ノート

HPLC による青果物中残留農薬及びその代謝物の一斉分析法

(平成9年5月29日受理)

外海 泰秀* 津村 ゆかり*
中村 優美子* 柴田 正*Simultaneous Determination of Pesticides and Their Metabolites in
Fresh Fruits and Vegetables by HPLC

Yasuhide TONOGAI, Yukari TSUMURA, Yumiko NAKAMURA and Tadashi SHIBATA

(National Institute of Health Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka,
Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan)

A method was established for simultaneous determination of 19 pesticides and their 4 metabolites in fresh fruits and vegetables by HPLC monitored by UV and FL. The pesticides were extracted with acetonitrile and partitioned with NaCl solution in an alkaline condition, then cleaned up with Bond Elut® SAX+PSA cartridges. The pesticides were eluted from the cartridges with a mixture of 5, 15 or 50% acetone-*n*-hexane and fractionated to fractions 1~3 depending on the type of sample.

The pesticides and their metabolites spiked in samples at 0.2 or 0.5 ppm gave satisfactory recoveries except for benomyl, TBZ, imazalil and thiophanate methyl. Detected pesticide peaks were confirmed by the use of a photodiode array detector, GC-NPD/FPD and GC/MS (TIC and SIM). NAC from apple, bitertanol from banana, and chlorpyrifos, OPP, TBZ, and imazalil from grapefruit were detected by the proposed method.

(Received May 29, 1997)

Key words: 青果物 fresh fruit, vegetable; 農薬 pesticide; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; ガスクロマトグラフィー (FPD, NPD) GC-FPD, NPD; ガスクロマトグラフィー-質量分析法 GC/MS; ボンドエルート SAX, PSA Bond Elut® SAX, PSA; セットバックフロリジル Sep-Pak® Florisil

緒言

食品衛生法では現在 138 の農薬について食品残留基準が定められているが、告示法でこれら进行分析すると多大な時間と労力を要する。そのため各検査機関では独自に多数の農薬を同時に抽出し、グループごとに測定する多成分一斉分析法^{1)~3)}を検討し、モニタリング検査などを行っていることが多い。また厚生省でも平成6年度から残留農薬迅速分析法検討会を発足させ、公的な一斉分析法の検討を行っており、その一部は既に公表⁴⁾されている。

しかし、今のところ多成分一斉分析法の大多数は GC 又は GC/MS による測定を採用しており、HPLC による一斉分析法はあまり見られず、わずかに *N*-メチルカーバメイト系農薬がポストカラム蛍光検出法で測定されている⁵⁾にすぎない。

著者らは HPLC でしか測定できない農薬、GC でテリングや分解をおこし測定困難な農薬、また親水性で従来の溶媒抽出では回収されにくい農薬のなかにも重要なものがあり、かなり広範囲に使用されている可能性もあると考えたので、これらの農薬及び代謝物も含めた一斉分析法について検討した。

本報では対象作物を野菜・果実などの青果物にしぼり、新鮮果実などからポストハーベスト農薬として検出

* 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所: 〒540-0006 大阪市中央区法円坂 1-1-43

Scheme 1. Preparation of tests solution for pesticide analysis by HPLC

* A/H: acetone/hexane

頻度の高い各種殺菌剤^(6), 7)で残留基準の定められている農薬を中心に検討した。

著者らは今まで殺菌剤の分析法について、GCを用いる一斉分析法を検討し、報告^(8), 9)してきた。また数種の殺菌剤についてはHPLCで同時に測定した報告^(10)~13)もみられる。しかし、殺菌剤を含めたポストハーベスト農薬をHPLCを用いて総合的に分析し、系統的な確認法を確立した報告は少なく、本法を適用することによりモニタリング検査などはより効率的に実施することが可能になると考えられる。

実験方法

1. 試料

市販のいちご、ぶどう、りんご、トマト、アスパラガス、キャベツ、バナナ、パイナップル、レモン、オレンジ、グレープフルーツを用いた。

2. 試薬及び試液

各農薬標準品：ミクロブタニル代謝物（ヒドロキシ体）は和光純薬工業（株）製の、その他は林純薬工業（株）製のそれぞれ農薬標準品を用いた。

各農薬標準原液：各農薬標準品 100 mg をはかり、チアベンダゾール (TBZ) 及びベノミルはアセトン 100 mL に、その他は酢酸エチル 100 mL に溶解した (1 mg/mL)。

農薬標準 A 混液：フェンスルホチオン、ミクロブタニル、イプロジオン、ジフェノコナゾール、クロフェンテジン、クロルピリホス、トリアジメホン、トリアジメノール、トリフルミゾール、トリフルミゾール代謝物、イミベンコナゾール、イミベンコナゾール代謝物の各農薬標準原液をアセトニトリルで 1 µg/mL となるように調製し、標準混合溶液を作製した。

農薬標準 B 混液：TBZ、イマザリル、ベノミル、チオファネートメチル、ジフルベンズロン、フェンピロキシメート (E 体)、イプロジオン代謝物は 1 µg/mL となるように、ジフェニール (DP)、オルトフェニルフェノール (OPP)、カルバリル (NAC)、ピテルタノールは 0.5 µg/mL となるように、それぞれ各農薬標準原液をアセトニトリルで調製し、標準混合溶液を作製した。

各種有機溶媒：アセトン、*n*-ヘキサン、酢酸エチルは

Fig. 1. High performance liquid chromatograms for standard mixture A
Each pesticide: 0.02 ng, UV: 230 nm, FL: Ex 285 nm, Em 315 nm

和光純薬工業（株）社製の残留農薬分析用を，アセトニトリルはメルク（株）社製の HPLC 用を使用した。

Sep-Pak® フロリジル：Waters 社製，プラス型
Bond Elut® SAX, PSA: Varian 社製，100 mg/1.0 mL 型

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ：（株）島津製作所製，LC-10A

検出器：（株）島津製作所製，SPD-10AV（紫外），RF-10A（蛍光）及び SPD-M10A（フォトダイオードアレイ）

ガスクロマトグラフ：ヒューレットパッカード社製，5890 II (GC-FPD, NPD)

ガスクロマトグラフ-質量分析計：ヒューレットパッカード社製，5971 Series II

4. 分析操作法

1) 抽出法

試料約 1 kg を細切して均一化し，その 20 g をブレンダーカップにとり，アセトニトリル 50 mL（かんきつ類の場合は更に酢酸ナトリウム 5 g）を加え，3 分間ホモナイズし，吸引ろ過した。残さにアセトニトリル 50 mL を加え，ホモナイズ以下同様の操作を繰り返した。抽出液を合わせアセトニトリルを加えて 100 mL の定容とした。その 50 mL を分液漏斗にとり，塩化ナトリウム 5 g 及び飽和リン酸水素二ナトリウム溶液 10 mL を加え 5 分間振とうした後 10 分間放置し，水層を除去した。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウム 5 g を加えて 5 分間振とう後，アセトニトリル層を分取し濃縮乾固した。

2) 精製法

Method I: 残留物を 15% アセトン含有 *n*-ヘキサン

Fig. 2. High performance liquid chromatograms for standard mixture B

DP, OPP, NAC, bitertanol: 0.01 ng, others: 0.02 ng, UV: 230 nm, FL: Ex 285 nm, Em 315 nm

(A/H) 20 mL に溶解し、同溶媒でコンディショニングした Bond Elut[®] SAX と PSA を直結したカートリッジに負荷し、溶出液を分取した。次いで 50% A/H 20 mL で先に乾固したフラスコを洗い、洗液をカートリッジに負荷し、溶出液を分取した。それぞれの溶出液を濃縮乾固した後、アセトニトリル 2 mL に溶解し試験溶液とした。

Method II: 妨害の少ない試料については、残留物を 50% A/H 20 mL に溶解し同溶媒でコンディショニングした Bond Elut[®] SAX と PSA を直結したカートリッジに負荷し、溶出液を分取し、濃縮乾固した後、アセトニトリル 2 mL に溶解し試験溶液とした。

Method III: 妨害の特に多い試料（かんきつ類）については、残留物を 5% A/H 20 mL に溶解し同溶媒でコンディショニングした Sep-Pak[®] フロリジル及び Bond Elut[®] SAX と PSA を直結したカートリッジに負荷し、溶出液を分取した。次いで 15% 及び 50% A/H 20 mL でそれぞれ乾固したフラスコを洗い、各洗液を

カートリッジに負荷し、各溶出液を分取し、それぞれ濃縮乾固した後、アセトニトリル 5 mL に溶解し試験溶液とした。

以上の抽出及び精製法についての概略を、Scheme 1 に示した。

3) 添加回収試験

細切均一化した試料 20 g に農業標準混液 A 又は B4 mL（かんきつ類の場合は 10 mL）を別々に加え、30 分放置した後、試料に応じて Method I, II 又は III で抽出を開始し、HPLC で測定して回収率を求めた。

4) 定性・定量

各試験溶液 20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、ピークの保持時間 (t_R) とピーク面積から農業を定性、定量した。

5) 確認試験

試料から検出された農業ピークについてはフォトダイオードアレイ検出器を用いて吸収スペクトルを測定し、標準溶液と比較した。また試験溶液の半量を取り、アセ

Fig. 3. High performance liquid chromatograms for apple and banana extract
A/H: acetone/*n*-hexane fraction

Fig. 4. High performance liquid chromatograms for grapefruit extract monitored by UV (230 nm)
A/H: acetone/*n*-hexane fraction

トニトリルをアセトンに置換して GC 測定用の試験溶液を調製した。GC で測定可能な農薬については GC-NPD 及び GC-FPD で測定した (2 μ L 注入)。検出されたピークは GC/MS でマスペクトル又は選択イオン検出 (SIM) 法で確認した (2 μ L 注入)。

HPLC 測定条件

カラム: GL Sciences 社製, Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. $\times$ 25 cm)

カラム温度: 40°C, 流速: 1 mL/min

移動相: A) 0.01 mol/L KH_2PO_4 -アセトニトリル

Fig. 5. High performance liquid chromatograms for grapefruit extract monitored by FL (Ex 285 nm, Em 315 nm)

A/H: acetone/*n*-hexane fraction

(70:30)

B) 0.01 mol/L KH_2PO_4 -アセトニトリル

(20:80)

タイムプログラム: 0 min A-100%, B- 0%

40 min A- 0%, B-100%

50 min A- 0%, B-100%

51 min A-100%, B- 0%

60 min stop

GC 測定条件

カラム: J&W Scientific 社製, DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度: 60°C (2 min)-10°C/min-270°C (7 min)

注入口及び検出部温度: 270°C

Table 1. Recoveries of Pesticides by Partition between Acetonitrile and NaCl Solution, and from Bond Elut® SAX+PSA with or without Sep-Pak® Florisil

Pesticide added (2 µg/2 mL)	Partition CH ₃ CN/NaCl*	Recovery (%) n=3				
		Bond Elut® SAX+PSA		Sep-Pak® F+SAX+PSA**		
		①15% A/H	②50% A/H	①5% A/H	②15% A/H	③50% A/H
Imibenconazole metabo.	95.1	0	97.1	0	0	89.9
Fensulfothion	97.5	42.4	53.0	0	0	96.9
Triflumizole metabo.	96.3	93.7	0	0	86.7	0
Triadimenol	96.5	44.5	49.2	0	12.1	83.5
Myclobutanil	96.3	31.9	60.9	0	0	94.4
Triadimefon	94.8	93.5	0	0	95.1	0
Iprodione	96.8	93.6	0	0	95.0	0
Difenoconazole	97.8	91.1	0	0	53.6	41.4
Triflumizole	96.7	98.8	0	0	94.2	0
Clofentezine	99.5	94.6	0	67.8	30.7	0
Imibenconazole	98.4	61.9	34.5	0	49.7	53.0
Chlorpyrifos	99.1	94.2	0	96.6	0	0
Benomyl	97.5	0	114.0	0	0	76.1
TBZ	98.0	0	100.4	0	0	81.8
Carbaryl (NAC)	97.7	91.8	7.4	0	100.4	0
Imazalil	96.0	76.7	16.8	0	0	87.2
OPP	85.2	55.0	43.1	0	94.4	0
Diflubenzuron	98.8	22.9	79.3	0	34.5	62.3
Bitertanol	96.2	4.3	91.1	0	0	97.5
DP	79.1	80.6	0	75.8	0	0
Thiophanate methyl	89.6	0	33.0	0	0	78.7
Iprodione metabolite	98.9	97.9	0	80.2	18.7	0
Fenpyroximate	97.0	97.3	0	76.1	25.0	0

* Aqueous layer in partitioning was ^{sat}Na₂HPO₄ solution 10 mL+NaCl 5 g.

** Sep-Pak® Florisil+Bond Elut® SAX+PSA, (A/H: acetone/hexane)

GC/MS 測定条件

カラム: J&W Scientific 社製, DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 µm)

カラム温度: 60°C (2 min)→10°C/min→270°C (7 min)

注入口, セパレーター及びイオン化室温度: 270°C

イオン化電圧: 70 eV, イオン化方法: EI

結果及び考察**1. HPLC 条件についての検討**

19 種農薬及びその代謝物 4 種を同時に分析するために逆相系の ODS カラムを使用し, グラジエント溶出法を用いて一斉分析を行った。ただし, ピークの *t_R* の近似するものがあったので, 添加回収試験は A グループと B グループに分けて実施した。分析対象とした農薬の中で蛍光を有するものには A グループでトリアジメノール, クロルピリホス, B グループでベノミル, DP, TBZ, NAC, ビテルタノール, OPP があるが, 検出波長は最も感度の低いベノミルに合わせた。A 及び B グループの UV 並びに FL 検出による HPLC クロマトグラムを Fig. 1 と 2 に示した。

ベノミルは測定時に MBC に変化していると思われる。ビテルタノールはジアステレオマーを有するので 2 本のピーク面積 (FL) の合計値で計算した。ミクロブタニル代謝物 (ヒドロキシ体) は UV 感度が低かったので対象外とした。ジフルベンズロンの UV ピークとビテルタノールの早い方のピークが近似したが, ビテルタノールの UV 吸収は極めて小さいので無視した。

2. アセトニトリル/食塩水分配法についての検討

アセトニトリル抽出液の水を分離する方法はカリフォルニア州政府農務省 (CDFA) が開発し¹⁴⁾, 我が国でも検討¹⁵⁾が始められている。本法ではこの方法に種々の改良を加えた。試料 20 g をアセトニトリル 50 mL で 2 回磨砕抽出し, 抽出液を 100 mL の定容としてその半量を分析に使用した。

かんきつ類の場合には酸性を中和するために酢酸ナトリウム 5 g を添加して同様に行った。CDFA 法¹⁴⁾及び秋山らの方法¹⁵⁾ではアセトニトリル抽出液を ODS ミニカラムに通して低極性物質を除去している。本法では青果物を対象作物としたので脂肪など低極性物質の混入が

Table 2. Recoveries of Pesticides Spiked to Apple and Banana by the Proposed Method

Pesticide added (2 µg/10 g)	Apple			Banana		
	①15% A/H	②50% A/H	Total	①15% A/H	②50% A/H	Total
Imibenconazole metabo.	0	93.7	93.7	9.7	75.2	84.9
Fensulfothion	33.7	53.6	87.3	over	8.1	
Triflumizole metabo.	84.8	0	84.8	79.4	7.4	86.8
Triadimenol	52.6	35.0	87.6	55.9	31.6	87.5
Myclobutanil	25.1	59.3	84.4	50.3	23.9	74.2
Triadimefon	85.1	0	85.1	83.8	0	83.8
Iprodione	83.5	0	83.5	74.7	0	74.7
Difenoconazole	85.4	0	85.4	82.9	0	82.9
Triflumizole	99.2	0	99.2	106.0	0	106.0
Clofentezine	103.7	0	103.7	88.3	9.2	97.5
Imibenconazole	83.1	22.2	105.3	64.3	19.4	83.7
Chlorpyrifos	73.8	27.0	100.8	69.1	30.3	99.4
Benomyl	0	63.1	63.1	0	47.4	47.4
TBZ	1.3	68.0	69.3	0	57.8	57.8
NAC	224.2	28.5	—	100.5	0	100.5
Imazalil	80.9	0	80.9	62.1	0	62.1
OPP	48.9	38.8	87.7	51.5	37.5	89.0
Diflubenzuron	30.0	over		43.4	over	
Bitertanol	9.5	76.6	86.1	37.7	151.4	—
DP	86.7	0	86.7	95.9	0	95.9
Thiophanate-methyl	0	35.5	35.5	0	42.1	42.1
Iprodione metabo.	88.3	0	88.3	88.8	0	88.8
Fenpyroximate	80.1	0	80.1	87.3	0	87.3

A/H: acetone/*n*-hexane, over: overlapping of adulterant, —: recovery can not be calculated because the pesticide was contained originally.

少なく、DP の回収率も低下すると考えられたので、ODS ミニカラムは使用しなかった。

また CDFA 法¹⁴⁾ ではアセトニトリル抽出液に pH 7 のリン酸緩衝液及び塩化ナトリウム 15 g を加えて振とうし、水を分離している。本報では塩基性農薬が多いので水層をアルカリ性としたほうが抽出率は良いと考え、飽和リン酸水素二ナトリウム溶液を用いた。かんきつ類の場合には水相をアルカリ性とするためには、更に 1 mol/L NaOH 0.5~1 mL が必要であった。このような条件下で、アセトニトリル抽出液中のグレープフルーツなどかんきつ類の黄色色素は水層に移行して除去でき、ある程度のクリーンアップができた。また塩化ナトリウム量は分取操作の簡便性を考慮して 5 g とした。

3. 固相抽出カラムによる精製についての検討

3.1 妨害物の比較的に少ない試料について

イオン交換性カートリッジ Bond Elut® SAX 及び PSA による精製¹⁶⁾ を検討した。大多数の青果物については妨害ピークの分散を目的として 15% A/H 及び 50% A/H を用いて 2 画分に溶出した。最終試験溶液は測定感度を上げるため 2 mL とした (各 10 g/2

mL)。ただし、トマト、いちご、ぶどうなど妨害の少ない試料は 50% A/H だけの 1 画分溶出でも測定に影響はなかった。

パイナップル果肉の抽出液を PSA+SAX カラムで精製した場合としない場合を比較した結果、ミニカラムの効果は明らかであった。りんご及びバナナを 15% 及び 50% A/H で精製した場合の HPLC クロマトグラムの一部を Fig. 3 に示した。

りんごの 15% A/H 画分には NAC、バナナの 50% A/H 画分にはビテルタノールに相当するピークがいずれも UV 及び FL で検出され、食品由来の妨害ピークの影響はみられなかった。

アスパラガス、キャベツなどの緑色色素及びバナナなどの黄色色素は 50% A/H 画分に溶出した。FL 検出ではほとんどの青果物で農薬の溶出位置に妨害ピークは検出されなかったが、*t_R* 40 分以降に多数のピークが出現した。

3.2 妨害物の多い試料について

かんきつ類は HPLC (UV) では食品由来の多数のピークが出現し農薬ピークの検出が困難である。アセトニト

Table 3. Recoveries of Pesticides Spiked to Tomato and Grapefruit by the Proposed MethodRecovery (%) $n=3$

Pesticide added (2 or 5 $\mu\text{g}/10\text{ g}$)	RRT*	Tomato	Grapefruit			
		①50% A/H	①5% A/H	②15% A/H	③50% A/H	Total
Imibenconazole metabo.	0.422	91.4	over	over	over	
Fensulfothion	0.672	73.3	0	0	93.1	93.1
Triflumizole metabo.	0.734	131.6	0	63.4	0	63.4
Triadimenol	0.781	90.5	0	0	78.7	78.7
Myclobutanil	0.883	98.4	0	15.5	59.1	74.6
Triadimefon	0.915	107.7	0	70.8	0	70.8
Iprodione	1.000	106.5	0	60.9	11.7	72.6
Difenoconazole	1.127	98.3	0	over	over	
Triflumizole	1.180	114.6	0	72.0	0	72.0
Clofentezine	1.226	99.4	54.0	10.2	0	64.2
Imibenconazole	1.286	91.0	0	29.5	51.5	81.0
Chlorpyrifos	1.449	95.8	45.6	33.2	0	78.8
Benomyl	0.240	88.7	0	0	56.8	56.8
TBZ	0.312	76.8	0	0	64.3	64.3
NAC	0.614	97.8	0	69.7	2.8	72.5
Imazalil	0.747	98.6	0	49.6	31.5	81.1
OPP	0.818	90.9	0	86.9	0	86.9
Diflubenzuron	1.000	102.1	0	over	over	
Bitertanol	1.009	97.3	0	10.2	60.6	70.8
DP	1.194	96.7	86.7	0	0	86.7
Thiophanate-methyl	1.223	82.3	0	0	21.2	21.2
Iprodione metabo.	1.240	101.0	52.1	17.5	0	69.6
Fenpyroximate	1.506	95.5	49.7	17.8	0	67.5

* RRT: Relative retention time monitored by UV detector

A/H: acetone/hexane, over: overlapping of adulterant

リル抽出液を濃縮乾固した後、ゲル浸透クロマトグラフィーで精製したが妨害ピークはほとんど減少しなかった。

そこで SAX+PSA カラムの上に Sep-Pak® フロリジルを連結し、溶出には 5% A/H を追加して 3 画分で溶出し、更に最終試験溶液を 5 mL に調製した (各 10 g/5 mL)。この方法により妨害ピークを小さくすることができた。グレープフルーツの精製後の 3 画分の HPLC クロマトグラムを Figs. 4, 5 に示した。

UV 検出ではクロルピリホス、ジフルベンズロン、イマザリル、TBZ に相当するピークが、また FL 検出ではクロルピリホス、OPP、TBZ に相当するピークが見いだされた。精製にフロリジルカラムを追加し、3 画分とすることにより食品由来の妨害ピークの影響を軽減することができた。

4. 農薬の添加回収試験について

4.1 標準品の回収について

アセトニトリル 50 mL と塩化ナトリウム 5 g を含む飽和リン酸水素二ナトリウム溶液 10 mL の分配による農薬の回収率を求めたところ、各農薬の回収率にはほと

んど問題がなく、DP がやや低い値を示したのは、減圧濃縮時に一部揮散したためと考えられた。

Bond Elut® SAX+PSA からの回収はチオファネートメチルが低い値を示したが、その他については良好であった。イミベンコナゾール代謝物、ベノミル、TBZ、チオファネートメチルはすべて 50% A/H 画分に溶出した。

Sep-Pak® フロリジル+Bond Elut® SAX+PSA からの各農薬の回収率に問題はなかった。DP、クロルピリホスはすべて 5% A/H 画分に、イミベンコナゾール、フェンスルホチオン、ミクロブタニル、ベノミル、TBZ、チオファネートメチル、イマザリル、ピテルタノールはすべて 50% A/H 画分に溶出した。このように農薬が分画されることから、検出ピークの判別が容易になった。ただし、試料に添加した場合には検体により若干溶出位置に変動の見られることがあった。

チオファネートメチルの回収率は変動が大きかった。チオファネートメチルをアセトニトリル又は 50% A/H に添加して、濃縮乾固したときの回収率はそれぞれ 86.5%、6.5% であり、後者の変動係数は $\pm 45\%$ とか

Table 4. Detection Limits for Pesticides and Their Metabolites by HPLC (UV, FL), GC (NPD, FPD) and GC/MS (TIC, SIM)

Pesticide	Detection limit (ng)					
	HPLC		GC		GC/MS	
	UV	FL	NPD	FPD	TIC	SIM
Imibenconazole metabo.	2.0	—	0.20	—	10.00	2.00
Fensulfothion	2.0	—	0.02	0.01	0.20	0.004
Triflumizole metabo.	2.0	—	—	—	—	—
Triadimenol	2.0	1.0	0.10	—	1.00	0.20
Myclobutanil	2.0	—	0.02	—	1.00	0.20
Triadimefon	2.0	—	0.10	—	0.20	0.04
Iprodione	2.0	—	1.00	—	1.00	0.20
Difenoconazole	2.0	—	2.00	—	2.00	1.00
Triflumizole	2.0	—	0.10	—	2.00	1.00
Clofentezine	2.0	—	(0.20)	—	—	—
Imibenconazole	2.0	—	—	—	—	—
Chlorpyrifos	2.0	1.0	0.02	0.004	0.02	0.004
Benomyl	2.0	1.0	—	—	—	—
TBZ	2.0	0.2	0.20	—	1.00	0.20
Carbaryl (NAC)	4.0	0.2	1.00	—	1.00	0.20
Imazalil	2.0	—	0.20	—	1.00	0.20
OPP	4.0	0.2	—	—	1.00	0.20
Diffubenzuron	2.0	—	2.00	—	2.00	1.00
Bitertanol	20.0	0.2	1.00	—	1.00	0.20
DP	4.0	1.0	—	—	1.00	0.20
Thiophanate methyl	2.0	—	0.20	—	1.00	0.20
Iprodione metabo.	2.0	—	1.00	—	1.00	1.00
Fenpyroximate	2.0	—	—	—	—	—

—: impossible to detect, (): decomposed product

なり大きかった。チオファネートメチルは 50% A/H 中で濃縮時に分解するものと推定され、この現象は BHA や BHT などの抗酸化剤を添加しても防止できなかった。その他の農薬の回収率における変動係数は ±10% 以下であった。

4.2 試料からの回収について

りんご、バナナ、トマト (以上 0.2 ppm)、グレープフルーツ (0.5 ppm) に添加した各農薬の回収率を求め Table 2, 3 に示した。全般的に水溶性の高いベノミル、TBZ、チオファネートメチル、イマザリルの回収率が低い傾向にあった。50% A/H 画分のフェンスルホチオン、ジフルベンズロンは妨害のため測定困難なことが多かった。オレンジのトリアジメノール、またオレンジ及びグレープフルーツのイミベンコナゾール代謝物、ジフェノコナゾール、ジフルベンズロンは妨害のため測定困難なことが多かった。用いたりんご及びバナナには NAC 及びビテルタノールがそれぞれ含有されていたため、回収率は算出できなかった。回収率の変動係数はチオファネートメチルを除いて ±20% 以下であった。

試料中には DP と同じ t_R を持つ蛍光物質の含まれることがあったので、DP に関しては UV 検出による値を採用し、その他の蛍光を有する農薬に関しては FL による検出値を採用した。

HPLC のグラジエント溶出法では繰り返し実験において、特に t_R の前半において少しずれる傾向があった。データ処理にピークの自動読みとり方式を採用すると、妨害ピークを農薬と誤って読み込み、ときどき回収率の異常値がみられた。この現象は特に妨害ピークの多いかんきつ類において著しかった。

このような場合は自動読みとりは行わず、Table 3 に示したように A グループではイプロジオン、B グループではジフルベンズロンに対する各農薬の相対保持時間 (RRT) を算出して、目的ピークの割り出しを行った。したがって、未知検体についてはイプロジオン又はジフルベンズロンを内部標準として加えた場合と加えない場合について測定するのが好ましい。

また検体を測定する途中にしばしば標準品を注入して HPLC クロマトグラムを測定し、両者の t_R を比較して

確認した。農薬により溶出画分に特徴があるので、3画分に分けることも農薬ピークの判定を助けた。このようにしてレモン、オレンジ、グレープフルーツについても本法で良好に測定できた。

5. 検出されたピークの確認法について

HPLCで検出した農薬ピークについてはフォトダイオードアレイ検出器でUV吸収スペクトルを測定した。Fig. 3に示したりんごのNAC(試料中0.14 ppm)、バナナのピテルタノール(0.10 ppm)に相当するピークのUV吸収スペクトルは、それぞれ標準品と良好な一致を示した。またFig. 4, 5に示したグレープフルーツのTBZ(0.98 ppm)に相当するピークのスペクトルは標準品と一致したが、ジフルベンズロンのスペクトルは一致しなかった。クロルピリホス、OPP(それぞれ0.002及び0.11 ppm)は濃度が低いため明確な判定はできなかった。イマザリル(0.98 ppm)は特徴的な極大吸収を持たないため、フォトダイオードアレイによる確認は不能であった。

本来ならHPLCで検出されたピークについてLC/MSで確認を行うべきところであるが未だ設置されていないので、GCで測定可能な農薬についてはGC-NPD, FPD並びにGC/MSで確認した。

りんごのNAC(15% A/H 画分)は感度が低いためGCでは測定できなかったが、バナナのピテルタノール(50% A/H 画分)はGC-NPDで測定できた。またグレープフルーツのTBZ、イマザリル(50% A/H 画分)はGC-NPDで検出され、クロルピリホス(5% A/H 画分)は濃度が低いためGC-NPDでは検出されず、GC-FPDで検出された。

GC/MSではりんごのNAC、バナナのピテルタノール、またグレープフルーツのTBZ、イマザリルについてはマススペクトルを測定できた。クロルピリホスとOPPについてはGC/MS(SIM)で測定できた。

6. 各種検出器による農薬の検出限界

HPLCで測定した19種農薬及び4種代謝物のHPLC, GC及びGC/MSによる検出限界(S/N=3)を調べ、Table 4に示した。

HPLCのFL及びGC-FPDで検出できる農薬については高感度に測定できた。GC/MS(SIM)ではスクランモード(TIC)に比して約5倍高感度に測定できた。DP, OPPはGC-FIDで測定する必要があるため今回は検討しなかったが、GC/MS(SIM)では高感度に測定できた。トリフルミゾール代謝物、イミベンコナゾール、ベノミル、フェンピロキシメートはGC測定が困難であり、GC/MSによる確認もできなかった。

今後は本法にLC/MSを導入してピークの確認をより確実にするとともに、HPLC装置をセミマイクロ化して分析時間を短縮するなどの改良が必要と考えられる。

ま と め

HPLC(UV及びFL)による青果物中残留農薬の多成分一斉分析法について検討した。試料からアセトニトリル抽出し、アルカリ性食塩水と分配後Bond Elut® SAX+PSA ミニカラム(かんきつ類ではSep-Pak® フロリジルを追加)に負荷してアセトン-*n*-ヘキサン混液で1~3画分に分けて溶出して試験溶液を作製した。本法による19種農薬及びその代謝物4種の0.2又は0.5 ppm添加における回収率は、チオファネートメチルなど低いものや試料により妨害のみられるものもあったが、全般的にはほぼ満足すべき結果が得られた。

本法を生鮮果実に適用し、りんご、バナナ、グレープフルーツから検出された農薬ピークをフォトダイオードアレイ検出器、GC-NPD, FPD及びGC/MSで確認した。

本法により、検出頻度が高いがGC分析が困難なため、モニタリング調査などの対象外とされがちであった農薬の検査が可能となり、より効率的なモニタリングを実施する上で本法は有用と考えられる。

謝 辞

本研究を行うに当たり種々御協力いただいた、横浜検疫所 輸入食品検疫・検査センターの土屋 鍛氏及び神戸検疫所 輸入食品検疫・検査センターの関口幸弘、平原嘉親氏並びにその他の諸氏に深謝致します。

文 献

- 1) Nakamura, Y., Tonogai, Y., Sekiguchi, Y., Tsumura, Y., Nishida, N., Takakura, K., Isechi, M., Yuasa, K., Nakamura, M., Kifune, N., Yamamoto, K., Terasawa, S., Oshima, T., Miyata, M., Kamakura, K., Ito, Y.: J. Agric. Food Chem. **42**, 2,508~2,518 (1994).
- 2) 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).
- 3) 尾花裕孝, 堀 伸二郎: 衛生化学 **42**, 1~16 (1996).
- 4) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究 **45** (9), 31~49 (1995); **47**(5), 27~41 (1997); **47**(6), 27~41 (1997).
- 5) 平成6年6月9日厚生省告示第199号.
- 6) 永山敏廣: 食品工業 **30**, 53~62 (1995).
- 7) 上野祐子, 小川貴史, 岡本尚子, 谷口勝彦, 三坂亜矢子, 西田政司, 樋口初良: 食品衛生研究 **46**(10), 75~84 (1996).
- 8) 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 松木宏晃, 伊藤誓志男: 衛生化学 **38**, 270~281 (1992).
- 9) 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誓志男, 宮田昌弘, 鎌倉和政, 長谷川眞住, 和田伊智朗, 藤原靖士: 食衛誌. **34**, 216~226 (1993).
- 10) 茶谷裕行, 近本武次, 棟久美佐子, 足立 透, 小松正幹: 同上 **37**, 187~194 (1996).
- 11) 近藤 巖, 前川吉明, 熊谷昌士: 同上 **35**, 8~12 (1994).
- 12) 川原章弘, 山田真記子, 加藤喜昭, 中村幹雄, 西島基弘,

- 伊藤誉志男: FFI ジャーナル **163**, 104~110 (1995).
- 13) 中里光男, 只野敬子, 小川仁志, 牛山博文, 川合由華, 小林千種, 立石恭也, 田村行宏: 衛生化学 **41**, 392~397 (1995).
- 14) Lee, S. M., Papathakis, M. L., Feng, H. C., Hunter, G. F., Carr, J. E., Fresenius J.: Anal. Chem. **339**, 376~383 (1991).
- 15) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 武田信幸, 辻 正彦: 食衛誌. **37**, 351~362 (1996).
- 16) Cairns, T., Luke, M. A., Chiu, K. S., Navarro, D., Siegmund, E. G.: Rapid Commun., Mass Spectrom. **7**, 1,070~1,076 (1993).