GCによる農産物中の酸化フェンブタスズ,シヘキサチンの同時分析

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	山本,千佳代 中村,宗知 木船,信行 前川,吉明
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	37巻5号
掲載ページ	p. 288-294
発行年月	1996年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

報 文

GCによる農産物中の酸化フェンブタスズ，シヘキサチンの同時分析

(平成8年5月9日受理)

山本千佳代*1　中村宗知*1
木船信行*1　前川吉明*2

Determination of Fenbutatin Oxide and Cyhexatin by GC

Chikayo YAMAMOTO*1, Munetomo NAKAMURA*1, Nobuyuki KIBUNE*1 and Yoshiaki MAEKAWA*2

(*1Japan Food Research Laboratories Osaka Branch: 3-1, Toyotsu-cho, Suita-shi, Osaka 564, Japan; *2Japan Food Research Laboratories Tama Laboratory: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206, Japan)

A method of analysis of fenbutatin oxide and cyhexatin by GC was developed. The compounds were extracted from foods with acetic acid–ethyl ether (1 : 99) mixture, then ethylated with Grignard reagent (EtMgBr), and the ethyl derivatives were extracted with hexane. The hexane layer was concentrated and purified on a Sep-pak Florisil cartridge. Each ethyl derivative was determined by FPD-GC (Sn) using a DB-1 capillary column. The detection limit of fenbutatin oxide was 0.05 ppm and that of cyhexatin was 0.02 ppm. The recoveries from 10 kinds of samples (at the level of 1 ppm) were 80～105%.

(Received May 9, 1996)

Key words: ガスクロマトグラフィー FPD-GC; 酸化フェンブタスズ fenbutatin oxide; シヘキサチン cyhexatin; エチル化 ethylation; グリニャール試薬 Grignard reagent; 農産物 agricultural products

緒　言

酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンは，果実，野菜，茶などの殺だに剤として使用される有機スズ化合物農薬であり，食品衛生法の中でそれぞれの残留基準値が設定され，試験法が示されている．酸化フェンブタスズ試験法はフレームレス原子吸光光度計を測定機器として用いる方法[1]であり，測定機器が比較的高価である．また，使用する機種により至適測定条件が異なることや，実試料液と標準液との測定感度が変動し，これに対しモディファイヤーの添加，標準添加法などを用いるなど，試料の種類に応じて操作条件を検討する必要*3があり，操作に熟練を要する．また，酸化フェンブタスズの代謝体であるジ体など他の有機スズ化合物が，試料中に共存している場合，原子吸光光度法では分別測定ができないので，他の有機スズ化合物を除くための操作が複雑になるなどの問題点がある．一方，シヘキサチン試験法は水素化による誘導体化後，FPD-GCで測定する方法[2]が示されている．

酸化フェンブタスズの他の試験法としてはHPLC[3]が報告されているが，GCによる方法，また酸化フェンブタスズとシヘキサチンを同時に測定する方法の報告は見当たらない．トリブチルスズ化合物(TBT)，トリフェニルスズ化合物(TPT)が漁網防汚剤，船舶塗料などに使用され，海洋及び水生生物に対する汚染[4)～7)]が問題に

*1 (財)日本食品分析センター大阪支所：〒564 大阪府吹田市豊津町3-1
*2 (財)日本食品分析センター多摩研究所：〒206 東京都多摩市永山6-11-10

*3 日本食品衛生学会第64回学術講演会講演要旨集 p. 41 (1992).

なっている．

著者らは，環境試料中のTBT, TPT分析法[8)~11)]のアルキル化FPD-GCに検討を加え，食品中の酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンの同時残留分析法を作製したので報告する．

実験方法

1. 試　料

市販の野菜類，果実類，大豆，小麦粉，茶及び果汁を使用した．

2. 試　薬

酸化フェンブタスズ及びシヘキサチン標準品：和光純薬工業製

塩化トリブチルスズ：東京化成工業製

エチルマグネシウムブロミド（3 *M* ジエチルエーテル溶液），ヘキシルマグネシウムブロミド（2 *M* ジエチルエーテル溶液）：東京化成工業製

陽イオン交換樹脂：オルガノ社製 (Amberlite CG-120 TYPE 1) 100 g を 3 *M* 塩酸 500 ml に1夜浸漬後，蒸留水でpHが約7になるまで洗浄した．

陰イオン交換樹脂：三菱化成社製 (MCI GEL CA08 P) 200 ml を 2 *M* 水酸化ナトリウム溶液 500 ml に1夜浸漬し，蒸留水でpHが約7になるまで洗浄した．

フロリジルミニ充てんカラム：Sep-pak プラスフロリジル

ヘキサン，無水硫酸ナトリウム，ジエチルエーテル，酢酸，塩化ナトリウム，アセトン，シクロヘキサン，硫酸：試薬特級

ケイソウ土（セライト545）

標準原液：酸化フェンブタスズ50 mgを正確にはかりとり，酢酸–ジクロロメタン (1 : 99, v/v) で50 mlに定容し標準原液 1,000 μg/ml を調製した．シヘキサチン50 mgをはかりとり，ジクロロメタンで50 mlに定容し標準原液 1,000 μg/ml を調製した．

混合標準溶液：標準原液2 mlずつを合わせ，ジエチルエーテルで20 mlに定容し，混合標準溶液 100 μg/ml を調製した．これをエーテルで適宜希釈し，添加回収試験に用いた．

内標準物質溶液（ヘキシルトリブチルスズ）：塩化トリブチルスズをヘキサンに溶解し，100 μg/ml を調製した．この1 mlを30 ml容共栓付試験管にとり，ヘキシルマグネシウムブロミド1 mlを加え，ゆっくり振りまぜ，室温で30分間放置し，ヘキシル化反応を行った．反応液に1 *N* 硫酸7 mlを注意しながら徐々に滴下し，過剰のヘキシルマグネシウムブロミドを分解した．蒸留水10 mlを加え，ヘキサン5 mlで2回抽出した．抽出液をヘキサンで希釈し 0.3 μg/ml 溶液を調製した．

3. 装　置

ガスクロマトグラフ：

Hewlett Packard 社製 5890 II (FPD検出器，Snフィルター)；オートサンプラー：7673A; データ処理装置：3396 II

ガスクロマトグラフ操作条件

カラム：DB-1（J & W 社製）φ0.32 mm×30 m

カラム温度：120℃(2 min)–10℃/min–200℃–20℃/min–300℃(3 min)

検出器温度：280℃，試料注入口温度：280℃

ガス流量：キャリヤーガス (He) 4 ml/min，水素 80 ml/min，空気 100 ml/min，メイクアップガス (He) 30 ml/min

4. 試験溶液の調製

4.1 抽出

野菜，果実，大豆，小麦粉及び茶葉：試料 10 g（大豆，茶葉は2 g）をはかりとり，乾燥試料の場合は蒸留水 20 ml を加えた．少量のケイソウ土，塩化ナトリウム5 g及び酢酸–ジエチルエーテル (1 : 99, v/v) 100 ml を加え，30分間激しく振とうした．吸引ろ過し，容器及び残さを酢酸–ジエチルエーテル (1 : 99, v/v) で洗浄した．ろ液，洗液を 300 ml 容分液漏斗に合わせて水層を除いた後，ヘキサン 100 ml を加え振とう混合し30分間放置した．

茶浸出液：茶葉9 gを沸騰水540 mlに5分間浸漬後，ろ過したろ液120 ml（茶葉2 g相当）を500 ml分液漏斗にとり，塩化ナトリウム10 gを加え，酢酸–ジエチルエーテル (1 : 99, v/v) 100 ml で2回振とう抽出した．ジエチルエーテル層にヘキサン 100 ml を加え振とう混合し30分間放置した．

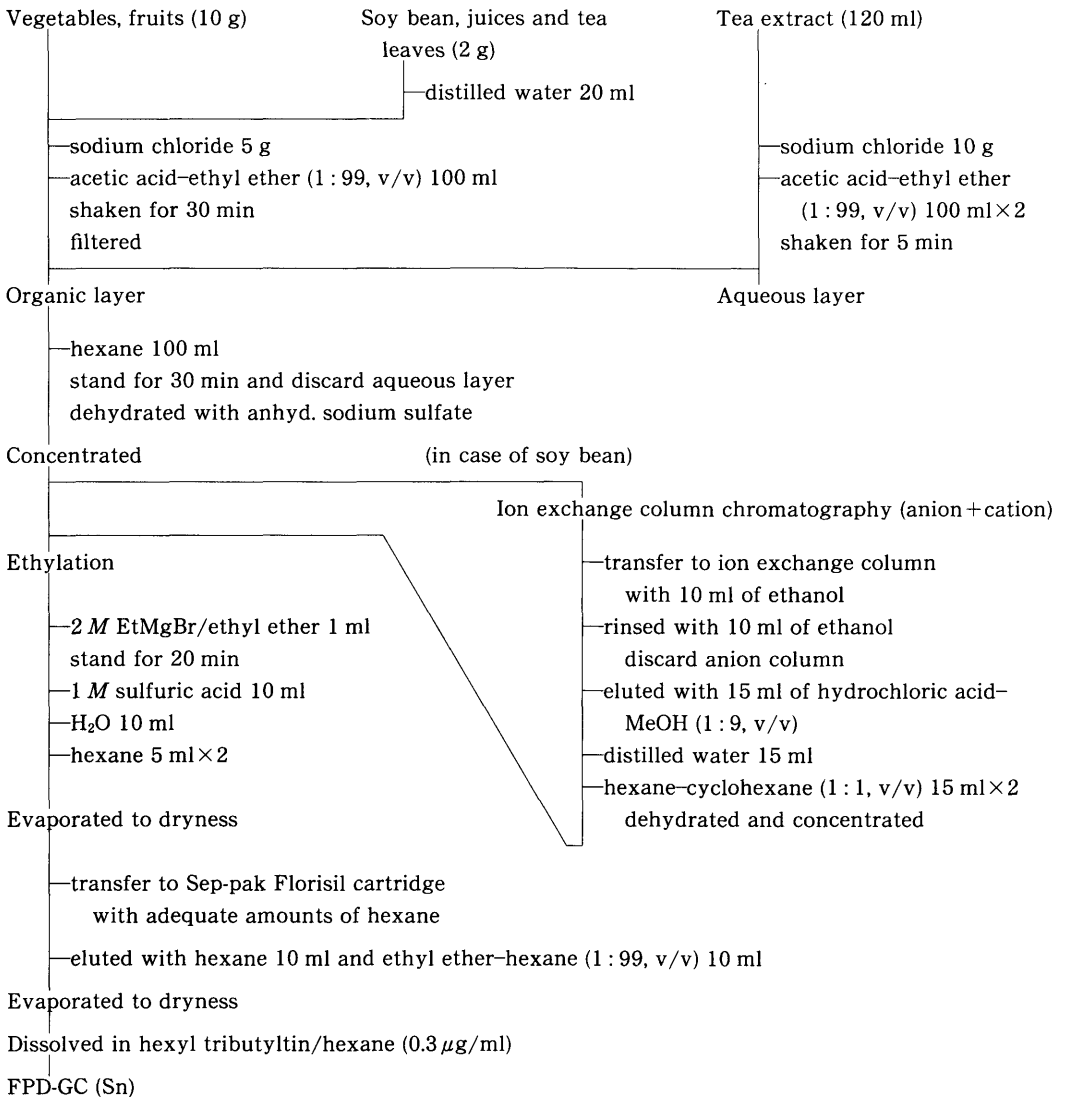
果汁：試料2 gを500 ml容分液漏斗にはかりとり，10% 塩化ナトリウム溶液 100 ml を加え，酢酸–ジエチルエーテル (1 : 99, v/v) 100 ml で2回振とう抽出した．ジエチルエーテル層にヘキサン 100 ml を加え振とう混合し30分間放置した．

4.2 脱水及び濃縮乾固

4.1 の分離した水層を捨て，ジエチルエーテル–ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧濃縮後，乾固させた．酢酸が残る場合はヘキサンを加えて数回濃縮操作を繰り返した．

4.3 イオン交換カラムクロマトグラフィー[8)]（大豆のみ）

陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂をそれぞれ2 mlずつディスポーザブルリザーバー（4 ml容量）に充てんし，蒸留水10 ml，続いてエタノール10 mlで洗浄し，陰イオン交換樹脂を陽イオン交換樹脂の上に連結した．**4.2** の残さをエタノール10 mlに溶解し，連結したカラムに負荷した．エタノール10 mlで洗浄後，陰イオンカラムを外し，陽イオンカラムから塩酸–メタノール (1 : 9, v/v) 15 mlで目的化合物を溶出させた．蒸留水15 mlを加え，ヘキサン–シクロヘキサン (1 : 1, v/v) 15 mlで2回振とう抽出した．ヘキサン–シクロヘ



Scheme 1. Analytical procedure for fenbutatin oxide and cyhexatin in agricultural products

キサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧濃縮後，乾固させた．

4.4 エチル化反応

4.2 又は **4.3** の残さをジエチルエーテルで 5 ml に定容し，1 ml を 30 ml 容試験管に分取した．大豆，茶葉，茶浸出液及び果汁については残さをエチルエーテルで 30 ml 容試験管に洗い込み，窒素気流下約 1 ml まで濃縮した．エチルマグネシウムブロミド 1 ml を加え，室温で 20 分間放置した．1 *N* 硫酸 10 ml を注意しながら徐々に滴下し，過剰の反応試薬を分解した．蒸留水 10 ml を加えヘキサン 5 ml で 2 回抽出した．茶葉など **4.2** での残さが多いものについては蒸留水及びヘキサンの量を増やし，分液漏斗で転溶分取の操作を行った．ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後，ヘキサン層を 2～3 ml まで減圧濃縮した．

4.5 フロリジルミニ充てんカラムクロマトグラフィー

4.4 の溶液をあらかじめヘキサン 10 ml で洗浄しておいたフロリジルミニ充てんカラムに移し，更にヘキサン 8 ml で容器を洗浄し同様に負荷させた．このときの溶出液を分取し，続いてジエチルエーテル–ヘキサン (1 : 99, v/v) 10 ml を流下させ先の溶出液と合わせた．溶出液を減圧濃縮乾固し，内標準溶液（ヘキシルトリブチルスズ 0.3 μg/ml ヘキサン溶液）で 2 ml に定容し試験

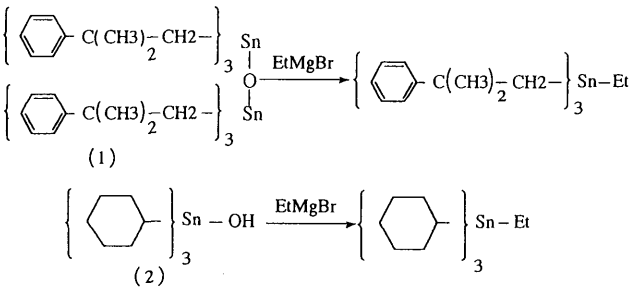


Fig. 1. Ethylation of fenbutatin oxide (**1**) and cyhexatin (**2**)

Table 1. Comparison of Sensitivity and Retention Time among Alkylation Products

Compounds	Methylation		Ethylation		Propylation	
	Sens.[1]	R.t.[2]	Sens.[1]	R.t.[2]	Sens.[1]	R.t.[2]
Triphenyltin hydroxide	2.6	8.75	2.3	9.28	1.7	9.66
Tricyclohexyltin hydroxide	3.0	8.92	2.8	9.51	1.5	9.80
Fenbutatin oxide (di form)	2.9	9.13	2.7	10.23	1.2	10.67
Fenbutatin oxide (tri form)	1.6	13.55	1.3	14.02	0.2	14.08

[1] Sens.: Relative sensitivity on each compounds (1 ng) for internal standard (0.3 ng)
[2] R.t.: Retention time (minutes)
GC conditions are shown in the text.

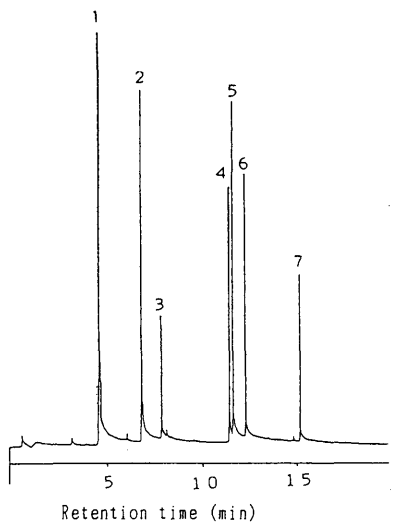


Fig. 2. Gas chromatogram of ethylation products of organotin compounds

Peaks 1: tributyltin; 2: fenbutatin oxide mono-form; 3: hexyl tributyltin (internal standard); 4: triphenyltin; 5: cyhexatin; 6: fenbutatin oxide di-form; 7: fenbutatin oxide

Table 2. Influence of Acetic Acid Concentration in Ethylation of Fenbutatin Oxide

Concentration[1] of acetic acid (μg/ml)	Peak height ratio[2]
0	45
0.01	45
0.1	61
1	100
10	98
100	100
1,000	100
10,000	97

[1] Added each concentration of acetic acid to 1 ml of diethyl ether and ethylated ($n=2$)
[2] Defined value from 1,000 μg/ml concentration of acetic acid as 100 and calculated

溶液とした．

これらの操作を Scheme 1 に示した．

5. 測　　定

5.1 検量線の作成

混合標準溶液 1 ml を 30 ml 容試験管にとり，**4.4** と同様にエチル化及びヘキサン転溶を行った．ヘキサン層を合わせて減圧濃縮し，濃度が 0.3 μg/ml になるように内標準溶液を添加した後，ヘキサンで希釈し，酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンの濃度が 0.02～1 μg/ml の定量用標準溶液を調製した．それぞれ 2 μl をガス

Table 3. Comparison of Two Analysis Methods for Fenbutatin Oxide

Samples	Result (ppm) from spiked[1]		Result (ppm) from not spiked	
	GC[2]	AAS method[3]	GC[2]	AAS method[3]
Cucumber	0.93	0.73	<0.05	<0.05
	0.94	0.80	<0.05	<0.05
	0.97	0.57	<0.05	<0.05
	0.95	0.55	<0.05	<005
	1.1	0.53	<0.05	<0.05
Spinach	—	—	<0.05	1.7
			<0.05	<0.05
			<0.05	0.12
			<0.05	0.10
			<0.05	<0.05

[1] Added 1 ppm
[2] Gas chromatographic method is shown in the text.
[3] Atomic absorption spectrometry method

クロマトグラフに注入し，縦軸にヘキシルトリブチルスズとのピーク高の比，横軸に重量をとり，検量線を作成した．

5.2 定量

試験溶液 2 μl をガスクロマトグラフに注入し，**5.1** の検量線から酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンの重量を求め，試料中濃度を算出した．

結果及び考察

1. アルキル化について

本法は，抽出した酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンをグリニャール試薬であるエチルマグネシウムブロミドを用いてエチル化し，FPD-GC（Sn フィルター）で測定するものである (Fig. 1)．相当するグリニャール試薬を用い標準溶液のメチル化，エチル化，プロピル化を行い，それぞれのガスクロマトグラムを比較したところ (Table 1, Fig. 2)，いずれも適用可能と考えられたが，他の有機スズ化合物（特にトリフェニルスズ化合物）との分離を考慮し，エチル化を採用した．また，室温放置 15～30 分間で一定の反応率を示した．

2. エチル化時の化合物の形態

酸化フェンブタスズ，シヘキサチンともに試料中又は，分析操作中における化合物の存在形態の差で反応率が変化する可能性があり，トリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の分析では，塩酸酸性で抽出し塩化物としてアルキル化反応が行われている[8)~11)]．そこで以下の検討を行った．まずシヘキサチンを塩酸酸性で塩化物にした後，ジクロロメタンで抽出しエチル化反応を行ったものと，市販のヒドロキシド体をそのままエチル化したものとで，GC におけるピーク高を比較した．その結果，ほぼ同等のピーク高を示し，むしろ操作上の損失もあってヒドロキシド体を反応させた場合のピーク高が高い傾向を示した．また，酸化フェンブタスズは，同様の比較で塩化物化後エチル化反応させた方がピーク高が高くなった．一方，エチル化反応時に微量の酢酸が存在す

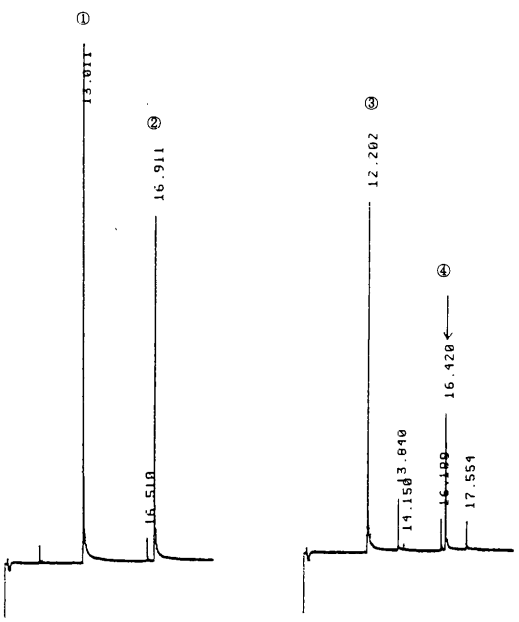


Fig. 3 Gas chromatograms of the derivatives of fenbutatin oxide (1 μg/ml) and cyhexatin (1 μg/ml)
Peaks ①: ethyl derivative of cyhexatin (out of full scale); ②: ethyl derivative of fenbutatin oxide; ③: hydric derivative of cyhexatin; ④: hydric derivative of fenbutatin oxide

Table 4. Recoveries of Fenbutatin Oxide and Cyhexatin Added to Agricultural Products

Samples	Recovery (%)			
	Fenbutatin oxide		Cyhexatin	
	Range[1)]	Average	Range[1)]	Average
Soybean	84～ 98	99	73～ 91	80
Grapefruit	96～104	99	93～102	98
Banana	81～119	96	90～116	105
Watermelon	88～101	94	80～ 94	89
Onion	85～ 91	89	89～102	96
Flour	98～109	102	78～100	91
Tea leaves	66～107	86	77～ 93	88
Tea extract	83～103	92	86～ 97	92
Carrot juice	91～ 99	95	89～100	96
Apple juice	87～ 96	90	91～107	99

[1)] $n=3$

る場合，反応率が上昇した (Table 2). このときの酢酸濃度は 1 ppm～1% までの範囲で反応率は一定であり，塩化物化後エチル化反応したものと同様のピーク高を得た．これらの結果から，酸化フェンブタスズの -Sn–O–Sn– の結合がはずれ，2 分子のイオンの形（塩化物，酢酸塩）になれば，反応は進行するということが推測された．従って，標準原液の調製を酢酸–ジクロロメタン (1 : 99, v/v) により行うこととし，試料の場合は，操作中にイオン化が達成されると考えられた．

3. 油分の除去

大豆では抽出物に油分が多く，以後の操作が困難であった．油分を除く手段として，ヘキサンとヘキサン飽和アセトニトリルによる分配を検討した．通常の分配操作では，シヘキサチン及び酸化フェンブタスズとも回収されなかった．ヘキサン飽和アセトニトリルに 1～5 v/v% の濃度で酢酸を加えることで，酸化フェンブタスズは良好な回収率が得られたが，シヘキサチンの回収率は低かった．同時分析を行うため，環境試料中のトリブチルスズ (TBT) 及びトリフェニルスズ (TPT) 分析法[8)～11)]で油分の除去などの精製に用いられているイオン交換カラムクロマトグラフィーの操作を行ったところ，酸化フェンブタスズ，シヘキサチンともに良好な回収率が得られ，油分も除去された．

4. 精製条件の検討

フロリジルミニ充てんカラムの溶出条件を検討した．あらかじめヘキサン 10 ml で洗浄し，エチル化物混合標準溶液（10 μg/ml，ヘキサン溶液）1 ml を負荷し，ヘキサン 10 ml，続いてジエチルエーテル–ヘキサン (1 : 99, v/v) で溶出した．エチル化シヘキサチンはヘキサン 10 ml でほとんど溶出されたが，酸化フェンブタスズのエチル化物はヘキサンでは溶出されず，ジエチルエーテル–ヘキサン (1 : 99, v/v) 10 ml で溶出された．そこで，ヘキサン 10 ml で負荷させ，ジエチルエーテル–ヘキサン (1 : 99, v/v) 10 ml で溶出させ，両方の画分を合わせてとることとした．

5. 酸化フェンブタスズ公定法（フレームレス原子吸光法）との比較

きゅうりとほうれんそうを用いて両法の比較試験を行った．きゅうりを用いた添加回収試験では，ほぼ同様の結果を得たが原子吸光光度法ではばらつきが認められた．またほうれんそうでは原子吸光光度法の場合，酸化フェンブタスズが検出されたものがあり (Table 3)，これをエチル化後 GC で測定すると検出されなかった．原子吸光光度法では，他の物質を誤って検出する可能性があると考えられた．酸化フェンブタスズの代謝物であるジ体，モノ体，シヘキサチン，水酸化トリフェニルスズ，アゾシクロチンなどが同一試料に共存する場合，フレームレス原子吸光法では，Sano らの報告[13)]にもあるように前処理段階で分離しておく必要があり，操作が複雑になる．しかし本法では，他の有機スズ化合物との分離定量が可能であった．

6. シヘキサチン公定法（水素化法）との比較

シヘキサチンの公定法は，水素化ホウ素ナトリウム–エタノール溶液を用いて水素化反応し，FPD–GC で測定するものである．混合標準溶液をヘキサンで希釈し 4 μg/ml とし，その 1 ml を公定法に従って反応させ，水素化溶液を作成しガスクロマトグラフに注入したところ，シヘキサチン水素化物の感度はエチル化物の約 50%，酸化フェンブタスズ水素化物はエチル化物の約 35% の感度であった (Fig. 3)．従って，感度の良いエチル化法が微量分析に適していると考えられた．

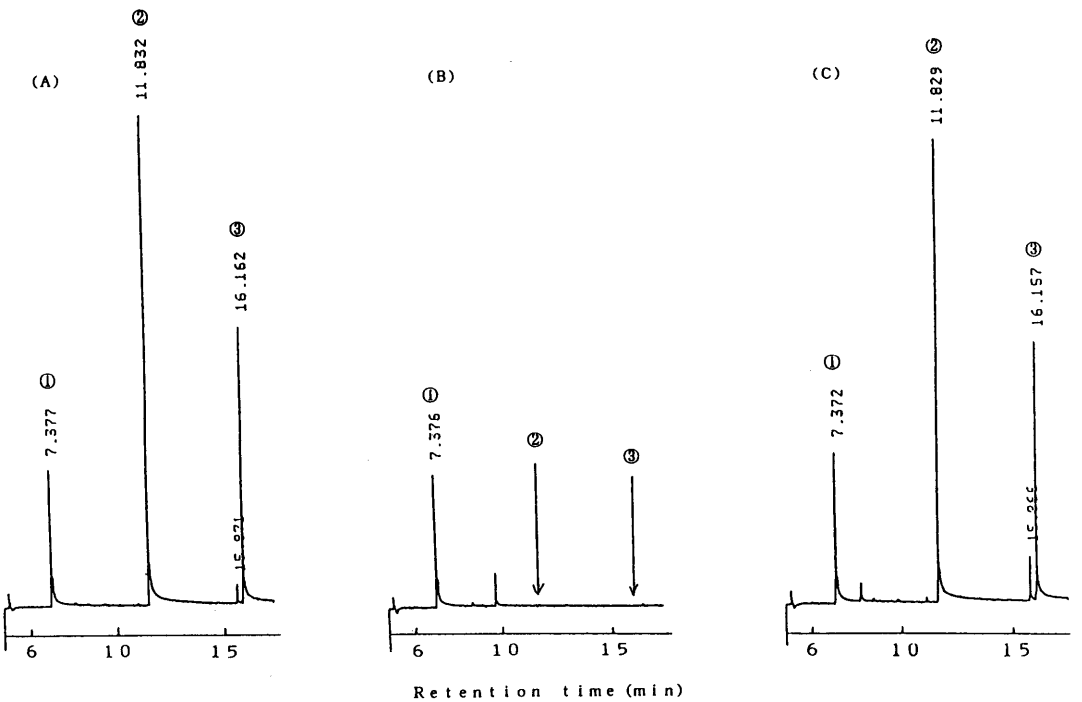


Fig. 4. Gas chromatograms of standard (A: 2 ng), tea leaves extracts (B) and added 1 ppm to tea leaves (C)
Peaks ①: hexyl tributyltin (internal standard); ②: cyhexatin; ③: fenbutatin oxide

7. 添加回収試験

酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンを，大豆，グレープフルーツ，バナナ，すいか，たまねぎ，小麦粉，茶葉，にんじん果汁及びりんご果汁に 1 ppm，緑茶浸出液に 2 μg/120 ml（茶葉当たりに換算すると，1 ppm）添加し，回収試験を行った (Table 4). 回収率は酸化フェンブタスズで 86～102%，シヘキサチンで 80～105%（3 試行の平均値）であった．ガスクロマトグラム上に妨害ピークは認められなかったが，連続注入した場合，注入口及びカラムの汚染による感度の変動があり，注入口のメンテナンスには十分な注意が必要であった．茶葉などの抽出残さの多い試料は，エチル化の際，激しく反応するため注意が必要であった．また，残さのために生成するエマルジョンや Sep-pak フロリジルカラム処理における目づまりなどの操作上の問題点もあった．なお，いずれの市販試料からも酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンは検出されなかった．標準溶液，無添加試料溶液及び添加回収試験溶液のクロマトグラムの一例を示した (Fig. 4). 本法の検出限界は，酸化フェンブタスズ 0.05 ppm，シヘキサチン 0.02 ppm であった．

ま と め

GC による酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンの簡便な同時分析法を確立した．茶葉などの残さの多い試料については，更に精製操作を検討する必要が考えられた．

本研究の一部は，日本食品衛生学会第 64 回学術講演会（1992 年 10 月，奈良）で発表を行った．

文 献

1) 厚生省告示 239 号（平成 4 年 10 月 27 日）.
2) 厚生省告示 199 号（平成 6 年 6 月 9 日）.
3) Cabras, P., Melis, M., Tuberoso, C., Falqui, D., Pala, M.: J. Agric. Food Chem. **40**, 901～903 (1993).
4) 荒井真一：公害と対策 **24**, 1,081～1,108 (1988).
5) 土本一郎：同上 **24**, 1,109～1,116 (1988).
6) 辻 信一：同上 **26**, 367～371 (1990).
7) 森田昌敏：環境化学 **2**, 169～179 (1992).
8) 環境庁環境保健部保健調査室監修："有害化学物質分析法指針" 1992 年版，p. 153～163 (1992) 公害研究対策センター.
9) 高見勝重，奥村為男，山崎裕康，中本雅雄：分析化学 **37**, 117～122 (1988).
10) Maquire, R. J., Hunealt, H.: J. Chromatogr. **209**, 458～462 (1981).
11) Müller, M. D.: Anal. Chem. **59**, 617～623 (1987).
12) Sano, M., Furukawa, M., Kourai, M., Tomita, I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 764～768 (1979).