

分担研究報告書

各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

(2) 原子発光検出器による含硫黄作物中の有機塩素系農薬の測定

分担研究者 佐々木久美子

(国立医薬品食品衛生研究所)

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

分担研究報告書

各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究 (2) 原子発光検出器による含硫黄作物中の有機塩素系農薬の測定

分担研究者 佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

GC-ECD による測定では妨害が多く、高感度分析が困難な含硫黄作物中の有機塩素系農薬等について、原子発光検出器 (AED: Atomic Emission Detector) 付き GCを用いて検出を試みた。代謝物を含めた塩素のみを有する 15 農薬、塩素及び硫黄を有する 6 農薬の計 21 農薬について、塩素あるいは硫黄元素をターゲットにして測定し、検出の可否を検討した。その結果、いずれの農薬も 1 ng を十分に検出できた。また、含硫黄作物であるタマネギ、ネギ及びシイタケの抽出液にこれら農薬を添加して、フロリジルミニカラムで精製後 GC-AED で測定したところ、多くの農薬が検出できることが示唆された。

研究協力者

永山敏廣 東京都立衛生研究所

農薬標準品：いずれも林純薬工業(株)、和光純薬工業(株)または Riedel-de Haën 社製の残留農薬試験用を用いた。表 1 に検討に用いた農薬を示した。

A. 研究目的

食品中の残留農薬を分析するとき、有機塩素系農薬など塩素を分子内に含む農薬には GC-ECD が用いられる。しかし、ねぎ類及びきこの類など多くの硫黄成分を有する農産物では、試料中の成分による妨害が多く、これら農薬を高感度に検出することはほとんどできない。今回、GC-AED を用いて、有機塩素系農薬などの分子内に含まれる特徴的な元素である塩素を選択的に捕捉することにより、硫黄成分を含む農産物中の有機塩素系農薬を高感度に検出することを試みた。

B. 研究方法

1. 試料

東京都内で購入したタマネギ、ネギ及びシイタケを用いた。

2. 試薬及び試液

試薬：n-ヘキサン、アセトン、酢酸エチル及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用 (和光純薬工業(株)または関東化学(株)製) を使用した。

カートリッジミニカラム：Sep-Pak plus Florisil (910mg、Waters社製) を使用した。

表 1. 測定対象農薬

分子内に塩素のみを含む農薬

- | | |
|------------------|--------------|
| 1. α -BHC | 9. アルドリッ |
| 2. β -BHC | 10. カメキニル |
| 3. γ -BHC | 11. カルベンゾレート |
| 4. δ -BHC | 12. カロチニル |
| 5. p,p'-DDD | 13. ジクロリン |
| 6. p,p'-DDE | 14. デイルドリッ |
| 7. o,p'-DDT | 15. プロミトン |
| 8. p,p'-DDT | |

分子内に塩素及び硫黄を含む農薬

- | | |
|-------------|------------------|
| 16. カブタホル | 19. インドスルファン I |
| 17. キアブタ | 20. インドスルファン II |
| 18. ジクロルアクト | 21. インドスルファンフルエト |

農薬標準原液：各農薬標準品を n-ヘキサンで溶解して 1 mg/mL の濃度に調製し、冷凍庫 (-20 °C) に保存した。

農薬標準混合溶液：いずれも分子内に塩素を有する α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、

p,p'-DDT、p,p'-DDD、p,p'-DDE、o,p'-DDT、アルドリン、ディルドリン、クロルベンジレート、クロロタロニル、クロメトキシニル、ジクロラン、プロシミドン及び分子内に塩素及び硫黄を有するカプタホール、キャプタン、ジクロフルアニド、エンドスルファンI、エンドスルファンII、エンドスルファンサルフェートの各農業標準原液を採り、n-ヘキサンを加えて10 µg/mLの濃度に調製し、冷凍庫(-20℃)に保存した。

3. 装置

GC-AED: Hewlett Packard 社製 HP5921A (AED)付き HP5890 SERIES II (GC) を用いた。

4. GC 操作条件

(1) GC 条件

カラム: DB-5ms (0.25 mm i.d.× 30 m, 膜厚 0.25 µm)

カラム温度: 50℃(1 min)→ 25℃/min→ 125℃→ 10℃/min→ 300℃ (6.5 min)

注入口温度: 250℃

キャリアガス: ヘリウム 6.5 kgf/cm²

カラムヘッド圧: 17.5 psi

注入方法: スプリットレス

注入量: 2 µL

(2) AED 条件

ヘリウム供給圧: 30 psi

窒素パージ流量: 2 L/min

キャビティ圧: 1.5 psi

キャビティ温度: 250℃

トランスファーライン温度: 250℃

使用ガス: 水素 2.1 kgf/cm²

酸素 2.3 kgf/cm²

検出波長: 塩素 479 nm、硫黄 181 nm

5. 試験溶液の調製

(1) 抽出溶液の調製

試料 20 g にアセトン・n-ヘキサン (2:3) 混液 100 mL を加え 5 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残渣を n-ヘキサンで洗浄し、吸引ろ過してろ液を合わせ、40℃以下で減圧濃縮した。濃縮液に酢酸エチル・n-ヘキサン (1:4) 混液 50 mL 及び 5%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、5 分間激しく振とうした。有機層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、40℃以下で減圧濃縮した。

残留物を n-ヘキサン 2 mL に溶かし、抽出溶液とした。

(2) カートリッジミニカラムによる精製

抽出溶液 1 mL を、あらかじめアセトン・n-ヘキサン (1:9) 混液 10 mL でコンディショニングした Sep-Pak plus Florisil カートリッジに負荷し、アセトン・n-ヘキサン (1:9) 混液 10 mL で溶出した。溶出液を 40℃以下で減圧濃縮し、残留物に n-ヘキサン 1 mL を加えて溶かし、GC-AED 用試験溶液とした。

6. 添加回収試験

タマネギ、ネギ及びシイタケを用いて 5 (1) 抽出溶液の作製に従いそれぞれの試料抽出溶液を作製した。得られた試料抽出溶液 1 mL に農業標準混合溶液を 0.1 mL ずつ加え、5 (2) カートリッジカラムによる精製に従い処理し、試験溶液とした。

各試験溶液は、塩素あるいは硫黄元素を測定ターゲットとして調整した GC-AED に注入し、各農業の回収率を求めた。

7. 定量

各試験溶液を GC-AED に注入して得られたクロマトグラム上に出現したピークの保持時間で定性し、またそのピーク面積値を用いて、絶対検量線法で定量した。

C. 研究結果

1. GC-AED による有機塩素系等 21 農業の検出

今回検討した 21 農業はいずれも分子内に塩素を有するため、塩素を測定ターゲットとしてすべて検出できた。各農業を 1 ng 注入したときの GC クロマトグラムを図 1 に示した。

また、これら農業のうち、カプタホール、キャプタン、ジクロフルアニド、エンドスルファンI、エンドスルファンII及びエンドスルファンサルフェートは、いずれも分子内に硫黄も併せて有することから、硫黄を測定ターゲットにしても検出が可能であった。各農業を 1 ng 注入したときの GC クロマトグラムを図 2 に示した。

2. タマネギ、ネギ及びシイタケ中の有機塩素系等 21 農業の検出

ネギ抽出物に各農業を試料中濃度として 0.1

ppm となるように添加し、フロリジルミニカラムで精製後、塩素及び硫黄をターゲットにして GC-AED で測定したときの GC クロマトグラムを図 3 及び図 4 に示した。塩素をターゲットに測定したとき、妨害ピークはほとんど見られなかったが、硫黄では多くの妨害ピークが観察された。

各農薬の回収率を、塩素をターゲットとしたときの結果を表 2 に、硫黄をターゲットとしたときの結果を表 3 に示した。タマネギ及びネギでは多くの農薬は 70 ~ 120 % の回収率が得られたが、シイタケでは回収率の低い (40 % 以下) 農薬が多く見られた。カブタホールは、塩素及び硫黄のいずれをターゲットに測定しても、これら農作物から回収できなかった。

D. 考察

1. GC-AED による有機塩素系等 21 農薬の検出

AED はヘリウムプラズマ中で農薬などの化合物を原子に分解し、励起された原子が発生する特有の光を捉えることから、農薬分子に含まれる元素を選択的に検出できる。その感度は測定元素の数に依存し、分子内の元素数が多いほど検出感度が高くなる傾向がある。従って塩素あるいは硫黄原子を多く有する農薬は、比較的高感度で検出できた。各農薬とも 1 ng の注入で、GC クロマトグラム上にピークが確認できた。

また、硫黄を測定したときそのレスポンスは直線性を示すため、定量性に優れていることが示唆された。

2. タマネギ、ネギ及びシイタケ中の有機塩素系等 21 農薬の検出

たまねぎ、ねぎ及びシイタケなどは硫黄成分を多く含むため、GC-ECD での測定時に多くの試料由来の妨害ピークにより、ほとんどクロマトグラムのベースがとれない。一方、AED を用いた場合、硫黄と塩素は明確に区別され、選択的に検出されるため、塩素で測定した場合にはほとんど妨害ピークが見られなかった (図 3)。しかし、AED を用いても、膨大な妨害物質の存在下では、注入口及びカラムへの負荷が大きく、精度良く農薬を検出することは困難で

あった。そこで、有機塩素系農薬の精製に広く用いられるフロリジルで簡便な精製を行った後、測定した。今回検討した試料は、特に硫黄成分を多く含むため、フロリジルのみでは精製が不十分であり、分子内に硫黄を有する農薬を S フィルターを装着した FPD で測定することはできなかった。AED を用いて硫黄をターゲットとして測定した場合でも、クロマトグラム上に多くの妨害ピークが検出されたが、農薬由来のピークの有無を判別することは可能であった (図 4)。このことは、FPD と異なり、AED のレスポンスが直線性を示すため (FPD のレスポンスは対数に比例する)、過量の妨害成分による影響が FPD に比較して少なかったためと考えられる。

タマネギ、ネギ及びシイタケからの抽出溶液に、試料中濃度が 0.1 ppm となるように各農薬を添加し、フロリジルで精製した後 GC-AED で測定して、それぞれの回収率を求めたところ、一部農薬で 50 % 以下の回収率が示された。また、カブタホールはいずれの抽出溶液からも検出できなかった。これら回収率が低かった農薬も、より高レベルの精製を加えると検出される場合も認められ、過量な妨害成分の影響により、注入口などで分解が促進され、あるいは原子化が抑えられた可能性もある。さらに検討を加える必要があると考える。

E. 結論

(1) GC-AED による有機塩素系等 21 農薬の検出

BHC、DDT、クロロタロニル、ディルドリン、プロシミドンなどは塩素を、また、キャプタン、エンドスルファンなどは塩素及び硫黄をターゲットにして、1 ng の注入量で十分に検出できることが示された。

(2) タマネギ、ネギ及びシイタケ中の有機塩素系農薬等 21 農薬の検出

多くの硫黄成分を含む農産物からの有機塩素系等 21 農薬の検出を試みた。試料中濃度 0.1 ppm となるように添加したとき、多くの農薬を検出できた。しかし、カブタホールやシイタケの抽出溶液を用いた場合などでほとんど回収できない農薬も見られたことから、精製方法などさらに検討を加える必要があることが示され

た。

F. 研究発表

1. 学会発表

「GC-AED を用いたネギ類, キノコ類中塩素及び

硫黄含有農薬の分析」, 立石恭也, 永山敏廣, 高野伊知郎, 小林麻紀, 伊藤正子, 田村康宏, 木村奈穂子, 北山恭子, 斉藤和夫, 日本食品衛生学会 第 81 回学術講演会 平成 13 年 5 月 17 日 東京

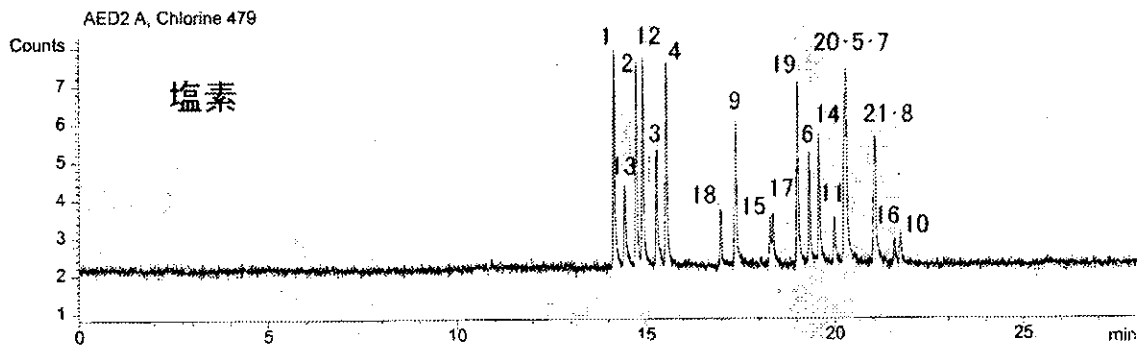


図 1. 塩素を測定元素としたときの 21 農薬の GC クロマトグラム

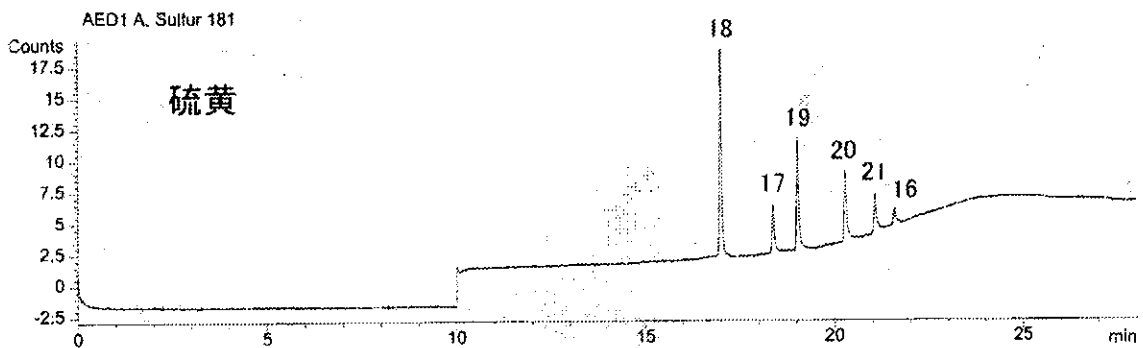


図 2. 硫黄を測定元素としたときの 21 農薬の GC クロマトグラム

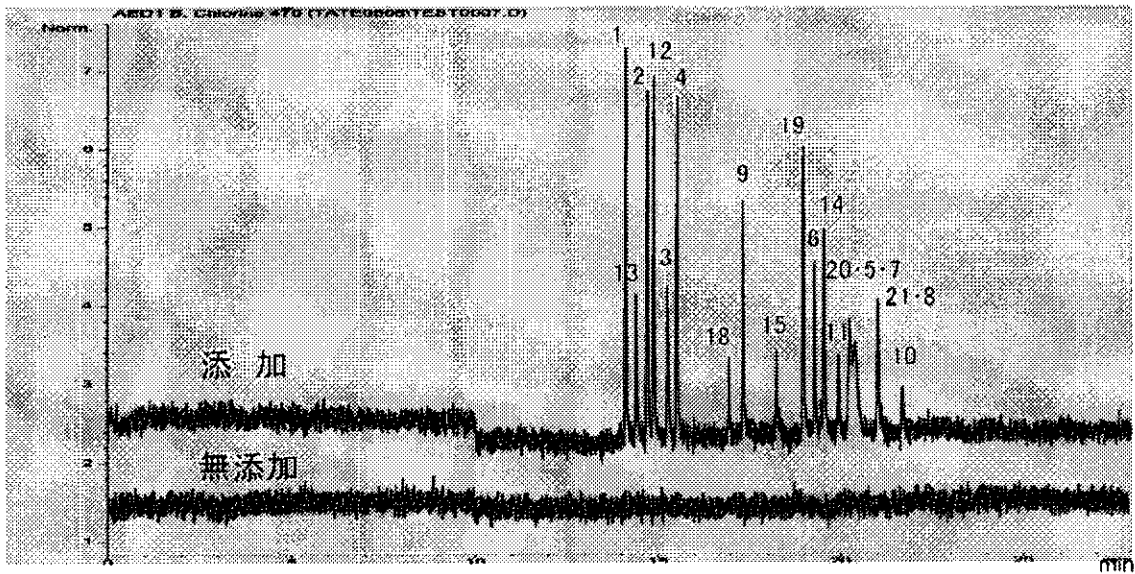


図3. ネギ抽出溶液に添加した農菜のGCクロマトグラム (ターゲット: 塩素)

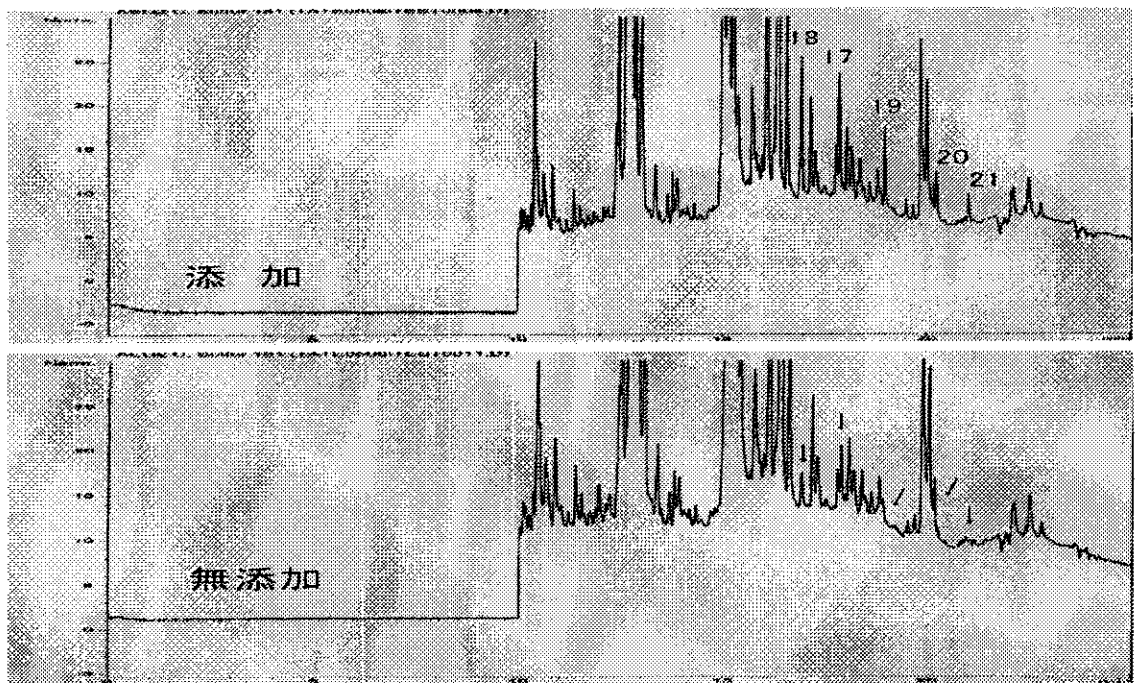


図4. ネギ抽出溶液に添加した農菜のGCクロマトグラム (ターゲット: 硫黄)

表 2. 試料抽出溶液に添加した農薬の回収率 (ターゲット: 塩素)

農薬	回収率 (%)		
	タマネギ	ネギ	シイタケ
α -BHC	117	109	107
CNA	105	84	117
β -BHC	111	112	109
TPN	114	116	110
γ -BHC	126	77	103
δ -BHC	104	103	101
ジクロフルアニド	48	118	85
アルドリノ	58	93	99
プロシミドン	78	107	99
キャプタン	45	57	79
エンドスルファンI	82	128	19
p, p' -DDE	101	161	21
ディルドリン	103	102	18
クロルベンジレート	86	83	nd
エンドスルファンII	83	(65)	(19)
p, p' -DDD	67	(65)	(19)
o, p' -DDT	82	(65)	(19)
エンドスルファンサルフェート	71	83	nd
p, p' -DDT	103	113	32
カプタホール	nd	nd	nd
クロメトキシニル	120	116	nd
nd: 検出できなかった。 ()内は3農薬の総量で算出した。			n=3

表 3. 試料抽出溶液に添加した農薬の回収率 (ターゲット: 硫黄)

農薬	回収率 (%)		
	タマネギ	ネギ	シイタケ
ジクロフルアニド	47.1	103	87.7
キャプタン	172	72.6	53.3
エンドスルファンI	111	92.0	61.5
エンドスルファンII	79.3	93.0	102
エンドスルファンサルフェート	101	92.6	84.3
カプタホール	nd	nd	nd
nd: 検出できなかった。			n=3