

# フォトダイオードアレイ検出HPLCによる農作物中のクロリムロ ンエチル及びトリベヌロンメチルの分析

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	橋本, 常生 永山, 敏廣 小林, 麻紀
巻/号	39巻5号
掲載ページ	p. 324-328
発行年月	1998年10月

## ノート

# フォトダイオードアレイ検出 HPLC による農作物中のクロリムロンエチル及びトリベヌロンメチルの分析

(平成 10 年 3 月 30 日受理)

橋本常生\* 永山敏廣\* 小林麻紀\* 羽石奈穂子\*  
伊藤正子\* 田村康宏\* 友松俊夫\*

## Analysis of Chlorimuron Ethyl and Tribenuron Methyl in Crops by HPLC with a Photodiode Array Detector

Tsuneo HASHIMOTO, Toshihiro NAGAYAMA, Maki KOBAYASHI, Nahoko HANEISHI, Masako ITO, Yasuhiro TAMURA and Toshio TOMOMATSU

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

An analytical method for determination of sulfonylurea herbicides, chlorimuron ethyl (CE) and tribenuron methyl (TM), in crops by HPLC was developed.

The sample was homogenized with acetone followed by extraction with ethyl acetate, and the extract was evaporated. The residue was defatted by acetonitrile-*n*-hexane partitioning for soybean, peanut and corn grits. The residue was cleaned up with a Florisil column and a Bond Elut<sup>®</sup> SAX cartridge column. CE and TM were separated on an HPLC column (Inertsil ODS-2) using acetonitrile-water-phosphoric acid (50:50:0.01) as the mobile phase. These compounds were detected at 240 nm.

The mean recoveries of these compounds added to crops at the level of 0.1 ppm were 59~84% (CE) and 54~79%, except for peanut (TM). The detection limits of CE and TM in crops were 0.01 ppm.

(Received March 30, 1998)

**Key words:** クロリムロンエチル chlorimuron ethyl; トリベヌロンメチル tribenuron methyl; 農作物 crops; 除草剤 herbicide; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; フォトダイオードアレイ検出器 photodiode array detector; フロリジルカラム florisil column; 固相抽出カートリッジ solid phase extraction cartridge; ボンドエルート SAX Bond Elut<sup>®</sup> SAX

### 緒言

クロリムロンエチル (CE) 及びトリベヌロンメチル (TM) (Fig. 1) はスルホニルウレア系の除草剤で、平成 9 年 9 月 1 日付で食品衛生法の農薬残留基準が設定された。CE は大豆、落花生に対し 0.05 及び 0.02 ppm, TM は穀類などに対し 0.05~0.1 ppm の残留基準値が設けられた<sup>1)</sup>。また米国やカナダなどにおいても CE は大豆、落花生など、TM は穀類などに対し同濃度レベルの残留

許容量が設定されている<sup>2)</sup>。CE 及び TM は国内で農薬登録されていないが、海外で使用されているため輸入農産物やその加工品に残留する可能性があり、その残留実態の把握が必要である。

一般的にスルホニルウレア系除草剤は熱に不安定であることから GC で分析することは困難である<sup>3)</sup>。そのため CE 及び TM の分析にはキャピラリー電気泳動<sup>3)~5)</sup>や HPLC<sup>6)</sup> が用いられている。特に農作物等を対象とした分析法としては、電気伝導度検出器を用いた HPLC<sup>7)</sup>、キャピラリー電気泳動<sup>8)</sup> による報告例があるが、汎用される紫外部吸収検出器やフォトダイオードアレイ

\* 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

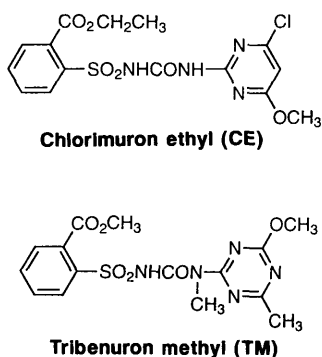


Fig. 1. Chemical structures of chlorimuron ethyl (CE) and tribenuron methyl (TM)

(PDA) 検出器を用いた HPLC による分析例は現在のところ報告されていない。今回、大豆や数種の農作物を対象に CE 及び TM の PDA 検出器を用いた HPLC による分析法を検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

市販の大豆、落花生、コーングリッツ、きゅうり、にんじん、りんご、トマト、レタス、ほうれんそう、キャベツ及びたまねぎを用いた。

### 2. 試薬

CE 標準液：CE 標準水溶液 (10 ng/ $\mu$ L, Dr. Ehrenstorfer GmbH 製) を水又はアセトニトリルで希釈した。

TM 標準液：TM 標準品 (Riedel-de Haën 社製) をアセトンに溶解し 1,000  $\mu$ g/mL の標準原液を作製し、水又はアセトニトリルで適宜希釈した。

有機溶媒等：アセトニトリルは HPLC 用、リン酸は試薬特級を、その他は残留農薬試験用を使用した。

フロリジルカラム：Florisil PR (和光純薬工業(株)製) を 130°C で 12 時間以上活性化しデシケーター中で放冷後、これに水 5% を加えてよく混和した。その 5 g を内径 15 mm のガラスカラムにメタノール-アセトン (5:95) で湿式充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層して調製した。

固相抽出 (SPE) カートリッジカラム：Bond Elut® SAX (500 mg/3 cc, Varian 社製)

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ：フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10AV), ポンプ (LC-10AT), オートサンプラー (SIL-10A), データ処理システム (CLASS-LC10) いずれも (株)島津製作所製

### 4. 試験溶液の調製法

#### 4.1 抽出操作

細切した試料 20 g (大豆及び落花生は粉碎した後、その 10 g に水 20 mL を加えて 2 時間放置) にアセト

ン 100 mL を加えてホモジナイズした。吸引ろ過後、残さにアセトン 50 mL を加えて同様に操作し、ろ液を合わせた。

ろ液を 40°C 以下で約 30 mL に減圧濃縮し、10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL で抽出した。更に酢酸エチル 50 mL で抽出した後、抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水して減圧濃縮した。

#### 4.2 脱脂操作

大豆、落花生及びコーングリッツなど脂肪含量が多い試料は脱脂操作を行った。4.1 の濃縮残留物を *n*-ヘキサン 50 mL で溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 80 及び 50 mL で分配した。アセトニトリル層をアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 50 mL で洗浄し減圧濃縮した。

#### 4.3 精製操作

##### 1) フロリジルカラム

あらかじめ調製したフロリジルカラムに 4.1 又は 4.2 の濃縮残留物を少量のメタノール-アセトン (5:95) に溶解して負荷し、同混液 50 mL で洗浄した。次にメタノール-アセトン (10:90) 100 mL で溶出後、減圧濃縮した。

##### 2) Bond Elut® SAX カートリッジカラム

アセトン-*n*-ヘキサン (50:50) 20 mL でコンディショニングしたカラムに 1) で精製した残留物を少量のアセトン-*n*-ヘキサン (50:50) を用いて負荷し、同混液 15 mL で溶出した。

溶出液を減圧濃縮後、アセトニトリル-水 (50:50) 2 mL (大豆などは 1 mL) に溶解して HPLC 用試験溶液とした。

#### 4.4 HPLC の測定条件

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×250 mm, 粒径 5  $\mu$ m, ジェールサイエンス社製)

移動相：アセトニトリル-水-リン酸 (50:50:0.01)

流速：1 mL/min, 注入量：20  $\mu$ L, カラム温度：50°C

測定波長：240 nm

#### 結果及び考察

##### 1. HPLC の測定条件

本分析条件で、PDA 検出器を用いて CE 及び TM の紫外外部吸収スペクトルを観察したところ、それぞれ 234 及び 233 nm に極大吸収が得られた。しかし、極大吸収波長付近で測定するとベースラインのノイズや共存物質の妨害ピークの強度も大きくなったため、より妨害の少ない 240 nm で測定することとした。

CE 及び TM などのスルホニルウレア系除草剤の HPLC 分析は、逆相系カラムを用い移動相はアセトニトリル-水などの系にリン酸又は酢酸を加え pH を調整して測定する方法が多い<sup>6), 7), 9)-11)</sup>。そこで本分析でも逆相系の ODS カラムを用いることとした。移動相には酢

酸が短波長側に吸収があり、ベースラインの安定性やPDAでのスペクトルに影響する可能性があるため、リン酸酸性アセトニトリル-水系の使用を検討した。Fig. 2にリン酸を加えpHを2~5に調整した移動相(アセトニトリル-水 50:50)を用い、CE及びTMを測定したときの保持容量( $K'$ )を示した。pH 5では標準物質の保持時間が短く試料由来の共存物質の妨害を受けた。pHが2.0~4.0の範囲ではほぼ安定した保持容量を示し、ピーク形状も良く、妨害ピークとの分離も良好であった。アセトニトリル-水-リン酸(50:50:0.01)はpHが約2.7で、安定した保持容量を示すpHの範囲内であり、移動相をこの組成に調製して分析することとした。

## 2. 試験溶液の調製法

### 2.1 抽出操作

農薬の告示分析法<sup>12)</sup>で一般的に採用されている抽出方法を検討した。すなわち、アセトンによるホモジナイズ、酢酸エチルでの転溶操作を用いて、CE及びTMの標準水溶液(10 µg/mL, 0.1 mL)を水に添加し回収率を求めたところ、それぞれ97.8%及び91.6%と高い回収率が得られた。なお、TMが酸性下で不安定であることから、同じスルホニルウレア系除草剤であるイマズスルフロンの告示分析法で塩酸を添加しての抽出操作を適用することは困難であった。

### 2.2 脱脂操作

簡便な脱脂操作が可能な多孔質ケイソウ土を充てんしたカラム(エクストレール)とn-ヘキサン-アセトニトリル分配を検討した。エクストレールへはCE及びTMをジクロロメタンに溶解後負荷し、アセトニトリルで溶出したが特にCEの回収が45%以下であり、満足する回収が得られなかった。一方n-ヘキサン-アセトニトリル分配は大豆など夾雑物の多い試料でエマルジョンを形成することがあるため、告示分析法で通常用いられる溶媒量(ヘキサン30 mL, アセトニトリル30 mL×3)

を増加して分配した。その結果、エマルジョンの影響が少なく操作性も向上した。n-ヘキサン50 mLにCE及びTMのアセトニトリル標準溶液(10 µg/mL, 0.1 mL)を加え、本分析法のとおり分配したときの回収率はそれぞれ98.0及び88.6%と良好であった。

## 2.3 精製操作

### 1) フロリジルカラム

固相抽出(SPE)カートリッジカラムは操作の簡便化、溶媒の少量化などの利点から汎用されてきている、そこで本研究でも農薬の精製に汎用されるフロリジルやシリカゲルが充てんされたカートリッジカラム(Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Florisil, Silica)を使い、アセトン-n-ヘキサン混液によるCEの溶出及び回収を検討した。

CEは極性が高く、アセトン-n-ヘキサン(40:60)より高い極性の溶媒でないと溶解しにくく、濃縮残留物のカラムへの定量的な負荷ができなかった。そこでアセトン-n-ヘキサン(50:50)で負荷し、順次溶媒の極性を上

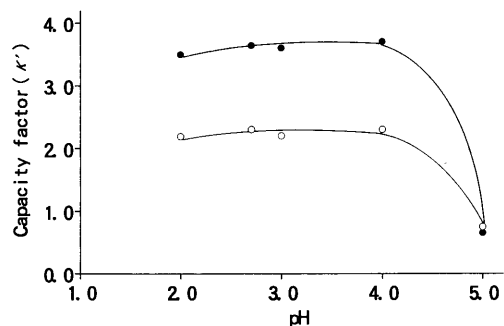


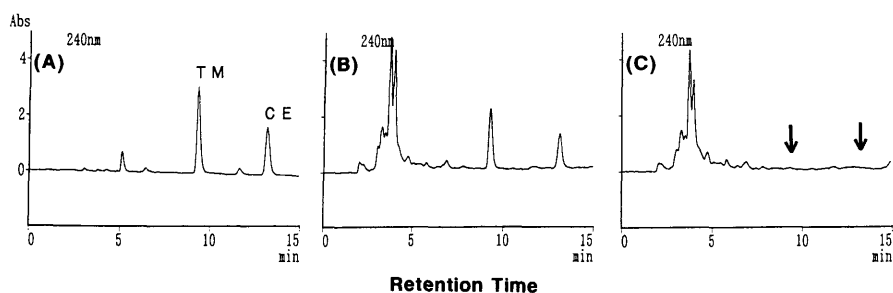
Fig. 2. Effect of pH of mobile phase on capacity factor ( $K'$ )  
●—●: chlorimuron ethyl, ○—○: tribenuron methyl  
Mobile phase: MeCN-H<sub>2</sub>O (50:50), pH was adjusted by phosphoric acid.

Table 1. Elution Pattern of Chlorimuron Ethyl and Tribenuron Methyl from Florisil Column

Elution solvent	Fraction (mL)	Recovery (%)	
		CE	TM
MeOH-acetone (5:95)	0~ 50	0.0	0.0
MeOH-acetone (10:90)	0~ 20	9.2	33.9
	20~ 40	77.8	55.6
	40~ 60	22.8	2.7
	60~ 80	6.1	0.0
	80~100	0.0	0.0
Total		105.9	97.2

Florisil column: After activation (130°C, 12 hr), florisil was deactivated with addition of 5% of H<sub>2</sub>O and mixed well. The column was prepared with MeOH-acetone (5:95).

The abbreviations of compound names are shown in Fig. 1.



**Fig. 3.** HPLC chromatograms of (A) standard (each 20 ng), (B) spiked (0.1 ppm) and (C) blank soy beans extract

HPLC conditions; column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 250 mm), mobile phase: MeCN-H<sub>2</sub>O-phosphoric acid (50:50:0.01), flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 50°C, detection: 240 nm (photodiode array detector)

The abbreviations of compound names are shown in Fig. 1.

げて溶出した。Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Florisil は CE がアセトンでも溶出されず、更に極性の高いメタノール-酢酸エチル (40:60) 20 mL で約 60% が溶出された。同じスルホニルウレア系除草剤のイマズスルフロシド及びベンシルフロシドの告示分析法<sup>12)</sup> でシリカゲルカートリッジカラムを用いアセトン溶出で精製が行われている。そのため Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Silica を用い同時に精製が可能であるか検討したところ、CE はアセトン-*n*-ヘキサン (50:50) で溶出し始めたがアセトンでも 30 mL 以上の溶出容量が必要で回収も約 70% であった。また、大豆を用い各カートリッジカラムの精製効果を検討したところクロマトグラム上、早い保持時間に出現する妨害ピークの除去が困難であり、より効果的な精製法が必要となった。そこで、充てん剤の活性を容易に調整できるオープンカラムでのカラムクロマトグラフィーを検討した。カートリッジカラムの検討結果からシリカゲルでは溶出範囲が広く、多量の溶媒が必要となる可能性があるため、より少量の溶媒で溶出可能なフロリジルについて検討を加えた。Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Florisil からアセトンでの溶出が困難であったことから、水を 5% 添加して活性を下げたフロリジルを用い、CE 及び TM の溶出を観察した。CE 及び TM はアセトン 50 mL を流下させても溶出しなかった。更にメタノール-アセトンの混液を用いて溶出を試みたところ、メタノール-アセトン (5:95) 約 80 mL で TM が溶出し始めた。そこで、メタノール-アセトン (5:95) でフロリジル (5% 含水) をカラムに充てん、同混液で CE 及び TM を負荷後、50 mL で洗浄し、メタノール-アセトン (10:90) で溶出した。このときの溶出画分の回収率を Table 1 に示した。CE 及び TM の溶出が 80 mL で終了するため、100 mL を溶出画分とした。CE 及び TM の回収率はいずれも 90% 以上で、クロマトグラム上の妨害ピークもほとんど除くことができた。

**Table 2.** Recoveries of Chlorimuron Ethyl and Tribenuron Methyl from Spiked Samples

Sample	Recovery (%)	
	CE	TM
Cucumber	81.6 ± 7.0	78.7 ± 7.6
Carrot	76.5 ± 1.5	70.6 ± 1.4
Apple	79.4 ± 6.2	71.0 ± 5.7
Tomato	76.2 ± 2.0	63.4 ± 2.1
Lettuce	78.3 ± 2.1	57.1 ± 3.7
Spinach	78.6 ± 7.1	53.5 ± 6.0
Cabbage	68.8 ± 6.0	75.0 ± 4.1
Potato	72.3 ± 1.3	75.0 ± 1.7
Onion	69.0 ± 3.3	71.9 ± 2.7
Corn grits	83.9 ± 6.6	66.7 ± 7.6
Soy bean	66.1 ± 2.6	57.5 ± 4.4
Peanut	58.7 ± 9.0	27.1 ± 5.7

The values are mean ± S.D. (*n* = 3).

Each sample was spiked with CE and TM at levels of 0.1 ppm, respectively.

The abbreviations of compound names are shown in Fig. 1.

## 2) Bond Elut<sup>®</sup> SAX

フロリジルカラムによる精製ではほとんどの試料は良好なクロマトグラムが得られたが、大豆や落花生など、試料によっては、ベースライン上に妨害となる微小なピークが観察される場合があり、CE や TM と誤認する可能性が考えられる。そこで、簡便な精製を行うため数種の SPE カートリッジカラム (Sep-Pak<sup>®</sup> Plus NH<sub>2</sub>, Diol, 及び Bond Elut<sup>®</sup> SAX, PSA) を使い溶出及び精製効果を検討した。その結果、Bond Elut<sup>®</sup> SAX を用いアセトン-*n*-ヘキサン (50:50) 15 mL の溶出により、ベースライン上のピークも除去でき、妨害のない良好なクロ

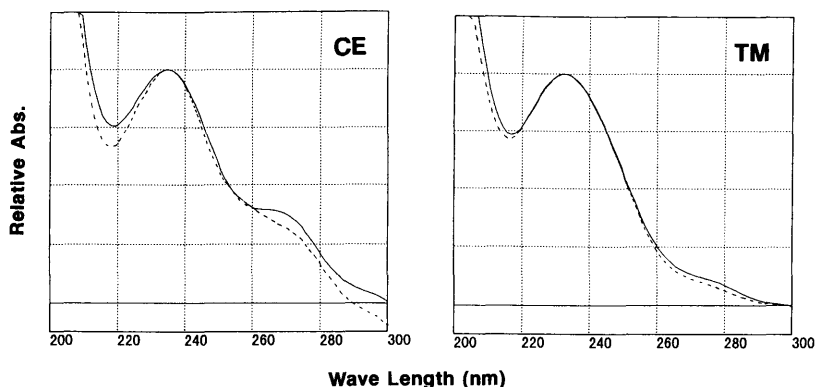


Fig. 4. Spectra of CE and TM in standard solution and spiked sample extract

—: spectra of standard solution

.....: spectra of spiked soy beans extract (0.05 ppm)

The abbreviations of compound names are shown in Fig. 1.

マトグラムが得られた。そのときのCE及びTMの回収率はそれぞれ95.8%及び96.0%と良好であった。

また、SPEカートリッジカラム単独での精製では妨害ピークの除去は困難で、フロリジルカラムとの併用で効果的な精製が可能であった。

### 3. 添加回収実験

農産物の試料11種を用い0.1 ppmになるように標準品を添加し、本法で分析したときの回収率をTable 2に示した。CEで59~84%、TMでは残留基準の対象農産物になっていない落花生で27%と低くその他の試料では54~79%の結果であった。落花生は脂溶性の夾雑物が多く、分配操作でのエマルジョンや精製操作における共存物質の影響が回収を低くした原因と考えられる。

添加回収実験での代表的なクロマトグラムをFig. 3に示した。妨害ピークのない、良好なクロマトグラムが得られた。本分析法の定量限界はいずれも0.01 ppmであった。

### 4. 吸収スペクトルによる確認

PDA検出器を用いCE及びTMの標準溶液(各1 µg/mL)で得た吸収スペクトルと、試料(大豆)中に標準品が0.05 ppmになるように添加して得られた試験溶液の吸収スペクトルをFig. 4に示した。またこれらのスペクトルの相関性を数値的に評価する方法として、PDAのデータ処理システムのピーク同定機能を用いた。すなわち、標準溶液で得た吸収スペクトルをライブラリーに登録し、標準品添加試料の吸収スペクトルをライブラリー検索し類似度を求めた結果、CEが0.9982、TMが0.9987と高い類似度が得られた。したがって、PDAによる確認は、大豆の基準値(CE 0.05 ppm)の濃度で確認手法の一つとして活用できるものとする。

### 5. 市販農作物の残留調査

国内で市販された輸入品の大豆5検体、落花生2検

体、コーングリッツ2検体及びたまねぎ2検体、きゅうり、にんじんなど12種、計19検体について、本法を用いて調査したが、いずれからもCE及びTMは検出されなかった。

なお本法は平成9年9月1日付厚生省告示179号のクロリムロンエチル及びトリベヌロンメチル試験法として告示された。

また本研究の一部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) 厚生省告示第179号: 平成9年9月1日(1997).
- 2) Environmental Protection Agency: "Code of federal regulations 40-Protection of environment" (1995).
- 3) Garcia, F., Henion, J.: J. Chromatogr. **606**, 237~247 (1992).
- 4) Dinelli, G., Vicali, A., Brandolini, V.: J. Chromatogr. A **700**, 201~207 (1995).
- 5) Penmetsa, K., Leidy, R. B., Shea, D.: *ibid.* **745**, 201~208 (1996).
- 6) Galletti, G. C., Bonetti, A., Dinelli, G.: *ibid.* **692**, 27~37 (1995).
- 7) Prince, J. L., Guinivan, R. A.: J. Agric. Food Chem. **36**, 63~69 (1988).
- 8) Krynetsky, A. J., Swineford, D. M.: J. AOAC Int. **78**, 1,091~1,096 (1995).
- 9) Howard, A. L., Taylor, L. T.: J. Chromatogr. Sci. **30**, 374~382 (1992).
- 10) 田中幸雄, 小形 勝: 分析化学 **44**, 1,067~1,070 (1995).
- 11) Lian, H. Z., Zhang, W. B., Jiang, Q., Miao, J.: J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. **19**, 207~216 (1996).
- 12) 厚生省生活衛生局監修: "食品衛生小六法 平成10年版" p. 455~633 (1997) 新日本法規出版.