

---

 原著
 

---

## 農産物におけるピラフルフェンエチル残留分析法について

佐藤久美子、岸 美智子、佐藤修二

## Analysis method for Pyraflufen-ethyl in Agricultural Products

Kumiko SATO, Michiko KISHI, Syuji SATOH

## Synopsis

SAT, K., KISHI, M. and S. SATOH (Kanagawa Pref. P. H. Lab., Asahi-ku, Yokohama, 241-0815)

The analysis method for Pyraflufen-ethyl in agricultural products was investigated. Pyraflufen-ethyl was extracted with acetone followed by evaporation, and sodium chloride solution was added to the residue before extraction with n-hexane. The extract was evaporated and partitioned between acetonitrile and n-hexane. The acetonitrile layer was evaporated and cleaned up on a Florisil column. Pyraflufen-ethyl was determined by GC and GC/MS. Recoveries of Pyraflufen-ethyl from all samples, corns and fruits, were more than 80% ,and Pyraflufen-ethyl was not detected in all samples.

**Key Words :** pyraflufen-ethyl, herbicide, agricultural products, GC, GC/MS, Florisil

## 緒言

ピラフルフェンエチル (Fig. 1) は低濃度で広葉の雑草に効果を示す除草剤であり<sup>1)</sup>、1999年4月19日農薬登録保留基準の「作物残留に係る登録保留基準」及び「水質汚濁に係る登録保留基準」に新規追加された農薬である。環境庁長官個別設定の基準値としては、小麦、小麦以外の麦・雑穀、みかん、みかん以外のかんきつ類、第二大粒果実類に対して0.1ppm と設定されている<sup>2)</sup>が、食品衛生法においてはまだ基準は設定されていない。

環境庁告示法においてはアセトニトリル抽出、多孔性。

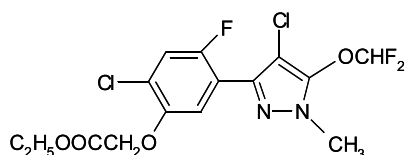


Fig.1 Chemical structure of Pyraflufen-ethyl

けい藻土カラム、シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムによる精製法が用いられている<sup>2)</sup>が、農産物中の残留分析に関する文献は少ない。今回は食品衛生法に適用されている含窒素系農薬と同様な試験方法、すなわちアセトン抽出、n-ヘキサン等による転溶、フロリジルカラムによる精製で分析が可能かどうか検討を行った。

## 方法

## 1 試料

小麦、とうもろこし、おうとう、オレンジ、レモン、りんご、キウイ、バナナ、いちご及びかきを用いた。

## 2 試薬

ピラフルフェンエチル標準品は和光純薬工業社製、塩化ナトリウムは和光純薬工業社製試薬特級、アセトン、n-ヘキサン、アセトニトリル、ジエチルエーテル及び無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業社製残留農薬試験用を、フロリジルは和光純薬工業社製フロリジルPR (130℃で12時間活性化後使用)を用いた。

## 3 装置及び測定条件

## 3・1 装置

ガスクロマトグラフ：島津製作所製、GC-17A、FTD

神奈川県衛生研究所食品薬品部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

検出器付き (以下 GC-FTD と略す)  
 ガスクロマトグラフ・質量分析計 (以下 GC/MS と略す) ガスクロマトグラフ部分: ヒューレットパッカード製、HP-5890 SERIES II

質量分析計部分: 日本電子製 Automass 20

3・2 測定条件

3・2・1 GC-FTD 測定条件

キャピラリーカラム:

条件① DB-17 (内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m、J & W Scientific 社製)

条件② DB-5 (内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m、J & W Scientific 社製)

カラム温度

条件①: 50°C (2分保持) - (20°C/分昇温) - 280°C (10分保持)

条件②: 50°C (2分保持) - (20°C/分昇温) - 240°C (10分保持) - (20°C/分昇温) - 280°C (10分保持)

注入口温度: 220°C

検出器温度: 280°C

キャリアーガス: ヘリウムガスの流量が2.4ml/分となるように調整した。

注入量: 2 μ l (スプリットレス)

3・2・2 GC/MS 測定条件

キャピラリーカラム: DB-5 (内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m、J & W Scientific 社製)

カラム温度: 50°C (2分保持) - (20°C/分昇温) - 280°C

(10分保持)

注入口温度: 220°C

キャリアーガス: ヘリウムガスの流量が1.2ml/分となるように調整した。

注入量: 2 μ l (スプリットレス)

3・2・3 定性・定量下限

定性・定量下限

定性下限 (S/N=5) 定量下限 (S/N=10)

果実類 0.005ppm 0.01ppm

穀類・豆類 0.01ppm 0.02ppm

4 試験溶液の調製 (Fig. 2)

4・1 試料からの抽出

細切した試料20.0g にアセトン100ml を加え、高速ホモジナイザーで2分間細砕した後、遠心分離器を用いて毎分6000回転で5分間遠心分離した。ただし、試料が穀類・豆類のように脂肪分が多いものについては、粉碎した試料10.0g に水20ml を加え2時間放置後、アセトン100ml 加え同様の操作を行った。続いて上清を分離後、残さにアセトン50ml を加え、同じ操作を繰り返した。得られたアセトン層を合わせ、アセトンを減圧下で20ml 程度まで留去した。これに n-ヘキサン100ml 及び10% 塩化ナトリウム溶液100ml を加え5分間激しく振とうした後、n-ヘキサン層を分取した。水層に n-ヘキサン50ml を加え同様に操作を行った。n-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、n-ヘキサンを減圧下で留去した。油脂を多く含む場合は以下の脱脂操作を行っ

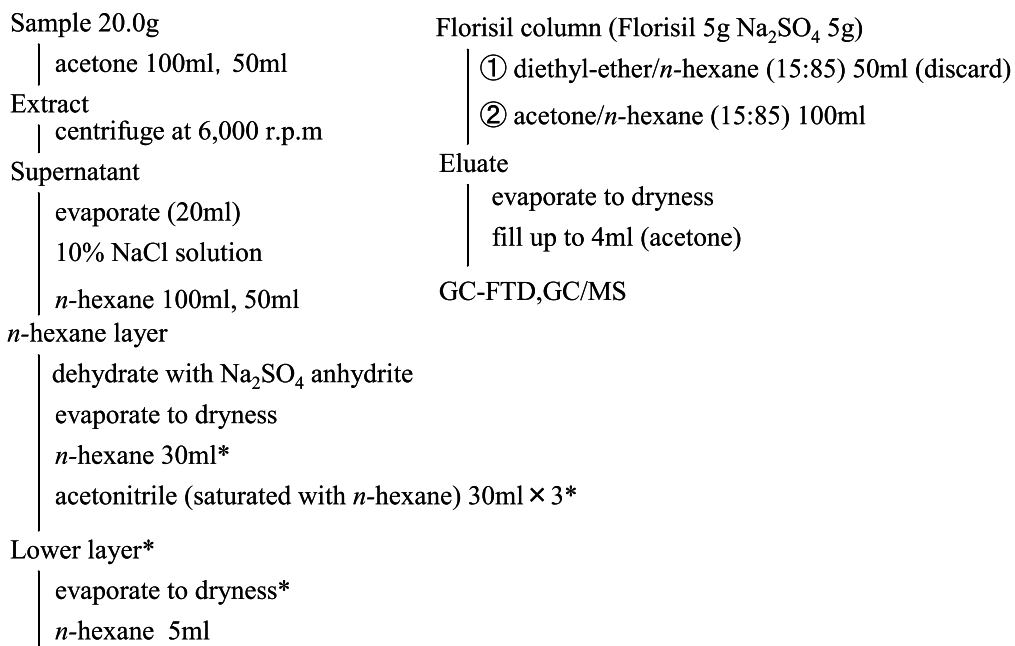


Fig.2 Analytical procedure for Pyraflufen-ethyl in agricultural products  
 Asterisk (\*) indicates the steps not necessary in case of oilless foods.

た。すなわち留去後の残留物にヘキサン30ml 及びヘキサン飽和アセトニトリル30ml を加え5分間激しく振とうした後アセトニトリルを分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30ml を加え、同様に2回操作した後、アセトニトリル層を合わせ、減圧下でアセトニトリルを留去した。

#### 4・2 フロリジルカラムによる精製

内径15mm のカラム管にフロリジル5g を *n*-ヘキサンにて湿式充填した後、無水硫酸ナトリウム5g を積層させフロリジルカラムとした。得られた抽出物に *n*-ヘキサン5ml を加え、フロリジルカラムに負荷し、エーテル・ヘキサン(15:85)50ml で溶出後(この画分は捨てる)アセトン・ヘキサン(15:85)100ml で溶出し、得られた画分の溶媒を減圧下留去し、残留物をアセトンで正確に4ml とし、GC-FTD で測定し、GC/MS で確認を行った。

### 結果及び考察

#### 1 食品からの抽出条件について

##### 1・1 液液分配における溶媒の検討

含窒素系農薬、有機リン系農薬で一般的に用いられる *n*-ヘキサンと酢酸エチル・*n*-ヘキサン(20:80)で10%塩化ナトリウム溶液100ml に対して回収率の比較検討を行った(Table 1)。どちらの溶媒も良好な回収率を得ることができたが、より良好な結果を得ることができ、実際に農産物に適用するにあたり、抽出後の妨害物質が少なくと考えられる *n*-ヘキサンを採用することとした。

#### 1・2 脱脂操作の検討

脱脂操作におけるピラフルフェンエチルの抽出状態を把握するために脱脂操作の検討を行った。脱脂操作においては1回の抽出でアセトニトリル層にほとんど移行したが、実際の農産物の抽出時においては夾雑物等の原因によるエマルジョン生成の可能性等を考慮して通常行われる3回抽出とした。

#### 1・3 精製条件の検討

ピラフルフェンエチルのフロリジルカラムの溶出挙動を把握するために精製条件の検討を行った (Table 2)。フロリジルカラム精製においてピラフルフェンエチルはエーテル・*n*-ヘキサン混液では溶出せず、アセトン・*n*-ヘキサン混液で溶出することがわかった。実際の農産物試料では溶出位置が異なる可能性があり、さらに精製効果を鑑みてエーテル・ヘキサン(15:85)50ml で溶出後、アセトン・ヘキサン(15:85)で溶出操作を行うこととした。

#### 2 ガスクロマトグラフ測定条件について

##### 2・1 カラム極性の検討

ピラフルフェンエチル測定におけるキャピラリーカラムについては無極性の DB-1カラムではピーク形状の再現性が悪く、テーリングする傾向がみられたため、定性・確認には使用可能であるが定量には不適であった。中極性の DB-17 (測定条件①)を用いたところピーク形状再現性ともに良好であった。

Table 1 Comparison between *n*-hexane and ethyl acetate/*n*-hexane used for extraction for recoveries of Pyraflufen-ethyl

Solvent	Recovery (%) (Mean ± R.S.D, n=3) R.S.D.:Relative standard deviation
<i>n</i> -hexane	99.9 ± 8.5
Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (20:80)	89.9 ± 14.4

Table 2 Elution patterns of Pyraflufen-ethyl by Florisil column chromatography

Fraction No.	Solvent	Recovery (%) (Mean ± R.S.D, n=3)
F1	<i>n</i> -hexane	50ml —
F2	diethyl-ether/ <i>n</i> -hexane (5:95)	50ml —
F3	diethyl-ether/ <i>n</i> -hexane (15:85)	50ml —
F4	diethyl-ether/ <i>n</i> -hexane (30:70)	50ml —
F5	acetone/ <i>n</i> -hexane (5:95)	50ml 53.6 ± 7.0
F6	acetone/ <i>n</i> -hexane (15:85)	50ml 41.0 ± 4.2
F7	acetone/ <i>n</i> -hexane (30:70)	50ml —
F8	acetone/ <i>n</i> -hexane (50:50)	50ml —

測定条件①において添加回収用サンプル試験溶液を測定したところ、すべての試料についてピラフルフェンエチルのピークの直前に試料由来のピークがみられた。そのピークはピラフルフェンエチルのピークと完全に分離し、この測定条件においては測定可能であった。しかしカラムの劣化などにより分離条件が悪化した場合はピークが重なる可能性も考えられたため、直前の試料由来のピークをピラフルフェンエチルのピークとさらに分離するための検討を行った。

まず、微極性カラムで分離がどのように変化するか検討を行った。測定条件①と同様の昇温条件で DB-5のカラムにおいてピラフルフェンエチルを測定した。

DB-5のカラムにおいてもピラフルフェンエチルのピーク形状・再現性ともに良好であった。しかし DB-5においても測定条件①と同様の昇温条件では直前のピークとの保持時間の差は広がらなかった。DB-5のカラムにおいてもピラフルフェンエチルが流出する温度条件の検討は必要とされたため、最高使用温度が DB-17よりも高く検討しやすい DB-5のカラムにおいて流出温度の検討を行った。

2・2 温度条件の検討

キウイーにピラフルフェンエチルを添加した試験溶液を用い流出温度を280℃から270℃、260℃、250℃、240℃と下げていったところ、240℃においてもピラフルフェンエチルは流出し、直前のピークとの保持時間の差は0.36分であり影響はほとんど受けないと考えられた (Table 3)。従ってピラフルフェンエチルの流出温度は240℃とし、流出後280℃まで昇温する条件を設定した (測定条件②)。

測定条件②で測定して得られたガスクロマトグラムについては、Fig. 4に標準溶液のガスクロマトグラムを Fig. 5、6に試料溶液を代表して小麦及びキウイーのガスクロマトグラムを示した。ピラフルフェンエチルの保持時間は約16分であり、標準溶液の検量線 (Fig. 3) は注入絶対量として0.2~2.0ng の範囲で原点を通る良好な直線性が得られた。試料溶液ではいずれの農産物でもピラフルフェンエチルの保持時間の直前に試料由来のピークが検出されたものの、ピーク流出時のカラム温度条件を緩和することで添加試料においてピラフルフェンエチルのピークと完全に分離させることができた。

Table 3 Effect of final temperature to retention time of Pyraflufen-ethyl and Interruptive peak

GC capillary Column	Final Temperature (°C)	Retention time (min)		
		Interruptive peak	Pyraflufen-ethyl	Balance
DB-17	280	16.187	16.281	0.094
DB-5	280	14.654	14.758	0.104
DB-5	270	14.704	14.822	0.118
DB-5	260	14.884	15.039	0.155
DB-5	250	15.406	15.639	0.233
DB-5	240	16.224	16.583	0.359

Table 4 Recoveries (%) of Pyraflufen-ethyl added to 10 samples

Samples	Spiking level (ppm)	Recovery (%) (Mean ± R.S.D., n=3)
Wheat	0.1	88.4 ± 4.0
Corn	0.1	89.8 ± 6.3
Cherry	0.1	97.3 ± 2.0
Orange	0.1	109.4 ± 1.2
Lemon	0.1	118.0 ± 12.1
Apple	0.1	113.5 ± 9.1
Kiwi fruit	0.1	98.1 ± 7.3
Banana	0.1	106.5 ± 11.1
Strawberry	0.1	98.8 ± 1.8
Persimmon	0.1	94.9 ± 1.1

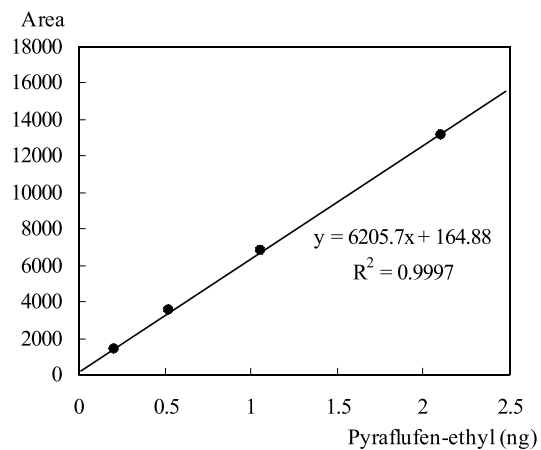


Fig.3 Calibration curve of Pyraflufen-ethyl (0.2~2.0ng)

ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS)によって得られたピラフルフェンエチルのトータルイオンクロマトグラム(TIC)、マススペクトル及びマスクロマトグラムについては標準品及び添加試料(りんご)については、Fig. 7~9に示した。TIC では添加試料において夾雑物の影響がかなり見られたものの、マススペクトル及びマスクロマトグラムに関しては分子イオンピークの  $m/z=412$ をはじめ、高分子側の特有なフラグメントイオン( $m/z=195$ 、 $261$ 、 $289$ 、 $349$ 等)についてもピラフルフェンエチルがはっきりと確認された。

### 3 添加回収試験

試料中濃度が $0.1\text{ppm}$ となるように添加し測定条件②で測定し回収率を調べた(Table 4)。すべての試料で88%以上の回収率を得ることができた。レモンの無添加試料においてピラフルフェンエチルの保持時間にピークが見られたため、GC/MSによる確認試験を行ったところ、ピラフルフェンエチルはSIM法においても特有な分子イオン、フラグメントイオンともに確認されなかった。それ以外の無添加の試料では、いずれからもピラフルフェンエチルは検出されなかった。レモンの回収率についてはピラフルフェンエチルのピークに妨害ピークが重なっているために著しく高い値が得られたと考えられた。

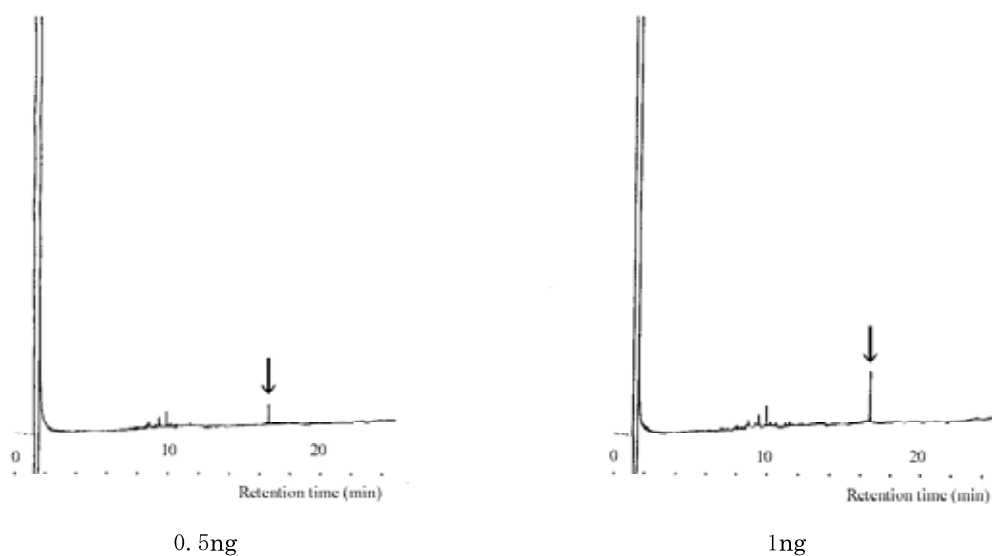


Fig. 4 Gas Chromatograms of Pyraflufen-ethyl standard (0.5ng、1ng)

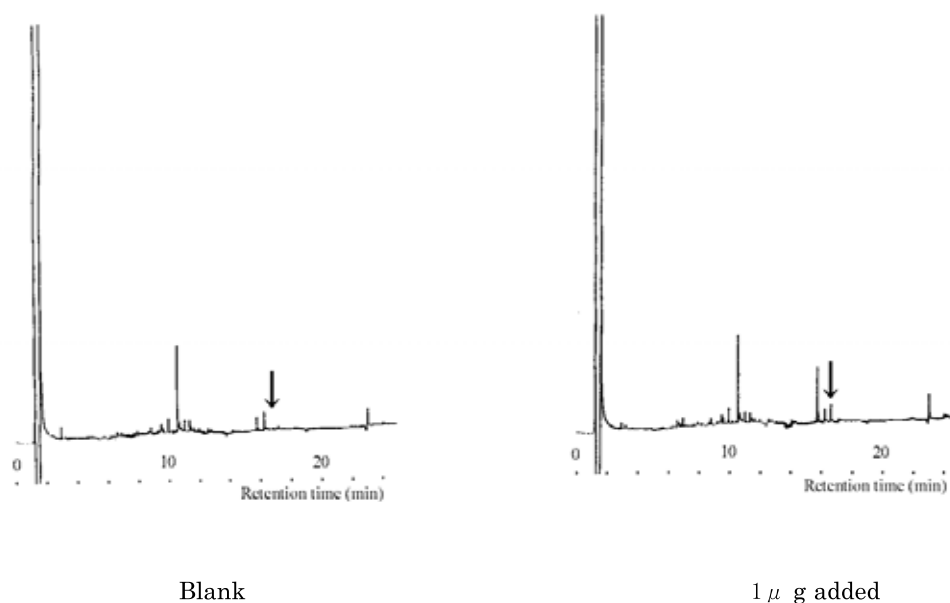


Fig. 5 Gas Chromatograms of Wheat (Blank、 $1\mu\text{g}$  added)

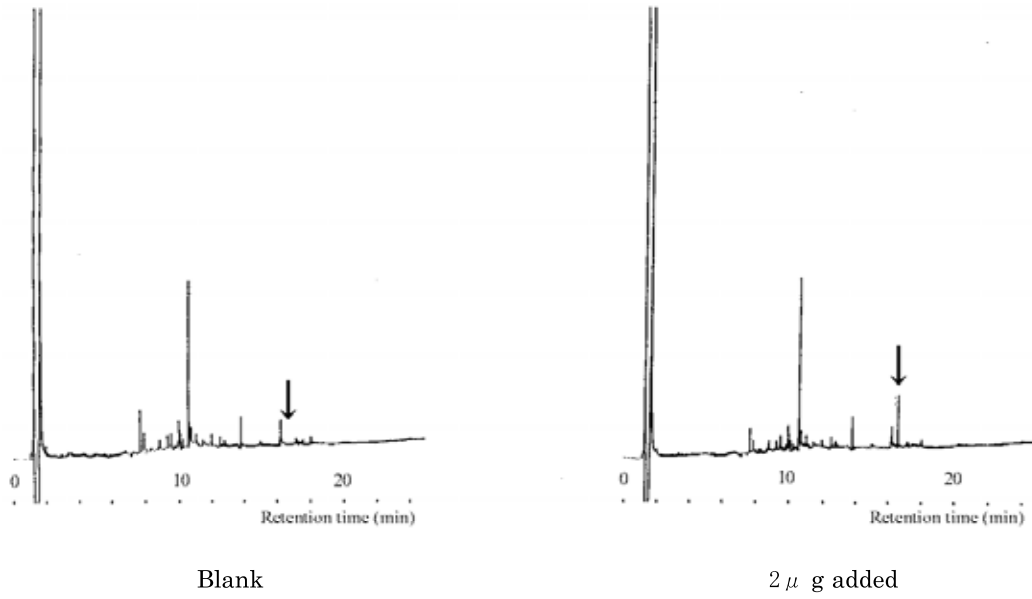


Fig. 6 Gas Chromatograms of Kiwi fruit (Blank, 2  $\mu$  g added)

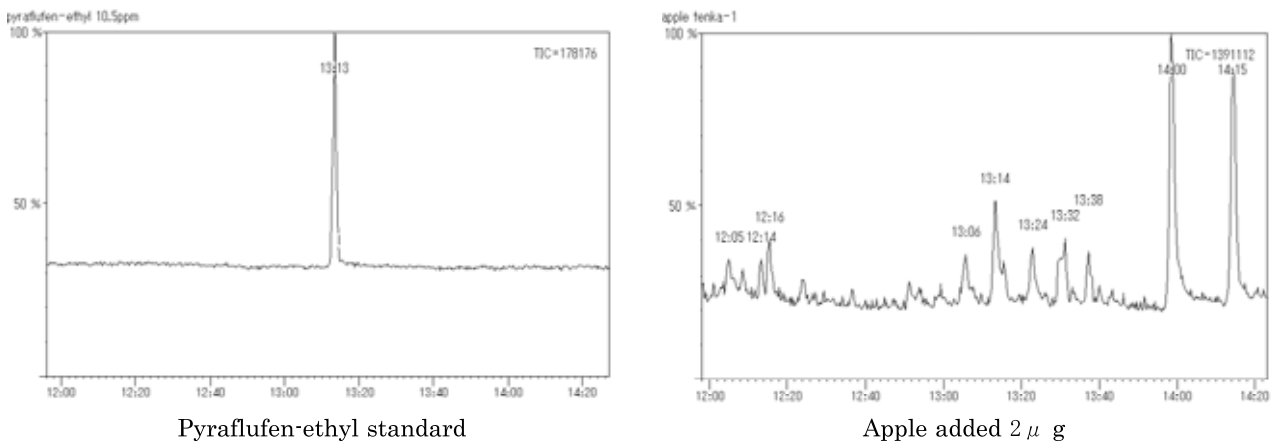


Fig. 7 Total Ion Chromatograms of Pyraflufen-ethyl standard and Apple added 2  $\mu$  g

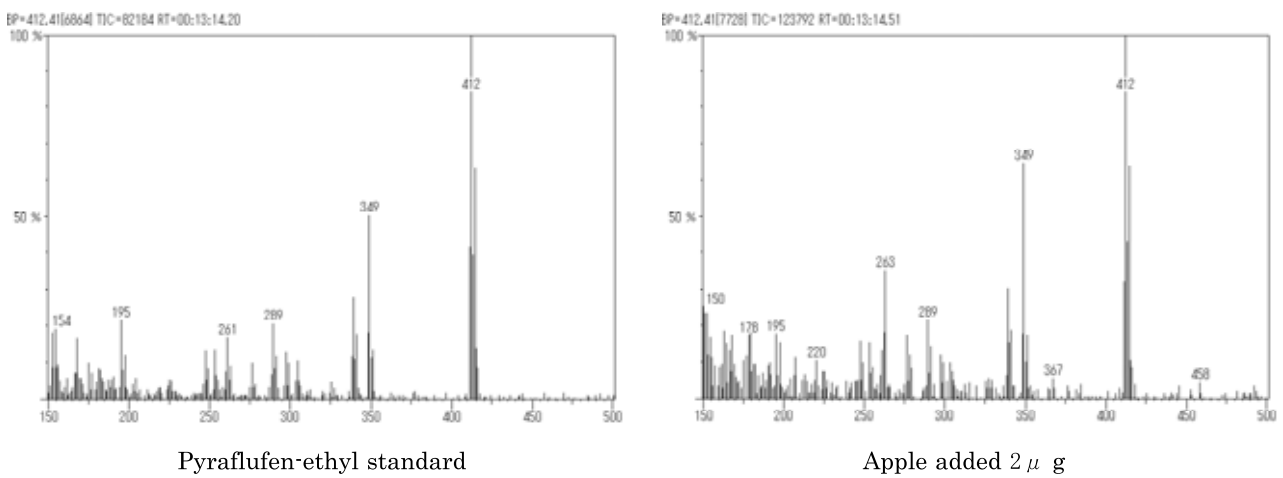


Fig. 8 Mass Spectra of Pyraflufen-ethyl standard and Apple added 2  $\mu$  g

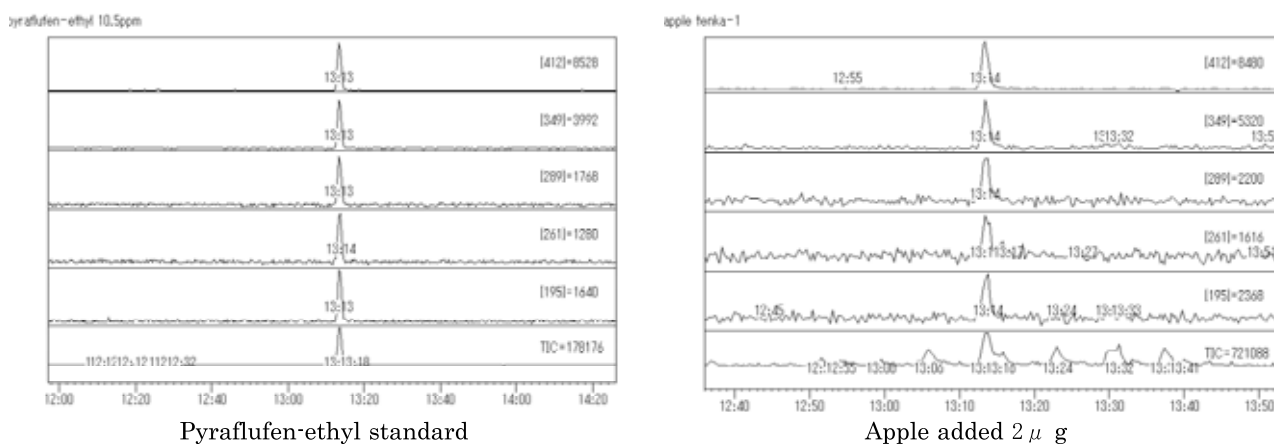


Fig. 9 Mass Chromatograms of Pyraflufen-ethyl standard and Apple added  $2 \mu\text{g}$

## 結論

農産物中のピラフルフェンエチルを分析する手法として、食品衛生法で含窒素系農薬で主に適用されているアセトン抽出、*n*-ヘキサン転溶、アセトニトリル・*n*-ヘキサンによる脱脂、フロリジルカラムによる精製による分析法を検討し、穀類、果実類10種類において添加回収実験を行ったところ80%以上の良好な回収率を得ることができた。従ってピラフルフェンエチルにおいても食品衛生法規制農薬と同様な手法で分析可能であると思われる。妨害ピークが重なったレモンについては分離条件に

さらに検討を要する。

## 謝辞

検討を行うにあたり小麦の試料を提供して頂きました神戸市環境保健研究所の田中俊嗣氏に感謝いたします。

## 文献

- 1) Tomlin, C.D.S.: The Pesticide Manual 11th Ed., British Crop Protection Council (1997)
- 2) 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「今月の農業」編集室 pp40, pp80 (1999)