ノート

デュアルカラム GC-FPD, -NPD による野菜・果実中の
有機リン系農薬の多成分分析

(平成 13 年 4 月 23 日受理)

上野 英二^{*†} 大島 晴美^{*} 斎藤 勲^{*} 松本 浩^{*}Multiresidue Analysis of Organophosphorus Pesticides in Vegetables and
Fruits Using Dual-column GC-FPD, -NPDEiji UENO[†], Harumi OSHIMA, Isao SAITO and Hiroshi MATSUMOTO(Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi,
Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan; [†] Corresponding author)

We investigated simultaneous and consecutive analytical methods for pesticide residues in large numbers of vegetable and fruit samples. Extraction of the sample with acetonitrile was followed by a salting-out step using a graduated cylinder. Co-extractives were removed by gel permeation chromatography (GPC) and the pesticide eluate was separated to 2 fractions. Firstly, the second fraction (85~125 mL) was passed through a silica-gel mini-column. After putting a Florisil mini-column before the silica-gel mini-column, the first fraction (55~85 mL) was passed through the tandem mini-columns, which were then eluted with 15 mL of 50% acetone/petroleum ether. The eluate was subjected to dual-column GC with dual FPD (P mode, column Rtx[®]-OPPesticides) and NPD (column Rtx[®]-200) detectors.

Recoveries of 63 organophosphorus pesticides from fortified spinach, tomato, apple and strawberry, ranged from 71 to 126% with RSD values of 1~18%, except for the RSDs of omethoate, isoxathion, and pyraclofos (20%<). Detection limits of pesticides were 0.5~2 ng/g.

Surveillance of pesticides in vegetables and fruits was carried out by using the present method. From 20 out of 30 samples, 15 pesticides (39 in total) were detected. The results indicated that the present method can be applied as an efficient and reliable tool for monitoring organophosphorus pesticide residues in vegetables and fruits.

(Received April 23, 2001)

Key words: 有機リン系農薬 organophosphorus pesticide; 多成分分析 multiresidue analysis; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC); デュアルカラム dual-column; デュアル検出器 dual-detection; ガスクロマトグラフィー (FPD, NPD) GC-FPD, -NPD; 野菜・果実 vegetables and fruits

緒言

食品衛生法による規制農薬数は、平成 4 年 10 月の告示改正¹⁾ から 10 回の改正を数えて、現在、昭和 53 年までに設定された 26 農薬から 214 農薬にまで拡大されている。また、全世界では約 700 農薬が使用されているとも言われていることから²⁾、今後、我が国において登録が予想される新規農薬や増加傾向にある生鮮野菜などの輸入食品に対応するために、規制農薬数は更に拡大されていくと考えられる。

このような状況下において、著者らは穀類、豆類及び生鮮野菜などの農産物に残留する多種類の農薬を対象としたモニタリングを行い、実際に残留している農薬について、

調理・加工過程による摂取量の変化に関する検討を行ってきた^{3)~5)}。しかし、これらに関するデータの収集には多種類、多数の検体の分析が必要となることから多大な労力と時間を強いられる。そこで、このようなモニタリングを実施可能とするために、アセトニトリル抽出、メスシリンダーを用いたろ過・塩析及び有機層の分取操作、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 精製及びデュアルカラム-デュアル選択検出器付きガスクロマトグラフィー (GC) を組合せた迅速な多成分分析法を開発している⁵⁾。本報では、GC-FPD, -NPD で分析可能な極性農薬を含む 63 種類の有機リン系農薬を対象として、より多くの検体を連続して感度良く分析するために GPC 及びミニカラムによる精製条件及び GC 条件の検討を行ったところ、特に、野菜・果実について有用性が確認されたので報告する。

[†] 連絡先^{*} 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

実験方法

1. 試料

野菜・果実は名古屋市内の小売店で購入した。

2. 標準品及び試薬

農薬標準品：林純薬工業(株)、和光純薬工業(株)及び Riedel-de-Haën の農薬分析用標準品を用いた。これらの標準品は原則として約 20 mg を正確に量り採ってトルエンに溶解し、正確に 20 mL として標準原液とした。標準原液を予備実験による保持時間をもとにクロマトグラム上のピークが可能な限り重ならないように A, B の 2 グループに分け、アセトンで希釈してそれぞれ添加回収用標準混液とした。また、標準原液と保持指標物質（トリフェニルリン酸 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合し、アセトンで希釈して GC 用の標準混液とした (Table 2)。GPC 溶出試験用標準溶液はアセトン-シクロヘキサン(1:4, v/v)で希釈して用いた。

有機溶媒：アセトニトリル、アセトン、シクロヘキサン及び石油エーテルは和光純薬工業(株)の残留農薬試験用(300 倍濃縮保証品)、酢酸エチルは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用(1,000 倍濃縮保証品)を用いた。

試薬：塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用、その他の試薬は特級品を用いた。

ミニカラム：Waters 社製の Sep-Pak[®] Plus Silica (690 mg) 及び Sep-Pak[®] Plus Florisil (910 mg) を用いた。

3. 装置及び測定条件

3.1 吸引ろ過装置：前報⁵⁾と同様にメスシリンダーを用いた吸引ろ過装置を用いた。

3.2 GPC 装置：前報⁵⁾と同様に(株)島津製作所製の LC-10 装置に昭和電工(株)製の分離カラム CLNpak EV-2000 (20mm i.d.×300 mm) 及びガードカラム CLNpak EV-G (20 mm.i.d.×100 mm) を装着したものをを用いた。

3.3 GC

GC-FPD, -NPD 装置：Hewlett Packard 社製 5890 II (オートサンブラ 7673 付)、デュアルカラム①Restek 社製 Rtx[®]-OPPesticides (0.32 mm i.d.×30 m)、膜厚 0.50 μm (FPD, P モード) ②Restek 社製 Rtx[®]-200 (0.32 mm i.d.×30 m)、膜厚 0.25 μm (NPD)、ガードカラム Rtx[®]-200 (0.53 mm i.d.×2 m)、膜厚 0.10 μm 、カラム温度 60°C (1 min)-10°C/min-200°C-5°C/min-280°C (2 min)、注入口温度 240°C、検出器温度 280°C、キャリアガス：He、キャリアガス圧力プログラム：130 kPa (1 min)-2 kPa/min-194 kPa、注入量：2 μL

GC/MS 装置：(株)島津製作所製 QP-5000/GC-17A (オートインジェクタ AOC-20i, オートサンブラ AOC-20s 付)、カラム J&W Scientific 社製 DB-5 ms (0.25 mm i.d.×30 m)、膜厚 0.25 μm 、カラム温度 60°C (1 min)-10°C/min-200°C-5°C/min-300°C (5 min)、注入口温度 240°C、インターフェース温度 300°C、イオン化電圧：70 eV、検出器ゲイン 1.5 kV、キャリアガス：He、キャリアガス圧力プログラム：70 kPa(1 min)-4 kPa/min-

130 kPa-2 kPa/min-178 kPa、注入量：1 μL

4. 分析操作

GPC 注入用の試料原液の調製は前報⁵⁾と同様に行った。試料原液 2 mL を GPC 装置に注入し、農薬の流出画分として第 1 画分 55~85 mL (11 min-17 min)、第 2 画分 85~125 mL (17 min-25 min) を分取した。各画分は濃縮せずに、第 2 画分をシリカゲルミニカラムを通過させた後、その上部にフロリジルミニカラムを連結して第 1 画分を通過させ、次いで 50% アセトン-石油エーテル 15 mL を通過させた。全通過液を濃縮後、アセトン（保持指標物質としてトリフェニルリン酸 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有）2 mL に溶解して試験溶液とした。定量には FPD (Rtx[®]-OPPesticides) を優先して用い、NPD (Rtx[®]-200) は主に確認に用いた。以上の操作法の概略を Scheme 1 に示した。

結果及び考察

1. GC 条件の検討

今回は、食品衛生法上は規制されていない農薬を含めて

Scheme 1. Sample preparation method for multiresidue analysis of pesticides

我が国や諸外国で使用されており^{2), 6)}, 標準品が入手可能で試験法について検討の必要性が高いと考えられる 63 種類の有機リン系農薬について検討を加えた。検出器は有機リン系農薬を選択的に検出可能な FPD (P モード) 及び NPD とし、分離カラムは 1 つの注入口に並列に接続したデュアルカラム方式として Rtx[®]-OPPesticides (FPD) 及び Rtx[®]-200 (NPD) を、ガードカラムには Rtx[®]-200 を用いた。これらの分離カラムは、農薬分析で一般的に使用されているフェニル-メチル系カラム (DB-5 ms, Rtx[®]-5) やシアノプロピル-メチル系カラム (DB-1701 P, Rtx[®]-1701) などに比べると極性が高く、比較的極性の高い農薬の多い有機リン系農薬の保持に優れている。しかも、高い熱安定性と耐久性を有しているため、カラム温度を高くして短時間に多成分を分析することができる。63 種類の農薬を Table 2 に示す A, B の 2 グループに分けて測定したところ、約 30 分の測定時間ですべての農薬の分離定量が可能となった。特に、Rtx[®]-OPPesticides は多くの有機リン系農薬を一度に測定するために開発されたカラムであり、各農薬を明確に分離する性能を有していることから、NPD に比べてより選択性に優れた FPD に接続して定量に優先して用い、Rtx[®]-200 (NPD) は主として確認に用いた。また、Rtx[®]-200 (NPD) は、極性などの異なる含窒素農薬の分離にも優れていることから、本方式は含窒素農薬も同時に分析可能と考えられた。今後検討する予定である。

Table 2 に Rtx[®]-OPPesticides (FPD) により得られた標準溶液のクロマトグラムから S/N が 3 を示す農薬量を求め、これを試料 50 g 中の濃度に換算した検出限界を示した。両カラムはいずれも GC-FPD, -NPD による高感度分析において高温条件下でも不活性かつ低ブリードであることから、すべての農薬が 0.5~2 ppb の範囲で微量分析可能であった。なお、ガードカラムには不活性処理済シリカチューブを用いたところ、試験溶液を複数回注入すると分離カラムの Y スプリッター接続付近への食品由来成分の付着による影響とみられる分離能の低下現象が起こった。そこで、Rtx[®]-200 をガードカラムに用いたところ分離能が低下してもガードカラムの注入口側を 5~10 cm カットすることで分離能は改善された。両カラムでの農薬標準品の相対保持時間 (R.R.I., トリフェニルリン酸を 1.0 として表示) を Table 1 に、クロマトグラムを Fig. 1 及び 2 に示した。

2. 試料分析法の検討

2.1 抽出法

前報⁵⁾と同様にメスシリンダーを用いた吸引ろ過装置を使用し、ろ過・塩析及びアセトニトリル層の分取操作を行った (Scheme 1)。Table 1 に水-アセトニトリル (1:3, v/v) 200 mL に各農薬を添加し、塩析及びアセトニトリル層の分取操作での回収率を示した。今回検討した 63 種類すべての有機リン系農薬で 70% 以上の回収率が得られたことから、本抽出法は極性農薬を含む広範囲の農薬の多

成分分析に有用であると考えられた。

2.2 精製法

著者らは有機リン系農薬分析において、GPC 及びシリカゲルミニカラム精製法を用いてきた^{5), 7)}。この方法では極性などの異なる多くの農薬の分析が可能であるが、試料由来の妨害成分の除去が必ずしも十分でなく、いくつかの農薬でピークが重なることがある。また、食品の組み合わせによっては十数検体程度の連続分析で GC 装置の注入口インサートやカラムの汚れにより測定感度が低下し、微量レベルでの分析が困難であった。このため色素などの除去に優れたグラファイトカーボン (ENVI-Carb) や弱陰イオン交換ミニカラム (Bond Elut PSA) による精製法など^{8)~11)}を検討したが、多種類の農薬の溶出可能な条件下では、シリカゲルミニカラム同様に妨害成分の除去などが不十分であった。一方、フロリジルミニカラムは、アセフェート、トリクロロホン、ジクロロボスなどはフロリジルに強く吸着するためこれらの農薬を溶出させることは困難であるが、食品由来の色素や油脂などの保持力が強く、高い精製効果が期待できた。また、GPC は流出の速い農薬と色素などの一部妨害成分との分離が困難であるが、油脂など大部分の高分子成分を効率的に除去できることからミニカラムへの負荷を大幅に軽減できた。そこで、GPC とシリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムを組み合わせた精製条件を検討した。Table 1 に各農薬の分子量、GPC カラムからの農薬の流出範囲のほかに、GPC 及びシリカゲルミニカラムによる精製、フロリジルミニカラムによる精製操作での各農薬の回収率を示した。実験方法に示した条件で GPC の流出画分を分けたところ、フロリジルミニカラムによる精製での回収率の低い農薬は、トリクロロホンの 15% が第 1 画分 (55~85 mL) に流出したのを除いて、そのすべてが第 2 画分 (85~125 mL) に流出した。また、第 1 画分は作物によっては着色が認められたが、第 2 画分は着色がほとんど認められず高い精製効果が得られたものと考えられた。そこで、第 2 画分をシリカゲルミニカラムを通過させた後、その上部にフロリジルミニカラムを連結して第 1 画分を通過させ、更に 50% アセトン-石油エーテル 15 mL を通過させ、全通過液を合わせ、濃縮して試験溶液とした。その結果、GPC 流出液の濃縮操作が省略可能となり、かつ精製効果はこれまでの方法^{5), 7)}よりも優れていた。特に、ネギなどのアリウム属野菜やパセリなどでは、凍結リン酸処理法^{5), 12)}と組み合わせることにより妨害成分が効果的に除去された。なお、フロリジルミニカラムは製造メーカー、製造ロットなどにより活性に大きなばらつきが認められたので、数種のミニカラムについて溶出テストを行い適当なものを使用した。Fig. 1 及び 2 にネギ及びパセリ抽出液のクロマトグラムを示した。また、前報で検討対象としたピレスロイド系及び有機塩素系などの農薬は、フロリジルミニカラムによる精製において 10% アセトン-石油エーテル 15 mL ですべての農薬が 75% 以上溶出することから⁵⁾、これらの

Table 1. Relative Retention Index (Triphenylphosphate 1.000), Molecular Weight, GPC Elution Volume and Recovery of Pesticides through Each Analytical Procedure

No.	Compounds	Rtx-OPP (FPD) R.R.I.	Rtx-200 (NPD) R.R.I.	Molecular weight	GPC elution volume (mL)	Recovery (% , mean, <i>n</i> =3)		
						Extraction from aq. soln. ^{b)}	GPC-Silica ^{c)}	Florisil ^{d)}
1	Dimethylphosphite ^{e)}	0.178	0.165					
2	Dichlorvos	0.430	0.423	221	85~ 95 ^{a)}	76	84	68
3	Dichlorvos ^{e)}	0.430	0.423					
4	Methamidophos	0.435	0.435	141	100~110	77	76	0
5	Trichlorfon	0.540	0.539	257	80~ 95	73	72	4
6	Mevinphos E type	0.554	0.564	224	85~100	88	105	75
7	Mevinphos Z type	0.554	0.564	224	85~100	84	96	71
8	Acephate	0.579	0.596	183	90~100	74	87	0
9	Ethoprophos	0.603	0.605	242	70~ 80	84	99	90
10	Phorate	0.605	0.600	260	70~ 80	81	102	98
11	Cadusafos	0.619	0.618	270	65~ 75	88	95	93
12	Sulfotep	0.623	0.625	322	65~ 75	77	95	103
13	Dioxabenzofos	0.633	0.638	216	100~110	84	98	95
14	Diazinon	0.642	0.641	304	60~ 70	93	99	97
15	Terbufos	0.646	0.645	288	65~ 75	96	94	100
16	Etrimfos	0.663	0.665	292	70~ 80	95	98	103
17	Omethoate	0.668	0.691	213	100~110	76	81	0
18	Dichlofenthion	0.692	0.695	315	70~ 80	84	97	96
19	Chlorpyrifos-methyl	0.699	0.702	323	85~ 95	88	99	91
20	Dimethoate	0.701	0.720	229	90~100	90	94	64
21	Iprobenphos	0.702	0.710	288	65~ 80	89	95	96
22	Monocrotophos	0.710	0.738	223	85~ 95	77	94	35
23	Tolclofos-methyl	0.714	0.719	301	85~100	90	97	100
24	Pirimiphos-methyl	0.719	0.722	305	70~ 80	89	103	100
25	Cyanophos	0.725	0.741	243	90~100	96	98	96
26	Chlorpyrifos	0.740	0.739	351	70~ 85	89	96	101
27	Fenthion	0.749	0.752	278	90~100	98	103	98
28	Formothion	0.767	0.785	257	90~105	104	92	93
29	Phosphamidon E type	0.769	0.791	300	75~ 85	98	91	77
30	Parathion-methyl	0.779	0.790	263	90~100	94	97	95
31	Malathion	0.787	0.795	330	70~ 85	101	101	91
32	Dimethylvinphos Z type	0.792	0.799	332	80~ 95	95	96	95
33	Fenitrothion	0.800	0.809	277	85~100	93	92	102
34	Bromophos-ethyl	0.800	0.793	395	65~ 80	92	97	102
35	Quinalphos	0.805	0.804	298	75~ 90	88	92	105
36	Phenthoate	0.807	0.808	320	80~ 90	94	96	97
37	Isofenphos	0.813	0.812	345	60~ 70	93	96	101
38	Chlorfenvinphos E type	0.818	0.822	360	70~ 80	88	95	103
39	Prothiophos	0.821	0.812	345	65~ 75	95	93	103
40	Phosphamidon Z type	0.827	0.849	300	75~ 90	96	93	79
41	Parathion	0.830	0.836	291	75~ 85	99	95	105
42	Chlorfenvinphos Z type	0.832	0.836	360	70~ 85	90	96	102
43	Mecarbam	0.849	0.854	329	70~ 85	92	99	101
44	Fosthiazate 1	0.853	0.864	283	85~100	97	98	75
45	Fosthiazate 2	0.856	0.867	283	85~100	96	102	78
46	Methidathion	0.858	0.860	302	95~110	92	96	101
47	Profenofos	0.865	0.861	374	75~ 85	97	107	93
48	Tetrachlorvinphos	0.865	0.868	366	80~ 95	90	93	99
49	Butamifos	0.890	0.890	332	65~ 75	84	89	102
50	Sulprofos	0.906	0.897	322	75~ 90	99	94	98
51	Carbophenothion	0.914	0.902	343	75~ 85	91	96	103
52	Ethion	0.916	0.909	385	65~ 80	95	95	100
53	Isoxathion	0.926	0.928	313	75~ 90	98	96	107
54	Edifenphos	0.958	0.955	310	85~100	101	96	90
55	Triazophos	0.967	0.969	313	80~ 95	94	93	102
56	Triphenylphosphate ^{f)}	1.000	1.000					
57	Cyanofenphos	1.016	1.020	303	80~ 95	96	90	107
58	Leptophos	1.023	1.006	412	75~ 90	90	98	100
59	Fensulfotioin	1.033	1.050	308	85~100	92	78	97
60	Phosmet	1.083	1.091	317	105~120	100	96	88
61	EPN	1.085	1.088	323	80~ 95	94	91	100
62	Piperophos	1.091	1.096	354	65~ 80	89	95	99
63	Pyridaphenthion	1.093	1.105	340	80~ 95	88	88	100
64	Azinphos-methyl	1.126	1.131	317	115~125	107	101	83
65	Phosalone	1.135	1.142	368	75~ 90	97	89	99
66	Pyrazophos	1.157	1.165	373	75~ 85	90	91	103
67	Pyraclufos	1.160	1.166	361	75~ 90	113	103	91
68	Azinphos-ethyl	1.163	1.168	345	90~105	100	91	101
69	Dialifos	1.164	1.170	394	75~ 90	93	95	98
70	Coumaphos	1.299	1.327	363	80~ 95	104	91	97

^{a)} Figures show the elution range.^{b)} Extraction from aq.-acetonitrile solution: 2 µg of pesticides were spiked into 200 mL of aq.-acetonitrile (1 : 3, v/v).^{c)} GPC and Sep-Pak Plus Silica: 1 µg of pesticides were loaded on the column and eluant (fraction of 55~125 mL) were collected. The eluant were loaded on the cartridge and eluted with 15 mL of 50% acetone-pet. ether.^{d)} Sep-Pak Plus Florisil: 1 µg of pesticides were loaded on the cartridge and eluted with 15 mL of 50% acetone-pet. ether.^{e)} Degradation products of trichlorfon standard^{f)} Retention index standard

Fig. 1. GC/FPD chromatograms of pesticide standard mixtures, vegetables extracts spiked retention index standard (triphenylphosphate)

Peak numbers correspond to numbers of pesticides on Table 1

A-1: Pesticide standard mixture A

A-2: Pesticide standard mixture B

A-3: Spring onion extract (no residue)

A-4: Parsley extract (no residue)

A-5: Parsley extract (detect diazinon and EPN)

GC conditions are shown in the text.

Fig. 2. GC/NPD chromatograms of pesticide standard mixtures, vegetables extracts spiked retention index standard (triphenylphosphate)

Peak numbers correspond to numbers of pesticides on Table 1

B-1: Pesticide standard mixture A

B-2: Pesticide standard mixture B

B-3: Spring onion extract (no residue)

B-4: Parsley extract (no residue)

B-5: Parsley extract (detect diazinon and EPN)

GC conditions are shown in the text.

Table 2. Recoveries of Spiked Pesticides from Vegetables and Fruits

Compounds	Spiking level ^{a)} (ng/g)	Group ^{b)}	Recovery (% , mean $\pm$ SD, $n=3$) ^{c)}				LOD ^{d)} (ng/g)
			Spinach	Tomato	Apple	Strawberry	
Acephate	40	A	74 $\pm$ 14	81 $\pm$ 7	83 $\pm$ 9	78 $\pm$ 7	2
Azinphos-ethyl	40	A	81 $\pm$ 6	94 $\pm$ 3	86 $\pm$ 3	84 $\pm$ 8	0.6
Azinphos-methyl	40	B	85 $\pm$ 15	100 $\pm$ 8	111 $\pm$ 5	97 $\pm$ 3	1
Bromophos-ethyl	20	B	77 $\pm$ 7	94 $\pm$ 4	89 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4	0.6
Butamifos	20	A	92 $\pm$ 2	89 $\pm$ 5	94 $\pm$ 1	84 $\pm$ 6	0.5
Cadusafos	20	B	81 $\pm$ 5	86 $\pm$ 6	95 $\pm$ 12	86 $\pm$ 5	0.7
Carbophenothion	40	A	94 $\pm$ 1	96 $\pm$ 2	93 $\pm$ 6	85 $\pm$ 6	1
Chlorfenvinphos	40	B	87 $\pm$ 10	88 $\pm$ 2	89 $\pm$ 5	76 $\pm$ 5	1
Chlorpyrifos	20	A	92 $\pm$ 2	91 $\pm$ 3	96 $\pm$ 1	93 $\pm$ 3	0.5
Chlorpyrifos-methyl	20	B	77 $\pm$ 11	97 $\pm$ 1	92 $\pm$ 3	91 $\pm$ 4	0.5
Coumaphos	40	B	83 $\pm$ 16	99 $\pm$ 3	104 $\pm$ 5	95 $\pm$ 1	1
Cyanofenphos	40	A	90 $\pm$ 1	92 $\pm$ 4	87 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	0.6
Cyanophos	20	B	89 $\pm$ 10	108 $\pm$ 3	106 $\pm$ 5	101 $\pm$ 4	0.5
Dialifos	40	B	78 $\pm$ 10	82 $\pm$ 7	85 $\pm$ 12	89 $\pm$ 9	2
Diazinon	20	B	89 $\pm$ 2	94 $\pm$ 4	100 $\pm$ 8	83 $\pm$ 4	0.6
Dichlofenthion	20	B	91 $\pm$ 8	96 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2	90 $\pm$ 1	0.5
Dichlorvos	40	A	83 $\pm$ 8	88 $\pm$ 9	92 $\pm$ 6	81 $\pm$ 6	1
Dimethoate	20	A	89 $\pm$ 4	95 $\pm$ 3	92 $\pm$ 4	86 $\pm$ 4	0.6
Dimethylvinphos	20	B	82 $\pm$ 8	93 $\pm$ 7	106 $\pm$ 12	79 $\pm$ 4	0.5
Dioxabenzofos	20	B	91 $\pm$ 18	95 $\pm$ 13	97 $\pm$ 14	95 $\pm$ 12	0.5
Edifenphos	40	B	84 $\pm$ 6	100 $\pm$ 5	106 $\pm$ 8	101 $\pm$ 8	1
EPN	40	A	91 $\pm$ 11	88 $\pm$ 7	90 $\pm$ 3	99 $\pm$ 6	0.8
Ethion	40	B	80 $\pm$ 5	93 $\pm$ 3	108 $\pm$ 7	86 $\pm$ 3	0.6
Ethoprophos	20	B	92 $\pm$ 5	100 $\pm$ 9	99 $\pm$ 7	96 $\pm$ 6	0.5
Etrimphos	20	A	89 $\pm$ 2	88 $\pm$ 2	88 $\pm$ 3	90 $\pm$ 3	0.5
Fenitrothion	20	A	92 $\pm$ 4	91 $\pm$ 1	88 $\pm$ 1	94 $\pm$ 3	0.5
Fensulfothion	40	A	92 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	77 $\pm$ 7	85 $\pm$ 2	0.7
Fenthion	40	B	81 $\pm$ 4	96 $\pm$ 3	94 $\pm$ 2	85 $\pm$ 3	0.5
Formothion	40	A	89 $\pm$ 5	98 $\pm$ 2	93 $\pm$ 3	100 $\pm$ 4	2
Fosthiazate	40	B	89 $\pm$ 6	95 $\pm$ 7	105 $\pm$ 12	96 $\pm$ 11	1
Iprobenfos	20	B	83 $\pm$ 7	73 $\pm$ 16	74 $\pm$ 17	76 $\pm$ 14	0.5
Isofenphos	20	B	77 $\pm$ 17	86 $\pm$ 14	95 $\pm$ 15	72 $\pm$ 17	0.7
Isoxathion	40	A	97 $\pm$ 23	99 $\pm$ 23	122 $\pm$ 24	88 $\pm$ 17	1
Leptophos	40	B	81 $\pm$ 10	87 $\pm$ 2	87 $\pm$ 4	88 $\pm$ 3	0.8
Malathion	20	A	86 $\pm$ 4	89 $\pm$ 2	93 $\pm$ 2	88 $\pm$ 3	0.6
Mecarbam	20	A	85 $\pm$ 4	87 $\pm$ 6	88 $\pm$ 3	88 $\pm$ 5	0.7
Methamidophos	40	B	119 $\pm$ 11	106 $\pm$ 13	121 $\pm$ 15	123 $\pm$ 15	1
Methidathion	40	A	96 $\pm$ 6	98 $\pm$ 4	94 $\pm$ 3	101 $\pm$ 4	0.6
Mevinphos	20	B	97 $\pm$ 8	102 $\pm$ 16	106 $\pm$ 16	101 $\pm$ 12	0.6
Monocrotophos	40	A	81 $\pm$ 10	92 $\pm$ 7	81 $\pm$ 3	71 $\pm$ 2	0.8
Omethoate	40	B	119 $\pm$ 21	117 $\pm$ 21	121 $\pm$ 21	107 $\pm$ 16	0.6
Parathion	20	A	92 $\pm$ 3	93 $\pm$ 1	88 $\pm$ 1	95 $\pm$ 2	0.5
Parathion-methyl	20	B	104 $\pm$ 9	102 $\pm$ 2	103 $\pm$ 3	94 $\pm$ 4	0.5
Phenthoate	20	B	73 $\pm$ 8	88 $\pm$ 4	99 $\pm$ 7	88 $\pm$ 1	0.6
Phorate	20	A	71 $\pm$ 10	86 $\pm$ 6	92 $\pm$ 5	74 $\pm$ 13	0.9
Phosalone	40	A	80 $\pm$ 10	95 $\pm$ 3	88 $\pm$ 3	95 $\pm$ 7	1
Phosmet	40	B	83 $\pm$ 10	89 $\pm$ 7	101 $\pm$ 3	97 $\pm$ 1	0.9
Phosphamidon	40	B	91 $\pm$ 12	106 $\pm$ 11	105 $\pm$ 11	89 $\pm$ 7	1
Piperophos	40	B	85 $\pm$ 4	93 $\pm$ 9	102 $\pm$ 11	89 $\pm$ 10	1
Pirimiphos-methyl	20	A	78 $\pm$ 6	82 $\pm$ 8	79 $\pm$ 4	79 $\pm$ 6	0.6
Profenofos	20	B	86 $\pm$ 6	95 $\pm$ 7	105 $\pm$ 13	104 $\pm$ 10	0.7
Prothiophos	20	A	90 $\pm$ 2	93 $\pm$ 3	88 $\pm$ 1	90 $\pm$ 3	0.6
Pyraclofos	40	B	101 $\pm$ 12	109 $\pm$ 17	126 $\pm$ 25	125 $\pm$ 26	1
Pyrazophos	40	A	100 $\pm$ 3	97 $\pm$ 2	94 $\pm$ 1	99 $\pm$ 4	0.8
Pyridaphenthion	40	A	78 $\pm$ 7	91 $\pm$ 8	88 $\pm$ 4	94 $\pm$ 8	0.6
Quinalphos	40	A	82 $\pm$ 4	87 $\pm$ 7	85 $\pm$ 6	79 $\pm$ 6	1
Sulfotep	20	A	88 $\pm$ 4	93 $\pm$ 3	94 $\pm$ 2	92 $\pm$ 5	0.4
Sulprofos	40	B	72 $\pm$ 4	87 $\pm$ 2	91 $\pm$ 4	72 $\pm$ 3	0.9
Terbufos	20	A	78 $\pm$ 3	85 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	72 $\pm$ 13	0.7
Tetrachlorvinphos	20	A	78 $\pm$ 6	80 $\pm$ 9	85 $\pm$ 6	88 $\pm$ 6	0.6
Tolclofos-methyl	20	B	95 $\pm$ 10	94 $\pm$ 2	92 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2	0.5
Triazophos	40	A	88 $\pm$ 6	92 $\pm$ 6	88 $\pm$ 2	100 $\pm$ 7	0.8
Trichlorfon	60	B	76 $\pm$ 13	78 $\pm$ 18	81 $\pm$ 18	84 $\pm$ 14	1

a) Amount of pesticides spiked into samples

b) Pesticide standard mixture A and B were spiked into several samples.

c) Recoveries were calculated from the GC/FPD peak area.

d) Limit of detection calculated from signal and noise of standard solution (GC/FPD, S/N=3)

Table 3. Analytical Result of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Sample	No. of sample	No. of positive	Pesticide residues (ng/g) ^{a)}
Cabbage	2	2	Acephate, 510; Methamidophos, 64; Tolclofos-methyl, 6 Tolclofos-methyl, 53
Chrysanthemum	1	1	Chlorpyrifos, 18; Cyanophos, 6; Fenitrothion, 5;
Cucumber	2		nd nd
Egg plant	2	1	Sulprophos, 43 nd
Komatsuna	1		nd
Lettuce	2	2	Acephate, 32; Fosthiazate, 10 Malathion, 9
Parsley	1	1	Diazinon, 16; EPN, 13,000
Perilla	2	1	Pyridaphenthion, 1,200 nd
Rape green	1		nd
Spinach	1	1	Fenitrothion, 8
Tomato	2	1	Fenitrothion, 18 nd
Watercress	1		nd
Apple	2	2	Chlorpyrifos, 5 Chlorpyrifos, 7; Chlorpyrifos-methyl, 3; Prothiophos, 4 nd
Grapes	1		nd
Japanese pear	2	2	Cyanophos, 7; Diazinon, 10; Fenitrothion, 250; Methidathion, 17; Phenthoate, 180 Methidathion, 10
Nectarine	2	2	Chlorpyrifos, 19; Cyanophos, 12; Fenitrothion, 6 Chlorpyrifos, 6; Diazinon, 9; Prothiophos, 4
Peach	2	2	Chlorpyrifos, 6; Cyanophos, 12 Diazinon, 10; Fenitrothion, 11
Prune	2	1	Chlorpyrifos, 8; Diazinon, 5 nd
Strawberry ^{b)}	1	1	Malathion, 18
Total	30	20	39 pesticides ^{c)}

“nd” not detected

^{a)} Values were calculated from the GC/FPD peak area.

^{b)} Imported from America

^{c)} The total number of pesticides

農薬を同時に分析可能と考えられた。含窒素農薬などを含めて今後検討する予定である。

2.3 GCによる測定

実験方法に示したように、定量にはFPD（カラム：Rtx[®]-OPPesticides）を優先して用いたが、ネギなどのアリウム属野菜などでは試料由来の硫黄化合物の影響を受けにくいNPD（カラム：Rtx[®]-200）を用いた。このようにデュアルカラム-デュアル検出器方式を用いると、検出されたピークが農薬か否かを短時間に定性し、定量する上で非常に有用であった。

GC-FPD、-NPDによる定性・定量に続いて、検出された農薬をGC/MS（SIMモード）を用いて1農薬につき2～3種のフラグメントイオンをモニターして測定したところ、一部の農薬では夾雑成分の影響からイオン強度比が一致せず確認が困難であった。しかし、試料原液を再度GPC装置に供し検出された各農薬のGPC流出画分のみを選択的に分取精製することにより全農薬を同定することが可能であった。また、試験溶液を連続して測定した後も

注入口インサートやカラムの汚れによる農薬の吸着、分離能の低下は、これまでの方法^{5), 7)}よりも少なかった。以上のことから本法は多種類・多数の検体を分析するモニタリングに有用であると考えられた。

3. 添加回収実験

本法は、予備実験による検討結果から、穀類、豆類及び生鮮野菜などの多くの農作物に適用可能と考えられたが、今回は前報⁵⁾と同様に、ホウレンソウ、トマト、リンゴ及びイチゴの細切試料に添加回収用標準混液1 mLを添加後、1時間放置したものについて回収率を求め、その結果をTable 2に示した。GPCの第1画分に一部が溶出するトリクロロホン、濃縮操作中に揮散しやすいジクロロボスなどを含めても、63種類すべての農薬で70%以上と良好な回収率が得られた。なお、フェンチオン、テルブホスなどのチオエーテル基を有する農薬は、酢酸エチル溶液の濃縮操作中に酸化によると考えられる絶対量の減少が認められたが^{5), 7)}、購入後2か月以内の酢酸エチルを、開封後は当日中に使用することによって回収率を改善することが

可能となった。また、実験方法に示したように品質の高い酢酸エチルを使用することも回収率の改善に有効であると考えられた。本法における添加回収率の相対標準偏差はオメトエート、イソキサチオン及びピラクロホスの3農薬を除く60農薬で20%未満であった (Table 2)。

4. 実態調査

本法を用いて平成12年8月に野菜・果実30検体について実態調査を行い、その結果をTable 3に示した。20検体から15種類の農薬 (平均2.0種類/検体) が検出された。代表例としてダイアジノン及びEPNの検出されたパセリのクロマトグラムをFig. 1及びFig. 2に示した。

農薬の検出率は、野菜類が55.6%、果実類が83.3%と同報⁴⁾と同様に果実類が高かった。また、農薬の残留量を食品衛生法の残留基準、あるいは農薬取締法の登録保留基準と比較したところ (パセリ中のEPN、リンゴ中のクロルピリホスメチル、ネクタリン中のフェニトロチオン及びプロチオホスは基準値未設定のため除く)、基準値に対する検出値の百分率は野菜類が平均値283.9% (中央値6.4%)、果実類が平均値19.2% (中央値5.0%)と野菜類が高かった。これは、オオバ中のピリダフェンチオン (1,200 ppb) など葉菜類で高濃度残留が認められたためである。次に、EPN (13,000 ppb) が検出されたパセリ、ピリダフェンチオン (1,200 ppb) が検出されたオオバを用いて、既報³⁾に準じて水道水によるすすぎ洗いを行い、オオバについてはこすり洗いを行った後、再度分析した。その結果、農薬の除去率は、すすぎ洗いではパセリ中のEPNが2.1%及びオオバ中のピリダフェンチオンが1.7%と除去率は低かったが、こすり洗いではオオバ中のピリダフェンチオンは17.9%が除去された。

この実態調査に要した日数は、自動化されたGPC及びGCにより昼夜分析を行っておよそ3日であった。

ま と め

極性農薬を含む有機リン系農薬を対象として、多種類・多数の検体を連続して感度よく分析可能な農薬残留モニタリングのための多成分分析法を検討したところ、以下のとおり本法が迅速性に優れた信頼性のある分析法であることが確認された。

1. 選択性に優れたFPD (Rtx[®]-OPPesticides) と試料由来の硫黄化合物の影響を受けにくいNPD (Rtx[®]-200) を用いたデュアルカラム・デュアル検出器方式により、野菜・果実中の63種類の有機リン系農薬を約30分で分離定量することが可能となり、分析時間の大幅な短縮が図られた。

2. GPCの農薬流出画分を2分しての精製、それに付加するミニカラム精製条件を確立し、多数の検体を連続してGC測定することが可能となった。

3. 本法における添加回収率は、63種の全農薬について70%以上、相対標準偏差はオメトエート、イソキサチオン及びピラクロホスの3農薬を除いて20%未満、検出限

界はいずれの農薬も0.5~2 ppbと良好であった。

4. 本法を用いて、野菜・果実30検体について実態調査を行った結果、20検体から15種類の農薬 (平均2.0種類/検体) が検出された。

文 献

- 1) 厚生省告示第239号 (1992) “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成4年10月27日。
- 2) Shibuya, S. *et al.* eds., “SHIBUYA INDEX—1999—”, 8th Ed., Tokyo, Shibuya index research group, 1998.
- 3) Ueno, E., Okuda, K., Nakashima, H., Takakura, K., Okazaki, K., Sugiyama, H., Residues of organophosphorus pesticides in cabbage. *Shokuhin Eisei Kenkyu* (Food Sanitation Research), **46**(12), 57–66 (1996).
- 4) Saito, I., Yamada, S., Oshima, H., Hayakawa, J., Identification of phthalide in brown rice using GC / AED. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho* (Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health), **47**, 7–11 (1997).
- 5) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Multi-residue analysis of pesticides in foods using acetonitrile extraction, GPC and mini-column cleanup, dual-column GC-ECD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **41**, 178–187 (2000).
- 6) 日本植物防疫協会編 (農林水産省農産園芸局植物防疫課監修) “農薬要覧—2000—” 東京, (社)日本植物防疫協会, 2000.
- 7) Saito, I., Yamada, S., Oshima, H., Hayakawa, J., Multi residue method for determination of pesticides using Luke method extraction, gel permeation chromatography and gas chromatography. *Nippon Nouyaku Gakkaishi* (Journal of Pesticide Science), **20** (2), 109–118 (1995).
- 8) Fillion, J., Hindle, R., Lacroix, M., Selwyn, J., Multi-residue determination of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 1,252–1,266 (1995).
- 9) Akiyama, Y., Yano, M., Mitsushashi, T., Takeda, N., Tsuji, M., Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **37**, 351–362 (1996).
- 10) Shibata, Y., Oyama, M., Sato, H., Nakao, K., Tsuda, M., Sonoda, M., Tanaka, F., Simultaneous cleanup method for multi pesticide residue analysis by GC and HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **39**, 241–250 (1998).
- 11) Committee on analytical method of pesticide residue, Commentary on the method for multiresidue pesticide analysis (1). *Shokuhin Eisei Kenkyu* (Food Sanitation Research), **47**(5), 27–41 (1997).
- 12) Chonan, T., Rapid determination of organophosphorus pesticides in onion and welsh onion by homogenization of frozen sample in dilute phosphoric acid. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **33**, 543–547 (1992).