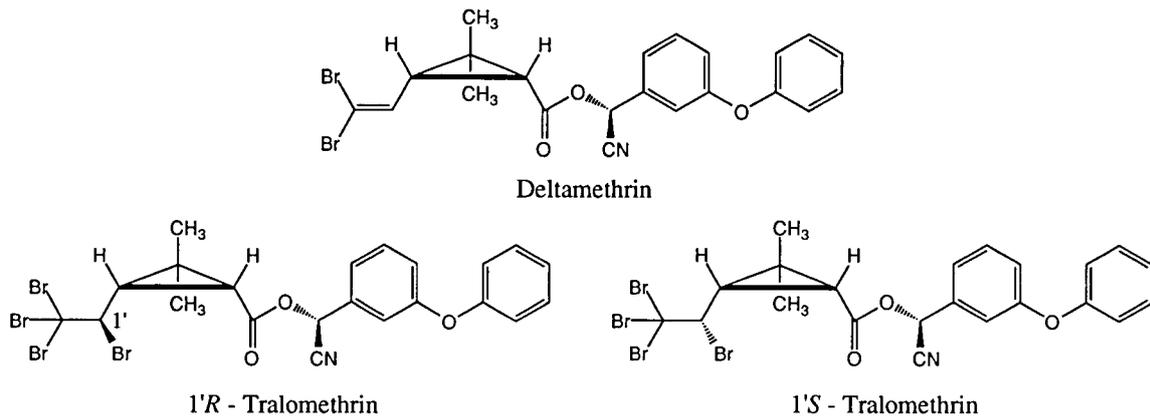
Fig. 2. Structures of deltamethrin, 1' *R*- and 1' *S*-tralomethrin

Table 2. Recovery of deltamethrin and tralomethrin spiked to agricultural

Spiked Pesticides	Detected Pesticides	Recovery (% , mean \pm SD, n=3)		
		Japanese radish	Apple	Soybean
<i>Before Fractionation</i>				
Deltamethrin		97.5 \pm 9.6	80.4 \pm 5.6	85.5 \pm 7.6
Tralomethrin		92.7 \pm 3.1	115.3 \pm 5.9	81.0 \pm 2.4
<i>After Fractionation</i>				
Deltamethrin	Deltamethrin	78.0 \pm 1.1	58.6 \pm 14.8	42.3 \pm 8.7
	Tralomethrin	0.0	0.0	0.8 \pm 1.4
	Total	78.0 \pm 1.1	58.6 \pm 14.8	43.1 \pm 8.1
Tralomethrin	Deltamethrin	31.1 \pm 0.6	3.3 \pm 0.6	6.3 \pm 0.3
	Tralomethrin	39.8 \pm 6.0	76.8 \pm 14.9	18.0 \pm 1.5
	Total	70.9 \pm 5.8	80.1 \pm 15.4	24.3 \pm 1.3

3. リン酸添加による Delta の生成抑制効果について

Tralo が分析操作もしくは農産物成分により Delta に変化することが判明したことから Delta への変化率が一番高かっただいこんときゅうりを用いて Delta の生成抑制について検討した。

試料に Tralo を添加した後、3時間放置したもの (control) と試料20g 当たりリン酸 2 ml を添加した後、Tralo を添加し、3時間放置したものについて、分別定量を行った。その結果を Table 3 に示す。分別前の GC 分析では、リン酸を添加した試料、control とともに85から117%の良好な回収率を得た。

一方、分別定量ではリン酸を添加しただいこんで5.2%が Delta として検出され、リン酸無添加の場合の26.2%に対して、Delta の生成は抑制されたが、完全に抑制することはできなかった。また、きゅうりでは、リン酸添加の有無に関わらず約13%が Delta として検出され、リン酸添加による Delta の生成抑制効果は認められなかった。以上の結果から、試料から Delta が検出された場合、その Delta が試料に本来残留していたものなのか、分析操作中に Tralo

から生成したものなのかの正確な判別は不可能であることが明らかとなった。多くの作物では Delta の残留基準は Tralo より低く設定されている (例 だいこん, Delta で 0.01ppm, Tralo で 0.5ppm) ため、操作中の Tralo から Delta への変化を完全には防止できない以上は、両者を分別せずに Delta として測定し、基準への適合性を判断することが合理的であると考えられた。

4. Tralo 標準品中の Delta 含量

Tralo は光分解などにより一部は Delta に変化する⁷⁾ことから、林純薬と和光純薬の 2 社から購入した残留農薬試験用標準品について HPLC により分析した結果、異性体比に多少の違いが観られたが、Delta は検出されなかった。

まとめ

Delta および Tralo の分別定量法および、Tralo の農産物ホモジネート中での Delta への変化に関する検討を行い、以下のような結果を得た。

1. Delta と Tralo は、C₁₈カートリッジカラムでは分離できないが、C₁₈カラムを用いた逆相 HPLC により十分な

Table 3. Inhibitory effect of phosphoric acid on the decomposition of tralomethrin to deltamethrin in the homogenate of vegetables

Pesticides	Recovery (% , mean \pm SD, n=3)			
	Japanese radish ^{a)}		Cucumber	
	Control	P-acid added ^{b)}	Control	P-acid added
<i>Before Fractionation</i>				
Tralomethrin	84.6	100.9 \pm 5.6	116.6 \pm 4.1	90.0 \pm 8.4
<i>After Fractionation</i>				
Deltamethrin	26.2	5.2 \pm 0.7	12.9 \pm 1.7	12.7 \pm 3.8
Tralomethrin	40.7	75.8 \pm 1.1	75.0 \pm 7.3	58.2 \pm 5.0
Total	66.9	81.0 \pm 0.5	87.9 \pm 7.1	70.9 \pm 8.8

a) : Control of Japanese radish ; n=1. b) : "P-acid added" is the agricultural products added with phosphoric acid before tralomethrin addition.

分離を得ることができた。

2. Delta と Tralo に対する HPLC 感度が十分でないの
で、分取 HPLC と GC 分析を組み合わせることにより両者を
分別定量する方法を確立した。

3. Tralo は、分析操作中に一部が Delta に変化し、変
化率は農産物により異なった。また、農産物ホモジネート
にリン酸を添加しても Delta の生成を完全に抑制すること
はできなかつた。

4. Tralo の分析用標準品には、Delta は含まれていな
かつた。

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編集：“最新農薬の残留分析法”
中央法規出版，p.198(1995)；同，pp.638-640.
- 2) 後藤真康，加藤誠哉：“増補 残留農薬分析法”ソフト
サイエンス社，pp.66-68(1987).
- 3) L. M. Cole, J. E. Casida and L. O. Ruzo: *J. Agric. Food
Chem.*, **29**, 702~706 (1981).
- 4) 金子秀雄，高松泰子，北村紀子，吉武 彬，宮本純之：
日本農薬学会誌，**11**，533~540 (1986).
- 5) C. Meinard, P. Bruneau and M. Roche: *J. Chromatogr.*,
349, 105~108 (1985).
- 6) S. N. Irving and T. E. M. Fraser: *J. Agric. Food Chem.*,
32, 111~113 (1984).
- 7) L. O. Ruzo and J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.*, **30**,
916~920 (1982).