ノート

HPLC による農産物中のダイムロン分析法

(平成 11 年 1 月 6 日受理)

小林 麻紀* 永山 敏廣* 橋本 常生*
 羽石 奈穂子* 伊藤 正子* 田村 康宏*
 高田 千恵子* 安田 和男*

Determination of Dymron in Agricultural Products by HPLC

Maki KOBAYASHI, Toshihiro NAGAYAMA, Tsuneo HASHIMOTO, Nahoko HANEISHI,
 Masako Ito, Yasuhiro TAMURA, Chieko TAKADA and Kazuo YASUDA

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

We investigated a simplified determination of dymron in agricultural products by HPLC with UV detection.

Homogenates of agricultural products were extracted with acetone. Each crude extract was purified on Bond Elut[®] extraction Cartridge PSA and SAX using a mixture of acetonitrile and diethyl ether. Dymron was analyzed by HPLC with UV detection (243 nm). The HPLC separation was performed on a ODS column with acetonitrile-water (50:50) as the mobile phase.

Recoveries of dymron from several agricultural products fortified at the level of 0.10 ppm were in the range of 93.3~105.2%. The limit of detection was 0.005 ppm in samples.

(Received January 6, 1999)

Key words: ダイムロン dymron, (米): daimuron; 農産物 agricultural products; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 除草剤 herbicide; 紫外外部吸収検出器 UV detector; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS; 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS

緒言

ダイムロン [dymron (米): daimuron, 1-(α,α -dimethylbenzyl)-3-(*p*-tolyl)urea] は Fig. 1 に示した構造を有する非ホルモン型移行性除草剤であり、水田におけるホタルイ及びマツバイなどのカヤツリ草科の雑草防除に使用される¹⁾。平成 10 年 10 月 12 日厚生省告示第 245 号で食品衛生法による残留農薬基準が設定された。

農産物中のダイムロンの分析法には、環境庁告示法としてフロリジルカラムで精製した後、加水分解して 1,1,1-トリクロロ-4'-メチルアセトアニリドへと誘導し、GC-ECD を用いて測定する方法がある²⁾。しかし、この方法では抽出及びカラムクロマトグラフィーに排水基準

が厳しく規制されているジクロロメタンを使用する必要があり、また、加水分解に 6 時間と長時間を要するなど日常分析に適していない。そこで今回、イオン交換樹脂ミニカートリッジで精製後 UV 検出 HPLC を用いて、農産物中のダイムロンを簡便に精度良く分析する方法について検討した。

Fig. 1. Structure of dymron

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

Scheme 1. Analytical procedure for dymron

実験方法

1. 試料

米（玄米）を用いた。また、ダイムロンの諸外国での使用状況が把握できないことや他の農産物への混入などを考慮し、コングリッツ、大豆、りんご、いちご、かんしょ、さといも、ばれいしょ、ごぼう、レタス、せり、トマト、ピーマン、たまねぎ、ねぎ、ほうれんそう、さやえんどう及び綿実も併せ、合計 18 種類を対象として検討した。

2. 試薬及び標準品

1) ダイムロン標準品：林純薬工業（株）製残留農薬試

験用農薬標準品を用いた。

- 2) 添加回収試験用標準溶液：ダイムロン標準品 50.0 mg を量り、ジエチルエーテルで正確に 50 mL として 1,000 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を作製した。この標準原液 2.5 mL をジエチルエーテルで正確に 50 mL として 50 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を作製し、更に必要に応じてジエチルエーテルで希釈した。
- 3) 10% 塩化ナトリウム溶液：蒸留水約 900 mL を酢酸エチル約 100 mL で洗浄した後、残留農薬試験用塩化ナトリウムを 10% になるように加え、溶解した。

- 4) 水: 蒸留水を Milli-Q® 超純水装置 (日本ミリポアリテッド(株)製) により精製して用いた (比抵抗値 18 MΩcm 以上).
- 5) Bond Elut® PSA: バリアン社製 Bond Elut Extraction Cartridge PSA 3 cc/500 mg
- 6) Bond Elut® SAX: バリアン社製 Bond Elut Extraction Cartridge SAX 3 cc/500 mg
- 7) Extrelut®3: Merck 社製ケイソウ土カラム
- 8) Sep-Pak C18: Waters 社製 Sep-Pak C18 Cartridge (short body)
- 9) その他の試薬: 残留農薬試験用又は高速液体クロマトグラフ用を用いた.

3. 装 置

- 1) 高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC-6AD 型
- 2) 紫外外部吸収検出器: (株)島津製作所製 SPD-6A 型
- 3) ガスクロマトグラフ/質量分析計: Finigan MAT 社製 Traker™ System
- 4) 液体クロマトグラフ/質量分析計: VG Biotech 社製 Platform II-LC System

4. 分析方法

1) 試験溶液の調製

試料 20 g にアセトン 200 mL を加え (穀類及び豆類は粉碎した試料 20 g に蒸留水 40 mL を加え 2 時間放置した後アセトン 200 mL を加えた), ホモジナイザー (10,000 回転/分) で 5 分間細砕した後, ろ紙上にケイソウ土を約 5 mm の厚さに敷いて吸引ろ過した. ろ紙上の残さに更にアセトン 50 mL を加え軽くかくはんした後, 再び吸引ろ過した. ろ液を合わせ, 減圧下 (40℃ 以下) でアセトンを留去した.

残留物に酢酸エチル 100 mL 及び 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え 5 分間激しく振り混ぜた後, 酢酸エチル層を分取した. 水層に酢酸エチル 50 mL を加え, 同様に操作した. 酢酸エチル層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後ろ過し, 減圧下で酢酸エチルを留去した.

試料が穀類, 豆類など油脂を多く含む場合は減圧留去後の残留物にジエチルエーテルを加えて正確に 6 mL とし, このうち 3 mL を Extrelut®3 に負荷した. 負荷後直ちに Extrelut®3 の出口をアスピレーターにつなぎ, 2 分間吸引して大部分のジエチルエーテルを除いた. Extrelut®3 の出口に Sep-Pak C18 をつなぎ, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL で溶出し, 減圧下でアセトニトリルを留去した.

得られた残留物にジエチルエーテルを加え, 脱脂操作を行ったものは 1 mL, 他は 2 mL とした.

この 0.5 mL を, あらかじめアセトニトリル 30 mL, 次いでジエチルエーテル 20 mL でそれぞれコンディ

Fig. 2. UV spectrum of dymron in mobile phase

ショニングした Bond Elut® PSA 及び SAX を, PSA を上に接続したものに負荷した. アセトニトリル-ジエチルエーテル (1:19) 混液 20 mL で洗浄した後, PSA をはずし SAX のみにしてアセトニトリル-ジエチルエーテル (1:3) 混液 30 mL で溶出した. 得られた溶出液を減圧下で濃縮乾固し, アセトニトリル 0.5 mL を加えて試験溶液とした.

これらの操作方法を Scheme 1 に示した.

2) HPLC 測定条件

カラム: NOVA-PAK™ C18 (3.9 mm i.d. × 300 mm, Waters 社製)

カラム温度: 50℃

移動相: アセトニトリル-水 (50:50)

流速: 1.0 mL/min

検出器: 紫外分光光度計 (波長: 243 nm)

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

ダイムロンのアセトニトリル-水 (50:50) 溶液での UV 吸収スペクトルを Fig. 2 に示した. 極大吸収波長は, 203 nm 付近であるが, この波長付近ではベースラインのノイズや食品由来の夾雑成分も吸収を有するものが多くあるため, 長波長側の 243 nm で測定することとした.

また, 市販の ODS カラムを用い, 紫外外部吸収の少ないアセトニトリルと水の混液による移動相の検討を行った.

アセトニトリル-水 (50:50), 流速 1.0 mL/min とし

たとき、ダイムロンは約8分で溶出し、良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 3).

2. 抽出, 精製方法の検討

1) 抽出方法

試料からの抽出は、ダイムロンの溶解性が高く、また、他の農薬の抽出に最もよく利用される溶媒のひとつであるアセトンを用いた。アセトンを留去した後の転溶時に使用する転溶溶媒について検討を加えた。転溶溶媒は、*n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル及びこ

Fig. 3. HPLC chromatogram of dymron (10 ng) LC conditions: column, NOVA-PAK™ C18 (3.9 mm i.d.×300 mm); column temperature, 50°C; mobile phase, acetonitrile-water (50:50); flow rate, 1.0 mL/min; detect wavelength, 243 nm

れらの混合溶媒について検討した。10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL にダイムロン (10 μ g/mL 標準溶液 0.5 mL) を添加し、各溶媒 100 mL で5分間振とうした。1回抽出での溶媒への転溶率を測定したところ、ジエチルエーテルが98%, 酢酸エチルが97%であった。*n*-ヘキサンにはほとんど転溶されなかった。ジエチルエーテルは、実際の試料抽出液に用いた場合エマルジョンを形成しやすく、回収率が低下したため、試料抽出液でもエマルジョン形成の少ない酢酸エチルを転溶溶媒に用いることとした。

2) 脱脂方法

Extrelut®3を用いた Extrelut/Sep-Pak®C18 法³⁾ 及びアセトニトリル分配の2つの脱脂方法を検討した。

Extrelut/Sep-Pak®C18 法では、10 μ g/mL ダイムロン-ジエチルエーテル標準溶液を Extrelut®3 に負荷し、常法³⁾ に従い処理した。アセトニトリル分配法では、*n*-ヘキサン 25 mL にダイムロン (10 μ g/mL 標準溶液 0.5 mL) を負荷し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で3回抽出した。いずれの方法によっても回収率はほぼ100%と良好であった。

次に粉碎した玄米及び大豆にダイムロン (10 μ g/mL 標準溶液 0.2 mL) を添加し、Extrelut/Sep-Pak®C18 法及びアセトニトリル分配で脱脂を行った。標準溶液を用いたときと同様良好な結果が得られた。しかし、操作の簡略化及びアセトニトリル分配法では振とう時にエマルジョンを形成した場合に回収率が低下することを考慮し、脱脂操作には Extrelut/Sep-Pak®C18 法を用いることとした。

3) 精製方法

今回は、精製操作を簡略化する目的で、既製のミニカラムカートリッジの利用を試みた。

Fig. 4. Elution profiles of dymron from Bond Elut® SAX cartridge successively eluted with 10 mL of each eluting solvent

—▲— acetone in ethyl acetate, —△— acetone in diethyl ether
—■— methanol in ethyl acetate, —□— methanol in diethyl ether
—●— acetonitrile in ethyl acetate, —○— acetonitrile in diethyl ether

Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of sample extracts
(a): blank sample; (b): spiked sample (0.10 ppm)

ダイムロンは *n*-ヘキサンに溶解しにくいいため、カラムカートリッジへの負荷はジエチルエーテルを用いる必要があった。

Sep-Pak® (フロリジル, シリカ, NH₂, C18 及びジオール) 及び Bond Elut® (PSA 及び SAX) による精製方法を検討した。

10 µg/mL のダイムロン-ジエチルエーテル標準溶液 1 mL をカラムカートリッジに負荷し、ジエチルエーテルを 10 mL ずつ流下した。7 種類のカラムカートリッジのうちダイムロンが保持されたのは SAX のみであった。SAX 以外のカラムカートリッジから流出したジエチルエーテル溶液では HPLC クロマトグラム上に妨害ピークが出現し、測定が困難であった。

そこで、ダイムロンの精製には SAX を用いることとした。SAX に 10 µg/mL のダイムロン-ジエチルエーテル標準溶液 1 mL をカラムカートリッジに負荷した後、アセトン、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル及びそれらの混液をそれぞれ 10 mL ずつ流下して溶出状況を調べた。

酢酸エチル又はジエチルエーテルと他の溶媒との混液を用いたとき、SAX への吸着及び溶出が容易であった。各溶媒混液での溶出状況を Fig. 4 に示した。

種々農産物の試料溶液にダイムロンを添加し、それぞれの溶媒混液の溶出条件に合わせて精製を行ったところアセトニトリル-ジエチルエーテル (1:19) 混液 20 mL で洗浄後、同 (1:3) 混液 30 mL で溶出したとき HPLC

Fig. 6. Mass spectra of dymron by GC/MS

(a): 1 µg/mL dymron standard solution, (b): 0.10 ppm spiked brown rice extract

GC/MS conditions: column, DB-5 ms (0.25 mm i.d.×30 m); inlet temperature, 250°C; oven temperature program, 120°C (1.2 min)→(8°C/min)→280°C (3 min); ionization mode, EI; ionization voltage, 70 eV

クロマトグラム上試料由来の妨害ピークの影響が最も少なかった。

しかし、たまねぎなど試料によっては微小なピークがHPLCクロマトグラム上に出現し精度よく測定することが困難であった。そこで、他のカラムカートリッジをSAXの上段に接続することにより妨害物質の除去を試みた。

フロリジル、シリカ、NH₂、C18、ジオール及び

PSAをSAXの上段に接続し、試料抽出溶液を1 mL負荷した。各カラムカートリッジの溶出条件に合わせて洗浄し、洗浄後は上段に接続したカートリッジをはずし、SAXに保持されたダイムロンをアセトニトリル-ジエチルエーテル(1:3)混液30 mLで溶出した。その結果、PSA及びSAXカートリッジの組み合わせが最も試料由来の妨害ピークを取り除くことができ、かつダイムロンが98%以上と良好に回収された。そこで、ダイ

Fig. 7. Mass spectrum of dymron by LC/MS

(a): 1 $\mu\text{g/mL}$ dymron standard solution, (b): 0.10 ppm spiked brown rice extract
 LC/MS conditions: column, COSMOSIL[®] C18-AR (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); column temperature, 40°C; mobile phase, acetonitrile-water (50 : 50); ionization mode, APCI⁺

ムロンの精製は、Bond Elut[®] PSA 及び SAX を用い PSA を SAX の上段に接続し、試料抽出液を負荷した後、アセトニトリル-ジエチルエーテル (1 : 19) 混液 20 mL で洗浄し、PSA をはずして SAX にアセトニトリル-ジエチルエーテル (1 : 3) 混液 30 mL を注入して溶出することにした。いずれの農産物においても妨害なく測定することができた。玄米及びたまねぎにダイムロンを 0.10 ppm になるように添加したときの HPLC クロマト

グラムを Fig. 5 に示した。

3. ダイムロンの確認

UV 検出器は選択性がやや劣るためダイムロンの検出に際し、GC/MS あるいは LC/MS でダイムロンの確認をすることが望ましい。GC/MS は HPLC 用に調製した試験溶液のアセトニトリルを留去した後、ジエチルエーテルに溶解して直接測定した (Fig. 6)。なお、LC/MS は標準品によりチューニングし、感度調整した後、

Table 1. Recoveries of Dymron from Agricultural Products Spiked at the Level of 0.10 ppm

Sample	Recovery ¹⁾ (%)
Brown rice	98.3±2.6
Corn	93.9±3.6
Soy bean	96.3±2.9
Apple	94.1±5.0
Strawberry	99.3±6.6
Sweet potato	96.0±2.8
Taro	98.7±3.3
Potato	96.4±3.0
Burdock	99.3±5.9
Lettuce	101.5±6.0
Water dropwort	95.0±5.8
Tomato	103.3±3.3
Green pepper	93.3±2.7
Onion	98.4±3.0
Welsh onion	94.8±5.7
Spinach	99.8±7.5
Field pea	101.9±3.1
Cotton seeds	105.2±5.0

¹⁾ Average $\pm$ standard deviation of 3 determinations

HPLC 用の試験溶液をそのまま用いて測定した (Fig. 7). 0.10 ppm になるように添加したダイムロンはいずれの方法によっても良好に確認できた。しかし、GC/MS では注入口での加熱分解やインサートへの吸着などにより 0.01 ppm 前後のダイムロンの確認が困難となることも推察され、留意が必要と考える。

4. 添加回収試験結果

あらかじめダイムロンを含有していないことを確認した 18 種類の試料を用いて、添加回収試験を行った。各試料それぞれ 20 g に 10 μ g/mL のダイムロン標準溶液をそれぞれ 200 μ L ずつ加え (試料中濃度 0.10 ppm に相当)、30 分間放置した後、本法に従い回収試験を

行った。3 回の試行による回収率の平均値を Table 1 に示した。

いずれの試料でも回収率は 93% 以上であり、良好な回収結果が得られた。

なお、本法における検出限界は 0.005 ppm であった。

5. 市販品におけるダイムロンの残留実態調査

本法を用い、平成 9 年 4 月から平成 10 年 3 月にかけて東京都内に搬入された玄米 24 検体、ピーマン及びレタスなどの国内産野菜果実類 8 種 51 作物の計 9 種 75 検体について検査したところ、ダイムロンはいずれから検出されなかった。なお、いずれの作物においても HPLC クロマトグラム上に特に定量を妨害するピークはみられなかった。

ま と め

ダイムロンの簡便で精度の良い分析法を検討した。

農産物中のダイムロンは、アセトンで抽出し酢酸エチルに転溶した後、Bond Elut[®] PSA 及び SAX カートリッジで精製することにより、UV 検出 HPLC で、精度良く測定できた。試料中の濃度が 0.10 ppm になるように添加したときの回収率は 93% 以上であり、検出限界は 0.005 ppm であった。

本法は、簡便な操作で精度良く農産物中のダイムロンを測定できることから、実用上十分使用できる方法であると考ええる。

本研究の要旨は日本食品衛生学会第 75 回学術講演会において発表した。

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) “農業ハンドブック 1994 年版” p. 358~359 (1994) 日本植物防疫協会。
- 2) 農業環境保全対策研究会編: “残留農業ハンドブック—作物・水質残留の分析法—” p. 449~451 (1995) 化学工業日報社。
- 3) 残留農業簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究 45 (9), 31~49 (1995)。