

高速液体クロマトグラフィーによる 農産物中の残留ジウロンの試験方法

藤本 和司¹・木内 佳伸²

Analytical Method for Residual Diuron in Agricultural Products by High Performance Liquid Chromatography

Kazushi FUJIMOTO and Yoshinobu KIUCHI

農産物中に残留する尿素系除草剤ジウロン (DCMU) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による試験方法について検討した。

試料からのジウロンの抽出及び精製は、登録保留基準の方法に準拠したが、転溶溶媒には20% クロロメタン/n-ヘキサンを用いた。フロリジルカラムによる精製後、HPLC-UV法 (測定波長250 nm) でジウロンを測定した。

本法による穀類、野菜、果実等の農産物13種類を用いた添加回収実験の結果、0.1 ppmレベルでの回収率は85~98%であった。また、定量下限は0.02 ppmであった。

Key Words: ジウロン diuron, DCMU, 除草剤 herbicide, 農産物 agricultural products, 高速液体クロマトグラフィー High Performance Liquid Chromatography, HPLC

I はじめに

現在、厚生省は食品衛生法における農薬残留基準の改正作業中で、平成8年3月末現在での基準設定農薬は108種類に増加しており、更に平成8年度中に31農薬に新基準を設定する予定である。厚生省は、各種農産物における農薬残留実態を把握し、新規基準を定めるための資料とするため、全国の自治体の研究機関及び日本食品衛生協会に対して委託調査を実施しており、当所も平成4年度から参加している。

平成6年度の当所の担当農薬の1つはジウロンで、推奨分析法である登録保留基準の試験方法¹⁾は、ジウロンをN-メチル化し、GC-NPDで検出する方法である。しかし、指定された誘導体化は、水素化ナトリウムを用い、激しい反応を伴うため、通常のルーチン検査には不向きである。他のメチル化法も試みたが、反応しなかったため、直接ジウロンを検出できるHPLC-UV法²⁾を検討したところ、若干の知見を得たので報告する。

II 試験方法

1. 試料

試験方法の検討のために以下の試料を用いた。

- ・穀類：玄米、小麦、大麦、とうもろこしの4種
- ・野菜：ばれいしょ (冷凍品)、アスパラガスの2種
- ・果実：レモン、オレンジ、グレープフルーツ、りんご、いちご、パイナップルの6種
- ・茶：緑茶

2. 試薬

・ジウロン標準品：Riedel-de Haën No.45463 Diuron PESTANALを用いた。

・標準原液：標準品5.0 mgを精秤し、エタノールに溶解し、25.0 mlとした (200 ppm)。

・標準溶液：標準原液を適宜アセトニトリルまたはn-ヘキサン (以下「ヘキサン」) /エタノール (9:1) で希釈して用いた。

・飽和食塩水：特級塩化ナトリウムを蒸留水に溶かして飽和食塩水を調製し、ヘキサンで洗浄して用いた。

・無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製、残留農薬試験用を用いた。

・塩化ナトリウム：関東化学(株)製、残留農薬試験用を用いた。

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

2. 福岡市衛生試験所 理化学課

(現所属：福岡市博多保健所 衛生課)

いた。

・凝固液：塩化アンモニウム 2 g 及びりん酸 4 ml を蒸留水 400 ml に溶解したものをを用いた。

・フロリジル：Floridin Co. 製， Florisil 60～100 mesh Lot No. TWQ 6871 を 450℃ で 1 夜加熱処理したものを，使用前に 130℃ で 2 時間加熱し，デシケーターで 1 時間放冷後使用した。

・フロリジルカラム：内径 10 mm，長さ 150 mm のカラム管にフロリジル 3 g を 15% アセトン／ヘキサンを用いて湿式充填し，無水硫酸ナトリウム 1 g を積層し，15% アセトン／ヘキサン 15 ml で洗浄後使用した。

・ヘキサン，アセトン，ジクロロメタン，エタノール：和光純薬工業(株)製，残留農薬試験用 Grade 300 を用いた。

・アセトニトリル：HPLC 移動相の調製には関東化学(株)製，高速液体クロマトグラフィー用を，その他は和光純薬工業(株)製，残留農薬試験用アセトニトリル 300 を用いた。

・その他の試薬類は，和光純薬工業(株)製の特級品を用いた。

3. 器具及び装置

・粉碎器：(株)象印マホービン製，ミル&ミキサー BM E-02 型

・調理用電動カッター：松下電機産業(株)製，MK-K 3 型

・振とう機：イワキ産業(株)製，V-DX 型

・遠心分離機：Beckman CPK Centrifuge

・ロータリエバポレータ：東京理科器械(株)製，N-4 型

・分光光度計：島津製作所(株)製，UV-240

・高速液体クロマトグラフ（逆相）

送液ポンプ：島津製作所(株)製，LC-5 A

紫外検出器：島津製作所(株)製，SPD-6 A

インジェクター：RHEODYNE 7125

記録計：理化電機(株)製，R-22 型

・高速液体クロマトグラフ（順相）

送液ポンプ：Waters 製，510 型

紫外検出器：Waters 製，490 型

インジェクター：RHEODYNE 7125

記録計：日本電子科学(株)製，

UNICORDER U-329

4. 試験溶液の調整

1) 抽出

果実及び野菜は，粉碎試料 20 g にアセトンを加えて 60 ml とし，1 夜放置後，20% ジクロロメタン／ヘキサン 30 ml × 2 で抽出し，溶媒層を飽和食塩水 10 ml で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで脱水した。柑橘類は，A)

アセトニトリル－ヘキサン分配後，B) 凝固法による精製を行い，溶媒を減圧下で留去し，残留物を 15% アセトン／ヘキサン 4 ml に溶解し，抽出液とした。

穀類は，粉碎試料 20 g に 30% 含水アセトン 120 ml を加え，1 夜放置後，20% ジクロロメタン／ヘキサン 60 ml × 2 で抽出し，溶媒層を飽和食塩水 20 ml で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで脱水した。その後，A) アセトニトリル－ヘキサン分配を行い，溶媒を減圧下で留去し，残留物を 15% アセトン／ヘキサン 4 ml に溶解し，抽出液とした。

茶は，検体 9 g を 100℃ の水 540 ml に浸し，5 分間放置後，ろ過した。冷後ろ液 360 ml を採り，飽和酢酸鉛溶液 2 ml を加えて攪拌，ろ過し，残渣をアセトン／水（1：1）50 ml で洗浄，ろ過し，ろ液を合わせ，ろ液からエーテル／ヘキサン（1：1）100 ml × 2 で抽出し，溶媒層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧下で留去し，残留物を 15% アセトン／ヘキサン 4 ml に溶解し，抽出液とした。

A) アセトニトリル－ヘキサン分配

穀類及び柑橘果実等脂質を多く含有する試料に適用した。

溶媒を減圧下で留去し，残留物をアセトニトリル飽和ヘキサン 10 ml に溶解し，ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml × 2 で抽出し，抽出液を合わせ，アセトニトリル飽和ヘキサン 10 ml で洗浄した。

B) 凝固法

柑橘果実に適用した。

溶媒を減圧下で留去し，残留物をアセトン 10 ml に溶解した。この液に凝固液 50 ml 及びケイソウ土 2 g を加え攪拌し，5 分後にろ紙ろ過し，残渣をアセトン／凝固液（1：5）50 ml で洗浄，ろ過した。ろ液をジクロロメタン 50 ml × 2 で抽出し，無水硫酸ナトリウムで脱水した。

2) 精製

フロリジルカラムに，抽出液の 2 ml を負荷し，15% アセトン／ヘキサン 15 ml で洗浄後，25% アセトン／ヘキサン 12 ml でジウロンを溶出した。この溶出液の溶媒を減圧下で留去し，残留物をアセトニトリル（逆相）または 9% エタノール／ヘキサン（順相）1 ml に溶解し，HPLC 用試験溶液とした。

3) 測定

表 1 に示す HPLC 条件でジウロンの定性，定量を行った。柑橘類は順相系で，それ以外の作物は逆相系で測定した。

試験操作のフローシートを図 1～3 に示す。

表1 ジウロン測定のためのHPLC条件

条 件 I (逆相)	
移動相	アセトニトリル/水 (45:55), 0.6 ml/min
カラム	Inertsil ODS-2, 5 μm, 4.6 φ × 150 mm
注入量	10 μl
検出条件	UV 250 nm, 0.01 AUFS
条 件 II (順相)	
移動相	9%エタノール/ヘキサン, 1.2 ml/min
カラム	Unisil Q NH2, 5 μm, 4.6 φ × 250 mm
注入量	30 μl
検出条件	UV 250 nm, 0.01 AUFS

[野菜・果実]

粉碎試料 20 g
 ↓
 アセトンで 60 ml に定容し, 1 夜放置
 ↓
 20%ジクロロメタン/ヘキサン 30 ml × 2 で抽出
 ↓
 飽和食塩水 10 ml で洗浄
 ↓
 無水硫酸ナトリウムで脱水
 ↓
 アセトニトリル-ヘキサン分配^{A)}
 ↓
 凝固法による精製^{B)}
 ↓
 溶媒を減圧下で留去し, 残留物を 15%アセトン/ヘキサン 4 ml に溶解
 ↓
 フロリジルカラムクロマトグラフィー
 負荷: 試料 10 g 相当 (2 ml)
 洗浄: 15%アセトン/ヘキサン 15 ml
 溶出: 25%アセトン/ヘキサン 12 ml
 ↓
 溶出液の溶媒を減圧下で留去し, 残留物をアセトニトリル (逆相) または 10%エタノール/ヘキサン (順相) 1 ml に溶解
 ↓
 HPLCにより定性, 定量

図1 ジウロンの試験方法 (野菜・果実)

III 結果と考察

1. 測定条件の検討

1) 前処理方法の検討

登録保留基準の試験方法では, 抽出, 精製後, N-メチル化, GC-NPDによる測定が採用されている. HPLC-UVによる測定では検出器の選択性が弱く, 前処

[穀類・豆類]

粉碎試料 20 g
 ↓
 30%含水アセトン 120 ml を加え, 1 夜放置
 ↓
 20%ジクロロメタン/ヘキサン 60 ml × 2 で抽出
 ↓
 飽和食塩水 20 ml で洗浄
 ↓
 無水硫酸ナトリウムで脱水
 ↓
 アセトニトリル-ヘキサン分配^{A)}
 ↓
 溶媒を減圧下で留去し, 残留物を 15%アセトン/ヘキサン 4 ml に溶解
 ↓
 以下, 野菜及び果実と同様に処理し, HPLCにより定性, 定量

図2 ジウロンの試験方法 (穀類・豆類)

[茶]

茶 9 g
 ↓
 100℃の水 540 ml を加え, 5 分放置後ろ紙ろ過し, 放冷
 ↓
 ろ液 360 ml (試料 6 g 相当) を分取し, 飽和酢酸鉛溶液 2 ml を加え攪拌
 ↓
 吸引ろ過し, 残渣をアセトン/水 (1:1) 50 ml で洗浄, ろ過
 ↓
 エーテル/ヘキサン (1:1) 100 ml × 2 で抽出
 ↓
 無水硫酸ナトリウムで脱水
 ↓
 溶媒を減圧下で留去し, 残留物を 15%アセトン/ヘキサン 4 ml に溶解
 ↓
 以下, 野菜及び果実と同様に処理し (カラム負荷: 試料 3 g 相当), HPLCにより定性, 定量

図3 ジウロンの試験方法 (茶)

理で十分精製する必要があるが, 別の精製法の採用・追加は操作の煩雑化を伴い, 好ましくない. そこで, フロリジルカラムクロマトグラフィー条件の再検討を行った.

使用したフロリジルのジウロン溶出パターンを図4に示す. フロリジル 3 g に負荷したジウロンは指定された洗浄条件である 5%アセトン/ヘキサンでは全く溶出しなかった. また, 15%アセトン/ヘキサンで溶出しても最初の 15 ml では溶出せず, その後徐々に溶出したが, 速度が遅く, 90%以上溶出するのに 50 ml を要した. 溶出液を 25%アセトン/ヘキサンに変更するとジウロン

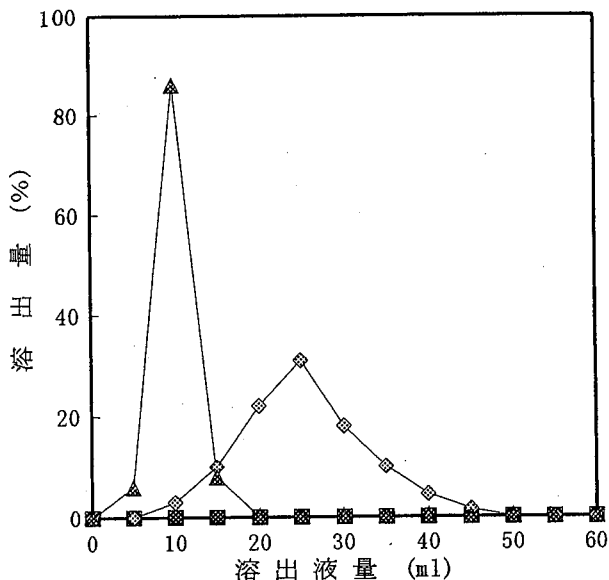


図4 フロリジルカラムからのジウロンの溶出
 -■-5%, -◇-15%, -▲-25%アセトン/ヘキサン
 負荷 ジウロン0.2 μg/フロリジル3g

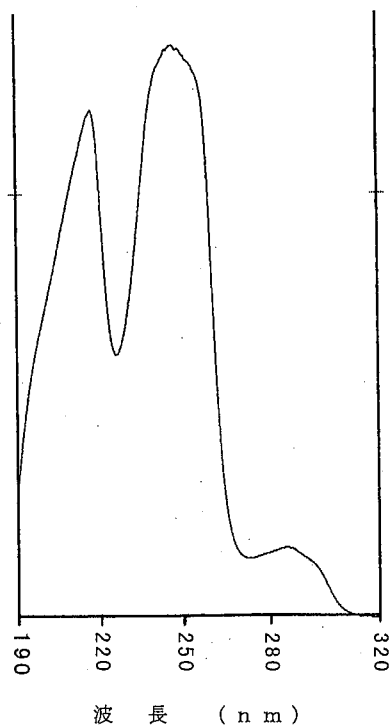


図5 ジウロンのUV吸収スペクトル

が適度な速度で溶出した。そこで、カラム処理条件を15%アセトン/ヘキサン15 mlによる洗浄後、25%アセトン/ヘキサン12 mlで溶出することとした。

2) 測定波長

ジウロンのHPLCによる測定条件²⁾では、測定波長として254 nmが示されている。ジウロンのUV吸収スペクトル(図5)によると、吸収極大波長は246 nm付近にあるため、測定波長を250 nmとした。

3) HPLC条件の検討

文献では分離カラムにODS, 移動相に水/メタノール系を用いる逆相系が示されている。そこで、まず穀類について逆相系における分離条件の検討を行った。

カラムにジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-2 4.6 mm id×150 mmを用い、移動相としては当所で合成抗菌剤等に繁用しているアセトニトリル/水系で検討したところ、表1に示す測定条件Iで良好なクロマトグラムが得られた。この条件における検量線を図6に、標準液のクロマトグラムを図7-Aに示す。

本条件による小麦及び玄米の測定チャートを図8、9に示す。小麦では、ジウロンの近傍には妨害となるピークは存在せず、ジウロンのピークの後にもほとんどピークが存在しておらず、本法による精製で十分であった。また、登録保留基準の試験方法の定量下限値0.02 ppmにおいても十分なS/N比が得られた。しかし、玄米では、図9に示したようにジウロンの近傍に他成分と思われる小ピークが存在し、若干定量の妨げとなったが、定量下限の0.02 ppmの確認は可能であった。野菜、柑橘

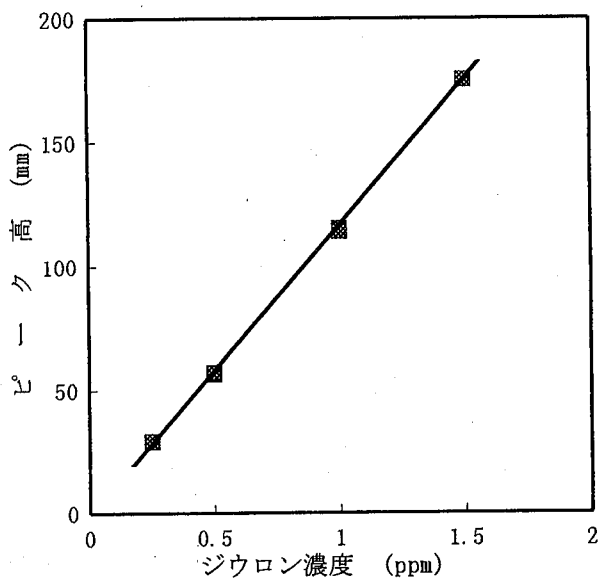


図6 ジウロンの検量線の一例
 逆相系, 測定条件I

類以外の果実、茶も同様に測定可能であった。

柑橘類果実のレモンについて同様に逆相系で測定したところ、図10に示すように多数の大きな妨害ピークが存在し、定量できなかった。そこで、順相系での測定条件の検討を行った。カラムにジーエルサイエンス社製 Unisil Q NH₂を、移動相に9%エタノール/ヘキサンを用いることにより、良好なクロマトグラムが得られ

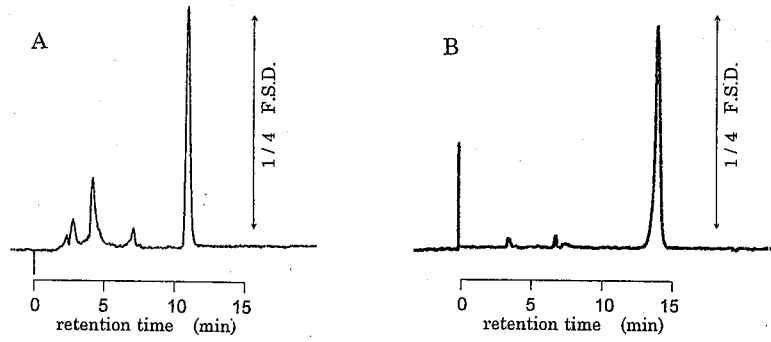


図7 ジウロン標準液のHPLCクロマトグラム
A, 逆相系 0.5 ppm 10 μ l : B, 順相系 1 ppm 10 μ l

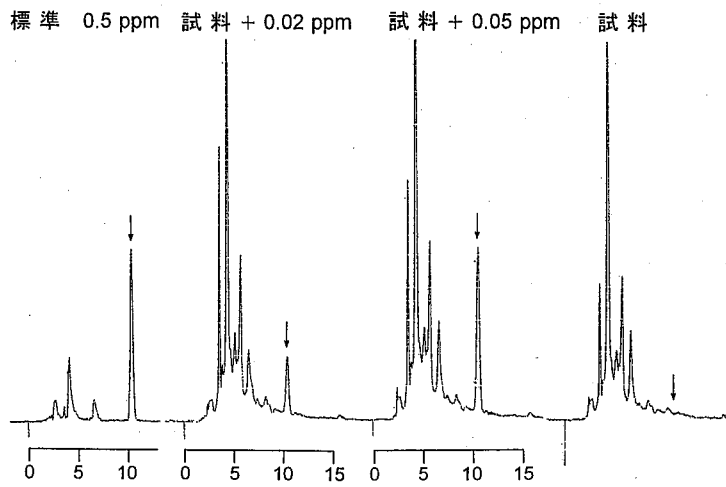


図8 小麦のジウロンのHPLC (逆相) クロマトグラム

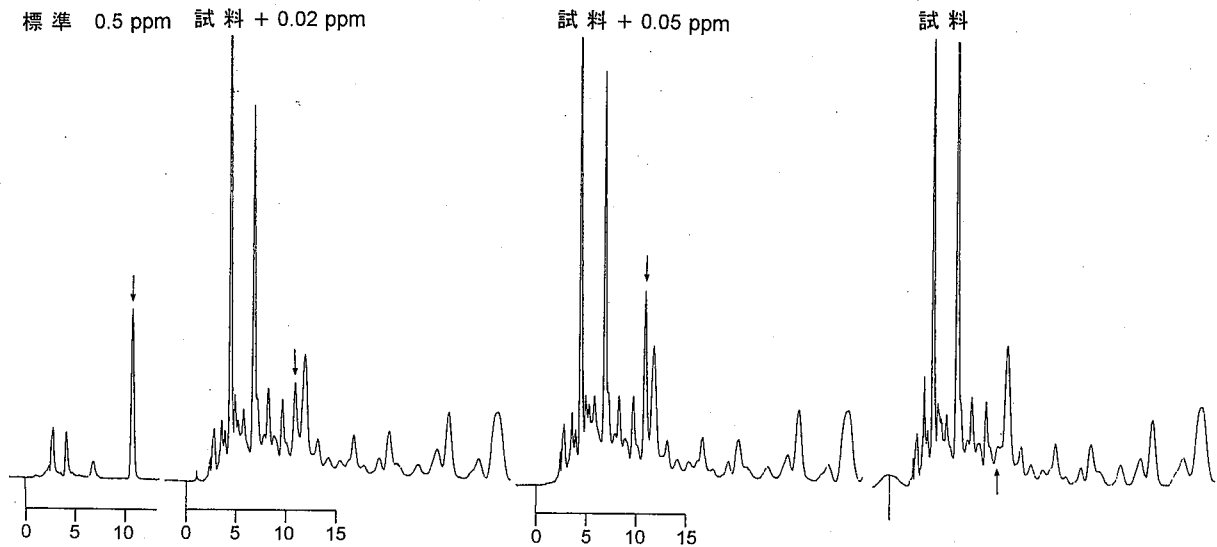


図9 玄米のジウロンのHPLC (逆相) クロマトグラム

た。測定条件を表1に、標準液のクロマトグラムを図7-Bに、レモンのクロマトグラムを図11に示す。若干妨害ピークが残存したが、ジウロンのピークと分離でき、定量が可能となった。また、その他の作物でジウロンが検出された場合の確認法としても活用できた。

表2 HPLC法によるジウロンの添加回収実験結果

農産物名	添加濃度 ppm	回収率 %
玄米	0.02	88
	0.05	91
小麦	0.02	85
	0.05	95
大麦	0.05	96
	0.05	85
とうもろこし	0.05	88
ばれいしょ	0.05	90
アスパラガス	0.05	94
レモン	0.05	93
オレンジ	0.05	94
グレープフルーツ	0.05	94
りんご	0.05	89
いちご	0.05	93
パイナップル	0.05	90
緑茶	0.167	98

2. 添加回収実験

本法に従い、穀類4種、野菜2種、果実6種及び茶の計13種類の農産物を用い、添加回収実験を行い、表2に示す結果を得た。添加濃度を登録保留基準である0.05 ppm及び一部本法の定量下限である0.02 ppmとしたときの回収率は85～98%であり、十分満足できる結果であった。なお、柑橘果実類に関しては順相系で測定した結果を用いた。

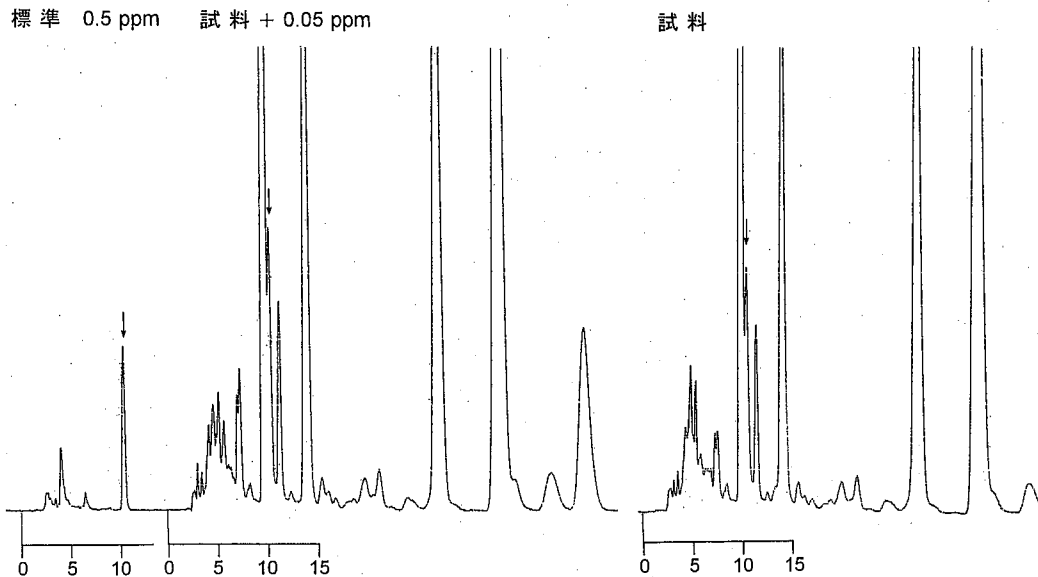


図10 レモンのジウロンのHPLC (逆相) クロマトグラム

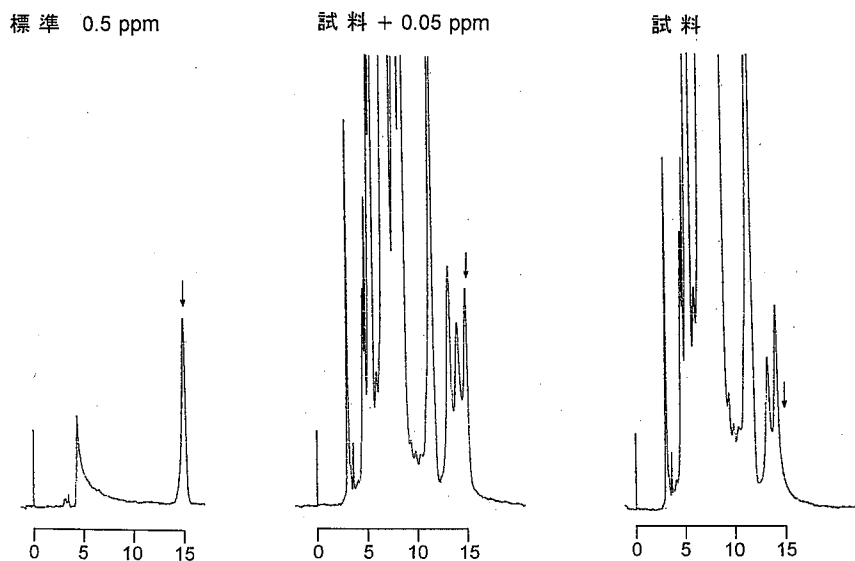


図11 レモンのジウロンのHPLC (順相) クロマトグラム

文 献

- 1) 農薬環境保全対策研究会編：農薬登録保留基準ハンドブック，139，化学工業日報社，1990
- 2) 後藤真康，加藤誠哉著：増補残留農薬分析法，239，ソフトサイエンス社，1987