ノート

原子発光検出器付ガスクロマトグラフ (GC-AED) を用いたネギ類,
キノコ類中の塩素含有農薬の分析

(平成 16 年 6 月 10 日受理)

立石 恭也^{*†} 高野伊知郎^{*} 小林 麻紀^{*} 田村 康宏^{*} 富澤 早苗^{*}
酒井奈穂子^{*} 上 條 恭子^{*} 永山 敏廣^{*} 鎌田 国広^{*}Analysis of Pesticides Including Chlorine in Welsh Onions and Mushrooms Using Gas
Chromatograph with an Atomic Emission Detector (GC-AED)Yukinari TATEISHI[†], Ichiro TAKANO, Maki KOBAYASHI, Yasuhiro TAMURA, Sanae TOMIZAWA,
Naoko SAKAI, Kyoko KAMIJO, Toshihiro NAGAYAMA and Kunihiro KAMATA(Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-0073, Japan; [†] Corresponding author)

An analytical method for the determination of 32 kinds of pesticide residues in onions, Welsh onions and mushrooms using gas chromatograph with an atomic emission detector (GC-AED) was developed. The pesticides were extracted with acetone-*n*-hexane (2:3) mixture. The crude extract was partitioned between 5% sodium chloride and ethyl acetate-*n*-hexane (1:4) mixture. The extract was passed through a Florisil[®] mini-column for cleanup with 10 mL of acetone-*n*-hexane (1:9) mixture. Although the sensitivity of GC-AED was inferior to that of GC-ECD, GC-AED has a superior element-selectivity. Therefore pesticide residues in foods could be analyzed more exactly by using GC-AED. Thirty-two pesticides including chlorine in onion, Welsh onion and shiitake mushroom were detected without interference. Recoveries of these pesticides from samples determined by GC-AED were 64–114%, except for a few pesticides.

(Received June 10, 2004)

Key words: 原子発光検出器付ガスクロマトグラフ GC-AED, 残留農薬 pesticide residue, 固相抽出 solid phase extraction, タマネギ onion, 長ネギ Welsh onion, シイタケ shiitake mushroom

緒 言

キャプタン, カプタホール, エンドスルフェンなど分子内に塩素および硫黄を含有する農薬は, GC-ECD あるいは S フィルターを装着した GC-FPD を用いた測定が多く利用されている。しかし, ネギ類, キノコ類では成分中に硫化アリル, レンチオニンなどの硫黄化合物が多く含まれていることから¹⁾, ECD あるいは FPD を用いた分析は困難とされてきた。そのため, 凍結-リン酸添加磨砕法²⁾ や電子レンジを利用した前処理法³⁾ などが考案されたが, これらは処理に時間を要したり, 水分の少ない試料には適さないなどの制約があった。

原子発光検出器 (atomic emission detector) 付きガスクロマトグラフ (GC-AED) は分子をプラズマにより励起状態にし, その励起状態が基底状態に戻るときの元素特有の発光を測定するため分子中の元素を高い選択性で定性,

定量することができ^{4)~8)}, ハロゲン (フッ素, 塩素, 臭素, ヨウ素) を明確に識別することが可能であるなど ECD にはない利点もある。

そこで今回, GC-AED を用いたネギ類, キノコ類中の残留農薬分析法について検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

市販のタマネギ, 長ネギおよびシイタケを試料として用いた。

2. 測定対象農薬

BHC, DDT など分子内に塩素を含む農薬 25 種と, キャプタン, カプタホールなど分子内に塩素および硫黄を含む農薬 7 種の, いずれも GC-ECD を用いて測定されることの多い 32 農薬を選定した (Table 1)。

3. 試薬および標準品

農薬標準品: 林純薬工業(株)製および和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用標準品を用いた。

[†] 連絡先^{*} 東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

農薬標準溶液：それぞれ 10 mg をアセトンまたは *n*-ヘキサンに溶解し、全量を 50 mL として標準原液とした。16 種 (Table 1, No. 1~16), 7 種 (Table 1, No. 17~23) および 9 種 (Table 1, No. 24~32) の 3 つの組み合わせで、クロルフェナピルおよびジコホールは 20 $\mu\text{g/mL}$, その他の農薬は 10 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準溶液を作製し、必要に応じて *n*-ヘキサンで希釈して用いた。

ミニカラム：Waters 社製の Sep-pak[®] Plus Florisil[®] (910 mg) を用いた。

その他の試薬：残留農薬試験用または試薬特級品を用いた。

4. 装置および測定条件

1) GC-AED

ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 社製 HP5921 A 型 AED 付き HP5890 SERIES II ガスクロマトグラフを用いた。GC 条件は、カラム：DB-5MS (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μm , J & W 社製); カラム温度：50°C (1 min) $\rightarrow$ (25°C/min) $\rightarrow$ 125°C $\rightarrow$ (10°C/min) $\rightarrow$ 300°C (6.5 min); 試料注入口温度：250°C; ガス流量：ヘリウム 6.5 kgf/cm²; カラムヘッド圧：17.5 psi; 注入量 2 μL (スプリットレス) とした。

AED 条件は、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; キャビティ温度およびトランスファーライン温度：250°C, 検出波長：塩素 479 nm; 使用ガス：水素 2.1 kgf/cm², 酸素 2.3 kgf/cm² とした。

2) GC-ECD

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-17A を用いた。GC 条件は、カラム：DB-5MS (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μm , J & W 社製); カラム温度：50°C (1 min) $\rightarrow$ (25°C/min) $\rightarrow$ 125°C $\rightarrow$ (10°C/min) $\rightarrow$ 300°C (6.5 min); 試料注入口温度：250°C; 検出器温度 300°C; キャリアーガス：窒素; 注入量 1 μL (スプリットレス) とした。

5. 試験溶液の調製

細切した試料 20 g をはかり取り、アセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液 100 mL を加え、5 分間ホモジナイズ後吸引ろ過し、ろ液をエバポレーターで約 30 mL に減圧濃縮した。酢酸エチル-*n*-ヘキサン (1:4) 混液 50 mL および 5% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加えて 5 分間振とうし、酢酸エチル-*n*-ヘキサン層を分取した。無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過後、減圧濃縮し、残留物に *n*-ヘキサン 2 mL

Fig. 1. Chlorine-selective GC-AED chromatograms of (A) 16 pesticides, (B) 7 pesticides and (C) 9 pesticides in standard mixtures
Peak numbers correspond to the numbering of pesticides in Table 1.

Fig. 2. Chlorine and carbon-selective GC-AED and GC-ECD chromatograms of Welsh onion extract

A: sample extract spiked with 9 pesticides (GC-AED)

B: blank sample extract (GC-AED)

(a): carbon selective (496 nm) (b): chlorine selective (479 nm)

C: sample extract spiked with 9 pesticides (GC-ECD)

D: blank sample extract (GC-ECD)

Peak numbers correspond to the numbering of pesticides in Table 1.

○=The peaks of a food ingredient which interferes with detection

を加え抽出溶液とした。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をした Sep-pak® Plus Florisil® ミニカラムに抽出溶液 1 mL を負荷し、続いてアセトン-*n*-ヘキサン (1:9) 混液 10 mL で溶出した。溶出液を減圧濃縮後、*n*-ヘキサン 1 mL に溶解して GC-AED および GC-ECD 用試験溶液とした。

6. 分 析

GC-AED: 試験溶液を GC-AED に注入し、塩素に特徴的な 479 nm の波長を用いて測定した。定性は、検出したピークと標準品ピークとの保持時間の比較から行った。定量は、クロルフェナピルおよびジコホールが 2 µg/mL, その他の農薬は 1 µg/mL の標準溶液での一点検量線によるピーク面積法で行い、必要に応じて手動で波形処理を行い定量値を求めた。

GC-ECD: 比較のために試験溶液を適宜希釈して GC-ECD で測定を行った。定性は、検出したピークと標準品ピークとの保持時間の比較から行った。定量は適宜希釈した標準溶液での一点検量によるピーク面積法で行い、GC-AED と同様にして定量値を求めた。

AED と ECD の定量値の比較: GC-AED と GC-ECD で得られたおのこの定量値を比較するために両者の比 (ECD/AED) を求めた。

結果および考察

1. GC-AED と GC-ECD のクロマトグラムの比較

32 農薬を同時に添加して試験を行うと、ピークが重なり農薬の判別が困難な場合があったことから、正確に定性、定量するために 3 つのグループに分けて検討した。

Table 1. Recoveries of Spiked Pesticides from Samples by GC-AED

No.	Pesticide	Molecular formula	Recovery (% , mean±S.D., n=3)		
			Onion	Welsh onion	Shiitake mushroom
1	α -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	86.9±10.8	92.5± 7.8	95.4± 1.0
2	β -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	94.8± 6.7	97.4± 4.6	92.6± 3.7
3	γ -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	89.0± 5.8	101.6± 0.9	91.8± 2.8
4	δ -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	92.1± 5.2	96.1±11.6	99.2± 6.0
5	Dichlofluanid	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ F N ₂ O ₂ S ₂	49.8±10.2	58.8± 8.3	nd
6	Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	71.3±11.3	88.5± 9.2	89.2±10.0
7	Heptachlor epoxide	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	86.1±15.9	99.9±10.2	94.2± 8.0
8	Captan	C ₉ H ₈ Cl ₃ N O ₂ S	64.1±11.3	48.4±10.6	nd
9	α -Endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	91.1±14.9	97.7± 6.2	97.0± 9.6
10	Chlorfenapyr	C ₁₅ H ₁₁ Br Cl F ₃ N ₂ O	96.0±15.1	113.6±18.4	102.7± 8.0
11	Chlorobenzilate	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₃	85.0±13.9	77.6± 1.7	88.2±16.6
12	β -Endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	95.6± 8.4	77.3±36.7	88.9± 6.8
13	Endosulfan sulfate	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	85.2±10.8	91.5± 6.5	94.0±12.5
14	Captafol	C ₉ H ₈ Cl ₃ N O ₂ S	54.5±23.6	55.0±49.6	nd
15	Methoxychlor	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	93.1±16.1	109.9±19.6	95.4± 6.1
16	Tetradifon	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	89.9± 8.2	75.2± 7.4	96.3±12.0
17	Quintozone (PCNB)	C ₆ Cl ₅ N O ₂	83.9± 6.0	89.9± 2.7	72.1± 8.0
18	Heptachlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	80.6± 7.6	96.8±10.2	77.6±12.2
19	<i>p,p'</i> -DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	95.6± 6.6	87.6± 9.1	74.4± 6.7
20	Chloropropylate	C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ O ₃	70.2± 1.0	65.7±13.5	66.3± 9.9
21	<i>p,p'</i> -DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	90.6±12.3	51.9±28.6	75.2±10.0
22	Chlornitrofen (CNP)	C ₁₂ H ₆ Cl ₃ N O ₃	99.8± 8.2	83.4± 7.5	73.5±12.8
23	Dicofol	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	110.0±20.4	96.8±12.5	96.3±12.7
24	Dichloran (CNA)	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	92.4± 6.1	69.7± 3.7	83.0±14.5
25	Chlorothalonil (TPN)	C ₈ Cl ₄ N ₂	29.1± 1.8	46.0± 6.5	13.2±10.5
26	Vinclozolin	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ N O ₃	90.9±13.4	68.2± 6.3	82.2±10.3
27	Procymidone	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ N O ₂	89.3± 5.3	74.3±12.9	83.5±11.8
28	Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	86.9±10.5	76.7±12.2	83.8±12.2
29	Endrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	91.2± 4.2	79.9± 8.1	80.2±11.0
30	<i>o,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	81.7±13.5	69.9±24.3	81.4±11.4
31	<i>p,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	46.8± 9.5	45.9±18.7	75.3±13.2
32	Chlomethoxynil	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ N O ₂	83.0±17.6	54.2± 1.5	72.3± 6.1

nd=not detected

GC-AED のクロマトグラムでは、いずれの農薬もピークの分離、形状ともに良好な結果が得られた (Fig. 1).

次に、試料溶液における GC-AED と GC-ECD のクロマトグラムの比較を行った。その結果、GC-AED のクロマトグラムでは、いずれの農薬に対しても試料由来のきょう雑ピークは認められなかった。しかし、GC-ECD では一部の農薬がきょう雑ピークと重なり定量が困難な場合もあった。GC-AED は、GC-ECD と比較して感度はやや劣るものの、よりの確な定性が可能であることが示された (Fig. 2).

2. 検出限界および検量線

GC-AED における 32 農薬の検出限界 (S/N=3) は作物中として 0.02~0.1 $\mu\text{g/g}$ であった。

検量線は、標準溶液の 0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲において、いずれも原点を通る良好な直線性を示し、一点検量による定量が可能であった。

3. 固相抽出ミニカラムの検討

抽出溶液中のきょう雑物によるキャピラリーカラムへの負荷および励起時のマトリックスの影響を防止する目的で、Sep-pak[®] Plus Florisil[®], NH₂, Silica, および

ENVITM-Carb の 4 種類のミニカラムを用いて精製条件を検討した。その結果、最も精製効果に優れていた Florisil[®] ミニカラムを採用することとした。本カラムからの溶出条件は、32 農薬すべてが溶出されるアセトン-*n*-ヘキサン (1:9) 混液 10 mL とした。

4. 添加回収試験

細切した試料にクロルフェナビルおよびジコホールが 0.2 $\mu\text{g/g}$ 、その他の農薬は 0.1 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、2 時間放置した後、回収試験を行い、その結果を Table 1 に示した。

ジクロフルアニド、キャプタン、カプタホール、TPN および *p,p'*-DDT の 5 農薬についてはすべての試料において、また *p,p'*-DDD およびクロメトキシニルについては長ネギについてのみ回収率が低かったが、これらを除く農薬については回収率が 64~114% とほぼ良好な結果が得られた。このうち回収率の低かったジクロフルアニド、キャプタン、カプタホールおよび TPN の 4 農薬については植物体中の SH 化合物と反応しやすいことから、抽出時に農薬が分解され^{9,10)} 回収率が低下したものと考えられた。

Table 2. Comparison of the Quantitative Values Obtained by GC-AED and GC-ECD

(μg/g)

No.	Pesticide	Added	Onion			Welsh onion			Shiitake mushroom		
			ECD	AED	Ratio ECD/AED	ECD	AED	Ratio ECD/AED	ECD	AED	Ratio ECD/AED
1	α-BHC	0.1	0.078	0.087	0.90	0.084	0.092	0.91	0.091	0.095	0.95
2	β-BHC	0.1	0.088	0.095	0.93	0.089	0.097	0.92	0.094	0.093	1.02
3	γ-BHC	0.1	0.078	0.089	0.88	0.083	0.102	0.81	0.090	0.092	0.98
4	δ-BHC	0.1	0.086	0.092	0.93	0.089	0.096	0.92	0.147	0.099	1.48
5	Dichlofluanid	0.1	0.041	0.050	0.82	0.032	0.059	0.55	0.006	nd	—
6	Aldrin	0.1	0.074	0.071	1.03	0.073	0.088	0.83	0.086	0.089	0.96
7	Heptachlor epoxide	0.1	0.086	0.086	1.00	0.089	0.100	0.89	0.092	0.094	0.98
8	Captan	0.1	0.040	0.064	0.63	0.022	0.048	0.46	nd	nd	—
9	α-Endosulfan	0.1	0.084	0.091	0.92	0.087	0.098	0.89	0.093	0.097	0.96
10	Chlorfenapyr	0.2	0.175	0.192	0.91	0.178	0.227	0.78	0.189	0.205	0.92
11	Chlorobenzilate	0.1	0.099	0.085	1.17	0.086	0.078	1.11	0.101	0.088	1.14
12	β-Endosulfan	0.1	0.088	0.096	0.92	0.089	0.077	1.15	0.095	0.089	1.07
13	Endosulfan sulfate	0.1	0.087	0.085	1.02	0.089	0.092	0.97	0.093	0.094	0.99
14	Captafol	0.1	0.043	0.054	0.79	0.028	0.055	0.50	0.002	nd	—
15	Methoxychlor	0.1	0.084	0.093	0.91	0.096	0.110	0.87	0.096	0.095	1.00
16	Tetradifon	0.1	0.095	0.090	1.06	0.092	0.075	1.23	0.096	0.096	1.00
17	Quintozone (PCNB)	0.1	0.085	0.084	1.02	0.080	0.090	0.89	0.086	0.072	1.19
18	Heptachlor	0.1	0.092	0.081	1.14	0.078	0.097	0.81	0.088	0.078	1.14
19	p,p'-DDE	0.1	0.104	0.096	1.09	0.087	0.088	1.00	0.087	0.074	1.16
20	Chloropropylate	0.1	0.128	0.070	1.82	0.078	0.066	1.19	0.086	0.066	1.30
21	p,p'-DDD	0.1	0.105	0.091	1.15	0.086	0.052	1.67	0.089	0.075	1.19
22	Chlornitrofen (CNP)	0.1	0.101	0.100	1.01	0.084	0.083	1.01	0.089	0.073	1.21
23	Dicofol	0.2	0.219	0.220	0.99	0.249	0.194	1.29	0.286	0.194	1.48
24	Dichloran (CNA)	0.1	0.086	0.092	0.93	0.089	0.070	1.28	0.084	0.083	1.01
25	Chlorothalonil (TPN)	0.1	0.020	0.046	0.44	0.067	0.046	1.46	0.012	0.013	0.94
26	Vinclozolin	0.1	0.088	0.091	0.97	0.089	0.068	1.30	0.087	0.082	1.05
27	Procymidone	0.1	0.082	0.089	0.92	0.074	0.074	1.00	0.094	0.083	1.12
28	Dieldrin	0.1	0.093	0.087	1.07	0.090	0.077	1.18	0.088	0.084	1.05
29	Endrin	0.1	0.099	0.091	1.08	0.102	0.080	1.27	0.095	0.080	1.19
30	o,p'-DDT	0.1	0.087	0.082	1.06	0.093	0.070	1.33	0.093	0.081	1.14
31	p,p'-DDT	0.1	0.078	0.047	1.66	0.107	0.046	2.33	0.094	0.075	1.25
32	Chlormethoxynil	0.1	0.097	0.083	1.17	0.101	0.054	1.86	0.095	0.072	1.32

nd=not detected

また、*p,p'*-DDT、クロメトキシニルなどについては、GC-AEDにおいて塩素と炭素の測定波長が近接していることから（塩素：479 nm、炭素：496 nm）、試料溶液中に含まれるきょう雑物中の炭素により干渉を受け、塩素測定時における農薬の感度に影響が出たものと考えられた（Fig. 2 A, B-(a)）。

5. GC-AED と GC-ECD の定量値の比較

GC-AEDにより得られた定量値とGC-ECDにより得られた定量値を比較した結果、32農薬中タマネギ28農薬、長ネギ26農薬およびシイタケ29農薬において、ECD/AED比が0.70～1.48の範囲にあり、定量性について両者間で大きな差は見られなかった（Table 2）。

タマネギの*p,p'*-DDT、クロルプロピレート、長ネギの*p,p'*-DDT、クロメトキシニルおよび*p,p'*-DDDのECD/AED比は1.50～2.33であり、ECDの定量値がAEDの定量値より高く出る傾向が見られた。一方、タマネギのTPN、長ネギのキャプタンおよびカプタホルのECD/AED比は0.44～0.50であり、先とは逆の傾向が見られ

た。このように作物により検出器間で定量値が相違する理由は、先に述べたECDにおける天然成分によるきょう雑ピークの影響、あるいはAEDにおける波長の干渉による影響と推察された。

ま と め

GC-AEDによるネギ類、キノコ類中の残留農薬分析法について検討した。AEDはECDと比較して検出感度はやや劣るが、きょう雑ピークの影響が少ないため、よりの確定性が可能であった。タマネギ、長ネギおよびシイタケを用いて添加回収実験を行ったところ、32農薬中28農薬（長ネギについては25農薬）の回収率は64～114%と良好な結果であり、日常の分析業務に十分適用できることが判明した。

また、今後の検討により本法はリン、臭素などを含む農薬についても応用できるものと考えられた。

文 献

- 1) 菅原龍幸, 井上四郎 編 “新訂 原色食品図鑑” 東京, 健康社, 2001, p. 192-195, p. 234-235.
- 2) Chonan, T., Rapid determination of organophosphorus pesticides in onion and welsh onion by homogenization of frozen sample in dilute phosphoric acid. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **33**, 543-547 (1992).
- 3) Okihashi, M., Obana, H., Hori, S., Nishimune, T., Sasaki, Y., Determination of pesticide residues in onion, using a microwave oven. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **37**, 43-47 (1996).
- 4) Kashiwakura, K., Hanai, Y., Katou, T., Analysis of imazalil by gas chromatography with atomic emission detector. *Anzen Kogaku*, **32**, 72-75 (1993).
- 5) Lee, S. M., Wylie, P. L., Comparison of the atomic emission detector to other element-selective detectors for the gas chromatographic analysis of pesticide residue. *J. Agri. Food Chem.*, **39**, 2,192-2,199 (1991).
- 6) Stan, H-J., Linkerhagner, M., Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection State-of-the-art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting. *J. Chromatogr. A*, **750**, 369-390 (1996).
- 7) Skopec, Z., Clark, R., Harvey, P. A., Wells, R. J., Analysis of organophosphorus pesticides in rice by supercritical fluid extraction and quantitation using an atomic emission detector. *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 445-449 (1993).
- 8) Cook, J., Engel, M., Wylie, P. L., Quimby, B. D., Multiresidue screening of pesticides in foods using retention time locking, GC-AED, database search, and GC/MS identification. *J. AOAC Int.*, **82**, 313-326 (1999).
- 9) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法” 東京, 中央法規出版, 1995, p. 99-103, p. 196-198, p. 691-694.
- 10) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二 “残留農薬分析法” 東京, ソフトサイエンス社, 2002, p. 86-87, p. 526-529, p. 533-536.