ガスクロマトグラフィーによる輸入農産物中の エタルフルラリンの定量

(平成元年 11 月 21 日受理)

根本 了* 鈴木 隆* 斎藤 行生*

Gas Chromatographic Determination of Ethalfluralin in Imported Crops

Satoru NEMOTO*, Takashi SUZUKI* and Yukio SAITO*

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

A gas chromatographic method for quantitative analysis of ethalfluralin in crops has been established. Ethalfluralin was extracted from crops with acetone, and the extract was diluted with 5% sodium chloride solution after evaporation of the acetone and re-extracted with *n*-hexane. The *n*-hexane layer was concentrated, and the residue was cleaned up by Florisil column chromatography for non fatty food or by silica gel dry column chromatography followed by Florisil column chromatography for fatty food.

The mean recovery of ethalfluralin from crops spiked at the level of 0.01 or 0.1 ppm was 87.1~97.3%. The detection limit of ethalfluralin was 0.002 ppm in soybean samples and 0.001 ppm in wheat, lemon and orange samples.

Ethalfluralin was not detected in imported crops in this study (soybean, 6; wheat, 6; lemon, 5; orange, 4).

(Received November 21, 1989)

Key words: エタルフルラリン ethalfluralin; シリカゲルドライカラムクロマトグラフィー silica gel dry column chromatography; フロリジルカラムクロマトグラフィー florisil column chromatography; ガスクロマトグラフィー (ECD) gas chromatography (ECD); 輸入農産物 imported crops

緒 言

エタルフルラリン(Fig.1)は除草剤として使用され、米国では大豆などの豆類に対する残留許容量として0.05 ppmが定められている¹⁾。一方我が国ではエタルフルラリンは農薬として登録されておらず、従って残留基準及び登録残留基準も定められていない。しかし、輸入農産物中への残留が懸念されるため、その分析法を確立するとともに、輸入農産物中の残留量の実態調査を行った。

エタルフルラリンは構造的にはジニトロアニリン系の除草剤に属するが、これらの分析には厚生省のDraft

Fig. 1. Structure of ethalfluralin

法²⁾では脱脂にヘキサン-アセトニトリル分配法を用いている。しかし、この方法は操作が繁雑であるばかりか、種子食品の場合にはエマルジョンを生じやすいなど多数の試料の迅速な分析には不向きであることから、より簡便な方法としてシリカゲルドライカラム法による精製を試みた。この方法は、著者らが既に鶏卵³⁾及び肉⁴⁾中の有機塩素系農薬の分析に適用し、その有用性を示した。今回この方法を大豆及び小麦中のエタルフルラリンの分析に試みた結果、穀物の分析にも有効であることを見いだした。この方法を用いて実施した輸入食品の検査結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試 料

東京、横浜及び神戸の各検疫所から昭和63年10月から平成元年2月にかけて当所に送付された大豆(米国産3検体、中国産1検体、ブラジル産1検体)、小麦(米国産2検体、オーストラリア産2検体、カナダ産1検

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

体), レモン (米国産 4 検体), オレンジ (米国産 4 検体) 及び当所に保存してあった大豆 (輸入国不明 1 検体), 小麦 (輸入国不明 1 検体) 並びに世田谷区内で購入したレモン (米国産 1 検体) を用いた。

2. 試 薬

エタルフルラリン 標準品: Eli-Lilly and Co., Lilly Research Laboratories 製純度 99.20% のものを用いた。

貯蔵用標準原液: エタルフルラリン 10 mg を *n*-ヘキサンを用いて溶解し 100 µg/ml 溶液とした。

分析用標準溶液: 貯蔵用標準原液を *n*-ヘキサンで適宜希釈して調製した。

アセトン, *n*-ヘキサン, ジクロロメタン, 石油エーテル, エチルエーテル: 市販一級品を蒸留して用いた。

無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験用

ろ過助剤: セライト No. 545 (Johns-Manville 製)

シリカゲルドライカラム: Kieselgel 60 (メルク社製, 70~230 メッシュ, Art. 7734) を 450° で 3 時間活性化した後デシケーター中で放冷し, 含水率が 10% になるように水を加え, 12 時間以上密栓して放置した。この 15 g を内径 22 mm, 長さ 300 mm のガラスカラムに乾式充てんした。

フロリジルカラム: フロリジル PR (Floridin 社製, 60~100 メッシュ) を 130° で 16 時間以上活性化した後デシケーター中で放冷した。この 10 g を内径 15 mm, 長さ 300 mm のガラスカラムにヘキサンを用いて湿式充てんし, 更に無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。

3. 装 置

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 GC-4BM 型 (⁶³Ni-ECD 付)

粉砕器: (株)日本精機製作所製遠心粉砕機 (大豆及び小麦の粉砕にはメッシュスクリーンの穴径がそれぞれ 0.5 mm 及び 0.25 mm のものを用いた。)

ホモジナイザー: Biotrona 社製バイオトロン

振とう機: イワキ(株)製 KM シェーカー

減圧濃縮機: ヤマト科学(株)製ロータリー・エバポレーター RE-46A 型

4. ガスクロマトグラフィー (GC) の測定条件

a) カラム: 2% OV-17, Chromosorb W (HP, 100~120 メッシュ), 3 mm i.d.×1.0 m, ガラスカラム; カラム温度: 160°; 注入口及び検出器温度: 280°; キャリヤーガス: N₂ 40 ml/min

b) カラム: 5% QF-1, Gas Chrom Q (80~100 メッシュ), 3 mm i.d.×1.0 m, ガラスカラム; カラム温度: 180°; 他の条件は a) に同じ

c) カラム: 5% DC-200, Chromosorb W (HP, 80~100 メッシュ), 3 mm i.d.×1.5 m, ガラスカラム; カラム温度: 190°; 他の条件は a) に同じ

試料注入量: 5 µl

5. 実験操作

5.1 抽出操作

大豆, 小麦: 試料を粉砕器で粉末として均一にした後, そのうち 10 g をとり水 10 ml を加え更にアセトン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出した後, ろ過助剤を厚さ約 5 mm に敷いた吸引ろ過器を用いてろ過した。ろ過盤上の残留物をアセトン 50 ml を用いて洗い込み, ろ液を先のろ液と合わせ, 40° 以下で大部分のアセトンを減圧留去した。この濃縮液をあらかじめ 5% 塩化ナトリウム溶液 80 ml を入れた分液漏斗に移し, ヘキサン 60 ml で 2 回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 40° 以下でほとんどのヘキサンを減圧留去し, 更に窒素気流中で完全に揮散させた。

レモン, オレンジ: レモンはその全部を用いて, また, オレンジは外果皮を除去したものをホモジナイザーで均一にした後, そのうち 10 g をとりアセトン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出し, 以下大豆, 小麦の項と同様に操作した。

5.2 シリカゲルドライカラムクロマトグラフィー

大豆, 小麦については, 上記抽出操作で得られた残留物を 20% ジクロロメタン含有石油エーテルに溶解し, このうち残留物 400~500 mg 以下に相当する量をカラムのcockを開いた状態でシリカゲルドライカラムに移し, 20% ジクロロメタン含有石油エーテルで溶出した。溶出液 90 ml を集め, 40° 以下で大部分の溶媒を減圧留去し, 更に窒素気流中で完全に揮散させた。

レモン, オレンジについてはこの操作を省いて行った。

5.3 フロリジルカラムクロマトグラフィー

上記操作で得られた残留物を少量のヘキサンに溶解し, これをフロリジルカラムに移した後, ヘキサン 100 ml で洗浄し, 次いで 2% エーテル含有ヘキサン 100 ml で溶出した。溶出液は 40° 以下で溶媒を減圧留去した後, ヘキサン 10 ml に溶解しガスクロマトグラフ用検液とした。

5.4 GC による定量

貯蔵用標準原液をエタルフルラリンの濃度が 1.0~20.0 ng/ml になるようにヘキサンで希釈し, その 5 µl をガスクロマトグラフに注入し, ピーク高あるいはピーク面積を測定し検量線を作成した。この検量線からピーク高法あるいはピーク面積法により定量を行った。また, 本条件下におけるエタルフルラリンの最小検出量は, 0.005 ng であった。また, 2% OV-17 のカラムを定量用に用い, 必要に応じて 5% QF-1 及び 5% DC-200 のカラムにより確認を行った。

結果及び考察

1. シリカゲルドライカラムによるクリーンアップの検討

エタルフルラリン 10 µg をシリカゲルドライカラム

Fig. 2. Elution pattern of ethalfluralin from 10% H₂O impregnated silica gel (15 g) column with 20% CH₂Cl₂-pet. ether
Column: 22 mm i.d.×300 mm, glass column

に負荷し 20% ジクロロメタン含有石油エーテルで溶出したときの溶出パターンを Fig. 2 に示した。図のようにエタルフルリンは溶出液 70 ml 以内に溶出されたことから、20% ジクロロメタン含有石油エーテル溶出液 90 ml を集めることとした。また、このときカラムからのエタルフルリンの回収率は 100.1% であった。

また、シリカゲルドライカラムへの脂質の負荷量は、前報¹⁾より 400~500 mg が上限であった。Table 1 より、大豆の場合は試料 10 g を用いたとき得られた抽出物が 1577.1±99.1 mg であったため、このうち約 400 mg に相当する全体の 1/4 量 (大豆 2.5 g 相当) をカラムに負荷することとした。小麦の場合は、抽出物が 185.7±11.9 mg であったので全量をカラムに負荷した。

大豆及び小麦の試料を上記によりシリカゲルドライカラムを用いて精製し、得られた残留物をヘキサンで 10 ml に希釈して GC に注入したところ、Fig. 3 に示したようにガスクロマトグラム上に多くの妨害ピークが現れ、定量が困難であると思われた。

2. フロリジルカラムによるクリーンアップの検討

上記のようにシリカゲルドライカラムによるクリーン

Fig. 3. Gas chromatograms of soybean and wheat extracts after silica gel dry column clean-up

(a): ethalfluralin (20 ng/ml)

(b): unfortified soybean

(c): unfortified wheat

GC conditions: column, 2% OV-17, 3 mm i.d.×1 m; column temp., 160°C; injection temp., 280°C; carrier gas N₂ (40 ml/min)

Fig. 4. Elution patterns of ethalfluralin from Florisil (10 g) column

—●—: 10% ethyl ether-hexane

--○--: 5% ethyl ether-hexane

—▲—: 2% ethyl ether-hexane

--△--: 0.5% ethyl ether-hexane

Column: 15 mm i.d.×300 mm, glass column

Table 1. Amount of Residue after Evaporation of Sample Solution at Each Clean-up Step

Crop	Residue (mg) Mean±S.D.* ¹		
	Extraction* ²	Silica gel dry column	Florisil column* ³
Soybean	1,577.1±99.1	0.9±0.6* ⁴	< 0.1
Wheat	185.7±11.9	2.9±1.3	< 0.1

*¹ Mean of 6 samples

*² Ten gram of soybean or wheat was extracted with acetone, and the extract was diluted with 5% NaCl solution after evaporation of acetone and re-extracted with *n*-hexane

*³ Applied after silica gel dry column chromatography clean-up

*⁴ A quarter of the extracted residue was applied to the column.

Fig. 5. Gas chromatograms of soybean and wheat extracts after silica gel dry column, followed by Florisil column clean-up
s-1, w-1: unfortified sample
s-2, w-2: fortified with 0.1 ppm of ethalfluralin
↓: position of ethalfluralin
GC conditions are the same as in Fig. 3.

Table 2. Recovery of Ethalfluralin from Fortified Crops

Crop	Fortification level (ppm)	Recovery (Mean $\pm$ C.V.) (%)
Soybean	0.10	87.5 $\pm$ 10.2*
Wheat	0.10	97.3 $\pm$ 5.3**
Lemon	0.10	91.4 $\pm$ 3.7*
Lemon	0.01	87.1 $\pm$ 15.6**

* $n=4$ ** $n=3$

アップのみでは妨害ピークが多かったため、更にフロリジルカラムによるクリーンアップについて検討した。Fig. 4 にエタルフルリン 10 μ g をフロリジルカラムに負荷し、0.5, 2, 5 及び 10% エーテル含有ヘキサンを用いて溶出パターンを検討した結果を示した。その結果、2% エーテル含有ヘキサンを用いた場合溶出液 70 ml までにすべて溶出したことから、この溶出溶媒が適切であると考え、以後は 2% エーテル含有ヘキサン 100 ml を用いて溶出することとした。このときのエタルフルリンの回収率は 109.0% であった。また、溶出溶媒にヘキサンを用いた場合には、本条件下ではエタルフルリンは溶出されてこないので、洗浄溶媒としてヘキサン 100 ml を用いることとした。

大豆及び小麦からの試料をシリカゲルドライカラムに

よりクリーンアップした後、引き続きフロリジルカラムによりクリーンアップを行ったところ、Fig. 5 に示したように妨害ピークが減少し、更に、15 分以降まで現れていたピークもみられなくなり安定なベースラインが得られ、測定時間の短縮が図られた。

また、カラムから溶出される量の検討を行ったところ、Table 1 に示したようにシリカゲルドライカラムからは、大豆で 0.9 mg、小麦で 2.9 mg が溶出したが、更にフロリジルカラムを用いることによって 0.1 mg 未満にまでクリーンアップすることができた。シリカゲルドライカラムには、大豆から得られた全抽出物の 1/4 量 (約 400 mg) を、また、小麦の場合には全量 (約 190 mg) を負荷したが、上記のように小麦の方がシリカゲルドライカラム後の残留物が多かった。これは、小麦の抽出物中には脂質以外のシリカゲルに保持されない成分が大豆より多く含まれているためと思われるが、フロリジルカラムを用いることによってこれらも除くことができた。

3. 添加回収実験

大豆、小麦及びレモンを用いてエタルフルリンを試料に対して 0.01 あるいは 0.1 ppm になるように添加し、回収率を求めた。その結果 Table 2 に示したように 87.1~97.3% の回収率が得られた。また、本法におけるエタルフルリンの検出の下限は、試料 10 g を用いて最終液量を 10 ml とし、その 5 μ l をガスクロマトグラフに注入した場合、試料中 0.001 ppm であった。ただし、大豆の場合は脂質が多いため試料 10 g を用いて抽出操作を行い、得られた抽出物の 1/4 量を用いてシリカゲルドライカラムクロマトグラフィーを行い、最終液量を 5 ml とした場合 0.002 ppm であった。

4. 輸入食品の実態調査

大豆 6 検体、小麦 6 検体、レモン 5 検体及びオレンジ 4 検体について調査した結果、いずれの試料からもエタルフルリンは検出されなかった。

ま と め

1. 大豆、小麦、レモン及びオレンジ中のエタルフルリンの分析法について検討した。

2. 穀類、豆類については、シリカゲルドライカラムクロマトグラフィーにより脱脂し、更にフロリジルカラムクロマトグラフィーによりクリーンアップする方法を確立した。果実類についてはフロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップのみで十分であった。

3. 大豆、小麦及びレモンを用いて求めた添加回収率は 87.1~97.3% であった。また、検出の下限は大豆で 0.002 ppm、他は 0.001 ppm であった。

4. 今回調査した輸入農産物からはいずれもエタルフルリンは検出されなかった。

文 献

- 1) "Code of Federal Regulations" 40, parts 180, 416, p. 345 (July 1, 1985), the Office of the Federal Register

National Archives and Records Administration.

- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課(編): “残留農薬分析法 (Draft)” p. 76~81 (1986), (社)日本食品衛生協会, 東京.
- 3) 佐々木久美子, 鈴木 隆, 斎藤行生: 食衛誌. **29**, 205~209 (1988).
- 4) 鈴木 隆, 石坂 孝, 佐々木久美子, 斎藤行生, 福田 裕: 同上. **30**, 48~53 (1989).