凍結-リン酸添加磨砕法を用いたタマネギ及び ネギ中の有機リン系農薬の迅速定量

(平成4年5月18日受理)

長 南 隆 夫^{*1}

Rapid Determination of Organophosphorus Pesticides in Onion and Welsh Onion by Homogenization of Frozen Sample in Dilute Phosphoric Acid

Takao CHONAN

(Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome, Kita 19-zyo,
Kita-ku, Sapporo 060, Japan)

A simple and rapid method for the simultaneous determination of 30 kinds of organophosphorus pesticides in onion and welsh onion was developed.

First of all, the sample to be analyzed was frozen to inactivate enzymes. The sample was cut into pieces, placed in a mixer cup containing dilute phosphoric acid and then homogenized. Pesticides in the homogenized sample were extracted with aqueous acetone. The extract was concentrated *in vacuo*, diluted with NaCl solution and reextracted with hexane. The pesticides were determined by gas chromatography with a flame photometric detector using the capillary column of ULBON HR-1.

No interfering peak was found on the gas chromatograms of onion and welsh onion extracts. The recoveries of pesticides from onion and welsh onion at levels of 0.1 µg/g were more than 77%, except for DDVP. The recoveries of DDVP were 60%. The detection limits of pesticides ranged from 0.003 to 0.04 µg/g.

(Received May 18, 1992)

Key words: 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides; タマネギ onion; ネギ welsh onion; 凍結処理 freezing treatment; ガスクロマトグラフィー (FPD) gas chromatography (FPD)

緒 言

FPD 検出器を用いたガスクロマトグラフィー (FPD-GC) によるタマネギ中の有機リン系農薬の定量法には幾つかの報告^{1)~3)}がある。しかし、これらの方法は測定妨害物質となるイオウ化合物を除去するために複雑なクリーンアップ操作を必要とし、かつ試験溶液が複数化するなどの問題点を有している。このため、イオウ化合物の影響を受けにくい FTD 検出器を用いて定量する方法も検討⁴⁾され、タマネギにも応用されている^{*2}。

今回、著者は、有機リン系農薬の分析に汎用されてい

る FPD-GC を用いてタマネギ及びネギ中の農薬を迅速に定量するため、前処理法として凍結したタマネギ及びネギにリン酸溶液を加えて磨砕する方法 (凍結-リン酸添加磨砕法) を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試 料

札幌市近郊の食品販売店でタマネギ 7 試料、ネギ 5 試料を購入し、試験に供した。

2. 試 薬

農薬標準品: Table 1 に示した農薬のうち、チオメトン、レプトホスはナノゲン社製標準品を、その他の農薬は和光純薬工業(株)製残留農薬試験用標準試薬を、それ

^{*1} 北海道立衛生研究所: 〒060 札幌市北区北 19 条西 12 丁目

^{*2} 私信: 山本 優

Fig. 1. Gas chromatograms of organophosphorus pesticides
 (a) standard solution of A (each $0.5 \mu\text{g/ml}$)
 (b) standard solution of B (each $0.5 \mu\text{g/ml}$)
 (c) extract of homogenized onion
 (d) extract of homogenization of frozen onion and dilute phosphoric acid
 Peak number corresponds to the number in Table 1.

ぞれ標準品として用いた。

農業標準原液: α -CVP, β -CVP, チオメトン, レプトホス (これらについては $100 \mu\text{g/ml}$ または $1,000 \mu\text{g/ml}$ に調製された市販品を使用) を除く各農業標準品 25.0 mg をアセトンに溶解して 50 ml とした。

農業標準溶液: 標準原液を, 各農薬の含量が $2 \mu\text{g/ml}$ となるようにヘキサンで希釈し, 標準溶液 A (DDVP など 18 種) 及び B (サリチオンなど 12 種) を調製した。

有機溶媒及びその他の試薬: 有機溶媒はいずれも和光純薬工業(株)製残留農薬試験用アセトン, 特級ヘキサンを用いた。ヘキサンは蒸留後使用した。その他の試薬は市販特級品を, 水は脱イオン水をヘキサンで洗浄後使用した。

リン酸溶液: リン酸 30 ml に水を加えて 1 L とした。比重は約 1.02。

30% 含水アセトン: アセトン 700 ml に水 300 ml を加えた。

飽和塩化ナトリウム溶液: 塩化ナトリウム 400 g に水 1 L を加え, 充分振り混ぜた後, 静置し, 上澄液を用いた。

3. 装 置

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-15A (FPD 検出器付, P モード) にデータ処理装置として同社クロマトパック C-R5A を接続して用いた。

4. 試験溶液の調製

(1) タマネギ

冷凍庫 (-18°) で一晩凍結したタマネギ (約 1 kg) を室温に $30 \sim 40$ 分間放置した。1 個のタマネギを二分し, その片方を直ちにひょう量後, 速やかに $2 \sim 4$ 片に切断し, あらかじめリン酸溶液 400 ml を加えたミキサーカップ (容量 2 L) に入れ, 直ちにかくはんした。残りのタマネギも同様に処理し, 前記のミキサーカップに加えてにかくはんし, 最終的にひょう取した試料の総重量と等量

Table 1. Recoveries of Organophosphorus Pesticides Added to Onion and Welsh Onion

Range of recovery* (%)	Pesticide	
	Onion	Welsh onion
90.0~94.9	Salithion (2)**, Disulfoton (5), Diazinon (6), Edifenphos (24)	Salithion, IBP, Methylparathion, Chlorpyrifosmethyl, Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, α -CVP, PAP, Isoxathion, Ethion, Edifenphos, CYP, Pyridaphenthion, EPN, Phosalone, Leptophos
85.0~89.9	Thiometon (3), CYAP (4), IBP (7), Methylparathion (8), ECP (9), Chlorpyrifosmethyl (10), MEP (11), Malathion (12), MPP (13), Parathion (14), Chlorpyrifos (15), β -CVP (17), PAP (18), DMTP (19), Propaphos (20), Pyridaphenthion (27)	CYAP, Disulfoton, ECP, MEP, MPP, β -CVP, DMTP, Prothiofos, PMP
80.0~84.9	α -CVP (16), Prothiofos (21), Isoxathion (22), Ethion (23), CYP (25), PMP (26), EPN (28), Phosalone (29)	Thiometon, Diazinon, Propaphos
75.0~79.9	Leptophos (30)	
60.0~64.9	DDVP (1)	DDVP

* : Average of 3 determinations

**(): Number corresponds to the peak number in Fig. 1.

になるようにリン酸溶液を加え、充分かくはんした。磨砕均質化した試料 40 g をブレンダーカップにひょう取し、その温度が 20° 前後に達してから、アセトン 100 ml を加え、5 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。残留物に 30% 含水アセトン 100 ml を加え、同様の操作を繰り返して、ろ液を合わせた。ろ液を 40° の水浴上で約 70 ml に減圧濃縮し、濃縮液に飽和塩化ナトリウム溶液 100 ml 及びヘキサン 100 ml を加え、5 分間激しく振とうした。2 層に分離後、ヘキサン層を分取し、水層にヘキサン 100 ml を加え、同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせて水 100 ml で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、40° の水浴上で約 2 ml に減圧濃縮した。濃縮液をヘキサンの 5 ml としたものを試験溶液とした。

(2) ネギ

冷凍庫 (-18°) で一晩凍結したネギ (約 1 kg) を室温に 20~30 分間放置した。試料をひょう量後、速やかに 4 片に切断し、あらかじめ試料と等重量のリン酸溶液を加えたミキサーカップに入れ、直ちに十分かくはんした。磨砕均一化した試料 40 g をひょう取し、以後、(1) タマネギと同様の方法で操作し、試験溶液を調製した。

5. GC の測定条件

カラム: ULBON HR-1 (0.25 mm i.d. $\times$ 25 m, 信和化工(株)製)

カラム温度: 140° $\rightarrow$ 260° 試料注入後、直ちに 5°/min で昇温し、260° に 5 分間保持。

キャリアーガス及び圧力: ヘリウム 1.3 kg/cm²

メイクアップガス及び流量: ヘリウム 40 ml/min

注入口温度: 260°

検出器温度: 280°

フレイムガス及び圧力: 水素 1.2 kg/cm², 空気 0.7 kg/cm²

注入量: 2 μ l (スプリット法, スプリット比 1:10)

実験結果及び考察

1. GC 測定条件の検討

極性の異なる 3 種類のキャピラリーカラム ULBON HR-1, Hicap CBP-5 及び Hicap CBP-10 ((株)島津製作所製) を用いて有機リン系農薬の分析条件を検討したが、1 本のカラムで 30 種の農薬を完全に分離することは困難であった。そこで、定量には分離及び検出感度の点で最も優れている ULBON HR-1 を使い、確認には Hicap CBP-5 または Hicap CBP-10 を用いることとした。

カラムに ULBON HR-1 を用いたとき各農薬のピークが相互に分離して同定が容易になるように 30 種の農薬を標準溶液 A, B に分け、実験方法 5. GC の測定条件の項に従って分析したときのクロマトグラムは Fig. 1(a), (b) に示すとおりである。なお、リテンションタイムがほぼ一致するジスルホトンとダイアジノン、メチルパラチオンと ECP, β -CVP と PAP は Hicap CBP-5 を、パラチオンとクロルピリホス、エディフェンホスと CYP は Hicap CBP-10 を用いると、それぞれ分離可能である⁵⁾。

Table 2. Analytical Results of Organophosphorus Pesticides in Commercial Onion and Welsh Onion

		Pesticide ($\mu\text{g/g}$)	
		β -CVP	EPN
Onion	1	ND*	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	5	ND	ND
	6	ND	ND
	7	ND	ND
Welsh onion	1	0.47	0.05
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	0.01
	5	ND	0.01

* ND: Not detected

Organophosphorus pesticides except for β -CVP and EPN were not detected in all samples.

この測定条件下では、有機リン系農薬の検量線は $0.125\sim 0.500\mu\text{g/ml}$ の範囲で、ほぼ良好な直線性を示した。また、このときの各有機リン系農薬の検出限界は α , β -CVP, プロバホスが $0.10\sim 0.16\mu\text{g/ml}$, DDVP, チオメトン, エディフェンホス, PMP, ビリダフェンチオンが $0.03\sim 0.05\mu\text{g/ml}$, その他が $0.01\sim 0.02\mu\text{g/ml}$ であり、実用上十分な検出感度と考えられる。

2. 試験溶液の調製法の検討

(1) 妨害ピークの除去法の検討

岩田らの方法¹⁾に準じて、タマネギを切断後、磨砕した。磨砕した試料を実験方法 4. 試験溶液の調製の項に従って調製し、ガスクロマトグラフで分析したときのクロマトグラムは Fig. 1(c) に示すとおりで、多くの妨害ピークが認められた。この試験溶液には強いタマネギ臭が認められたため、著者はタマネギ臭の成分と妨害ピークとの関係を検討した。ネギ属植物の臭気成分は、植物組織に損傷を与えることにより生成し、その生成は酵素作用によるとされている⁶⁾。そこで、タマネギ臭の生成を抑えながら試料を切断、磨砕する方法を試みた。磨砕時の酵素作用を抑制する方法としては、凍結-リン酸添加磨砕法がすでに報告⁷⁾されている。今回、この方法を参考にして、切断、ひょう量時の試料の状態及び磨砕時の pH (磨砕試料の示した pH 値) を検討するため、(I) 凍結したタマネギを切断後、等重量の冷却水 (5°) を加えて磨砕 (pH 5.3), (II) タマネギを切断後、等重量のリン酸溶液を加えて磨砕 (pH 2.0), (III) 凍結したタマネギを切断後、等重量のリン酸溶液を加えて磨砕 (pH 2.0) の方法により各磨砕試料を調製した。それぞれ磨砕した試料を実験方法 4. 試験溶液の調製の項に従って調製し、ガスクロ

トグラフで分析した。各クロマトグラム上の妨害ピークは、(I) が最も多く、ついで (II), (III) の順であった。(III) の試験溶液のクロマトグラムは Fig. 1(d) に示すとおりで、妨害ピークは全く認められなかった。(I), (II) の試験溶液のクロマトグラムには妨害ピークは若干認められたものの、Fig. 1(c) に比べると大幅に減少した。また、各試験溶液には極めて弱いタマネギ臭しか認められなかったことから、妨害ピークはタマネギを切断、磨砕する際の酵素作用により生成するタマネギ臭の成分と考えられる。この結果から、妨害ピークとなる化合物を生成させる酵素作用は、切断時の試料の状態及び磨砕時の pH の影響を受けることが判明した。従って、凍結した試料の解凍は試料を切断できる程度までとすること、また切断した試料のひょう量を速やかに行うことも必要と考えられる。

一方、ネギについてもタマネギと同様のクロマトグラムが得られた。

以上の結果から、妨害ピークの全く認められないクロマトグラムを得るためには、これまで報告されてきた試料をそのまま切断、磨砕する方法に代え、試料を凍結した後、切断し、リン酸溶液中で磨砕する方法が有効であり、クリーンアップ操作を省略できることが判明した。

次に、抽出時の試料温度について検討した。磨砕直後の試料 (このときの試料温度は 5°) を分析すると定量値は低く、抽出が不十分と考えられた。そこで、試料温度を 20° 前後にした後、分析したところ良好な結果が得られた。この結果から、抽出時の試料温度は 20° 前後とした。

また、今回検討した農薬の中には酸性で不安定なダイアジノンも含まれているため、試験溶液の調製に当たっては、ヘキサンによる再抽出までを速やかに行うことが必要である。

(2) 凍結中の有機リン系農薬の安定性の検討

本法では試料をいったん凍結するため、凍結中の有機リン系農薬の安定性についての検討が必要と考えられる。農産物中の農薬には、凍結により分解するものもあり、この分解は農産物をそのまま凍結するよりも磨砕して凍結する方が起こりやすいとされている⁸⁾。そこで、農薬が分解しやすいとされる磨砕試料を用いて凍結中の有機リン系農薬の安定性を検討した。凍結したタマネギ 20 g を等重量の冷却水 (5°) 中で磨砕し、各農薬 $2\mu\text{g}$ を添加して、冷凍庫 (-18°) で 72 時間放置した。その後、本法で定量して各農薬の残存率 (後記の本法の添加回収率を 100% として補正した率) を求めたところ、いずれの農薬についても 90% 以上であった。磨砕した試料を用いた本実験で有機リン系農薬は高い残存率を示したことから、試料をそのまま凍結する本法でも有機リン系農薬は分解しないと考えられた。

3. 添加回収実験

凍結したタマネギ及びネギにリン酸溶液を加えて磨砕した試料 40 g に、各有機リン系農薬 2 μ g を添加後、本法による有機リン系農薬の回収率を求め、結果を Table 1 に示した。タマネギでの回収率は DDVP で 60.2%, その他の農薬で 77.0% 以上であった。一方、ネギでの回収率は DDVP で 63.0%, その他の農薬で 83.3% 以上であった。

4. 市販タマネギ及びネギ中の有機リン系農薬の残留実態調査

本法を用いて市販タマネギ及びネギ中の有機リン系農薬の残留実態調査を行い、結果を Table 2 に示した。タマネギ 7 試料からは、有機リン系農薬は全く検出されなかった。一方、ネギでは β -CVP が 5 試料中 1 試料から 0.47 μ g/g, EPN が 3 試料から 0.01~0.05 μ g/g 検出された。食品衛生法では CVP, EPN ともネギに残留基準値は設定されていないが、今回検出された β -CVP 0.47 μ g/g は環境庁の定めた登録保留値 0.2 μ g/g を上回っていた。また、EPN は検出された値は低かったが、検出率は 60% と高かった。これらは、現在も殺虫剤として使用されている農薬であるため適正な使用が望まれる。

結 語

タマネギ及びネギ中の有機リン系農薬の定量時の前処理法として、凍結-リン酸添加磨砕法の有用性について

検討した。凍結した試料をリン酸溶液中で磨砕後、含水アセトンで抽出し、抽出物をヘキサンで再抽出し、ガスクロマトグラフで分析すると妨害ピークの全く認められないクロマトグラムが得られた。

30 種の農薬について添加回収実験を行ったところ、DDVP (60%) 以外の農薬は 77% 以上の回収率が得られ、各農薬の検出限界は 0.003~0.04 μ g/g であった。本法は簡便かつ迅速であるため、タマネギ及びネギ中の有機リン系農薬の実用的な定量法と考えられる。

文 献

- 1) 岩田好博, 杉谷 哲, 山田不二造: 食衛誌, **22**, 484~489 (1981).
- 2) Sasaki, K., Suzuki, T., Saito, Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 460~464 (1987).
- 3) 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり, 藤原 守, 伊藤誉志男: 衛生化学 **36**, 349~357 (1990).
- 4) 山本 優, 大内格之, 富澤 政, 菊地由生子, 高杉信男: 札幌市衛生研究所年報, **16**, 178~182 (1989).
- 5) 長南隆夫: 北海道立衛生研究所報, **41**, 5~10 (1991).
- 6) 岩井和夫, 中谷延二: “香辛料成分の食品機能” p. 165 (1989), 光生館, 東京.
- 7) 後藤真康, 加藤誠哉: “残留農薬分析法” p. 196 (1980), ソフトサイエンス社, 東京.
- 8) 後藤真康, 加藤誠哉: 同上 p. 10 (1980), ソフトサイエンス社, 東京.