

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の農薬分析

六嶋 紀子, 安部 尚子, 岡本まゆみ, 近藤陽太郎

Rapid and Simultaneous Determination of Pesticides in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Noriko Rokushima, Naoko Abe, Mayumi Okamoto and Yôtarô Kondo

Reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) using acetonitrile-water as a mobile phase and UV detection is performed for a rapid and simultaneous determination of 25 pesticides of different types, namely organophosphorus, organochlorine, carbamates, triazines and nitroaniline in fruits, vegetables and tea leaves. The pesticides were extracted with acetone and then partitioned with dichloromethane. Clean-up of the samples was accomplished by open-column liquid chromatography with florisil. Eleven pesticides were detected from 22 among 35 samples. The detection limits of the present method were less than 0.001 $\mu\text{g/g}$.

I. はじめに

いま、日本の農業では、多くの種類の農薬が使用されており、その数は国内で約300種類、世界では約600~700種類に上ると言われている¹⁾。害虫や病原菌を殺す殺虫剤や殺菌剤、雑草だけを選んで枯らす除草剤、作物の成長を早めたり抑制したりする作用や果実の落下を防ぐ作用などをもつ植物成長調整剤など、その用途はさまざまである。単位面積当たりの農薬使用量は、ヨーロッパやアメリカの5倍とも6倍とも言われている²⁾。

このように幅広く使われている農薬は、野菜や果物では表面にそのまま付着して残るほか、吸収されて可食部に移行したりすると考えられている。家畜のエサとなる穀類や草に農薬が残っており、それを食べた牛豚の肉や鶏卵、牛乳から農薬が検出されたことが報告されている。また、散布された除草剤が川や海に流れ、魚に濃縮されたりしていたという報告もある³⁾。

農業労働の省力化、商品価値の向上を目的に多用されている農薬は、昆虫や植物の生理機能に障害を与えて殺虫・除草の効果を得るものであるが、人も虫も、呼吸や神経作用などの生理機能の面では、本質的な違いがあるわけではなく、構造の基本単位が

細胞であることは、人も植物も同じである。したがって虫や植物に毒性を示すものは、人に対しても毒性を現すことは言わば当然のことである。

外国では作物を収穫したあと輸出するにあたって、農薬を使用する(ポストハーベスト)など、我が国と異なった使用形態もある。ポストハーベスト農薬⁴⁾の使用は、散布から喫食までの期間が短く、使用場所が貯蔵倉庫などであり、日光・雨などによる分解・流失がないため、収穫前の農薬使用に比較して、残留が多くなりやすいという問題点がある。

最近の農薬の急性毒性は、低毒性になってきている。しかし、しばしば誤解されているように、人畜無害では決してない。“農薬は生物にとって、本質的には毒である”ということには変わりはない。日常、口にする穀物、野菜、果物、魚介類、肉類から飲料水にいたるまで、あらゆる食物に農薬が残留していると言われており、ごく微量であっても、毎日摂取していると、アレルギー疾患の素因になったり、ひどければ癌などの病気になったりすると言われていている。このため、農薬の使用や、食品への残留についての規制が食品衛生法及び、農薬取締法に基づいて行われており、関心が高まっている。また、近年、環境中に微量存在し、生体内でホルモンに似た働きを行って、内分泌系を攪乱する化学物質(環境ホルモン)として幾つかの農薬が疑われている⁵⁾。

この研究では、私たちが日常口にしている野菜や

果物、茶葉類に残留している農薬を、高速液体クロマトグラフィーを用いて、系統的にかつ、迅速に分析する方法を確立し、農薬残留の実態を明らかにすることを目的とした。

II. 実験方法

1. 試料

平成7年4月から平成10年3月の間に京都市内で市販された農産物を分析した^{6,7,8)}。分析した試料の内訳は以下の通りである。

いんげん、かいわれだいこん、カリフラワー、菊菜、きぬさや、キャベツ、きゅうり、巨峰、ごぼう、サニーレタス、しょうが、たまねぎ、トマト、白菜、ブロッコリー、なし、なす、にんじん、ねぎ、ピーマン、ほうれん草、みかん、りんご、れんこん、レタス、宇治茶、玄米茶、麦茶の国産品28種と、アスパラガス、キウイフルーツ、スウィーティー、ネーブルオレンジ、バナナ、レモン、紅茶の外国産品7種類、合計35種類を対象とした。

2. 試薬

市販の残留農薬試験用または特級品を用いた。今回の試験に用いた農薬標準品(25種)は東ソー(株)より提供されたものであり、以下にそれらの特徴⁹⁾を示した。

1) アシュラム Asulam (カーバメート系除草剤) : 芝、桑畑の一年生雑草、牧草地のギンギン類に適用される。非農耕地の除草にも使われる。

2) DDVP Dichlorvos (有機リン系殺虫剤) : 接触毒、食毒、ガス毒として作用し、野菜のアオムシ、アブラムシ、コナガ、ヨトウムシ、みかんのイセリヤカイガラムシ、なしのシンクイムシ、桑のカミキリムシ、メイガ、アメリカシロヒトリ、茶のハダニなどに適用される。発熱剤と混合点火して、煙霧化する燻煙剤は、ビニールハウスやトンネル栽培でのハダニ、アブラムシや、貯蔵倉庫でのコクゾウムシなどに適用される。家庭でも、ダニ退治用に燻煙剤などが使われる。

3) シマジン Simazin (トリアジン系除草剤) : メヒシバ、カヤツリグサ、タデ、スズメノテッポウなど畑地や果樹園の一年生雑草に適用される。団地や河川敷、ゴルフ場などの芝地でもよく使われる。

4) メチダチオン Methidathion (有機リン系殺虫剤) : 野菜のアブラムシ、コナジラミ、果樹や茶、花卉のカイガラムシに適用される。

5) ダイアジノン Diazinon (有機リン系殺虫剤) : 稲のニカメイチュウ、ウンカ、ツマグロヨコバイ、

野菜のアオムシ、コナガ、アブラムシ、果樹のシンクイムシ、ハマキムシ、カイガラムシなどに適用される。安全使用基準によれば夏みかん、かぶ、しゅんぎく、茶に使用しないとある。防疫病として、ハエ、カ、ノミ、ゴキブリなどに適用される。

6) メプロニル Mepronil (酸アミド系殺菌剤) : イネの紋枯病、麦・芝のさび病、雪腐菌核病、じゃがいもの黒あざ病、なしやりんごの赤星病、野菜の苗立枯病などの防除に用いる。リゾクトニア菌などの担子菌に属する病原菌に特異的に高い抗菌活性を有する。

7) フェニトロチオン Fenitrothion (有機リン系殺虫剤) : 接触毒及び食毒として作用する。稲のニカメイチュウ、ウンカ、ツマグロヨコバイ、ミナミアオカメムシ、野菜のアオムシ、アブラムシ、果樹のシンクイムシ、アブラムシ、茶のチャホソガ、松のマダラカミキリムシ、桜のアメリカシロヒトリなどに適用される。安全使用基準ではレタス、施設栽培のイチゴに使用しないとされている。家庭内のハエ、カ、ダニなどの駆除にもスプレー剤やタタミシートで用いられている。街路樹の害虫、下水道のカ、ハエなどの駆除にも広く用いられている。

8) クロロタニル Clorothanyl (有機塩素系殺菌剤) : 野菜や果樹のべと病、エキ病、灰色カビ病、クロホシ病、ウドンコ病、タンソ病、芝のスソガレ病などに適用される。ハウス栽培では、燻煙剤として用いられる。多くの工業製品に殺菌剤として添加されている。

9) EDDP Edifenphos (有機リン系殺菌剤) : 稲のイモチ病、ホガレ病などに適用される。

10) エチルチオメトン Disulfoton (有機リン系殺虫剤) : ウンカ、ハダニ、アブラムシ等に適用される。使用上の注意に、エチルチオメトンを使っただいこんの間引き葉は、食用や飼料にしないようにというのがある。

11) クロルピリホス Chlorpyrifos (塩素を含む有機リン系殺虫剤) : りんごやなしのアブラムシ、ハマキムシ、シンクイムシ、樹木のアメリカシロヒトリに適用される。シロアリ駆除用にも販路が拡大されている。

現在、日本には、農産物に対する農薬の残留基準は2種類あり、その1つは、食品衛生法に基づいて厚生省が決めた「農薬残留基準」である。これは「食品・食品添加物等規格基準」の一部になっていて、53種類の作物について、26種類の農薬の基準値が設定されている。この基準に合致しないものは、食品

としての規格に適合しないから、これを輸入し、加工し、使用し、調理し、保存し、または販売をしてはならないとされている。本実験で用いた25種類の農薬のうち、6種類 (DDVP, キャプタン, フェニトロチオン, ダイアジノン, EPN, クロルピリホス) については、農薬残留基準が設定されている。もうひとつの基準としては、農薬取締法に基づいて環境庁が設定した「登録保留基準」がある。これは約250種類の農薬に設定されているが、あくまでも参考値であり、残留基準のように市場農産物の検査を実施する義務もなく、基準を越えても何の罰則もない。また厚生省が設定する残留基準は登録保留基準に優先するとされ、新しく残留基準が決められると自動的に登録保留基準も改められることになっている。

農薬標準混合試薬 A (6種混合) : チウラム, イソプロチオラン, プロピザミド, ベンスリド, トリクロフォスメチル, ペンディメタリンを各々 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにアセトニトリルで調製した。

農薬標準混合試薬 B (4種混合) : ナプロバミド, フルトラニル, メプロニル, プタミフォスを各々 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにアセトニトリルで調製した。

農薬標準混合試薬 C (6種混合) : DDVP, メチダチオン, EDDP, エチルチオメトン, ペンフラカルブ, EPN を各々 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにアセトニトリルで調製した。

農薬標準混合試薬 D (9種混合) : アシュラム, シマジン, キャプタン, フェニトロチオン, ダイアジノン, クロロタニル, イソフェンフォス, イソキサチオン, クロルピリホスを各々 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにアセトニトリルで調製した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ : 東ソー(株) SC-8010 送液ユニット付, 紫外可視検出器 ; 東ソー(株) UV-8010

4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : 東ソー(株) TSK-gel Enviropak G1 (6.0 mm I. D. \times 150 mm), 溶離液 ; 50 mM KH_2PO_4 — CH_3CN (50 : 50 v/v), 流速 ; 1.0 ml/min, カラム槽温度 ; 40°C, 検出波長 ; 210 nm。

5. 検量線の作成

それぞれの農薬標準品 10 mg をアセトニトリルに溶かして 10 ml とし, 農薬標準原液 (1 mg/ml)

を調製した。これを適当に希釈し, この 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入し, 得られたピーク面積と濃度によりそれぞれの農薬量を求めた。

6. 分析操作法

試験溶液の調製 : 検体 20 g にアセトン 200 ml を加え, 10分間放置し, ミキサーで5分粉碎した後セライトを敷いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 ml を加え, 軽く攪拌した後, 吸引ろ過して, ろ液を合わせ, ロータリーエバポレーターを用いて減圧下アセトンを留去した。これにジクロロメタン 100 ml 及び 5% 塩化ナトリウム溶液 200 ml を加え, 分液漏斗を用いて5分間激しく振り混ぜた後, ジクロロメタン層を分取した。さらに水層にジクロロメタン 100 ml を加え, 同様の操作をし, ジクロロメタン層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後, セライトを敷いて吸引ろ過し, ロータリーエバポレーターを用いて減圧下ジクロロメタンを留去した。この残留物にジクロロメタンを加え約 3 ml の濃縮液とした。内径 2 cm, 長さ 20 cm のガラスカラムにフロリジル 10 g, 次いで無水硫酸ナトリウム 2 g をジクロロメタンによる湿式法で充填した。このカラムをジクロロメタン 20 ml で洗った後上記濃縮液を加え, ジクロロメタン 100 ml で溶出した。ロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを留去した。得られた残留物にメタノールを加え, メスフラスコに移し, 全容を正確に 2 ml とした。この溶液をろ過し, これを試験溶液とした^{10,11)}。

検出閾値の確認 : 農薬混合試薬の濃度を 10, 5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にそれぞれ調製して, HPLC 分析を行い, どの濃度まで本装置で検出可能かを試験した。測定対象農薬 (25種) の本装置での検出限界は 0.001 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

7. 添加回収試験

細切した無農薬野菜 (なす及びにんじん) 20 g に各種農薬標準混合試薬 (0.1 mg/ml) を添加し, アセトン 200 ml を加え10分放置後, 抽出回収操作を行い, HPLC 分析により添加回収率を求めた (表 1)。

III. 結果と考察

試験溶液中の農薬は HPLC カラムで分離した後, 各農薬の分子構造中の二重結合部分が特有の UV 吸収を持ち, 紫外可視検出器で検出されるためこの強度を利用して定量できるという原理に基づいて行った。上記の条件で農薬標準混合試薬を60分以内に

表1 なすおよびにんじん試料調製物からの添加標準農薬回収率

農 薬	回収率 (%)	
	なす	にんじん
アシュラム	10	77
DDVP	32	82.1
シマジン	124.3	85.6
チウラム	54.3	75.1
メチダチオン	86.4	74.7
キャプタン	87.3	97
ナプロパミド	89	73.9
イソプロチオラン	105.3	118.2
フルトラニル	84.1	74
プロピザミド	102.8	82.6
メプロニル	100.2	79.3
フェニトロチオン	85.3	85.1
ダイアジノン	68.3	67
ベンスリド	113.1	170.8
クロロタニル	84.8	88.1
EDDP	97.6	84.4
イソフェンフォス	94.9	70.3
エチルチオメトン	52.7	80.9
トリクロフォスメチル	87.4	79.5
ブタミフォス	77.1	415.1
イソキサチオン	134	254.9
ベンフラカルブ	180	365.8
EPN	96.7	106
クロルピリホス	90.6	278.3
ペンディメタリン	90.1	404.4

分離することが可能であった。試料由来の成分を除去する前処理方法には (1) 有機溶媒による抽出^{12,13,14}, (2) オープンカラムクロマトグラフィ^{12,14}, (3) ゲルろ過^{12,13,15}, (4) クロマトグラフ用担体を予め充填したプラスチックカートリッジによる固相抽出^{12,16,17}, (5) 超臨界点抽出^{12,18} などがある。今回の前処理法は今まで広く利用されてきて、標準法となっている有機溶媒による抽出とオープンカラムクロマトグラフィ (充填剤: フロリジル) を組み合わせたものとした。無農薬のなすとにんじんを用いた農薬25種の添加回収実験結果を表1に示す。アシュラム, DDVP, チウラム, エチルチオメトンについては回収率が低く, これは農薬が試料成分に吸着するためではないかと考えられる。ベンスリド, イソキサチオン, ベンフラカルブ

は試料成分に由来する妨害ピークの保持時間と重なるため全体的に回収率が高くなった。また, ブタミフォス, クロルピリフォス, ペンディメタリンは使用した試料の種類により, その妨害ピークと重なることを示している。この傾向は特に緑黄色野菜について顕著であると思われる。その他の農薬の回収率は約70~110%と良好であった。例としてバナナ (果肉) のクロマトグラムを図1に, 農薬標準混合試薬D (9種混合) を図2に示す。また, 野菜, 果物, 茶葉類の農薬残留分析結果を表2に示す。

農産物35種について分析を行った結果, その内22の食品から11種類の農薬が検出された。検出された農薬を農薬残留基準および登録保留基準と比較すると, アシュラムは0.2 μg/g以下とされているが, ピーマンでは4倍, たまねぎで2.3倍の濃度で検出された。DDVPは0.1 μg/g以下とされているが, キウイフルーツ (果肉) では基準値の15倍, きゅうりでは19倍, 巨峰 (果肉) では11倍, 白菜では6倍, ブロッコリーでは5倍, アスパラガスでは6倍, りんごの果肉では3倍, 皮では7倍, ネーブルの果肉では10倍, 皮では15倍の濃度検出された。シマジンは検出されないこととされているが, きゅうりで0.42 μg/g, にんじんで0.2 μg/g, いんげん, 巨峰 (果肉) でも検出されている。メチダチオンは0.2 μg/g以下とされているが, グレープフルーツ (皮) で18倍の濃度検出された。フェニトロチオンは0.2 μg/g以下とされているが, トマト (果肉) では1.8倍, バナナ (果肉) では2.5倍, りんご (果肉) では1倍の濃度で検出された。ダイアジノンは0.1 μg/g以下とされているが, トマト (皮) で40倍の濃度で検出された。エチルチオメトンについては, 0.1 μg/g以下とされているが, 白菜からは基準値の14倍の濃度で検出されている。その他の農薬が検出された農産物については, 基準値が設定されていないか, 基準値以内であった。

本実験の残留分析では, 一般に広く用いられると思われる農薬25種類を限定して測定対象としているため, 本実験で不検出であったとしても, その他の農薬が残留している可能性があり, 安心はできない。また, 試験溶液の精製時にフロリジル処理により, 試料固有の成分を取り除いたが, HPLC分析結果をみると, 試料由来のピークと農薬のピークが重なって検出されているものがあつた。前述した特に回収率が高くなり問題のある農薬についてはデータとして取り扱わなかった。その他の農薬についても分析結果の数値はピーク面積の比較により算出した値

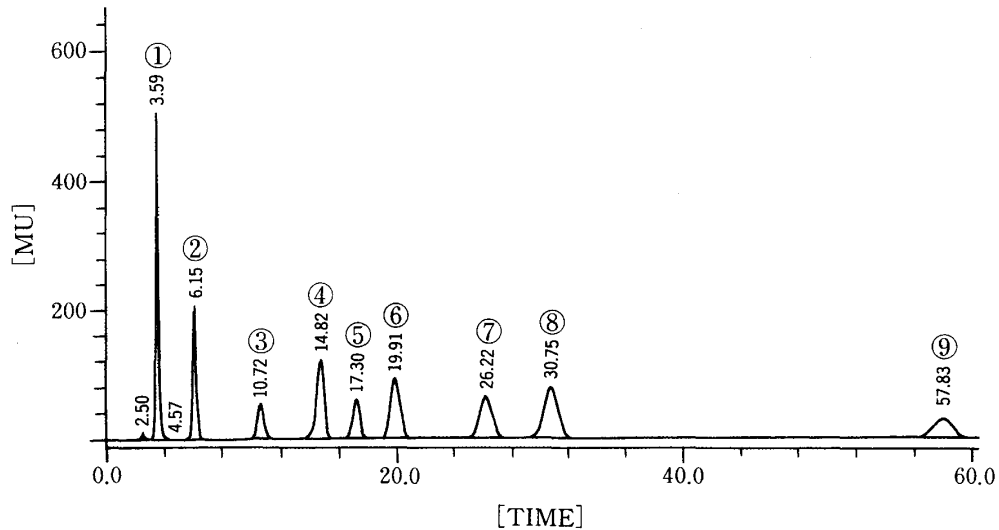


図1 農薬標準混合試薬D (9種混合) の高速液体クロマトグラム
 ①アシュラム；②シマジン；③キャプタン；④フェニトロチオン；⑤ダイアジノン；
 ⑥クロロタニル；⑦イソフェンホス；⑧イソキサチオン；⑨クロルピリホス

であるので、実際の残留量より幾分高い値として検出されるものがあると考えられる。妨害ピークが非常に多く農薬ピークと重なり、本法のみでは確認が困難な試料の場合は試験溶液をさらにガスクロマトグラフィー—質量分析計を用いて確認することが、誤認を防ぐ上で大切であると考えられる。以上の結果から、オープンカラムを用いた本法は、いくつかの農薬の測定に不具合がある場合が考えられるものの、残留農薬の一斉分析法としては、安価で簡便・迅速な測定方法であると考えられる。

Ⅳ. ま と め

本研究では、日常私たちが口にしている野菜や果物、茶葉に残留している農薬を、高速液体クロマトグラフを用いて、系統的にかつ、迅速に分析するスクリーニング法を確立し、農薬残留の実態を明らかにすることを目的として、京都市内で市販されていた農産物を試料として分析を行った。まず、試料を細切した後、アセトンで抽出を行い、ジクロロメタンに転溶した後、塩化ナトリウム溶液で洗浄し、ジ

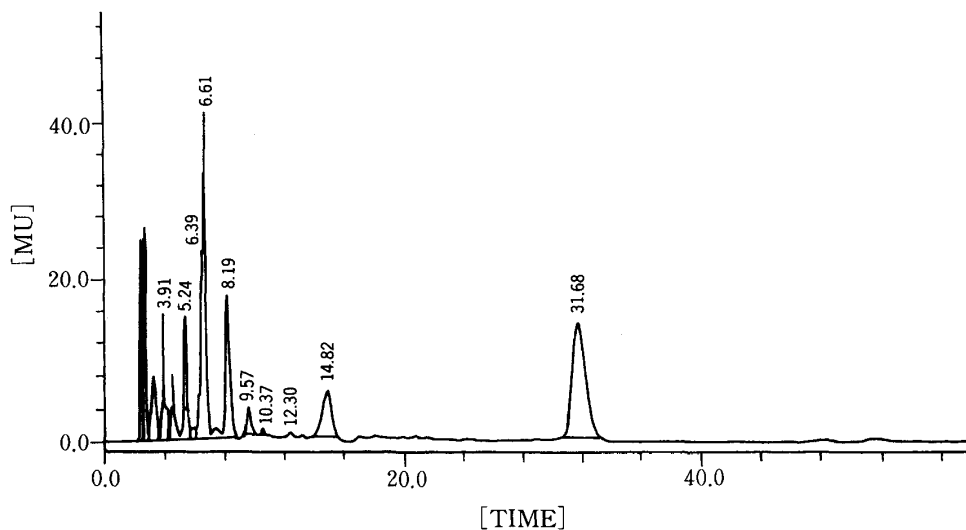


図2 バナナ (果肉) の高速液体クロマトグラム
 図中の保持時間14.82分に現れたピークは図1の標準農薬保持時間と比較すると14.82分に現れたフェニトロチオンと同一物質と考えられる。

クロロメタン層を回収，減圧濃縮した。濃縮液をフロリジルカラムで精製し，溶出液を減圧濃縮し，メタノールに溶解して試験溶液とした。これを紫外可視検出器を装着した高速液体クロマトグラフで測定した。測定対象農薬は，有機リン系殺菌剤，有機リ

ン系殺虫剤，有機塩素系殺菌剤，フタルイミド系殺菌剤，トリクロルピリジル系殺虫剤，カーバメート系除草剤，ジチオカーバメート系殺菌剤，トリアジン系除草剤などの25種とした。市販の農産物35種について分析を行った結果，そのうちの22種の農産物

表2 農産物中の残存農薬濃度

農 薬	農産物	残留濃度 (μg/g)	残留基準値 (μg/g)	
アシュラム	なし (皮)	0.52	0.5	
	ピーマン	0.78	0.2	
	たまねぎ	0.45	0.2	
	キウイフルーツ (果肉)	0.1	0.2	
	キウイフルーツ (皮)	0.04	0.5	
DDVP	キウイフルーツ (果肉)	1.55	0.1	
	きゅうり	1.92	0.1	
	巨峰 (果肉)	1.1	0.1	
	白菜	0.57	0.1	
	ブロッコリー	0.52	0.1	
	アスパラガス	0.63	0.1	
	ほうれん草	0.08	0.1	
	りんご (果肉)	0.29	0.1	
	りんご (皮)	0.68	0.1	
	ネーブルオレンジ (果肉)	0.93	0.1	
	ネーブルオレンジ (皮)	1.45	0.1	
	シマジン	キウイフルーツ (皮)	0.94	—
		いんげん	0.58	ND
巨峰 (果肉)		1.03	—	
巨峰 (皮)		0.93	—	
きゅうり		0.42	ND	
にんじん		0.2	ND	
メチダチオン		いんげん	0.15	0.2
	グレープフルーツ (皮)	3.52	0.2	
	宇治茶	0.81	—	
ダイアジノン	トマト (皮)	4.09	0.1	
メプロニル	レモン (皮)	5.02	2	
フェニトロチオン	トマト (果肉)	0.35	0.2	
	バナナ (果肉)	0.49	0.2	
	りんご (果肉)	0.21	0.2	
	りんご (皮)	0.13	0.2	
	麦茶	0.57	—	
	クロロタニル	キウイフルーツ (皮)	0.11	—
	EDDP	玄米茶	0.15	—
紅茶		0.49	—	
エチルチオメトン	白菜	1.43	0.1	
クロルピリフォス	キウイフルーツ (皮)	0.59	—	

注) 暫定許容量 : ND ; 不検出, — ; 設定値なし

から、11種の農薬が検出され、中には規格基準を越えて農薬が検出されたものもあり、同一検体から複数の農薬が検出されるものもあった。複数の農薬を同時に摂取した場合、相乗的に毒性が増大すると言われていることから、喫食上注意を要すると懸念され、より詳細な検討が必要であると考えられるが、本法は幾分精度に問題はあるものの、残留農薬の一斉分析法とすると、安価で簡便・迅速な測定方法であると考えられる。

文 献

- 1) 植付振作, 河村 宏, 辻万千子, 宮田重行, 細田静夫: 残留農薬データブック, 三省堂, 東京 (1992)
- 2) 谷山鉄郎: 恐るべきゴルフ場汚染, 合同出版, 東京 (1990)
- 3) T. Tsuda, M. Kojima, H. Harada, A. Nakajima and S. Aoki: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 151 (1998)
- 4) 河野修一郎: 日本農薬事情 岩波新書114, 岩波書店, 東京 (1993)
- 5) D. L. デービス, H. L. ブラッドロー: 日経サイエンス, **25**, 114 (1995)
- 6) 岡本まゆみ: 京都女子大学家政学部学士論文 (1996)
- 7) 六嶋紀子: 京都女子大学家政学部学士論文 (1997)
- 8) 安部尚子: 京都女子大学家政学部学士論文 (1998)
- 9) 植村振作, 河村 宏, 辻万千子, 宮田重行, 前田静夫: 農薬毒性の事典, 三省堂, 東京 (1988)
- 10) 厚生省生活衛生局食品化学課編: 残留農薬分析法 Draft, 社団法人日本食品衛生協会, 東京 (1986)
- 11) 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)
- 12) J. Tekel and Š. Hatrik: *J. Chromatogr. A*, **754**, 397 (1996)
- 13) M. J. Nunes, M. F. Camões and J. Fournier: *Chromatographia*, **44**, 505 (1987)
- 14) P. Cano, J. L. de la Plaza and L. Muñoz-Delgado: *J. Agric. Food. Chem.*, **35**, 144 (1987)
- 15) K. Szymczyk and M. Malczewska: *Chromatographia*, **48**, 156 (1998)
- 16) A. Di Muccio, R. Dommarco, D. A. Barbini, A. Santilio, S. Girolimetti, A. Ausili, M. Ventriglia, T. Generali and L. Vergori: *J. Chromatogr. A*, **643**, 1363 (1993)
- 17) Z. M. Chen and Y. H. Wang: *J. Chromatogr. A*, **754**, 367 (1996)
- 18) S. J. Lehotay: *J. Chromatogr. A*, **785**, 289 (1997)