

【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(2) -

難波順子, 山辺真一, 武志保, 今中雅章, 劔持堅志\* (衛生化学科)

\*水質第二科

### 要 旨

食品中の残留農薬の GC/MS を用いた一斉分析法を更に拡充させ、新たに14農薬を加え、計85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果汁100%ジュース24検体の残留農薬の実態調査を行ったところ、3検体から Chlorpyrifos が検出された。農薬の確認は、MS/MS 法を用いて行った。MS/MS 法は、Scan 法では夾雑物の為スペクトルによる確認が困難である低濃度の農薬の確認法として有用性が示された。

[キーワード：食品残留農薬，一斉分析法，GPC，GC/MS，実態調査]

### 1 はじめに

“食の安全，安心”に対する関心が非常に高まる中、平成15年5月に食品衛生法の改正が行われた。この中で食品中に残留する農薬等への“ポジティブリスト制”の導入が3年以内に行われることが示された。“ポジティブリスト制”とは「基準値が設定されていない農薬が検出された食品の流通を全て禁止する」という事であり、残留基準が定められている農薬数が現在よりも飛躍的に増加することが確実視されている。このような状況下で、食品中の残留農薬分析は益々重要になってきており、迅速簡便な一斉分析法の検討が行われている<sup>1-5)</sup>。本研究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、多成分を感度良く測定できる分析法を検討した<sup>6-7)</sup>。本報告では、GC/MS を用いた一斉分析法の拡充と本分析法を用いた市販ジュース中の残留農薬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15年7月～8月に岡山市内で販売されていた果汁100%ジュース24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 $\mu$ 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 - <sup>13</sup>C<sub>6</sub> (HCB - <sup>13</sup>C<sub>6</sub>) を用いた。

#### 2.3 装置及び測定条件

(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 $\mu$ l

(230 $^{\circ}$ C, パージ開始時間1.5min)

(カラム) DB5-MS (J&W社), 0.25mm $\phi$   $\times$  30m, 0.25 $\mu$ m

(カラム温度) 昇温分析

50 (2min) - 20 $^{\circ}$ C/min - 120 $^{\circ}$ C - 7 $^{\circ}$ C/min - 310

(5min)

(トランスファーライン温度) 285

(イオン化条件) 230 (70eV)

(キャリアーガス)

He (99.9999%) 1 ml/min (定流量モード)

(測定法)

SIM 法

農薬のモニターイオンを表 1 に示した。

内部標準のモニターイオン

2,4-DPB-d5  $m/z = 213$

HCB-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>  $m/z = 290$

フルスキャン法

$m/z = 45 - 450$  0.46秒間隔

MS/MS 法

Chlorpyrifos

プリカーサーイオン  $m/z = 314$

プロダクトイオン  $m/z = 286$

## (2) GPC の操作条件

(カラム) 昭和電工 Shodex CLNpak

PAE-2000Ac (20mmφ × 300mm)

(プレカラム) 昭和電工 Shodex CLNpak

PAE-G AC (8mmφ × 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

(注入量) 2 ml

(サイクルタイム) 30min

(検出器) 示差屈折計

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年度より検討した食品中の残留農薬の一斉分析法を用いた<sup>6-7)</sup>。本分析法は、まず野菜、果物の場合はアセトン、穀類、豆類、種実類の場合はアセトニトリルで抽出した後、後者はヘキサンで洗浄し、共にヘキサンと酢酸エチルの混液 (8 : 2) で再抽出し、次に市販のカートリッジカラムと GPC による精製を行い、GC/MS (SIM 法) で測定する分析法である。農薬を検出した場合には GC/MS (フルスキャン法) 又は GC/MS (MS/MS 法) で確認を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 本分析法の新規18農薬分析への適応

新たに18種類の農薬 (Ethoprophos, Chlorpropham, Terbufos, Etrimfos, Metribuzin, Pirimifos-methyl, E-dimethylvinphos, Dichlofluanid, Triadimenol, Fensulfothion, Lenacil, Cyhalothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Halfenprox, Flucythrinate, Fluvalinate, Deltamethrin) が本分析法で同時分析が可能かどうか検討した。

#### (1) GC/MS による分析条件の検討

表 1 に新たに検討した18農薬の GC/MS 分析における保持時間、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0.2~2.5ng/g の範囲であり、高感度分析が可能であった。これらの農薬を昨年度検討した71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。

#### (2) 試料分析法の検討

##### 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。3 農薬 (Ethoprophos, Metribuzin, Lenacil) を除き一回の抽出で70%以上の回収率が得られた。

##### 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。その結果3農薬（Terbufos, Etrimfos, Pirimifos-methyl）が洗浄液中に20%以下ではあるが溶出しはじめた。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で溶出させると、全ての農薬が70%以上溶出した。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。

### GPCの操作条件の検討

GPC操作条件<sup>8)</sup>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14農薬が70%以上溶出した。Metribuzin, Triadimenol, Fensulfothion, Lenacilはほぼ全量が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18農薬標準溶液を各0.5μgになるよう添加し、回収実験を行った（n=

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 (%)	Florisol カラム溶出率 (%)		GPC			添加回収率 (%)	
	R.T. <sup>1)</sup> (min)	Monitor ion (m/Z)	DL <sup>2)</sup> (ng/g)	H: EA <sup>3)</sup> (8:2)	H: A <sup>3)</sup> (5:95) 0-10ml	H: A <sup>3)</sup> (1:1) 0-15ml	10-13 min	13-16 min	16-19 min	小麦 (n=3)	オレンジ (n=3)
Ethoprophos	14.23	158	2.5	55.9	-	77.5	-	110.1	-	100.1	102.3
Chlorpropham	14.57	127	0.2	77.8	-	74.6	-	92.3	-	87.3	89.5
Terbufos	16.35	231	0.5	84.2	19.4	73.5	-	80.2	-	83.7	91.3
Etrimfos	17.03	292	0.5	101.0	15.3	62.7	-	94.1	-	75.8	84.9
Metribuzin	17.88	198	0.5	62.3	-	81.5	-	-	119.7	0.0	0.0
Pirimifos-methyl	18.71	290	0.5	80.3	19.0	69.5	-	94.9	-	77.7	82.6
E-dimethylvinphos	18.89	295	2.0	78.8	-	83.5	-	95.8	6.4	96.6	77.5
Dichlofluanid	18.95	123	2.0	77.7	-	115.7	-	83.5	-	86.6	72.1
Triadimenol	20.89	168	2.5	80.4	-	84.6	-	17.2	113.5	0.0	0.0
Fensulfothion	22.93	293	2.5	80.0	-	94.7	-	-	112.3	0.0	0.0
Lenacil	24.05	153	0.2	56.6	-	83.0	-	-	118.0	0.0	0.0
Cyhalothrin	26.58	181	2.0	71.6	-	82.3	-	74.1	-	104.0	73.8
Cyfluthrin	28.90	206	1.0	75.2	-	77.1	-	82.9	-	96.9	75.8
Cypermethrin	29.20	181	0.5	71.7	-	73.6	-	86.5	-	115.3	83.5
Halfenprox	29.33	263	0.5	78.8	-	78.3	-	87.2	-	110.1	70.6
Flucythrinate	29.46	199	0.5	76.1	-	74.5	-	78.1	-	102.9	70.1
Fluvalinate	30.66	250	0.5	75.5	-	72.7	-	76.2	-	88.4	80.1
Deltamethrin	31.58	181	1.0	73.3	-	81.9	-	80.1	-	117.5	74.5

1) Retention time

2) Detection limit (S/N=3)

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

4) -: No Peak

表2 食品中残留農薬実態調査結果

ジュース種類	調査検体数	検出検体数	検出農薬	検出濃度 (ppm)
オレンジ	6	1	Chlorpyrifos	0.002
グレープフルーツ	5	1	Chlorpyrifos	0.001
リンゴ	4	1	Chlorpyrifos	tr
ブドウ	5	0		
ピーチ	1	0		
レモン	1	0		
ブルーベリー	1	0		
パイナップル	1	0		

3) 表1に示す様に、いずれも14農薬 (Ethoprophos, Chlorpropham, Terbufos, Etrimfos, Pirimifos-methyl, E-dimethylvinphos, Dichlofluanid, Cyhalothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Halfenprox, Flucythrinate, Fluvalinate, Deltamethrin) が回収率70%以上と良好な値が得られた。一方、4農薬 (Metribuzin, Triadimenol, Fensulfothion, Lenacil) は回収率が0%であった。これはGPC操作により、この4農薬が13分~16分の分取画分より遅く溶出するためである。以上の結果より、昨年度までに検討した農薬を含め総計85種の農薬について本分析法による一斉分析が可能であることが判明した。

### 3.3 実態調査

ジュース24検体を用いて実態調査を行った。ジュース3検体より殺虫剤のChlorpyrifosが検出された (表2)。

Scan法による確認を試みたが、低濃度 (0.002ppm以下) であったため夾雑物の影響を受け、スペクトルによる確認が困難であった (図1, 図2)。

よって、MS/MS法による確認を試みた。MS/MS

法では、質量分離によって生成した農薬に由来する特定の質量イオン (プリカーサーイオン) を選択し、不活性ガスによりそのイオンをさらに衝突活性化して分解イオン (プロダクトイオン) を生成させ、このイオンをスキャンすることにより各物質に特有なスペクトルを得ることができる。選択性の向上により夾雑物の影響を低減できるので、食品中の低濃度の農薬を検出する場合において、非常に有効である<sup>9-10)</sup>。まず、Chlorpyrifos標準品のMS/MS測定を行った。Scan測定時のフラグメントイオンの $m/z = 314$ をプリカーサーイオンに選び、プロダクトイオン $m/z = 286$ のクロマトグラム及びMS/MSスペクトルを得た (図3)。次にChlorpyrifosを検出したジュース検体で、同様にMS/MS測定を行い、標準品のクロマトグラムと同じ保持時間にほぼ一致するスペクトルを得る事が出来たことによつて (図4)、Chlorpyrifosであることが確認出来た。また、ChlorpyrifosのMS/MS測定時の検出限界は0.1ng/gであり、SIM測定時の検出限界 (0.2ng/g) とほぼ同じであり高感度分析が可能であった。以上のことより、MS/MS測定が食品中に低

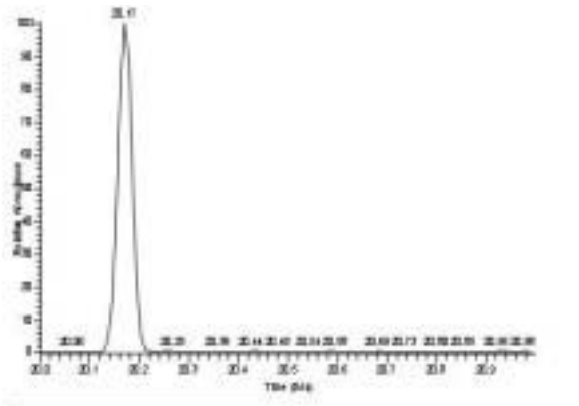


図1 Chlorpyrifos 標準品の Scan 測定のカロマトグラム ( $m/z = 314$ ) 及びスペクトル

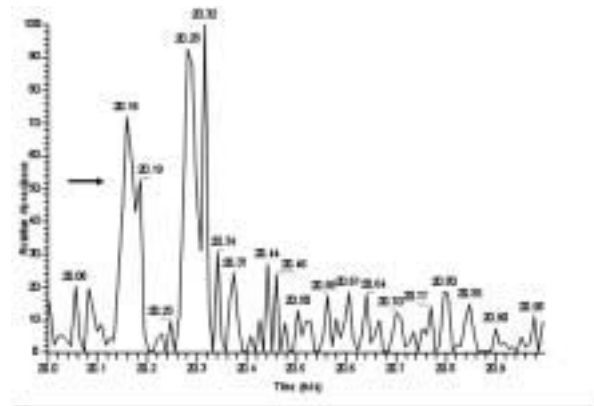


図2 オレンジ抽出液中の Scan 測定のカロマトグラム ( $m/z = 314$ ) 及びスペクトル

濃度含まれる農薬を検出する場合において有効であることが明らかになった。今後、Chlorpyrifos 以外の農薬でも MS/MS 法を用いた測定を検討していきたい。

検出された農薬は、昨年度の市販農産物の実態調査を行った結果<sup>6-7)</sup>と比較して、農薬の種類、濃度共に著しく減少していた。これは調査検体数が昨年度より少なかったということと共に、加工工程による農薬の除去、分解等が考えられる。今回検討した果汁100%ジュースはそのほとんどが、その製造過程で農産物の検査では行わない果物の洗浄や濃縮のため果汁の温度を上昇させる“濃縮還元”の果汁を使用しており、又、オレンジやグレープフルーツなど柑橘類では外皮を使用しない等の農薬を減少させる工程を含んでいた。

#### 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

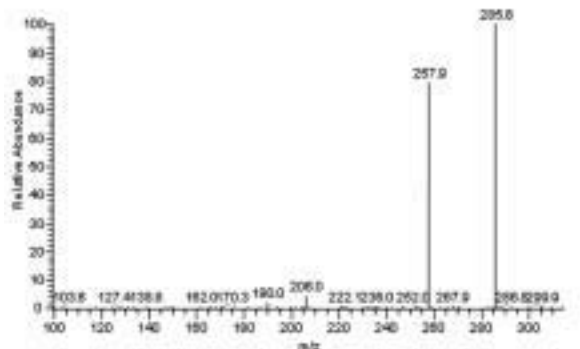
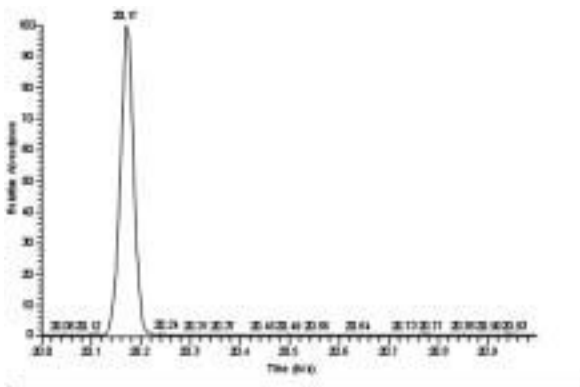


図3 Chlorpyrifos 標準品の MS/MS 測定のカロマトグラム (m/Z = 286) 及びスペクトル

までに検討した71農薬と同時に、総計89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ピングして測定した。検出限界は全ての農薬が0.2 ~ 5 ng/g の範囲であり、高感度分析が可能であった。

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18農薬のうち14農薬が回収率70%以上と良好な値が得られ、昨年度までに検討した農薬を含め総計85種の農薬が本法で一斉分析が可能となった。

3) 本法を用いてジュース24検体の実態調査を行ったところ、3検体から殺虫剤の Chlorpyrifos が低濃度 (0.002ppm 以下) 検出され、MS/MS 法による確認を行った。MS/MS 法が食品中に低濃度含まれる農薬の確認法として極めて有効であることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) 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, 38, (2), 48 - 61, 1997

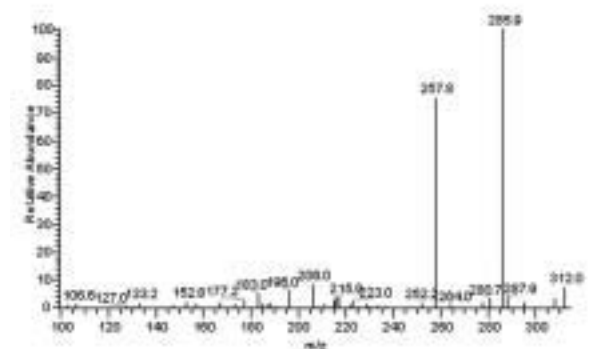
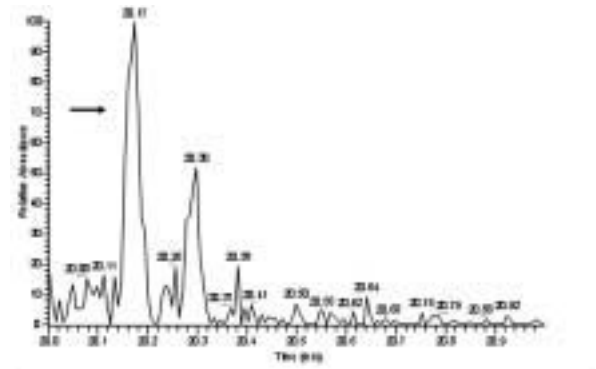


図4 オレンジ抽出液の MS/MS 測定のカロマトグラム (m/Z = 286) 及びスペクトル

- 2) 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 40, (1), 68 - 74, 1999
- 3) 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, 41, (4), 233 - 241, 2000
- 4) Akiyama, Y., Yoshioka, N. and Tsuji, M. : Pesticide residues in agricultural products monitored in Hyogo Prefecture, Japan, FYs 1995-1999, J. AOAC Int., 85, 692-703, 2002
- 5) 柿本芳久, 大谷有二, 舟木紀夫, 篠照雄: GC/MS (SCANモード)及びHPLCによる野菜・果実中残留農薬の多成分一斉分析法, 食衛誌, 44, (5), 253 - 262, 2003
- 6) 難波順子, 劔持堅志, 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, 26, 58 - 64, 2002
- 7) 難波順子, 劔持堅志, 武志保, 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確立と実態調査 -, 岡山県環境保健センター年報, 27, 77 - 82, 2003
- 8) 劔持堅志: 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) 武田和夫, 石黒寛, 田中里恵, 丸山純一, 笠松隆志, 大川真, 堀伸二郎: イオントラップ型GC/MS/MSによる農産物中の残留農薬の多成分分析の検討, 食衛誌, 43 (5), 280 - 288, 2002
- 10) 井上智子, 佐々木さおり, 内川誠二, 平松嘉親, 塩見幸博, 外海泰秀: イオントラップ型GC/MS/MSによる農産物中低濃度レベルの残留農薬測定, 食衛誌, 44, (6), 310 - 315, 2003