

GPC (ゲル浸透クロマトグラフィー) 装置による 食品中の残留農薬分析法について ——有機塩素系農薬分析への応用——

山本 優 土佐林誠一 佐藤 稔 大内 格之
菊地由生子

要 旨

残留農薬分析の試料精製法として従来の吸着型クロマトグラフィー等とは原理の異なる分子サイズの差を利用した GPC による精製法を有機塩素系農薬を対象として検討した。

GPC における有機塩素系農薬と色素等定量妨害物質との分離の状況を UV 検出器を用いて検討したところ、それぞれの溶出位置は異なり妨害物質は分離除去されることが確認された。

さらに色素含量の多い野菜等を用いて GPC 処理を行い、GC 分析に供したところ、妨害なく測定が可能であり試料精製手段として十分、実用可能であった。

GPC は再生操作なしで連続使用が可能なことから液体クロマトグラフィー装置、オートフラクションコレクター等を組み合わせることにより、操作が自動化され従来法に比べ分析時間が大幅に短縮された。

さらに GPC は有機塩素系以外の農薬にも応用が可能なことから、多種類の農薬の試料精製を同時一斉に行うことが可能となり、残留農薬分析の大幅な省力化が期待できる。

1. 緒 言

近年食品中の残留農薬に対する関心は輸入農産物におけるポストハーベスト農薬汚染等を契機として、全国的に高まっており、残留農薬分析に対する需要は急速に増大している。

しかしながら、現在の分析法は精度及び感度の点では十分な水準に達しているが、分析に多大の時間を要するため、迅速な食品衛生行政を遂行する上で支障をきたしている。

食品中の残留農薬分析を煩雑にし、律速要因となっているのは、複雑な物質組成を持つ食品から測定上妨害となる成分を除去し、目的の農薬成分を分離する試料精製操作である。

現行の一般的な試料精製法は油脂成分の除去法として液液分配法、また色素等については、フロリジル等による吸着型のカラムクロマトグラフィーによる精製法が多用されているが、これらの方法は精製能力も十分でなく極めて操作が煩雑であり、分析法の迅速化、省力化の最大の障害となっている。

近年、これら吸着型のカラムクロマトグラフィーとは、原理を異にし、分子サイズの差を利用して物質を

分離する GPC を試料の精製に用いる方法が報告されている¹⁾²⁾。

この方法の最大の特長は再生操作を必要とせず、繰り返しカラムの連続使用が可能なことから、液体クロマトグラフィー装置とオートフラクションコレクター及びオートインジェクターを組合せシステムとして一体化することにより、多数の試料の精製操作を自動化し残留農薬分析の大幅な省力化を可能とする点にある。

今回著者らは残留農薬分析の迅速化、省力化の一環として、ポストハーベスト農薬であるメトキシクロール、ジクロラン (CNA)、アレスリンを含めた 19 種類の有機塩素系農薬を対象とし、GPC による試料精製法について基礎的な検討を行った。

さらに、定量値の再現性の点でバックドカラムに劣るとされ、定量手段として問題のあったキャピラリーカラムについて内部標準法を導入することにより定量値の再現性の向上をはかり、19 種類の有機塩素系農薬のキャピラリー/GC による実用的な多成分定量分析法を検討したので併せて報告する。

2. 方 法

2-1 器具及び装置

2-1-1 GPC装置

・GPCカラム

多孔性のスチレンジビニルベンゼン共重合体の粒子からなる Bio Beads SX-3 (200-300mesh, Bio-Rad Laboratories Inc) をシクロヘキサン・ジクロロメタン(1+1, V/V)混合溶媒で一夜膨潤させ、外径25mm, 内径20mm, 長さ500mmのステンレスカラムに充填した。

・送液ポンプ

島津 LC-10AS

・インジェクター

ローダイン 7125 型に 5ml のサンプルローディンググループを取り付けた。

・UV-検出器

島津 SPD-10A

・オートフラクションコレクター

島津 FRC-10A

・脱気装置

島津 DGU-2A

He ガスによる密閉バージ方式

上記装置を Fig 1 に示す通り組合せ、システムコントローラー(島津 SCL-10A)で集中制御した。

・GPC装置操作条件

試料の注入は 3ml のガラスシリンジを用い、インジェクターに 2ml 注入した。

移動相の溶媒組成は石井等の方法¹⁾に準じシクロヘキサン・ジクロロメタン (1+1, V/V) とし、He ガスにより脱気した。

流量は 5ml/min とし、オートフラクションコレクターで時間指定モードにより分画を行った。

2-1-2 ガスクロマトグラフ装置

島津 GC15A (ECD 検出器付き)

・データ処理装置

島津 C-R 4 A

・GC 操作条件

キャピラリーカラム DB-1701 (J&B 社製, 内径 0.321mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μ m)

カラム温度: 初期温度 100 $^{\circ}$ C (2 分), 25 $^{\circ}$ C/分で 200 $^{\circ}$ C まで昇温, 2 分間保持しさらに 3 $^{\circ}$ C/分で 260 $^{\circ}$ C まで昇温を行った。

検出器温度: 280 $^{\circ}$ C

注入口温度: 280 $^{\circ}$ C

注入量: 2 μ l

2-3 試 薬

分析に供した農薬は以下の 19 種類である。

α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, o, p'-DDT, p, p'-DDT, p, p'-DDD, p, p'-DDE, エンドリン, ディルドリン, アルドリン, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド, キャプタン, カプタホル, メトキシクロール, TPN, アレスリン, ジクロラン (CNA)

β -カロチン, クロロフィル溶液は和光純薬工業製

GPC 移動相に用いたジクロロメタン, シクロヘキサンは液体クロマトグラフィー用を使用した。

その他の溶媒, 試薬類は残農用を用いた。

2-4 実験操作

2-4-1 試料調製法

食品は均一化した後, 20g を採取しアセトン 100ml 30% 含水アセトン 50ml でホモジナイズ抽出した後, エバポレーターで溶媒を留去した。残留液に 10% 食塩水 100ml を加え, ジクロロメタン 50ml で 2 回抽出し, 有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで脱水後, 減圧濃縮し, 窒素気流中で乾固した後, GPC 移動相溶液 5

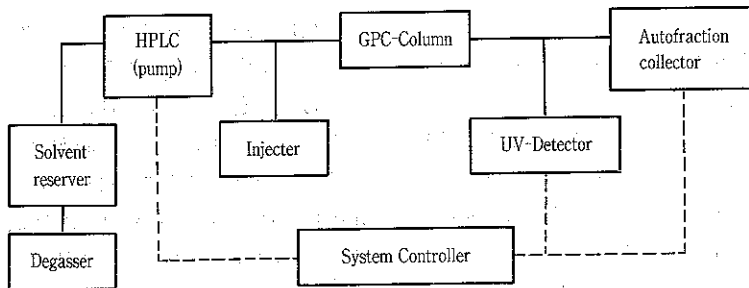


Fig. 1 Schematic of GPC clean up system

mlに溶解した。

β -カロチン、クロロフィルの標準品及びコーン油はGPC移動相溶液で20倍に希釈した。

2-4-2 UV検出器による溶出位置の確認

上記調製法により作成した、食品抽出液、コーン油溶液、 β -カロチン溶液、クロロフィル溶液及び農薬標準混合溶液(濃度:40ppm)をFig.1に示すGPC装置に2ml注入しUV-検出器によりクロマトグラムを求めた。

なお、測定波長は250nmとした。

2-4-3 実試料における添加回収試験

食品20gに各農薬(添加量はTable2に示す)を添加し、2-4-1に示す方法により処理した後2mlをGPC装置に注入した。

75ml~170mlの溶出画分を分取し、減圧濃縮後、窒素気流中で乾固し、n-ヘキサン2mlに溶解し、GC分析を行った。

3. 結果及び考察

3-1 GPCにおける農薬と色素等妨害成分の分離状況

食品中の残留農薬分析上、最も困難な操作は有機溶媒への溶解性等の点で農薬と同一の挙動を示す油脂及びクロロフィル、カロチノイド等の油溶性色素を農薬と分離し除去する操作である。

油脂についてはアセトニトリル/n-ヘキサン分配法が知られているが、この方法は煩雑であり油脂分の除去が完全ではなく、また農薬によっては分離が困難なものもある。

油溶性色素についてはフロリジル等の吸着型のカラ

ムクロマトグラフィーによる除去法が一般的であるが極性の高い農薬では油溶性色素との分離が困難であり、さらに活性炭によるカラムクロマトグラフィー等の操作を必要とする。

今回、試料調製に用いたGPCは吸着力ではなく分子サイズの差を利用して、親油性の混合物を分離し、分子サイズの大きい物質から先に溶出させることにより、分子量200~400の農薬と500以上の油脂成分及び油溶性色素を分離しようとする方法である。

最初に各物質のGPCからの溶出位置を確認するためにUV検出器を用いて、GPC装置によるクロマトグラフィーを行った。

測定波長は予め各物質について、UV吸収スペクトルを求めたところ、共通して250nm付近に吸収があったので250nmとした。

GPCに供試した試料の内訳は有機塩素系農薬19種類の混合溶液の他、植物中の油溶性色素の主成分であるクロロフィル、 β -カロチン、植物油脂としてコーン油さらに食品として色素含量の多いほうれんそう、かぼちゃ及び油脂分の多いごまの抽出物である。

この結果Fig.2(B), Fig.2(C), Fig.2(D)のクロマトグラムに示すように、分子量1,000付近のクロロフィルが50ml~75ml、コーン油では45ml~70ml、分子量500付近の β -カロチンは70ml~80mlとほぼ分子量の順に溶出した。

また、食品からの抽出物についてはFig.2(E); Fig.2(F), Fig.2(G)に示すように色素含量の多いほうれんそう、かぼちゃについてはクロロフィル、 β -カロチンの位置にごまについてはコーン油とほぼ同じ位置にピークが見られ、いずれも80mlまでに溶出するこ

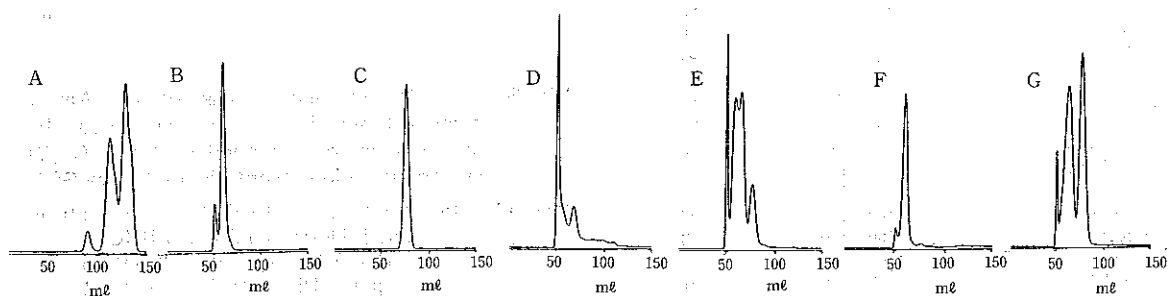


Fig. 2 GPC elution profile monitored by UV detector: (A) Mixed standard solution of 19 pesticides (40 ppm), (B) Corn oil, (C) β -carotene, (D) Chlorophyll (E) Spinash extract, (F) Sesame extract, (G) Pumpkin extract

とが確認された。

一方、分子量が200から400の範囲にある有機塩素系農薬の混合溶液は Fig 2 (A) に示すように90ml 付近にアレスリンが溶出するものその他の農薬はすべて、100ml~170ml の範囲に溶出した。

以上の通り農薬と食品の抽出物、色素及び油脂分のピークはGPCクロマトグラム上、重なることなく分離されており、GPCの分離手段としての有効性が確認された。

3-2 GPCによる各有機塩素系農薬の溶出位置

GPCによる各農薬の正確な溶出位置を把握するため、農薬標準混合溶液をGPC装置に注入後、10ml 毎の溶出画分を分取し、ECD/GCで画分毎に各農薬を定量し各農薬の溶出位置を求めた。

Table 1に示すように、最も速く溶出するのはアレスリンで80ml~110ml、最も遅く溶出するのは β -BHC、 δ -BHCで140ml~170mlであり、アレスリンを除く18種類の農薬は100ml~170mlの範囲に溶出した。

以上の結果からアレスリンを分析対象としない場合は95ml~170ml、分析対象とするときは80ml~170mlの溶出画分を分取すれば十分であることが明らかとなった。

また、この溶出画分(80ml~170ml)の各農薬の添加回収率はTable 1に示すように85%以上を示し、他の方法と同等でありまたフロリジル等の吸着型クロマ

Table 1 GPC elution profile of pesticides

Pesticide	Elution volume (ml)	Recovery (%)
α -BHC	110~140	85
γ -BHC	120~140	87
CNA	120~150	91
Heptachlor	110~130	86
Aldrin	100~120	89
TPN	120~140	94
β -BHC	140~170	80
δ -BHC	140~170	81
Heptachlor epoxide	100~120	89
Allethrin	80~110	92
p,p'-DDE	110~120	98
Dieldrin	110~130	97
Captan	100~130	92
Endrin	100~130	93
o,p'-DDT	100~120	87
p,p'-DDD	110~140	91
p,p'-DDT	100~130	96
Methoxychlor	100~130	98
Captahol	100~130	97

(n=3)

トグラフィーと異なり、一部農薬の充填剤への不可逆的な吸着は見られなかった。

3-3 GPCによる試料精製効果及び添加回収率

実試料におけるGPCの精製効果を検討するためほうれんそう、かぼちゃについて抽出操作を行いGPC装置に注入後、80mlから170mlまでを分取しECD/GCで分析を行った。

Fig 3 (A), Fig 3 (B), Fig 3 (C) はそれぞれ有機塩素系農薬18種類の標準溶液、GPC精製後のかぼちゃ及び有機塩素系農薬を添加したかぼちゃのECD/

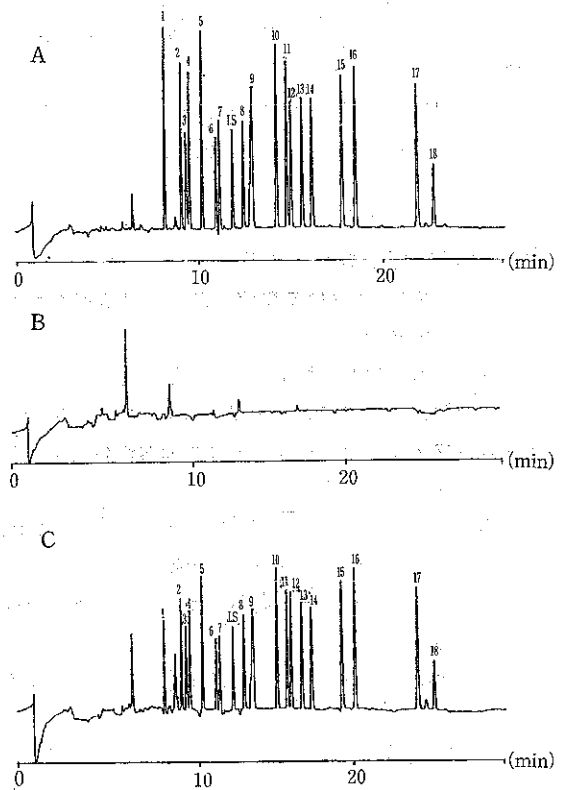


Fig. 3 ECD/GC chromatograms of (A) Mixed standard solution of 18 pesticides (B) pumpkin extract cleaned up by GPC (C) spiked pumpkin extract cleaned up by GPC

Peak identities: 1 α -BHC, 2 γ -BHC, 3 CNA, 4 Heptachlor, 5 Aldrin, 6 TPN, 7 β -BHC, 8 Heptachlor epoxide, 9 Allethrin, 10 p, p'-DDE, 11 Dieldrin, 12 Captan, 13 Endrin, 14 o, p'-DDT, 15 p, p'-DDD, 16 p, p'-DDT, 17 Methoxychlor, 18 Captahol, I.S (Internal Standard) δ -BHC

Table 2 Recoveries of pesticides added to crops

Pesticide	added ($\mu\text{g}/20\text{g}$)	recovery (%)	
		spinash	pumpkin
α -BHC	0.1	88	89
γ -BHC	0.1	86	81
CNA	1.0	82	89
Heptachlor	0.1	85	83
Aldrin	0.2	91	85
TPN	0.1	92	86
β -BHC	0.2	78	81
Heptachlor epoxide	0.2	92	89
Allethrin	1.0	89	86
p,p'-DDE	0.2	80	87
Dieldrin	0.2	82	85
Captan	0.1	81	86
Endrin	0.1	88	87
o,p'-DDT	0.3	93	87
p,p'-DDD	0.3	85	89
p,p'-DDT	0.5	82	81
Methoxychlor	1.0	89	87
Captahol	3.0	81	78

Mean of 3 determinations

GCクロマトグラムを示したものであるが、一部試料由来のピークはみられるが、測定上支障となるような農薬との重複ピークはなく十分な精製効果が得られた。

以上のように、GPCは他の検出器より高感度で妨害を受け易いECD検出器によるGC分析においても、従来の煩雑で時間を要するフロリジル等の吸着型クロマトグラフィーの精製法と同程度の精製効果が極めて簡便に得られる精製手段であることが明らかとなった。

なお、添加回収率もTable 2に示すように、78%以上を示し他の精製法と同程度であった。

3-4 内部標準法によるキャピラリーカラムの定量精度の向上

従来キャピラリーカラムはその高分離能から、多成分分析に最適であるとされているが、定量値の再現性がパッキドカラムに劣り定量手段として問題があることから、今回内部標準法による定量値の再現性の向上を検討した。

内部標準物質としてはGC分析上測定対象農薬と類似した挙動を示し、また食品、環境中から検出されない物質が望ましいことから、こうした条件を満たす物質としてBHCの異性体の一種である δ -BHCを用いた。

Table 3は有機塩素系農薬18種類をGC分析 (n=

Table 3 Coefficients variation of uncorrected and corrected peak area in GC determination with capillary column

Pesticide	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CV (%) of peak area	
		uncorrected	corrected
δ -BHC(I.S)	0.04	8.2	
α -BHC	0.02	4.3	2.2
γ -BHC	0.02	5.3	1.9
CNA	0.2	4.9	1.6
Heptachlor	0.02	6.1	3.0
Aldrin	0.04	4.7	1.9
TPN	0.02	7.0	3.8
β -BHC	0.04	4.0	1.5
Heptachlor epoxide	0.02	9.0	2.1
Allethrin	0.2	7.8	4.1
p,p'-DDE	0.04	6.8	2.2
Dieldrin	0.04	5.2	3.1
Captan	0.2	7.5	3.1
Endrin	0.02	6.2	2.5
o,p'-DDT	0.06	7.1	3.9
p,p'-DDD	0.06	5.7	1.9
p,p'-DDT	0.1	9.5	2.3
Methoxychlor	0.2	8.9	3.6
Captahol	0.6	8.5	2.8

- 1) C.V (%): Coefficients variation of 8 determinations
- 2) Corrected peak area: peak area of pesticide/peak area of internal standard (δ -BHC)

8)した時の、内部標準法によるピーク面積の補正值及び非補正值の変動係数を示したものであるが、補正前に比較して補正後の変動係数は低下しており、パッキドカラムと同等の定量値の再現性が得られた。

この結果有機塩素系農薬18種類のキャピラリーカラムによる実用的な一斉定量分析が可能となり、GPCによる試料精製法の簡易化と合わせて大幅な農薬分析法の省力化が達成された。

4. 結 語

食品中の残留農薬分析における試料精製法として、GPCによる精製法を有機塩素系農薬19種類を対象として検討した。

この結果、本方法は従来の吸着型カラムクロマトグラフィー等の方法と同程度の精製効果を極めて簡便な操作により達成することが可能であった。

また、本方法は従来のフロリジル等のカラムクロマトグラフィーによる精製法と比較すると以下のような特長を有している。

<GPC>

- ① カラムは再生操作なしで連続使用が可能なることから自動化が可能となり、分析所要時間が大幅に

短縮される。

- ② 1種類の溶出液により多種類の農薬を同時に分離でき、またカラムへの不可逆的吸着も起こらず、多成分分析に最適である。
- ③ 油脂成分も同時に除去され、特別な脱脂操作を必要としない。

〈吸着型カラムクロマトグラフィー〉

- ① 試料毎にカラムを調製する必要があり、操作に時間を要した、連続使用ができない。
- ② 吸着剤の活性度はロットにより異なることから、使用毎に吸着活性度のチェックが必要である。
- ③ 吸着特性の異なる農薬を含む多成分分析の場合、数種の組成の異なる溶出液を用いた、数回のカラムクロマトグラフィー操作が必要である。
- ④ 農薬によっては、色素は分離されず、再度活性炭カラム等による精製が必要である。
- ⑤ イオン解離性農薬の場合カラムへの不可逆的吸着が起る等、適用範囲が限定される。
- ⑥ 油脂性食品の場合、アセトニトリル/n-ヘキサン分配等の脱脂操作が別途必要である。

本方法による精製法の最大のメリットは連続使用の可能なGPCカラムの特性を利用した、精製操作の自動化にある。

今回、GPC装置への注入は手動で行ったが、今後オートインジェクターの導入により夜間における無人自動運転も可能となり、分析時間の大幅な短縮が達成されることが考えられる。

また、今回は有機塩素系農薬についての検討であったが、他の農薬についても応用が可能であり現在農薬の種類毎に数系統に分けて、行っている精製操作を同時一斉に行うことも可能であり、この点でも大幅な省力化が期待されることからさらに研究を進める予定である。

5. 文 献

- 1) 石井康夫, 他: 日本農薬学会誌 15, 225-230, 1990.
- 2) Stephen J Chamberlain: Analyst, 115, 1161-1165, 1990

A Method of Analyzing Residual Pesticide in Foods
by Using Gel Permeation Chromatography (GPC)
— Application to Analysis of Organic Chloride Pesticide —

Masaru Yamamoto, Seiichi Tosabayashi, Minoru Sato,
Kakuyuki Ouchi and Yuko Kikuchi

ABSTRACT

A sample purification method of analyzing residual pesticide by using Gel Permeation Chromatography (GPC) was studied on organic chloride pesticide. The principle of GPC is different from conventional methods such as adsorption chromatography, as it utilizes the difference in molecular size.

When we studied, by using UV detector, how the organic chloride pesticide and interfering material of pigment quantity etc., were separated by GPC, it was confirmed that each elution site was different and that interfering material was separated and removed.

Moreover, when pigment-rich vegetables were used and treated by using GPC and also analyzed by GC, it was possible to quantify, without interference, residual pesticides, and it was found that this method is sufficiently practicable as a sample purification method.

As GPC could be used consecutively without the need for regenerative operation, by combining the liquid chromatography and the auto-fraction collector etc., operation was automated and consequently the analysis time was substantially reduced as compared with the conventional methods.

Furthermore, since GPC can be applied to pesticides other than organic chloride pesticides, the concurrent purification of various kinds of pesticides is possible and hence, substantial labor saving in terms of analysis work can be expected.