

# HPLCによる玄米,小麦,大豆中のテフルベンズロン,メタベンズチアズロン,ルフェヌロン及びアゾキシストロビンの分析法の検討

西田政司<sup>1</sup>

## Analysis of Teflubenzuron , Methabenzthiazuron , Lufenuron and Azoxystrobin in Brown Rice , Wheat and Soybean by HPLC

Seiji NISHIDA

### Summary

A simple and rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) determination of Teflubenzuron , Methabenzthiazuron, Lufenuron and Azoxystrobin in brown rice , wheat and soybean was developed . The pesticides were extracted from samples with acetonitrile . The fats in the extract were partitioned between acetonitrile and hexane . The acetonitrile layer was evaporated to dryness . The residue was dissolved in 6% ether-hexane , then was applied to NH<sub>2</sub> and Floridil cartridge column .

The pesticides were eluted with 20% acetone-hexane . The residue was dissolved with methanol 1mL and detected to HPLC with a UV detector at 260nm . The HPLC separation was carried out on a Inertsil<sup>®</sup> Ph-3 column (250nm × 4.6mm i.d. , 5 μm) with acetonitril-methanol-water (2:4:3) as the mobile phase at a flow rate of 1.0mL/min . The recoveries of the pesticides from the Agricultural products at the level of 0.05 , 0.1 μg/g were 39 ~ 78% , RSD were 1.1 ~ 9.1% .

Key Words : テフルベンズロン Teflubenzuron, メタベンズチアズロン Methabenzthiazuron, ルフェヌロン Lufenuron, アゾキシストロビン Azoxystrobin , 高速液体クロマトグラフ HPLC , 玄米 Brown rice , 小麦 Wheat , 大豆 Been

### はじめに

農産物中の農薬の残留基準は年々増加し,平成14年4月現在217農薬に基準が設けられている。当所ではGCで検査可能な116項目について一斉に抽出,精製をおこない,FPD,ECD,NPD-GCで系統分析をおこなっているが<sup>1-5)</sup>,GCによる測定が困難な農薬については主にHPLCで測定している<sup>6-8)</sup>。

しかしHPLCでの検査の多くは選択性が低いUVで測定するため,一斉に多項目を分析するのは難しい。

個別分析法は一斉分析法に比べ精度や正確さは高くなるが,人手と時間とコストがかかるため効率的ではない。

そこで今回は当所においてGCで行っている系統分析法で農産物から抽出して得られる試料溶液を利用して第8次改正農薬のメタベンズチアズロン,テフルベンズロン<sup>9)</sup>,第10次改正農薬のルフェヌロン<sup>10)</sup>,第11次改正農薬アゾキシストロビン<sup>11)</sup>について極力時間をかけず

にHPLCで測定する方法を玄米,小麦,大豆で検討した。

### 方法

#### 1 試薬

・標準試薬:メタベンズチアズロン,テフルベンズロンは和光純薬工業(株),ルフェヌロンはRiedel-de Haen,アゾキシストロビンはDr.Ehrenstorfer GmbH製を使用した。Fig.1に各農薬の構造式を示す。

・アセトニトリル,アセトン,ヘキサン,ジエチルエーテル,メタノール:市販の残留農薬用試薬(300)を使用した。

・メタベンズチアズロン,ルフェヌロン,アゾキシストロビン標準原液:農薬20μgを精秤し,メタノールで20mLに定容し,1000mg/L標準原液とした。

・テフルベンズロン標準原液:農薬20μgを精秤し,アセトニトリルで20mLに定容し,1000mg/L標準原液とした。

1. 福岡市保健環境研究所 衛生化学部門

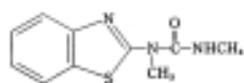
・農薬混合標準液：メタベンズチアズロン標準原液 0.1mL, その他の農薬標準原液 0.2mL をとり, メタノールで 10mL に定容し, 10mg/L 及び 20mg/L 混合標準液とした。

・分画検討用農薬混合標準液：農薬混合標準液 0.5mL を乾固し, 6%エチルエーテル-ヘキサンで 30mL に定容し, カートリッジカラムによる分画用農薬混合標準液とした。

・NH<sub>2</sub>カートリッジカラム：VARIAN, BOND ELUT<sup>®</sup> ZIP PAK NH<sub>2</sub>(500mg)

・フロリジル(FLO)カートリッジカラム：WATERS Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Florisil(1g)

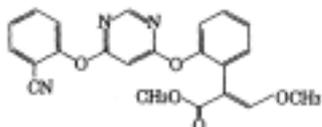
1) Methabenzthiazuron  
(Herbicide)



2) Teflubenzuron  
(Insecticide)



3) Azoxystobin  
(Germicide)



4) Lufenuron  
(insecticide)

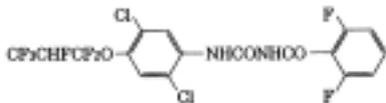


Fig.1 Chemical structure of pesticides

## 2 機器及び運転条件

1) 高速液体クロマトグラフ

ポンプ：WATERS 510,

検出器：WATERS<sup>™</sup> 486,

オートインジェクター：JASCO AS-950,

レコーダー：JASCO 801-IT,

恒温槽：スガイケミー(株) U 620

2) 運転条件

カラム：Inertsil Ph-3( i.d.4.6mm × 250mm,5 μm),

波長：255nm,

カラム温度：40 ,

流量：1.0mL/min.,

注入量：10 μL,

移動相：アセトニトリル-メタノール-水(2:4:3)

## 3 検査方法

1) GC による迅速分析法の抽出・アセトニトリル/ヘキサン分配後の試料溶液調整

試料 20g にアセトニトリル 80mL を加え一夜放置後 30 分間振とうし, アセトニトリル層を分取, 残渣をアセトニトリル 10mL で数回洗い, 洗液を加え 120mL に定容した。これにアセトニトリル飽和ヘキサン 40mL を加え 30 分間振とう後, アセトニトリル層を 40 以下で濃縮・乾固し, 6%ジエチルエーテル-ヘキサン 10mL で溶解して GC・HPLC 精製用溶液とした。

2) 50% アセトニトリル-水/ヘキサン分配

GC・HPLC 精製用溶液 4mL を 10mL 容遠沈管に分取し濃縮・乾固した。これを 50% アセトニトリル-水 4mL で溶解し, アセトニトリル飽和ヘキサン 2mL を加え, 1 分間振とう後, 3000rpm で 10 分間遠心分離し, アセトニトリル-水層 3mL を 50mL 容ナシ型フラスコに分取し, 45 以下で濃縮・乾固後, 35% ジエチルエーテル-ヘキサン 3mL に溶解し, ミニカラム負荷用溶液とした。

3) ミニカラムによる精製

NH<sub>2</sub>と FLO カートリッジカラムを連結し, 20%アセトン-ヘキサン 10mL, 35%ジエチルエーテル-ヘキサン 10mL でコンディショニングした。

NH<sub>2</sub>-FLO カートリッジカラムにミニカラム負荷用溶液 2.5mL を負荷し, 35%ジエチルエーテル-ヘキサン 15mL で洗浄後, 20%アセトン-ヘキサン 10mL で溶出した。次に NH<sub>2</sub>カートリッジカラムをはずし, FLO カートリッジカラムを 20%アセトン-ヘキサン 10mL で溶出した。20%アセトン-ヘキサン溶出液を合わせて乾固し, メタノールで 1mL に定容し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過後, ろ液(HPLC 用試料)10 μl を HPLC に負荷した。

## 結果と考察

### 1 分離カラムと移動相の検討

告示法では 4 農薬ともオクタデシル化シリカゲル(ODS)カラムにアセトニトリル-水(9:11)~(7:3)の移動相を流して分離している。そこでこれらの条件で分離条件を検討したが, 移動相をアセトニトリル-水にしたときはメタベンズチアズロンとアゾキシストロピンが分離しなかった。

次にアセトニトリル-メタノール-水で分離を検討したところ, メタベンズチアズロンとアゾキシストロピンは分離したが, 保持時間が早く, ルフェヌロンが遅いため 4 農薬をグラジエントせず同時に測定するには約 40 分を要し, テフルベンズロン, ルフェヌロンの感度が低くなった。

ODS よりも保持力が弱いフェニル化シリカゲル(Ph)カラムで分離を検討した。テフルベンズロンとアゾキシ

ストロピンの分離が悪かったが、アセトニトリル-メタノール-水(2:4:3)で4農薬を約10分で分離することができた。

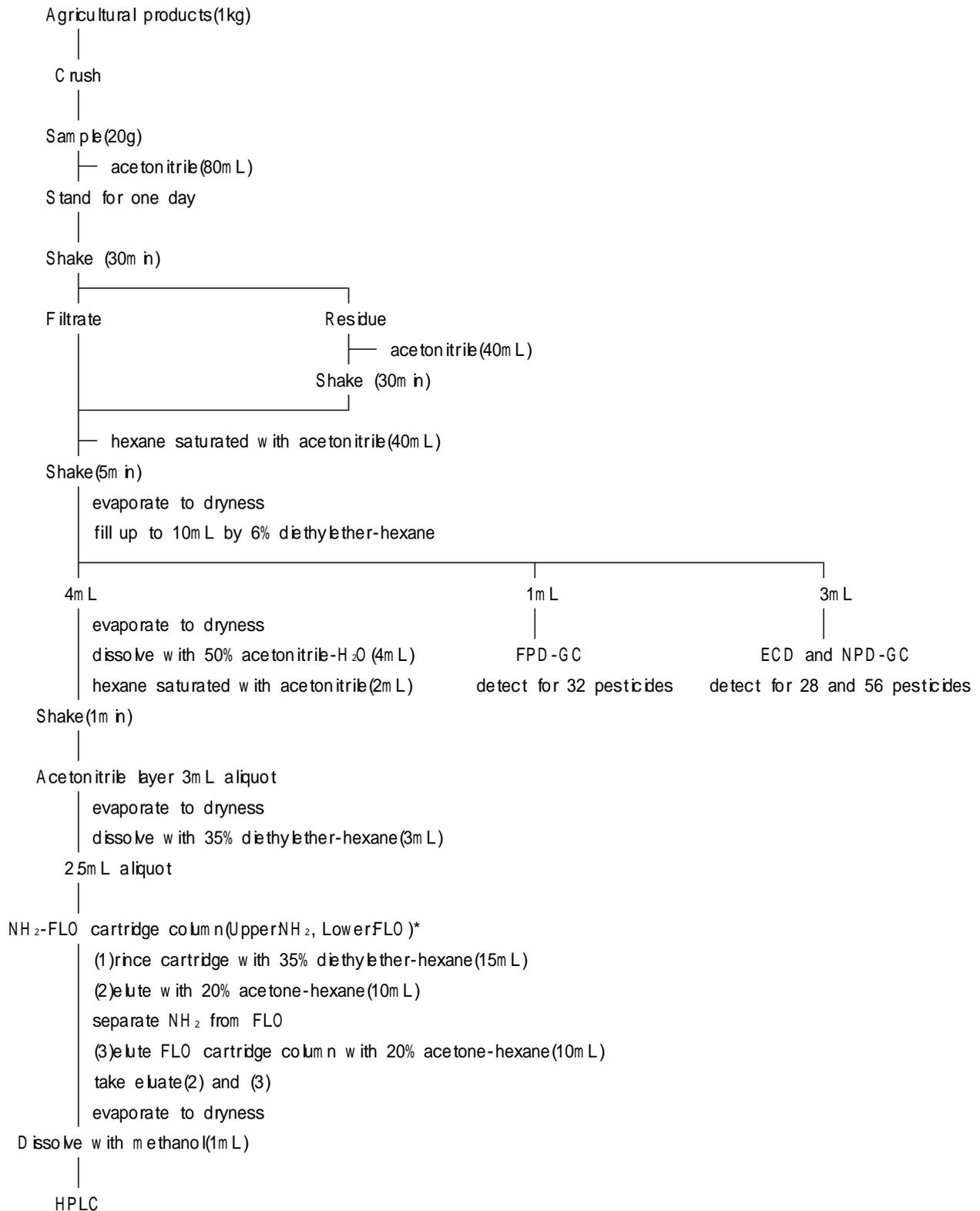


Fig2 Analytical procedure for methabenzthiazuron ,Teflubenzuron ,Azoxystrobin and Lufenuron in agricultural products  
\*conditioned by 20% acetone-hexane 10m L and 35% diethylether-hexane 15m L

## 2 カートリッジカラムによる分画

農産物由来のマトリックスの影響を除去するために NH<sub>2</sub> 及び FLO カートリッジカラムによる精製法を検討した。

### 1) NH<sub>2</sub>カートリッジカラムによる精製

NH<sub>2</sub>カートリッジカラムに分画検討用農薬混合標準液 3mL を負荷し、40%、35%、30%、25%ジエチルエーテル-ヘキサンで 5mL ずつ 20mL を溶出させた。

NH<sub>2</sub>カートリッジカラムからの溶出状況を Table1 に示す。メタベンズチアズロンは最初の 5mL を含め、すべての画分に溶出した。テフルベンズロン、ルフェヌロンは 40%ジエチルエーテル-ヘキサンでは 10 ~ 20mL の範囲、35%ジエチルエーテル-ヘキサンでは 15 ~ 20mL の範囲で溶出した。アゾキシストロピンは 40%ジエチルエーテル-ヘキサンの 5 ~ 20mL の範囲で溶出した。

### 2) FLOカートリッジカラムによる精製

NH<sub>2</sub>カートリッジカラムと同様に分画検討用農薬混合標準液 3mL を負荷し、40%、35%、30%、25%ジエチルエーテル-ヘキサンで 5mL ずつ 20mL を溶出させた。FLO カートリッジカラムからの溶出状況を Table2 に示す。メタベンズチアズロンとアゾキシストロピンはすべての画分に溶出しなかった。テフルベンズロンとルフェヌロンは 25%ジエチルエーテル-ヘキサンでは 0 ~ 10mL には溶出しなかったが、10 ~ 20mL の範囲で溶出した。30%ジエチルエーテル-ヘキサンではテフルベンズロンが 5 ~ 20mL、ルフェヌロンはすべての画分に溶出した。

Table1, 2 の結果から NH<sub>2</sub>と FLO カートリッジカラムを連結した場合の洗浄溶液は 35%ジエチルエーテル-ヘキサン 15mL が適当と判断された。

### 3) NH<sub>2</sub>-FLOカートリッジカラムからの溶出

連結した NH<sub>2</sub>と FLO カートリッジカラムに分画検討用農薬混合標準液 3mL を負荷し、8、12、15、17 及び 20%アセトン-ヘキサンで 5mL ずつ 20mL を溶出させた。

NH<sub>2</sub>-FLO カートリッジカラムからの溶出状況を Table 3 に示す。アゾキシストロピンの溶出が悪かったが、20%アセトン-ヘキサンでほぼ全量溶出した。したがって溶出溶液は 20%アセトン-ヘキサン 20mL が適当であると判断された。

次に NH<sub>2</sub>カートリッジカラムに分画検討用農薬混合標準液 3mL を負荷し、20%アセトン-ヘキサンで 5mL ずつ 20mL まで溶出させた。NH<sub>2</sub>カートリッジカラムからの溶出状況を Table4 に示す。4 農薬とも 10mL までに全て溶出した。

したがって連結した NH<sub>2</sub>と FLO カートリッジカラムから溶出させるとき、最初の 20%アセトン-ヘキサン

Table1 Effect of Volume of Diethyl ether-Hexane Solvents Eluent on 1 µg of Pesticides were added in NH<sub>2</sub>-Cartridge Column

Eluent (Diethyl ether-Hexane)	Range of Eluent(mL)	Rate of Elution(%)			
		Meta	Teflu	As	
40:60	0~5	13	0	0	0
	5~				
	10~15	33	5	21	8
35:65	15~20	25	18	33	21
	0~5	5	0		
	5~				
30:70	10~15	44	0	0	0
	15~20	33	2	0	2
	0~5	5	0		
25:75	5~				
	10~15	33	0	0	0
	15~20	28	0	0	0
20:80	0~5	3	0		
	5~				
	10~15	28			
15:85	15~20	30	0	0	0
	0~5				
	5~				

\*Meta: Metabenzothiazuron  
Teflu: Tebufenprozin  
As: Azoxystrobin

Table2 Effect of Volume of Diethyl ether-Hexane Solvents Eluent on 1 µg of Pesticides were added in FLO-Cartridge Column

Eluent (Diethyl ether-Hexane)	Range of Eluent(mL)	Rate of Elution(%)			
		Meta	Teflu	As	
40:60	0~5	0	8	0	39
	5~10	0	11	0	41
	10~15	0	12	0	31
	15~20	0	11	0	14
35:65	0~5	0	8	0	44
	5~				
	10~15	0	8		
	15~20	0	8	0	5
30:70	0~5	0	0	0	30
	5~				
	10~15	0	9	0	19
	15~20	0	8	0	12
25:75	0~5	0			
	5~10	0	0	0	0
	10~15	0	4	0	18
	15~20	0	5	0	14

Table3 Effect of Volume of Acetone-Hexane Solvents Eluent on 1 µg of Pesticides were added in NH<sub>2</sub>-FLO-Cartridge Column

Eluent (Acetone-Hexane)	Range of Eluent(mL)	Rate of Elution(%)			
		Meta	Teflu	As	
8:92	0~5	6	3	0	
	5~10	28	4	0	0
	10~15	31	3	0	0
	15~20	17	3	0	2
	Total		82	13	0
12:88	0~5	30	5	0	4
	5~				
	10~15	12	29	2	19
	15~20	4	25	5	27
15:85	Total	99	8		
	0~5	47	3	0	2
	5~				
	10~15	4	25	18	47
17:83	15~20	0	2	29	7
	Total	99	97	49	98
	0~5	55	8	0	8
	5~10	36	61	8	41
20:80	10~15	7	28	24	43
	15~20	1	4	23	8
	Total	99	100	54	
	0~5	68	30	7	24
25:75	5~10	27	66	39	69
	10~15	3	4	39	7
	15~20	0	0	13	0
	Total	99	100	98	100

10mL で溶出させた後、NH<sub>2</sub>カートリッジカラムをはずして FLO カートリッジカラムに 20%アセトン-ヘキサン 10mL を負荷して溶出させることとした。

Table4 Effect of Volume of Acetone-Hexane Solvents Eluent on 1 µg of Pesticides were added in NH<sub>2</sub>-Cartridge Column

Eluent (Acetone-Hexane)	Range of	Rate of Elution(%)			
		100	74	87	60
20:80	0 ~ 5	100	74	87	60
	5 ~ 10	0	26	13	40
	10 ~ 15	0	0	0	0
	15 ~ 20	0	0	0	0

### 3 直線性と検出下限値

標準原液をメタノールで希釈し、0.025 ~ 1.0mg/L 溶液を調整した。その 10 µL を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク高より検量線を作成した。S/N 比 3 以上としたときの検出下限はメタベンズチアズロンが 0.01mg/L、テフルベンズロン、ルフェヌロン、アゾキシストロピンが 0.05mg/L であった。検量線はメタベンズチアズロンが 0.01 ~ 1.0mg/L、テフルベンズロン、ルフェヌロン、アゾキシストロピンが 0.05 ~ 1.0mg/L の範囲で濃度とピーク面積の間には Fig.3 に示すように良好な相関関係が得られた。

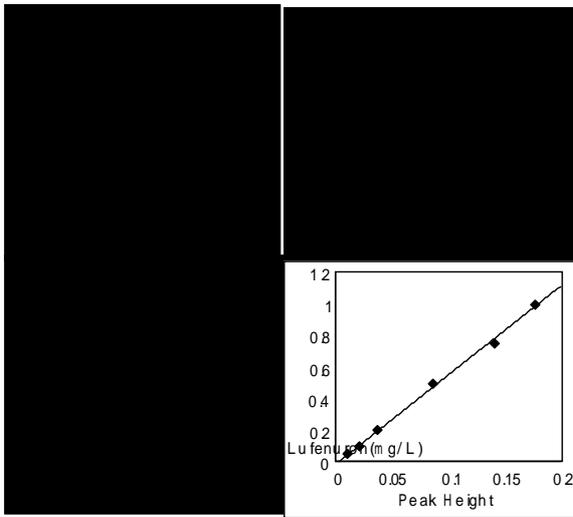


Fig.3 Calibration curves for four pesticides

$$\text{メタベンズチアズロン (mg/L)} = 1.04 \times \text{ピーク高} - 0.00613$$

$$r = 0.9993 \quad n = 7$$

$$\text{テフルベンズロン (mg/L)} = 4.73 \times \text{ピーク高} - 0.0115$$

$$r = 0.9990 \quad n = 6$$

$$\text{アゾキシストロピン (mg/L)} = 5.47 \times \text{ピーク高} - 0.0132$$

$$r = 0.9995 \quad n = 6$$

$$\text{ルフェヌロン (mg/L)} = 5.62 \times \text{ピーク高} - 0.0161$$

$$r = 0.9988 \quad n = 6$$

本法による検出下限値は各農薬とも農産物の中で最も低濃度の残留基準値を満たしていた。

### 4 農産物からの回収

玄米、小麦及び大豆にメタベンズチアズロンを 0.05ppm、テフルベンズロン、アゾキシストロピン、ルフェヌロンをそれぞれ 0.1ppm となるように添加し、本法に従って回収率と RSD を求めた。結果を Table 5 に示す。

各農産物の回収率はメタベンズチアズロンが 64 ~ 76%、テフルベンズロンが 57 ~ 70%、ルフェヌロンが 54 ~ 68% で、RSD は何れも 10% 以下であり良好に回収された。アゾキシストロピンの回収率は大豆と玄米では 79%、66% と良好であったが、小麦では 39% と回収率が低かった。しかし RSD は何れの農産物も 10% 以下であり、回収率のばらつきは小さかった。したがってスクリーニング法としては使用できると判断した。

農作物別にみると脂肪分が少ない小麦で何れの農薬も回収率が低い。この原因はアセトニトリル-ヘキサン分配によるものではなく、抽出液に問題があるものと推察された。つまり GC による迅速分析法で抽出した抽出液を利用するため、アセトニトリルを抽出液としている。アセトニトリルは脂肪分が多い大豆や玄米になじみやすく、脂肪分の少ない小麦とはなじみにくいのがその原因と考えられた。

Fig.4 にメタベンズチアズロン 0.25mg/L、テフルベンズロン、アゾキシストロピン、ルフェヌロンそれぞれ 0.5mg/L 標準溶液(a)、玄米(b)、小麦(c)、大豆(d)の HPLC クロマトグラムを示す。玄米、大豆は何れの農薬も測定を妨害するピークはみられなかったが、小麦はルフェヌロンの肩にわずかに妨害ピークがみられた。しかし、何れの農産物のクロマトグラムも今回の方法でほぼ良好に妨害ピークを除去することができたので、HPLC で測定する農薬のうち検出波長が 260nm 付近にある多くの農薬を同時に検査できると考えている。

Table 5 Recoveries of Four Pesticides Added to Brown Rice, Wheat and Soybean

Pesticide	Brown Rice		
	75.5	63.8	70.2
Methabenzthiazuron	(7.9)	(4.0)	(3.1)
Teflubenzuron	63.0	57.4	69.9
	(8.0)	(1.1)	(3.1)
Azoxystrobin	78.9	39.1	
	(7.3)	(9.1)	(1.5)
Lu	62.6	53.8	
	(1.6)	(2.9)	(3.9)

To agricultural products, 1.0 µg/20g of methabenzthiazuron and 2.0 µg/20g of teflubenzuron, azoxystrobin and lu fenuron.

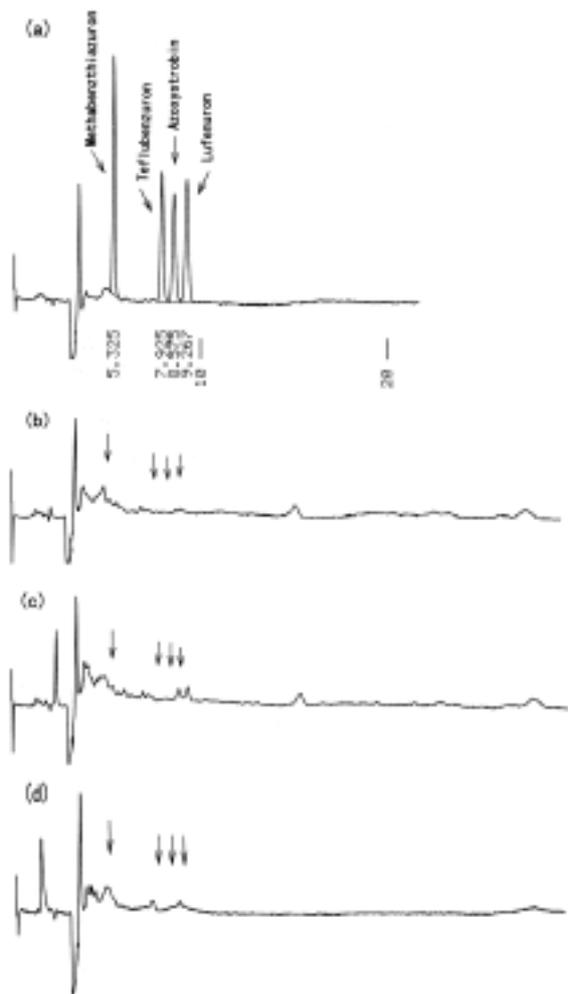


Fig4 HPLC chromatogram of (a)standard mixture (methabenzthiazuron 0.25mg/L, teflubenzuron, azoxystrobin, lufenuron 0.5mg/L) and HPLC sample solution of (b)brown rice, (c)wheat, (d)soybean

## まとめ

当所では限られた人員と経費の中で、定常業務を実施しているが、基準が設定されたすべての農薬を個別に検査を行うのは難しい。そこで、できるだけ多くの農薬の安全性を確認するために、多くの農薬を一斉に抽出、精製し、検出する迅速分析法を開発し、効率的に検査を実施している。

しかしながら極性が高い農薬や沸点が高い農薬は GC や GC/MS による迅速分析が難しい。これらの農薬は HPLC で分析されることが多いが、HPLC は検出器の選択性が低いため、GC に比較すると多くの項目を同時に分析することは難しく、試料溶液の精製を十分に行う必要があるため、定常検査への導入が遅れている。

今回、HPLC で検査する農薬を定常検査へ導入するた

めに従来行っている GC による迅速分析法によりアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配した試料溶液の一部を利用することで、検査の前処理の段階を大幅に合理化した。

GC で測定する農薬の抽出液を使用したことから、回収率は満足できるものではなかったが、回収率の RSD が小さいのでスクリーニング法として活用できると判断した。また抽出を省略することができるため、検査に要する時間を大幅に短縮することができ、定常検査への導入も十分可能であると考えている。

今後は本法で検査可能な農薬を増加させること及び回収率を上げることが課題である。

## 文献

- 1) 小林英樹：12 種農薬の迅速分析法への適応性の検討, 福岡市保健環境研究所報, 24, 124 ~ 127, (1999)
- 2) 小林英樹, 江頭 勝, 西田政司：フルジオキシニル, ウニコナゾールP, クレソキシムメチル, ジフルフェニカン, ヘキサコナゾール, ペンコナゾール及びモリネートの迅速分析法への適応性の検討, 福岡市保健環境研究所報, 25, 134 ~ 137, (2000)
- 3) 江頭 勝, 小林英樹, 西田政司：アクリナトリン, ピフェントリン, ピフェノックス及びホルペットの迅速分析法への適応性の検討, 福岡市保健環境研究所報, 25, 138 ~ 141, (2000)
- 4) 宮崎悦子, 西田政司：有機窒素系9農薬における迅速分析の適応性の検討, 福岡市保健環境研究所報, 26, 140 ~ 144, (2001)
- 5) 江頭 勝：フェンプロパトリン及びターバシルの迅速分析法への適応性の検討, 福岡市保健環境研究所報, 26, 145 ~ 148, (2001)
- 6) 小林英樹：玄米, 精米中のキンクロラック・イマゾスルフロン・ベンスルフロンメチル・ジクロメジンの同時分析法の検討について, 福岡市保健環境研究所報, 22, 76 ~ 78, (1997)
- 7) 長 律子, 西田政司：HPLC による農産物中の 14 農薬の同時分析法の検討について, 福岡市保健環境研究所報, 23, 94 ~ 99, (1998)
- 8) 長 律子：HPLC による玄米中のクミルロン, ダイムロン及びアジメスルフロンの迅速分析法の検討, 福岡市保健環境研究所報, 25, 142 ~ 145, (2000)
- 9) 厚生省告示第 245 号, (1998)
- 10) 厚生労働省告示第 56 号, (2001)
- 11) 厚生労働省告示第 258 号, (2001)



