

## 5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンのガスクロマトグラフによる同時定量法

屋方 光則\*

### Determination of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in Wet Type Pet Foods by GC-FPD

Mitsunori YAKATA\*

(\*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center)

An analytical method for determination Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in wet type pet foods using Gas chromatography equipped with flame-photometric detector (GC-FPD) was developed. Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion was extracted with 100 mL of ethyl acetate and filtered. All sample solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in cyclohexane-acetone (7:3). It was purified by gel permeation chromatography (GPC) with cyclohexane-acetone (7:3) and SampliQ Florisil PR cartridge with 2,2,4-trimethyl pentane-acetone (4:1). The elute subjected to GC-FPD on a fused silica capillary column (DB-5; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm (Agilent Technologies)) for determination of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion. A recovery test was conducted using four kinds of wet type pet foods spiked with Chlorpyrifos-methyl and Malathion at 2 and 0.05 mg/kg, Pirimiphos-methyl at 1 and 0.05 mg/kg. The mean recoveries of Chlorpyrifos-methyl were 74.1~93.8 % and the relative standard deviations (RSD) were within 9.5 %. Pirimiphos-methyl were 73.9~94.0 % and the relative standard deviations (RSD) were within 8.4 %. Malathion were 70.5~94.5 % and the relative standard deviations (RSD) were within 13 %. A collaborative study was conducted in seven laboratories using three kinds of pet foods spiked with Chlorpyrifos-methyl and Malathion at 2 and 0.05 mg/kg, Pirimiphos-methyl at 0.5 and 0.05 mg/kg. The mean recoveries of Chlorpyrifos-methyl were 93.5~103 % and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 6.4 %, 16 % and 0.73 respectively. Pirimiphos-methyl were 94.6~95.3 %, 4.7 %, 14 % and 0.62 respectively. Malathion were 93.4~102 %, 7.1 %, 18 % and 0.84 respectively.

Key words: pesticide residue ; Chlorpyrifos-methyl ; Pirimiphos-methyl ; Malathion ; Gas chromatography equipped with flame-photometric detector (GC-FPD) ; gel permeation chromatography (GPC) ; collaborative study

キーワード：残留農薬；クロルピリホスメチル；ピリミホスメチル；マラチオン；炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ；ゲル浸透クロマトグラフィー；共同試験

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

## 1 緒 言

クロルピリホスメチルは、ダウ・ケミカル社（米国）が開発した有機リン系殺虫剤で、1974年に日本での農薬登録が行われている。化学構造上似ているクロルピリホスより人畜毒性、魚毒性ともに低く、広範囲の害虫に使用されている<sup>1),2)</sup>。

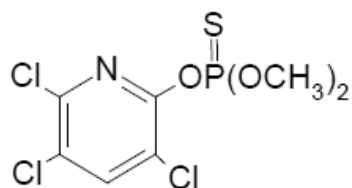
ピリミホスメチルは、ICI社（スイス）が開発した有機リン系殺虫剤で、1976年に日本での農薬登録が行われている。接触作用とくん蒸作用の両方で効果を示し、倉庫等の衛生害虫駆除としても使用されている<sup>1),2)</sup>。

マラチオンはACC社（ドイツ）が開発した有機リン系殺虫剤で、1953年に日本での農薬登録が行われている。植物体組織中で分解されやすく、また、植物体表面からの揮散や分解によっても失われるので残効期間は短い<sup>1),2)</sup>。

愛がん動物用飼料中のこれらの農薬の基準値<sup>3)</sup>は、クロルピリホスメチル及びマラチオンで10 ppm、ピリミホスメチルで2 ppmとされている。現在、愛がん動物用飼料等の検査法<sup>4)</sup>に記載されている、クロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンを対象とする分析法は「有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法」（以下「ドライ法」という。）であるが、適用範囲がドライ及びセミドライ製品であり、ウェット製品を適用範囲とする分析法が記載されていないことから検討することが急務となっていた。

ウェット製品中のこれら農薬の分析法は、財団法人日本食品分析センターが「平成21年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業」で開発したクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの同時定量法<sup>5)</sup>（以下「分析センター法」という。）が報告されている。筆者は分析センター法を基に、愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、クロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの構造式をFig. 1に示した。また、これら農薬の愛がん動物用飼料中の基準値（水分含有量10%に換算したものに対して）と水分含有量が80%の場合のウェット製品の現物中の基準値の比較をTable 1に示した。

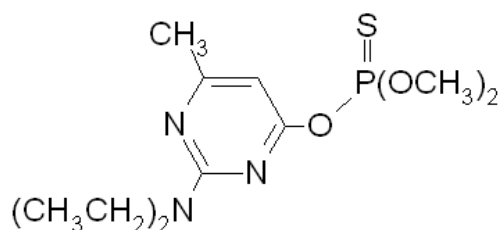


Chlorpyrifos-methyl

*O,O*-dimethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl  
phosphorothioate

C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS MW: 322.5

CAS No.: 5598-13-0

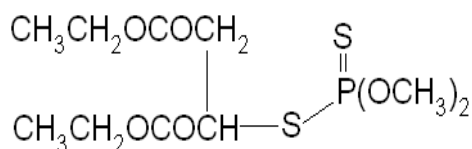


Pirimiphos-methyl

*O*-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl  
*O,O*-dimethyl phosphorothioate

C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>PS MW: 305.3

CAS No.: 29232-93-7



Malathion

*S*-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl  
*O,O*-dimethyl phosphorodithioate

C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub> MW: 330.4

CAS No.: 121-75-5

Fig. 1 Chemical structures of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Table 1 Standard value of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Pesticide	Standard value	Wet type product*
	(ppm)	(mg/kg)
Chlorpyrifos-methyl	10	2.2
Pirimiphos-methyl	2	0.44
Malathion	10	2.2

※ Standard value of wet type product when containing 80 % moisture .

## 2 実験方法

### 2.1 試料

愛がん動物用飼料犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 2 種類をフードプロセッサーで粉砕し供試試料として用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 2 に示した。

Table 2 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Wet type for adult dogs 1	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Wheat flour, Culinary plants (Potato, Carrot, Green peas), Minerals (Cl,Na,K,Mg,Zn,Se,I), Emulsifier, Thickening agent, Coloring agent (Caramel, Titanium dioxide, colcothar), Vitamins (Choline chloride, Pantothenic acid, Biotin, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, D <sub>3</sub> , E, B <sub>9</sub> ),
Wet type for adult dogs 2	Meat (Chicken), Rice, Carrot, Corn, Dietary fiber, Vitamins (B <sub>12</sub> , D, E, Choline chloride, Pantothenic acid, B <sub>9</sub> ), Minerals (Ca, K, Na, S, Zn), Glycine, Thickening agent, Phosphate (Ca, Na), Color coupler (Nitrous acid Na), Coloring agent (Colcothar, Titanium dioxide)
Wet type for adult cats 1	Turkey, Pork, Salmon, Rice, Cornstarch, Cellulose, Wheat, Chicken extract, Soy bean, Chicken, Animal fats, Corn gluten, Yeast, Minerals, Vitamins Amino acid (Taurine, methionine), Thickening agent
Wet type for adult cats 2	Tuna, Pork, Wheat gluten, Chicken, Soy bean protein, Spinach, Glucose Minerals, Vitamins, Amino acid, Thickening agent (Modified starch), Coloring agent (Edible red No.3, Titanium dioxide)

## 2.2 試薬

### 1) クロルピリホスメチル標準原液

クロルピリホスメチル標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 97.5 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてクロルピリホスメチル標準原液を調製した（この液 1 mL は，クロルピリホスメチルとして 0.2 mg ( $f=0.975$ ) を含有する.）.

### 2) ピリミホスメチル標準原液

ピリミホスメチル標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 99.0 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてピリミホスメチル標準原液を調製した（この液 1 mL は，ピリミホスメチルとして 0.2 mg ( $f=0.990$ ) を含有する.）.

### 3) マラチオン標準原液

マラチオン標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 99.0 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてマラチオン標準原液を調製した（この液 1 mL は，マラチオンとして 0.2 mg ( $f=0.990$ ) を含有する.）.

### 4) 混合標準液

クロルピリホスメチル標準原液，ピリミホスメチル標準原液及びマラチオン標準原液の一定量を混合した後，2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンとしてそれぞれ 0.05，0.1，0.5，1，2 及び 5  $\mu$ g を含有する各混合標準液を調製した.

### 5) 酢酸エチル，シクロヘキサン及びアセトンは残留農薬分析用を用いた．2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ用を用いた.

### 2.3 装置及び器具

- 1) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W
- 2) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 NAJ-160
- 3) ガスクロマトグラフ：Agilent Technologies 製 6890N
- 4) ゲル浸透クロマトグラフ：日本分光製 GPC システム  
 ポンプ：PU-2080  
 オートサンプラー：AS-2050  
 フラクションコレクター：SF-212N
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Agilent Technologies 製 SampliQ Florisil PR（充てん剤量 500 mg, リザーバー量 3 mL）
- 6) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-25HP（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, PTFE）

### 2.4 定量方法

#### 1) 抽出

分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次酢酸エチル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ろ液を 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

シクロヘキサン-アセトン（7+3）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,800 $\times$ g（3,000 rpm）で 5 分間遠心分離した後、メンブランフィルター（孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

#### 2) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。なお、ゲル浸透クロマトグラフィーの条件を Table 3 に示した。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

Table 3 Operating conditions of GPC for analysing Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Column	Shodex CLNpak EV-2000AC (20 mm i.d. $\times$ 300 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d. $\times$ 100 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Eluent	Cyclohexane-acetone(7:3)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	70~100 mL

#### 3) カラム処理

試料溶液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに入れ、初めの流出液 2 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL をガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

## 4) ガスクロマトグラフィー

試料溶液及び各標準液各 1  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフに注入し、Table 4 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

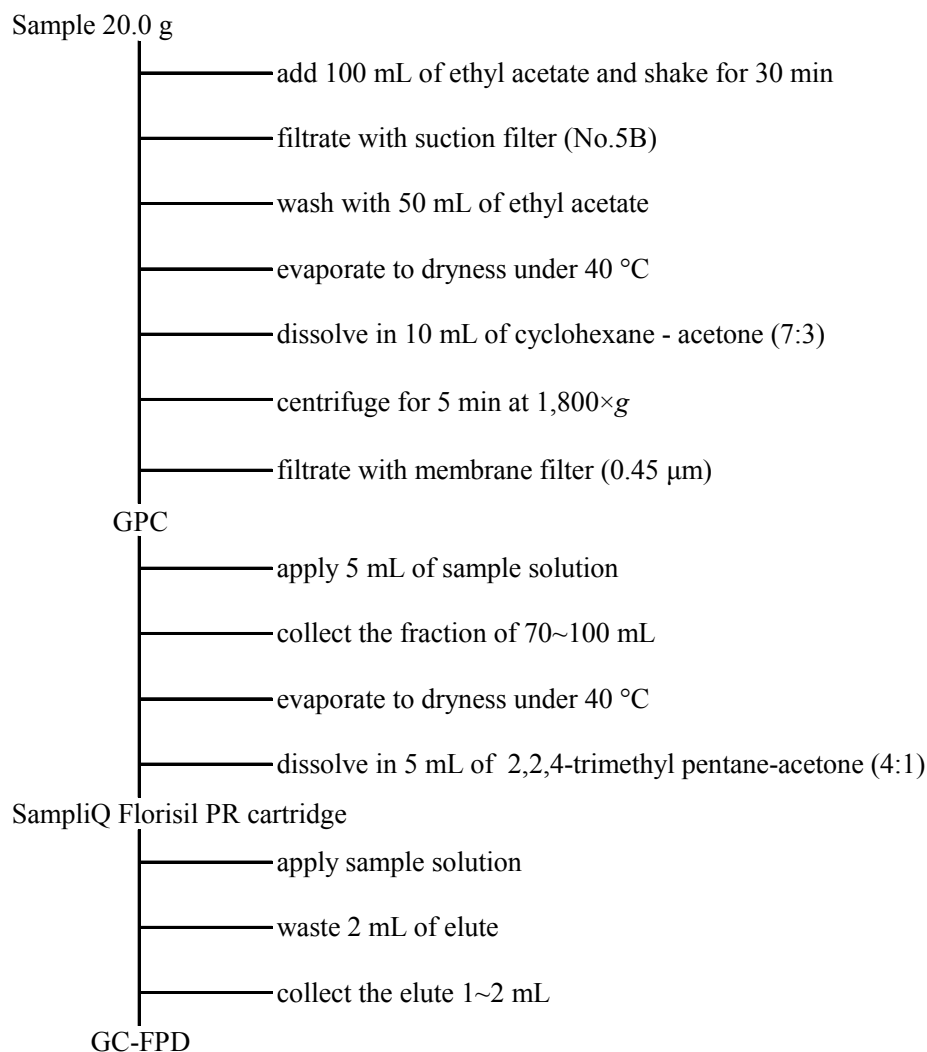
Table 4 Operating conditions for GC-FPD for analysing Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Column	DB-5 (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.25 $\mu\text{m}$ film thickness)
Column temperature	60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) $\rightarrow$ 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 170 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 210 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 250 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temperature	240 $^{\circ}\text{C}$
Carrier gas	He 1.5 mL/min
Hydrogen	75 mL/min
Air	100 mL/min
Make up gas	He (30 mL/min)
Detector	FPD (P-Filter)
Detector temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume	1 $\mu\text{L}$

## 5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in wet type pet foods

### 3 結果及び考察

#### 3.1 抽出方法の検討

分析センター法による抽出方法は、アセトニトリルを用いて抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで精製後、ゲル浸透クロマトグラフに供することとしている。分析センター法を用いて犬用ウェット製品 2 種、猫用ウェット製品 2 種の試料の抽出精製を試みたところ、犬用 1 種、猫用 1 種で抽出液の濃縮乾固時にゲル状のエマルジョンが発生し乾固操作及びその後のカラム処理が不可能であった。エマルジョンの発生は抽出液中に多量の水分と油分が混在することが原因と考えられることから、抽出溶媒にアセトニトリルより極性が低い溶媒を用いて、水分の抽出を抑える方法を検討した。抽出液に酢酸エチルを使用し、先の 4 種の試料のほか、犬用ウェット製品 5 種及び猫用ウェット製品 8 種を用いて抽出したところ、全ての試料でエマルジョンは発生しなかった。

また、分析センター法<sup>5)</sup>は、愛がん動物用飼料等の検査法<sup>4)</sup>に記載されているドライ法を基としているが、ドライ法では多孔性ケイソウ土カラムは使用されていない。このことから多孔性ケイソウ土カラムの省略の可否について、本法による添加回収試験を実施して確認したところ、

Table 5 のとおり良好な結果が得られた。これらのことから抽出溶媒には酢酸エチルを用い、多孔性ケイソウ土カラムによる精製は行わないこととした。

Table 5 Recoveries for extraction by ethyl acetate

Pesticide	Spike Level (mg/kg)	Wet type for Dogs		Wet type for Cats	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
Chlorpyrifos-methyl	1	85.3	1.8	86.7	5.2
Pirimiphos-methyl	1	94.0	3.2	94.0	1.1
Malathion	1	83.7	5.4	85.0	4.7

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.2 抽出溶媒の検討

一般的に農薬分析の抽出溶媒は、アセトニトリルやアセトン等の水と親和性のある比較的極性の高い溶媒が多用されるが、今回、抽出溶媒として極性の低い酢酸エチルを用いることにしたことから、農薬に自然汚染された試料においても 3.1 の検討と同程度の回収率が得られるか検討を行った。対象試料については、農薬に自然汚染された愛がん動物用飼料を入手することが困難であったことから、以下のように調製を行い自然汚染された状態に近似させた試料を用いることとした。まず、小麦粉 10 g を 50 ml 容のプラスチックチューブに入れクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 4 mg/kg、ピリミホスメチルとして 1 mg/kg 相当量を添加し、溶媒が十分に揮散するまで 14 時間静置した後、ふたをして良く混合した。次に、2.1 により調製した犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品を 50 mL 容の各ビーカーに 19 g ずつ入れた。更に、先に調製した小麦粉 1 g ずつを各ビーカーに加え、かき混ぜた後、ラップをかけ 4 時間静置した。

このように調製した試料を用いて、本法に従って添加回収試験を実施した。結果は Table 6 のとおりであり、良好な回収率が得られたことから、抽出溶媒として酢酸エチルを使用することに問題は認められなかった。

Table 6 Recoveries from pet food which was polluted like a naturally by pesticide

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		Wet type for dogs	Wet type for cats
Chlorpyrifos-methyl	0.2	80.2	79.9
Pirimiphos-methyl	0.05	84.8	86.2
Malathion	0.2	81.5	83.2

a) Mean ( $n=1$ )

### 3.3 測定条件について

ドライ法では有機リン系農薬 25 成分をカラム槽温度、使用カラム及び検出器温度の違う測定条件 AB の二つのグループに分け測定することとしている。ピリミホスメチル及びマラチオンは A



グループ、クロルピリホスメチルは B グループに属している。分析センター法ではドライ法と同じ測定条件を適用しているが、分析センター法検討の中で AB グループの測定条件のどちらを用いても各農薬ともに測定が可能であることが報告されている。今回の検討では作業時間の省力化の観点から、A グループの測定条件を基にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンを 3 成分同時測定することとした。

なお、溶出順が最後となるマラチオンが 200 °C 前後で溶出することから、昇温条件を変更して、210 °C 以降の昇温ペースを 20 °C にし測定時間の短縮を図ることとした。

#### 3.4 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の確認を行った。犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品を 2.4 の 1)及び 2)により操作した試料溶液にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 1 mg/kg 相当量を添加し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに負荷し各農薬を画分に溶出した。その後、本法により測定し溶出画分の回収率を確認した。なお、流出液量は全体で約 4 mL であった。その結果 Table 7 のとおり流出液 0~1 mL では低回収率であったが 1 mL 以降の溶出では良好な回収率が得られた。本法では安全性を見て初めの流出液 2 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL を測定に供することとした。

Table 7 Elution pattern from Florisil mini column

Pesticide	Recoveries of pesticide <sup>a)</sup> (%)							
	Wet type for dogs				Wet type for cats			
	0~1 mL	~2 mL	~3 mL	~4 mL	0~1 mL	~2 mL	~3 mL	~4 mL
Chlorpyrifos-methyl	75.9	92.5	95.3	98.0	75.5	95.5	97.7	98.1
Pirimiphos-methyl	77.5	92.4	95.5	97.3	74.8	96.4	96.8	96.1
Malathion	47.4	88.2	93.4	96.5	41.5	90.3	94.5	95.5

a) Mean(*n*=2)

#### 3.5 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した各標準液 (0.05~5 µg/mL) 各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンのピーク面積又は高さを用いて検量線を作成した。その結果、検量線はクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとしてそれぞれ 0.05~5 µg/mL (注入量として 0.05~5 ng) の範囲で直線性を示した。得られた検量線の例を Fig 2 に示した。

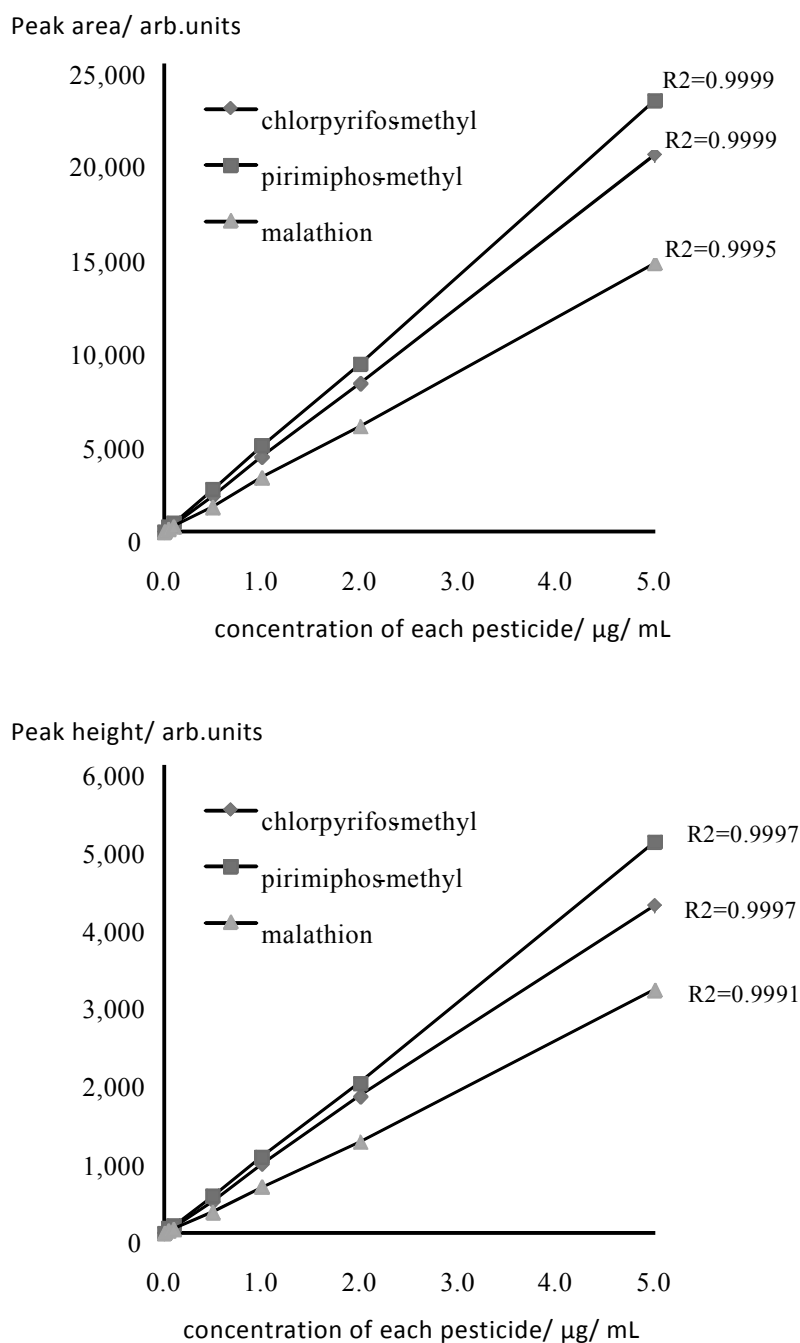


Fig. 2 Calibration curves of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

### 3.6 妨害物質の検討

市販の愛がん動物用飼料（犬用ウェット製品 7 種，猫用ウェット製品 11 種）を本法に従って分析を行い，妨害ピークの有無を確認した。

その結果，クロルピリホスメチル等の定量を妨害するピークは認められなかった。

### 3.7 添加回収試験

犬用ウェット製品 2 種及び猫用ウェット製品 2 種にクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 2 mg/kg 相当量，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法により

5点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、Table 8 のとおりクロルピリホスメチルについては平均回収率 89.7~93.8 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 3.9 %以下，ピリミホスメチルについては平均回収率 80.8~88.5 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 5.1 %以下，マラチオンについては平均回収率 92.1~94.5 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 3.6 %以下の成績が得られた。

なお，添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 8 Recoveries of pesticide from four kinds of pet food

Pesticide	Spike level (mg/kg)	Wet type for dogs1		Wet type for dogs 2		Wet type for cats 1		Wet type for cats 2	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Chlorpyrifos-methyl	2	89.9	3.9	93.8	1.8	89.7	2.5	91.5	1.9
Pirimiphos-methyl	0.5	82.9	4.0	80.8	5.1	84.4	2.8	88.5	1.4
Malathion	2	93.6	3.6	94.5	2.1	92.1	2.7	92.8	2.9

a) Mean ( $n=5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

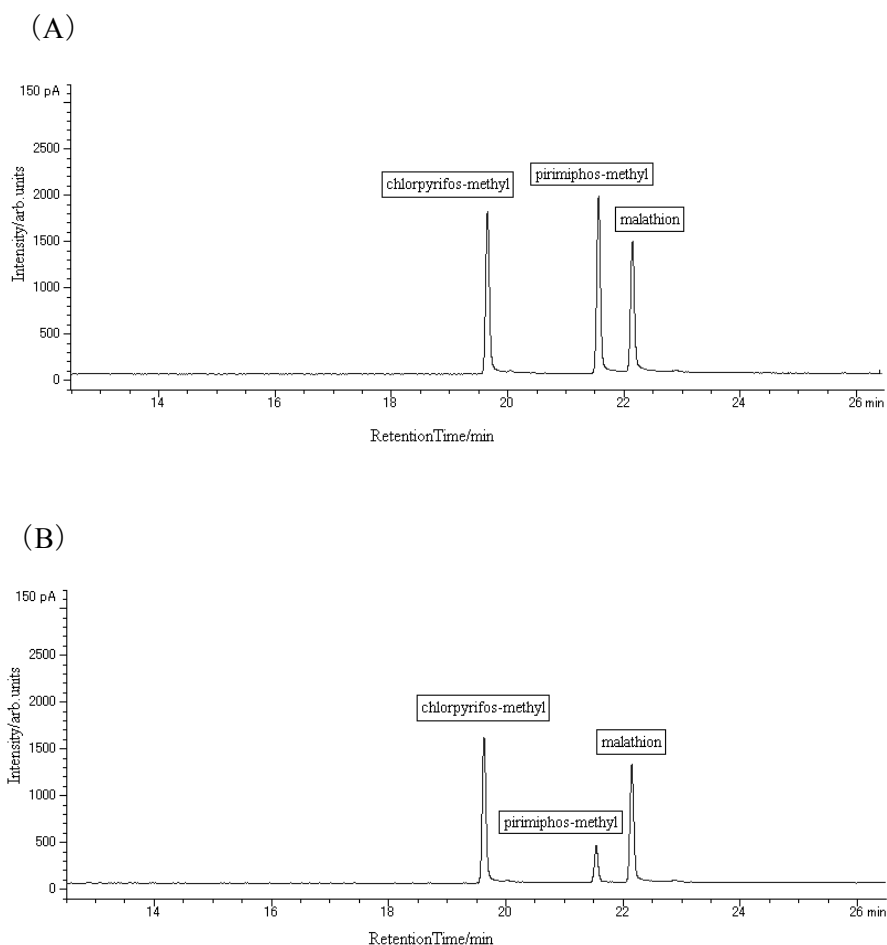


Fig. 3 Chromatograms of each pesticide

(A) Mix Standard solution (The amount was each 4 ng.)

(B) Sample solution of wet type pet food for cats spiked chlorpyrifos-methyl and malathion at 2 mg/kg, pirimiphos-methyl at 0.5 mg/kg

### 3.8 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、得られたピークの  $SN$  比が 10 以上となる濃度は、最も低いマラチオンで、0.05 mg/kg であり、 $SN$  比が 3 以上となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

確認のために、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は、Table 9 のとおりであった。

以上の結果から、本法の定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であった。

Table 9 Recoveries at the level of limit of quantitation

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Wet type for dogs1		Wet type for dogs2		Wet type for cats1		Wet type for cats2	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
Chlorpyrifos-methyl	0.05	75.7	3.5	87.9	1.9	74.1	4.6	83.9	9.5
Pirimiphos-methyl	0.05	76.3	4.9	83.4	6.7	73.9	4.8	78.5	8.4
Malathion	0.05	71.8	2.1	81.5	11	70.5	1.4	91.5	13

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.9 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

成犬用ウェット製品 A 及び成猫用ウェット製品にクロルピリホスメチルとして 2 mg/kg 相当量、ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量、マラチオンとして 2 mg/kg 相当量を添加した。また、成犬用ウェット製品 B にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 0.05 mg/kg 相当量を添加した。以上の試料を用いて、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 7 試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

クロルピリホスメチルでの結果は Table 10 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.5 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ $RSD_f$  及び  $RSD_R$ ）として 2.3 % 及び 7.0 % であり、HorRat は 0.50 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 6.4 % 及び 16 % であり、HorRat は 0.73 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 93.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 4.9 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.68 であった。

ピリミホスメチルでの結果は Table 11 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 95.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ $RSD_f$  及び  $RSD_R$ ）として 2.7 % 及び 9.3 % であり、HorRat は 0.52 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 94.6 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 3.6 % 及び 14 % であり、HorRat は 0.62 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 4.7 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.57 であった。

マラチオンでの結果は Table 12 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.4 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ $RSD_f$  及び  $RSD_R$ ）として 2.1 % 及び 7.8 % であり、HorRat は 0.54 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 7.1 % 及び 18 % であり、HorRat は 0.84 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 4.9 % 及び 11 % であり、HorRat は

0.74 であった。

参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフの機種等を Table 13 に示した。

Table 10 Collaborative study results of Chlorpyrifos - methyl

Lab.No.	Pet food types					
	Wet type for dogs A (mg/kg)		Wet type for dogs B (mg/kg)		Wet type for cats (mg/kg)	
1	1.85	1.78	0.0558	0.0567	1.68	1.75
2	1.70	1.66	0.0359	0.0392	1.67	1.72
3	1.90	1.87	0.0560	0.0656	2.00	1.84
4	1.96	1.90	0.0531	0.0519	1.85	1.94
5	1.92	1.93	0.0468	0.0426	1.90	2.15
6	2.02	2.14	0.0538	0.0591	2.17	2.09
7	1.78	1.78	0.0536	0.0540	1.78	1.70
Spiked level (mg/kg)	2		0.05		2	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.87		0.0517		1.87	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	93.5		103		93.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.3		6.4		4.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.0		16		10	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	14		22		14	
HorRat	0.50		0.73		0.68	

a)  $n=14$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Collaborative study results of Pirimiphos-methyl

Lab.No.	Pet food types					
	wet type for dogs A (mg/kg)		wet type for dogs B (mg/kg)		wet type for cats (mg/kg)	
1	0.491	0.460	0.0551	0.0533	0.439	0.454
2	0.416	0.403	0.0352	0.0382	0.415	0.429
3	0.502	0.486	0.0515	0.0531	0.517	0.482
4	0.496	0.484	0.0454	0.0440	0.468	0.492
5	0.472	0.475	0.0427	0.0416	0.473	0.536
6	0.535	0.562	0.0471	0.0515	0.549	0.536
7	0.446	0.440	0.0527	0.0507	0.438	0.412
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.05		0.5	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.476		0.0473		0.474	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	95.3		94.6		94.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.7		3.6		4.7	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.3		14		10	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	18		22		18	
HorRat	0.52		0.62		0.57	

a)  $n=14$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 12 Collaborative study results of Malathion

Lab.No.	Pet food types					
	Wet type for dogs A (mg/kg)		Wet type for dogs B (mg/kg)		Wet type for cats (mg/kg)	
1	1.81	1.77	0.0544	0.0592	1.70	1.77
2	1.67	1.63	0.0351	0.0358	1.68	1.72
3	1.94	1.96	0.0586	0.0690	2.19	2.04
4	1.99	1.94	0.0488	0.0479	1.88	1.99
5	1.89	1.92	0.0488	0.0447	1.90	2.14
6	2.00	2.12	0.0466	0.0526	2.11	2.09
7	1.75	1.75	0.0556	0.0556	1.75	1.61
Spiked level (mg/kg)	2		0.05		2	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.87		0.0509		1.90	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	93.4		102		94.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.1		7.1		4.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.8		18		11	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	14		22		14	
HorRat	0.54		0.84		0.74	

a)  $n=14$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Gas chromatograph	GC column (i.d.×length, Filmthickness)
1	Agilent Technologies 6890	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
3	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
4	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
5	Agilent Technologies 6890N	J&W HP-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.32 μm)
6	SHIMAZU GC-2010 Plus	J&W HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
7	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)

#### 4 まとめ

愛がん動物用飼料中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンについて，分析センター法を基に，ガスクロマトグラフによる同時定量法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ，次の結果を得た．

- 1) クロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンの検量線は 0.05~5.0 ng 相当量（注入量として 0.05~5 ng）の範囲で直線性を示した．
- 2) ウェット製品中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンの抽出は，抽出溶媒に酢酸エチルを用いることによりエマルジョンの発生を防止できた．また，自然汚染に近似させた試料を用いて酢酸エチルを使用することの妥当性を検討したところ，良好な結果が得られた．
- 3) ウェット製品中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンをドライ法 A グループの測定条件を基にして検討したところ，3 成分同時測定が可能であった．
- 4) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討を行ったところ，流出液 2 mL 以降を分取することにより安定した回収率を得た．
- 5) 試験法の妥当性を確認するため犬用ウェット製品 2 種及び猫用ウェット製品 2 種にクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 2 mg/kg，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量添加し，添加回収試験を実施した結果，クロルピリホスメチルについては平均回収率 89.7~93.8 %，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.9 % 以下，ピリミホスメチルについては平均回収率 80.8~88.5 %，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1 % 以下，マラチオンについては平均回収率 92.1~94.5 %，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.6 % 以下の成績が得られた．
- 6) 本法による定量下限はクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンともに，試料（現物）中で 0.05 mg/kg，検出下限は 0.02 mg/kg であった．
- 7) 成犬用ウェット製品 A 及び成猫用ウェット製品にクロルピリホスメチルとして 2 mg/kg 相当量，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量，マラチオンとして 2 mg/kg 相当量を，成犬用ウェット



製品 B にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、7 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、クロルピリホスメチルにおいては、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.5 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 2.3 % 及び 7.0 % であり、HorRat は 0.50 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 6.4 % 及び 16 % であり、HorRat は 0.73 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 93.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 4.9 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.68 であった。ピリミホスメチルにおいては、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 95.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 2.7 % 及び 9.3 % であり、HorRat は 0.52 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 94.6 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 3.6 % 及び 14 % であり、HorRat は 0.62 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 4.7 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.57 であった。マラチオンにおいては、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.4 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 2.1 % 及び 7.8 % であり、HorRat は 0.54 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 7.1 % 及び 18 % であり、HorRat は 0.84 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 4.9 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.74 であった。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 社団法人日本植物防疫協会, 農薬ハンドブック 2005 年度版編集委員会編集: 農薬ハンドブック 2005 年度版
- 2) 農薬残留分析法研究班 (武田 明治, 小田中 芳次, 小松 一裕, 前川 吉明) 編: 最新 農薬の残留分析法 [改訂版], 中央法規出版, 359 (2006).
- 3) 農林水産省令・環境省令: 愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令, 平成 21 年 4 月 28 日, 農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009).