調査・資料

2 種のカラムを用いたゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) における農薬及び油, クロロフィル, カロチンの溶出挙動について

(平成 8 年 4 月 30 日受理)

中村優美子* 津村ゆかり*
外海泰秀* 柴田 正*

Elution Patterns of Pesticides, Lipids, Chlorophyll and Carotene in Gel Permeation Chromatography (GPC) Using 2 Kinds of Columns

Yumiko NAKAMURA, Yukari TSUMURA, Yasuhide TONOGAI
and Tadashi SHIBATA(National Institute of Health Sciences, Osaka Branch:
1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan)**Key words:** ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC); 農薬 pesticides; 脂質 lipids; クロロフィル chlorophyll; β -カロチン β -carotene

緒 言

1996 年 4 月 1 日現在, 日本で残留基準が設定されている農薬は 108 種である。厚生省告示法には個別分析法が多く, 省力化のためには多種類の農薬を同時に分析する一斉分析法の開発が急務とされる。現在厚生省では残留農薬簡易分析法開発検討委員会を発足させ, 告示農薬の一斉分析法の開発を行っており, この成果の一部は既に公表されている¹⁾。

食品中の残留農薬分析における農薬と食品中の夾雑物との分離法としては, 吸着分配カラムクロマトグラフィー^{2), 3)}, ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, 以下 GPC と略す)^{4)~16)} などがある。脂質の除去法としてはヘキサン-アセトニトリル分配法^{2), 3)} の他に, エクストレルート-Sep-pak C₁₈ 法^{17), 18)} などがあるが, 色素の除去法として有効なのは活性炭カラムを用いる方法や GPC である。一斉分析法を開発するに当たっては, 農薬と食品中の夾雑物との分離法を全食品共通の簡便な方法とするのが望ましく, 中でも GPC は自動化が可能のため便利であると考えられる。

GPC において, カラムの違いによる農薬及び食品中の夾雑物の挙動について比較検討した報告は少ない。そこで, 著者らは酢酸エチル-シクロヘキサン系の移動相を用いる GPC で, 2 種のカラムすなわち Optima™ GPC カラム (フォスエレクトリック社) 及び Envirosep™-ABC (Phenomenex 社) を用い, 97 種農薬及び食品中の夾雑物すなわち脂質, クロロフィル, β -カロチンの溶出挙動を調べた。

実験方法

1. 試薬及び装置

1.1 試料

玄米, 大豆, ほうれんそう及びにんじんは大阪市内の小売店で購入した。

1.2 農薬標準品

97 種農薬標準品はそれぞれ和光純薬工業(株), 林純薬工業(株), ルセル・ユクラフ社より購入した。

1.3 農薬標準液

97 種の農薬標準品をそれぞれ n -ヘキサンあるいは酢酸エチルに溶解して 1 mg/ml の濃度に調製したものを農薬標準原液とし, 酢酸エチル-シクロヘキサン (1:1, v/v) 混液で希釈して 20 μ g/ml の農薬標準液を調製した。

* 国立衛生試験所大阪支所: 〒540 大阪市中央区法円坂 1-1-43

Table 1. Retention Times of Pesticides in GPC

Pesticides	Molecular weight	Retention time (min)		Elution volume (ml)	
		Optima™ GPC	Envirosep™ ABC	Optima™ GPC	Envirosep™ ABC
Pyrethroids					
○Fluvalinate	502.9	8.46	14.09	37.5~50.0	65~ 80
○Flucythrinate	451.5	8.92	14.43	37.5~52.5	65~ 80
○Cyhalothrin	449.9	8.94	14.45	37.5~52.5	65~ 80
○Cyfluthrin	434.2	10.32	15.01	42.5~60.0	70~ 85
○Fenvalerate	419.9	9.93	15.67	40.0~60.0	70~ 85
○Cypermethrin	416.3	10.96	15.68	45.0~62.5	70~ 85
○Deltamethrin	505.2	9.86	16.14	40.0~60.0	75~ 90
○Tralomethrin	665.0	10.82	16.66	45.0~62.5	75~ 90
○Permethrin	391.3	10.97	16.89	35.0~50.0	75~ 90
○Pyrethrin	328.5 (Pyrethrin I)		17.23		80~ 95
○Cycloprothrin	482.4	12.82	20.53	55.0~70.0	95~110
△Ethofenprox	376	13.05	20.56	55.0~72.5	95~110
○Allethrin	302.4	12.89	20.57	55.0~70.0	95~110
○Tetramethrin	331.4	13.06	20.58	55.0~72.5	95~110
○Phenothrin			20.65		95~110
Organochlorine pesticides					
○Butachlor	332.4		16.47		75~ 90
○Bromopropylate	428.1		16.57		75~ 90
○Dicofol	370.5	10.75	16.62	47.5~60.0	75~ 90
○Chlorobenzilate	325.2	11.01	16.70	47.5~60.0	70~ 90
○DDD	320.0	10.91	17.19	47.5~60.0	80~ 95
○Alachlor	269.8		17.98		85~100
○Benzoxymate	363.8		18.57		85~100
○DDE	318.8	12.14	18.88		85~100
○Chlorthal-dimethyl (TCTP)	332.0		19.00		90~100
○Pyrazoxyfen	438.7	12.55	19.01	50.0~72.5	80~105
○Pyrifenox	295.2	12.60	19.74	50.0~72.5	90~110
○Chlornitrofen (CNP)	318.6		19.90		90~105
○Chlomethoxyfen	314.1		20.13		
○Chlorotharonil	265.9	13.51	21.07		95~110
Organophosphorus pesticides					
○Diazinon	304.4	10.76	16.58	45.0~62.5	75~ 90
○Terbufos	288.4	10.78	16.93	45.0~60.0	80~ 90
○Iprofenfos	288.4	11.39	17.49	50.0~62.5	80~100
○Etrimphos	292.3	11.42	17.57	47.5~67.5	75~ 95
○Pirimiphos-methyl	305.3	11.71	17.67	45.0~70.0	80~ 95
○Parathion	291.3	11.35	17.73	45.0~65.0	80~ 95
○Prothiofos	345.2		17.90		85~100
○Chlorpyrifos	350.6	11.84	17.97	50.0~65.0	85~100
○Isoxathion	313.3		18.07		80~ 95
○Disulfoton	274.4		18.10		85~100
○Phenthoate	320.4	12.66	18.59	45.0~70.0	85~100
○Quinalphos	298.3	12.34	18.79	47.5~70.0	85~100
○EPN	323.3		18.92		85~100
○Dimethoate	229.3	12.78	19.08	55.0~70.0	90~100
○Fenitrothion	277.2	12.52	19.08	45.0~72.5	90~100
○Fensulfothion	308.4	12.59	19.09	50.0~72.5	90~100
○Parathion-methyl	263.2	12.61	19.17	47.5~72.5	90~105
○Chlorpyrifos-methyl	322.5	12.69	19.58	55.0~70.0	90~105
○Edifenphos (EDDP)	310.4	13.47	20.37	55.0~77.5	95~110
○Fenthion	279.3	13.99	20.48	52.5~77.5	95~110
○Pyridafenthion	340.3	12.87	20.66	47.5~72.5	95~110
○Dioxabenzophos	216.2	13.70	21.48	60.0~75.0	100~115

Table 1. (continued)

Pesticides	Molecular weight	Retention time (min)		Elution volume (ml)	
		Optima™ GPC	Envirosep™ ABC	Optima™ GPC	Envirosep™ ABC
Organonitrogen pesticides					
Benfluralin	335.3		15.01		70~ 85
○Flutoluanil	323.3	9.70	15.40	37.5~57.5	70~ 85
Cyanazin	240.7		15.63		70~ 85
Propazine	229.7		15.64		70~ 85
○Triadimenol	295.8	9.98	15.75	37.5~60.0	70~ 85
○Bitertanol	337.4	10.19	16.13	37.5~62.5	75~ 90
Oxadiazon	345.2		16.13		75~ 90
Propyzamide	256.1		16.13		75~ 90
Atrazine	215.7		16.17		75~ 90
○Diethofencarb	267.3	10.50	16.26	40.0~60.0	75~ 90
○Chlorpropham (IPC)	213.7	10.46	16.51	40.0~60.0	75~ 90
○Propiconazole	342.2	12.80	16.52	55.0~95.0	75~ 90
○Pretilachlor	311.9	10.71	16.81	45.0~60.0	75~ 90
○Mepronil	269.4	11.00	16.91	42.5~65.0	75~ 90
○Fenobucarb	207.3	10.79	16.97	47.5~60.0	75~ 90
Swep (MCC)	220.1		17.30		75~ 95
○Isoproc carb	193.3	11.26	17.31	47.5~62.5	80~ 95
○Bendiocarb	223.2	11.38	17.54	45.0~67.5	75~ 95
Linuron	249.1		17.83		80~ 95
○Esprocarb	265.4	11.54	17.86	47.5~62.5	85~ 95
○Metribuzin	214.3	11.60	18.00	47.5~70.0	85~100
○Amitraz	293.4		18.03		75~100
Diuron	233.1		18.12		85~100
○Ethiofencarb	225.3	11.94	18.21	47.5~67.5	85~100
○Aldicarb	190.3	11.65	18.30	45.0~65.0	85~100
○Pendimethalin	281.3	11.94	18.36	45.0~70.0	85~105
Metolcarb (MTMC)	165.2	11.94	18.62	45.0~65.0	85~100
○Carbaryl (NAC)	201.2	12.70	19.08	50.0~72.5	90~105
○Thiobencarb	257.8	12.57	19.23	55.0~70.0	90~105
○Oxamyl	219.3	13.03	20.06	52.5~75.0	90~110
○Pirimicarb	238.3	13.27	20.25	55.0~75.0	95~110
Carbendazim	191.2		20.43		95~110
○Iprodione	330.2	13.02	20.49	50.0~70.0	95~110
○Inabenfide	338.8	12.95	20.60	50.0~70.0	95~110
Propoxur (PHC)	209.3	12.97	20.61	50.0~70.0	95~110
○Methiocarb	225.3	12.96	20.62	47.5~70.0	95~110
○Triclamide	340.6	12.86	20.62	47.5~67.5	95~110
○Mefenacet	298.4	14.18	21.80	55.0~82.5	100~115
○Clofentezine	303.2	14.08	22.17	55.0~82.5	100~120
○Chinomethionat	234.3	15.77	26.10	60.0~87.5	120~140
Other pesticides					
Mecoprop (MCP)	214.7 (free)		16.94		75~ 95
Propanil (DCPA)	218.1	10.68	17.00	42.5~60.0	75~ 90
2,4-D	221.0 (free)		17.96		85~100
○Imazalil	297.2 (free)	12.95	20.58	47.5~70.0	95~110
○Diflubenzuron	310.7	12.89	20.64	47.5~70.0	95~110
○Daminozide	160.2		20.64		95~110

○: Pesticides registered till Apr. 1, 1996. △: Pesticides planned to be registered on Aug., 1996.

Conditions for GPC are described in the text.

Fig. 1. GPC chromatograms of fluvalinate and chinomethionat

1.4 試薬

アセトン, 酢酸エチル, シクロヘキサンは残留農薬分析用を用いた. 塩化ナトリウムは試薬特級を用いた. 水は再蒸留イオン交換水を用いた.

1.5 装置

GPC 分取装置は Waters 社製 510 HPLC Pump, 717 plus Autosampler, 486 Tunable Absorbance Detector, Fraction Collector 及び SIC Chromatocorder 21 を用いた. ロータリーエバポレーターは RE111 (柴田科学機械工業, 水浴付き) を用い, 水浴の温度は 35~40℃ に設定した.

分取用 GPC カラムは O・I フォスエレクトリック社製 Optima™ GPC カラム (16 mm i.d.×470 mm) 及び Phenomenex 社製 Envirosep™-ABC (21.2 mm i.d.×350 mm)+ガードカラム (21.2 mm i.d.×60 mm) を用いた.

Chem Elut CE2050 は Varian 社より購入した.

2. 試料調製法

試料調製法は多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィ²⁾あるいは残留農薬簡易分析法開発検討委員会で平成7年度に検討された方法^{*1)}に基づいて行った.

ほうれんそう及びにんじんは同量の水を加えてあらかじめホモジナイズしたもの 40 g をブレンダーカップに計り取った. 玄米及び大豆は粉碎して 420 μm のふるいを通過させたもの 20 g をブレンダーカップに計り取

り, 水 40 ml を加えて 2 時間膨潤させた.

各試料についてアセトン 100 ml を加えブレンダーで 3 分間 (10,000 rpm) ホモジナイズし, 吸引ろ過した. 残さをアセトン 50 ml で洗浄し, ろ液と洗液を合わせ 50 ml まで減圧濃縮した. 濃縮液に塩化ナトリウム 9 g を加え, 全量を Chem Elut CE2050 に負荷し, 10 分間放置した. 次いで酢酸エチル 300 ml で溶出した.

溶出液を乾固し, 酢酸エチル-シクロヘキサン混液 (1:1, v/v) 4 ml に溶解して試験液とした.

3. GPC

2. で調製した試験液のうち 2 ml をゲル浸透クロマトグラフに注入し, 各種農薬, クロロフィル, β-カロチン及び脂質の溶出パターンを調べた. また, 農薬標準液は 2 ml をゲル浸透クロマトグラフに注入し, 下記の条件で UV モニターにより保持時間を求めた.

GPC 条件は以下のとおりである.

機器: Waters™ 510 HPLC Pump + Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector + Waters™ 717 plus Autosampler + Fraction Collector + SIC Chromatocorder 21

カラム: Optima™ GPC カラムあるいは Envirosep™-ABC + ガードカラム

移動相: 酢酸エチル-シクロヘキサン (1:1, v/v)

流速: 5 ml/min

モニター波長: λ254 nm (UV)

感度: attenuation 1024 mV/FS (n=10)

注入量: 2,000 μl

*1) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会, 未発表.

Fig. 2. Elution patterns of lipids and chlorophyll by Optima™ GPC column
Conditions for GPC are described in the text.
Dark columns indicate the fractions which are removed by GPC clean-up.

分取画分: 0~150 ml (0~30 分); 2.5 ml ごと (Optima™ GPC カラム) あるいは 5 ml ごと (Envirosep-ABC カラム)

4. 脂質, クロロフィル及び β -カロチンの溶出パターン

各画分への玄米及び大豆の脂質溶出量を重量法で, ほうれんそうのクロロフィルを吸光度法 ($\lambda 662 \text{ nm}$)¹⁹⁾ で,

にんじんのカロチンを吸光度法 ($\lambda 453 \text{ nm}$)²⁰⁾ で測定した。

実験結果

1. 農薬の挙動

97 種農薬の GPC での保持時間を Table 1 に示した。全農薬は Optima™ GPC カラムでは 37.5~87.5 ml (7.5~17.5 分) の画分に, Envirosep™-ABC カラムで

Fig. 3. Elution patterns of lipids and chlorophyll by Envirosep™-ABC column
 Conditions for GPC are described in the text.
 Dark columns indicate the fractions which are removed by GPC clean-up.

は65.0~140 ml (13.0~28.0分)の画分に溶出した。

97種農薬の溶出は両カラムで溶出順序が若干異なったが、最も溶出の早いのはフルバリネート(保持時間: Optima™ GPCカラムで8.46分, Envirosep™-ABCカラムで14.09分), 最も遅いのはキノメチオネート(保持時間: Optima™ GPCカラムで15.77分, Envirosep™-ABCカラムで26.10分)であった。フル

バリネート及びキノメチオネートのGPCクロマトグラムをFig. 1に示す。

Envirosep™-ABCカラムでは両農薬の保持時間はOptima™ GPCカラムに比べて約1.66倍であったが、分離能はより優れていた。

Fig. 4. Elution patterns of lipids and β -carotene by EnvirosepTM-ABC column
Conditions for GPC are described in the text.
Dark columns indicate the fractions which are removed by GPC clean-up.

2. OptimaTM GPC カラムにおける脂質及びクロロフィルの溶出挙動

OptimaTM GPC カラムにおける玄米脂質及びほうれんそうのクロロフィルの溶出挙動を Fig. 2 に示した。

Table 1 に示した 97 種農薬すべてを分析するため 37.5~87.5 ml (7.5~17.5 分) の画分を分取すると仮定すると、玄米脂質の 65.1%，ほうれんそう中クロロ

フィルの 40.5% が除去可能であった。図中の色の濃い部分は GPC で除去される画分である。

3. EnvirosepTM-ABC カラムにおける脂質、クロロフィル及び β -カロチンの溶出挙動

EnvirosepTM-ABC カラムにおける玄米脂質、大豆脂質、ほうれんそうのクロロフィル及びにんじんの β -カロチンの溶出挙動を Fig. 3, 4 に示した。

Table 1 に示した 97 種農薬すべてを分析するため 65.0~140 ml (13.0~28.0 分) の画分を分取すると仮定すると、玄米脂質の 62.0%, 大豆脂質の 77.4%, はうれんそう中クロロフィルの 30.5%, にんじん中 β -カロチンの 10.7% が除去可能であった。図中の色の濃い部分は GPC で除去される画分である。

考 察

残留農薬分析における精製法としての GPC では、移動相として従来からジクロロメタンを含む液相がよく用いられている^{4), 5), 7), 9)~16)}。GPC では使用する溶媒が多量であり、環境保護及び労働衛生の点からジクロロメタンの使用を避けることが望ましい。GPC での移動相として、ジクロロメタンを含む液相の他にアセトン-シクロヘキサン混液 (1:3, v/v)⁸⁾あるいはアセトン-石油エテル混液 (1:1, v/v)⁸⁾、酢酸エチル-シクロヘキサン混液 (1:1, v/v) を用いる方法が報告されている^{1), 6), 15)}。

GPC 用のカラムとしては SX-3 (Bio Beads) を充てんしたものや Phenomenex 社の既製カラム EnvirosepTM-ABC などがある。

齊藤ら¹⁵⁾は SX-3 カラムを用いた GPC でジクロロメタン-シクロヘキサン混液 (1:1, v/v) 及び酢酸エチル-シクロヘキサン混液 (1:1, v/v) の移動相を比較し、農薬と食品由来のカロチノイドとの分離はジクロロメタン-シクロヘキサン混液の方が優れていると報告している。更に、酢酸エチル-シクロヘキサン混液を移動相とする場合、樹脂の膨潤度が不十分なため GPC の分子ふるい効果が発揮されないと推定している¹⁵⁾。

著者らが用いた OptimaTM-GPC カラムは SX-3 と同質の樹脂を用いたもので、酢酸エチル-シクロヘキサン混液で充てんしたものである。

97 種農薬すべてを分析するために分取条件を設定すると、玄米脂質の除去率は同カラムで 65.1%, EnvirosepTM-ABC カラムで 62.0%, クロロフィルの除去率は同カラムで 40.5%, EnvirosepTM-ABC カラムで 30.5% であり、同カラムの方が EnvirosepTM-ABC カラムよりやや勝るものの、農薬との完全分離はいずれのカラムでも困難であった。また、EnvirosepTM-ABC カラムでの大豆脂質の除去率は 77.4%, にんじん中 β -カロチンの除去率は 10.7% であり、農薬との完全分離は困難であった。特に保持時間の短いフルバリネート、フルシトリネート、シハロトリンなどでは完全分離は不可能であった。

一方、保持時間の比較的長い有機リン系農薬や有機塩

素系農薬などの農薬では、分取区間の設定次第ではどちらのカラムでも農薬と食品由来の脂質、クロロフィル、 β -カロチンとの分離が効率よく行われると推定された。

残留農薬一斉分析法において、酢酸エチル-シクロヘキサン混液を移動相とする GPC による農薬精製を効率よく行うためには、GPC カラム充てん剤の更なる開発検討が必要と思われる。

文 献

- 1) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究 **45**, 31~49 (1995).
- 2) 農薬残留分析法研究班編: “最新農薬の残留分析法” p. 1~719 (1995) 中央法規出版.
- 3) 農薬環境保全対策研究会編: “農薬登録保留基準残留農薬基準ハンドブック—作物・水質残留の分析法—” p. 1~1,239 (1995) 化学工業日報社.
- 4) Hopper, M. L.: EDRO SARAP Res. Tech. Rep. CODEN: ESRRD5; ISSN: 0161-3200, p. 1~50 (1978).
- 5) Ault, J. A., Spurgeon, T. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67**, 284~289 (1984).
- 6) Specht, W., Tillkes, M.: Fresenius Z. Anal. Chem. **322**, 443~455 (1985).
- 7) Marsden, P. J., Pearson, J. G., Bottrell, D. W.: ASTM Spec. Tech. Publ. (925), 198~212 (1986).
- 8) Steinwandter, H.: Fresenius Z. Anal. Chem. **331**, 499~502 (1988).
- 9) Chamberlain, S. J.: Analyst **115**, 1,161~1,165 (1990).
- 10) Patterson, J. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **74**, 1,016~1,018 (1991).
- 11) 山本 優, 土佐林誠一, 佐藤 稔, 大内格之, 菊池由生子: 札幌市衛研年報. **18**, 129~135 (1991).
- 12) 平間祐志, 中野道晴: 道衛研所報. **42**, 54~57 (1992).
- 13) Armishaw, P., Millar, G.: J. AOAC Int., **76**, 1,317~1,322 (1993).
- 14) 齋藤行雄, 山本 敦, 水上英一: 富山衛研年報. **16**, 210~214 (1993).
- 15) 齊藤 勲, 山田貞二, 大島晴美, 早川順子: 日本農薬学会誌. **20**, 109~118 (1995).
- 16) 尾花裕孝, 堀 伸二郎: 衛生化学. **42**, 1~16 (1996).
- 17) Di Muccio, A., Ausili, A., Vergori, L., Camoni, I., Dommarco, R., Gambetti, L.: Analyst. **115**, 67~1,169 (1990).
- 18) 齊藤 勲, 大島晴美, 山田貞治, 川村典久, 早川順子: 愛知衛研報. **43**, 17~21 (1993).
- 19) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1990” p. 524 (1990) 金原出版.
- 20) 日本薬学会編: 同上 p. 523 (1990) 金原出版.