

---

## 研究報文

---

### 高速液体クロマトグラフィーによる

### 食品中の残留農薬の分析

—Sep-Pak カートリッジによる

クリーンアップ処理の検討—

安部 尚子, 近藤陽太郎

Selective Clean-up using Sep-Pak Cartridges for Determination  
of Organophosphorous Pesticides in Vegetables  
by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection

Naoko Abe and Yôtarô Kondo

It is important for analysis of the pesticide residues in vegetables to remove the UV- sensitive impurities derived from vegetables. To evaluate clean-up methods for determination of the pesticide residues, organophosphorus pesticides were spiked into the solution obtained after extraction of the vegetable samples with acetone followed by partition with dichloromethane. A portion of the dichloromethane extract was loaded onto a Sep-Pak cartridge (the cartridge is filled with C<sub>18</sub>, frorisil, silica and diol material, respectively). Average recoveries from vegetable extracts were in the range 74.3–96.7% and the background was greatly reduced when both C<sub>18</sub> and silica columns were used.

#### I. はじめに

現在, 農業において, 多くの種類の農薬が大規模に使用されており, 国内で約300種類, 世界では約600~700種類が使用されているといわれている<sup>1)</sup>。これらの農薬には, 害虫や病原菌を殺す殺虫剤や, 雑草だけを選んで枯らす除草剤, 作物の成長を早めたり, 抑制したりする作用や, 果実の落下を防ぐ作用などをもつ植物成長調整剤など, 様々な働きのあるものがある。わが国の耕地面積は狭く, そのなかで収量, 品質とも高い水準の生産性を維持し, 同時に経済性と労力低減が求められているのが, 現代の農業の姿である。そのために, 農薬の単位面積あたりの

使用量は, 世界のトップクラスにあるといわれている。

最近の農薬の急性毒性は, 低毒性になってきているが, 決して人畜無害ではなく, 農薬は生物にとって本質的には毒である。それ故, 農薬は, 生物に対する毒作用を網渡り的に利用したものであり, 使い方を誤れば, 人間も死亡する。すぐに死ななくとも, 慢性毒性や発癌性, 遺伝毒性などがあることが知られている。従って, 農薬は, 定められた使用量を守って, 正しく使用されなければならない。このため, 農薬の使用や食品への残留についての規制が食品衛生法及び農薬取締法に基づいて行われているわけである。

前報<sup>1)</sup>では, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い, 野菜や果物, 茶葉など市販の農

産物35種についてフロリジルを使用したオープンカラム精製法による分析を行い、そのうちの22種の農産物から、11種の農薬が検出したことを報告した。このオープンカラム法は残留農薬の一斉分析法として、安価で簡便・迅速な測定方法であるが、この方法では食品由来の成分を除くのに限界があり、その妨害ピークのため幾分精度に問題があることも指摘した。

本研究では、私たちが日常口にする野菜や果物に残留している農薬を、高速液体クロマトグラフィーを用いて迅速に分析するための試料の精製法（クリーンアップ）について検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試 薬

各農薬標準品：オキシシン銅，ナプロバミド，フルトラニル，メプロニル，ブタミフォス，チウラム，イソプロチオラン，プロピザミド，ベンスリド，トリクロホスメチル，ペンディメタリン，DDVP，メチダチオン，EDDP，エチルチオメトン，ベンフラカルブ，アシュラム，シマジン，キャプタン，フェニトロチオン，ダイアジノン，クロロタニル，イソフェンホス，イソキサチオン及びクロルピリホスを各々 100 ppm の濃度になるようにアセトニトリルで調製した。

固層抽出担体：日本ウォーターズ Sep-Pak カートリッジ (C<sub>18</sub>, フロリジル, シリカ, ジオール)

各種溶媒：アセトニトリル，アセトン，イソプロピルアルコール，ジクロロメタン，メタノール及び酢酸エチルは(株)ナカライテスク社製残留農薬試験用を用いた。

その他の試薬：塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは(株)ナカライテスク社製試薬特級を用いた。

### 2. 装 置

高速液体クロマトグラフ：東ソー(株)スーパーシステムコントローラー SC-8010，デュアルポンプ CCPD，カラム高温槽 CO-8011付，紫外可視検出器；東ソー(株) UV-8010

### 3. HPLC 測定条件

カラム：東ソー(株) TSK gel Enviropak G1 (6.0 mm I.D. × 150 mm)，溶離液；50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>CN (50 : 50 v/v)，流速；1.0 ml/min，カラム温度；40°C，波長；210 nm，試料；20 μl

### 4. 試料溶液の調製とクリーンアップ

1) オープンカラム法<sup>2,3,4)</sup>：方法の概略は図1に示した。検体 20 g にアセトン 200 ml を加え、

10分間放置し、ミキサーで5分間破碎した後、ハイフロスーパーセルを敷き、吸引濾過した。濾紙上の残留物もアセトン 50 ml で洗浄し、吸引濾過した。これをロータリーエバポレーターを用い、減圧下でアセトンを除去した。これに、ジクロロメタン 100 ml 及び5%塩化ナトリウム溶液 200 ml を加え、分液漏斗を用い、5分間激しく振り混ぜた後、ジクロロメタン層を分取した。水層にジクロロメタン 100 ml を加え、同様の操作をし、ジクロロメタン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ハイフロスーパーセルを敷き、吸引濾過後ロータリーエバポレーターを用いて減圧下で、ジクロロメタンを留去した。この残留物にジクロロメタンを加え、約 3 ml の濃縮液とした。内径 20 mm，長さ 200 mm のカラムにフロリジル 10 g，次いで無水硫酸ナトリウム 2 g をジクロロメタンを用いる湿式法で充填した。このカラムをジクロロメタン 20 ml で洗浄後、上記のように調製した試料溶液を加え、ジクロロメタン 100 ml で溶出した。ロータリーエバポレーターで減圧下、ジクロロメタンを留去した。得られた残留物にメタノールを加え、正確に 2 ml とし、ろ過後これを試験溶液とした。

2) Sep-Pak 法<sup>5,6)</sup>：方法の概略(図2)に示したように、検体 40 g にアセトン 400 ml を加え、10分間放置し、ミキサーで5分間破碎した後、ハイフロスーパーセルを敷き、吸引濾過した。濾紙上の残留物は再度アセトン 50 ml で洗浄し、吸引濾過した。これをロータリーエバポレーターを用い、減圧下でアセトンを除去し、ジクロロメタン 200 ml 及び5%塩化ナトリウム溶液 200 ml を加え、分液漏斗を用いて、5分間激しく振り混ぜた後、ジクロロメタン層を分取した。水層にジクロロメタン 200 ml を加え、再抽出操作をし、ジクロロメタン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ハイフロスーパーセルを敷いて吸引濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下で、ジクロロメタンを留去した。この残留物にメタノールを加え、メスフラスコで 10 ml とした。4種類の Sep-Pak (C<sub>18</sub>, フロリジル, シリカ, ジオール) カートリッジを、適当な溶出溶媒(アセトニトリル, イソプロパノール, メタノール, 酢酸エチル, ジクロロメタン) 5 ml で洗浄調製した後、上記試料濃縮液 1 ml を Sep-Pak にのせ、各溶出溶媒 2 ml で溶出し、3 ml とし、これを試験溶液とした。Sep-Pak 2 個の組み合わせでは 5 ml の溶媒で洗浄した後、溶出溶媒は 4 ml とし、5 ml に定容した。

### 5. 農薬添加回収率試験

日頃生食する機会の多い野菜（トマト，レタス，キュウリ及びキャベツ）を選び試料調製（図2）を行い，得られた濃縮物にメタノールを加えた。メスフラスコで定容する際に，100 g/ml の農薬（DDVP 及びエチルチオメトン）を各々 0.5 ml ずつ添加した。この試験液を Sep-Pak に通してクリーンアップしたときの回収率を，アセトニトリル，イソプロパノール，メタノール，酢酸エチル，ジクロ

ロメタンの5種類の溶媒についてそれぞれ測定した。

### III. 結果と考察

残留農薬の分析法を検討する際に大切なことは，野菜に付着・吸収された農薬の回収をできる限り高めることであり，それとともに検出器に検知される野菜由来の成分を最小限にしなければならない。農薬を最大限回収するために多量の抽出溶媒を使用す

試料 20 g

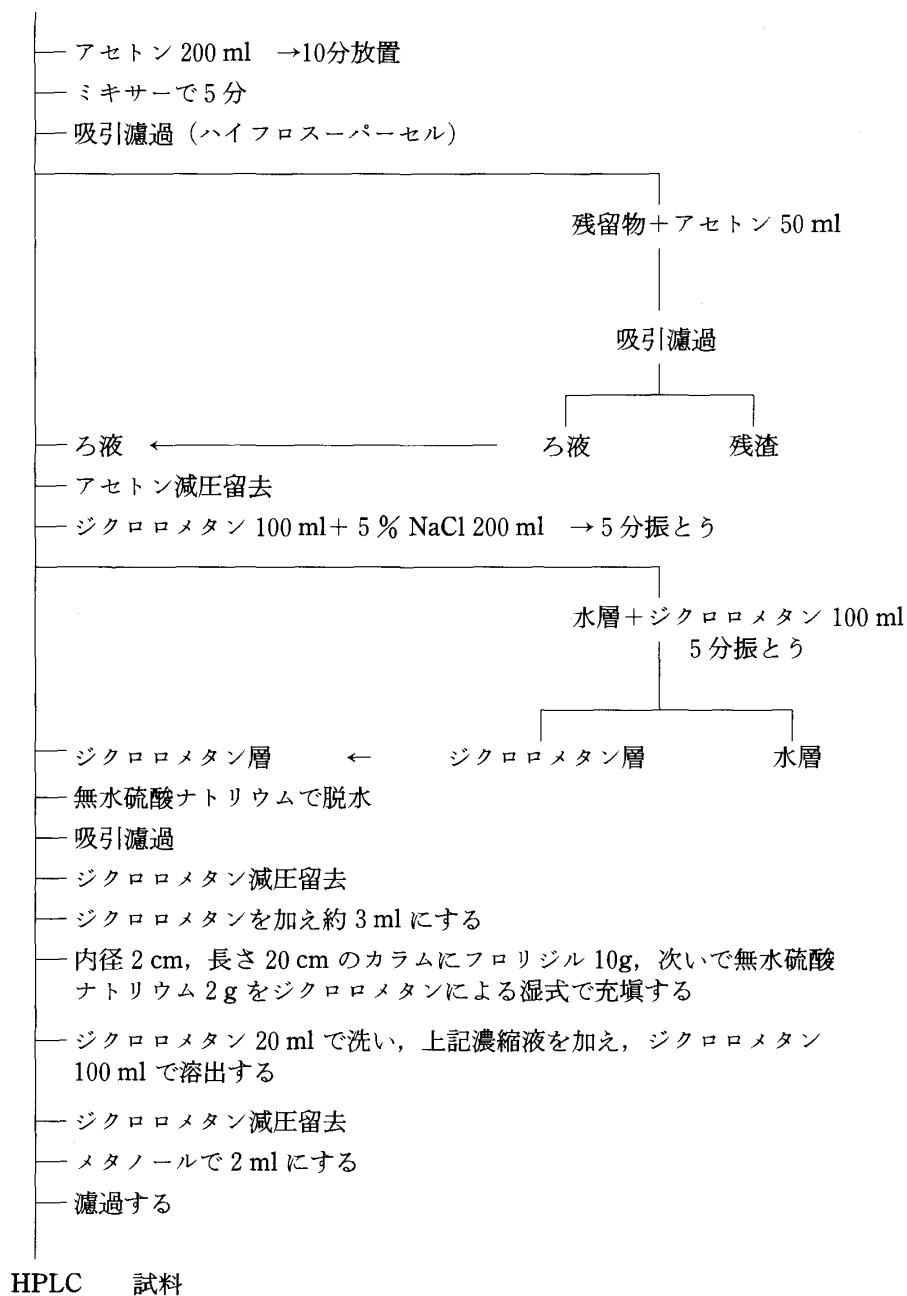


図1 フロリジルによるクリーンアップ操作

ると、農薬とは無縁の野菜成分も抽出することとなる。

そこで上記4種の野菜について試料溶液を調製し、それに有機リン系殺虫剤のDDVPとエチルチオメトンを添加し、Sep-Pak処理を行った場合の農薬の回収率について調べた。Sep-Pakカートリッジには固層抽出法<sup>6,7,8,9)</sup>に使用される担体をあらかじめ少量充填してあり、カラムクロマトグラフィーの前処理に用いられるものである。これを利用して農薬と野菜由来の成分が分離できれば、簡便な処理方法となるであろう。溶出溶媒としては、Sep-Pakに詰められた4種の充填剤の性質を考慮して、溶出力の異なる5種類の溶媒（アセトニトリル、イ

ソプロパノール、メタノール、酢酸エチル、ジクロロメタン）の中から適当なものを選び農薬回収率を調べた。その結果、Sep-Pak1個を使用した方法では、逆層系の担体においても順層系のものにおいても、アセトニトリルを用いた場合に他の溶媒に比較して、DDVP（図3）とエチルチオメトン（図4）はともに良い回収率が得られた。しかし、順層系の担体を使用した場合、順層系に用いられる溶出力の弱いジクロロメタンでは、エチルチオメトンはカートリッジ内に吸着されたままで、溶出回収されない結果となった。次に、最適溶媒と考えられるアセトニトリルを用いて、逆層-順層の順でSep-Pak2個を組み合わせ、4種の野菜についてのクリーンア

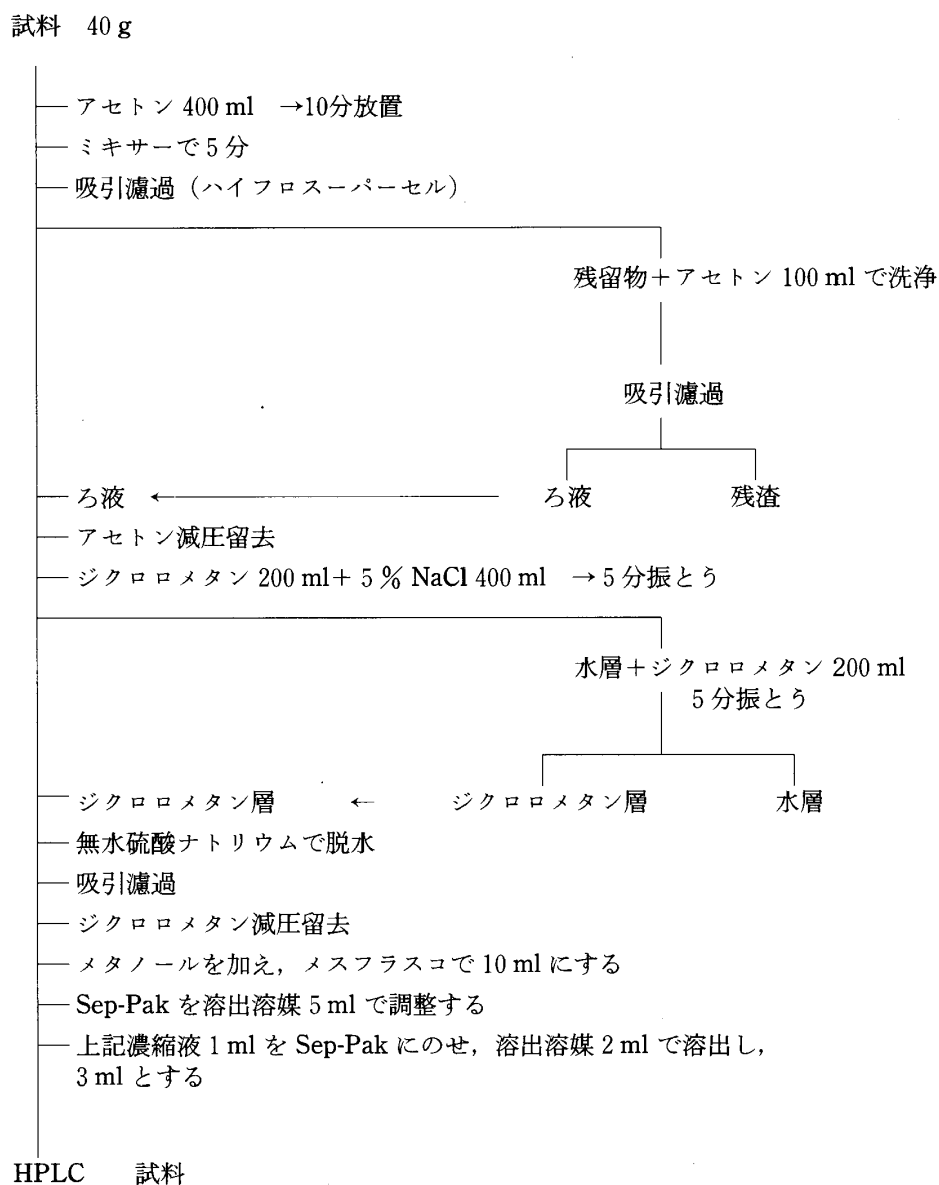


図2 Sep-PaKによるクリーンアップ操作

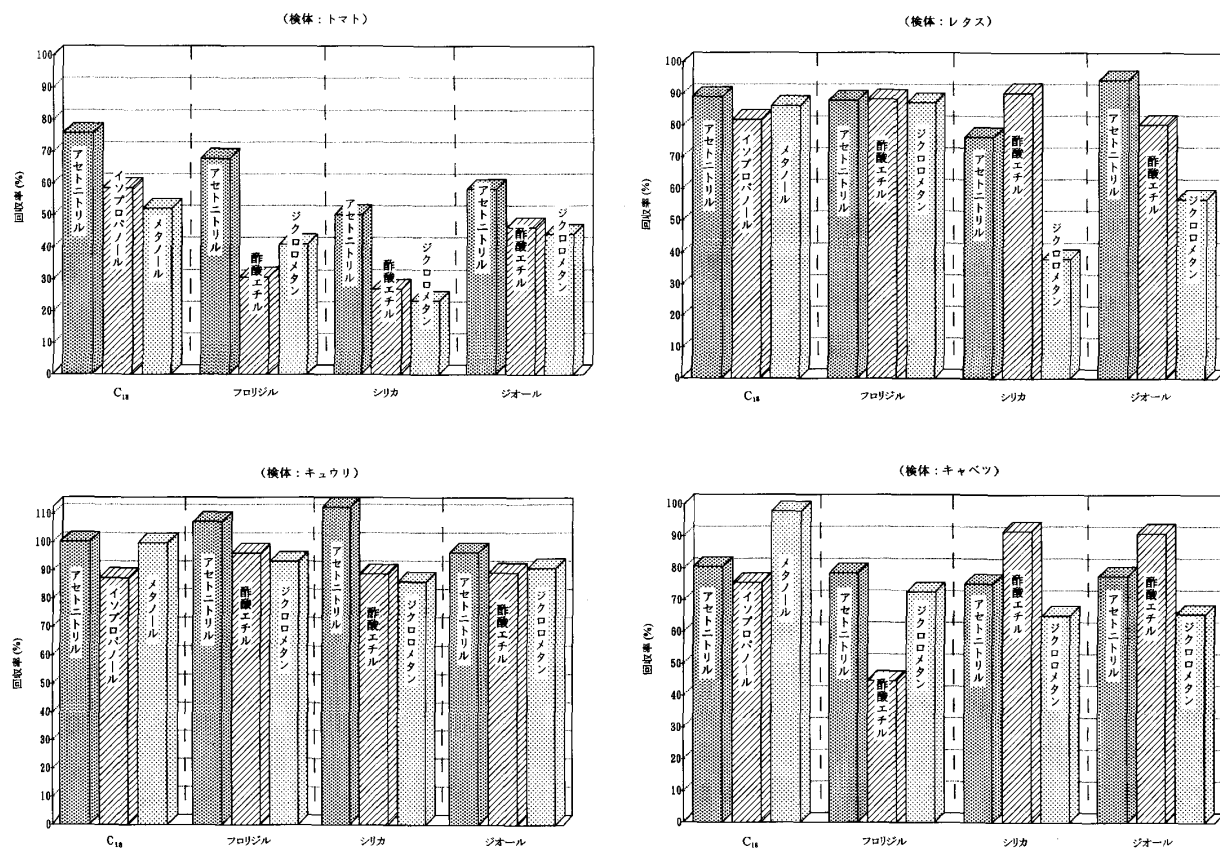


図3 Sep-Pak 1個を用いたクリーンアップ操作による農業DDVPの回収率

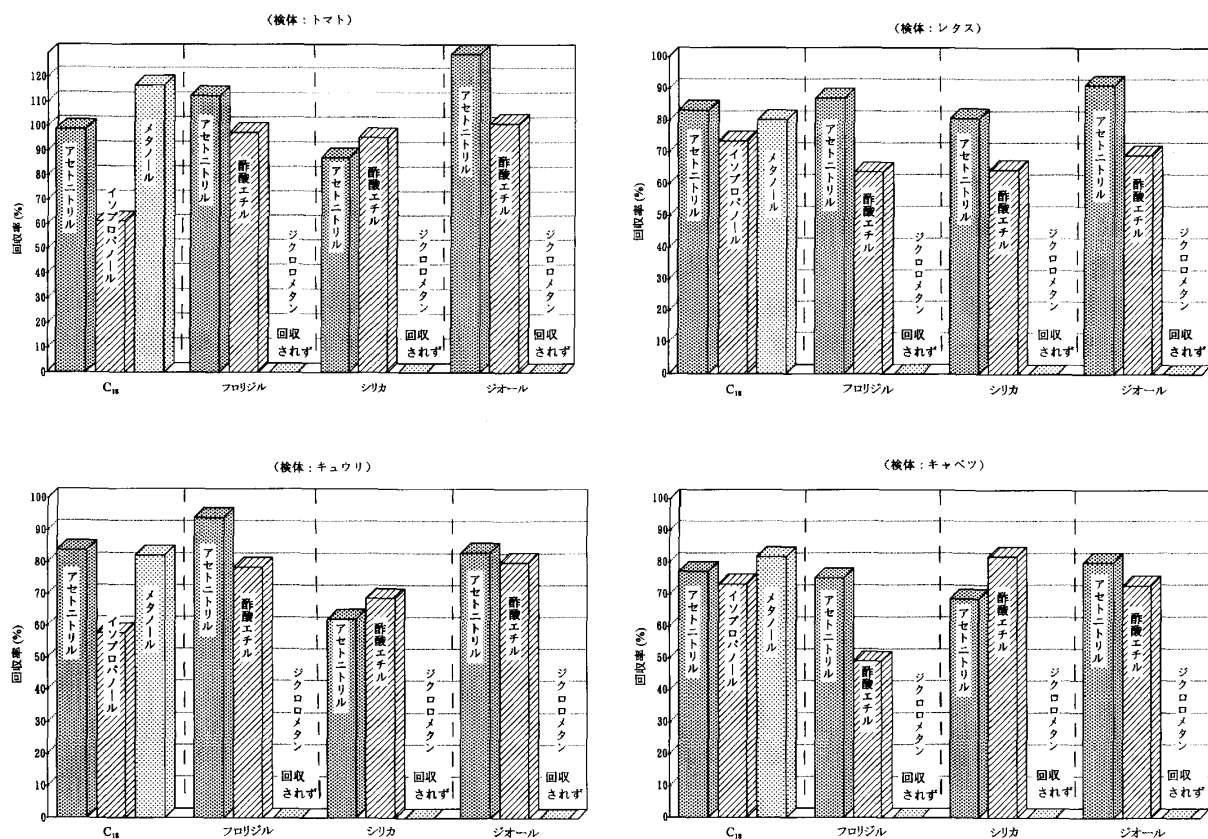


図4 Sep-Pak 1個を用いたクリーンアップ操作による農業エチルチオメトンの回収率

ップについて回収率を調べたところ、どの組み合わせにおいても、Sep-Pak 1個を使用したときよりも更に良い、70~101%という分析に十分な回収率を得ることができた(図5)。

従来法であるフロリジルを用いたオープンカラムによるクリーンアップでは、野菜や果物由来の成分を十分に取り除くことが難しく<sup>2)</sup>、HPLC分析結果のクロマトグラム(図6A)のように、野菜や果物由来の成分(妨害ピーク)が多く認められ、より正確な残留農薬量の分析を行うためには、できるかぎり妨害ピークを取り除くことが必要であることが分かった。そこで、Sep-Pak(C<sub>18</sub>,フロリジル,シリカ,ジオールの4種類)をそれぞれクリーンアップに用い、野菜由来の妨害ピークが何%にまで減少するかを検体にトマトを溶媒に最も幅広い適応性を示したアセトニトリルを溶出溶媒として用いて調べたところ、表1に示すような結果を得た。SEP-Pak単体によるクリーンアップでは、クリーンアップしていないものの妨害ピークを100%とすると、処理後では4種のSEP-Pakについて23.3~29.1%まで減少した。シリカを用いた場合に最も妨害ピークの除去率が大きく、23.3%にまで妨害ピークが減少した。次に、逆層系担体(C<sub>18</sub>)と順層系担体(フロリジル,シリカ,ジオール)の2個を組み合わせるクリーンアップを行ったところ、さらに改善され10.5~18.2%まで妨害ピークが減少した。C<sub>18</sub>を単独で使用する(図6B)よりは、C<sub>18</sub>とシリカの組み合わせ(図6C)が最も妨害ピークの除去率が大きく、10.5%まで妨害ピークは減少した。従って、アセトニトリルを用いた場合には、逆層担体とどの順層担体と組み合わせでも、十分クリーンアップ効果が得られ、分析可能であると考えられ、結論として野菜由来の成分(妨害ピーク)の減少率の高かったC<sub>18</sub>とシリカとの組み合わせるクリーンアップ法が

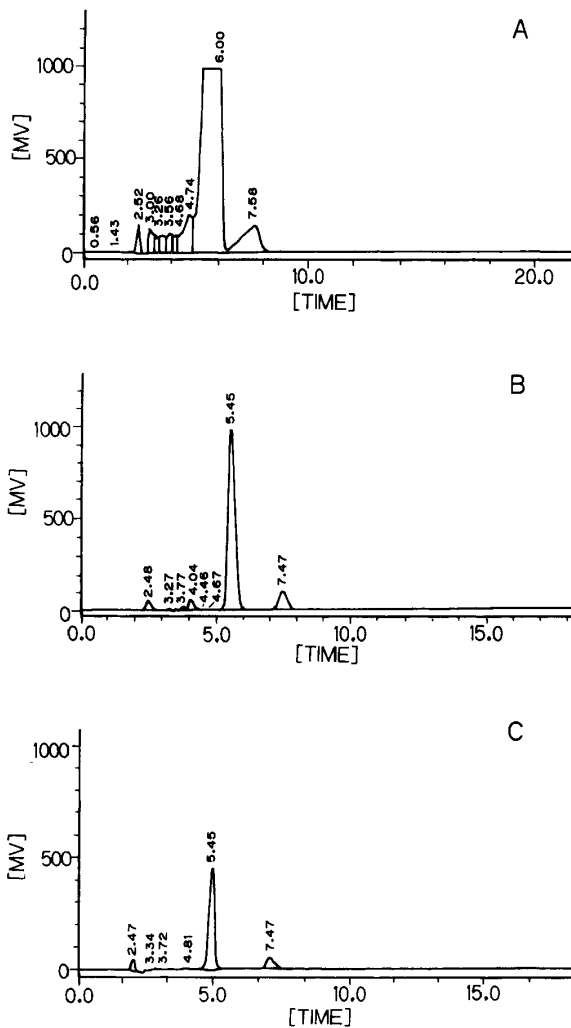


図6 Sep-Pakを用いたクリーンアップ操作によるトマト由来の成分(妨害ピーク)の除去  
A, Sep-Pak 処理なし; B, Sep-Pak (C<sub>18</sub>) 1個による処理; C, Sep-Pak (C<sub>18</sub>+シリカ) 2個による処理

最も良く、また汎用性に優れていると考えられる。それ故、この逆層担体(C<sub>18</sub>)と順層担体(シリカ)を組み合わせ、アセトニトリルのみで溶出するこの

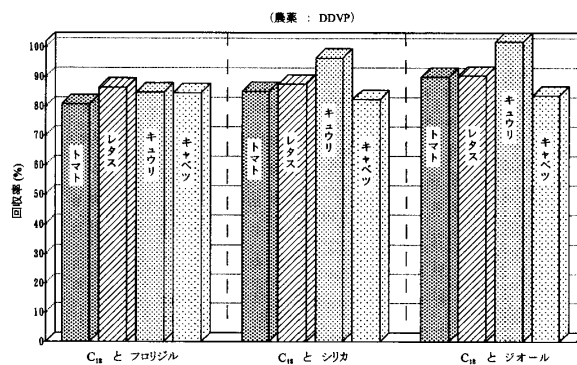
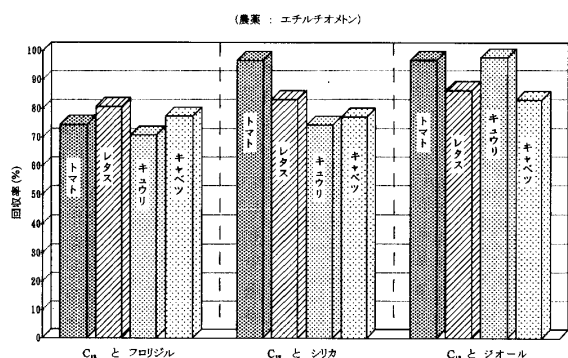


図5 Sep-Pak 2個を用いたクリーンアップ操作による農薬DDVPとエチルチオメトンの回収率

表1 トマト試料調製液の Sep-Pak クリーンアップ処理後に得られたトマト由来の妨害ピークのクリーンアップ処理前ピークに対する比率

Sep-Pak 種類	順層系		逆層系	
	C <sub>18</sub>	フロリジル	シリカ	ジオール
単体のみ	29.2%	25.5%	23.3%	24.0%
C <sub>18</sub> との組み合わせ	—	15.2%	10.5%	18.2%

方法は高速液体クロマトグラフィーによる残留農薬の簡便・迅速分析に寄与することが期待できる。

### ま と め

食品に残留している農薬を分析する際に、最も問題となるのは、食品由来の成分による影響が大きく、精度良く分析する方法の確立に多大な努力を必要とすることである。本研究では、固層抽出法に使用される吸着剤をあらかじめ充填した SEP-Pak カートリッジを使って、食品由来成分（妨害ピーク）による影響を減少させ、より精度の高い残留農薬分析方法を確立することを目的とした。生食されるトマト、レタス、キュウリ及びキャベツを選び、これらをアセトン抽出し、次いでジクロロメタンに転溶した溶液に農薬を添加し、農薬の回収率を調べた。試料調製液を逆層系 SEP-Pak (C<sub>18</sub>) と順層系 SEP-Pak (フロリジル, シリカ, ジオール) の4種類のカラム担体に注入し、5種類の溶媒 (アセトニトリル・イソプロパノール, メタノール, 酢酸エチル, ジクロロメタン) により溶出し、農薬の回収率を調べた。その結果、SEP-Pak 1個を単独で用いアセトニトリルを溶出溶媒とした場合、他の溶出溶媒と比較して、どの担体においても比較的良い回収率が得られた。逆層系-順層系の2個を組み合わせ、同様に回収率を調べるところ、アセトニトリルを用いた場合、逆層担体 (C<sub>18</sub>) とどの順層担体の組み合わせでも70~101%という良い農薬回収率が得られ、その中でも、最も多く妨害ピークが除去し、10.5%にまで低減させ

た、C<sub>18</sub> とシリカの組み合わせが良いという結論を得た。単一溶媒の使用のみで、分析における妨害ピークの問題がかなり改善されたので、この方法により簡便迅速に残留農薬の分析ができるのではないかと期待される。

### 文 献

- 1) 植付振作, 河村 宏, 辻万千子, 宮田重行, 細田静夫: 残留農薬データブック, 三省堂, 東京 (1992)
- 2) 六嶋紀子, 安部尚子, 岡本まゆみ, 近藤陽太郎: 本誌, 7 (1999)
- 3) 厚生省生活衛生局食品化学課編: 残留農薬分析法 Draft, 社団法人日本食品衛生協会, 東京 (1986)
- 4) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法, 中央法規出版, 東京 (1995)
- 5) Sep-Pak マニュアル: 日本ウォーターズ株式会社
- 6) P. Parrilla and J. M. Vidal: *Chromatographia*, **43**, 265 (1996)
- 7) J. Tekel' and Š. Hatrík: *J. Chromatogr. A*, **754**, 397 (1996)
- 8) C. M. Torres, Y. Picó and J. Mañes: *J. Chromatogr. A*, **778**, 43 (1997)
- 9) C. M. Lino, M. I. N. Da Silveria: *J. Chromatogr. A*, **769** (1997)