キャピラリー ECD-GC による農産物中の メトキシクロールの簡易分析法

(平成 3 年 11 月 8 日受理)

中村優美子* 津村(長谷川) ゆかり*
外 海 泰 秀* 伊藤誉志男*

A Simple Determination of Methoxychlor in Agricultural Products by Capillary ECD-GC

Yumiko NAKAMURA, Yukari TSUMURA-HASEGAWA, Yasuhide TONOGAI and Yoshio ITO

(National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch:
1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan)

A simple determination of methoxychlor in agricultural products was developed. Fifty grams of vegetables or fruits (minced) or 20 g of powdered polished rice or soybeans (swollen with 40 ml of water for 2 hours) was homogenized with acetone and filtered. The filtrate was concentrated to *ca.* 50 ml under reduced pressure, then 100 ml of saturated NaCl solution was added. Methoxychlor was extracted with 100 ml of *n*-hexane. Lipids were removed by *n*-hexane/acetonitrile partition chromatography from polished rice or soybeans. Then, *n*-hexane extracts were concentrated and purified on a Florisil column. Methoxychlor was analyzed by ECD-GC using a CBPl capillary column. The detection limit was 0.001 $\mu\text{g/g}$ for each sample. Recovery of methoxychlor in 10 kinds of agricultural products (0.2 or 0.5 $\mu\text{g/g}$ was added) was 65.2~90.6% for vegetables, fruits, polished rice and soybeans. Methoxychlor was not detected in those products.

(Received November 8, 1991)

Key words: メトキシクロール methoxychlor; キャピラリーカラム capillary column; フロリジルカラム Florisil column; *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配 *n*-hexane/acetonitrile partition; ECD ガスクロマトグラフィー ECD gas chromatography; 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides; ポストハーベスト使用される農薬 post-harvest application pesticides

緒 言

メトキシクロール (methoxychlor: 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-methoxyphenyl)-ethane) は、日本で環境庁の定める登録保留基準に記載されていないが、米国などでは、貯蔵あるいは輸送中の鮮度保持などを目的として収穫後(ポストハーベスト)使用される農薬¹⁾としても認可されている殺虫剤である^{2), 3)}。殺虫力及び作用機序は DDT に類似しているが、生物濃縮性は少ない²⁾。また、メトキシクロールの FAO/WHO による ADI は 0.1 mg/kg bw/day である⁴⁾。

米国における収穫前あるいは収穫後に使用したメトキシクロール残留量の許容基準はサツマイモ及びヤマイモで 7 ppm 以下と定められており、貯蔵倉庫で使用できる大麦、トウモロコシ、エン麦、米、ライ麦、モロコシ及び小麦については 2 ppm 以下である³⁾。

外国の報告では、子牛肉から 0.008 ppm⁵⁾、全乳^{6)~8)}、穀類⁸⁾、乳製品^{8), 9)}、魚・肉類⁹⁾、乳製品から 0.001~0.004 ppm、穀類から 0.002 ppm、豆類から 0.008~0.022 ppm¹⁰⁾、米国産の飼料及びレタス¹¹⁾からメトキシクロールが検出された例がある。

しかし、日本国内で市販されている農産物についてのメトキシクロールの分析方法及び分析例は報告されていない。近年農産物の輸入が増加しているため、輸出国で

* 国立衛生試験所大阪支所: 〒540 大阪市中央区法円坂 1-1-43

認可されているが日本国内で認可されていない農薬について簡便に分析する方法を開発することが必須と考えられる。

ここでは、キャピラリーカラムを用いた ECD-GC により農産物中のメトキシクロール残留量を簡単、迅速に測定する方法について検討した。さらに、この方法を用いて 10 種の農産物中のメトキシクロール残留量を測定した。

実験方法

1. 試薬・装置・試料

1.1 農薬標準品

メトキシクロール (HPLC で純度 99%) は Riedel-de Haën 社より購入した。

1.2 試薬

n-ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトン、酢酸エチル及びアセトニトリルは残留農薬分析用を用いた。フロリジル PR (Floridin 社製) は和光純薬工業(株)より購入した。その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。

1.3 農薬標準液

メトキシクロール 100 mg をとり *n*-ヘキサン 100 ml に溶解して標準原液を調製した。標準原液 1.0 ml をとり *n*-ヘキサンにて全量 100 ml として、標準溶液を調製した。本液のメトキシクロール濃度は 10 µg/ml である。

1.4 フロリジルカラム

内径 1.5 cm、長さ 30 cm の農薬分析用カラムに綿栓をした後、130°にて一夜活性化したフロリジル PR 20 g を *n*-ヘキサンの湿式充てんし、130°にて一夜乾燥した無水硫酸ナトリウム 8 g を積層し、フロリジルカラムを調製した。

1.5 装置

キャピラリーカラム CBP1 (φ0.2 mm×25 m、膜厚 0.25 µm) は(株)島津製作所製を用いた。ECD 付ガスクロマトグラフは G2800 ((株)柳本製作所製)を用いた。

1.6 試料

りんご、もも、きゅうり、にんじん、ばれいしょ、未成熟えんどう、トマト、キャベツ、玄米、大豆は 1991 年 9 月～10 月に大阪府下の小売店で購入し、試料に供した。

2. 分析操作法

2.1 試料溶液の調製

各農産物については、環境庁告示 (昭和 48 年 7 月 24 日)¹²⁾ に示された部位を採取した。りんご、もも、きゅうり、にんじん、ばれいしょ、未成熟えんどう、トマト、キャベツは各 50 g をとり、細切した。玄米及び大豆は粉碎後それぞれ 20 g をとり、2 倍量の水を加え、2 時間放置して膨潤させた。

これらの試料にアセトン 100 ml を加え、2 分間ホモジナイズした。No. 5A ろ紙でろ過後、残留物について同

様の操作を 1 回繰り返した。ろ液を約 50 ml まで減圧濃縮し、試料溶液とした。

2.2 *n*-ヘキサンによる抽出

2.1 で調製した試料溶液に飽和塩化ナトリウム水溶液 100 ml 及び *n*-ヘキサン 100 ml を加え、5 分間振とうした後、*n*-ヘキサン層を分取した。水層に *n*-ヘキサン 100 ml を加え、同様の操作を 1 回繰り返した。*n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウム約 10 g で脱水後、約 5 ml まで減圧濃縮し、2.4 のフロリジルカラムによるクリーンアップを行った。ただし、玄米及び大豆については *n*-ヘキサン層を脱水後乾固し、後述の 2.3 *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配による脱脂を行った。

2.3 *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配

2.2 で乾固した *n*-ヘキサン抽出物を *n*-ヘキサン 30 ml に溶解して分液漏斗に洗い込み、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml を加え 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層について同様の操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を合わせ、溶媒を留去後、*n*-ヘキサン 5 ml に溶解し、2.4 のフロリジルカラムによるクリーンアップを行った。

2.4 フロリジルカラムによるクリーンアップ

2.2 あるいは 2.3 で調製した *n*-ヘキサン抽出物全量 (約 5 ml) をフロリジルカラムに負荷した。*n*-ヘキサン・ジエチルエーテル混液 (95:5, v/v) 100 ml でカラムを洗浄後、*n*-ヘキサン・アセトン混液 (95:5, v/v) 100 ml で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、*n*-ヘキサンにて 5 ml に定容し、試験溶液とした。

2.5 ECD-GC によるメトキシクロールの定量

2.4 で調製した試験溶液 2 µl をガスクロマトグラフに注入し、メトキシクロールを絶対検量線法で定量した。GC 条件は以下のとおりである。

ガスクロマトグラフ: G2800

カラム: CBP1 (φ0.2 mm×25 m、膜厚 0.25 µm)

温度: カラム 250°, 検出部及び注入部: 270°

キャリアガス: 高純度窒素

検出器: ECD

試料導入法: スプリット法 (スプリット比 1:10)

感度: Applied B, attenuation 1/2

注入量: 2 µl

実験結果及び考察

1. メトキシクロール分析法の検討

1.1 ECD-GC 条件の検討

食品中のメトキシクロール分析法については米国の公定法は比色法¹³⁾である。その他 GC 法^{14)~16)}、GC/MS 法¹⁷⁾などが報告されている。

キャピラリーカラムを用いた ECD-GC 法によるメトキシクロールの分析条件については、SE-30 のような無極性カラムを用いた分析法が報告されている^{18)~20)}。しかし、通常のパックドカラムでは *p,p'*-DDT やジコホー

Fig. 1. Gas chromatogram of methoxychlor, *p,p*-DDT and dicofol

Conditions for ECD-GC were as follows: apparatus: Yanaco G2800; column: CBP1 (ϕ 0.2 mm $\times$ 25 m, film thickness 0.25 μ m); temperature: column 250°C, injection port and detector 270°C; detector: ECD; carrier gas flow: N₂ 1.0 ml/min; injection method: split (split ratio 1 : 10); injection volume: 2 μ l

Table 1. Elution Pattern of Methoxychlor Using Florisil Column

Florisil column	Recovery of methoxychlor (%)					Total
	<i>n</i> -Hexane	<i>n</i> -Hexane- Diethylether 95 : 5 (v/v)	<i>n</i> -Hexane-Acetone (v/v)			
			95 : 5	90 : 10	70 : 30	
A. Florisil PR 10 g + anhydrous Na ₂ SO ₄ 8 g	0.0	7.0	90.7	0.0	0.0	97.7
B. Florisil PR 20 g + anhydrous Na ₂ SO ₄ 8 g	0.0	0.0	94.5	4.1	0.0	98.6

Florisil columns were prepared with Florisil PR 10 or 20 g following by anhydrous Na₂SO₄ suspended in *n*-hexane. One ml of the standard solution containing 10 μ g of methoxychlor was added to each column. The columns were eluted by 100 ml of 5 kinds of organic solvents continuously. The eluates were concentrated to 5 ml and methoxychlor was analyzed by ECD-GC.

ルのようにメトキシクロールと化学構造式の類似した農薬の分離定量はほとんど不可能である。

そこでキャピラリーカラム CBP1 (OV-1 相当, 無極性) を用い, 実験方法 2.5 に示した条件でメトキシクロール及びメトキシクロールに化学構造式の類似した *p,p*-DDT とジコロールを分析したところ, Fig. 1 のガスクロマトグラムに示すような 3 種の農薬の良好な相

互分離が得られた。

メトキシクロールの検量線は 0.01~10 μ g/ml の濃度範囲で良好な直線性が得られ, 検出限界は 0.01 μ g/ml であった。

1.2 フロリジルカラムによる試料調製法の検討

フロリジルカラムの調製及びカラム洗浄液について検討した。

Scheme 1. Analytical procedure for methoxychlor in agricultural products

Table 2. Recoveries of Methoxychlor in 10 Kinds of Agricultural Products

Agricultural products	Added amounts of methoxychlor (ppm)	Recovery of methoxychlor (%)			Mean	SD*
		①	②	③		
Apple	0.2	78.1	93.4	82.6	85.7	10.8
Peach	0.2	75.0	84.5	79.3	79.6	4.8
Cucumber	0.2	90.2	92.4	76.8	86.5	8.5
Carrot	0.2	83.6	74.0	66.6	74.7	8.5
Potato	0.2	81.2	86.1	89.9	85.7	4.4
Immature pods	0.2	79.0	70.2	90.5	79.9	10.2
Tomato	0.2	91.2	90.5	89.9	90.6	0.6
Cabbage	0.2	76.1	81.8	77.9	78.6	2.9
Polished rice	0.5	77.6	86.5	83.8	82.7	4.6
Soybean	0.5	64.4	61.6	69.5	65.2	4.0

Analytical method for methoxychlor is described in the text.

* SD: Standard deviation

Table 1 に示したように、フロリジル PR の量を 10 g 及び 20 g に調製し (A カラム及び B カラム)、それぞれに無水硫酸ナトリウム 8 g を重層したものを各々 A カラム及び B カラムとし、メトキシクロール標準液 (10 μ g/ml) 1 ml を負荷した。各種溶離液 100 ml により連

続してメトキシクロールを溶出し、ECD-GC で回収率を求めた。

いずれのカラムでも *n*-ヘキサンではメトキシクロールは溶出されなかった。*n*-ヘキサン-ジエチルエーテル混液 (95:5, v/v) でのメトキシクロールの溶出率は A

Fig. 2. Gas chromatogram of apple
Analytical method for methoxychlor is described in the text.

カラムでは7.0%であったが、Bカラムでは溶出されなかった。いずれの場合もメトキシクロールのほとんどが *n*-ヘキサン-アセトン混液 (95:5, v/v) により溶出され、*n*-ヘキサン-アセトン混液 (90:10, v/v) で完全に溶出された。

1.3 抽出溶媒の検討

Scheme 1 に示したように、りんごを用い、アセトン抽出後の抽出溶媒について検討した。

すなわち、りんご 50 g を細切り、メトキシクロール標準液 (10 µg/ml) 1 ml を加え、アセトン 100 ml による抽出を 2 回行った。アセトン抽出液を約 50 ml まで減圧濃縮し、飽和塩化ナトリウム水溶液 100 ml を加えた後、*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン-酢酸エチル混液 (90:10, v/v) 及び酢酸エチルの 3 種の溶媒各 100 ml で 2 回抽出した。各抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウム約 10 g で脱水した後、5 ml に減圧濃縮し、メトキシクロールの回収率を ECD-GC により求めた。

メトキシクロールを *n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン-酢酸エチル混液 (90:10, v/v)、酢酸エチルで抽出した場合、それぞれの抽出率は 90.3%、90.2% 及び 90.9% であり、最も極性の低い *n*-ヘキサンでもメトキシクロールが十分抽出されることが示された。また、酢酸エチル含有量が高くなる、すなわち抽出溶媒の極性が高くなるほどクロマトグラム上に妨害物質が多く現れる傾向があった。

したがって、メトキシクロールのアセトン抽出後の抽出溶媒には妨害物質の混入が少ない *n*-ヘキサンを用い、抽出操作を 2 回行うこととした。

2. 10 種農産物中のメトキシクロール添加回収実験及びメトキシクロール残留量の実態調査

2.1 メトキシクロール添加回収実験

メトキシクロールを、りんご、もも、きゅうり、にんじん、ばれいしょ、未成熟えんどう、トマト、キャベツに 0.2 µg/g、玄米、大豆に 0.5 µg/g 添加し、添加回収実験を行った (Table 2)。

いずれの農産物についても、クロマトグラム上メトキシクロールの定量を妨害するピークは認められなかった。一例としてりんごの抽出溶液について得られたガスクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

添加したメトキシクロールの回収率は 65.2~90.6% (3 試行の平均) であった。

大豆での添加回収率が他の農産物に比べて低いのは、大豆で *n*-ヘキサン-アセトンニトリル分配により脂質を除去する操作が必要であり、この操作中に *n*-ヘキサンと親和性の強いメトキシクロールが *n*-ヘキサン画分に一部残存するためと考えられる。

2.2 メトキシクロール残留量の実態調査

10 種農産物すなわちりんご、もも、きゅうり、にんじん、ばれいしょ、未成熟えんどう、トマト、キャベツ、玄米、大豆中のメトキシクロール残留量を、各農産物につき 3 試行ずつ実験方法 2 で示した方法で測定した。

いずれの農産物からもメトキシクロールは検出されなかった (検出限界 0.001 ppm)。

以上の結果より、本法は農産物中のメトキシクロールを簡易に分析するのに有効であると考えられる。

文 献

- 1) 川口洋二: 月刊フードケミカル, 6月号, p. 51~64 (1989).
- 2) 富澤長次郎, 上路雅子, 腰岡政二編: “1989年版最新農薬データブック” p. 241 (1989) ソフトサイエンス社.
- 3) 日本子孫基金 [準]: “収穫後に使用される農薬ポストハーベストに関する研究” p. 1~71 (1988) 全国農業共同組合中央会.
- 4) Gunderson, E. L.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 1,200~1,209 (1988).
- 5) Johnson, R. D., Manske, D. D., New, D. H., Podrebarac, D. S.: *ibid.* **67**, 154~166 (1984).
- 6) Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., Gunderson, E. L.: *ibid.* **68**, 842~861 (1985).
- 7) Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., Gunderson, E. L.: *ibid.* **68**, 1,163~1,183 (1985).
- 8) Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., Gunderson, E. L.: *ibid.* **69**, 123~145 (1986).
- 9) Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., Gunderson, E. L.: *ibid.* **68**, 1,184~1,195 (1985).
- 10) Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., Gunderson, E. L.: *ibid.* **69**, 146~161 (1986).
- 11) Hundley, H. K., Cairns, T., Luke, M. A., Masumoto, H. T.: *ibid.* **71**, 875~892 (1988).
- 12) 後藤真康, 加藤誠也: “増補残留農薬分析法” p. 3 (1987) ソフトサイエンス社.
- 13) Horwitz, W. ed.: “Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists” 10th Ed. p. 391~392 (1965) Washington, U.S.A.
- 14) Gonter, C. E., Loughrey, R. W.: Am. Chem. Soc. Natl. Meet. Div. Environ. Chem. **21**, 229~232 (1981).
- 15) Stan, H. -J., Christall, B.: Fresenius J. Anal. Chem. **339**, 395~398 (1991).
- 16) Muino, M. A. F., Lozano, J. S.: Analyst **116**, 269~271 (1991).
- 17) Spingern, N. E., Northington, D. J.: J. Chromatogr. Sci. **20**, 571~574 (1982).
- 18) Ripley, B. D., Braun, H. B.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 1,084~1,095 (1983).
- 19) Stan, H. -J., Mrowita, D.: J. Chromatogr. **279**, 173~187 (1983).
- 20) Stan, H. -J., Goebel, H.: J. Chromatogr. **314**, 413~420 (1984).