

HPLCによる農産物中のカルベンダジム, チオファネートメチル 及びベノミルの分析

酒井 奈穂子*, 高野 伊知郎*, 小林 麻紀*, 田村 康宏*,
富澤 早苗*, 立石 恭也*, 上條 恭子*, 永山 敏廣**, 井部 明広*

Determination of Carbendazim, Thiophanate-methyl and Benomyl in Agricultural Products by HPLC

Naoko SAKAI*, Ichiro TAKANO*, Maki KOBAYASHI*, Yasuhiro TAMURA*,
Sanae TOMIZAWA*, Yukinari TATEISHI*, Kyoko KAMIJO*, Toshihiro NAGAYAMA** and Akihiro IBE*

A determination method of carbendazim (MBC), thiophanate-methyl (TM), and benomyl (BM) in agricultural products by using HPLC was investigated.

MBC, TM and BM were extracted with methanol from homogenates of agricultural products. The methanol extract was evaporated down to ca. 70 mL, and 100 mL of 10% sodium chloride solution added, and defatted by *n*-hexane partitioning. The three compounds were extracted with ethyl acetate-*n*-hexane (1:1) from the aqueous layer and adjusted to pH 6~7. BM was hydrolyzed to MBC while being extracted with methanol. TM in the ethyl acetate-*n*-hexane (1:1) extract was converted to MBC by refluxing at 120°C, for 30 min with copper acetate in 50% acetic acid. For tea samples, the three compounds were cleaned up using Bond Elut® PSA after refluxing with copper acetate. Total concentration of BM, TM and MBC were measured as that of MBC by HPLC.

Recoveries at the 0.10 µg/g level were more than 70% from agricultural products except for some crops. The detection limits were 0.01 µg/g in all samples, except for tea where the limit was 0.05 µg/g.

Keywords : カルベンダジム carbendazim, チオファネートメチル thiophanate-methyl, ベノミル benomyl,
農産物 agricultural products, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

カルベンダジム (MBC), チオファネートメチル (TM) 及びベノミル (BM) は, 菌核病, 灰色カビ病, フザリウム病害など広範囲の病害に有効な効果を示すベンゾイミダゾール系の浸透性殺菌剤である. TM及びBMは, いずれも農産物中で代謝されMBCとなり, いずれもこのMBCとして殺菌作用を示すといわれている¹⁻³⁾. また, 実験室内において, 溶液中でTMは徐々に, BMは速やかにMBCに変換することが確認されている.

厚生労働省は, 平成18年5月末までに農産物中の残留農薬基準にポジティブリスト制度を導入するにあたり, 本年6月3日に示された「食品中に残留する農薬等の暫定基準(最終案)⁴⁾」の中で, これら3農薬の総和をMBCに換算して基準を設ける方向を示している. そこで今回, 環境省告示試験法⁵⁾に示されているTMをMBCに変換して測定する方法を基に, TM及びBMをMBCに変換して, 3農薬を合わせて分析する方法を試みたので報告する. なお, Fig.1にMBC, BM及びTMの構造式を示す.

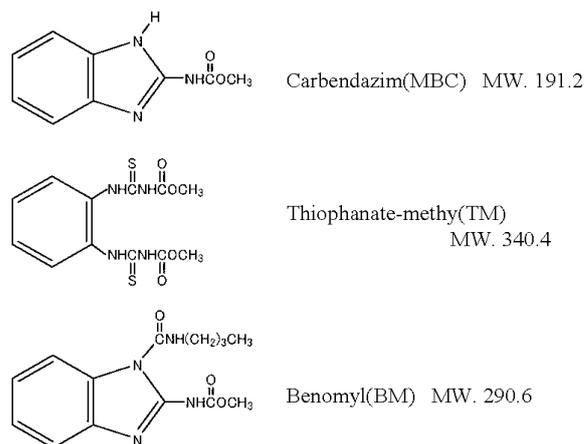


Fig. 1. Structures of Compounds

実験方法

1. 試料

市販の玄米, 大豆, オレンジ, りんご, ぶどう, トマト,

* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科

ばれいしょ、たまねぎ、ほうれんそう及び茶の10種類を対象とした。

2. 試薬

農薬標準品：MBC及びBMは林純薬Riedel-de Haen社製、TMは和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用標準品を用いた。

農薬標準溶液：各農薬標準品をそれぞれメタノールに溶解し、1,000 µg/mLの標準原液を調製した。各標準原液の0.5 mLをメスフラスコにとり、メタノールで正確に50 mLとして、MBC、TM及びBMの10 µg/mL混合標準溶液を作成した。

ミニカラム：Bond Elut® PSA（充填量 500 mg、バリアン社製）をあらかじめアセトン及び*n*-ヘキサン20 mLでコンディショニングした後、使用した。

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

アルミヒートブロック：PATENT PENDING JAPAN製 DRY BLOCK BATH AL-1000

高速液体クロマトグラフ（HPLC）：（株）島津製作所製 LC-10AT型ポンプ及びRF-535型蛍光検出器

液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）：Micromass社製 Quattro LC system

4. 分析方法

環境省から告示された「チオファネートメチル試験法」（以下、TM試験法と略す。）を一部改良した。試料溶液の調製方法をFig. 2に示した。

1) HPLC測定条件 カラム：Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, GLサイエンス社製）、カラム温度：50°C、移動相：アセトニトリル-水（3:7）混液、流速：0.8 mL/min、試料注入量：20 µL、検出器：蛍光（励起波長285 nm, 蛍光波長315 nm）。

2) LC/MS測定条件 カラム：Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm GLサイエンス社製）、カラム温度：50°C、移動相：アセトニトリル-水（3:7）混液、流速：0.8 mL/min、試料注入量：20 µL、イオン化モード：ESI（positive）法、コーン電圧：30 V。

5. 添加回収試験

あらかじめMBC、TM及びBMを含有していないことを確認した玄米、大豆、オレンジなど10種類を用い、試料中の各農薬の濃度が0.10 µg/gになるようMBC、TM及びBM混合標準溶液を加え、30分間放置後、本法に従い回収試験を行った。また、検量線は添加した混合標準溶液を同様に閉環反応処理して作成した。

結果及び考察

今回検討対象としたTM及びBMは、環境省告示において

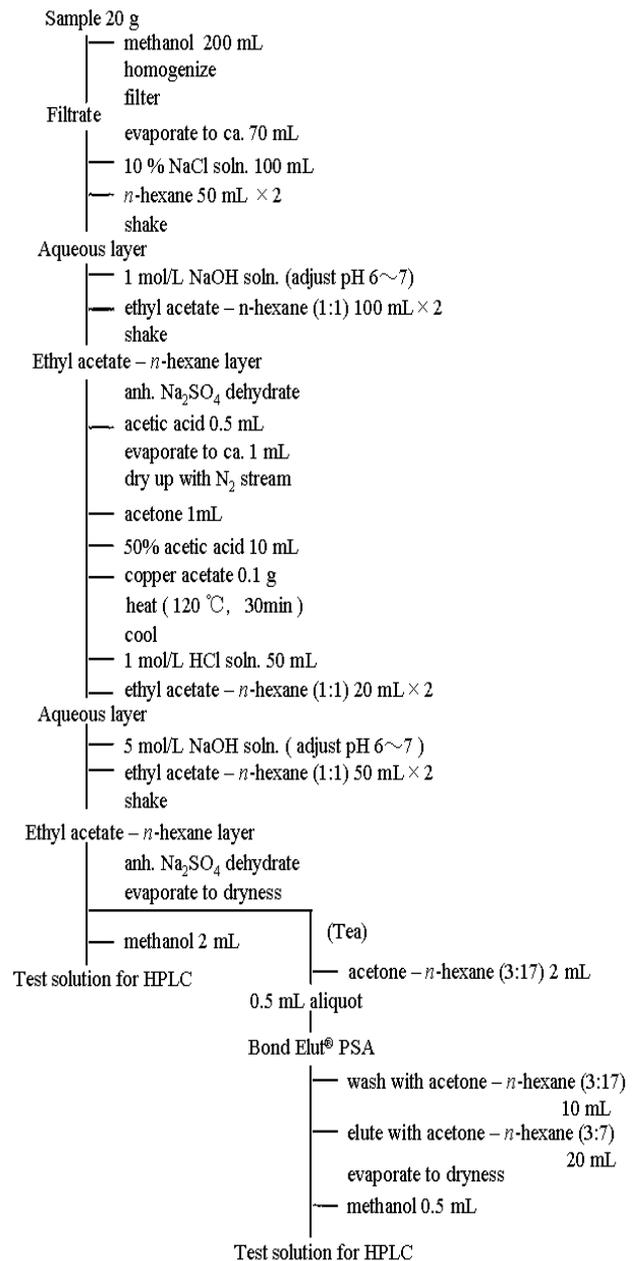


Fig. 2. Analytical Method for MBC, TM and BM

それぞれ別の試験法として示されているが、両者ともMBCに変換して測定する方法である⁵⁾。そこでTM試験法を基本として、MBC、TM及びBMを一度の操作で分析するために以下の条件を検討した。

1. 転溶溶媒の検討

n-ヘキサン洗浄後の転溶溶媒について検討した。MBC、TM及びBMは、中性付近では水から無極性溶媒へは転溶されにくく、比較的極性の高い溶媒で転溶される。TM試験法において用いられるジクロロメタンは排出規制が設けられているため、酢酸エチル、ジエチルエーテル及びこれらと*n*-ヘキサンの混合溶液について検討した。その結果、いずれもほぼ100%転溶されたが、中でも酢酸エチル-*n*-ヘキサン（1:1）混液が、実試料を用いたときにエマルジョン形成が比較的少なかったためこれを用いることとした。

2. 閉環反応における温度と時間の検討

本法は酢酸及び酢酸銅を加えて加熱還流し、TMをMBCに変換する閉環反応処理が必要であり、回収率に最も影響を及ぼすと考えられたため、反応温度と時間について検討を加えた。TM試験法では、30分間激しく沸騰させると示されている。そこで、TM 1 µg/mLをアルミヒートブロックを用いて80°C、100°C及び120°Cと温度を変えて30分間加熱し、生成したMBCを測定した。その結果、MBCのピーク面積は120°Cで最大となることがわかった。120°C以上でさらに生成量が増大することも考えられたが、反応後の冷却等の操作性を考慮して120°Cで行うこととした。次いで、120°Cにおける反応時間の検討を行った。10、20、30、40及び60分間反応させたところ、ピーク面積は30分で最大となり、40分では小さくなることがわかった。よって閉環反応は、120°C、30分で行うこととした (Fig. 3)。

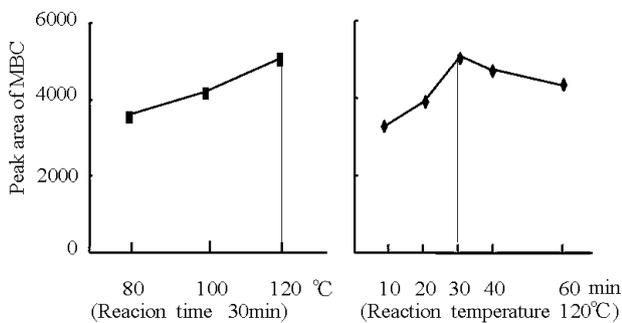


Fig. 3. Effects of Temperature and Time on the Ring Closure Reaction of TM

3. 精製法の検討

ほとんどの農産物ではミニカラムによる精製を行わずに分析できたが、茶では夾雑物が多く、HPLCによる測定が困難であった。そこでBond Elut® PSA, SAX (いずれも500 mg), ACCUCAT (600 mg) 及びENVI™-Carb (250mg) の4種類のミニカラムによる精製法を検討した。

はじめに10 µg/mL MBC標準溶液を各々のミニカラムに負荷し、洗浄及び溶出溶媒にアセトン及び*n*-ヘキサンを混液を用い、それらの混合比を(1:99)から(1:1)まで変えて、各混液を順次10 mLずつ流下した。その結果、MBCがほぼ100%回収されたものはBond Elut® PSAのみであった。次に、PSAを用い溶出条件に合わせて試料溶液の精製を行ったところ、試料由来の妨害成分を取り除くことができた。そこで閉環反応処理後のMBCの精製にはPSAを用い、アセトン-*n*-ヘキサン(3:17)混液10 mLで洗浄した後、アセトン-*n*-ヘキサン(3:7)混液20 mLで溶出することとした。

4. HPLC条件の検討

ODSカラムを用いてMBCの分離条件を検討した。TM試験法では、リン酸二水素カリウムとメタノールの混液を用いているが、LC/MSによる測定も可能にするため、アセトンニトリルと水の混液による移動相の検討を行った。検出条

件はTM試験法に従った。

アセトンニトリルの含有量が70%、流速0.8 mL/minとしたとき、MBCは約6分で溶出した (Fig. 4)。ピーク形状や妨害ピークとの分離も良好であったことから、移動相としてアセトンニトリル-水(3:7)混液を用いた。

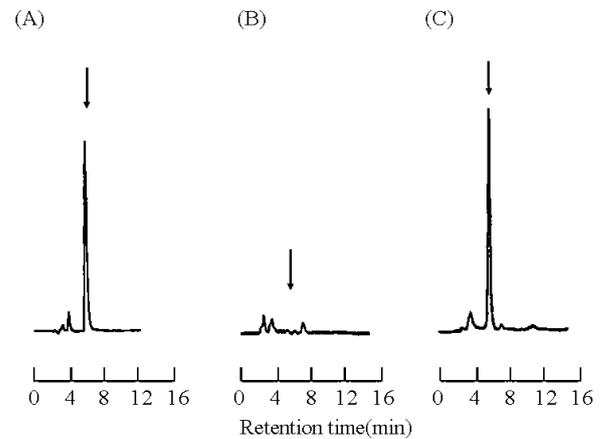


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Standard and Spinach Extract (A): standard of MBC (1 µg/mL), (B): unspiked sample, (C): spiked with 3mix standards (0.10 µg/g)

5. MBCの確認

MBCの確認としてLC/MSによる方法を検討した。MBC標準品20 ngを注入し、ESI (positive) 法で測定したところ、プロトン負荷イオン[M+H]⁺190.2が観測された。次に、混合標準溶液を添加(試料中濃度各0.10 µg/gに相当)したほうれんそう抽出溶液中のMBCについて測定したところ、同様のスペクトルが得られたことから、MBCの確認にLC/MSが有用であることがわかった (Fig. 5)。

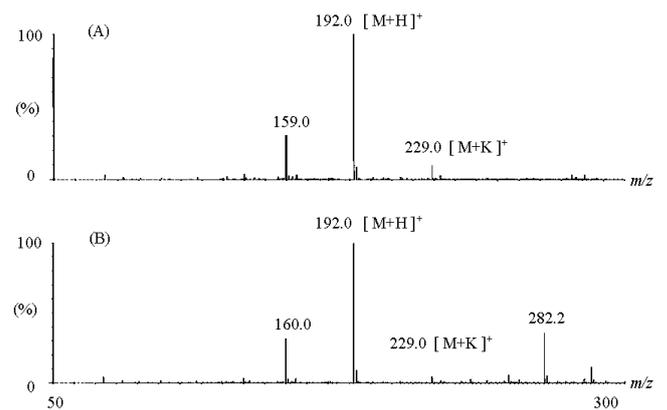


Fig. 5. Mass Spectra of MBC by LC/MS (A): 1 µg/mL MBC standard solution, (B): extract solution of spinach spiked with 3mix standard (0.10 µg/g)

6. 添加回収試験

添加回収結果をTable 1に示した。回収率は、大豆及びばれいしょを除き70%以上であり、概ね良好であった。また、どの農産物も試料由来の夾雑ピークによる影響は見られなかった。本試験法における定量限界は0.01 µg/g (茶は0.05

μg/g) であった.

Table 1. Recoveries of 3mix Standard from Agricultural Products Spiked at the Level of 0.1 μg/g

Sample	Recovery ¹⁾ (%)
Brown rice	70.6±6.1
Soy bean	54.4±8.4
Orange	88.8±9.0
Apple	75.6±2.0
Grape	83.9±4.5
Tomato	88.0±7.2
Potato	54.5±2.3
Onion	88.3±3.0
Spinach	78.6±4.3
Tea	97.6±10.1

1) Average ± Standard Deviation (n=3)

ま と め

HPLCを用いた農産物中のMBC, TM及びBMの3農薬について分析法を検討した. 試料からの抽出はメタノール, 転溶は酢酸エチル-*n*-ヘキサン (1:1) 混液を用いた. BMはメタノール中で速やかにMBCに変換され, TMは酢酸銅存在下閉環反応処理することでMBCに変換した. 閉環反応処理は120°C, 30分で行った. 3農薬は, HPLC法により総MBCとして測定した. 本法を用いて添加回収試験を行ったところ, 回収率は一部の農産物を除いて70%以上であり, 定量を妨害するピークは認められなかった.

文 献

- 1) Vonk, J.W., Sijpesteijin, A.K: *Pestic.Sci.*, **21**, 160, 1971.
- 2) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二: 残留農薬分析法, 2002年度版, 48-51, 490-492, 2002, ソフトサイエンス社, 東京.
- 3) 志賀直史, 俣野修身, 後藤真康: 日本農薬学会誌, **2**, 27-32, 1977.
- 4) 厚生労働省食品安全部基準審査課: 食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度における暫定基準の設定 (最終案) 等に対する御意見の募集について, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu2/050603-1.html>
- 5) 環境庁告示: 第 26 号, 昭和 55 年 3 月 27 日.