

【調査研究】

食品中の有害化学物質等に関する調査研究

— 残留農薬の一斉分析法確立と実態調査 —

難波順子, 劔持堅志, 武 志保, 今中雅章 (衛生化学科)

要 旨

平成13年度に開発した食品中の残留農薬の一斉分析法を更に拡充させ、新たに8農薬を加え、計71種類の農薬について同時分析が可能な方法を確立した。この分析法を用いて市販農産物88検体の残留農薬の実態調査を行ったところ、35検体から15種類総計48農薬が検出されたが、食品衛生法での残留基準を越えるものは無かった。しかしながら、食品衛生法による残留基準未設定の農薬が7農薬検出されていることから、引き続き一斉分析法の改良を重ねると共に実態調査を強化する必要性が認められた。

[キーワード：農薬, 一斉分析法, GPC, GC/MS, 実態調査]

1 はじめに

食品衛生法では年10~20農薬の食品残留基準設定が行われてきており、平成15年3月現在までに229農薬で基準が設定されている¹⁾。輸入農産物では中国産冷凍ほうれん草から高濃度の残留農薬が検出され、一方国産農産物では無登録農薬の不正使用が問題になるなど、食の安全、とりわけ残留農薬に対する関心が非常に高まっている。このような背景のもとで食品衛生法改正に伴う残留農薬等のポジティブリスト制の導入が検討され、農薬取締法に基づく基準、国際基準、欧米の基準等を踏まえた暫定的な基準値設定や、登録等と同時の残留基準設定の促進が計画されており、厚生労働省は数年以内に400農薬以上に残留基準を追加設定する旨公表している。この膨大な種類の農薬を個別分析法で検査するのは困難であり、迅速簡便な一斉分析法の確立が急がれている。既に種々の一斉分析法が報告されている²⁻⁶⁾が、全国的に統一された方法が確立されるに到っていない。そこで、本研究では系統の異なる農薬を対象とし、今後基準設定が行われる可能性のある農薬をも含め、多成分を感度良く測定できる分析法を検討した⁷⁾。本報告では、市販のカートリッジカラムによる精製をゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 操作の前に行うことにより、GPCカラムへの負荷を軽減し、多検体、連続測定でのガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) の定量安定性を向上させるとともに、本分析法を用いた市販の農産物の実態調査も行ったので、

その詳細を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

平成13年8月~14年2月に岡山市内で販売されていた輸入農産物88検体を使用した。

2.2 試薬

有機溶媒等は残留農薬分析用試薬を使用した。

フロリジルミニカラム：Spelco社製 LC-Florisil (5g, 20ml, 注射筒型)、ヘキサンで洗浄後使用した。

グラファイトカーボンカラム：Spelco社製 ENVI-Carb(0.5g, 6ml, 注射筒型)、トルエン、アセトン、ヘキサンで順次洗浄後使用した。

標準品は残留農薬分析用を使用した。

標準液は標準品20mgを少量のアセトンに溶解し、ヘキサンで100mlとして200 μ g/mlの溶液を調製した。

内部標準品は林純薬製の2,4-Diphenyl-1-butene-d5 (2,4-DPB-d5) 又はCIL社製 Hexachlorobenzene-¹³C₆ (HCB-¹³C₆) を用いた。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 キャピラリー GC/MS の測定条件

(装置) Thermo Quest 製 POLARIS イオントラップ MS/MS システム

(注入方式) スプリットレス注入 1 μ l (230 $^{\circ}$ C, パージ開始時間 1.5min)

(カラム) DB 5-MS (J&W社), 0.25mm ϕ ×30m,

0.25 μm

(カラム温度) 昇温分析 50°C (2 min) - 20°C/min - 120°C - 7°C/min - 310°C (5 min)

(トランスファーライン温度) 285°C

(イオン化条件) 230°C (70 eV)

(キャリアーガス) He (99.9999%) 1 ml/min (定流量モード)

(測定法) フルスキャン法 m/z=45-450 0.46秒間

SIM法 農薬のモニターイオンを表1に示した。

内部標準 2,4-DPB-d5 m/z=213

HCB-¹³C₆ m/z=290

2.3.2 GPC の操作条件

(カラム) 昭和電工 Shodex CLNpak PAE-2000 Ac (20mm ϕ ×300mm)

(プレカラム) 昭和電工 Shodex CLNpak PAE-G AC (8mm ϕ ×50mm)

(溶離液) シクロヘキサン：アセトン (5：95)

4 ml/min

(カラム温度) 40°C

(注入量) 2 ml

(サイクルタイム) 30 min

(検出器) 示差屈折

試料の分取毎に、テトラヒドロフラン (THF)：トルエン (1：1) 2 ml を注入してカラムを洗浄した。

2.4 分析方法

平成13年度に開発した、食品中の残留農薬の一斉分析法 (図1～3) を用いて検討した。

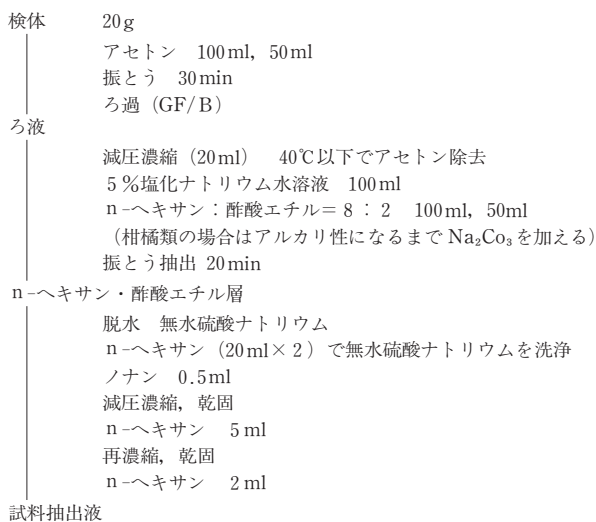


図1 果物及び野菜の抽出法

3 結果及び考察

3.1 本分析法⁷⁾の新規10農薬分析への適応

新たに含窒素系農薬10種 (Bitertanol, Flucylazole, Propiconazole, Tebufenpyrad, Myclobutanil, Diethofencarb, Pyridaben, Pacrobutorazole, Difenconazole, Tricyclazole) が本分析法で同時分析が可能かどうか検討した。

3.1.1 GC/MS による分析条件の検討

表1に新たに検討した10農薬のGC/MS分析にお

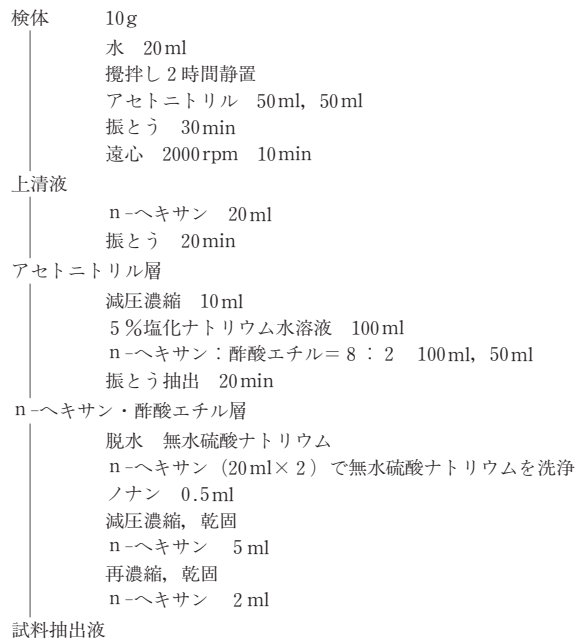


図2 穀類及び種実類の抽出法

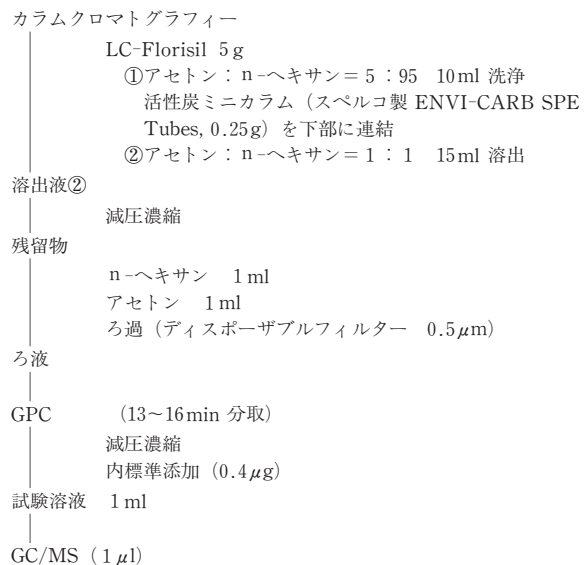


図3 試料抽出液のクリーンアップ法

る保持時間、定量に用いたモニターイオン及び検出限界を示す。検出限界は、標準溶液のクロマトグラムでS/Nが3を示す量を試料20g中の濃度に換算した値で示したが、全ての農薬が0.5~2.5ng/gの範囲であり、高感度分析が可能であった。本分析法への適応を昨年度検討した63農薬との同時分析を行う場合は、混合標準溶液A、Bの2グループとし、モニターイオンをグループピングして測定した。約30分の測定で全ての農薬を分離、定量出来た。内標準物質はカラムが劣化してもテーリング現象が生じにくく、定量性が良好であった2,4-DPB-d5及びHCB-¹³C₆を選定した。

3.1.2 試料分析法の検討

① 抽出溶媒の検討

検体からの抽出は野菜、果物の場合はアセトンを用いた。一方、穀類、豆類、種実類の場合はアセトニトリルを用い、ヘキサンで洗浄することにより脱脂操作の簡略化を図った。

アセトン又はアセトニトリル抽出後の再抽出溶媒の検討を行った。5%塩化ナトリウム水溶液と抽出溶液(ヘキサンと酢酸エチルの混液(8:2))との液々抽出(容積比5:1)を行い、表1に示した。2農薬を除き一回の抽出で70%以上の回収率が得られた。

② カラムクロマトグラフィー条件の検討

精製に用いるカラムはフロリジルミニカラム(Spelco LC-Florisil 5g, 20ml, 注射筒型)とグラファイトカーボンカラム(ENVI-Carb 0.5g, 6ml, 注射筒型)を連結させる方法を検討した。フロリジルカラムクロ

マトグラフィーにおける溶出溶媒の検討結果を表1に示した。フロリジルミニカラムにヘキサン溶液で負荷し、まずアセトン:n-ヘキサン(5:95)10mlで洗浄した。次に、グラファイトカーボンカラムをフロリジルミニカラム下部に連結した状態でアセトン:n-ヘキサン(1:1)15mlで溶出させた。この画分にはほぼ全ての農薬が溶出した。また、グラファイトカーボンカラムではほとんどの農薬が回収できた。

③ GPCの操作条件の検討

GPC操作条件⁹⁾における農薬類の分離状況を検討したところ、13分~16分(52ml~64ml)のフラクション(12ml)中にはほぼ全ての対象農薬が溶出したが、Tricyclazoleは全く溶出せず、Difenoconazoleは大部分が16分~19分に溶出した。

3.2 添加回収実験

小麦10g, オレンジ20gに対して10農薬標準溶液を各0.5μg添加し、回収実験を行った(n=4)。表1に示す様に、8農薬(Bitertanol, Flucylazole, Propiconazole, Tebufenpyrad, Myclobutanil, Diethofencarb, Pyridaben, Pacrobutorazole)が回収率70%以上と良好な値が得られた。一方、2農薬(Difenoconazole, Tricyclazole)は回収されなかった。これにより、昨年度検討した農薬を含め総計71種の農薬について本分析法による一斉分析が可能となった。

3.3 GPCによる食品中の妨害物質精製条件の検討

食品中の妨害物質として代表的なコーン油、クロロフィルa、β-カロチンのGPC操作条件における精製

表1 試料測定・分析条件検討及び添加回収実験における農薬の回収率(%)

Compounds	GC/MS(SIM)			液々抽出率(%) H:EA ³⁾ (8:2)	Florisilカラム溶出率(%) H:A ³⁾ (1:1) 0-15ml	GPC			添加回収率(%)	
	R.T. ¹⁾ (min)	Monitor ion (m/Z)	DL ²⁾ (ng/g)			10-13min	13-16min	16-19min	小麦 (n=4)	オレンジ (n=4)
Diethofencarb	19.19	225	1	108	102	— ⁴⁾	75	—	88	94
Paclobutorazole	21.05	236	0.5	98	99	—	83	8	90	89
Tricyclazole	21.67	189	2.5	2	55	—	—	—	0	0
Myclobutanil	21.96	179	2.5	70	82	—	78	3	83	82
Flucylazole	22.02	233	0.5	102	93	—	75	7	77	74
Propiconazole	23.94	173	1	101	98	—	76	10	76	72
Tebufenpyrad	25.69	171	0.5	112	99	—	106	—	93	86
Bitertanol	27.70	170	1	67	80	—	87	14	80	71
Pyridaben	28.04	147	2	110	88	—	92	—	83	81
Difenoconazole	31.04	323	2	82	72	—	9	96	22	18

1) Retention time

2) Detection limit (S/N=3)

3) H: hexane, EA: ethyl acetate, A: acetone

4) —: No peak

状況を検討した(図4)。農薬が溶出する13分~16分(52 ml~64ml)のフラクション(12ml)を分取することにより、コーン油、クロロフィルaのほぼ全量を、 β -カ

ロチンの約半量を除去することが出来た。ほうれん草抽出液を GPC 処理を行い、その操作前後での精製度の違いを同一スケールの TIC クロマトグラムで図5に

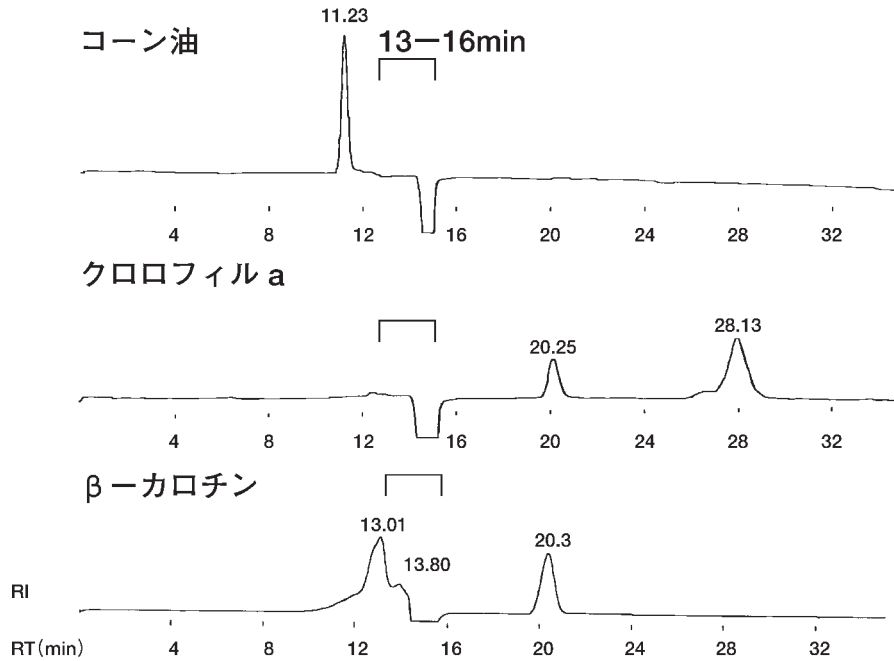


図4 GPCによる食品中夾雑物の分離状況

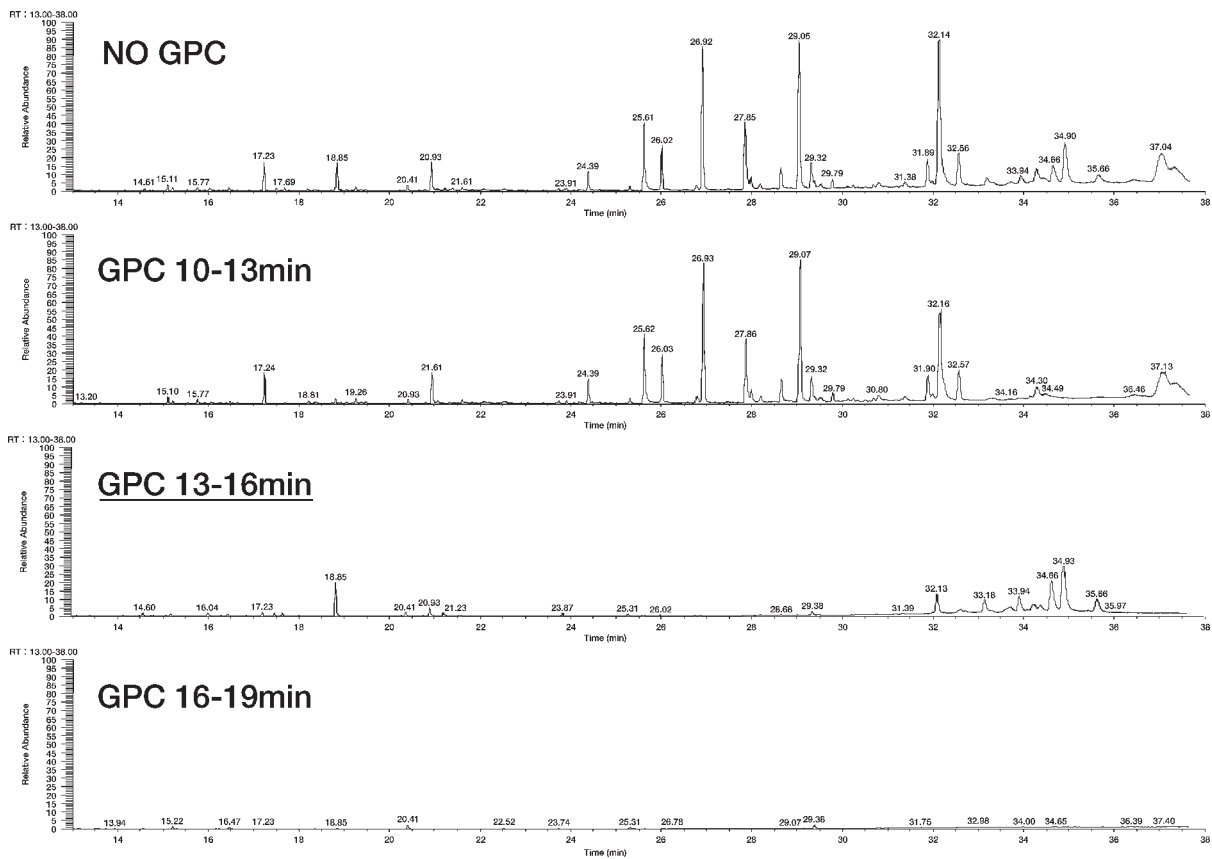


図5 ほうれん草抽出液の GPC による精製

示した。GPCによる分取を行うことにより、農薬が溶出する13分～16分のフラクション中の妨害成分の量を大幅に減らすことが出来た。このことからGC/MSに対する負荷が小さくなり、多検体分析での定量安定性の向上が期待される。

3.4 実態調査

輸入農産物88検体を用いて実態調査を行った。農薬が検出された農産物を表2に示した。88検体中35検体から15種類総計48農薬が検出されており、表3に示すように農産物全体で40%の検体から検出されたことになる。検出濃度は全て食品衛生法での残留基準値以下又は基準値未設定のものであった。農産物を分類して検出率を検討したところ、果物では50%、茶では75%と高頻度で検出されたが、野菜は17%、種実類では全く検出されなかった。兵庫県の検出率⁹⁾は全体で56%、輸入野菜が38%、輸入果実が84%であり、今回の検出率より高い値となっている。兵庫県は分析農薬が1995年の107農薬の時は検出率が全体で38%であったが1999

年に204農薬になると58%に増加していることから、分析対象農薬数の多さが検出率の高さとして現れているものと考えられる。今後、本分析法でも分析対象農薬の増加が急務の課題である。

検出された15農薬中では、中国産冷凍ほうれん草から高濃度に検出されて問題となった殺虫剤のクロルピリフォスが最も高頻度に柑橘類8検体から検出された。また、残留基準が設定されていない農薬も7農薬検出

表3 農産物分類ごとの農薬検出率

	調査検体数	検出検体数	検出割合(%)
果物	52	26	50.0
野菜	12	2	16.7
穀類	12	4	33.3
茶	4	3	75.0
種実類	8	0	0.0
全体	88	35	39.8

表2 実態調査で検出された農薬

農産物名	調査検体数	検出検体数	検出農薬	検出濃度(ppm)	基準値(ppm)
オレンジ	8	3	Chlorpyrifos	0.005, 0.002, 0.027	0.3
小麦	8	4	Chlorpyrifos-methyl	0.006, 0.036, 0.011, 0.004	—
グレープフルーツ	8	2	Chlorpyrifos	0.007	0.3
			Methidation	0.057, 0.002	—
レモン	8	5	Chlorpyrifos	0.001, 0.006, 0.001, 0.002	0.3
			Methidation	0.019	—
クランベリー	4	4	Chlorothalonil	0.050, 0.559, 0.456, 0.221	5.0
チェリー	4	4	Endosulfansulfate	0.005, tr, 0.001, 0.001	—
茶	4	3	Endosulfansulfate	0.006, 0.002	—
			Buprofezin	0.003, 0.002, 0.006	—
			Fenvalerate	0.029, 0.004, 0.033	1.0
			es-Fenvalerate	0.142, 0.214	—
桃	4	4	Diazinon	0.001	0.1
			Ethofenprox	0.009, 0.004	2.0
			EPN	0.012, 0.006, 0.012, 0.001	0.1
トマト	4	2	PAP	0.040, 0.158	—
			Pyrazophos	0.005, tr	—
ブドウ	4	2	Iprodione	0.134, 0.012	25.0
プルーン	4	2	Propargit	tr, tr	—

表4 農薬検出検体1件当たりに検出された農薬数

検出農薬数	1	2	3	4
検出検体数	26	6	2	1
検出割合 (%)	74.3	17.1	5.7	2.9

されており、早期の基準値設定が望まれる。

1検体から検出された農薬数を表4に示した。1検体から1農薬のみ検出される割合が、農薬が検出された35検体中約75%と大部分を占めるが、1検体から4農薬検出されるものもあった。1検体から3農薬又は4農薬検出された検体は全て茶であり、検出農薬は殺虫剤であった。

4 まとめ

液々抽出、フロリジル及び活性炭ミニカラム、GPCを組み合わせた食品中の残留農薬の一斉分析法を用いて検討を行い、次に示す結果を得た。

1. GC/MSのSIM法での測定条件を検討し、昨年度検討した63農薬と同時に、総計73農薬を混合標準溶液A、Bの2グループとし、モニターイオンをグループピングして測定した。検出限界は全ての農薬が0.5~5 ng/gの範囲であり、高感度分析が可能であった。内標準物質はカラムが劣化してもテーリング現象が生じにくく、定量性が良好であった2,4-DPB-d5及びHCB-¹³C₆を選定した。
2. 本法における小麦10g、オレンジ20gを用いて行った添加回収実験では新たに検討した10農薬のうち8農薬が回収率70%以上と良好な値が得られ、昨年度検討した農薬を含め総計71種の農薬が本法で一斉分析が可能となった。
3. GPC条件(カラム:昭和電工 Shodex CLNpak PAE-2000 Ac (20mmφ×300mm, 溶離液:シクロヘキサン:アセトン(5:95) 4 ml/min, 温度:40℃)において農薬が溶出する13分~16分のフラクションを分取することにより、食品中の妨害物質であるコーン油、クロロフィルaのほぼ全量を、β-カロチンの約半量を除去することが出来た。
4. 本法を用いて輸入農産物88検体の実態調査を行ったところ、35検体から残留基準が設定されていない7農薬を含め15種類総計48農薬が検出されたが、食

品衛生法での残留基準を越えるものは無かった。茶は1検体から3農薬又は4農薬の殺虫剤が検出された。

文 献

- 1) 厚生労働省告示第94号:平成14年3月13日
- 2) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 武田信幸, 辻 正彦: 固層抽出法を用いた農産物中残留農薬のGC/MSによる多成分一斉分析, 食衛誌, Vol. 37, No. 6, 351-362, 1996
- 3) 小川正彦, 坂井 亨, 大熊和行, 松本 正, 久松由東, 中澤裕之: GPC及びGC/MS-SIMを用いた農産物中残留農薬の迅速一斉分析, 食衛誌, Vol. 38, No. 2, 48-61, 1997
- 4) 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光 進, 外海泰秀, 土屋 鍛, 木村実加, 関口幸弘: 超臨界流体抽出及びGC, HPLCによる穀類中残留農薬の多成分一斉分析法, 食衛誌, Vol. 40, No. 1, 68-74, 1999
- 5) 根本 了, 佐々木久美子, 衛藤修一, 斉藤 勲, 酒井 洋, 高橋哲夫, 外海泰秀, 永山敏廣, 堀伸二郎, 前川吉明, 豊田正武: GC/MS (SIM)による農作物中110農薬の一斉分析法, 食衛誌, Vol. 41, No. 4, 233-241, 2000
- 6) 吉岡直樹, 秋山由美, 辻 正彦: 11種農薬のGC/MSによる多成分一斉スクリーニング法への適応性の検討, 兵庫県立衛生研究所年報第36号, 105-108, 2001
- 7) 難波順子, 剣持堅志, 武 志保, 門田 実, 今中雅章: 食品中の有害化学物質等に関する調査研究—残留農薬の一斉分析法について—, 岡山県環境保健センター年報第26号, 58-64, 2002
- 8) 剣持堅志: GPC (Gel Permeation Chromatography)の微量化学物質(PCBs, PCNs等)分析への応用, 第11回環境化学討論会講演要旨集, 2002
- 9) Yumi Akiyama, Naoki Yoshioka and Masahiko Tsuji: Pesticide residues in agricultural products monitored in Hyogo Prefecture, Japan, FYs 1995-1999, J. AOAC Int., 85, 692-703, 2002