

キャピラリー・ガスクロマトグラフ / PEG 共注入法の 農産物中の有機リン系農薬同時定量法への適用

畑野 和広¹

Application of PEG Co-Injection Method for Simultaneous Determination of Organic Phosphorous Pesticides in Agricultural Products by Capillary Gas Chromatography

Kazuhiro Hatano

Summary

A method by capillary gas chromatography with FPD was developed for the simultaneous determination of organic phosphorous pesticides in agricultural products. It was known that the gas chromatography response of many pesticides in actual samples was considerably higher than that in standard owing to the effect of matrices from the samples. Then, the polyethylene glycol (PEG) co-injection method was devised for the standard solution and the test solution from the samples to compensate the matrices effect. The pesticides were extracted with acetonitrile or ethyl acetate, and the extract solution was evaporated. The residue was added with acetone containing PEG200 and PEG400 (0.05% of each) for injection into the gas chromatography. The recoveries of 31 kinds of pesticides were 70.1 ~ 102% from the agricultural products fortified at 0.1 ppm, except fenthion from cabbage (58.5%). The gap between the retention time of each pesticide in the test solution on the gas chromatogram and that in the standard solution was less than 0.01 minutes, except acephate (0.05 minutes) and methamidophos (0.06 minutes) in cabbage sample. The detection limits of those were 0.0006 ~ 0.0022ppm (S/N=3).

Key Words : 有機リン系農薬 organic phosphorous pesticide , 残留分析 residual analysis, ガスクロマトグラフ gas chromatography, 農産物 agricultural product, ポリエチレングリコール polyethylene glycol(PEG), マトリックス matrix

は じ め に

我が国において農産物中の残留農薬の基準は現在 229 物質に設定されているが、特にアセフェート及びメタミドホスをはじめとした有機リン系農薬の検出頻度が高い^{1, 2)}。

これらの有機リン系農薬をキャピラリーカラムによるガスクロマトグラフで分析する場合、特に強極性物質では試料中のマトリックスの影響により、回収率が 100%

を大きく超過し、定量値が過大評価されることが知られている³⁻⁷⁾。また、アセフェートやメタミドホスでは標準溶液と試料溶液とでピークの保持時間が 1 分以上異なることもあり、同定が非常に困難である³⁾。

このため、正確な定性及び定量を行う際には、標準添加法や分析する試料の種類毎に試料マトリックスを添加して標準溶液を作成する方法などが用いられているが、いずれの方法も操作が煩雑である。

このようなことから、小川らは農産物中のアセフェート及びメタミドホスの分析において、標準溶液に酵母エキスを抽出物を添加して定量を行っている⁵⁾。また、奥村

1.福岡市保健環境研究所 衛生化学部門（現：保健科学部門）

は環境水中の農薬の分析において、標準溶液に酢酸及びポリエチレングリコール(PEG)を添加して定量を行っている^{6,7)}。

今回は、分析対象物質の種類が多いため、標準溶液に添加するマトリックスも複合成分の方が効果が期待できること、また、試薬の調製も容易であることなどから、PEG を用いてガスクロマトグラフによる農産物中の有機リン系農薬の同時定量法について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の農産物を用いた。

2. 試薬等

標準品：GrA(カズサホス，ダイアジノン，クロルピリホスメチル，ピリメホスメチル，クロルピリホス，フェンチオン，マラチオン，キナルホス，プロチオホス，EPN)，GrB(エトプロホス，テルブホス，エトリムホス，トルクロホスメチル，パラチオンメチル，フェントロチオン，イソフェンホス，パラチオン，ブタミホス，ホサロン)，GrC(メタミドホス，アセフェート，ジメチルビンホス，フェントエート，クロルフェンビンホス 1，クロルフェンビンホス 2，ホスチアゼート 1，ホスチアゼート 2，エディフェンホス，フェンスルホチオン，ピラクロホス)はいずれも残留農薬試験用を使用した。

標準原液：標準品をそれぞれ 20 ～ 30mg 精秤し，1000mg/L となるようアセトンまたはトルエンで溶解し調製した。

標準溶液：標準原液をそれぞれ 1mL ずつ上記のグループごとにとり，アセトンで 100mL に希釈し 10mg/L の混合標準溶液を調製後，適宜 PEG 混液に希釈して使用した。

アセトニトリル，酢酸エチル及び n-ヘキサン：いずれも残留農薬試験用を使用した。

PEG200，PEG300 及び PEG400：試薬 1 級品を使用した。

PEG 混液：PEG200 及び PEG400 を 0.1g ずつとり，アセトンに溶解し 200mL にして使用した。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 ろ紙 5A を使用した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：Agilent 社製 HP-5890 シリーズ

FPD を使用した。

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 PT10-35 を使用した。

4. 測定条件

分析カラム：Restek 社製 Rtx-OPPesticides 0.32mmi.d. × 30m, 0.5μm+ガードカラム 5m

注入口温度：250

検出器温度：280

カラム温度：60 (3min) - 40 /min - 140 - 8 /min-280 (10min)

キャリアガス：He, 5mL/min

注入量：3μL

5. 試験溶液の調製

1) 穀類及び豆類

粉碎試料10gにアセトニトリル75mL及び無水硫酸ナトリウム20gを加えホモジナイズし，上澄み液をろ紙でろ過した。残留物にアセトニトリル30mLを加え同様の操作を2回繰り返しの液を集め，アセトニトリル飽和n-ヘキサン30mLを加え振とう後，アセトニトリル層を200mLに定容した。うち40mL(試料2g相当)を濃縮乾固後，残留物にPEG混液4mLを加え溶解し試験溶液とした。

2) 野菜及び果実

細切試料10g(キャベツについてはリン酸を2%添加して細切)に酢酸エチル75mL及び無水硫酸ナトリウム75gを加えホモジナイズし，上澄み液をろ紙でろ過した。残留物に酢酸エチル40mLを加え同様の操作を2回繰り返しの液を集め，酢酸エチルで200mLに定容した。うち40mL(試料2g相当)を濃縮乾固後，残留物にPEG混液4mLを加え溶解し試験溶液とした。

6. 定量

PEG混液で調製した標準溶液のピーク面積から作成した検量線を用いて，試験溶液中の各農薬濃度を求め試料中の含量を算出した。

結果及び考察

1. 分析カラムの選択

分析カラムについては，本来，液相の種類，長さ及び膜厚等を検討し最適なものを選択する必要があるが，分析する対象物質が多くその物性も異なる場合，すべての物質を最適な条件で分析できるカラムを選択することは非常に困難である。今回は，有機リン系農薬の多成分分析に専用に開発された Restek 社製の Rtx-OPPesticides を

使用して以下の検討を行うことにした。

2. PEGの種類及び濃度の影響

奥村の報告⁷⁾によると、標準溶液に添加する PEG として平均分子量が 200 及び 300 の PEG200 及び PEG300 を使用しているが、今回は対象とする農薬の分子量を考慮し、PEG200、PEG300 及び PEG400 の 3 種類について検討した。

奥村の報告⁷⁾を参考に混合標準溶液(0.05mg/L)を各グループごとに 0.05%の PEG200、PEG300 及び PEG400 のそれぞれで調製し、ガスクロマトグラフで測定しピーク強度を求め、アセトンで調製したもののピーク強度と比較した。

PEG200 溶液でのピーク強度は、アセトン溶液に比べてピーク面積で 1.1 ~ 4.5 倍、ピーク高さで 1.4 ~ 12 倍、PEG300 ではそれぞれ 0.8 ~ 4.3 倍、1.5 ~ 12 倍、PEG400 ではそれぞれ 1.1 ~ 3.6 倍、1.5 ~ 9.2 倍と 3 種類の PEG 溶液ともほとんどの物質についてアセトン溶液よりも高いピーク強度が得られた。

また、PEG200 ではアセフェート及びメタミドホスなど保持時間の短い物質に対して、PEG400 ではエディフェンホス、ピラクロホス及びホサロンなど保持時間の長い物質に対して効果が大きく、PEG300 は両者の中間的な結果が得られた。

このため、標準溶液の調製は PEG200 及び PEG400 の混液を用いることにし、PEG の効果が特に著しい 5 物質(ピーク面積が 2 倍以上またはピーク高さが 5 倍以上)について、PEG 濃度によるピーク強度(ピーク面積)の変化を調べた。

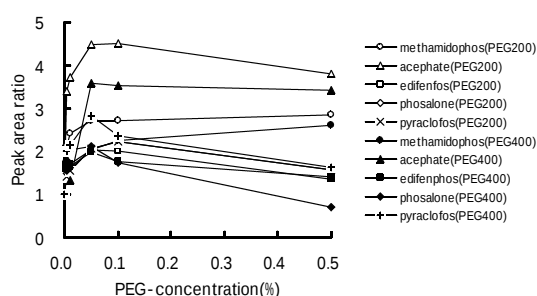


Fig. 1. Effect of PEG concentration on gas chromatography response of pesticides.

The peak area ratio={peak area of pesticides(0.05mg/L of each) in PEG solution / peak area of pesticides(0.05mg/L of each) in acetone solution}.

Fig. 1. に示したとおり、PEG200 及び PEG400 ともいずれの物質についても 0.05 ~ 0.1%の範囲でピーク強度

は最高または平衡に達し、濃度が高くなるにつれて逆にピーク強度が減少する傾向が見られた。

以上のことから、標準溶液は PEG200 及び PEG400 の各 0.05%溶液(PEG 混液)で調製することにした。

3. PEGがガスクロマトグラフ分析に与える影響

PEG 溶液をガスクロマトグラフに数多く注入すると注入口及びカラムが汚染され、ピーク形状及び再現性が悪化したりピーク強度が急激に変化することが懸念される。

このため、PEG 混液で調製した 0.05mg/L 混合標準溶液を GrA、GrB 及び GrC の順にそれぞれ 30 回ずつ連続測定し(計 90 回、約 60 時間)、ピーク強度の変化、再現性及びピーク形状について検討した。

いずれの物質についても 26 回から 30 回目までのピーク強度の平均は 1 回から 5 回目までの平均に比べて、93.5 ~ 104%とほとんど変化は見られなかった。また、それぞれの RSD もいずれも 5%以内で、ピーク形状についてもほとんど変化は見られなかった。

検量線は、EPN、アセフェート、エディフェンホス、エトリムホス、ピラクロホス、ホサロン、ホスチアゼート 1 及びホスチアゼート 2 では 0.005 ~ 0.5mg/L の範囲で、その他の物質では 0.0025 ~ 0.5mg/L の範囲でいずれも $r=0.999$ 以上であった。

以上のことから、今回検討した PEG 混液は、ガスクロマトグラフ分析において注入口及びカラムへの影響はほとんどなく、分析対象とした 31 物質に対して分解等の反応性もほとんど認められなかったため、標準溶液の調製に使用しても支障がないことがわかった。

4. 試験溶液への PEG の添加の影響

農産物中の試料マトリックスは複雑で試料の種類及びマトリックスの量により、ガスクロマトグラフのピーク強度に与える影響もかなり異なり、試験溶液と PEG 混液では同等のピーク強度が得られない農薬もあると考えられる。

そこで、玄米及びオレンジについて試料2g相当を前述の方法で抽出し、残留物を前述の5物質を含むアセトン溶液(0.05mg/L)及び PEG 混液(0.05mg/L)1 ~ 16mLに溶解し、PEG 混液で調製した標準溶液(0.05mg/L)とピーク強度(ピーク面積)を比較した。

Fig. 2. に示したとおり、玄米では残留物を1mLのアセトンに溶解した場合、標準溶液に対する相対ピーク強度は0.90 ~ 0.94で、溶解するアセトンの量を増加するにつれて徐々に減少した。一方、残留物をPEG混液に溶解した場合、相対ピーク強度は1mLで1.05 ~ 1.08と若干高

くなったが、2mL以上ではいずれの物質も0.95～1.05と標準溶液とほぼ同等のピーク強度を得ることができた。

また、オレンジについても同様な結果が得られたが、ガスクロマトグラフの感度及び残留基準値を考慮し、最終試験溶液は試料2g相当の残留物を PEG 混液4mLに溶解することにした。

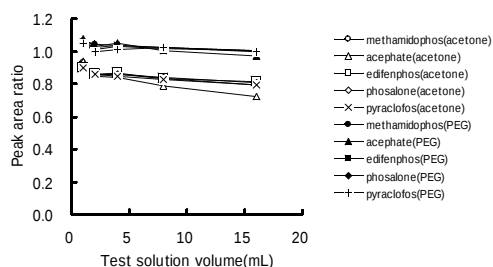


Fig. 2. Effect of final volume of test solution prepared from brown rice on gas chromatography response of pesticides.

The peak area ratio={peak area of pesticides(0.05mg/L of each) in test solution prepared from brown rice / peak area of pesticides(0.05mg/L of each) in standard PEG solution}.

5. 添加回収試験

本法を用いて、これらの物質を含まないことを確認した玄米、大豆、オレンジ及びキャベツに各農薬を0.1ppm 添加し回収試験(n=3)を行った。

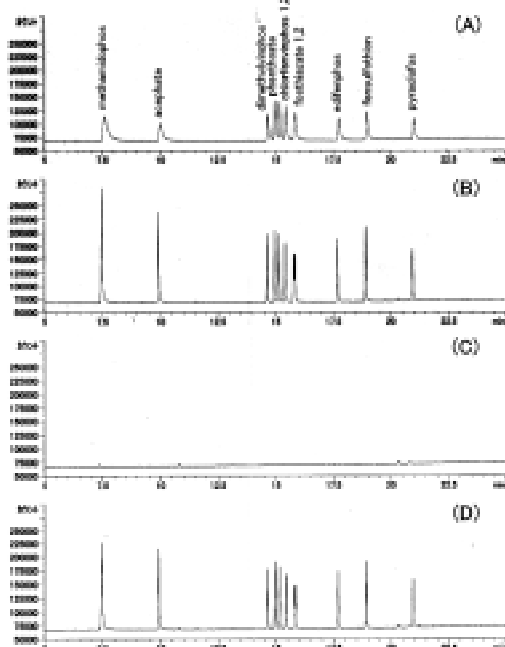


Fig. 3. Chromatograms of organic phosphorous pesticides (GrC:0.05mg/L of each) in acetone solution(A), that in PEG solution(B), blank brown rice(C) and brown rice fortified with 0.1ppm of each (D).

Table 1. に示したとおり、回収率はキャベツからのフェンチオンを除けば70.1～102%, RSD も0.4～9.8%と良好な結果が得られた。標準溶液に対する各試料における各物質の保持時間の差は、キャベツ中のアセフェート(0.05分)及びメタミドホス(0.06分)でやや違いが見られたが、その他の物質についてはいずれも0.01分以内であった。

Table 1. Recoveries of organic phosphorous pesticides (each of 0.1ppm) from agricultural products

compound	recovery(%) ^{a)}			
	brown rice	soybean	orange	cabbage
GrA				
cadusafos	94.0(2.3)	91.1(2.2)	71.4(8.0)	84.7(4.4)
diazinon	94.5(2.2)	93.7(3.7)	72.8(6.8)	89.7(2.6)
chlorpyrifos-methyl	96.5(2.6)	92.7(2.4)	75.2(8.7)	88.7(5.3)
pirimiphos-methyl	96.5(3.0)	93.1(2.4)	74.4(9.8)	93.6(0.5)
chlorpyrifos	96.7(0.8)	92.9(3.1)	74.3(7.0)	91.6(3.1)
fenthion	80.9(2.2)	91.6(2.9)	71.0(6.1)	58.5(6.9)
malathion	94.9(2.4)	92.7(3.2)	74.8(5.8)	91.8(1.4)
quinalphos	95.5(2.0)	95.1(2.3)	74.8(6.0)	89.3(1.5)
prothiofos	94.3(2.1)	92.2(3.8)	76.0(5.3)	95.7(1.7)
EPN	102.4(2.5)	100.6(5.8)	79.4(6.6)	100.9(2.7)
GrB				
ethoprophos	90.9(0.5)	86.1(2.3)	70.8(7.5)	89.0(1.9)
terbufos	83.6(0.5)	90.2(0.5)	70.7(7.2)	76.5(4.5)
etrimfos	94.1(1.4)	90.2(0.8)	70.1(7.7)	87.0(0.6)
tolclofos-methyl	92.7(2.0)	89.8(1.6)	74.7(4.4)	90.7(0.7)
parathion-methyl	94.5(1.1)	89.5(1.9)	77.3(8.8)	95.3(0.6)
fenitrothion	95.7(0.8)	91.3(1.6)	75.3(8.6)	95.3(1.0)
isofenphos	94.2(2.5)	92.2(2.4)	74.1(8.5)	90.0(1.0)
parathion	94.6(1.2)	90.7(1.6)	73.7(9.0)	92.9(1.2)
butamifos	96.3(0.9)	90.6(1.1)	77.6(8.7)	98.2(0.6)
phosalone	97.0(0.4)	88.1(2.5)	74.8(8.7)	95.9(2.2)
GrC				
methamidophos	83.0(2.4)	75.7(4.4)	79.9(1.6)	88.7(1.0)
acephate	88.0(1.3)	77.5(4.7)	88.5(1.5)	101.0(0.9)
dimethylvinphos	85.1(2.6)	89.3(2.6)	75.6(1.7)	92.8(5.4)
phenthoate	84.9(3.3)	88.0(3.7)	76.2(1.7)	93.2(4.7)
chlorfenvinphos 1	84.0(3.4)	87.8(4.3)	74.7(1.1)	91.1(6.1)
chlorfenvinphos 2	84.0(3.4)	87.6(3.6)	73.9(1.4)	88.7(4.0)
fosthiazate 1	85.5(3.7)	88.0(4.4)	79.5(1.2)	90.0(1.2)
fosthiazate 2	84.8(3.0)	87.4(4.1)	82.0(1.9)	91.0(1.0)
edifenphos	84.0(3.9)	87.8(5.5)	76.3(1.9)	93.4(1.4)
fensulfothion	83.9(3.1)	87.8(4.8)	76.8(2.4)	90.7(3.7)
pyraclofos	86.3(6.4)	85.7(7.6)	74.8(5.0)	91.4(1.6)

^{a)} Values are mean(RSD),(n=3).

Fig. 3. に GrC の標準アセトン溶液(0.05mg/L) , 標準 PEG 溶液(0.05mg/L) , 玄米試料及び玄米に0.1ppm添加した試料から得られたクロマトグラムを示したが , 定量に支障を与えるような夾雑ピークはほとんど見られなかった . また , PEG 混液を用いて標準溶液を調製することにより , ピークが著しくシャープになりピークの同定も容易となった .

なお , 添加回収試験のクロマトグラムから求めた各農薬の検出限界(S/N=3)は0.0006 ~ 0.0022ppmであった .

ま と め

農産物中の有機リン系農薬(31 種類)について , キャピラリー・ガスクロマトグラフによる迅速同時定量法を検討した .

PEG200 及び PEG400 (各 0.05%) のアセトン溶液を用いて標準溶液及び試験溶液を調製することにより , 回収率 , 再現性 , 保持時間及びピーク形状とも良好な結果が得られ , いずれの試料についても , 定量に支障を与えるような夾雑ピークは見られなかった .

本法は試料を抽出しその一部を濃縮乾固後 PEG 溶液に溶解するだけであり , 定量及び定性に優れ迅速かつ簡便であることから , 日常の残留分析法として非常に有用な手法と考えられた .

文 献

- 1)厚生省生活衛生局食品化学課：食品中の残留農薬 (2001)
- 2)佐々木久美子：食品衛生研究, 45(7), 13-18 , 1995.
- 3)佐藤正幸ら , 農産物への残留農薬迅速分析法の適用性について(第2報) , 北海道衛生研究所報, 50, 32-40 , 2000.
- 4)飛野敏明ら , キャピラリー GC/MS を用いた農産物中残留農薬分析における試料マトリックスの影響 , 熊本県保健環境科学研究所報, 29, 40-46 , 1999.
- 5)Takashi, O., Naoko, O., Katsuhiko, T., Kenji, Y., Seiji, N., Hatsuyoshi, H., Analysis of acephate and methamidophos in agricultural products by GC., Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan), 38, 204-210,1997.
- 6)Tameo, O, GC/MS determination of acephate in water., Journal of Environment Chemistry, 2, 31-35,1992.
- 7)Tameo, O, Determination of pesticides and their oxidation products in water by capillary gas chromatography / mass spectrometry., Journal of Environment Chemistry, 5, 575-583,1995.