

危機管理に係る食品中有機リン系農薬の一斉試験法について

河野裕子 竹村悦子 斎藤和男
理化学課

要 旨

平成 20 年 3 月 7 日付けで厚生労働省より「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」が事務連絡として通知された。通知に基づき、有機リン系農薬の一斉分析法について検討を行った。その結果、健康危機事例等高濃度に混入された場合においては、測定可能であることを確認した。更に、この方法に準拠した方法で一律基準値(0.01ppm)の測定が可能であるか検討を行った。2 種類のカラムの精製効果を検討した結果、C18 カラムの精製効果が高く、一律基準値(0.01ppm)の分析にも対応できることを確認した。

これらの結果を基に標準作業書を作成し、2008 年度は、5 種類の冷凍食品において検査を行った。その結果、有機リン系農薬は検出されなかった。

キーワード：有機リン系農薬，加工食品，GC-FPD，GC/MS

はじめに

有機リン系農薬は、主に殺虫剤として幅広く使用されている。その中には毒性の強いものがあり、医薬用外劇物や医薬用外毒物に指定されているものが多い。

2007 年 12 月以降有機リン系農薬であるメタミドホスが中国産冷凍餃子に混入することによる中毒事例が発生した。これらの事件に伴い、2008 年 2 月に中国産冷凍餃子、野菜ジュース、同年 10 月に冷凍いんげんのメタミドホス、ジクロロボスの検査を実施した。しかし、その他の有機リン系農薬の分析は行っていない。

平成 20 年 3 月 7 日付けで厚生労働省より「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」が事務連絡¹⁾として通知された(以下“通知法”とする)。当所においても通知による加工食品中に高濃度に残留する有機リン系農薬の一斉分析法について検討を行った。

通知法は定量限界が 0.2ppm であり、一律基準値(0.01ppm)の測定には適用されない。そこで、通知法に準拠した方法で一律基準値(0.01ppm)を満たした有機リン系農薬の一斉分析(低濃度分析)が可能かについても検討し、標準作業書を作成することとした。

方 法

1 試料

- 1) 高濃度分析に用いた試料
きゅうり，りんごジュース，冷凍餃子
- 2) 低濃度分析に用いた試料
冷凍いんげん，冷凍餃子
- 3) 食品安全対策事業において、2008 年度に収去された冷凍食品 5 検体
いんげん，さといも，とうもろこし，ブルーベリー，ブロッコリー

2 対象農薬及び標準物質

表 1 に示す農薬について検討を行った。

- 1) 高濃度分析に用いた標準液
標準品は、和光純薬工業、Dr. Ehrenstorfer GmbH 社、Riedel-deHaën 社の残留農薬試験用を用い、各農薬標準品から 1mg/mL 溶液を調製した。クロルフェンビンホス(E)，(Z)体及びエトリムホスは市販の溶液を使用した。これらを混合、希釈して 20 μ g/mL のアセトン混合標準液 A 及び B を調製した。
- 2) 低濃度分析に用いた標準液
和光純薬工業の有機リン系農薬混合液 FA-1-1 及び FA-2-1 (各 20 μ g/mL) を用いた。
- 3) 検量線用標準液
高濃度分析用は、酢酸エチル、低濃度分析

用はアセトンを用いて適宜希釈して検量線用標準液を調製した。

表1 測定項目

標準液A	標準液B
アセフェート	EPN
イプロベンホス (※2)	エトプロホス (※2)
エチオン	エトリムホス
エディフェンホス	クロルピリホス
カズサホス	ジクロフェンチオン
キナルホス (※2)	ジメトエート
クロルピリホスメチル	スルプロホス (※2)
クロルフェンビンホス (E)	チオメトン (※2)
クロルフェンビンホス (Z)	テルブホス
サリチオン (※2)	トルクロホスメチル
シアノフェンホス (※2)	パラチオンメチル (※1)
シアノホス	ピラクロホス
ジクロロホス	フェンスルホチオン (※2)
ジメチルビンホス (E)	フェンチオン
ジメチルビンホス (Z)	フェントエート
ダイアジノン	ブタミホス (※2)
ピリダフェンチオン	プロチオホス
ピリミホスメチル	ホスメット (※2)
プロバホス (※2)	ホルモチオン (※2)
プロフェノホス (※2)	ホレート (※2)
ホサロン	メチダチオン (※2)
ホスチアゼート	
マラチオン	
メタミドホス	
(※1) 高濃度のみ測定	(※2) 低濃度のみ測定

3 試薬

酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル、トルエンはいずれも和光純薬工業(株)社製残留農薬・PCB 試験用 5000 を、無水硫酸ナトリウムは、和光純薬工業(株)社製残留農薬試験用を使用した。ジエチレングリコール (DEG) は、和光純薬工業(株)社製特級を使用した。

固相カラムは、GL Sciences 社製の GL-Pak グラファイトカーボン/NH₂ 二層カートリッジカラム (500mg/500mg) 及び Varian 社製メガボンドエリート C18 カラム (1g) を使用した。二層カートリッジカラムはアセトニトリル・トルエン (3:1) 10mL で、C18 カラムはアセトニトリル 10mL でコンディショニングを行った後、使用した。

4 装置および測定条件

1) 炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ

(GC-FPD)

HP 社製ガスクロマトグラフ 5890SERIES II を使用した。測定条件は以下のとおりである。

カラム：Agilent 社製 DB-1701 (30m, 0.25mm id, 膜厚 0.25μm)

カラム温度：60 °C (1min) → 25 °C/min → 180 °C → 5 °C/min → 270 °C (15min)

注入口温度：240 °C

検出器温度：250 °C

ガス流量：He 15psi

注入量：2μL (スプリットレス)

2) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)

GC は、Agilent Technologies 社製 7890A を、質量分析計は、同社製の 5975C inert XLMSD を使用した。測定条件は以下のとおりである。

カラム：Agilent 社製 HP-5MS (30m, 0.25mm id, 膜厚 0.25μm)

カラム温度：50 °C (1min) → 25 °C/min → 125 °C → 10 °C/min → 300 °C (10min)

注入口温度：250 °C

イオン源温度：230 °C

ガス流量：He 1mL/min

注入量：2μL (スプリットレス)

測定モード：SIM 及び SCAN

5 試験溶液の調製

平成 20 年 3 月 7 日付け事務連絡「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」に従って、試験液を調製した。分析フローを図 1 に示す。



図 1 試験液のフローシート

結果及び考察

1 高濃度分析における検討

1) 測定条件の検討

GC-FPD を用いて、方法“4 1)”の条件で標準混合液 A 及び B をそれぞれ測定した結果、良好なクロマトグラフが得られた。検量線も 0.1 ~ 1µg/mL の範囲で直線性が得られた。

GC/MS を用いて方法“4 2)”の条件で SIM 測定を行った結果、30 種の一斉分析で良好なクロマトグラムが得られた。しかし、試験液がほとんど精製されていない高マトリックス溶液であり、このような溶液の多検体注入は、MS 部を汚染する可能性が高いため、検出した場合のみ SCAN モードによる確認試験を行うこととした。

2) 農産物、加工食品を用いた添加回収試験

農産物としてきゅうり、液体試料としてりんごジュース、油分が多い加工食品として冷凍餃子を選択した。

添加濃度は、定量限界 0.2ppm の 2 倍量の 0.4ppm とし、試料 10g に添加した後、図 1 のフローシートに従って 5 回の併行試験を行った。その結果を表 2 に示す。

きゅうりは、アセフェートの回収率が 143 % と 120 % を超えたが、その他の 30 農薬は、70 ~ 120 % の範囲内であった。

りんごジュースは、クロルフェンビンホス (E)、ダイアジノン、ピリダフェンチオン、ホサロン、マラチオンの 5 農薬が 70 % 未満となり、最も低いホサロンで 63.3 % であった。りんごジュースは、液体試料のため脱水操作で無水硫酸ナトリウムが固まることが多かったため、抽出する際には抽出効率が低下する可能性があり、注意が必要と考えられた。また、同じ液体試料でもミネラルウォーターは、無水硫酸ナトリウムを入れた瞬間に固体化するため、この方法では分析できなかった。

冷凍餃子については、エチオン、エディフェンホス、ピリダフェンチオン、ホサロン、EPN、ピラクロホスの 6 農薬が 70 % 未満となった。特に高温側で検出してくるピリダフェンチオン、ホサロン、ピラクロホスの 3 農薬のピークが検出しにくくなり、55.3 %、43.2 %、49.4 % とかなり低い結果となった。分析

終了後インサートを確認した結果、油分らしきものが付着してかなり汚れている状態であった。3 農薬は、マトリックスと共にインサートに付着し回収率が低下したと考えられる。

変動係数は、全体的に大きくなり、きゅうりが 11.0 ~ 19.4 %、りんごジュースが 7.9 ~ 17.8 %、冷凍餃子が 1.7 ~ 14.6 % であった。冷凍餃子が最もばらつきが少なかった。

表 2 添加回収試験結果

農薬名	回収率 (%) n=5		
	きゅうり	りんごジュース	冷凍餃子
アセフェート	142.8	114.8	119.5
エチオン	91.6	70.7	69.9
エディフェンホス	76.0	76.4	59.9
カズサホス	83.0	73.1	91.0
クロルピリホスメチル	81.2	70.2	86.7
クロルフェンビンホス (E)	73.1	68.9	81.7
クロルフェンビンホス (Z)	71.7	72.4	83.8
シアノホス	79.9	71.1	85.9
ジクロロホス	91.9	75.8	91.6
ジメチルビンホス (E)	71.7	72.6	83.7
ジメチルビンホス (Z)	73.5	74.5	79.8
ダイアジノン	79.2	69.1	88.0
ピリダフェンチオン	76.9	68.2	55.3
ピリミホスメチル	82.6	72.1	85.2
ホサロン	80.4	63.6	43.2
ホスチアゼート	101.4	82.3	79.5
マラチオン	76.6	66.6	86.3
メタミドホス	109.4	89.1	89.7
EPN	106.1	86.5	69.0
エトリムホス	96.6	86.8	91.5
クロルピリホス	101.1	88.3	84.5
ジクロフェンチオン	100.1	88.5	89.0
ジメトエート	108.1	92.2	88.8
テルブホス	84.9	93.9	100.6
トルクロホスメチル	98.5	87.3	92.0
パラチオンメチル	95.3	86.7	86.9
ピラクロホス	112.3	97.5	49.4
フェンチオン	85.6	94.7	92.7
フェントエート	88.0	78.8	93.1
プロチオホス	103.5	89.9	84.5

2 低濃度における分析法の検討

1) 測定条件の検討

低濃度用標準液 A 及び B を測定した結果、GC-FPD、GC/MS どちらの装置でも良好なクロマトグラムが得られ、検量線も 0.04 ~ 1µg/mL の範囲で直線性が得られた。

2) 分析法の検討

高濃度分析時は、酢酸エチル抽出は 1 回のみだが、低濃度分析ではより抽出効率を上げるため、2 回抽出を行うこととした。そのた

め、図1の酢酸エチル 20mL × 3回洗浄の部分を残渣に 60mL 加え、5分間ホモジナイズし、吸引ろ過を行うという操作に変更した。

計算上、図1の方法で得られた試験液を8倍濃縮することで 0.01ppm を得ることができる。しかし、そのまま濃縮するとマトリックスも濃縮され分析は困難になるため、精製の操作を加えてマトリックスをできるだけ取り除くことが重要と考えられる。そこで、残留農薬試験で用いている二層カートリッジカラム及び C18 カラムによる精製を検討した。分析のフローシートは、図2に示す。

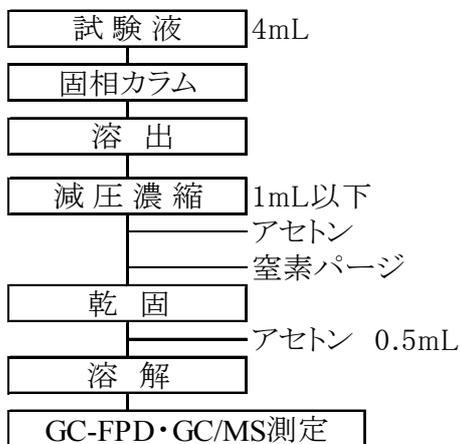


図2 精製のフローシート

(1) 窒素パージによる溶媒の転溶

C18 カラムに酢酸エチル溶液をそのまま注入した結果、油分も色素も共に通過してほとんど精製されなかった。二層カートリッジカラムについても全体的に回収率が低くなったため、カラムに通筒させる前に、それぞれのカラム溶出液に転溶させる必要があることが明らかとなった。窒素パージにより酢酸エチルを揮散させ、別の溶媒に転溶する検討を行った。

酢酸エチル 2mL に標準液を添加し、窒素パージで乾固させた後、アセトンに再溶解し測定した結果、ジクロロボスの濃度が低下した。ジクロロボスは揮散しやすいため、乾固直前で窒素パージを止め、二層カートリッジカラムの場合は、アセトニトリル・トルエン (3:1) 2mL、C18 カラムの場合は、アセトニトリル 2mL で溶解することとした。

(2) 減圧濃縮による検討

アセトニトリル・トルエン (3:1) 溶液に標準液を添加した後、減圧濃縮しアセトン溶液に転溶した結果、ジクロロボスの回収率が低下した。減圧濃縮する前に、1% DEG アセトン溶液を添加した結果、ジクロロボスの揮散を抑えることができた。

(3) 固相ミニカラムによる検討

加工農産物として冷凍いんげん、油分が多い加工食品として冷凍餃子を試料とした。

標準溶液 A を用いて、添加濃度は、定量限界 0.01ppm の 2 倍量の 0.02ppm とし、試料 10g に添加した後、図1及び図2のフローシートに従って 5 回の併行試験を行った。

GC/MS で測定した結果を表3に示す。

① 二層カートリッジカラム

冷凍いんげんを用いて添加回収試験を行った結果、アセフェート、エチオン、ジクロロボスの 3 農薬が、それぞれ 28.4%、120.6%、56.8% と 70 ~ 120% の範囲に入らなかった。変動係数は、すべて 20% 以内であった。

冷凍餃子においては、油分などマトリックスを十分取り除くことができず、測定は困難であった。

以上から、二層カートリッジカラムでは、野菜などの農産物には使用可能であるが、油分の高い加工食品の精製には効果が得られず、今回のような分析には不向きであることが明らかになった。

② C18 カラム

図1の方法で調製した冷凍いんげん及び冷凍餃子のブランク液 4mL を採取し標準液を添加した後、C18 カラムを使用して精製した結果、油分及び色素を取り除くことができた。特に油分については、乾固した際の残留物が 1/10 以下となり、GC-FPD 及び GC/MS で測定できる範囲までマトリックス量を下げることが可能であった。

冷凍餃子を用いて添加回収試験を行った結果、アセフェート、ジクロロボス、ピリミホスメチルの 3 農薬が、それぞれ 63.6%、54.4%、23.9% と 70 ~ 120% の範囲に入らなかった。変動係数は、アセフェート以外は、すべて 20% 以内であった。ピリミホスメチルは、GC-FPD のデータではほとんど回収され

なかったことから分析対象農薬から除外することとした。

表3 カラム別検討結果

農薬名	回収率 (%)			
	二層カートリッジカラム		C18カラム	
	冷凍いんげん	冷凍餃子	冷凍いんげん	冷凍餃子
	平均(n=5)	CV	平均(n=5)	CV
アセフェート	28.4	7.9	63.6	20.5
イプロベンホス	84.2	8.2	94.5	14.1
エチオン	120.6	7.6	106.6	9.1
エディフェンホス	84.7	6.5	93.1	7.1
カズサホス	72.1	7.6	110.2	5.6
キナルホス	93.4	9.6	81.3	11.2
クロルピリホスメチル	82.8	7.6	84.7	12.4
クロルフェンビンホス(E)	91.0	8.2	92.5	9.2
クロルフェンビンホス(Z)	92.1	9.1	93.2	7.6
サリチオン	84.3	8.6	79.5	11.2
シアノフェンホス	83.2	6.5	97.9	7.8
シアノホス	86.4	8.7	79.6	12.2
ジクロルボス	56.4	19.8	54.4	18.8
ジメチルビンホス(E)	81.4	8.9	93.0	9.8
ジメチルビンホス(Z)	86.3	9.5	92.9	9.6
ダイアジノン	87.9	10.9	85.3	12.7
ピリダフェンチオン	93.1	8.9	97.8	7.9
ピリミホスメチル	89.4	9.5	23.9	11.5
プロバホス	96.6	9.7	100.8	6.9
プロフェノホス	91.5	7.3	105.5	8.8
ホサロン	91.2	5.7	97.9	8.5
ホスチアゼート	95.6	8.6	90.0	9.0
マラチオン	84.3	9.2	102.6	10.5
メタミドホス	118.1	11.2	112.6	7.6

CV:変動係数

(4) 添加回収試験

“(3) ①及び②”の結果から、有機リン系農薬の低濃度分析は、図3のフローシートに従って分析を行うこととした。

冷凍いんげんを用いて図3に従って添加回収試験を行った。添加濃度は0.02ppmとし、FPDを用いて5回の併行試験を行った結果を表4に示す。

今回は、アセフェートのピーク形状が悪く定量することができなかった。回収率はイプロベンホス69.0%、ホスチアゼート131.0%、エトプロホス69.9%の3農薬が70~120%の範囲に入らなかったが、その他の42農薬では十分測定可能であることを確認した。変動係数は、すべて15%以内であった。

食品安全対策事業として2008年度に搬入する冷凍食品は、野菜類や果実類に限定したため、今回は冷凍餃子を用いた添加回収試験

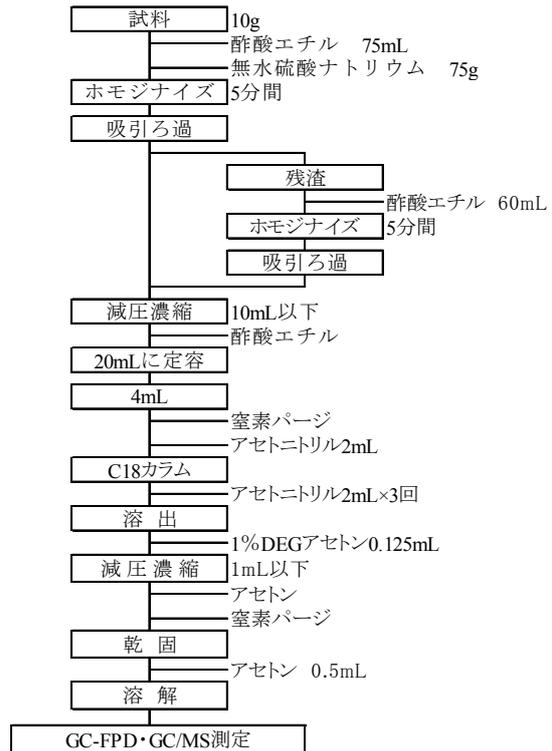


図3 フローシート

表4 GC-FPDによる添加回収試験結果

農薬名	回収率 (%)		農薬名	回収率 (%)	
	平均(n=5)	CV		平均(n=5)	CV
アセフェート	-	-	EPN	78.5	3.2
イプロベンホス	69.0	6.0	イソフェンホス	74.7	1.0
エチオン	75.7	7.0	エトプロホス	69.9	2.4
エディフェンホス	108.7	1.7	エトリムホス	70.9	1.8
カズサホス	70.8	13.1	クロルピリホス	73.3	3.1
キナルホス	73.3	6.7	ジクロルフェンチオン	72.6	1.3
クロルピリホスメチル	77.3	3.1	ジメトエート	94.8	2.4
クロルフェンビンホス(E)	72.9	2.9	スルプロホス	78.3	2.0
クロルフェンビンホス(Z)	73.0	6.3	チオメトン	71.9	1.5
サリチオン	87.0	5.6	テルブホス	71.6	2.0
シアノフェンホス	77.5	8.2	トルクロホスメチル	71.2	2.8
シアノホス	83.0	4.4	ピラクロホス	90.3	3.2
ジクロルボス	101.4	8.1	フェントロチオン	79.2	1.6
ジメチルビンホス(E)	90.6	5.9	フェンシルホチオン	80.0	3.1
ジメチルビンホス(Z)	90.4	5.5	フェンチオン	74.0	2.4
ダイアジノン	72.2	4.0	フェントエート	79.7	3.2
ピリダフェンチオン	88.1	7.2	ブタミホス	72.2	1.9
プロバホス	118.2	4.8	プロチオホス	75.2	2.2
プロフェノホス	81.3	6.1	ホスメット	117.8	4.6
ホサロン	102.4	9.1	ホルモチオン	87.6	4.4
ホスチアゼート	131.0	8.3	ホレート	73.0	2.4
マラチオン	75.0	7.4	メチダチオン	83.2	3.4
メタミドホス	110.0	4.1			

CV:変動係数

は行わなかった。

今回アセフェートは分析できなかったが、検討の段階では60%程度の回収率が得られ

ていた。カラムの状態等が良好であれば分析できる可能性が高いため、分析対象項目に入れることとした。標準混合液 A の 21 農薬（延べ 23 農薬）及び標準混合液 B の 20 農薬について標準作業書を作成した。

3 収去検査結果

方法“1 3)”に示した食品安全対策事業として搬入された冷凍食品 5 検体について分析を行った。

41 農薬について分析を行った結果、すべて 0.01ppm 未満であった。同時に行った添加回収試験（添加濃度 0.05ppm, n = 2）の結果を表 5 に示す。ジメトエート 124.5 % と 120 % を超えたが、その他の農薬はすべて 70 ~ 120 % の範囲内と良好な結果であった。

表 5 GC-FPDによる添加回収試験結果

農薬名	回収率 (%)	農薬名	回収率 (%)
	冷凍いんげん		冷凍いんげん
アセフェート	100.2	EPN	96.5
イプロベンホス	90.6	エトプロホス	83.0
エチオン	107.9	エトリムホス	77.0
エディフェンホス	87.8	クロルピリホス	89.5
カズサホス	80.9	ジクロフェンチオン	87.5
キナルホス	95.4	ジメトエート	124.5
クロルピリホスメチル	88.4	スルプロホス	98.0
クロルフェンビンホス(E)	91.6	チオメトン	73.0
クロルフェンビンホス(Z)	87.4	テルブホス	76.5
サリチオン	82.4	トルクロホスメチル	84.0
シアノフェンホス	110.8	ピラクロホス	101.0
シアノホス	84.4	フェンスルホチオン	100.0
ジクロロホス	71.9	フェンチオン	74.0
ジメチルビンホス(E)	84.1	フェントエート	80.5
ジメチルビンホス(Z)	82.0	ブタミホス	80.5
ダイアジノン	83.3	プロチオホス	95.0
ピリダフェンチオン	93.4	ホスメット	89.5
プロパホス	93.7	ホルモチオン	102.5
プロフェノホス	99.4	ホレート	74.5
ホサロン	103.6	メチダチオン	93.5
ホスチアゼート	104.2		
マラチオン	84.9		
メタミドホス	103.4		

まとめ

平成 20 年 3 月 7 日付け事務連絡「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」に従って、高濃度に残留する有機リン系農薬の一斉分析について検討を行った。添加回収試験結果では、回収率が 70 ~ 120 % の範囲を満たさない農薬がいくつか確認された。しかし、冷凍餃子中のピリダフェンチオン、ホサロン、ピラクロホスの 3 農薬以外は、

60 % 以上の回収率を示し、十分緊急時のスクリーニングには対応できると考えられる。3 農薬の低回収率の原因は、GC-FPD のインサートの汚れなどによる測定感度の低下であった。従って、希釈や低濃度分析で検討した精製を行うなど油分を減らす操作を加えれば、3 農薬も十分測定可能と考えられる。

低濃度分析では、2 種類のミニカラムを使用し検討を行った。二層カートリッジカラムは、農産物など油分の少ない検体であれば、十分使用可能であったが、油分等マトリックスを非常に多く含む冷凍餃子には不向きであることを確認した。C18 カラムを用いた検討では、色素及び油分をほとんど取り除くことができたため、検討した農薬でほぼ良好な結果を得た。以上の結果から、高濃度分析と同様の操作に C18 カラムの精製を加えた方法を用いることによって、41 農薬について定量下限値付近の測定が可能と判断された。

メタミドホスやアセフェートは、カラムや注入口などが汚染されるとピーク形状が悪化しやいことが確認されたため、FPD のメンテナンスは頻繁に行い、よりよい条件下で測定することが重要であると考えられた。

標準作業書を作成後、食品安全対策事業として搬入された冷凍食品 5 検体について分析を行った結果、有機リン系農薬は検出されなかった。合わせて行った添加回収試験は良好な結果が得られた。

今後は、油分などマトリックスの多い冷凍食品について更なる検討を行い、変更点があれば、標準作業書を改定していく予定である。

引用文献

- 1) 事務連絡 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課通知：2007/3/7
- 2) 食安発第 0124001 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：2005/1/24