ＨＰＬＣによる玄米，小麦，大豆中の１１農薬の一斉分析法の検討

西田政司[1]

Analysis of the Eleven Pesticides in Brown Rice, Wheat and Soybean by HPLC

Seiji NISHIDA

Summary

A method was established for simple and simultaneous determination of 11 pesticides in brown rice,wheat and soybean by HPLC.The pesticides were extracted from samples with acetonitrile. The fats in the extracts were removed with hexane saturated and acetonitrile,and acetonitrile layer was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 6% ether-hexane, and partitioned with 30% zinc acetate solution. The hexane layer was applied to NH_2+ Floridil cartridge column, and the pesticides were eluted with 20% acetone-hexane. In case of brown rice, elution was divided into two fractions（15% and 20% acetone-hexane）, because Tebfenosid was affected by extracted matrix. The HPLC separation was carried out on a Inertsil® Ph-3 column（250nm × 4.6mm i.d., 5μm）with acetonitril-methanol-water(2:4:3) as the mobile phase at a frow rate of 1.0mL/min, with a UV detector at 260nm. The recoveries of the pesticides from the agricultural products at the level of 0.05, 0.1μg/g were 32.5 ～ 96.0%, RSD were 0.7 ～ 9.3%.

Key Words：ジフルベンズロン diflubenzuron, テブフェノジド Tebfenosid, ヘキサフルムロン Hexaflumuron, ペンシクロン Pencycuron, フルフェノクスロン Flufenoxuron, メタベンズチアズロン Methabenzthiazuron, ダイムロン Daimuron, テフルベンズロン Teflubenzuron, アゾキシストロビン Azoxystrobin, ルフェヌロン Lufenuron, クロルフルアズロン Chlorfluazuron, 高速液体クロマトグラフ HPLC , 玄米 Brown rice, 小麦 Wheat, 大豆 Been

Ⅰ はじめに

前報[1)]で GC による 116 農薬の系統分析を行う際に得られる抽出液を利用して玄米，小麦，大豆中のメタベンズチアズロン，テフルベンズロン，アゾキシストロビン及びルフェヌロンの 4 農薬を HPLC で簡易，迅速に分析する方法を開発し報告したが，今回はそれらを含めた 11 農薬[2～7)]について迅速分析法への適応性を検討するとともに，分析法に改良を加えたのでその結果を報告する．

Ⅱ 方 法

1 試 薬

・標準試薬：ジフルベンズロン，テブフェノジド，ヘキサフルムロン，ペンシクロン，フルフェノクスロン，ダイムロン，ルフェヌロンは Riedel-de Haen，メタベンズチアズロン，テフルベンズロン，クロルフルアズロンは和光純薬工業（株），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．

・酢酸亜鉛：市販の特級試薬を使用した．

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

・その他の農薬標準原液：農薬 20μg をメタノールで 20mL に定容し，1000mg/L 標準原液とした．

・農薬混合標準液Ａ：ジフルベンズロン，テブフェノジド，ヘキサフルムロン，ペンシクロン，フルフェノクスロン標準原液 0.2mL をとり，メタノールで 10mL に定容し，混合標準液Ａとした．

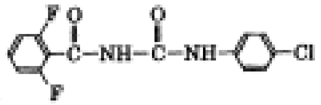
1．福岡市保健環境研究所　衛生化学部門

・農薬混合標準液 B：メタベンズチアズロン標準原液 0.1mL，ダイムロン，テフルベンズロン，アゾキシストロビン，ルフェヌロン，クロルフルアズロン標準原液 0.2mL をとり，メタノールで 10mL に定容し，混合標準液 B とした．

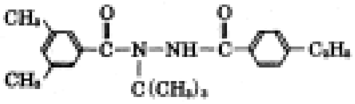
・NH_2カートリッジカラム：VARIAN，BOND ELUT[?] ZIP PAK NH 2 (500mg)

・フロリジル(FLO)カートリッジカラム：WATERS Sep-Pak[?] Plus Florisil(1g)

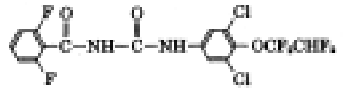
1) Diflubenzuon (Insecticide)



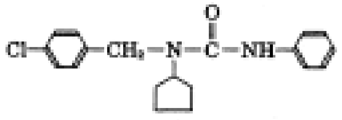
2) Tebfenosid (Insecticide)



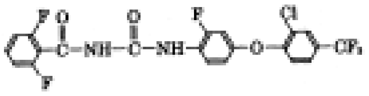
3) Hexaflumuron (Insecticide)



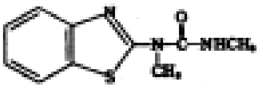
4) Pencycuron (Germicde)



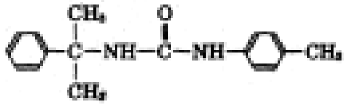
5) Flufenoxuron (Insecticide)



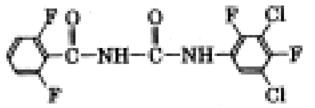
6) Methabenzthiazuron (Herbicide)



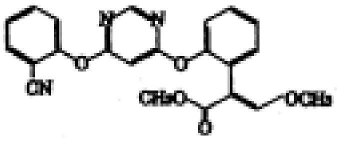
7) Daimuron (Herbicide)



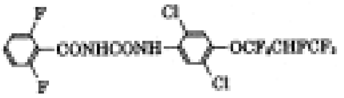
8) Teflubenzuron (Insecticide)



9) Azoxystobin (Germicde)



10) Lufenuron (insecticide)



11) Chlorfluazuron (Insecticide)

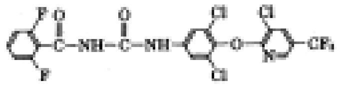


Fig.1 Chemical structure of pesticides.

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 ™ 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：260nm，カラム温度：40 ℃，流量：1.0mL/min.，移動相：アセトニトリル-メタノール-水(1:3:2)，注入量 ：10 μL

3 検 査 方 法

1) GC迅速分析法での抽出後の試料溶液調整

試料 20g にアセトニトリル 80mL を加え一夜放置後 10 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 5 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) 酢酸亜鉛による精製

GC・HPLC 精製用溶液 5mL を分取し，30%酢酸亜鉛溶液 2mL を加え 30 分間振とう後，3000rpm で 5 分間遠心分離し，ヘキサン相 4mL を分取し，濃縮・乾固した．

3) 75%アセトニトリル-水/ヘキサン分配

これを 75%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 5 分間遠心分離し，アセトニトリル層 3mL を分取し，45 ℃以下で濃縮・乾固し，6%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．

4) ミニカラムによる精製

NH_2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，7.5%アセトン-ヘキサン 10mL でコンディショニングした．

FLO-NH_2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，7.5%アセトン-ヘキサン 10mL で洗浄後，20%アセトン-ヘキサン 20mL で溶出した．玄米は 7.5%アセトン-ヘキサン 10mL で洗浄後，15%アセトン-ヘキサン 10mL で第 1 画分，20%アセトン-ヘキサン 15mL で第 2 画分を溶出した．溶出液を乾固し，メタノールで 1mL に定容し，0.45μL メンブランフィルターでろ過後，ろ液(HPLC 用試料)10μL を HPLC に負荷した．Fig.2 に分析のフローシートを示す．

Agricultural products 1kg
│
Crush
│
Sample 20g
├── acetonitrile 80mL
│ stand for one day
Shake (10min.)
├──────────┐
Filtrate　　　　　　Residue
│　　　　　　　　　├── acetonitrile 40mL
├────────── Wash
├── hexane saturated with acetonitrile 40mL
Shake(5min.)
│ evaporate to dryness
│ fill up to 10mL by 6% diethylether-hexane
5mL aliquot
│ 30% zinc acetate 2mL
Shake(30min.)
│
Diethylether-hexane layer 4mL aliquot
│ evaporate to dryness
│ dissolve with 75% acetonitrile-H_2O 4mL
│ hexane saturated with acetonitrile 2mL
Shake(1min.)
│
Acetonitrile layer 3mL aliquot
│ evaporate to dryness
│ dissolve with 6% diethylether-hexane 3mL
2.5mL
│
NH_2-FLO cartridge column(Upper:NH_2, Lower:FLO)*
│ rince cartridge with 7.5% acetone-hexane 10mL
│ elute with 20% acetone/hexane 20mL
│ {brown rice ;elute with 15% acetone-hexane 10mL as fraction 1, and 20% acetone-hexane 15mL as fraction 2}
│ evaporate to dryness
Dissolve with methanol 1mL
│
HPLC

Fig.2 Analytical procedure for 11 pesticides in agricultural products.
*conditioned by 20% acetone-hexane 10mL and 7.5% acetone-hexane 10mL

III 結果と考察

1 分離カラムと移動相の選択

前報ではマトリックス由来の妨害ピークにより，ベースラインが安定するのが遅いため，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.

今回このカラムで，移動相をアセトニトリル-メタノール-水(1:3:2)としたとき 11 農薬が重ならずに，15 分以内で測定でき，各農産物のマトリックス由来の妨害ピークも 30 分以内にすべて出て，30 分以降ベースラインは安定した．このため以後この条件で検討することとした．Fig.3 に混合標準液 A，B の HPLC クロマトグラムを示す.

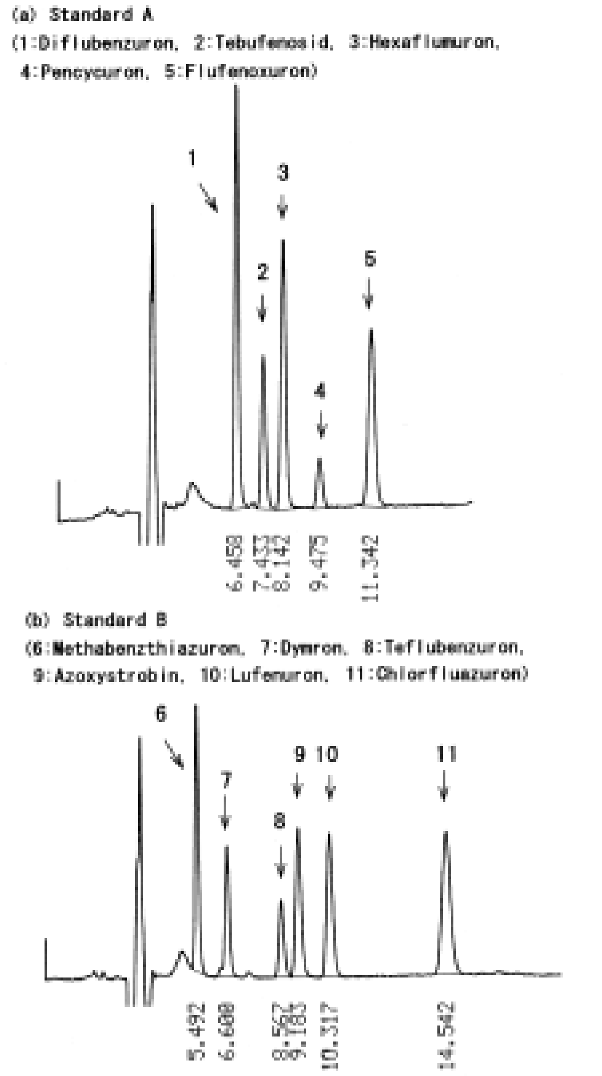


Fig.3 HPLC chromatogram of (a)standard A (concentration of each pesticides : 0.5mg/L), (b)standard B (concentration of methabenzthiazuron : 0.25mg/L and other pesticides : 0.5mg/L)

2　前報の方法による玄米からの11農薬の回収率

玄米にメタベズチアズロンを 0.05ppm，その他の農薬を 0.1ppm となるように加え，前報の方法で 11 農薬の回収率を求めた．結果を Table2 に示す．

テブフェノジドとダイムロンはマトリックスによる妨害を受けて測定できなかった．

また保持時間が遅いペンシクロンやフルフェノクスロン，クロルフルアズロンの回収率が 40%程度と低かった．

Table 2 Recoveries of the Eleven Pesticides from Brown Rice

Pesticides	Recover
	Brown Rice
Diflubenzuron	64
Tebufenosid	Can't be calculated
Hexaflumuron	62
Pencycuron	41
Flufenoxuron	36
Methabenzthiazuron	64
Daimuron	Can't be calculated
Tefulbenzron	54
Azoxystrobin	78
Lufenuron	52
Chlorfluazuron	36

To agricultural products,1.0 μg/20g of methabenzthiazuron and 2.0 μg/20g of other pesticides.

3　酢酸亜鉛による妨害の除去

そこで脂肪酸やタンパク質由来の妨害を除去する目的で，GC による迅速分析法の精製用溶液の 6%ジエチルエーテル-ヘキサン相 4mL に 30%酢酸亜鉛 2mL を加え，30 分間振とうしたところ，玄米でダイムロンの測定を妨害するマトリックスの影響は除去されたが，テブフェノジドの測定を妨害するマトリックスは除去することはできなかった．

4　アセトニトリル-水/ヘキサン分配時のアセトニトリルの割合の検討

GC・HPLC 精製用溶液は妨害除去のためにアセトニトリル/ヘキサンで液/液分配を行っているが，前報の方法では脂肪の除去が完全ではないので，より効果的に脂肪を除去するために 50%アセトニトリル-水/ヘキサンでもう一度液/液分配を行った．アセトニトリルと水の割合が農薬の回収に与える影響を調査するために，アセトニトリル-水相のアセトニトリルの割合を 100%，75%，50%, 25%としたアセトニトリル-水相 5mL に標準溶液 A 及び B を 0.05mL を加え，ヘキサン 2.5mL と液/液分配したときのアセトニトリル-水相への農薬の回収率を求めた．結果を Table3 に示す．

何れの農薬もアセトニトリルの割合が 75%の時が最も回収率が高く，87 ～ 96%が回収された．そこで液/液分配は 75%アセトニトリル-水で行うことにした．

Table3 Recovery of Pestisides partitioned with Hexane and Acetonitril-Water

Pestisides	Acetonitril (%)			
	100	75	50	25
Diflubenzuron	85	96	87	76
Tebufenosid	85	95	88	50
Hexaflumuron	86	96	84	45
Pencycuron	84	92	62	16
Flufenoxuron	85	95	69	69
Methabenzthiazuron	85	91	85	61
Daimuron	85	92	89	52
Tefulbenzron	84	90	75	8
Azoxystrobin	85	92	90	67
Lufenuron	86	89	72	3
Chlorfluazuron	86	87	62	3

5　NH_2-FLOカートリッジカラムによる精製

1）洗浄液の検討

前報では NH_2-FLO カートリッジカラムを 35%ジエチルエーテル-ヘキサン 15mL で洗浄したが，今回はアセトン-ヘキサンで洗浄をおこなった．10%アセトン-ヘキサンでは 10mL でジフルベンズロン，テブフェノジド，フルフェノクスロン，アゾキシストロビン以外の 7 農薬が溶出した．8%アセトン-ヘキサンでは 10mL でペンシクロンが 21%溶出した．7.5%アセトン-ヘキサンでは 10mL で 11 農薬すべてが溶出しなかったので洗浄は 7.5%アセトン-ヘキサン 10mL で行うことにした．

2）溶出液の検討

次に溶出は前報と同様 20%アセトン-ヘキサンで行った．最も溶出が遅いヘキサフルムロンがすべて溶出するには 20mL を要したので，溶出は 20%アセトン-ヘキサン 20mL で行うことにした．

3）玄米の溶出液の検討

小麦，大豆ではⅢ．5．2)の溶出液で 11 農薬ともにマトリックス由来の妨害を受けなかったが，玄米はテブフェノジドがマトリックス由来の妨害を受けたので画分を分けて測定することにした．

15%アセトン-ヘキサン 10mL でテフルベンズロンはすべて溶出したのでこれを第 1 画分とした．次に 20%アセトン-ヘキサン 15mL でヘキサフルムロンがすべて溶出したのでこれを第 2 画分とした．

6　直線性と検出下限値

ペンシクロンは 0.05 ～ 1ppm，その他の農薬は 0.0025 ～ 1ppm で濃度とピーク高の間に 0.997 以上の良好な直線性が得られた．

また 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 0.005ppm，ジフルベンズロンが 0.01ppm，ペンシクロンが 0.05ppm，テフルベンズロン

が 0.03ppm，テブフェノジド，ヘキサフルムロン，フルフェノクスロン，ダイムロン，アゾキシストロビン，ルフェヌロン，クロルフルアズロンが 0.02ppm であった．

7　玄米，小麦，大豆からの回収

玄米，小麦及び大豆 20g に標準溶液 A，B をそれぞれ 0.1mL 添加し，抽出・精製を改良した方法に従って回収率と RSD を求めた．

結果を Table　4 に示す．また Fig.4 に玄米(c)，小麦(d)，大豆(e)の HPLC クロマトグラムを示す．

各農産物とも小麦からの回収率が低かった．これは添加した農薬が小麦成分と結合しやすいためであろうと考えている。米は回収率は良好であったが，テブフェノジドがマトリックス由来の妨害を受けるため画分を二つに分けて測定しなければならなかった．小麦，大豆は測定を妨害するマトリックスはみられなかった．今回検討した 3 農産物ともに 70%以上回収したのはフェノクスロン，テフルベンズロン，ルフェヌロン，クロルフルアズロンの 4 農薬で，テブフェノジド，メタベンズチアズロン，アゾキシストロビンは小麦からの回収率は 50%以下であった．しかし RSD は何れの農産物も 10%以下であり，回収率のバラツキは小さかった．したがってスクリーニング法として使用できると判断した．

Table 5　Recoveries of Spiked Pesticides from Brown Rice,Wheat and Soybea

Pesticides	Recovery(%), (RSD)(%)				
	Brown rice			Wheat	
	Fr.1	Fr.2	Total		
Diflubenzuron	44.5	35.3	80.2	51.0	69
			(3.7)	(0.7)	(1.7)
Tebufenosid	63.3		63.3	40.5	57.9
			(2.5)	(5.1)	(2.3)
Hexaflumuron		67.9	67.9	56.3	69.2
			(1.8)	(4.6)	(5.7)
Pencycuron	56.8		56.3	58.9	57.9
			(4.5)	(6.0)	(6.1)
Flufenoxuron	21.6	60.4	82.0	71.3	78.4
			(4.8)	(1.4)	(6.1)
Methabenzthiazuron	77.0		77.0	46.5	68.4
			(1.9)	(3.7)	(4.0)
Dymuron	63.5		63.5	50.3	57.9
			(1.7)	(9.2)	(4.6)
Tefubenzron	31.5	57.0	88.5	80.4	9
			(9.3)	(4.1)	(4.0)
Azoxystrobin	2.9	59.4	62.3	32.5	61.2
			(5.5)	(3.2)	(8.4)
Lu	13.2	75.2	88.4	86.9	
			(2.2)	(5.9)	(6.6)
Chlorfluazuron	5.8	81.5	87		3
			(2.2)	(5.8)	(5.9)

To agricultural products,1.0 µg/20g of methabenzthiazuron and 2.0 µg/20g of tefubenzuron,azoxystrobin and lufenuron.

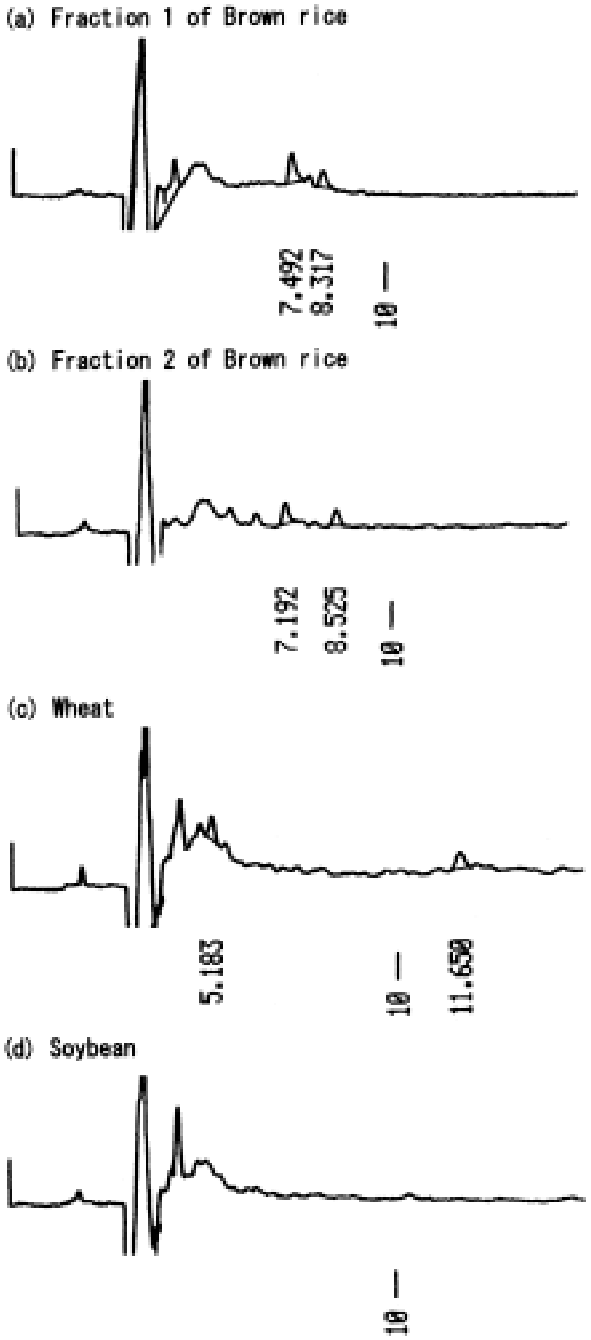


Fig.4　HPLC chromatogram of (a) Fraction 1 of Brown rice, (b)Fraction 2 of Brown rice, (c)Wheat and (d)Soybean

Ⅳ　ま　と　め

農産物における農薬の残留基準が毎年増設される中，できるだけ多くの農薬の安全性を確認するために，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[8~13]．

今回は前報で検討したメタベンズチアズロン等 4 農薬に加えて，新たに 7 農薬，計 11 農薬を HPLC で一斉分析する方法を検討した．前報の方法に比べ精製方法を一部変更することにより，クロマトグラム上に出現するマトリックス由来の妨害ピークを減少させたが，玄米では画分を二つに分ける必要があった．

今回のように検出器に選択性が低い紫外吸光光度計を使用した場合，測定農薬が多くなれば目的物を妨害ピークから分離するためにいくつかの画分に分けて測定せざるをえなくなる．そこで今後は，HPLC/MS によるスクリーニング検査法を検討するのが合理的であると考えている．

文　　献

1）西田政司：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，福岡市保健環境研究所報，27，未定，（2002）

2）厚生省告示第 239 号，（1992）

3）厚生省告示第 161 号，（1995）

4）厚生省告示第 221 号，（1996）

5）厚生省告示第 245 号，（1998）

6）厚生労働省告示第 56 号，（2001）

7）厚生労働省告示第 258 号，（2001）

8）小林英樹：8 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, 23, 239 ～ 242,（1998）

9）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）

10）小林英樹, 江頭　勝,西田政司：フルジオキソニル，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）

11）江頭　勝,小林英樹，西田政司：アクリナトリン，ビフェントリン，ビ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）

12）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）

13）江頭　勝：フエ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）