

HPLC 及び GC による青果物中残留農薬の一斉分析とその検出例

土屋 鍛^{*1}・前田憲二^{*1}・関口幸弘^{*2}・平原嘉親^{*2}
渡辺芳則^{*2}・外海泰秀[#]

Simultaneous Analysis and Detection of Pesticides
in Fresh Fruits and Vegetables By HPLC and GC

Tetsu Tsuchiya^{*1}, Kenji Maeda^{*1}, Yukihiro Sekiguchi^{*2}, Yoshichika Hirahara^{*2},
Yoshinori Watanabe^{*2} and Yasuhide Tonogai[#]

A method was established for simultaneous determination of pesticide residue in fresh fruits and vegetables by HPLC and GC. CH₃CN extraction /NaCl partition method was used in order to recover hydrophilic pesticide such as acephate, methamidophos. Dimethoate and methamidophos from okra and DDVP from strawberry were detected by GC. On the otherhand confirmation method by GC and GC/MS was studied for peaks detected by HPLC with UV and/or FL detector. OPP, TBZ, imazalil, chlorpyrifos etc. in citrus fruits were detected by the proposed method.

Keywords: HPLC, GC, GC/MS, pesticide, Fresh fruit

緒 言

著者らは既報¹⁾で HPLC による青果物中残留農薬の一斉分析法を作成し、その際に親水性農薬をも対象とするためアセトニトリル抽出、食塩水分配法を採用した。親水性農薬にはアセフェート、メタミドホス等 HPLC の紫外 (UV) 並びに蛍光 (FL) 検出器では検出不能でも、GC で検出可能な農薬もあり、既報ではこれらが同時に抽出されてくると考えられる。本報ではアセフェート、ジメトエート、メタミドホス、モノクロトホス、オキサミル、DDVP の既報への適用性について検討するとともに、実際の輸入検体から農薬の検出例について調べた。

実験方法

1. 試 料

輸入の野菜・果実

2. 試薬及び試液

各農薬標準品：DDVP, アセフェート, ジメトエート, メタミドホス, モノクロトホス, オキサミルは和光純薬工業(株)製のそれぞれ農薬標準品を用いた。その他の標準品は

既報¹⁾の通り。

各農薬標準原液：各農薬標準品10 mg をはかり、酢酸エチル100 ml に溶かした (100 μg/ml)。

農薬標準混液：各農薬標準原液それぞれ1 ml をとり、アセトンで100 ml にした (1 μg/ml)。

各種有機溶媒：アセトン, n-ヘキサン, 酢酸エチルは和光純薬工業(株)製の残留農薬分析用を、アセトニトリルはメルク社製の HPLC 用を使用した。

Bond Elut^R SAX, PSA: Varian 社製, 100 mg/1.0 ml 型
Sep-pak^R フロリジル: Waters 社製, プラス型

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所(株)製, LC-10A
検出器：島津製作所(株)製, 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 (GC/MS) :

ヒューレットパッカード社製, 5971 Series II

4. 分析操作法

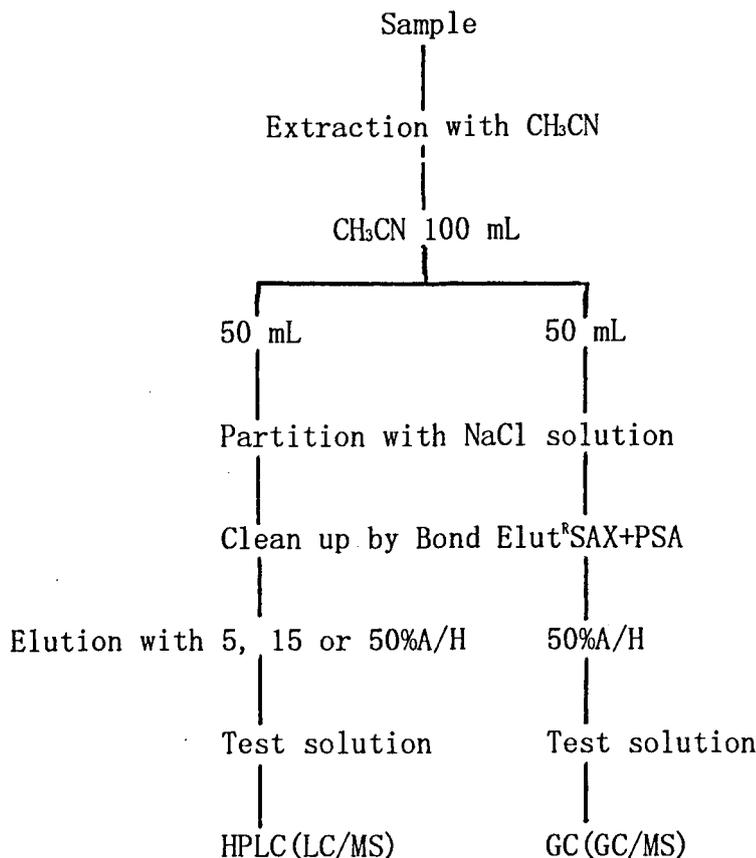
1) 試験溶液の調整法

既報¹⁾に従って得た抽出液をアセトニトリルで100 ml の定容とし、その50 ml は既報に従って操作し HPLC 用の試験溶液とした。残りの50 ml は既報の Method II に従って操作し、GC 用の試験溶液とした。以上の分析操作法の概略並びに既報¹⁾との関係を Scheme 1 に示した。

*1 横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター

*2 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

To whom correspondence should be addressed: Yasuhide Tonogai; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: tonogai@nihs.go.jp



Scheme 1. Outline for multiresidue analysis of pesticides in agricultural products by HPLC and GC

2) 定性・定量

各試験溶液 $20\mu\text{l}$ をHPLCに、また $2\mu\text{l}$ をGCに注入し、ピークの保持時間とピーク面積から農薬を定性・定量した。

3) 確認試験

試料からHPLCで検出され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 (Photo-D) 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GCで検出された農薬ピークについてはGC/MSで確認した。

5. HPLC 測定条件

既報¹⁾と同じ

6. GC 測定条件

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

カラム温度: 60°C (2 min) $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ -270°C (7 min)

注入口及び検出部温度: 270°C

7. GC/MS 測定条件

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

カラム温度: 60°C (2 min) $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ -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. GCによる親水性農薬の分析

カラムとして中極性のDB-1701を用い、検出器としてNPD及びFPDを使用し、昇温により6種農薬の一斉分析を行った。オキサミルはGC-NPDにのみ分解物が検出された。その他については両検出器で良好に検出され、GC-FPDの方が約1.5倍高感度に測定できた。

アセトニトリル/食塩水分配法では親水性農薬をいかに高収率でアセトニトリル層に残すかが問題となる。既報¹⁾ではアルカリ性の飽和リン酸水素二ナトリウムを用いることにより、青果物の色素等を水層へ除去し良好な結果を得た。本報の対象農薬についても水層に飽和リン酸水素二ナトリウムを用いた場合とCFA原法²⁾の1Mリン酸緩衝液 (pH 7) を使用した場合の抽出率の比較を行った。なお使用食塩量はそれぞれ5gと15gで比較し、それらの結果をTable 1に示した。

DDVP, メタミドホス, アセフェートの回収率はおおよそ40-60%程度と低く、他の3種は良好に回収された (DDVPの低回収率は濃縮時の損失によると考えられた)。いずれの場合についても6種農薬の抽出率に大差は認めら

Table 1. Recoveries of pesticide standard by partition between CH₃CN /NaCl solution

Pesticide*	Recovery ± SD (%), n = 3				
	1M Phosphate buffer		^{sat} Na ₂ HPO ₄ solution		
	NaCl	5g	15g	5g	15g
DDVP		53.6 ± 19.5	47.3 ± 15.8	37.2 ± 14.9	39.0 ± 18.0
Methamidophos		44.6 ± 11.6	41.6 ± 9.1	44.8 ± 10.3	42.6 ± 12.0
Acephate		56.7 ± 13.0	49.6 ± 10.9	55.9 ± 11.2	56.6 ± 14.4
Monocrotophos		93.2 ± 6.4	94.4 ± 8.0	94.0 ± 5.5	91.8 ± 6.9
Dimethoate		90.5 ± 5.7	89.1 ± 7.2	91.9 ± 8.0	92.9 ± 6.3
Oxamyl		80.0 ± 10.2	82.5 ± 11.5	85.8 ± 9.8	92.4 ± 10.5

*Two μl of each pesticide was added to 10 ml of 1M phosphate buffer (pH 7) or ^{sat}Na₂HPO₄ solution (pH 8) + NaCl 5 or 15 g, and shaken with 50 ml of CH₃CN.

れなかったので、分析操作を統一するため本操作は既報¹⁾と同様にすることとした。

GC 法においては HPLC 法に比して食品成分由来の妨害の影響が少ないので、クリーンアップには Bond Elut^R SAX + PSA を用い、50 % A/H の一分溶出で十分であった。本法を用いて 6 種農薬のいちご、トマト、バナナ (以上 0.2 ppm 添加)、オレンジ (0.5 ppm 添加) からの添加回収率を測定したところ、Table 1 における標準系と類似の値が得られ、ガスクロマトグラム上における妨害の影響もほとんど認められなかった。

2. GC による農薬の検出例

本法により輸入青果物のうちタイ産オクラからジメトエート 0.14 ppm 及びメタミドホス 0.01 ppm を、また韓国産いちごから DDVP 0.03 ppm を検出したので、その GC-NPD 及び FPD によるガスクロマトグラムを Fig. 1, 2 に示した。ジメトエート及びメタミドホスについては GC/MS でマススペクトル (MS) を測定できたが、DDVP については濃度が低いため MS は測定できず、選択イオン検出 (SIM) 法で確認した。

3. HPLC による農薬の検出例とその確認法

輸入青果物について既報¹⁾の HPLC 法による農薬の検出例とその確認法について検討した。レモン、オレンジ、グレープフルーツ、バナナについての結果を Table 2 に示した。柑橘類からは OPP, TBZ, イマザリル、クロルピリホスを、バナナからはピテルタノール、イプロジオンを検出した。いずれも最大残留基準値 (MRL) 以下であった。

Table 2 の検体について、HPLC で検出された農薬ピークを Photo-D, GC (FPD, NPD) 及び GC/MS (SIM) で確認した結果を Table 3 に示した。

Photo-D による確認においてイマザリル、イプロジオン、ピテルタノールは UV 域に特徴的な極大吸収を持たないので、確認手段にはならなかった。また OPP の UV 吸収は弱く、クロルピリホスも 0.01 ppm 程度では Photo-D での確認は困難なことが多かった。GC-NPD によるイプロジオン、ピテルタノールの感度は低いので本検体についての確認はできなかった。

結 語

HPLC 及び GC を用いた青果物中残留農薬の一斉分析法を作製し、本法を輸入野菜・果実に適用して、検出されたピークの確認法の検討を行った。

従来の通知法²⁾では親水性農薬をも回収するためケイ素土カラムを用いたりする必要があったが、本法ではアセトニトリル抽出/食塩水分配法を採用して操作を簡易にできた。ただし、本法によるアセフェート、メタミドホス、DDVP の回収率は約 40-60% 程度なので、検出された場合の値にはその点を考慮する必要がある。

また、UV 及び FL 同時検出 HPLC 法並びに GC 及び GC/MS 法を併用することにより、検出ピークの確認をより容易にした。ただし、イマザリル、ピテルタノール、イプロジオン等は UV 域に特徴的な極大吸収を持たないため Photo-D が決め手とならず、将来的には高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) の導入が必要と考えられた。

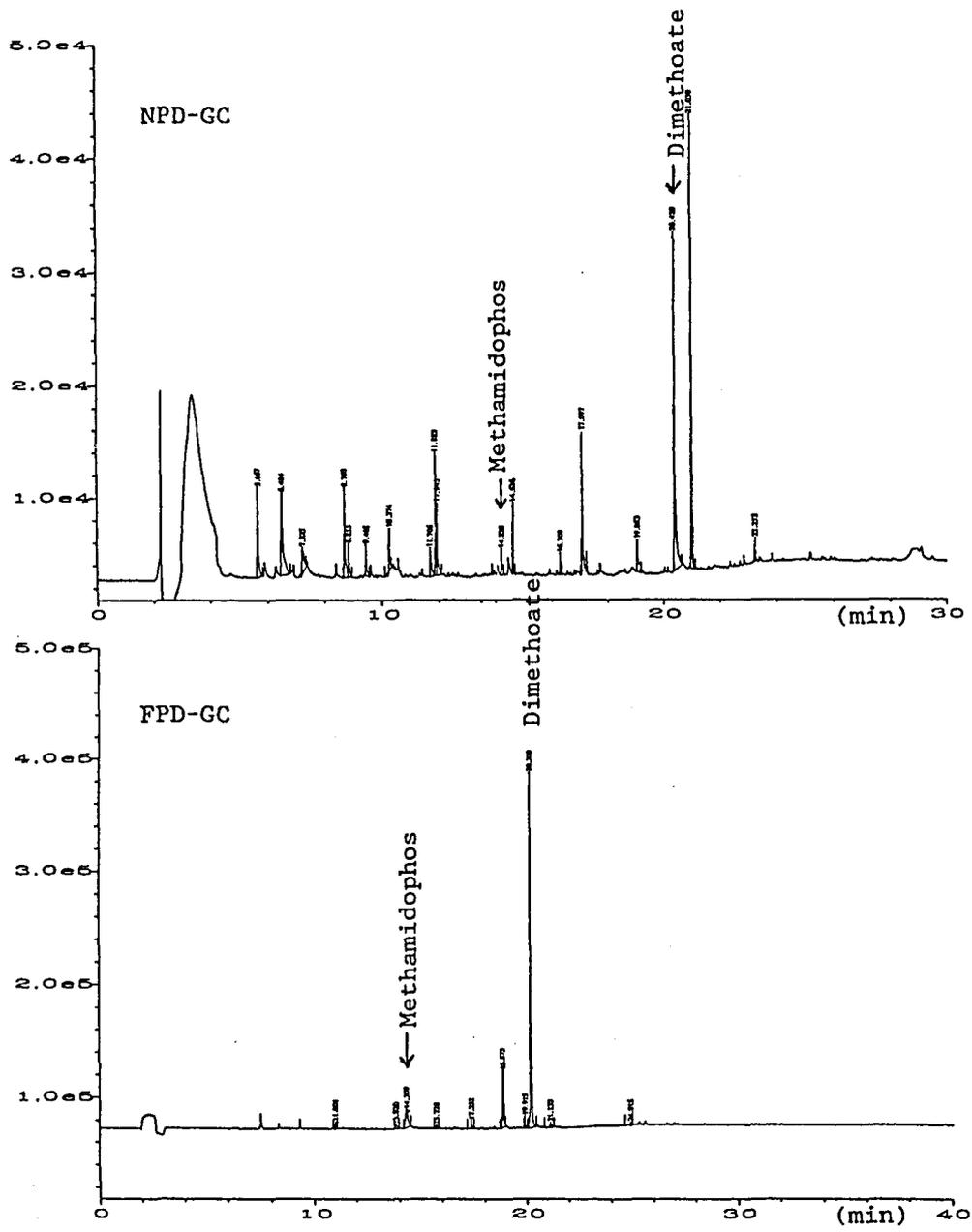


Fig. 1. Gas chromatograms for methamidophos and dimethate in okra extract by NPD and FPD-GC

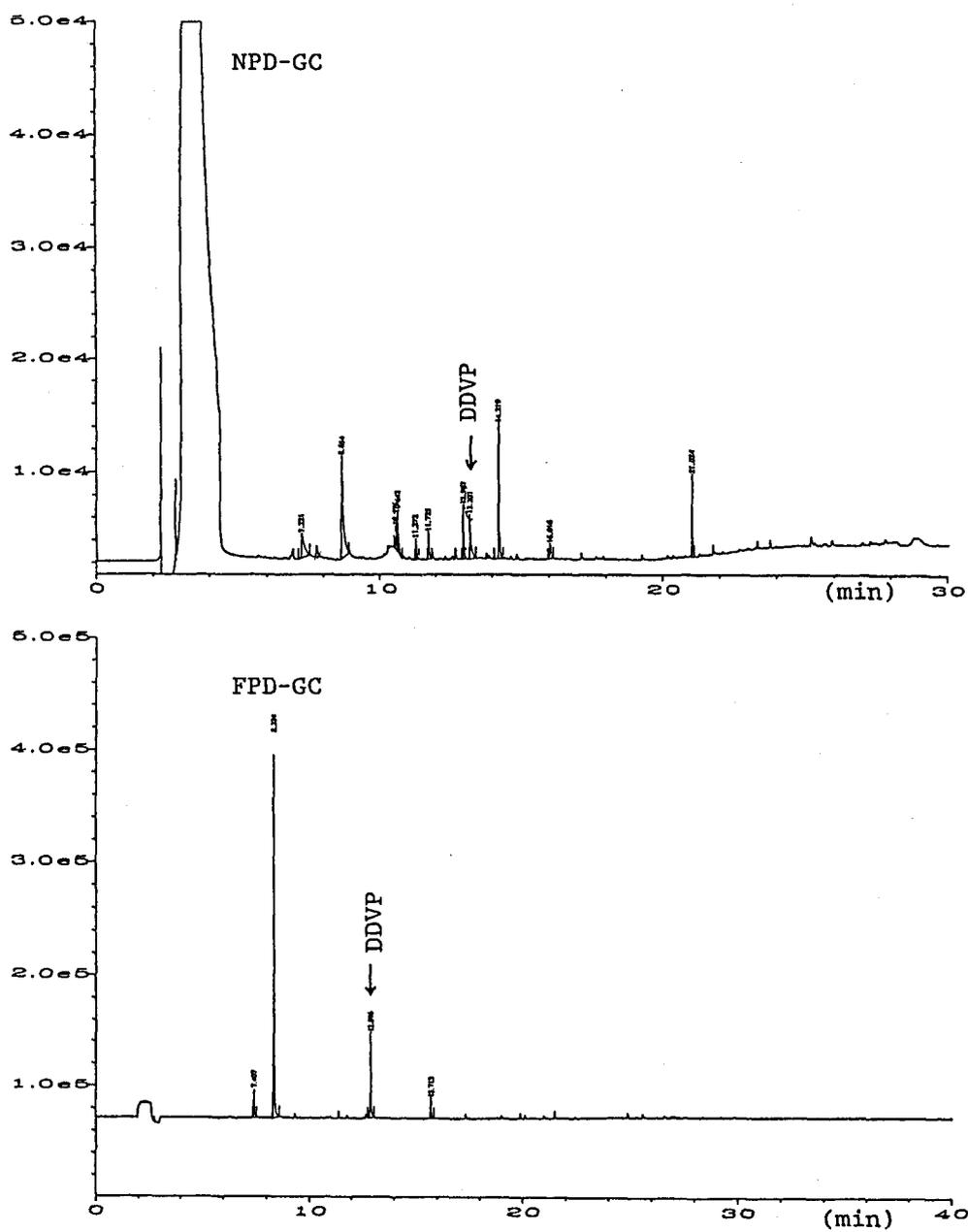


Fig. 2. Gas chromatograms for DDVP in strawberry extract by NPD and FPD-GC

Table 2. Pesticide residues detected in imported fruits

No.	Sample	Country	Pesticide	Detected (ppm)	MRL (ppm)
1	Lemon A	U.S.A.	Chlorpyrifos	0.01	0.3
			Imazalil	1.02	5
2	Lemon B	U.S.A.	OPP	0.87	10
			TBZ	0.46	10
			Imazalil	0.36	5
3	Orange A	U.S.A.	Chlorpyrifos	0.01	0.3
			TBZ	0.42	10
			Imazalil	0.90	5
4	Orange B	U.S.A.	Chlorpyrifos	0.01	0.3
			OPP	0.38	10
			Imazalil	0.84	5
5	Grapefruit A	U.S.A.	Chlorpyrifos	0.01	0.3
			TBZ	0.30	10
6	Grapefruit B	Israel	Chlorpyrifos	0.01	0.3
7	Banana	Philippine	Bitertanol	0.49	0.5
			Iprodione	0.75	10

Table 3. A list of pesticides detected by HPLC and confirmed by photo-D*, GC (FPD, NPD) and GC/MS (SIM)

Method	Pesticide in Table 2
UV-HPLC	OPP, TBZ, Imazalil, Chlorpyrifos, Iprodion
FL-HPLC	OPP, TBZ, Bitertanol
Photo-D	OPP, TBZ, Chlorpyrifos
GC-FPD	Chlorpyrifos
GC-NPD	TBZ, Imazalil, Chlorpyrifos
GC/MS(SIM)	OPP, TBZ, Imazalil, Chlorpyrifos, Iprodion, Bitertanol

* photo-D: photodiode-array detector

文 献

- 1) 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: 食衛誌, **39**, 13-25 (1998)
- 2) Lee, S. M., Papathakis, M. L., Feng, H. C., Hunter, G. F., Carr, J. E., Fresenius, J.: Anal. Chem., **339**, 376-383 (1991)
- 3) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究, **47**(5), 27-41 (1997), **47**(6), 27-41 (1997)