

## 農産物中フルスルファミドの分析における精製の検討

北山 恭子\*, 永山 敏廣\*, 高野 伊知郎\*, 小林 麻紀\*,  
田村 康宏\*, 富澤 早苗\*, 立石 恭也\*, 木村 奈穂子\*,  
齊藤 和夫\*

### Study on Clean-up for Determination of Flusulfamide in Agricultural Products

Kyoko KITAYAMA\*, Toshihiro NAGAYAMA\*, Ichiro TAKANO\*, Maki KOBAYASHI\*,  
Sanae TOMIZAWA\*, Yasuhiro TAMURA\*, Yukinari TATEISHI\*, Naoko KIMURA\*  
and Kazuo SAITO\*

A simplified determination of flusulfamide in agricultural products by HPLC with a UV detector was investigated.

The sample was homogenized with acetone followed by extraction with ethyl acetate, and the extract was evaporated. The residue was cleaned up with a Silica gel column, Bond Elut® extraction cartridge SAX and PSA. Flusulfamide was analyzed by HPLC with a UV detector (310nm). The HPLC separation was performed on a ABZ column with acetonitrile and 0.3 % acetic acid in 10 mmol/L sodium 1-heptanesulfonate as the mobile phase.

The choice of the silica gel column eluant was important. Using silica gel from Nacalai Tesque Co., flusulfamide was eluted with acetone-*n*-hexane at 1:4, and using silica gel from Wako Co. or Merck Co., flusulfamide was eluted with acetone-*n*-hexane at 2:3.

The recovery of flusulfamide in 6 kinds of agricultural products at the level of 0.01 µg/g was 58.3 ~ 131.2 %.

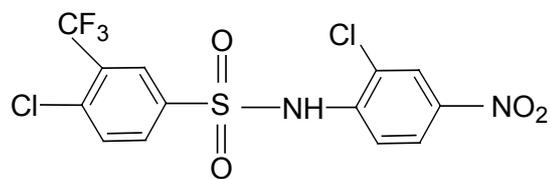
**Keywords:** フルスルファミド flusulfamide, 農産物 agricultural products, 高速液体クロマトグラフ HPLC, 紫外部吸収検出器 UV detector, シリカゲルカラムクロマトグラフィー Silica gel column chromatography

### 緒言

フルスルファミド (Fig.1) は1992年に登録されたスルホンアミド系殺菌剤で, 土壌処理剤としてばれいしょ, かぶ, キャベツなどに使用されている<sup>1)</sup>. 食品衛生法の食品規格に基づき, ばれいしょに0.05 ppm以下, かぶ類の根, 葉, はくさい, キャベツ, カリフラワー, ブロッコリーなどに0.1 ppm以下の残留農薬基準が設定されている<sup>2)</sup>. 厚生労働省及び環境省から告示された従来の試験法は, メタノールで抽出し, ジクロロメタンに転溶, ジアゾメタンでメチル化した後, 電子捕獲型検出器を装着したガスクロマトグラフ (GC-ECD) を用いて測定する方法である<sup>3)4)</sup>. しかし, この方法は, 排水基準が厳しいジクロロメタンを使用し, またメチル化など煩雑な操作が必要である. そこで厚生労働省は分析法の見直しを行い, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いたより簡易な試験法を提案した.

すなわち, ジクロロメタンの代わりに酢酸エチルを使用し, シリカゲルカラムとBond Elut®SAX及びPSAミニカートリッジカラムで精製した後, フルスルファミドを誘導体化することなく直接紫外部吸収検出器 (UV) を装着したHPLCで

測定する方法である. 今回, この試験法について, 操作性, 回収率など種々の検討を加えたところ, 精製のためのカラムに用いるシリカゲルの製造メーカーによって回収率に大きな差が見られることがわかった. そこで, シリカゲルカラムからの溶出条件について各製造メーカー別に最適条件を検討した.



C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 415.2

Fig. 1. Chemical Structure of Flusulfamide

### 実験方法

#### 1. 試料

市販のばれいしょ, ブロッコリー, キャベツ, かぶ(根), はくさい及びカリフラワーを用いた.

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

## 2. 試薬

- 1) フルスルファミド標準液：フルスルファミド(和光純薬工業(株)製)をアセトンに溶解し100 µg/mLの標準原液を作製した。標準原液をアセトンで1µg/mLになるように希釈し、添加回収用標準溶液とした。また、標準原液をアセトニトリルで0.25, 0.5, 1.0, 1.5 µg/mLになるように希釈し、HPLC用標準溶液とした。
- 2) 有機溶媒等：アセトニトリルはHPLC用を、その他の試薬は残留農薬試験用または試薬特級を用いた。
- 3) シリカゲルカラム：Silica gel (100~200 mesh, ナカライテスク(株)製), Silica gel 60 extra pure (particle size 0.063~0.200 mm, メルク社製)及びWakogel C-200 (75~150 µm, 和光純薬工業(株)製)をそれぞれ130°Cで12時間以上活性化し、デシケーター中で放冷した。内径15 mmのカラム管に活性化したシリカゲル10 g, さらにその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを適宜アセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液または同(1:4)混液で充填した。
- 4) SAX-PSAミニカートリッジカラム：Bond Elut® SAX (バリアン社製, 3 mL/500 mg) 及びBond Elut® PSA (バリアン社製, 3 mL/500 mg) を用いた。これらのミニカラムをあらかじめアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液20 mLで洗浄し、SAXの下にPSAを連結して用いた。
- 5) 水：蒸留水をMilli-Q®超純水装置(日本ミリポアリミテッド(株)製)により精製して用いた(比抵抗値18 MΩ·cm以上)。
- 6) 0.3%酢酸：精密分析用酢酸(和光純薬工業(株)製)を水で0.3%に希釈して用いた。
- 7) 10 mmol/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有0.3%酢酸溶液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム(関東化学(株)製) 4.045 gを0.3%酢酸2 Lに溶解した。

## 3. 装置

- 1) HPLC：日本分光(株)製ポンプPU-1580, 紫外吸収検出器UV-1575及びデータ処理装置JASCO-BORWINで構成した。
- 2) 液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)：VG Biotech社製Platform II-LC

## 4. 分析方法

### 1) 試験溶液の調製

細切した試料20 gにアセトン150 mLを加え、ホモジナイザーで5分間(10,000 rpm/min)細砕した後、ろ紙の上にケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたロートを用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残さにアセトン50 mLを加えて軽くかく拌した後、吸引ろ過し、ろ液を合わせ減圧下(40°C以下)で約30 mLに濃縮した。

残留物に酢酸エチル100 mL及び飽和塩化ナトリウム溶液100 mLを加えて5分間激しく振り混ぜた後、酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル50 mLを加え、同様に操作した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで15分間脱水した後、減圧下で濃縮し、通風乾固した。

得られた残留物にアセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液2 mLを加えて溶解した。これをシリカゲルカラム(ナカライテ

スク(株)製シリカゲルを充填)に負荷し、アセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液100 mLで洗浄後、同(1:4)混液100 mLで溶出した。なお、メルク(株)または和光純薬(株)製シリカゲルの場合は抽出残留物をアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液2 mLに溶解してカラムに負荷し、同(1:4)混液100 mLで洗浄後、同(2:3)混液50 mLで溶出した。溶出液は減圧下で溶媒除去した後、残留物をアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液5 mLに溶解し、シリカゲルカラム溶出液とした。

次いで、SAX-PSAミニカートリッジカラムにシリカゲルカラム溶出液を負荷し、アセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液10 mL及びアセトン5 mLで順次洗浄した後、アセトン35 mLで溶出した。溶出液を減圧下で濃縮後、通風乾固し、残留物をアセトニトリル2 mLに溶解して試験溶液とした。

### 2) HPLC測定条件

カラム：SPELCO SIL<sup>TM</sup>LC-ABZ(4.6 mm i. d. ×150 mm, 粒径5 µm, スペルコ社製);カラム温度:40°C;移動相:A液10 mmol/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有0.3%酢酸溶液, B液アセトニトリル, グラジエントプログラムB%:30%(0 min)-(20 min)→100%(15 min)-(1 min)→30%(10 min);流速:1.0 mL/min;検出器:紫外吸収分光光度計(波長:310 nm);注入量:20 µL

### 3) LC/MS測定条件

MS-ionization mode:ESI<sup>-</sup>;ion voltage:-30V

## 結果及び考察

### 1. 試験溶液の調製

厚生労働省より提案された方法について検討した。すなわちアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶した後、シリカゲルカラムで精製(アセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液で洗浄後同(2:3)混液で溶出)し、さらにSAX-PSAミニカートリッジカラムで精製した。この方法を用いて添加回収試験を行ったところ、フルスルファミドはほとんど回収できなかった。フルスルファミドはアセトン1 Lに314 g(25°C)溶けるため<sup>5)</sup>、アセトンを用いた試料からの抽出操作には特に問題はないと考えられた。そこでカラム精製における溶出条件について検討を加え、回収できない原因を調べた。

#### 1) シリカゲルカラムからの溶出条件の検討

シリカゲルカラムからのフルスルファミドの溶出について検討し、その結果をTable 1に示した。

はじめに、カラムの充填剤としてナカライテスク(株)製シリカゲル10 gを用いて検討した。シリカゲルカラムにフルスルファミド1 µg/mLアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液1 mLを負荷し、アセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液100 mLで洗浄後、同(2:3)混液50 mLで溶出した。その結果、フルスルファミドはほとんど回収されず、洗液として用いたアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液にほぼ100%溶出していた。そこで、洗液中のアセトン含量を少なくして、フルスルファミド1 µg/mLアセトン-*n*-ヘキサン(1:19)標準溶液をカラムに負荷し、アセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液100 mL, 同(1:4)混液100 mL, 次いで同(2:3)混液50 mLを順次流下させたところ

ろ、フルスルファミドは(1:4)混液画分にすべて溶出された。また、メルク社製及び和光純薬(株)製シリカゲル10gを用いて同様にフルスルファミド標準溶液を負荷して検討を加えた。これらの場合はアセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液及び同(1:4)混液では溶出されず、アセトン-*n*-ヘキサン(2:3)混液でほぼ100%溶出した。以上のことより、フルスルファミドのシリカゲルカラムからの溶出状況は、その製造メーカーにより異なっており、製造メーカーによりシリカゲルの保持力に違いが見られることがわかった。シリカゲルカラムは本法における回収率に影響を及ぼすことから、試験実施時に必ず溶出位置を確認することが求められる。今回は、ナカライテスク(株)製のシリカゲルを用いることとした。

Table 1. Recovery of Flusulfamide from Silica Gel of Each Manufacture

Manufacture of Silica gel	Recovery <sup>1)</sup> (%)		
	Ratio of acetone- <i>n</i> -hexane		
	1:19 (100mL)	1:4 (100mL)	2:3 (50mL)
Nacalai Tesque	0	102	0
Wako Pure Chemical	0	0	101
Merck	0	0	100

<sup>1)</sup> Average of 2 determinations

2) SAX-PSAミニカートリッジカラムからの溶出条件の検討  
SAX-PSAミニカートリッジカラムからのフルスルファミドの溶出について検討した。フルスルファミド1 µg/mLアセトン-*n*-ヘキサン(1:4)溶液1 mLを負荷し、アセトン-*n*-ヘキサン(1:4)混液10 mL、次いでアセトン5 mL、さらにアセトン35 mLで溶出したところ、フルスルファミドはアセトン35 mLの分画にほとんどすべて溶出した。この溶出パターンはSAX-PSAミニカートリッジカラムのロットを変えても変化しなかった。

2. HPLCによる測定

ODSカラムのSPELCOSEL<sup>TM</sup>LC-ABZを用いて、HPLC用標準溶液1 µg/mL 20 µLを注入して測定したところ、フルスルファミドのピークは約13.1分に検出した。また本法に従い試料抽出液を精製後、妨害ピークの有無を観察した。はくさいにおけるHPLCクロマトグラムをFig. 2に示した。フルスルファミドのピーク付近に特に大きな妨害ピークはなく、本条件で良好に測定できることがわかった。

3. LC/MSによる確認

フルスルファミドの確認方法としてLC/MSによる方法を検討した。イオン化モードESIネガティブ法で測定したところ分子イオンピークm/z 415が得られ(Fig. 3)、LC/MSはフルスルファミドの確認に有用であった。

4. 添加回収試験

あらかじめフルスルファミドが検出されないことを確認したブロッコリー、キャベツ、かぶの根、はくさい及びカリフラワーの各試料20 gに、添加回収用標準溶液(1 µg/mL)

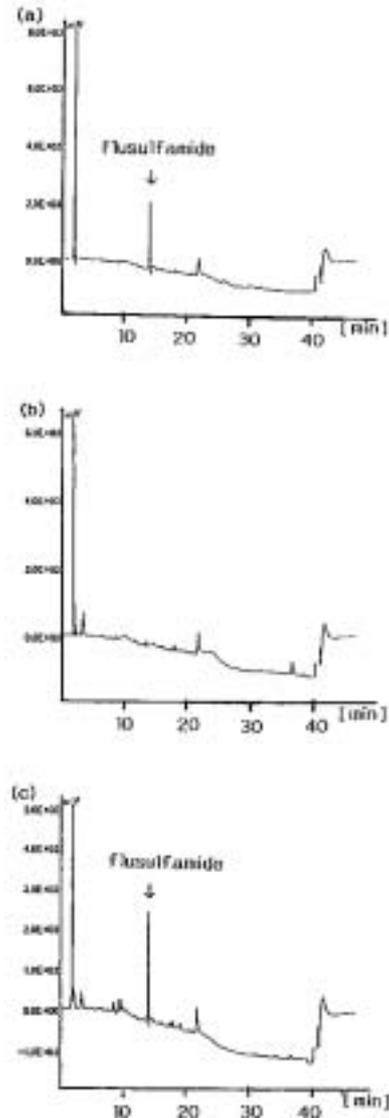


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Chinese Cabbage Extract (a): flusulfamide standard (0.1 µg/g), (b): unspiked sample, (c): spiked sample (flusulfamide 0.1 µg/g)

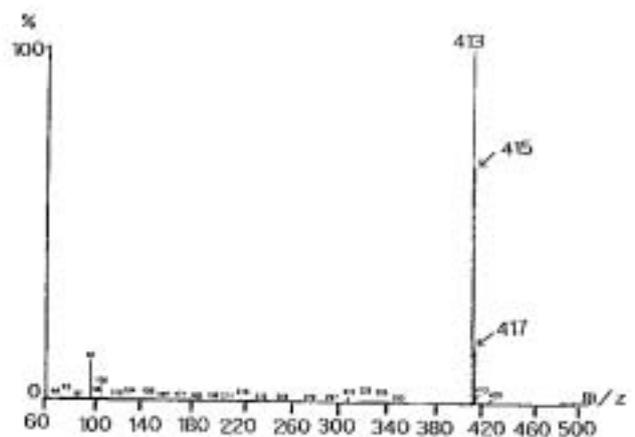


Fig. 3. Mass Spectrum of Flusulfamide by LC/MS Flusulfamide standard solution (2 µg/mL) MS-ionization mode:ESI<sup>-</sup>; cone voltage;-30V

2 mLを添加し（試料中濃度0.1 µg/gに相当）1時間放置後、本法に従い試験した。3回の試行による回収率をTable 2に示した。ばれいしょはフルスルファミドと同じ保持時間にピークを有していたので、同様に処理したブランク試料の当該ピーク面積値を差し引いて回収率を求めた。なお、ばれいしょから得られたHPLCクロマトグラム上のピークがフルスルファミドか否かの確認は今後さらに検討を加える必要があると考える。

回収率は、ばれいしょを除くいずれの農作物でも90%以上と良好な結果であった。ばれいしょは58.3%とやや低かったが、これはフルスルファミドと同じ保持時間に出現したピーク面積値のバラツキによるものと推察される。

Table 2. Recovery of Flusulfamide from Agricultural Products Spiked at the Level of 0.1 µg/mL

Sample	Recovery <sup>1)</sup> (%)
Potato	58.3 ± 33.5 <sup>2)</sup>
Broccoli	131.3 ± 29.2
Cabbage	99.2 ± 9.2
Turnip (root)	104.9 ± 6.5
Chinese cabbage	119.3 ± 1.9
Cauliflower	91.4 ± 1.5

<sup>1)</sup> Average ± standard deviation (n=3)

<sup>2)</sup> Value after deduction for blank

### ま と め

HPLCによるフルスルファミド分析における精製について検討した。農作物中のフルスルファミドを抽出後、シリカ

ゲルカラム、SAX及びPSAミニカートリッジカラムで精製したところ、HPLC (UV:検出波長310nm) で精度良く測定できた。精製において溶出条件をナカライテスク (株) 製ではアセトン-*n*-ヘキサン(1:19)混液で洗浄後、同(1:4)混液で溶出、他の2社製では同(1:4)混液で洗浄後、同(2:3)混液で溶出することにより十分な効果が得られることが分かった。試料中濃度を0.1 µg/mLになるように添加したときの回収率は58.3%~131.3%であった。なお本法による検出限界は0.01 ppmであった。

本法は、従来法と比べてより簡便で精度良く農作物中のフルスルファミドを測定できることから、実用上十分使用できる方法であると考えられる。

(本研究は国立医薬品食品衛生研究所の委託により実施した。)

### 文 献

- 1) 農薬ハンドブック2001年版編集委員会：農薬ハンドブック2001年版, 302, 2001, 社団法人日本植物防疫協会, 東京.
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：残留農薬基準便覧, 296, 1999 (社) 日本食品衛生協会, 東京.
- 3) 厚生省告示：第221号平成8年9月8日.
- 4) 「今月の農薬」編集室：改訂3版 農薬登録保留基準ハンドブック作物水質残留基準と試験法, 738-741, 1998, 化学工業日報社, 東京.
- 5) 上杉康彦, 上路雅子, 腰岡政二編：第3版最新農薬データブック, 195, 1997, ソフトサイエンス社, 東京.