

## 加工食品中の有機リン系農薬一斉分析法の検討

肥塚加奈江, 石井 学, 山本 淳, 山辺真一 (衛生化学科)

【調査研究】

## 加工食品中の有機リン系農薬一斉分析法の検討

Studies on Simultaneous Determination of Organic Phosphorous Pesticides in Processed Food

肥塚加奈江, 石井 学, 山本 淳, 山辺真一 (衛生化学科)  
Kanae Koeduka, Manabu Ishii, Jun Yamamoto, Shinichi Yamabe

### 要 旨

加工食品中の有機リン系農薬のガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)と液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS/MS)を用いた一斉分析法について検討した。平成20年3月7日付け, 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡の方法にアセトニトリル/ヘキサン分配とENVI-Carb/NH<sub>2</sub>ミニカラムクリーンアップを追加した分析法について, 平成19年11月15日付け, 食安発第1115001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知に従った試験法の妥当性評価を行った結果, 良好な方法であることが確認できた。

[キーワード: 有機リン系農薬, 加工食品, GC/MS法, LC/MS/MS法]

[Key words: Organic Phosphorous Pesticides, Processed Food, GC/MS, LC/MS/MS]

### 1 はじめに

平成20年1月に中国産冷凍餃子を原因とする有機リン系農薬(メタミドホス)中毒事例が発生したことから, 加工食品の安全性が大きな社会問題となり, 行政機関でも加工食品中の残留農薬検査を実施する動きが広まった。

岡山県でも事例発生後冷凍加工食品の残留農薬検査を実施した。しかし, 平成20年3月7日付け, 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡<sup>1)</sup>の方法(以下, 事務連絡の方法という。)では, 急性中毒を起こすほどの高濃度の有機リン農薬が混入している時の緊急分析には適しているが, 通常のモニタリング分析でGC/MS等で定量及び確認を行いたいときには前処理での精製が不十分と思われた。そこで, 事務連絡の方法にクリーンアップ過程を追加した方法を検討したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 試料

岡山県内に流通していた農薬の検出されなかった冷凍小籠包を使用した。

#### 2.2 対象農薬及び標準物質

表1にGC/MS, 表2にLC/MS/MS測定対象農薬及びモニタリングイオンを示した。農薬標準品は関東化学(株)製の農薬混合標準液を用い, 混合標準液に含まれていな

い農薬については, 各農薬標準品から1000 $\mu$ g/ml溶液を調整するか, 標準溶液を購入し, それぞれ混合して用いた。

#### 2.3 試薬

アセトニトリル, ヘキサン, トルエン, 酢酸エチル, 無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を用いた。LC/MS/MSの移動相溶媒のアセトニトリルはLC/MS用を, 精製水はイオン交換水をMilliQ超純水製造装置で精製したものを用いた。酢酸アンモニウムは試薬特級, 酢酸はLC/MS用を用いた。固相抽出にはグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500mg/500mg)(SUPELCO社製ENVI-Carb/NH<sub>2</sub>(500mg/500mg 20ml))(以下ENVI-Carb/NH<sub>2</sub>ミニカラムと呼ぶ)を用いた。

#### 2.4 装置

ア ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

測定条件は以下のとおりとした。

(装置) サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製 Polaris GC/MS system

(カラム) DB-5ms+DG (0.25 mm  $\phi$   $\times$  30m 膜厚 0.25 $\mu$ m ガードカラム1~2m)

(カラム温度) 昇温条件 50 $^{\circ}$ C (1min)-25 $^{\circ}$ C /min-125 $^{\circ}$ C -10 $^{\circ}$ C /min-300 $^{\circ}$ C (1min))

表1 GC/MS(SCAN)測定農薬

compounds	R.T.(min)	monitoring ions(m/z)
bromophos	15.01	331,329
butamifos	16.16	286,258
cadusaphos	11.57	213,159
chlorpyrifos	14.57	314,316
chlorpyrifos_methyl	13.63	286,288
cyanophos	12.54	243,180
diazinon	12.65	304,179
dimethoate	12.03	87,125
edifenphos	17.94	310,109
EPN	18.98	169,157
ethion	17.34	231,384
ethoprophos	11.02	158,200
etrimfos	12.99	292,181
fenamiphos	16.22	303,288
fenitrothion	14.26	260,277
fensulfthion	17.21	293,308
fenthion	14.66	278,125
fosthiazate	15.07	227,195
iprobenfos	13.21	246,204
isofenphos	15.38	213,255
isoxation	16.9	313,285
malathion	14.41	173,127
methidathion	15.84	145,85
methylparathion	13.75	246,263
monochlotophos	11.47	127,192
parathion	14.72	291,263
phenthoate	15.38	274,246
phorate	11.66	231,260
phosalon	19.61	182,367
phosmet	18.96	160,317
phosphamidon	13.45	264,127
pirimiphos_methyl	14.19	305,290
profenofos	16.46	339,337
prothiophos	16.39	309,267
pyraclophos	20.41	360,194
pyrazophos	20.09	265,221
pyridafention	18.77	340,199
quinalphos	15.56	298,156
terbufos	12.54	231,203
tetrachlorvinphos	15.94	331,329
tolclofos_methyl	13.78	265,267
triazophos	17.61	162,285
tribufos(DEF)	16.6	202,169
trichlorfon	9.07	79,109
vamidothion	15.98	87,145
Z_dimethylvinphos	14.61	295,297
$\alpha$ chlorfenvinphos	15.2	323,267
$\beta$ chlorfenvinphos	15.42	323,267

表2 LC/MS/MSの測定農薬

compounds	R.T. (min)	precursor ion (m/z)	daughter ion (m/z)
methamidophos	2.46	142.1	94.2
		142.1	125.2
		142.1	112.1
acephate	3.42	184.1	143.2
		184.1	95.1
		184.1	49.1
omethoate	4.14	214.1	125.2
		214.1	155.1
		214.1	183.1
dichlorvos	7.14	221.0	109.2
		221.0	127.2
		223.0	109.2

(注入口温度) 250℃

(トランスファーライン温度) 300℃

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

(注入方式) スプリットレス注入

(注入量) 2  $\mu$ L

(測定法) フルスキャン m/z50-550

(イオン化電圧) 70eV

(イオン源温度) 230℃

## イ 液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS/MS)

測定条件は以下のとおりとした。

(装置) 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

Applied Biosystems製 API3200 QTrap

LC/MS/MS systems

(分析カラム) CAPCELL PAK C18, TYPE MG III

3 $\mu$ m, 2.1 x 100 mm (Shiseido)

(移動相流量) 0.2mL/min

(測定用試料注入量) 5  $\mu$ L

(カラム温度) 40℃

(インターフェース) Turbo V source

(イオン化モード) エレクトロスプレーイオン化(ESI)  
法 positive modeMS/MSの測定条件は表3のとおり  
とした。

(グラジエント) A液: 0.5mmol/L 酢酸アンモニウム

0.005%酢酸水溶液

B液: アセトニトリル

グラジエント条件は表4のとおりと  
した。

## 2.5 精製操作

既述のとおり、事務連絡の方法は、緊急時に分析する方法であるため、酢酸エチル及び無水硫酸ナトリウムを加えて抽出した後、濃縮して機器分析に供する方法であり、精製操作がない。そこで、通常のモニタリング分析で、GC/MS等で分析可能とするために精製操作を追加することとした。

## 2.5.1 脱脂操作

n-ヘキサン25mlとアセトニトリル30mlを分液ロート中で混和した中に農薬標準品を添加して振とう機で振とうし、それぞれの相を分取したあと、1mlに濃縮して農薬の回収率を測定した。

表3 LC/MS/MS測定条件

compounds	R.T. (min)	Q1 <sup>注</sup> (amu)	Q3 <sup>注</sup> (amu)	Dwell time (msec)	DP <sup>注</sup> (volt)	EP <sup>注</sup> (volt)	CEP <sup>注</sup> (volt)	CE <sup>注</sup> (volt)	CXP <sup>注</sup> (volt)
methamidophos	2.46	142.1	94.2	50	31	6.5	10	21	4
		142.1	125.2	50	31	6.5	10	19	4
		142.1	112.1	50	31	6.5	10	21	4
acephate	3.42	184.1	143.2	50	21	9.5	12	15	4
		184.1	95.1	50	21	9.5	12	27	4
		184.1	49.1	50	21	9.5	12	27	6
omethoate	4.14	214.1	125.2	50	31	3.5	12	31	4
		214.1	155.1	50	31	3.5	12	21	4
		214.1	183.1	50	31	3.5	12	15	6
dichlorvos	7.14	221.0	109.2	50	46	4.0	14	21	4
		221.0	127.2	50	46	4.0	14	29	4
		223.0	109.2	50	36	9.0	16	23	4

total scan time:0.66sec,cycle:1546

source/gas:Curtain gas 30,Collision gas 5,Ion spray voltage 5500,Temptrature 450,Ion source gas1 80,Ion source gas2 70

【注】

Q1:precursor ion, Q3:daughter ion, DP:Declustering Potential, EP:Entrance Potential, CEP:Collision Cell Entrance Potential, CE:Collision Energy, CXP:Collision Cell Exit Potential

表4 LC/MS/MSのグラジェント条件

Time(min)	A液(%)	B液(%)
0	95	5
7	15	85
9	15	85
10	95	5
17	95	5

A液:0.5mmol/L酢酸アンモニウム0.005%酢酸水溶液  
B液:アセトニトリル

2.5.2 ミニカラム精製

アセトニトリル：トルエン（3：1）混液20mLを注入して洗浄したENVI-Carb/LC-NH2ミニカラムに、農薬混合標準液（アセトニトリル溶液）20mLを添加し、流出液を100mlなす型フラスコに受けた。その後、ミニカラムにアセトニトリル：トルエン（3：1）混液20mLを注入し、100mlなす型フラスコに受けて先の流出液と合わせた。全流出液を40℃以下で濃縮し、アセトン：ヘキサン（1：1）に転溶し回収率を測定した。

2.6 試験溶液の調製

試験溶液の調整は図1のフローチャートに従って行った。すなわち、試料10.0gを100mlコニカルピーカーにとり、無水硫酸ナトリウム20g～60gを検体の水分含量に応じて適宜加えた後、酢酸エチル50mlを加えた。次にポリロンホモジナイザーで約1分間ホモジナイズした後、200mlなす型フラスコを受器として吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に酢酸エチル25mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過し、得られたろ液を先のろ液と合わせ、40℃以下で減圧濃縮し、約1ml以下まで濃縮した。これにアセトニトリル約10ml加え、再び40℃以下で約1ml以下まで減圧濃縮し、酢酸エチルを除去した。この残留物をアセトニトリル飽和n-ヘキサン25ml及びn-ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで100ml分液ロートへ移し、5分間振とうし静置した後、下層のアセトニトリル層を200mlなす型フラスコに分取した。残ったヘキサン層にn-ヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え同様の操作を2回繰り返した、分取したアセトニトリル層を200mlなす型フラスコ中に合わせ、40℃以下で約50ml以

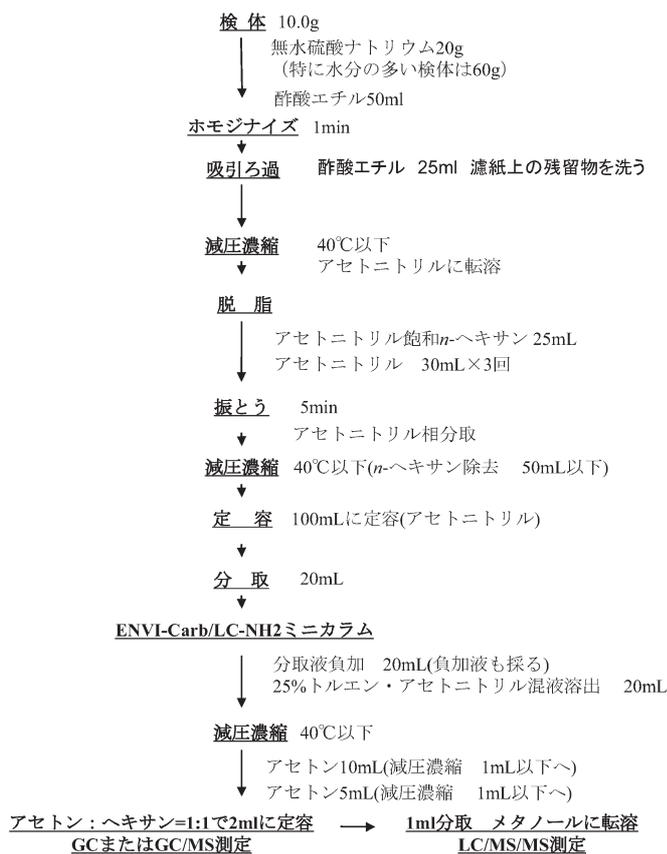


図1 分析フローチャート

下まで減圧濃縮し、n-ヘキサンを除去した。残った溶液を100mlメスフラスコに移しアセトニトリルを加えて100mlとした。アセトニトリル：トルエン(3：1)混液20mLを注入して洗浄したENVI-Carb/LC-NH2ミニカラムに、100mlのうちの20mlを分取して注入し流出液を100mlなす型フラスコに受けた。その後、ミニカラムにアセトニトリル：トルエン(3：1)混液20mLを注入し、100mlなす型フラスコに受けて先の流出液と合わせた。全流出液を40℃以下で1mL以下に濃縮した。これにアセトン10mLを加えて40℃以下で1mL以下に濃縮し、再度アセトン5mLを加えて1ml以下に濃縮した。これをアセトン：ヘキサン(1：1)混液で2mlメスフラスコに移して定容した。このうち1mlを正確に分取して1mlメスフラスコにとり、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除いた後、メタノールで1mlに定容した。残ったアセトン：ヘキサン(1：1)溶液をサンプル瓶に詰めてGC/MS用試験溶液とした。またメタノール溶液を試験溶液ろ過用フィルターでろ過して、サンプル瓶に詰めてLC/MS/MS用試験溶液とした。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 精製操作の検討

まず、脂肪分の除去を行うためにアセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。結果を表5に示す。ヘキサン相の存在割合が一番高かったのはprothiophosの36%であったが、その他の農薬は23%以下であり、アセトニトリル相の回収率もtribufos(DEF)とdichlorvosが40%台と低かったがおおむね60%以上であったため、アセトニトリル/ヘキサン分配を使って脂肪分の除去を行うことが可能と思われた。また、平成17年1月24日付け、食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知農産物の一斉分析法「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」<sup>2)</sup>で農産物の一斉分析法で採用されている、ENVI-Carb/LC-NH2ミニカラ

ムでの精製を検討した(表5)。回収率が最も低かったのはdichlorvosの74%であったが、全農薬とも70%以上を示し、このミニカラムを精製に使用して問題ないと思われた。以上のことから、分析法は図1のフローチャートのとおりとした。

#### 3.2 分析法の妥当性評価

県内で流通している冷凍小籠包の添加回収試験における添加濃度を0.1 $\mu$ g/gと0.5 $\mu$ g/gとし、2検体併行試験はそれぞれの濃度で5回繰り返して、それぞれの回収率及び併行精度及び室内精度を求め、平成19年11月15日付け、食安発第1115001号厚生労働省医薬食品局食品安全

表5 精製操作の回収率

	アセトニトリル/ヘキサン分配		固相抽出
	アセトニトリル相 回収率(%)	ヘキサン相 回収率(%)	ENV-Carb/NH2 回収率(%)
acephate	109	0	88
bromophos	77	18	91
butamifos	121	2	101
cadusaphos	67	20	102
chlorfenvinphos( $\alpha, \beta$ )	118	3	107
chlorpyrifos	101	21	96
chlorpyrifos_methyl	77	9	91
cyanophos	92	1	92
diazinon	104	23	95
dichlorvos	49	2	74
dimethoate	138	0	113
edifenphos(EDDP)	119	3	114
EPN	136	3	107
ethion	77	4	96
ethoprophos	88	11	104
etrimfos	104	16	99
fenamifos	72	1	105
fenitrothion	128	2	107
fensulfothion	70	0	94
fenthion	88	4	99
fosthiazate	77	0	101
iprobenfos	67	4	114
isofenphos	132	6	110
isofenphos_oxon	118	2	111
isoxation	93	2	95
isoxation_oxon	82	0	88
malathion	164	2	104
methamidophos	140	0	106
methidathion	85	1	101
monochlotophos	74	0	107
phenthoate	87	3	93
phorate	62	11	95
phosalon	80	1	98
phosmet(PMP)	95	0	96
phosphamidon	81	0	105
pirimiphos_methyl	74	10	96
profenofos	68	7	96
prothiophos	78	36	102
pyraclophos	99	2	120
pyridafention	76	0	102
quinalphos	146	8	104
terbufos	62	16	92
tetrachlorvinphos	82	2	98
tolclofos_methyl	122	12	99
triazophos	121	0	122
tribufos(DEF)	42	22	100
vamidothion	132	0	117
Z_dimethylvinphos	128	2	105

部長通知<sup>3)</sup>に従って試験法の妥当性評価を行った結果を表6に示す。

通知では、添加濃度0.1 $\mu\text{g/g}$ での目標値は、回収率70～120%，併行精度15%未満，室内精度20%未満であり，添加濃度0.5 $\mu\text{g/g}$ での目標値は，回収率70～120%，併行精度10%未満，室内精度15%未満とされている。今回検討した農薬は，すべての農薬で0.1 $\mu\text{g/g}$ 及び0.5 $\mu\text{g/g}$ いずれの濃度でも回収率及び併行精度，室内精度とも目標をみたとおり，分析法として妥当であると考えられた。

#### 4 まとめ

加工食品中の有機リン農薬について事務連絡の方法を基に抽出し，アセトニトリル/ヘキサン分配と固相抽出ミニカラムを追加することで，分析機器の負荷が少ない分析法となった。試験法の妥当性評価を行ったところ，検討した45農薬について分析法として妥当であるという結果であり，この分析法は加工食品の有機リン農薬の分析法として有用であると考えられた。

表6 回収率および繰り返し精度

	添加試料濃度0.1 $\mu\text{g/g}$			添加試料濃度0.5 $\mu\text{g/g}$		
	回収率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	回収率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
LC/MS/MS測定農薬						
methamidophos	109.0	3.9	4.9	112.7	1.5	3.4
acephate	94.7	3.2	7.9	98.4	2.1	7.6
omethoate	92.8	1.9	3.6	96.8	1.7	2.0
dichlorvos	70.1	12.2	12.2	73.1	9.8	11.8
GC/MS測定農薬						
bromophos	104.6	4.2	4.6	99.9	2.5	3.4
butamifos	98.4	7.3	7.5	106.8	3.8	5.2
cadusaphos	92.4	2.4	10.5	108.6	2.6	4.2
chlorpyrifos	108.1	5.8	6.2	107.5	2.3	3.3
chlorpyrifos_methyl	103.1	4.6	4.8	99.2	1.6	4.2
cyanophos	104.8	4.6	5.3	99.4	2.4	2.5
diazinon	110.6	5.7	12.7	105.0	6.2	7.6
EPN	95.6	6.9	12.9	102.8	4.4	5.4
ethion	101.6	6.0	8.3	100.0	1.9	4.7
ethoprophos	102.6	4.4	6.0	105.6	2.1	4.1
etrimfos	112.6	6.0	6.1	108.4	3.0	3.9
fenamiphos	99.5	8.7	12.7	101.1	3.4	6.1
fenitrothion	101.2	7.6	8.7	108.1	2.3	4.1
fensulfothion	100.2	9.2	16.1	103.4	5.9	7.7
fenthion	105.3	6.7	6.8	104.3	2.9	4.1
iprobefos(IBP)	100.3	5.8	9.2	103.7	3.4	4.0
isofenphos	118.7	3.5	3.5	109.1	1.6	4.5
isoxation	99.5	4.7	12.8	102.0	3.1	3.8
malathion	109.5	4.6	6.3	109.8	1.1	2.0
methidathion	97.3	4.8	5.1	100.0	2.2	2.9
methylparathion	104.3	8.2	10.2	113.3	3.0	3.4
monochlotophos	99.2	4.2	7.1	113.3	1.4	7.1
parathion	95.2	10.6	12.0	110.7	2.3	6.4
phenthoate	99.6	3.4	8.2	96.3	2.4	2.5
phorate	94.0	4.5	9.5	100.2	3.4	3.5
phosalon	100.4	6.8	7.3	99.7	6.3	6.8
phosphamidon	101.2	6.4	6.8	93.8	3.2	3.4
pirimiphos_methyl	107.2	3.7	7.1	101.7	3.1	3.6
profenofos	105.7	5.7	7.9	98.4	2.3	7.3
prothiophos	99.0	6.4	7.6	96.4	2.3	5.3
pyraclophos	113.7	10.3	12.5	108.1	6.4	7.1
pyrazophos	107.4	7.0	7.9	97.7	6.7	7.0
pyridafention	111.1	6.4	6.5	102.8	4.6	5.2
quinalphos	108.6	5.3	7.9	108.6	3.3	5.7
terbufos	102.8	3.7	6.8	99.8	1.4	2.8
tetrachlorvinphos	100.0	5.6	5.9	98.6	4.1	7.7
tolclofos_methyl	116.6	5.7	7.9	106.4	1.1	1.4
tribufos(DEF)	98.0	2.8	3.0	88.0	2.2	5.7
Z_dimethylvinphos	106.7	4.6	8.2	102.3	1.7	4.0
$\alpha$ chlorfenvinphos	105.8	5.8	8.3	110.5	2.6	4.7
$\beta$ chlorfenvinphos	104.8	4.9	5.4	110.4	5.1	5.8

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡“食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について”平成20年3月7日, 2008
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分で  
ある物質の試験法について”平成17年1月24日付け食安発第0124001号, 2005
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて”平成19年11月15日付け食安発第1115001号, 2007