

原著論文

アセトニトリル/水抽出-固相抽出管精製による残留農薬の簡易分析法

中川礼子

日常的に使用しうる農薬の一斉分析法として，アセトニトリル/水抽出-固相抽出管精製による残留農薬の簡易分析法を検討した．検討した対象農薬は塩素系16種，リン系20種及び窒素系13種の計49種であり，添加回収実験は対象農作物にイチゴ，カボチャ，玄米を用い， $n=5$ で実施した．塩素系農薬のクロロタロニル，リン系農薬のジクロルボス，エトリムホス，フェンチオン，窒素系農薬のカルバリル，フェナリモールについては，農作物によって回収率が食品中残留農薬一斉分析法の標準的目安である70-120%をはずれる場合もあったが，その他は概ね良好な結果を得た．本法を用いた野菜，果実及び玄米の35検体についての調査結果では，1農薬でも検出された農作物は35検体中9検体（果実2，野菜3，玄米4），2農薬以上は3検体（各1検体）であった．本法は，1人1.5日（10-12時間）で8検体の前処理，測定及び解析が可能であり，迅速化という観点から，優れた一斉分析法である．

〔キーワード：残留農薬，一斉分析，迅速分析，GC/MS〕

1 はじめに

2000年4月から食品衛生法で農薬残留基準が設定される農薬は199となった．収取検体の検査現場での農薬分析業務は多成分微量分析であり，迅速性及びそのデータの信頼性確保は重要課題である．今日，残留農薬分析は多成分一斉分析法を用いてスクリーニングすることが世界的標準手法である．我が国では，公定法として，1997年にゲルパーミエーション（GPC）による一斉分析法が採用されている¹⁾．この方法は，試料の粗抽出物から脂質や色素をGPCで除去する方法であり，その後固相抽出管で精製をする必要がある．全体としてGPCでは比較的多量の溶媒を使用するため，環境への配慮から今後，省溶媒化への移行が求められる．このような背景のもとに，1999年厚生省は，公定法と同等の分析法であれば，検査への採用を公式に認める旨の通達²⁾をした．1995年にFillionら³⁾は，アセトニトリルで抽出し，チャーコール/セライト（1：4）2gを充填したミニカラムを用いて精製後，GC/MSで測定し，良好な結果を得ている．当所で実施している残留農薬分析法（一斉分析法）⁴⁾は，Fillionらの方法の中のミニカラムを市販されているスペルコ社製 ENVI-Carb/LC-NH₂に変えたものである．ここでは，本法の妥当性の検証についてこれまで得られている結果と実際の応用例を示す．

2・1 試料及び試薬

2・1・1 対象試料

対象試料は，農作物のイチゴ（9），ブドウ（4），ミカン（1），モモ（1）の果実4種15検体，ナス（8），キャベツ（1），タマネギ（1），ニンジン（1），キュウリ（2），白瓜（1），カボチャ（1）の野菜7種15検体及び玄米5検体の計35検体であった．

2・1・2 対象農薬

農薬標準品は表1に示す塩素系農薬16種，リン系農薬20種及び窒素系農薬13種であり，和光純薬及び林純薬社製を用いた．

農薬混合標準液：塩素系農薬，リン系農薬及び窒素系農薬をそれぞれアセトンに溶解し，3種の混合標準原液（濃度は10 μ g/mL）を調製した．

2・1・3 試薬

アセトニトリル，トルエン，アセトン及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を，また，塩化ナトリウムは特級を用いた．固相抽出管はスペルコ社製 ENVI-Carb LC-NH₂ 6mL Tube（500mg/500mg），ろ紙はアドバンテック（株）製シリカ繊維ろ紙 QR200を用いた．内標準として用いた500ng/mLのトリフェニレン・アセトン溶液は東京化成社製トリフェニレンをアセトンに溶解して調製した．

2 実験方法

2・2 装置

2・2・1 ガスクロマトグラフ/質量分析計 (EI)

ガスクロマトグラフはヒューレットパッカード社製 6890 シリーズ、質量分析計は同社製 5973 シリーズを使用した。測定条件は以下の通りである。

カラム：SGE 社製 BPX5，0.22mm × 25m，膜厚 0.25 μm；測定モード：SIM；カラム温度：50（2 min） - 30 /min - 170（4 min） - 10 /min - 280（15 min）；He 流量：1.1 mL/min；注入温度：210；インターフェース温度：280；注入モード：スプリットレス；注入量：2 μL。

2・3 分析操作

2・3・1 試験溶液の調製

均一化試料 20g（玄米の場合は 10g）にアセトニトリル/水（80：20）100mL を加え、ポリトロンでホモジナイズした。それを吸引ろ過し、ろ液をリン酸緩衝液（pH 7.0）2 mL 及び塩化ナトリウム 15g が予め入った分液漏斗に移し、5 分間振とうした。静置後、試料 5 g 相当のアセトニトリル相 20mL（玄米の場合は 40mL）をナス型フラスコにとり、35 で減圧濃縮した。以下減圧濃縮はすべて乾固させないように行った。残さを酢酸エチル 20mL に溶解し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、その洗液（20mL の酢酸エチル）とともに合わせ、減圧濃縮した。残さは緩やかな窒素気流下で乾燥させ、アセトニトリル/トルエン（3：1）2 mL に溶解したのち、予め同液でコンディショニングした ENVI-Carb/LC-NH₂ に負荷した。さらに同液 18mL で少しずつナス型フラスコを洗い、先のミニカラムに負荷した。溶出液をナス型フラスコに集め、減圧濃縮後窒素気流下で濃縮した。内標準トリフェニレン 500ng/mL アセトン溶液 1 mL を加え、残さを超音波で溶解した。これを試験管に移し、GC/MS 試験液とした。

2・3・2 検量線用標準液の調製

別途調製済み農薬不検出の試験溶液を用いて、0.05 - 1.0 μg/mL の混合標準溶液（内標準添加済み）を調製した。

3 結果と考察

3・1 試験法の妥当性の検証

塩素系農薬、リン系農薬及び窒素系農薬混合標準液（10 μg/mL）を、実験方法で示した試験溶液と同様に調製した玄米抽出液（内標準添加の試験液）に添加して 1 μg/mL 溶液を作成し、最後に内標準を 500ng/mL になるように添加した。*p,p'*-DDD 及び *o,p'*-DDT 以外の農薬についてはクロマトグラム上での分離は良好であった（図 1）。*p,p'*-DDD 及び *o,p'*-DDT は本一斉分析法では混合

物（1：1）として取り扱った。各農薬とも検量線は 0.05 μg/mL（*p,p'*-DDD 及び *o,p'*-DDT は混合物（1：1）として 0.05 μg/mL） - 1.0 μg/mL で良好な一次回帰直線を示したことから、0.05 μg/mL 未満（*p,p'*-DDD 及び *o,p'*-DDT は混合物（1：1）として 0.05 μg/mL 未満）を不検出とした。従って、試験溶液は実験方法の 2・3・1 により農作物を処理して調製するので、0.01 μg/g が検出下限値となる。

次に、均一化した農作物試料（イチゴ、カボチャ、玄米、各 *n* = 5）20g に各農薬が 0.2 μg/g になるように添加し、実験方法の 2・3・1 により、試験液を調製し、GC/MS で測定した。表 2 にその添加回収試験の結果を示した。なお、カボチャにはマラチオンが既に残留していたため、カボチャでの本農薬の回収試験結果は採用しなかった。塩素系農薬では、クロロタロニル（イチゴ 66.5%，玄米 152.8%）、リン系農薬ではジクロロポス（イチゴ 30.1%）、エトリムホス（イチゴ 52.7%）、フェンチオン（イチゴ 1.7%，カボチャ 4.6%，玄米 4.7%）、窒素系農薬ではカルバリル（玄米 68.5%）、フェナリモル（イチゴ 53.5%，玄米 55.1%）と、一部の農薬に回収率を上げるための検討の余地が残されているものの、その他の農薬については総じて、一斉分析法で回収が一般に良好とされる 70 - 120%¹⁾ の回収率を示し、相対標準偏差は 7.8 - 10.7% であった。

従来の公定法である GPC 法は、GPC 単独の精製能が劣り、特に玄米においては直後の GC/MS 分析は困難である。この主たる理由は、玄米に含まれる脂肪酸が農薬の画分に溶出することによって考えられており、このため、シリカゲルやフロリジルを用いたカラムクロマトグラフィー又はそれらのミニカラムによる再精製が不可欠である。この再精製の際に、塩素系、リン系及び窒素系農薬は、それぞれの溶出条件が異なるため、溶出操作が煩雑となる。したがって、処理に要する人手や時間、さらにガラス器具をその分多く必要とし、迅速性・経済性を欠いた前処理法となる。本法では果実、野菜、穀物（玄米）のすべての農産物に対して 1 農作物 1 GC/MS 試料であり、測定は GC/MS の 3 種類のプログラムによる SIM 測定を自動注入装置を用いて行う。GC/MS 分析は夜間機器の自動運転により行うので、一人が 8 件の分析に要する実際の所要時間は前処理（8 時間）と翌日の GC/MS 解析（2 - 4 時間）の約 10 - 12 時間である。また、本実験において、試料中のマトリックス効果を排除するために、果実（イチゴ）、野菜（カボチャ）、穀物（玄米）の抽出液を用いて標準液を調製した。本法の妥当性は、大部分の農薬（91%）での平均回収率が 70 - 120% で、相対標準偏差が 10% 以内であったことから検

証された。

3・2 実試料の農薬調査

野菜、果実及び穀類の計35検体分析した中で、ディルドリン（白瓜0.02μg/g）プロシミドン（ナス0.55μg/g、イチゴ0.11μg/g）、マラチオン（カボチャ0.18μg/g、玄米0.02-0.03μg/g）、フルトラニル（玄米0.05μg/g）、フェナリモル（イチゴ0.02μg/g）、ピテルタノール（イチゴ0.04μg/g）等を検出した。これらは、GC/MSでSCANモードにより再測定を行い、試料から検出された農薬と推定されるピークのマススペクトルを当該農薬標準品のそれと比較し、確認した（図2）。今回の調査で1農薬でも検出された農作物は35検体中9検体（果実2、野菜3、玄米4）、2農薬以上は3検体（各1）であった。

4 まとめ

塩素系農薬16種、リン系農薬20種及び窒素系農薬13種の計49種について、アセトニトリル/水（80：20）で抽出し、塩析後、乾燥、濃縮し、活性炭/アミノプロピルの積層固相抽出管（ENVI-Carb/ LC-NH₂ 6 mL Tube（500 mg/500mg））でクリーンアップを行い、GC/MSで測定する一斉分析法の妥当性を検証した。その結果、以下の結論が得られた。

1）検討した大部分の農薬について、平均回収率70 - 120%、その相対標準偏差10%以内で良好な結果が得られた。

2）本法はGC/MSの自動分析を組み合わせることにより、一人で8件を、前処理に8時間、解析に2 - 4時間の実働時間で分析することが可能で、かつ使用する溶媒の量も少ないという利点がある。

これらのことを総合すると、本法は環境負荷が少ない農薬の迅速一斉分析法として、これまで報告された方法の中でも、最もルーチン分析に適した方法である。

文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知：残留農薬迅速分析法の利用について、平成9年4月8日、衛化第43号,1997。
- 2) “食品・添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成11年10月1日，厚生省告示第216号,1999。
- 3) Fillion, J., Hindle, R., Lacroix, M., Selwyn, J. : Multiresidue determination of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection. J. AOAC Int. 781,252-1,266,1995.
- 4) Task group on analytical methods for multiresidue pesticides in crops, Nakagawa, R., and Takeda, M. : Development of analytical methods for multiresidue pesticides in crops, 3rd European Pesticide Residue Workshop Proceeding p.103,2000.

Development of a simple screening method for residual pesticides in crops
using acetonitrile-water extraction and solid phase minicolumn cleanup

Reiko Nakagawa

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A simple screening method for residual pesticides in crops is described. Using this method, a high speed and precision analysis of 49 pesticides (8 crops per 1.5 days) can be achieved. Satisfactory pesticide recoveries from 70 to 120% (n=5) were obtained using strawberry, pumpkin and unpolished rice without several cases of DDVP, etrimphos, fenthion carbaryl and fenarimol. In the 2000 annual surveillance, the samples in which at least one pesticide was detected and those in which more than two pesticides were detected in a crop were 9 and 3 of 35 crops, respectively.

表1 各種農薬の保持時間及び測定イオン

塩素系農薬	保持時間 (分)	定量イオン (M/Z)	確認イオン (M/Z)
α-HCH	11.18	181.0	219.0
β-HCH	12.14	181.0	219.0
γ-HCH	12.20	181.0	219.0
Chlorothalonil	12.73	266.0	270.0
δ-HCH	13.15	181.0	219.0
Heptachlor	13.98	272.0	100.0
Aldrin	14.85	263.0	293.0
Heptachlorepoxide	15.80	353.0	263.0
p,p'-DDE	17.07	246.0	318.0
Dieldrin	17.21	263.0	277.0
Chlorbenzilate	17.74	251.0	139.0
Endrin	17.67	263.0	243.0
p,p'-DDD + o,p'-DDT	17.98	235.0	165.0
p,p'-DDT	18.71	235.0	165.0
Fenvalerate 1	23.94	167.0	225.0
Fenvalerate 2	24.15	167.0	225.0

表2 各種農薬の添加回収実験結果

塩素系農薬	イチゴ		カボチャ		玄米	
	a	b	a	b	a	b
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
α-HCH	73.5	8.8	92.5	9.0	120.1	8.2
β-HCH	84.0	8.9	96.8	8.8	106.7	8.2
γ-HCH	82.2	8.9	95.1	8.9	116.2	8.2
Chlorothalonil	66.5	9.2	72.3	10.4	152.8	9.8
δ-HCH	85.0	8.8	95.6	8.8	100.1	8.3
Heptachlor	79.8	8.8	97.8	8.9	118.0	8.2
Aldrin	77.2	8.8	94.1	8.9	109.9	8.2
Heptachlorepoxide	80.4	8.8	95.2	8.8	103.5	8.1
p,p'-DDE	80.1	8.7	96.2	8.7	95.6	8.2
Dieldrin	80.7	8.8	94.3	8.7	100.8	8.3
Chlorbenzilate	78.1	9.8	95.5	8.7	102.8	8.1
Endrin	77.7	8.7	95.1	8.8	99.7	8.1
p,p'-DDD + o,p'-DDT	79.9	8.7	95.5	8.7	96.8	8.1
p,p'-DDT	81.3	8.7	95.6	8.8	101.3	8.0
Fenvalerate(1+2)	90.9	8.7	99.5	8.8	80.3	7.8

リン系農薬	保持時間 (分)	定量イオン (M/Z)	確認イオン (M/Z)
Dichlofos	6.1	109.0	220.0
Etoprofos	9.9	158.0	242.0
Dimethoate	11.6	87.0	125.0
Daiazinon	12.3	179.0	199.0
Etrimfos	12.8	292.0	181.0
Chlorpyrifos-methyl	13.7	286.0	125.0
Tolchlofos-methyl	13.9	252.0	175.0
Fenitrothion	14.5	125.0	260.0
Pilimifos-methyl	14.3	290.0	305.0
Malathion	14.6	173.0	125.0
Chlorpyrifos	14.8	199.0	286.0
Fenthion	15.0	169.0	153.0
Fenthioate	15.8	274.0	246.0
Quinalfos	16.0	146.0	298.0
Prothiofos	16.9	267.0	239.0
Fensulfothion	17.9	293.0	141.0
Parathion	18.1	291.0	139.0
Edifenfos	18.6	201.0	218.0
EPN	19.7	157.0	169.0
Phosalon	20.3	182.0	125.0

リン系農薬	イチゴ		カボチャ		玄米	
	a	b	a	b	a	b
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Dichlofos	30.1	9.1	79.1	11.1	108.2	8.9
Etoprofos	97.4	8.8	95.8	8.9	92.8	8.9
Dimethoate	82.8	8.8	110.2	8.8	86.6	9.3
Daiazinon	71.2	8.8	98.5	8.9	88.1	9.1
Etrimfos	52.7	8.6	102.0	8.9	92.2	9.0
Chlorpyrifos-methyl	95.1	8.8	103.0	8.8	93.1	8.9
Tolchlofos-methyl	96.1	8.8	97.8	8.9	95.2	8.9
Fenitrothion	82.4	8.7	107.9	9.2	82.1	8.8
Pilimifos-methyl	88.1	8.8	97.3	8.8	85.5	9.1
Malathion	94.8	8.8	—	—	88.7	8.9
Chlorpyrifos	96.1	8.8	98.5	8.8	88.4	8.9
Fenthion	1.7	10.7	4.6	18.8	4.7	20.5
Parathion	98.7	8.7	124.9	8.8	98.0	8.9
Fenthioate	92.2	8.8	109.4	8.8	95.5	8.9
Quinalfos	87.6	8.7	99.8	8.8	88.9	9.0
Prothiofos	99.5	8.8	97.5	8.8	86.8	8.8
Fensulfothion	90.9	8.8	146.3	8.8	87.7	9.2
Edifenfos	88.2	8.7	101.0	8.8	88.1	8.4
EPN	89.3	8.7	121.6	8.8	89.6	8.8
Phosalon	95.6	8.7	111.7	8.7	89.6	8.9

窒素系農薬	保持時間 (分)	定量イオン (M/Z)	確認イオン (M/Z)
Metolcarb	7.7	108.0	165.0
Isoprocarb	8.4	121.0	136.0
Chlorpropham	10.3	213.0	171.0
Bendiocarb	10.6	151.0	166.0
Carbaryl	14.1	144.0	201.0
Thiobencarb	14.9	257.0	173.0
Procimidone	16.0	283.0	255.0
Pendimethalin	16.7	252.0	281.0
Flutouranil	16.8	173.0	281.0
Mepronil	18.2	119.0	269.0
Mefenacet	20.6	192.0	298.0
Fenarimol	20.9	219.0	251.0
Bitertanol 1	21.4	170.0	141.0
Bitertanol 2	21.5	170.0	141.0

窒素系農薬	イチゴ		カボチャ		玄米	
	a	b	a	b	a	b
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Metolcarb	95.8	8.8	99.6	9.1	85.6	9.9
Isoprocarb	99.2	8.9	97.3	9.0	83.8	10.0
Chlorpropham	101.3	8.8	100.7	8.9	85.0	10.0
Bendiocarb	101.5	8.8	99.6	8.9	73.4	9.9
Carbaryl	98.3	8.8	96.8	8.8	68.5	9.6
Thiobencarb	96.6	8.8	96.8	8.8	82.0	10.0
Procimidone	102.1	8.8	98.4	8.8	80.8	9.9
Pendimethalin	120.7	8.8	114.7	9.0	81.7	10.1
Flutouranil	104.3	8.8	100.0	8.8	81.7	9.9
Mepronil	103.7	8.7	104.4	8.8	86.0	10.7
Mefenacet	98.5	8.7	103.6	9.1	76.3	9.8
Fenarimol	53.5	8.5	91.3	9.7	55.1	10.6
Bitertanol(1+2)	99.1	9.1	104.8	9.1	80.4	10.0

a:n=5での平均回収率を示す。

b:RSDは相対標準偏差を示す。

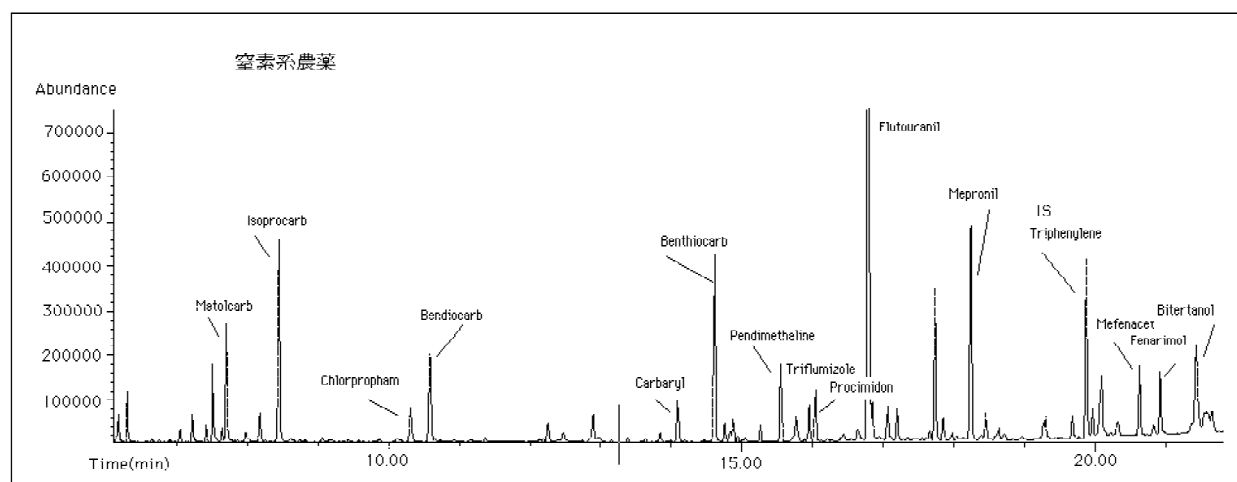
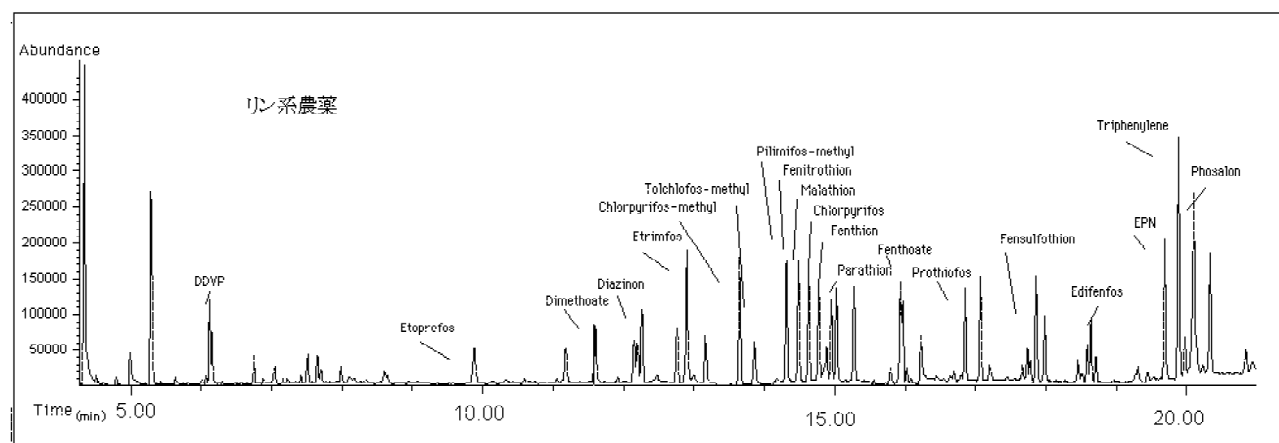
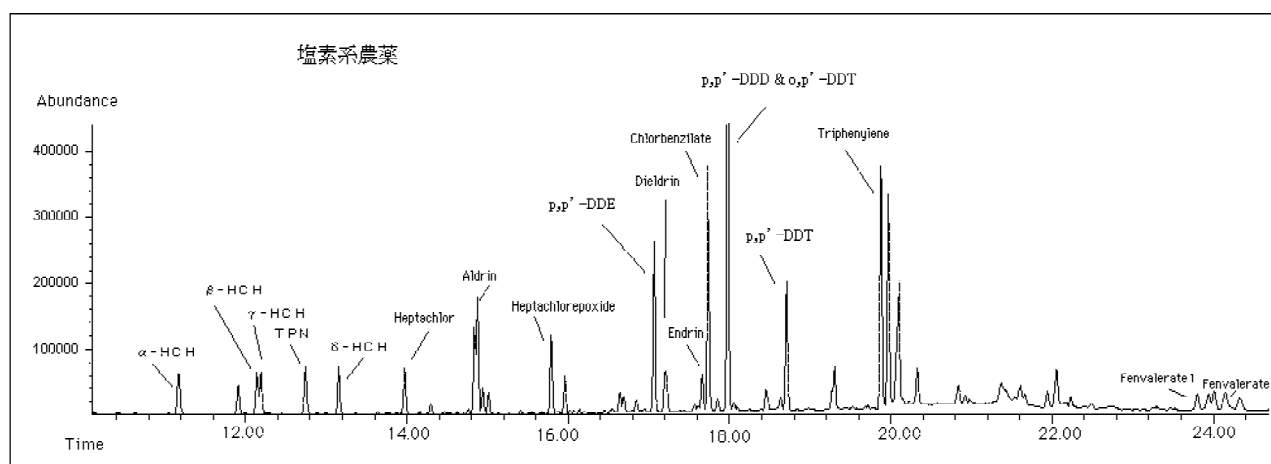
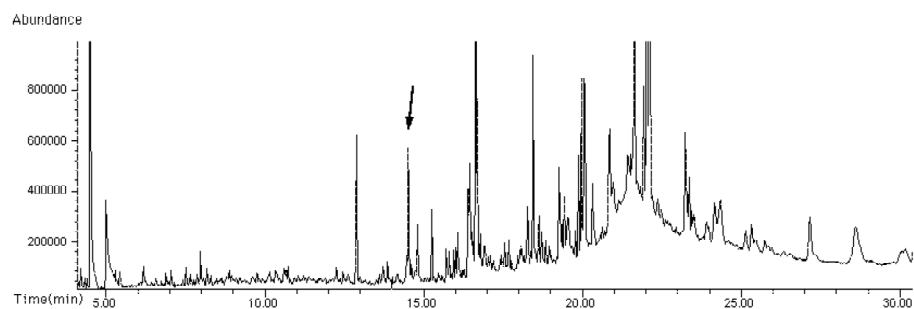
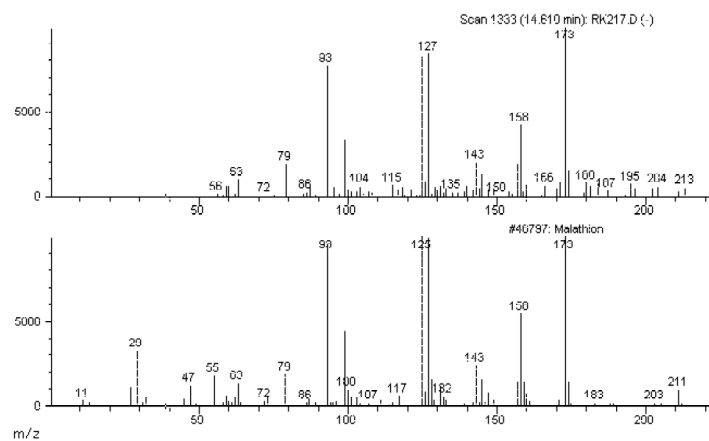


図1 玄米試験液を用いて調製した農薬混合標準液(1ppm)の全イオンクロマトグラム

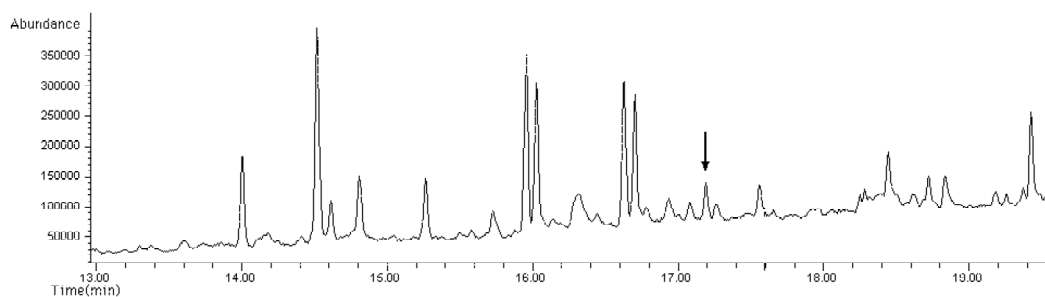
A. 玄米サンプルのマスクロマトグラム (Scan mode)



B. 玄米サンプルの14.61分のピーク（上段）及びマラチオン標品（下段）のマススペクトラム



C. 白瓜サンプルのマスクロマトグラム (Scan mode)



D. 玄米サンプルの17.19分のピーク（上段）及びディルドリン標品（下段）のマススペクトラム

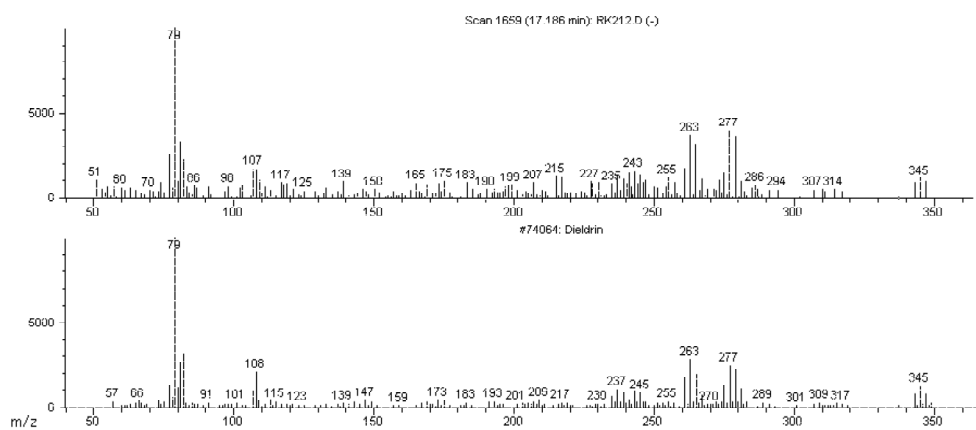


図2 玄米中マラチオン及び白瓜中ディルドリンの同定