ノート

HPLC による農産物中の Acibenzolar-S-methyl 及び分解物の分析法

(平成 12 年 7 月 28 日受理)

高 附 巧* 根 本 了* 堤 智 昭*
佐々木久美子* 豊田正武*Determination of Acibenzolar-S-methyl and Its Degradation Product
in Agricultural Products by HPLC

Satoshi TAKATSUKI, Satoru NEMOTO, Tomoaki TSUTSUMI, Kumiko SASAKI and Masatake TOYODA

(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

A method was developed for analysis of acibenzolar-S-methyl (benzo[1,2,3]thiodiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, BTH) and its decomposition product, benzo[1,2,3]thiodiazole-7-carboxylic acid (BTC), in grains by HPLC and LC/MS.

BTH and BTC were extracted from grains with 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 8.0) and acetone. BTH was extracted from the acetone extract (adjusted to pH 7.5~8.5) with diethylether-*n*-hexane (1:1). The remaining acetone extract was adjusted to <pH 3, and BTC was extracted with diethylether-*n*-hexane (1:1). The BTH extract was cleaned up on Florisil column after having been defatted by *n*-hexane-acetonitrile partition. The BTC extract was directly cleaned up on a Florisil column. BTH and BTC were determined by HPLC with UV or LC/MS (Scan or SIM). Recoveries of both compounds from rice, wheat and corn spiked at the level of 0.1 µg/g were in the range of 76.8~86.7% (standard deviation was 0.3~2.7%). The limits of detection were 0.003 µg/g (BTH) and 0.008 µg/g (BTC) by HPLC/UV.

(Received July 28, 2000)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS; 植物活性物質 plant activator; 農作物 agricultural products; フロリジル Florisil

アシベンゾラル-S-メチル (benzo[1,2,3]thiodiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, BTH) はチバガイギ (現スイス・ノバルティス社) が開発したベンゾチアゾール系の新規化合物で水稲いもち病防除に使用される長期残効型育苗箱処理剤で、殺菌剤とは異なり、この化合物には殺菌・抗菌作用はなく、植物が本来持つ自己防衛反応機構を活性化させ、病気にかかりにくい植物体へと改善する植物活性物質 (plant activator) として植物に作用する¹⁾。

農薬登録保留基準 (以下保留基準) の分析法²⁾ は、弱塩基性下アセトン (A) で抽出し、pH を調節して BTH 及び分解物 benzo[1,2,3]thiodiazole-7-carboxylic acid (BTC) をエーテル (E)-ヘキサン (H) で分別して再抽出する。BTH 試験用抽出画分は凝固法により脱脂し、凝固液から抽出した後、フロリジルカラムにより精製を行い HPLC により測定する。BTC 試験用抽出画分は SAX ミニカラムにより精製し、溶出液から酸性下で抽出し HPLC により測定するという方法である。

保留基準の分析法以外に農産物中の BTH の分析法に関する報告はみられない。

しかし、保留基準の分析法において脱脂法は比較的簡便な H/アセトニトリル (MeCN) 分配ではなく、より時間のかかる凝固法を採用していること、また、この分析法の再抽出溶媒の H-E 比では、BTC が 50% 程度しか回収しないこと、BTC の再抽出をリン酸酸性下で行って弱酸性化合物を集めているのにもかかわらず、精製を陰イオン交換相である SAX ミニカラムで行っており後述のとおり精製が不十分なことなどから、BTH の残留分析法について検討する必要があるものと考えられたので、HPLC による穀類中の BTH 残留分析法について検討した。また、対象とする農薬 BTH はエステル化合物であることから加水分解を受け BTC となり残留していることが考えられ、保留基準の分析においても分析の対象となっていることから、BTH の分解物である BTC についても保留基準の分析法と同様に対象とした。

LC/MS による測定についても検討を行ったので報告する。

* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1. 試料

米 (玄米), 小麦 (玄麦) 及びとうもろこし (イエローコーン) を添加回収実験用の試料とした。

2. 試薬及び標準物質

標準物質: ノバルティス社製の BTH (純度 99.8%), ノバルティス社製の BTC (純度 99.4%)。

BTH 標準原液: BTH を 20.0 mg 精ひょうし, MeCN を加えて 20 mL とした。

BTC 標準原液: BTC を 20.0 mg 精ひょうし, 水 5 mL 及びメタノール (MeOH) を加えて 20 mL とした。

BTH 標準溶液: BTH が 1.0 $\mu\text{g/mL}$ になるように標準原液を採り MeCN で希釈調製した。

BTC 標準溶液: BTC が 1.0 $\mu\text{g/mL}$ になるように標準原液を採り MeOH で希釈調製した。

その他の試薬試液は, 片山化学工業 (株) 製, 関東化学 (株) 又は和光純薬工業 (株) 製の残留農薬試験用, 精密分析用もしくは特級を用いた。

フロリジル: フロリジル PR を 130°C で一昼夜活性化させた後, デシケーター中で放冷し, 室温とした。

3. 装置

3.1 UV 検出器付高速液体クロマトグラフ: システムコントローラー SCL-10A VP; オートインジェクター SIL-10AD VP; ポンプ LC-10A VP; カラムオープン CTO-6A; UV 検出器 SPD-10A VP ((株) 島津製作所製)

3.2 液体クロマトグラフ/質量分析装置: 送液ポンプ; 脱気装置; カラムオープン; 注入装置 2690 Separations module (Waters 社製); MS 検出器 Platform LCZ (Micromass 社製)

4. 操作条件

4.1 HPLC 装置: カラム Inertsil ODS-2 (4.6 $\times$ 150 mm i.d., GL サイエンス (株) 製), カラム温度 40°C, 注入量 40 μL , 流速 1.0 mL/min, 移動相 BTH の場合; 0.5% 酢酸溶液 (AcOH)-MeCN (3:2), BTC の場合; 0.5% AcOH-MeOH (3:1), 測定波長 BTH の場合; 254 nm, BTC の場合; 235 nm。

4.2 LC/MS 装置: カラム Inertsil ODS-2 (2.1 $\times$ 150 mm i.d., GL サイエンス (株) 製), カラム温度 40°C, 注入量 10 μL , 流速 0.2 mL/min, 移動相上記 4.1 に同じ。MS パラメータ ソースブロック温度; 150°C, BTH 測定時; エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) ポジティブ, キャピラリー電圧; 3.5 kV, モニターイオン及びコーン電圧; Table 1, BTC 測定時; ESI ネガティブ, キャピラリー電圧; 3.0 kV, モニターイオン及びコーン電圧; Table 1。

5. 試験溶液の調製

5.1 BTH の抽出

試料 10.0 g に 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0) 20 mL を加え 2 時間放置した。これに A 100 mL を加え, 1~2 分間ホモジナイズした後, 吸引ろ過した。残さを

Table 1. Monitoring Ions and Corn Voltage for LC/MS Analysis of BTH and BTC

	Monitoring ions (<i>m/z</i>)		Corn voltage (V) ^{b)}	ESI mode
	Scan	SIM ^{a)}		
BTH	70~230	211, 136	40, 70	Positive
BTC	-50~-200	-179, -107	-25, -50	Negative

^{a)} Gothic: quantity ion; other: qualifier ion

^{b)} Gothic: voltage for quantity ion; other: voltage for qualifier ion

0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0) 20 mL 及び A 50 mL で 1~2 分間ホモジナイズした後, 上記と同様に操作し, 前のろ液と合わせ, 40°C 以下で約 50 mL に濃縮した。

これに 10% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え, 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液約 1 mL で pH 7.5~8.5 に調整した。これを E-H (1:1) 100 mL 及び 50 mL で再抽出した。

この抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し, 40°C 以下で濃縮乾固した。この残留物を H 30 mL に溶解し, H 飽和 MeCN 30 mL で 3 回抽出した。この MeCN 層を 40°C 以下で濃縮乾固し, 残留物を E-H (3:17) 5 mL に溶解した。

5.2 BTC の抽出

5.1 の操作を行い, BTH を再抽出した後の水層にリン酸 0.5 mL を加え酸性にした後, E-H (1:1) 50 mL で 2 回再抽出した。この抽出液を脱水し, 40°C 以下で濃縮乾固した。この残留物を MeOH-酢酸エチル (EA) (1:4) 5 mL に溶解した。

5.3 BTH の精製

内径 1.5 cm のカラムに, フロリジル 5.0 g 及び無水硫酸ナトリウム約 5 g を H で順次充てんした。このカラムに 5.1 で得た溶液を注入し, E-H (3:17) 50 mL で洗浄した。次いで E-H (1:1) 150 mL で溶出し, 流出液を集め, 40°C 以下で濃縮乾固した。この残留物に 0.5% AcOH-MeCN (3:2) を加えて溶解し, 正確に 5.0 mL として, これを BTH 試験溶液とした。

5.4 BTC の精製

内径 1.5 cm のカラムに, フロリジル 5.0 g 及び無水硫酸ナトリウム約 5 g を EA で順次充てんした。このカラムに 5.2 で得た溶液を注入し, MeOH-EA (1:4) 50 mL で洗浄した。次いで MeOH-EA (3:7) 200 mL で溶出し, 流出液を集め, 40°C 以下で濃縮乾固した。この残留物を 0.5% AcOH-MeOH (3:1) に溶解し, 正確に 2.0 mL として, これを BTC 試験溶液とした。

この試験溶液調製法の概略を Scheme 1 に示した。

6. 添加回収実験

均一化した試料 10.0 g に BTH 又は BTC 標準溶液 1.0 mL (試料当たり 0.1 $\mu\text{g/g}$ 相当) を添加し, 上記 5 に従い試験溶液を調製し, HPLC 及び LC/MS で測定して回収率を求めた。また, LC/MS で定性を行った。

Scheme 1. Analytical procedure for BTH and BTC in sample

7. 検量線の作成

BTH は $0.005 \sim 1 \mu\text{g/mL}$, BTC は $0.025 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ の溶液を数点調製し検量線を作成し、定量を行った。

実際に作物中の BTH の含量を求める場合は BTH 及び BTC の含量を求め、次式により、BTC を含む BTH の含量として求める。

$$\text{BTH (BTC を含む) の含量 (ppm)} = A + B \times 1.17$$

A: BTH の含量 (ppm), B: BTC の含量 (ppm)

結果及び考察

1. HPLC による測定条件

Fig. 1 に BTH 及び BTC の UV254 及び 235 nm におけるクロマトグラムを示した。

測定用の移動相は、LC/MS による測定も可能にするため保留基準の分析法でのリン酸-MeCN 系から BTH は

$0.5\% \text{ AcOH-MeCN (3:2)}$, BTC は試料からの妨害を考慮し $0.5\% \text{ AcOH-MeOH (3:1)}$ とした (下記 5 参照)。

測定波長は、各化合物の極大吸収波長付近とした。

検量線は良好な直線性を示した (BTH: $R^2 = 0.9998$, BTC: $R^2 = 0.9956$)。

検出限界は、シグナル/ノイズ比を 3 とすると標準溶液で BTH が $0.003 \mu\text{g/g}$, BTC が $0.008 \mu\text{g/g}$ であった。

2. 抽出条件の検討

BTH 及び BTC は中性及び弱酸性化合物であることから、同一条件で精製を行うことができない。また、これらの化合物の性質の違いを利用して別々に行った方が、妨害の減少も期待できる。

そこで試料を A 抽出した溶液から一度に再抽出せず pH を調節して E-H で別々に再抽出することとし、E-H の混合比について水溶液で検討した。その結果、抽出溶媒は保

Fig. 1. High performance liquid chromatograms of BTH (8 ng) and BTC (20 ng)
A: BTH (UV=254 nm), B: BTC (UV=235 nm)

Table 2. Recovery of BTH and BTC from Grains Determined by HPLC/UV

Spiked pesticides	Detected pesticides	Recovery (%) ^{a)}		
		Rice	Wheat	Corn
BTH	BTH	70.6±0.3	76.8±2.7	78.8±0.9
	BTC	16.1±0.4	—	—
	Total	86.7±0.5	76.8±2.7	78.8±0.9
BTC	BTC	73.9±2.3	83.2±2.7	81.6±0.3

^{a)} Values are mean±S.D. (n=3). Spiked level: 0.1 µg/g

留基準の分析法の E-H (3:7) ではなく E-H (1:1) が最も良い回収率を得た。このときの回収率は BTH は塩基性溶液 (pH 7.5~8.5) から $93.9\pm2.6\%$, BTC はリン酸酸性溶液から $98.4\pm1.8\%$ であった (n=3)。

3. 脱脂操作法の検討

米、穀類の BTH の溶媒抽出画分には、多くの油脂成分が抽出されてくることから、脱脂操作が必要となる。

脱脂の方法には、凝固法、固相抽出法、H/MeCN 分配などがある。保留基準の分析法で採用されている凝固法では凝固処理後、再度水溶液から抽出を行う必要があり操作が複雑になる。また、固相抽出法では、油脂がオーバーロードとなり脱脂効果が低下することが考えられる。そこで H/MeCN 分配について検討し、BTH 標準溶液を H 30 mL に添加し H 飽和 MeCN 30 mL で 3 回抽出した結果、回収率は $94.6\pm2.1\%$ であった (n=3)。

4. BTH の精製法の検討

保留基準の方法同様、フロリジルカラムにより精製を行うこととした。保留基準の方法は試料の BTH 抽出溶液 (H 溶液) をフロリジルカラムに付し、H 15 mL 及び E-H (1:19) 50 mL で洗浄し、E-H (1:1) 150 mL で BTH を溶出するというものである。この 2 種類の溶媒系による洗浄を 1 種類の溶媒系とすればより簡便な方法となることからフロリジルでの精製条件を再検討して、E-H (3:17) 50 mL で洗浄、E-H (1:1) 150 mL で溶出するように変更した。このときの回収率は $78.8\pm0.9\%$ (n=3) であった。

5. BTC の精製法の検討

保留基準の分析法で使われている SAX ミニカラムでの精製法について米抽出液で検討したが、HPLC において、分析時間全体にわたり米由来のピークが観察され、そのうちの 1 つが BTC の保持時間付近に妨害ピークとして認められた。また、SAX ミニカラムによる精製法では、もう一度分配により再抽出を行う必要がある。よって、より分離の良いフロリジルカラムでの精製条件を検討した。

まず標準溶液で MeOH-EA を溶出溶媒として検討した結果、MeOH-EA (1:4) 50 mL で洗浄し、MeOH-EA (3:7) 200 mL で溶出することとした。このときの回収率は $87.7\pm3.2\%$ (n=3) であった。米抽出液で HPLC クロマトグラム上の妨害について検討したところ、BTC の保持時間より遅く溶出するピークは除くことができたが、BTC の保持時間付近にはやや妨害がみられた。そこで、HPLC の条件を再検討し、移動相を 0.5% AcOH-MeCN (17:3) から 0.5% AcOH-MeOH (3:1) に変更することにより妨害を受けずに分析を行うことができた。

6. 農産物に対する添加回収実験

米、小麦及びとうもろこしに対する添加回収実験の結果を Table 2 に示した。また、各無添加試料の UV におけるクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

回収率は、BTH で 77~87%, BTC で 74~83% であった。標準偏差は 0.3~2.7 と回収率及び標準偏差ともに良好な結果を得た。BTH を添加した米において約 16% の BTC への分解が観察された。小麦及びとうもろこしでは BTC への分解は観察されなかった。米における BTH から BTC への分解は小麦及びとうもろこしでは観察されなかったことから米特有の成分によるものではないかと考えられる。

また、この試験溶液の調製法で再抽出が終わるまで 4 時間ぐらいを要し、脱脂及びカラムによる精製に 7 時間ぐらいを要した。

7. LC/MS による測定

LC/MS による測定条件について検討した結果、BTH は、ESI ポジティブ、コーン電圧 40 V で分子イオンの m/z 211 $[M+H]^+$ が観察され、70 V では BTH から

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of blank samples for BTH and BTC
A: BTH test solution, B: BTC test solution

Fig. 3. Mass spectra of BTH (A) and BTC (B) by LC/MS

A-1: Scan ($m/z=50\sim230$, corn voltage; 40 V), A-2: Scan ($m/z=50\sim230$, corn voltage; 70 V), B-1: Scan ($m/z=-70\sim-200$, corn voltage; -25 V), B-2: Scan ($m/z=-70\sim-200$, corn voltage; -50 V)

Table 3. Recovery of Acibenzolar-S-methyl and BTC from Grains Determined by LC/MS

Spiked pesticides	Detected pesticides	Recovery (%) ^{a)}					
		Scan ^{b)}			SIM		
		Rice	Wheat	Corn	Rice	Wheat	Corn
BTH	BTH	66.5±14.6	86.5±20.6	73.8±10.6	69.8±4.9	74.6±2.1	78.6±3.4
	BTC	15.2±0.8	—	—	15.8±2.6	—	—
	Total	81.7±14.0	86.5±20.6	73.8±10.6	85.6±3.1	74.6±2.1	78.6±3.4
BTC	BTC	77.2±1.9	83.2±1.2	87.1±2.6	76.9±1.8	83.1±1.6	93.5±1.6

^{a)} Values are mean±S.D. ($n=3$). Spiked level: 0.1 µg/g

^{b)} BTH: $m/z=70\sim230$, quantity ion $m/z=211$; BTC: $m/z=-50\sim-200$, quantity ion $m/z=-179$

COSCH₃ が外れたフラグメントイオン m/z 136 [M+H-COSCH₃]⁺ を最も大きく観察した。BTC は、ESI ネガティブ、コーン電圧 -25 V で分子イオンの m/z -179 [M-H]⁻ が観察され、-50 V で BTC からヘテロ環が外れたフラグメントイオン m/z -107 [M-H-CSN₂]⁻ が最も大きく観察された。この結果から Table 1 に示した MS 条件に決定した。

この条件での BTH 及び BTC の標準溶液のマスペクトルを Fig. 3 に示した。また、検出限界は、シグナル/ノイズ比を 3 とすると標準溶液で Scan では BTH が 0.1 µg/g, BTC が 0.03 µg/g, SIM では BTH が 0.02 µg/g, BTC が 0.001 µg/g であった。

LC/MS で添加回収実験の試験溶液を測定した結果を Table 3 に示した。BTH の回収率は Scan で 73.8～86.5%, SIM で 74.6～83.3% で、標準偏差は Scan で 10.6～14.0 で、SIM で 2.1～3.4 であった。また、BTC の回収率は Scan で 77.2～87.1%, SIM で 76.9～93.5% で、標準偏差は Scan で 1.2～2.6 で、SIM で 1.6～1.8 であった。

回収率を HPLC の結果と比較すると小麦の Scan での BTH 及びとうもろこしの SIM での BTC の測定値が大きく、BTH の Scan での測定値のばらつきが大きいが、他は、HPLC の回収率との差が 5% 以内に納まっており大きなばらつきは認められないことから、BTH, BTC の

Fig. 4. Ion chromatograms of rice blank and spiked samples by LC/MS at SIM

A: BTH test solution, $m/z=211$, corn voltage; 40 V, B: BTC test solution, $m/z=179$, corn voltage; -25 V, 1: blank sample, 2: spiked sample

SIM 及び BTC の Scan では LC/MS による定量を行うことが可能であると考えられる。

定性は, Scan, SIM 共に定性イオンの比較により十分可能であった。Fig. 4 に米の ESI での無添加及び添加試料の代表的なイオンクロマトグラムを示した。他の農産物のイオンクロマトグラムも米と同様であった。

ま と め

穀類中 BTH 残留分析法について検討した結果,

- 1) 試料からリン酸緩衝液 (pH 8.0) とアセトンで抽出後, BTH は塩基性溶液 (pH 7.5~8.5) から再抽出し, BTC はリン酸酸性溶液 (< pH 3) から再抽出する。BTH は脱脂後, フロリジルで精製し, BTC は, フロリジルで直接精製する方法を確立した。
- 2) 添加回収実験の結果 HPLC で 74% 以上の回収率を得た。
- 3) LC/MS による測定条件を最適化した結果, 定性を行うことができた。また, BTH, BTC の SIM 及び BTC の Scan で, 定量が可能であることが判明した。
- 4) 米で BTH から約 16% の BTC への分解が認められた。

文 献

- 1) “1999 年版農薬の手引”, 化学工業日報社, p. 11-12 (1997).
- 2) 「今月の農薬」編集室編, “改訂 3 版農薬登録保留基準ハンドブック 1999 年追録”, 化学工業日報社, p. 58-60 (1999).