報 文

HPLC による米中メトプレン分析法の開発

(平成 6 年 4 月 8 日受理)

田宮実千雄*¹ 柏原文和*¹ 渡邊佳子*¹
安藤 徹*¹ 堤 徹*² 法月廣子*²
南澤正敏*² 久井伸治*¹

Development of an Analytical Method for Methoprene in Rice by HPLC

Michio TAMIYA*¹, Fumikazu KASHIWABARA*¹, Yoshiko WATANABE*¹, Toru ANDO*¹
Toru TSUTSUMI*², Hiroko NORIZUKI*², Masatoshi MINAMISAWA*²
and Shinji HISAI*¹

(*¹Tokyo Quarantine Station, Food Inspection Division: 3-9-35, Kounan, Minato-ku,
Tokyo 108, Japan; *²Central Research Laboratory, Japan Grain Inspection
Association: 2-17-3, Arai, Ichikawa, Chiba 272-01, Japan)

A new analytical method was developed for the determination of methoprene, an insecticide, in rice. Methoprene was extracted with *n*-hexane from powdered samples. The concentrated *n*-hexane extract was purified by distillation in a Dean-Stark apparatus for 1.5 hr, and then cleaned-up with a Sep-pak Florisil cartridge. The eluate was used as test solution. Methoprene in the test solution was determined by UV-HPLC. The chromatography was performed on an Inertsil ODS-2 column with a mobile phase consisting of acetonitrile and water (9:1).

Recovery of methoprene was in the range of 80~86% when the compound was spiked at the concentration of 0.5 ppm in rice. The detection limit of methoprene by the proposed method was 0.02 ppm. No methoprene was detected in any of 10 samples imported from Thailand, the United States, and P. R. China during November and December, 1993.

(Received April 8, 1994)

Key words: メトプレン methoprene; 殺虫剤 insecticide; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 米 rice; Dean-Stark 蒸留装置 Dean-Stark apparatus; フロリジルカートリッジカラム Florisil cartridge column; 残留農薬分析 pesticide residue analysis

緒 言

メトプレン (methoprene) は一般に牧場、水田及び湿地帯等で発生するかなどの衛生害虫の防除、キノコや貯蔵穀物の害虫駆除を目的に使用される殺虫剤である¹⁾。

FAO/WHO 合同残留農薬部会は、メトプレンの 1 日

摂取許容量 (ADI) を 0.1 mg/kg/day と設定²⁾ し、我が国においては 1993 年 10 月 27 日付告示³⁾ により、9 種の農産物に対しその残留基準及び公定分析法が定められた。

平成 5 年秋、我が国の水稻の作柄は東北地方を中心に作況指数 74 と大規模な凶作にみまわれ、戦後最悪の生産水準となった。この記録的な米の不作により、これまで保たれてきた我が国の米の自給体制は需給バランスを

*¹ 東京検疫所 食品監視課: 〒108 東京都港区港南 3-9-35

*² (財)日本穀物検定協会中央研究所: 〒272-01 千葉県市川市新井 2-17-3

失い、政府は対応策として輸入米の緊急輸入を実施するに至った。それに伴い、著者らは輸入米中の残留農薬の検査を行う必要が生じたが、メトプレンの公定分析法は、厚生省が定めた残留基準のある農薬の中で、唯一FID付きガスクロマトグラフを用いる分析法である。そこで米について、公定法に基づきFID付ガスクロマトグラフによる分析を試みたところ、メトプレンのピークは比較的早い時間にクロマトグラム上に現れるため、妨害ピークと重なり、設定された検出限界(0.02 ppm)⁴⁾を確保することは困難であることが判明した。

この点を解決するために、ヘキサン抽出物に対して、Dean-Stark 蒸留装置を用いる再抽出、Sep-pak フロリジルカートリッジカラムを用いた精製、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたメトプレンの新たな分析方法の開発を試みた。その結果、妨害物質の除去、設定された検出限界の確保、分析時間の短縮などについて、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

1993年11月より12月までの2か月間に本邦に空輸された先行サンプル及び本船到着後、各輸入港において採取された本サンプル：タイ国産うるち精米3検体、もち精米3検体、アメリカ産うるち精米2検体、中国産もち精米1検体、うるち玄米1検体及び国産市販うるち精米1検体

2. 試薬、試液

メトペン標準品(isopropyl (E,E)-(RS)-11-methoxy-3,7,11-trimethyldodeca 2,4-dienoate): 林純薬工業(株)製、残留農薬試験用試薬

n-ヘキサン、エチルエーテル及び無水硫酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製、残留農薬試験用試薬

アセトニトリル及び蒸留水: 和光純薬工業(株)製、高速液体クロマトグラフィー用試薬

セライト: 和光純薬工業(株)製, No. 545

Sep-pak フロリジルカートリッジカラム及びC18カートリッジカラム: Waters社製, Sep-pak Puls Florisil cartridge (Part No. 20525, Lot No. P3286A1) 及び Sep-pak cartridge C18 (Part No. 51910, Lot No. P3265A1)

標準原液: メトペン 50.0 mg を正確に量り採り、*n*-ヘキサン 50 ml に溶解したものを標準原液とした。

標準液: 標準原液を *n*-ヘキサンで更に希釈し、10.0 mg/L 溶液を標準液とした。検量線の作成には、標準液に窒素ガスを吹き付けて乾固させた後、アセトニトリル-水(9:1)混液で0.02~5 mg/Lの濃度に調製したものをを用いた。

3. 器具、装置

Dean-Stark 蒸留装置: (株)前田製作所製(有機溶媒のトラップの容量は20 ml)

高速液体クロマトグラフィー: Beckman社製, System Gold 116型に島津製作所製データ処理装置、クロマトパック C-R6A を接続して用いた。

ブレンダー: 高速遠心粉碎器 ZM-1 型, 日本精機(Retsch製); マントルヒーター: 450 W, 10 A, 1 L, 丸底フラスコ用; 液層分離用ろ紙: 1 PS, 直径9 cm, (Whatman社製)。

4. 試験溶液の調製

1) 米からのメトプレンの抽出

試料 200 g をブレンダーにて粉碎均一化し、その 20.0 g を共栓付三角フラスコに量り採り、*n*-ヘキサン 160 ml を加え振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた。これをセライト 20 g を用いて減圧濃縮フラスコ中に吸引ろ過し、次いで *n*-ヘキサン 40 ml を用いて三角フラスコ及びろ過器上の残留物を洗い、ろ液に洗液を合わせ、減圧下 40°以下で *n*-ヘキサンを留去した。減圧濃縮フラスコ中の残留物を 15 ml の *n*-ヘキサンで溶解し、あらかじめ食塩 100 g, 蒸留水(あらかじめ *n*-ヘキサンで洗浄したものを使用) 300 ml を加えた Dean-Stark 蒸留装置⁵⁾用フラスコの中に移した。還流部側管内を蒸留水 30 ml を用いて満たした後、流水にて冷却し、フラスコを装着した。マントルヒーターを用いて(スライダックの電圧を 60 V に設定)、フラスコ内の溶液が沸騰を始めてから1時間30分加熱還流した。

フラスコをはずし、放冷後、トラップ及び還流部側管内の水をほとんど除去した後、*n*-ヘキサン層を液層分離ろ紙を用いて 20 ml のメスフラスコ中にろ過した。更に、トラップ及び冷却管の内壁を少量の *n*-ヘキサン及び蒸留水で洗浄し、同様に *n*-ヘキサン層をろ過し、ろ液を先のメスフラスコ中のろ液と合わせた後、*n*-ヘキサンを加え 20 ml の定容とした。

2) ヘキサン抽出液の精製

あらかじめエチルエーテル-ヘキサン(2:8)混液 10 ml, 次いで *n*-ヘキサン 10 ml で洗浄した Sep-pak フロリジルカートリッジカラムに、上記抽出法で得た溶液 5 ml を負荷し、流速 1.5 ml/min で流出させた。次いで *n*-ヘキサン 10 ml を用いて同様の操作を行い、これらの流出液はいずれも捨てた。続いて、エチルエーテル-ヘキサン(2:8)混液 10 ml を用いて同様の操作を行い、ここで得た流出液を減圧下 40°以下で溶媒を留去した。この残留物にアセトニトリル-水(9:1)混液 5 ml を加えて溶かしたものを試験溶液とした(Scheme 1)。

5. 定量法

定性は標準液の保持時間を測定し、試験溶液についても同様に操作し、標準液のそれと比較した。また、定量はピーク面積法により、あらかじめ作成した検量線より試料中のメトペン濃度を求めた。

HPLC 条件は次に示したとおりである。

カラム: Inertsil ODS-2, 4.6 mm i.d.×250 mm (ジ-

Scheme 1. Analytical procedure for the determination of methoprene in rice

エルサイエンス(株))

移動相: アセトニトリル-水 (9:1) 混液

カラム温度: 25°

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 254 nm

感度: 0.003 AUFS

注入量: 20 µl

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

Allen ら⁶⁾ は HPLC によりメトプレ標準液 (水溶液) の安定性試験を行っている。著者らは、米中の残留メトプレンの分析を目的とし、以下の条件検討を行った。

分離カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×250 mm) を使用し、一般的に用いられている検出波長 254 nm で HPLC 分析を行った。移動相にはアセトニトリル及び水を用い、混合割合を変え、分析時間及び妨害ピークとの分離状態から最適条件を求めた。その結果、移動相にはアセトニトリル-水 (9:1) 混液、流速 1.0 ml/min、カラム温度 25° の条件において、メトプレンは約 15 分でクロマトグラム上に現れ (Fig. 1(A)), 妨害ピークとの分離状態は良好であった。

また、この条件において、有機リン系農薬 8 種、塩素系農薬 16 種について測定を行ったが、メトプレと同じ保持時間に検出される農薬は認められなかった。

標準液を用いて検量線を作成したところ、0.02~5 µg/ml の範囲で良好な直線性を示した。

2. 抽出方法の検討

近年、農産物中残留農薬の多成分一斉分析法について多くの報告があり、そのほとんどの検査法において、抽出時に有機溶媒を使用するが、試料成分中の油脂、色素なども同時に溶かし出されてしまうため、精製が困難になる場合がある。米についても、その成分中に油脂など、分析を行う上で妨害となる物質が含まれる。公定法³⁾ではアセトニトリル抽出液から、石油エーテルに転溶し、更にカラムクロマトグラフィーで精製を行っているが、米試料の場合、妨害物質との分離には効果がみられず、更に精製を行う必要があった。そのため、抽出原理を全く異なる Dean-Stark 蒸留装置を用いて妨害物質の除去と回収率について検討した。

米試料を直接、Dean-Stark 蒸留装置を用いて蒸留すると、のり状あるいは焦げ付きが生じ、蒸留不能となったため、*n*-ヘキサンにて抽出した後に蒸留を行った。

市販国産うるち精米を試料としたとき、分析の障害となる妨害物質は除去され、また、0.5 ppm 相当量を添加したときの回収率は 80% 以上と効率よく回収された。市販国産うるち精米を用いたときのクロマトグラムを Fig. 1(B) に示す。ここで示したクロマトグラムは Dean-Stark 蒸留装置による抽出液をそのまま HPLC で測定したものである。Dean-Stark 蒸留装置を用いて抽出することにより、精製効果が期待できることが確認された。しかし、一部の精米及び玄米では更に精製が必要であった。

Fig. 1. High performance liquid chromatograms of methoprene and the extracts from polished rice distilled with Dean-Stark apparatus (before Sep-pak treatment)

(A): methoprene standard (0.5 ppm)

(B): polished rice

(C): polished rice (Methoprene was spiked at 0.5 ppm.)

a: peak of methoprene

3. クリーンアップ法の検討

輸入米を試料とした場合では、国産米とは精米方法もしくは精米の度合いが異なること、米の品種間における油脂などの構成成分の違いが分析結果に影響を及ぼすと思われる。更に、UV 検出器付 HPLC による分析方法では検出器の選択性が乏しいため、十分に精製を行う必要があると考えられる。

中国産うるち玄米を用い、Dean-Stark 蒸留装置による抽出液をそのまま HPLC で測定し、そのクロマトグ

ラムを Fig. 2(A) に示した。

公定法³⁾では、合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフ及びアルミナカラムクロマトグラフを用いて精製を行っている。この方法には大量の有機溶媒を必要とし、目的とする試験溶液を得るまでに長い時間がかかるうえ、回収試験において良好な結果が得られなかった(回収率 60~70%)。そこで、公定法を応用し、オープンカラムの代わりに Sep-pak フロリジル及び C18 カートリッジカラムを用いてクリーンアップの検討を行った。

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of the extracts from unpolished rice before and after treatment with a Sep-pak Florisil cartridge
(A): before treatment with the cartridge
(B): after treatment with the cartridge

Table 1. Contents and Recoveries of Methoprene in Imported Rice

Rice sample		Content of methoprene (ppm)	Recovery of methoprene (%) ^{*1}
Polished white rice	(Thailand)-1	ND ^{*2}	80.1±5.2
"	(Thailand)-2	ND	80.1±8.1
"	(Thailand)-3	ND	82.6±8.1
Polished glutinous rice	(Thailand)-1	ND	86.2±3.6
"	(Thailand)-2	ND	82.0±6.6
"	(Thailand)-3 ^{*3}	ND	83.1±3.9
Polished white rice	(U. S. A.)-1 ^{*3}	ND	80.9±3.3
"	(U. S. A.)-2 ^{*3}	ND	85.2±3.9
Polished glutinous rice	(China)	ND	85.3±2.8
Unpolished white rice	(China)	ND	80.7±7.5

^{*1} Recovery test was carried out at the level of 0.5 ppm, and the results were shown in mean (%)±S. D., $n=3$

^{*2} ND: not detected (less than 0.02 ppm)

^{*3} Samples sent by air prior to shipping.

その結果, Sep-pak C18 カートリッジカラムを用いた場合には, メトプレンは吸着されずに溶出し, 条件を変えて試行したが妨害物質との十分な分離条件は得られなかった。一方, Sep-pak フロリジルカートリッジカラムを用いた場合には, メトプレンが妨害物質とともに溶出することではなく, 同一保持時間に現れる妨害ピークは除去された (Fig. 2(B))。標準液を Sep-pak フロリジルカートリッジカラムに負荷し, 同様に操作したときの回収率は 95% 以上であった。またこのとき, ヘキサン洗浄による流出液中にメトプレンは認められなかった。

Sep-pak フロリジルカートリッジカラムを用いることにより, 少量の有機溶媒で十分な精製効果を得ることができ, 分析操作が簡便化され, 処理に要する時間が大きく短縮された。

本法を輸入米に用いたときの検出限界は 0.02 ppm であった。

4. 輸入米中メトプレンの添加回収試験及び測定結果

本報で検討したメトプレンの分析法により, 試料 10 検体についてそれぞれ, 標準液 1.0 ml を添加し, 回収実験を行ったところ 80.1~86.2% の回収率が得られた。

1993年11月より12月までの2か月間における先行サンプル及び本サンプル（タイ国産うるち精米3検体，もち精米3検体，アメリカ産うるち精米2検体，中国産もち精米1検体，うるち玄米1検体）中のメトブレンはいずれの検体からも検出されなかった。

測定結果及び添加回収試験結果について Table 1 にまとめた。

結 語

米中のメトブレンの新規分析法を開発した。

(1) Dean-Stark 蒸留装置を用いる精製操作により，メトブレンは少量の溶媒で効率よく抽出され，著しい精製効果が認められた。

(2) 精米及び玄米について，Sep-pak フロリジルカートリッジカラムによる精製を行うことにより，安定した分析が可能となった。また，オープンカラム使用のクロマトグラフィーに比べて分析時間が短縮され，溶出溶媒も少なく分析操作も簡便となり，抽出液の精製が容易となった。

(3) 本分析方法の添加回収率は 0.5 ppm 添加したとき 80～86% で，検出限界は 0.02 ppm であった。

(4) 外国産緊急輸入米 10 検体よりメトブレンは検出

されなかった。

以上のことから本分析方法は，残留農薬分析について迅速な対応が必要とされる試験機関などにおいて，実用的かつ有効な方法であると考ええる。

謝 辞

本研究を実施するに当たり，御指導を頂きました，国立衛生試験所食品部斎藤生行部長，食品添加物部石綿肇室長に深謝致します。

文 献

- 1) 宮沢長次郎，上路雅子，腰岡政二：“最新農薬データブック” p. 240 (1989) ソフトサイエンス社。
- 2) FAO: FAO Plant Production and Protection Paper, p. 32 (1987).
- 3) 厚生省告示第 239 号（平成 4 年 10 月 27 日）。
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課長通達：“食品，添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 4 年 10 月 27 日，衛化第 76 号 (1992)。
- 5) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解 1990” p. 609～610 (1990) 金原出版。
- 6) Cheryl, R. A., Charlotte, M. D.: J. Liquid Chromatogr. 13(2), 371～381 (1990).