報 文

Luke 法抽出, ゲル浸透クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィーによる多成分残留農薬分析法の検討

斎藤 勲, 山田 貞二, 大島 晴美, 早川 順子

愛知県衛生研究所

(平成 7 年 2 月 15 日受理)

Multi Residue Method for Determination of Pesticides Using Luke Method Extraction, Gel Permeation Chromatography and Gas Chromatography

Isao SAITO, Sadaji YAMADA, Harumi OSHIMA and Junko HAYAKAWA

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Kita-ku, Nagoya 462, Japan

We studied multi residue method of pesticides using Luke Method extraction, gel permeation chromatography (GPC) and dual column GC. A sample was extracted with acetone and filtered. Aliquot of the extracts was extracted with dichloromethane-petroleum ether (1:1) without evaporation of acetone. The extract was dehydrated, evaporated *in vacuo*, dissolved in dichloromethane-cyclohexane (1:1) and cleaned up by GPC using Bio Beads S-X3 and mobile phase dichloromethane-cyclohexane (1:1). The eluate fraction of pesticides was evaporated *in vacuo* and dissolved in acetone. The sample was determined with a dual column GC (column DB-1 and DB-1701, or DB-210 and DB-1) equipped with NPD and FPD. Silica gel column fractionation was effective for furthermore clean-up. Recoveries of 65 organic phosphate, carbamate and nitrogen containing pesticides from fortified tomato, lettuce and strawberry ranged 53-122%, except propamocarb, acephate, methamidophos and aldicarb. This multi residue method is fast and convenient to determine pesticide residues in crops.

(Received July 20, 1994; Accepted February 15, 1995)

結 言

食品衛生法に定められた食品中農薬残留基準は, 規制対象が従来の 26 農薬, 52 農産物から 103 農薬, 130 農産物に増加した。しかし, 種々の作物や輸入農産物について農薬使用状況, 各農薬の残留の情報は少なく, 従来から行ってきた個別分析法による農薬分析では対応できない状況となり, 多くの農薬を対象とした多成分一斉分析法の開発が必要となっている。

従来, 検体からの抽出方法としては, アセトンで抽出後, アセトンの大部分を減圧留去, 食塩水で希釈後ヘキサン, ジクロロメタン, 酢酸エチル等で抽出する方法が用いられている^{1,2)}。しかし, アセトン抽出液の減圧濃縮

や溶媒抽出時エマルジョン生成のため液層分離に時間がかかったり, ジクロロメタン以外の溶媒では極性のある農薬の回収率が低い等の問題がある。Luke らは, 200 以上の農薬を対象として, 野菜, 果実等から農薬をアセトン抽出後濃縮操作をせず, 直接ジクロロメタン・石油エーテル混液で抽出する多成分迅速分析法を報告している³⁾。Liao らもアセトン抽出後, GC-MS による多成分分析法を報告している⁴⁾。夾雑物質の少ない検体では, 有機リン系, カーバメート系農薬等は抽出液を直接 GC に注入して, 分析可能である。しかし, 多種類の検体を処理する場合, GC の注入部やカラムの汚れにより分離能が低下するため精製操作を加えることが望ましい。食品から農薬と同時に抽出されてくる油脂成分

は、従来ヘキサン-アセトニトリル分配¹⁾、シリカゲルドライカラム⁵⁾、エキストレルートカラム⁶⁾等により除去されてきた。他方、色素等の除去に、活性炭カラム等⁷⁾が用いられている。油脂成分の優れた除去方法としてのゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) は、1968年 Aker らにより小麦中マラチオンの分析⁷⁾、1972年 Stalling らにより魚中塩素系農薬、PCBs の残留分析⁸⁾ に応用され、その後多数の研究報告⁹⁻¹²⁾ がある。近年、野菜、果実等の残留農薬分析への適用性等について、Specht と Tillkes¹³⁾、Chamberlain¹⁴⁾、石井ら¹⁵⁾ 等多くの報告^{16,17)} があり、GPC により油脂成分とともにクロロフィル等植物色素も農薬成分と分離されている。

今回、われわれは食品中農薬残留基準の対象となった多数の農薬について、①NPD-, FPD-GC で分析可能な 65 種類の有機リンおよびカーバメート系農薬を対象とする。②検体からの抽出は、基本的に 1 回とし、できる限り多くの農薬が抽出され、かつ操作が簡便な方法として、Luke 法 (アセトン抽出液からジクロロメタン-石油エーテル混液で抽出) を応用する。③油脂成分、植物色素成分など夾雑物質の除去を効率的に行ない、かつ農薬の損失が少ない GPC を精製法に用いる。④再精製が必要な場合は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なう。これらの点を踏まえて、食品中残留農薬の一斉分析法の検討を行なった。

実験方法

1. 試薬

アセトン、石油エーテル、ジクロロメタン、酢酸エチル、ヘキサン、トルエン、無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用 (和光純薬製)、シクロヘキサンは試薬特級を蒸留して用いた。水は脱イオン水を蒸留したものを用いた。クロロフィル、 β -カロチン、リン脂質 (レシチン) は和光純薬製を用いた。コーン油は市販品を用いた。牛脂は牛肉からアセトン-ヘキサン (1:2) で抽出したものをを用いた。

カラムクロマト用シリカゲル (ワコーゲル C-100) は一晚 130°C で加熱活性化し放冷後、重量で 4% 相当の水を加えてよく混合したものを用いた。

2. 農薬標準品

65 種類の農薬標準品は、林純薬、和光純薬、Nanogen 社製を用いた。標準溶液は原則として 1000 ppm トルエン溶液を作成し、用時アセトンで希釈して調製した。GPC 添加回収用標準溶液はジクロロメタン-シクロヘキサン (1:1, v/v) で希釈し用いた。検量線は添加濃度 0.1 ppm の 0.5, 1, 1.5 倍に相当する濃度の標準

溶液を用いて作成した。

3. 作 物

市内スーパーマーケットで市販されていた次の 21 作物を分析対象とし、分析時まで 4°C で保存した: トマト、レタス、イチゴ、ハウレンソウ、キャベツ、ブロッコリー、ネギ、ダイコン、カキ、リンゴ、ナシ、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ミカン、キュウリ、カボチャ、白菜、いんげん、ナス、アスパラガス。

〔器具および装置〕

フードプロセッサー (National, MR-K3)、振とう機 (Miyamoto Shaker, MW-DR)、ホモジナイザー (日本精機製作所)、ロータリエバポレーター (Yamato RE-46)。

ゲル浸透クロマトグラフ (GPC): ポンプ、日立 L-6000; インジェクター、5 ml サンプルループ付レオダイン 5710; カラム、Bio Beads S-X3 200-400 mesh 約 50 g (Bio Rad Laboratories) を充填した 2.2 cm i.d. $\times$ 50 cm 桐山製ガラスカラム; 移動相、ジクロロメタン-シクロヘキサン (1:1) (0.45 μ m メンブランフィルターで吸引ろ過後使用した); 流速 4 ml/分; 試料注入量 4 ml; フラクションコレクター、Advantec SF-2120 で 1 分画 10 ml 分取。

シリカゲルカラム: 4% 含水シリカゲル 4 g をクロマト管 (1.5 cm i.d. $\times$ 30 cm) に乾式で充填し、約 1.5 cm 無水硫酸ナトリウムを積層する。

ガスクロマトグラフ: HEWLETT PACKARD 5890 II; 検出器, NPD, FPD (P mode); 注入, スプリットレス; 注入口温度 220°C; 検出器温度 240°C; カラム (デュアルカラム, 図 1), ① DB-1, 0.32 mm i.d. $\times$ 30 m (NPD), DB-1701, 0.32 mm i.d. $\times$ 30 m (FPD); 温度 140°C (1 分保持)-5°C/分昇温-240°C

Fig. 1 Dual column gas chromatography as described in METHOD.

(20 分); 流速 He 5 ml/分, ② DB-210, 0.53 mm i.d.×30 m (NPD), DB-1, 0.53 mm i.d.×30 m (FPD); 温度 140°C (1 分保持)-20°C/分昇温-160°C-5°C/分昇温-220°C (30 分); 流速 He 10 ml/分.

4. 分析操作

1) 試料の調整, 抽出

野菜, 果実はスピードカッターで粉砕後 100 g を秤取し, アセトン 200 ml を加え, ホモジナイザーで抽出した. アセトン抽出液は吸引ろ過する. 残渣はさらに少量のアセトンで洗い込み, 合計 300 ml とする. 検体 30 g を相当するろ液 90 ml を 500 ml 分液ロートに取り, 石油エーテルジクロロメタン (1:1) 200 ml を加え, 振とう抽出し, 有機層を無水硫酸ナトリウムを充填したカラムに通して脱水する. 抽出後はロータリエバポレーターで減圧濃縮し, N₂ 気流下で溶媒を蒸発させる. ジクロロメタン-シクロヘキサン (1:1) 6 ml に溶解し 3000 rpm, 3 分間遠心分離し, GPC 用試料とする.

ダイコンは通常の抽出では多数の妨害成分が生成するため, 長南の方法¹⁸⁾を一部変更して以下のように処理した. 凍結した試料を室温で 30 分間放置後, 3 cm 角程度に切り, その 50 g を秤取し, 3% リン酸溶液 50 ml, アセトン 200 ml を加え, ホモジナイザーで抽出し以下同様に処理した.

GPC: 試料 6 ml のうち 4 ml を GPC カラムに注入する. カラムからの溶出液は 100~200 ml の分画をとり減圧濃縮し, N₂ 気流下で溶媒を蒸発させる. 検液をアセトン 2 ml に溶解しその 2 μ l を GC に供する.

2) GC で妨害ピークがみられる場合は, 検液のアセトンを蒸発させた後, 15% 酢酸エチル-石油エーテル 2 ml に溶解し, シリカゲルカラムに注入する. フラスコはさらに少量の 15% 酢酸エチル-石油エーテルで 2 回洗い込む. 以下の溶媒を用いて農薬を溶出する. ①15% 酢酸エチル-石油エーテル 20 ml, ②15% アセトン-石油エーテル 20 ml, ③30% アセトン-石油エーテル 20 ml, ④アセトン 20 ml. 溶出液は減圧濃縮後アセトンで 2 ml 定容とし, 再度 GC に注入する.

結果および考察

1. GC による農薬標準品の分析

今回は, 食品衛生法の残留農薬基準の設定されている農薬, 答申中の農薬のうちで標準品の入手できた農薬および残留基準未設定であるが検討している農薬等を対象として, NPD-, FPD-GC 分析可能な 65 種類の農薬を検討した.

試料注入は, スプリットレス法で行なった. 図 1 に

示すように, 注入された試料は Y スプリッターで分岐し, 2 本のキャピラリーカラムまたはメガボアカラムに導かれるように配管した. 分離された農薬は NPD または FPD で検出した. NPD-GC (DB-1, DB-210 カラム), FPD-GC (DB-1701, DB-1 カラム) で検出される農薬の相対保持時間 (R.R I, クロロピリホスを 1.0 として表示) を表 1 に示した. GC 測定に際し DB-1 カラムでの相対保持時間から農薬を四つのグループに分類した. クロルフェンビホス, ピリフェノックス, プロピコナゾールは 2 本の異性体ピークとして検出された. 今回の条件ではトリクロロホンのジクロロボス等への分解は 10% 以下であった.

2. 野菜, 果実からの抽出

本抽出法 (Luke 法) は, アセトン抽出液からジクロロメタン-石油エーテルで抽出する際アセトン濃縮操作が不必要であること, 今回は対象作物としていないが穀類の抽出時のエマルジョンもみられず操作が簡便であること, 水溶性が比較的高いジメトエートも良好に抽出されることから, 多成分分析法の抽出法として選択した. 表 1 にアセトン-水 (2:1) に各農薬を添加して抽出したときの抽出率を示した. 大部分の農薬は良好な抽出率を示したが, アルジカルブ, メタミドホス, プロパモカルブ, アセフェート等水溶性の高い農薬では水溶液からの回収率は低かった.

3. GPC における溶出条件の検討

GPC カラムの溶出溶媒としては, ジクロロメタン-シクロヘキサン (またはヘキサン), 酢酸エチル-シクロヘキサン (またはヘキサン) 等が多く用いられている. 図 2 にジクロロメタン-シクロヘキサンおよび酢酸エチル-シクロヘキサンの混合比と Bio Beads S-X3 の膨潤度

Fig. 2 Effect of ratio of two eluting solvents on actual swelling of Bio Beads S-X3.

Table 1 Relative retention index (chlorpyrifos 1.00), group of standard mixture, extraction from aq. acetone solution, GPC elution volume, silicagel elution of pesticides from fortified crops at 0.1 ppm.

Compounds	DB-1 (NPD) R.R.I.	DB-210 (NPD) R.R.I.	DB-1701 (FPD) R.R.I.	Group	Extraction (%) from aq. soln.	GPC elution (ml)	Silica gel elution ^{a)}				Recovery (%) mean $\pm$ S.D. ($n=3$)		
							F1	F2	F3	F4	Lettuce	Tomato	Strawberry
Acephate	0.37	0.79	0.54	1	27.4	120-140	0	0	0	3	27.3 $\pm$ 2.2	22.1 $\pm$ 1.1	38.6 $\pm$ 4.3
Aldcarb	0.10	0.19		1	<20.0	110-140	0	0	3	0	43.6 $\pm$ 4.2	39.4 $\pm$ 4.9	39.2 $\pm$ 3.9
Amirbaz	1.79	1.74		1	98.4	110-130	4	0	0	0	80.2 $\pm$ 6.4	80.3 $\pm$ 2.7	65.9 $\pm$ 11.1
Bendiocarb	0.63	0.72		1	97.8	130-140	0	3	3	0	101.1 $\pm$ 0.9	106.8 $\pm$ 6.7	111.4 $\pm$ 2.4
Bitertanol	1.98	2.95		1	102.6	100-120	0	0	5	0	92.8 $\pm$ 6.9	99.3 $\pm$ 6.8	122.5 $\pm$ 12.3
Carbaryl	0.89	1.25		1	96.2	140-150	0	3	3	0	105.1 $\pm$ 4.3	90.6 $\pm$ 1.8	102.3 $\pm$ 3.5
Chinomethionat	1.11	1.14		2	100.6	140-160	4	0	0	0	95.4 $\pm$ 5.2	80.7 $\pm$ 8.4	91.8 $\pm$ 9.5
Chlorpropham	0.63	0.68		3	91.9	120-150	5	0	0	0	105.1 $\pm$ 2.1	79.6 $\pm$ 8.5	116.5 $\pm$ 6.3
Chlorpyrifos	1.00	1.00	1.00	2	100.0	110-140	5	0	0	0	102.5 $\pm$ 4.1	92.2 $\pm$ 2.4	89.9 $\pm$ 5.9
Chlorpyrifos methyl	0.89	0.92	0.89	2	100.8	120-140	5	0	0	0	106.8 $\pm$ 7.9	89.1 $\pm$ 1.8	91.4 $\pm$ 6.1
Coumaphos	2.04	3.77	2.37	2	105.9	100-120	2	4	0	0	93.3 $\pm$ 10.2	71.6 $\pm$ 4.4	75.3 $\pm$ 5.1
Chlorfenvinphos, α -	1.06	1.27	1.12	1	95.7	110-120	0	5	0	0	82.4 $\pm$ 5.5	80.9 $\pm$ 5.6	97.8 $\pm$ 4.2
Chlorfenvinphos, β -	1.08	1.32	1.16	1	101.2	110-120	0	5	0	0	85.0 $\pm$ 1.7	77.9 $\pm$ 3.0	99.6 $\pm$ 7.4
Diazinon	0.79	0.71	0.75	2	101.6	100-120	4	2	0	0	89.1 $\pm$ 13.2	89.0 $\pm$ 1.9	85.8 $\pm$ 4.2
Dichlofluanid	0.96	1.26		3	89.6	110-140	2	4	0	0	102.4 $\pm$ 0.8	88.9 $\pm$ 1.4	104.0 $\pm$ 2.8
Dichlorvos	0.24	0.41	0.22	1	70.2	120-140	0	3	3	0	88.0 $\pm$ 8.7	99.2 $\pm$ 5.5	90.1 $\pm$ 3.1
Diethofencarb	0.98	1.06		4	99.2	110-120	3	3	0	0	106.2 $\pm$ 3.4	87.3 $\pm$ 5.4	104.1 $\pm$ 4.7
Dimethoate	0.69	1.08	0.89	1	105.0	120-150	0	0	3	3	97.3 $\pm$ 3.5	88.2 $\pm$ 0.6	107.5 $\pm$ 3.9
Dioxabenzofos	0.64	0.81	0.69	2	99.9	130-160	4	2	0	0	103.2 $\pm$ 3.5	99.8 $\pm$ 3.2	102.2 $\pm$ 7.8
Edifenphos	1.35	1.76	1.49	2	99.2	110-140	0	4	2	0	95.3 $\pm$ 8.5	89.6 $\pm$ 0.9	88.1 $\pm$ 1.8
EPN	1.53	2.64	1.69	3	97.4	120-150	4	0	0	0	112.1 $\pm$ 1.6	78.5 $\pm$ 2.4	97.0 $\pm$ 2.2
Esprocarb	0.97	0.89		4	97.7	100-120	5	0	0	0	74.1 $\pm$ 8.1	58.3 $\pm$ 9.9	71.9 $\pm$ 5.9
Ethion	1.29	1.50	1.40	2	98.7	100-120	5	0	0	0	89.6 $\pm$ 11.0	91.6 $\pm$ 2.7	80.0 $\pm$ 5.6
Ethiofencarb	0.83	1.04		3	94.8	130-140	0	3	1	0	67.6 $\pm$ 3.4	85.1 $\pm$ 4.7	85.1 $\pm$ 11.9
Ethoprophos	0.61	0.70	0.58	1	96.2	100-120	0	5	2	0	95.4 $\pm$ 3.5	91.6 $\pm$ 2.4	103.7 $\pm$ 0.9
Etrinfos	0.83	0.78	0.80	1	101.5	100-130	5	1	0	0	93.6 $\pm$ 2.2	88.8 $\pm$ 1.0	100.9 $\pm$ 1.2
Fenitrothion	0.94	1.29	1.06	1	93.8	120-150	4	2	0	0	98.3 $\pm$ 3.2	96.1 $\pm$ 3.1	109.1 $\pm$ 2.6
Fenobucarb	0.58	0.67		2	97.1	120-140	0	5	0	0	104.6 $\pm$ 4.0	93.2 $\pm$ 2.9	98.0 $\pm$ 6.0
Fensulfothion	1.25	2.57	1.50	1	95.8	100-130	0	0	2	4	94.5 $\pm$ 8.3	85.6 $\pm$ 2.5	113.2 $\pm$ 9.3
Fenthion	0.98	1.06	1.04	3	100.0	120-140	4	0	0	0	90.5 $\pm$ 2.2	88.6 $\pm$ 1.2	90.8 $\pm$ 4.6
Flutolanil	1.16	1.64		2	102.4	110-130	0	4	3	0	79.2 $\pm$ 8.8	77.3 $\pm$ 2.1	81.0 $\pm$ 2.4
Formothion	0.82	1.26	1.03	3	96.8	110-130	0	0	4	0	99.4 $\pm$ 3.0	88.0 $\pm$ 0.6	108.9 $\pm$ 5.0
Imazalil	1.18	1.59		1	99.3	110-130	0	0	0	4	78.7 $\pm$ 11.6	81.4 $\pm$ 3.8	113.1 $\pm$ 11.5

Iprobenfos	0.84	0.97	0.85	2	98.3	100-120	0	4	2	0	75.7±3.1	64.0±13.4	85.6±10.9
Isoprocarb	0.50	0.62		1	100.3	120-140	0	4	2	0	104.9±0.4	93.9±2.4	107.8±0.5
Isoxathion	1.23	1.64	1.37	2	97.2	110-130	5	0	0	0	90.7±4.3	96.7±2.9	83.4±4.1
Malathion	0.96	1.21	1.05	1	96.2	100-130	3	3	0	0	91.8±8.2	83.5±4.7	98.7±2.9
Mefenacet	1.70	2.97	1.88	2	100.7	110-150	0	3	3	0	95.0±8.4	90.2±6.2	98.5±2.8
Mepronil	1.31	1.67		1	104.9	120-130	4	2	0	0	90.0±9.6	95.3±2.3	94.1±5.1
Methamidophos	0.21	0.46	0.29	1	19.3	140-160	0	0	0	3	19.0±0.4	24.8±3.5	19.2±0.6
Methidathion	1.10	1.44	1.25	1	95.0	120-150	2	4	1	0	94.5±3.7	97.1±3.2	111.1±4.1
Metribuzin	0.86	0.89		1	97.0	140-160	0	5	2	2	88.3±11.9	77.3±17.4	79.3±4.1
Oxamyl	0.10	0.30		2	63.6	110-140	0	0	0	4	81.8±8.0	83.6±13.7	90.3±10.6
Parathion	0.99	1.37	1.11	1	99.2	110-130	5	0	0	0	94.5±2.5	88.9±1.8	98.6±1.5
Parathion methyl	0.88	1.22	1.00	3	99.5	130-160	3	3	0	0	98.3±3.6	92.8±1.4	112.2±3.9
Pendimethalin	1.07	1.31		2	98.2	110-130	4	0	0	0	105.4±5.9	98.9±6.9	63.0±2.9
Phenthoate	1.08	1.25	1.17	3	96.8	130-150	4	0	0	0	101.3±0.9	93.3±1.9	87.1±5.1
Phosalone	1.67	3.11	1.86	1	100.4	110-140	4	2	0	0	93.8±5.7	83.7±3.7	110.9±10.3
Phosmet	1.49	2.71		1	96.8	120-150	0	4	1	0	94.0±9.9	86.0±9.1	100.0±4.2
Pirimicarb	0.83	0.98		4	96.8	110-130	0	4	2	0	97.1±4.4	85.8±3.5	90.9±4.6
Pirimiphos methyl	0.95	0.94	0.96	2	100.4	110-130	5	0	0	0	104.0±5.7	91.8±2.1	92.1±6.2
Pretilachlor	1.20	1.45		1	99.6	100-110	4	3	0	0	69.7±8.3	64.6±12.6	78.5±11.3
Propamocarb	0.36	0.4		1	2.4	130- $<$ 210	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
Propiconazole-1	1.37	1.79		1	99.3	100-120	0	0	4	0	89.4±10.6	89.4±1.6	108.0±6.5
Propiconazole-2	1.39	1.83		1	99.4	100-120	0	0	4	0	86.3±10.4	89.7±1.6	102.6±4.9
Propoxur	0.57	0.78		1	97.5	110-150	0	3	3	0	101.7±1.2	93.2±1.4	107.9±1.6
Prothiofos	1.19	1.19	1.21	3	100.1	110-140	5	0	0	0	108.9±6.8	93.1±8.2	107.9±2.2
Pyridaphenthion	1.50	2.86	1.71	2	98.0	110-130	0	0	4	0	96.6±11.8	85.5±1.6	86.6±2.7
Pyrifenox-1	1.07	1.05		2	103.5	110-150	0	0	4	0	90.8±9.2	82.6±8.2	98.7±3.9
Pyrifenox-2	1.13	1.15		2	104.1	110-150	0	4	3	0	81.9±5.3	80.0±4.1	82.8±10.9
Quinalphos	1.08	1.19	1.15	4	99.4	110-130	4	2	0	0	101.6±3.5	82.4±4.1	85.8±3.9
Terbufos	0.77	0.75	0.73	1	93.6	100-120	5	0	0	0	78.8±3.2	92.9±0.5	100.0±2.6
Thiobencarb	0.97	0.95		2	98.3	120-130	4	0	0	0	103.1±4.6	91.2±2.4	90.7±5.8
Triadimenol	1.10	1.31		2	102.2	110-130	0	0	4	0	85.3±6.4	77.7±1.3	69.4±2.1
Trichlormide	1.14	1.14		1	96.3	110-130	5	0	0	0	53.5±0.7	57.5±9.5	57.3±5.5
Trichlorfon	0.42	0.61	0.49	2	101.5	120-140	0	0	0	4	54.7±4.8	64.4±6.1	65.4±2.9
Triflumizole	1.11	1.53		4	94.0	100-120	0	1	4	0	73.9±3.2	105.7±7.9	57.9±12.7
Vamidothion	1.11	2.10	1.41	4	75.3	110-130	0	0	0	0	65.0±3.8	99.0±7.8	88.2±4.2

^a F1: 15% AcOEt-petr. ether 20 ml, F2: 15% acetone-petr. ether 20 ml, F3: 30% acetone-petr. ether 20 ml, F4: acetone 20 ml recovery (%). 5: >90%, 4: 60-90%, 3: 30-60%, 2: 10-30%, 1: <10%.

Fig. 3 Elution profiles of various compounds from Bio Beads S-X3 column using two eluting solvents.

の関係を示した。ジクロロメタン-シクロヘキサンの系ではジクロロメタンの比率が増えるに従って膨潤し、1:1以上にジクロロメタンの比率が増加しても膨潤度に変化はなかった。酢酸エチル-シクロヘキサンの系では溶媒混合比 1:1 のときもっとも膨潤したが、ジクロロメタン-シクロヘキサンの系と比較すると約 80% の膨潤度であり、酢酸エチルの比率が大きくても小さくても膨潤度は減少した。

ジクロロメタン-シクロヘキサン (1:1) および酢酸エチル-シクロヘキサン (1:1) 両溶媒系での GPC による各種共存成分 (脂質, クロロフィル, カロチノイド) と農薬との分離挙動を検討した (図 3)。農薬としてはカラムからの溶出の早いシハロトリン, ダイアジノンを用いた。脂質成分は重量法, クロロフィル, カロチノイド (β -カロチン) はそれぞれ 660 nm と 450 nm の吸光度法で定量した。

ジクロロメタン-シクロヘキサンを用いた場合, 共存する脂質, リン脂質, クロロフィル, カロチノイドと農薬の分離は良好であった。クロロフィル, カロチノイド等を多量に含むホウレンソウのような検体でも透明な農薬画分が得られ, 視覚的にも GPC の効果は明らかであった。酢酸エチル-シクロヘキサンを用いた場合, シハロトリンとカロチノイドの溶出容量は近接しており, 両者を分離することはできなかった。酢酸エチル-シクロヘキサンの場合, 樹脂の膨潤度が不十分のため, GPC の分子ふるい効果が発揮されなかったためと思われる。以上の結果から, GPC の溶出溶媒としてジクロロメ

タン-シクロヘキサン (1:1) を採用した。

市販の自動 GPC 装置では, 通常, 内径 2.5 cm (断面積 4.91 cm²) $\times$ 50 cm のカラム, 流速としては 5 ml/min が多用されている。内径 2.2 cm (断面積 3.80 cm²) $\times$ 50 cm のガラスカラムに Bio Beads S-X3 を充填し, ジクロロメタン-シクロヘキサン (1:1) の溶出液で, 最適な溶出速度を検討した。流速を 3, 4, 5 ml/min と変えて, 牛脂肪 0.5 g をカラムに注入したときの脂肪分の農薬画分への残留量を比較した。溶出速度が 5 ml/min (断面積当り線速度 1.32 ml/min) では, 農薬の溶出画分 (100~200 ml) に, 一部脂質成分 (2%) が溶出した。5 ml/min では線速度が高すぎるため, 膨潤した樹脂が収縮しカラム入口付近に空間が生じ, 分離能が低下したためと考えられた。溶出速度 4 ml/min (線速度 1.05 ml/min), 3 ml/min (線速度 0.79 ml/min) では, 農薬画分への脂質成分の残量は 0.5% 以下であり, 99% 以上の脂質成分を効率良く除去することができた。カラムの溶出速度は断面積当り線速度約 1.1 ml/min 以下を用いることにより望ましい分離が得られた。

表 1 に GPC カラムからの農薬の溶出画分を示した。分子量が約 300 かそれ以上の農薬は 110~140 ml 付近に, 分子量が約 200 前後の農薬は 120~150 ml 付近に溶出した。今回分析対象としていないが, 塩素系農薬の β -BHC が 150~180 ml に溶出することから, 100~200 ml を農薬の画分として分取した。プロパモカルブは約 70% が回収されたが, 明確な溶出画分が得

Fig. 4 NPD and FPD gas chromatograms of control cucumber extract cleaned up by GPC.

Operating conditions: 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 1 μ m DB-1 (NPD) and DB-1701 (FPD), helium carrier gas flow 5 ml/min, temperature program, 140°C for 1 min, 5°C/min to 240°C, 240°C for 20 min; 30 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 1 μ m DB-210 (NPD) and DB-1 (FPD), helium carrier gas flow 10 ml/min, temperature program, 140°C for 1 min, 20°C/min to 160°C, 5°C/min to 220°C, 220°C for 30 min.

られなかった。プロパモカルブは水溶性が非常に高く、溶媒に十分溶解しないため GPC での分離が悪いものと思われた。

本分析法について 0.1 ppm 相当の農薬を検体に添加したときの回収率を求めた。検体としては、Sawyer¹⁹⁾が Luke 法の collaborative study で回収率の検討に用いている緑黄色野菜のレタス、酸味のあるトマト、糖分の多いイチゴの 3 種類を用いた。ガスクロマトグラム上の農薬のピークは標準品のみの場合より野菜抽出物などマトリックスが混在した場合のほうが、注入口、カラムへの吸着およびそれらの中での分解が抑えられてピーク高、面積が増加することは知られている^{20,21)}。このため、回収率は、今回の方法で抽出精製し農薬の残留がないことを確認した 20 g 相当の検体残渣を添加農薬標準品溶液で溶解して作成した検量線から求めた。プロパモカルブ、アセフェート、アルジカルブは回収率が低かつ

たが、それ以外の農薬については、日常分析に用いる多成分分析法として十分有用な方法であると思われる。

本法における検出限界は、ジェトフェンカルブ、フルトラニル、メプロニル、プレチラクロール、プロピコナゾール、トリクラミドは 0.01~0.02 ppm、それ以外の農薬では 0.005~0.002 ppm であり、食品衛生法に規制された残留農薬基準を十分測定できる方法であった。

図 4 に GPC 精製後のキュウリの NPD (DB1 カラムと DB210 カラム)、FPD (DB1701, DB1 カラム) のガスクロマトグラムを示した。NPD では無極性の DB-1 カラムに比べ極性のある DB210 カラムのほうが夾雑ピークの影響の少ないクロマトグラムが得られた。また、対象農薬と一致する夾雑ピークはなかった。FPD ではほとんど妨害はみられなかった。このようにデュアルカラム-デュアルディテクターを日常分析に用いると、米国 FDA の Pesticide Analytical Manual

Vol. 1²²⁾で述べられているように、検出されるピークが農薬か否かを判定するうえで非常に有用であった。

市販品の21種類の作物をこの方法で分析したところ、キャベツ、ブロッコリー、白菜、ダイコンでは一部農薬の定量を妨害する大きなピークがみられたが、他の作物ではGPCのみの精製でも分析は可能であった。

近年、野菜類から検出される農薬について本法による添加回収率 (0.05-1 ppm 添加, 3 回の平均値±標準偏差) を求めたところ、ナス中イソキサチオン $80.6 \pm 4.2\%$ 、プロチオホス $92.8 \pm 1.5\%$ 、フェントエート $88.7 \pm 2.9\%$ 、フェニトロチオン $90.5 \pm 2.0\%$ 、アセフェート $101.3 \pm 6.1\%$ 、オレンジ中クロルピリホス $95.2 \pm 3.1\%$ 、イマザリル $110.6 \pm 6.1\%$ 、メチダチオン $99.7 \pm 3.2\%$ 、ネギ中アセフェート $28.1 \pm 3.0\%$ 、フェニトロチオン $95.5 \pm 2.3\%$ 、キャベツ中プロチオホス $81.9 \pm 1.3\%$ 、白菜中 EPN $79.0 \pm 4.6\%$ 、カボチャ中フェニトロチオン $90.0 \pm 3.2\%$ 、グレープフルーツ中エチオン $66.5 \pm 8.4\%$ 、ミカン中アセフェート $25.4 \pm 2.3\%$ 、アスパラガス中クロルピリホス $78.7 \pm 8.1\%$ であった。水分含量の高いネギ、ミカンからのアセフェートの回収率は低い値であるが、日常スクリーニング法としては応用可能であると思われた。

4. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

多数の農薬を GPC で精製後、NPD-, FPD-GC で分析を行ない、デュアルカラム、デュアルディテクターを用いることにより、大部分の農薬は分析可能であった。しかし、ブロッコリー、キャベツ、ダイコン等アブラナ科の野菜類は GPC による精製だけでは妨害成分の除去が不十分であり、一部ピークの重なる農薬の分析には再精製が必要であった。精製カラムとしては、フロリジルは精製効果が高いが、ジクロロボスが吸着して回収率が悪い²³⁾ためシリカゲルカラムを精製カラムに用いた。15% 酢酸エチル-石油エーテル, 15% アセトン-石油エーテル, 30% アセトン-石油エーテル, アセトン各 20 ml で溶出したときの溶出状況を表 1 に示す。フェンチオン、テルブホスは石油エーテルに溶解し、シリカゲルカラムに吸着させた場合、極性溶媒を用いても溶出しなかった。フェンチオンをシリカゲルに吸着させた場合は、アセトン溶出面分に別のピークが出現した。このピークはフェンチオンスルホキシドであった。フェンチオンなどチオエーテル基をもつ化合物は精製操作中に酸化される可能性があるので注意する必要がある。フェンチオン、テルブホスの場合は 15% 酢酸エチル-石油エーテルに溶解してカラムに負荷後、15% 酢酸エチル-石油エーテルから溶出を始めることで、8 割以上が回収

できた。アセフェート、メタミドフォス、エチオフェンカルブはアセトンで溶出が不十分 (60% 未満) であり、バミドチオン、プロパモカルブは溶出しなかった。これらの化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する場合は、溶出溶媒として最初から極性溶媒を用いる必要があると思われた。

図 5 にキャベツの GPC 精製後の NPD-ガスクロマトグラムを示した。GPC による精製だけではジクロロボス、ダイアジノン、メトリブジン、クロルピリホスメチルの測定を妨害ピークがみられるが、シリカゲルカラムで分離精製することにより大部分のピークが除去され、農薬の測定が可能であった。

図 6 にオレンジ、ネギに残留する農薬の検出例を示した。シリカゲルカラムで分画すると、オレンジのクロルピリホスは 15% 酢酸エチル-石油エーテル分画に、チアベンダゾール、イマザリルはアセトン分画に、ネギのフェニトロチオンは 15% 酢酸エチル-石油エーテル、アセフェートはアセトン分画に溶出し、標準品と同じ溶

Fig. 5 Gas chromatograms of cabbage extract cleaned up by silicagel column after GPC (column: DB-1).

Fig. 6 Gas chromatograms of silicagel column elution of some pesticides resided in (A) orange and (B) welsh onion (column: DB-210).

出挙動を示した。シリカゲルカラムによる分離精製は精製効果のみならず、カラムからの溶出挙動を調べることで農薬の確認にも利用できた。

Luke 法による抽出、GPC 精製（一部の検体についてはさらにシリカゲルカラムによる精製）、デュアルカラム、デュアルディテクターを用いた GC による農産物中の残留農薬の分析法は、迅速かつ簡易な方法であり、残留農薬一斉分析法として日常分析業務に適した方法と思われた。この方法で検出された農薬は、GC-MS による確認、公定法での分析を行なうことにより、さらに正確な判断ができるものと思われる。アルジカルブ、アセフェート、メタミドホス、プロパモカルブはアセトン-水溶液からジクロロメタン-石油エーテルへの転溶が不十分であったので、この転溶操作の後残った水層に塩化ナトリウムを添加しジクロロメタンで抽出する方法¹⁹⁾

を検討した。ネギおよびミカンを用いてアセフェートの添加回収を行なった結果、ネギ $64.1 \pm 0.3\%$ 、ミカン $75.6 \pm 1.4\%$ と回収率が向上した。

以上、Luke 法抽出、GPC 精製法は NPD- または FPD-GC で測定可能な多成分の農薬について多種類の農産物（食品）を対象に一斉分析が可能であることを示した。

引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課編：残留農薬分析法ドラフト，厚生省，pp. 4-38, 1985
- 2) B.M. McMahon & N.F. Hardin ed.: "Pesticide Analytical Manual Vol. 1: Multiresidue Methods," 3rd ed., Public Health Service, FDA, U.S.A., Section 302-1-302-12, 1994
- 3) M.A. Luke, W.S. Langham, S.M. Kodama, J.T

- Masumoto, J.E. Froberg & G.M. Doose: "Pestic. Chem.: Adv. Int. Res., Dev., Legis., Proc. Int. Congr. Pestic. Chem.; 7th Meeting Data 1990," ed. by H. Frehse, VCH, Weinheim, Fed. Rep. Germany, pp. 373-382.
- 4) W. Liao, T. Joe & W.G. Cusick: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 554 (1991)
- 5) M. Miyahara, M. Murayama, T. Suzuki & Y. Saito: *J. Agric. Food Chem.* **41**, 221 (1993)
- 6) A. Di Muccio, A.M. Cicero, I. Camoni, D. Pontecorvo & R. Dommarco: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 106 (1987)
- 7) N.L. Aker, S.H. Schanderl & N.C. Leeling: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **51**, 888 (1968)
- 8) D.L. Stalling, R.C. Tindle & J.L. Johnson: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**, 32 (1972)
- 9) K.R. Griffitt & J.C. Craun: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**, 168 (1974)
- 10) L.D. Johnson, R.H. Waltz, J.P. Ussary & F.E. Kaiser: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **59**, 174 (1976)
- 11) J.A. Ault, C.M. Schofield, L.D. Johnson & R.H. Waltz: *J. Agric. Food Chem.* **27**, 825 (1979)
- 12) 斎藤 勲・岡 尚男・高橋弘明・宇野圭一: 愛知衛研所報 **31**, 19 (1981)
- 13) W. Specht & M. Tillkes: *Fresenius Z. Anal. Chem.* **322**, 443 (1985)
- 14) S.J. Chamberlain: *Analyst* **115**, 1161 (1990)
- 15) 石井康雄・足立教好・谷内純一・坂本 剛: 農薬誌 **15**, 225 (1990)
- 16) 田中文隆・園田正則・小倉理恵子・宗 千幸・川幡 寛・深谷晴美・井出あかね: 第15回農薬残留分析研究会, p. 31, 1991
- 17) 斎藤行雄・山本 敦・水上英一: 富山衛研年報 **16**, 210 (1993)
- 18) 長南隆夫: 食衛誌 **33**, 543 (1992)
- 19) L.D. Sawyer: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 64 (1985)
- 20) 荒井香陽子・近藤亮子・木川 寛: 第30回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p. 124, 1993
- 21) D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis & C.F. Poole: *J. Chromatogr.* **638**, 57 (1993)
- 22) B.M. McMahon & N.F. Hardin ed.: "Pesticide Analytical Manual Vol. 1; Multiresidue Methods," 3rd ed., Public Health Service, FDA, U.S.A., pp. 103-105, 1994
- 23) 宮田昌弘・鎌倉和政・平原嘉親・成田美加子・岡本浩一郎・長谷川真住・鯉口 智・山名孝善・外海泰秀・伊藤善志男: 食衛誌 **34**, 496 (1993)