

GCによる農産物中の残留農薬の多成分分析法 ()
- Envi-Carb/NH₂及びFLOカートリッジカラム精製による
有機塩素系及びピレスロイド系農薬の分析 -

西田政司¹・阿部圭子²

Multiresidue Analysis of Pesticides in Agricultural Products by GC ()
- Organochlorine Pesticides and Pyresroids Analysis
Using Envi-Carb/NH₂ and FLO Cartridge Column Cleanup -

Seiji NISHIDA and keiko ABE

Summary

A method for multiresidue analysis of 36 pesticides in agricultural products by GC-ECD using Envi-Carb/NH₂ and FLO mini-column cleanup was developed. The pesticides in cereals and pulse were extracted with acetonitrile, and those in vegetable and fruits were extracted with ethyl acetate. The fats in the extract were partitioned between acetonitrile and n-hexane. Acetonitrile and ethyl acetate layer were evaporated to dryness, and the residue was filled up to 10mL with 6% ether-hexane. Two mL of the solution were evaporated to dryness, and dissolved with 2mL of 25% toluene-acetonitrile, then cleaned up with Envi-Carb/NH₂ cartridge column. The pesticides were eluted from the column with 20mL of 25% toluene-acetonitrile. The elution was evaporated to dryness, and dissolved with 1mL of 15% ether-hexane. The solution was applied to FLO cartridge column, and the pesticides were eluted with 20mL of 15% ether-hexane and 10% acetone-hexane. Recoveries of the pesticides added to 5 species of agricultural products at 0.01 ~ 0.05 µg/g were 62 ~ 159%.

Key Words : Envi-Carb/NH₂ カートリッジカラム Envi-Carb/NH₂ cartridge column, フロリジル
カートリッジカラム FLO cartridge column, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticide, ピレス
ロイド系農薬 pyresroid, 農産物 agricultural products, ガスクロマトグラフィー GC

はじめに

平成 15 年度より 3 年間で約 200 農薬に新たに基準が設けられるため、検査対象農薬が倍増することになる。

このため 15 年度以降しばらくは検査方法の検討に相当な時間と労力を要すると予想される。

現在当所では農産物中に残留する農薬を抽出後、液/液分配により脱脂し、その一部で FPD, HPLC 項目の農薬を測定している。残りは 5% 含水フロリジル (FLO)

カラムで精製後、4 画分に分けて ECD, NPD 項目の農薬を測定し、7 ~ 10 日で 130 農薬を検査している¹⁻⁴⁾。

機器による測定は全て自動化しているが、GC の測定時間は 1 回で約 40 分間を要し、1 回の検査 (約 20 件程度) では標準液を含めて約 100 回の測定が必要であり、昼夜連続運転しても GC 測定時間に約 2.5 日を要する。

そこで、現有機器による測定時間の短縮、前処理操作の簡素化及び溶媒の使用量を減らすことを目的として、穀類・豆類をアセトニトリル、青果物を酢酸エチルで抽出し、抽出液を GC-FPD, GC-ECD, NPD 及び HPLC 検査用に分けて系統分析する方法の検討を行った。

ここでは農産物の抽出液を Envi-Carb/NH₂ 及び FLO カートリッジカラムで精製し、有機塩素系及びピレスロイド系の 36 農薬を分析する方法を検討したので、その

1.福岡市保健環境研究所 衛生化学部門

(現所属：福岡市下水道局水質管理課)

2.福岡市保健環境研究所 衛生化学部門

(現所属：福岡市西区保健福祉センター衛生課)

結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

農薬標準試薬：和光純薬工業(株), 林純薬工業(株), Dr. Ehrenstorfer GmbH 社, Riedel de Haen 製残留農薬分析用標準試薬 10 ~ 20mg をアセトン 10 ~ 20mL に溶解し, 1000mg/L 標準原液を調製した。

上記標準原液を保持時間が異なるよう 3 グループに分けて混合標準液(0.5 ~ 2.5mg/L)を調製した。

混合標準液 A：テフルトリン, γ -BHC, クロロタロニル, ヘプタクロルエポキシド, ディルドリン, エンドリン, op -DDT, ビフェノックス, デルタメトリン各 0.5mg/L, ピフェントリン, アクリナトリン, シフルトリン, フルシトリネート, フルバリネート各 2.5mg/L
混合標準液 B： γ -BHC, δ -BHC, ϵ -BHC, ヘプタクロル, アルドリン, op -DDE, pp -DDE, op -DDD, pp -DDD, pp -DDT, シハロトリン, トラロメトリン各 0.5mg/L, ジクロフルアニド, プロシミドン, ペルメトリン, ハルフェンプロックス, シペルメトリン, フェンバレレート各 2.5mg/L

混合標準液 C：フィプロニル 0.5mg/L, ピリフェノックス Z, ピリフェノックス E 各 1.25mg/L, ピラゾキシフェン 2.5mg/L

n-ヘキサン, アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, トルエン, 無水硫酸ナトリウム：市販の残留農薬分析用。

Envi-Carb/ NH_2 カートリッジカラム：SPELCO Envi-Carb (500mg)/ NH_2 (500mg), 3mL, Tube。

FLO カートリッジカラム：WATERS, Sep-Pak Florisil (1g)。

2. GC測定条件

GC-ECD：HEWLETT PACKARD 5890 SERIES ,
カラム：RESTEK Rtx-50(0.25mm i.d. × 30m, 膜厚 0.1 μ m),

カラム温度：100 (1.5分) 20 /分 170 7 /分 280 (10分), 注入口温度：230 , 検出器温度：300 ,

ガス流量：定流量 40cm³/秒(100) ,

注入量：2.0 μ L ,

注入方法：スプリットレス

3. 検体

農産物中の残留農薬を検査する時ガスクロマトグラム

上の妨害が問題になる穀類の玄米, 野菜のキャベツ, 果物のオレンジ, アリル野菜のたまねぎ及び脂肪の多い大豆を用いた。

4. 検査方法

1) 抽出

(1) 穀類・豆類

農産物をミキサーで粉砕し調製した試料 10g を 300mL 遠沈管に採り, アセトニトリル 70mL を加え, 一夜放置後 10 分間振とうし, 200mL 分液ロートに 5A ろ紙でろ過し, 残渣をアセトニトリル 10mL で 3 回洗い込む。これにアセトニトリル飽和ヘキサン 40mL を加え, 5 分間振とうし, アセトニトリル層を 200mL ナシ型フラスコに取り, 濃縮・乾固後, 6%エーテル/ヘキサンで溶解し, 10mL に定容して抽出液とした。

(2) 青果物

農産物を細切後, ミキサーで粉砕し調製した試料 10g を 300mL 遠沈管に採り, 酢酸エチル 50mL と無水硫酸ナトリウム 50g を加え, ホモジナイズした。上澄み液を 5A ろ紙でろ過し, 残渣に酢酸エチル 50mL を加え同様の操作をし, 残渣を酢酸エチル 10mL で 2 回洗浄し, 濃縮・乾固後, 6%エーテル/ヘキサンで溶解し, 10mL に定容して抽出液とした。

2) 精製

抽出液は GC-FPD 検査用に 1mL を, HPLC 検査用に 5mL を分取した。

2mL を GC-ECD, NPD 検査用に濃縮・乾固し, 25%トルエン/アセトニトリル 2mL に溶解し, あらかじめ 25%トルエン/アセトニトリル 20mL で調整した Envi-Carb/ NH_2 カートリッジカラムに負荷し, 25%トルエン/アセトニトリル 20mL で溶出した。溶出液を濃縮・乾固し, 1%アセトン/ヘキサン 1mL に溶解し, その 0.9mL を GC-NPD 用検液とした。

0.1mL をあらかじめ 15%エーテル/ヘキサン 10mL で調整した FLO カートリッジカラムに負荷し, 15%エーテル/ヘキサン 20mL, 10%アセトン/ヘキサン 20mL で溶出し, それぞれ濃縮・乾固し, ヘキサン 1mL で溶解し, GC-ECD 用検液(第 1 画分, 第 2 画分)とした。

GC-ECD には検液 2.0 μ L をスプリットレス注入した。

Fig.1 に分析のフローシートを示す。

結果及び考察

1. 抽出溶媒の選択

極性の高い農薬から低い農薬まで一斉に抽出するためには試料中の水分を除く必要がある。また穀類・豆類は

水分含量が少なく、脂肪を多く含むので、脂肪を除去する必要がある。

そこで、穀類・豆類の抽出はアセトニトリルで行い、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂を行った。

青果物は水分を多く含むので 酢酸エチルを加えた後、試料の 5 倍量の無水硫酸ナトリウムを加え、ホモジナイズして抽出した。アリル野菜は農産物の 2%相当のリン酸を加えながらミキサーで粉碎した⁵⁾。

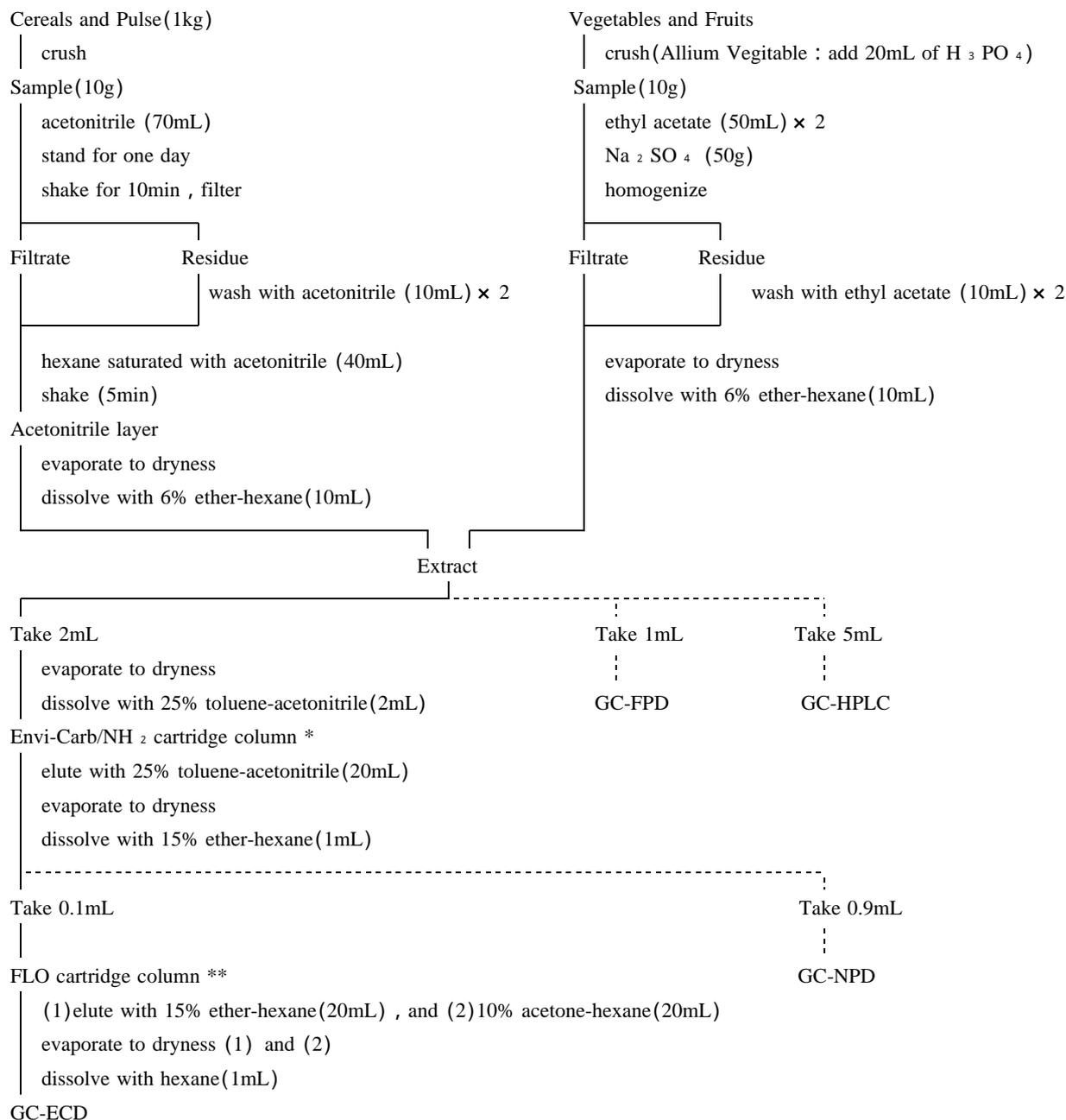


Fig.1 Analytical procedure for pesticides in agricultural products

* : conditioned with 25% toluene-acetonitrile(20mL)

** : conditioned with 15% ether-hexane(10mL)

2. Envi-Carb/NH₂カートリッジカラムによる精製

抽出液の精製は迅速性を重視して様々なカートリッジカラムが使用されているが⁶⁻¹⁰⁾、今回は Envi-Carb/NH

2カートリッジカラムに負荷し、25%トルエン-アセトニトリルで溶出させる柴田ら¹¹⁾の方法で検討した。即ち、キャベツ10gに混合標準液 0.2mL を添加し、1.1)。(2)

の方法で得た抽出液を乾固し、25%トルエン-アセトニトリル 10mL で定容した溶液 2 ~ 6mL を Envi-Carb/NH₂カートリッジカラムに負荷し、25%トルエン-アセトニトリルで溶出させたところ、3mL 以上負荷した時は GC クロマトグラム上の妨害ピークが多くなったので負荷量は 2mL とした。

また今回検討した全ての農薬は 20mL までに溶出したので溶出液量は 20mL とした。

3. FLOカートリッジカラムによる精製

玄米10gに混合標準液 0.2mL を添加し、1 : 1)。(1)の方法で得た抽出液を乾固し、25%トルエン-アセトニトリル 10mL で定容した溶液 2mL を Envi-Carb/NH₂カートリッジカラムに負荷し、25%トルエン-アセトニトリル 20mL で溶出させ、これをヘキサンで 10mL に定容し、GC-ECD で測定した。

しかし、農産物由来の妨害ピークの影響を受けてシベルメトリンやフルシトリネートの測定が困難であったため、FLO カートリッジカラムで 2 画分に分画して測定することにした。

前述のヘキサン溶液 2mL を 15%エーテル-ヘキサン

20mL で溶出させたところ、クロロタロニル、ピフェノックス、フルシトリネート、フルバリネート、ジクロフルアニド、ピリフェノックス Z 体、E 体、ピラゾキシフェン、フィプロニルの 9 農薬以外は良好に溶出し、溶出画分から農薬の測定を妨害するピークは除去されたためこれを第 1 画分とした。

第 1 画分で溶出しなかった農薬と溶出が不十分であった農薬は 10%アセトン-ヘキサン 20mL で良好に溶出し、農薬の測定を妨害するピークは見られなかったため、これを第 2 画分とした。

4. 農産物での妨害ピークの有無と回収率

5 種類の農産物それぞれ 10g に混合標準液 0.2mL を添加して、回収率を求めると共に妨害ピークの有無を確認した。

Table 1 に農産物ごとの回収率及び5種類の農産物の平均回収率と相対標準偏差(RSD)を示した。

また、Fig.2 に混合標準液 A ,B ,C(0.002 ~ 0.01mg/L) , Fig.3 に各農産物の画分 1 及び画分 2 のクロマトグラムを示した。

Table 1 Recovery of Pesticides Spiked into Agricultural Products

St. No. Pesticides	Spiking level (µg/g)	Recovery(%:mean,n=3)														RSD*		
		Brown rice			Soybean			Cabbage			Onion			Orange				
		Fr.1	Fr.2	Total	Fr.1	Fr.2	Total	Fr.1	Fr.2	Total	Fr.1	Fr.2	Total	Fr.1	Fr.2		Total	
1 Tefluthrin	0.01	86	0	86	83	0	83	94	0	94	82	0	82	96	0	96	88	7.3
2 -BHC	0.01	90	0	90	91	0	91	92	0	92	86	0	86	81	0	81	88	5.1
3 Chlorothalonil	0.01	0	50	50	0	81	81	0	64	64	0	65	65	0	59	59	64	17.7
4 Heptachlor epoxide	0.01	93	0	93	89	0	89	95	0	95	93	0	93	93	0	93	93	2.4
5 Dieldrin	0.01	91	0	91	90	0	90	96	0	96	93	0	93	90	0	90	92	2.8
A 6 op'-DDT	0.01	118	0	118	114	0	114	109	0	109	111	0	111	109	0	109	112	3.4
7 Bifenthrin	0.05	94	0	94	87	0	87	100	0	100	98	0	98	83	0	83	92	7.8
8 Endrin	0.01	58	0	58	57	0	57	63	0	63	66	0	66	67	0	67	62	7.3
9 Bifenox	0.01	19	80	99	32	64	96	24	63	87	27	53	80	19	80	99	92	9.1
10 Acrinathrin	0.05	101	0	101	87	0	87	85	0	85	80	0	80	84	0	84	87	9.2
11 Cyfluthrin	0.05	89	0	89	99	0	99	89	0	89	84	13	97	65	0	65	88	15.4
12 Flucythrinate	0.05	79	0	79	74	32	106	70	27	97	66	24	90	53	33	86	92	11.3
13 Fluralinate	0.05	76	0	76	80	0	80	84	21	105	75	11	86	66	26	92	88	12.9
14 Deltamethrin	0.01	93	0	93	91	0	91	86	0	86	88	0	88	71	0	71	86	10.1
15 -BHC	0.01	87	0	87	56	0	56	63	0	63	57	0	57	62	0	62	65	19.5
16 -BHC	0.01	93	0	93	76	0	76	77	0	77	78	0	78	70	0	70	79	10.8
17 -BHC	0.01	99	0	99	89	0	89	86	0	86	62	0	62	63	0	63	80	20.7
18 Heptachlor	0.01	101	0	101	97	0	97	95	0	95	107	0	107	142	0	142	108	17.8
19 Aldrin	0.01	61	0	61	48	0	48	82	0	82	73	0	73	64	0	64	66	19.5
20 Dichlofluanid	0.05	44	56	100	22	77	99	38	64	102	0	0	0	11	47	58	72	61.5
21 op'-DDE	0.01	86	0	86	84	0	84	91	0	91	84	0	84	71	0	71	83	8.9
22 Prochloraz	0.05	95	0	95	84	0	84	87	0	87	94	0	94	135	0	135	99	20.9
B 23 pp'-DDE	0.01	81	0	81	69	0	69	93	0	93	90	0	90	83	0	83	83	11.2
24 op'-DDD	0.01	107	0	107	95	0	95	96	0	96	95	0	95	90	0	90	97	6.5
25 pp'-DDD	0.01	92	0	92	86	0	86	86	0	86	88	0	88	81	0	81	87	4.6
26 pp'-DDT	0.01	162	0	162	135	0	135	179	0	179	190	0	190	127	0	127	159	17.2
27 Cyhalothrin	0.05	94	0	94	87	0	87	83	0	83	85	0	85	88	0	88	87	4.8
28 Permethrin	0.05	116	0	116	109	0	109	103	0	103	110	0	110	100	0	100	108	5.8
29 Halfenprox	0.05	98	0	98	85	0	85	94	0	94	102	0	102	78	0	78	91	10.7
30 Cypermethrin	0.05	105	0	105	98	0	98	99	0	99	100	0	100	91	0	91	99	5.1
31 Fenvalerate	0.05	97	0	97	85	0	85	89	0	89	92	0	92	75	0	75	88	9.5
32 Tralomethrin	0.01	94	0	94	93	0	93	93	0	93	109	0	109	63	0	63	90	18.5
C 33 Pyrifenoxy Z type	0.025	0	80	80	0	66	66	0	62	62	0	70	70	0	41	41	64	22.6
34 Pyrifenoxy E type	0.025	0	94	94	0	80	80	0	76	76	0	83	83	0	35	35	74	30.7
35 Fipronil	0.01	0	87	87	0	101	101	0	132	132	0	102	102	0	114	114	107	15.7
36 Pyrazoxyfen	0.05	0	107	107	0	132	132	0	103	103	0	105	105	0	97	97	109	12.4

* mean and RSD: Recovery of pesticides spiked to 5 agricultural products

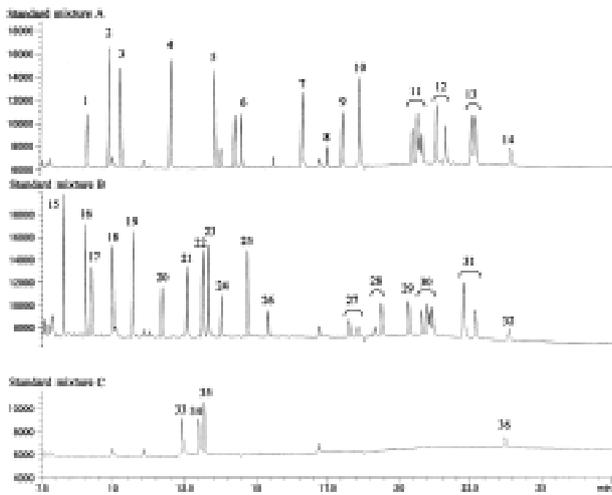


Fig.2 Gas chromatograms of pesticide standard mixture A,B,C (0.002 ~ 0.01ppm)

玄米，大豆，キャベツでは各農薬の測定を妨害するピークはみられなかった．しかしオレンジでは妨害ピークが最も多く，ヘプタクロルとプロシミドンは妨害ピークの影響を受けたため回収率が 142，135%と高くなった．

たまねぎではテフルトリンが妨害ピークの影響を受けた．

またピリフェノックス Z 体，E 体の回収率はオレンジでは妨害ピークの影響を受けて 41，35%と，他の農産物からの回収率に比べて特異的に低かった．

ジクロフルアニドはたまねぎでは全く回収されなかった．これはアリウム属野菜で GC-FPD 測定時の妨害を除去するために試料粉碎時にリン酸を加えて pH を調整したことあるいはたまねぎ中の SH 化合物と反応した^{1,2)}ことが原因と思われる．

ヘプタクロルとピリフェノックスはオレンジ等の柑橘類，テフルトリンはたまねぎ等のアリウム属野菜に残留基準がないため現在の法規制上は問題ないが，プロシミドンはオレンジに，ジクロフルアニドはたまねぎを含むアリウム属野菜に基準が設定されているので，早急に何らかの対策が必要であると考えている．

DDT は GC 試験溶液に比べ標準液では DDD への分解率が高いため回収率が高くなった．pp'-DDT は 5 農産物の回収率の平均値は 159%でその傾向が強かった．

その他の 28 農薬では 5 農産物の平均回収率は 62 ~ 109%，RSD が 20.7%以下で概ね良好に回収した．

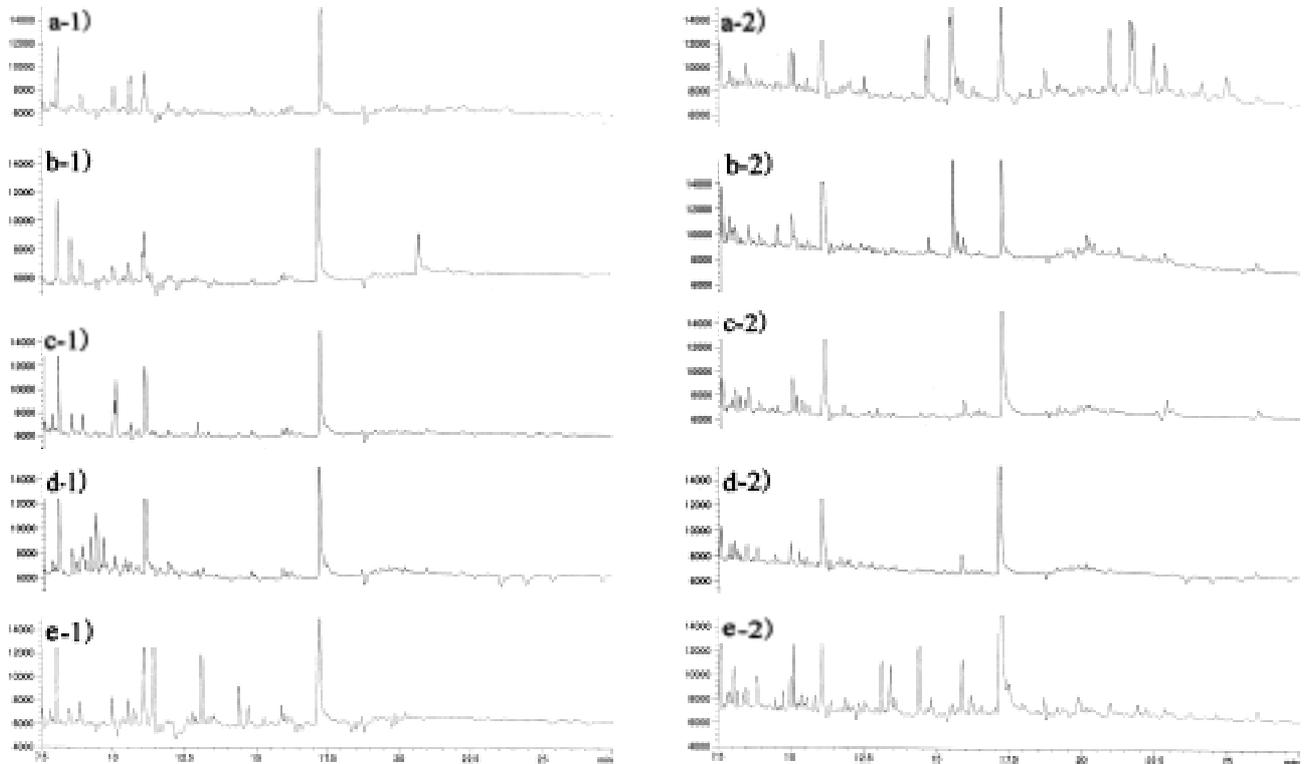


Fig.3 Gas chromatograms of agricultural products extracts

a-1,2) : brown rice extract fract.1 and 2 , b-1,2) : soybean extract fract.1 and 2 , c-1,2) : cabbage extract fract.1 and 2 , d-1,2) : onion extract fract.1 and 2 , e-1,2) : orange extract fract.1 and 2

ま と め

今回の検討で GC-ECD で測定していた 36 農薬を Envi-Carb/NH₂ 及び FLO カートリッジカラムで 2 分画して精製することで、従来行っていた 5% 含水フロリジルカラムによって 3 分画する精製に要する時間を短縮したこと及び GC 測定時間を 2/3 に短縮させたことにより検査に要する時間を約 3/4 に短縮することができた。

世界で使用されている農薬は約 700 種類といわれている。我が国では農産物の安全性を確保するために農薬の残留基準が年々増加してきている。

しかし、基準が充実すればするほどそれを検査して食の安全性をチェックするのに長時間を要することになる。

検査結果を迅速に市民に還元し、食の安全を確保するために、今後も常に効率的な検査法を開発する努力が必要であると考えている。

文 献

- 1) 上野祐子, 小川貴史, 岡本尚子, 谷口勝彦, 三坂亜矢子, 西田政司, 樋口初良: 食品衛生研究, 46, 75 ~ 84, (1996)
- 2) 小川貴史, 岡本尚子, 谷口勝彦, 山下健司, 西田政司, 樋口初良: 食衛誌, 38, 204 ~ 210, (1997)
- 3) 小林英樹: 福岡市保健環境研究所報, 24, 124 ~ 127, (1999)
- 4) 西田政司: 福岡市保健環境研究所報, 27, 152 ~ 157, (2002)
- 5) 長南隆夫: 食衛誌, 33, 543 ~ 547, (1992)
- 6) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 武田信幸, 辻正彦: 食衛誌, 37, 351 ~ 362, (1996)
- 7) 外海康秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: 食衛誌, 39, 13 ~ 24, (1998)
- 8) Doong R., Lee C.: Analyst, 124, 1287 ~ 1289, (1999)
- 9) Podhorniak L.V., Negron J.F., Griffith Jr.F.D.: J.AOAC Int., 84, 873 ~ 890, (2001)
- 10) 小林麻紀, 永山敏廣, 高野伊知郎, 田村康宏, 木村奈穂子, 北山恭子, 斎藤和夫: 食衛誌, 43, 133 ~ 143, (2002)
- 11) 柴田吉有, 小山真由美, 佐藤ひとみ, 中尾和子, 津田麻弓, 園田正則, 田中文隆: 食衛誌, 39, 241 ~ 250, (1998)
- 12) 農薬残留分析法研究班 編: 最新農薬の残留分析法, 中央法規出版, 東京, (1995)