報 文

GC による農産物中のアセフェート及びメタミドホスの定量法

(平成 8 年 10 月 7 日受理)

小川 貴 史* 岡 本 尚 子* 谷 口 勝 彦*
山 下 健 司* 西 田 政 司* 樋 口 初 良*

Analysis of Acephate and Methamidophos in
Agricultural Products by GC

Takashi OGAWA, Naoko OKAMOTO, Katsuhiko TANIGUCHI, Kenshi YAMASHITA,
Seiji NISHIDA and Hatsuyoshi HIGUCHI

(Fukuoka City Food Inspection Station: 6-23-1, Naka, Hakata-ku,
Fukuoka-City, Fukuoka 816, Japan)

When acephate and methamidophos in agricultural products were determined by GC-FPD, the recoveries were more than 100%. We therefore prepared a standard solution for analysis of the pesticides by dissolving acephate and methamidophos in yeast extract solution, and used it as a calibration standard. The detection limits of acephate and methamidophos were 0.01 ppm for agricultural products. Recoveries of acephate and methamidophos added to agricultural products at 0.1 ppm and 0.05 ppm were 97~99% and 80~92%, respectively. The present method was applied to the analysis of 447 agricultural products. Acephate and methamidophos were detected in 12 samples. The levels of acephate residues in 10 samples were 0.03~1.2 ppm and the levels of methamidophos residues in 7 samples were 0.01~4.3 ppm.

(Received October 7, 1996)

Key words: 農薬 pesticide; アセフェート acephate; メタミドホス methamidophos; 酵母エキス yeast extract; ガスクロマトグラフィー (FPD) GC-FPD

はじめに

1992 年 11 月 27 日に農産物の農薬の残留基準の大幅な改正が告示されて以来、度々改正が行われ、1996 年 8 月現在 108 農薬に残留基準が設けられている¹⁾。

これら残留基準が設けられた農薬の中で、アセフェートやメタミドホスのような水溶性農薬の検出率が世界的に高いといわれている²⁾。

しかしながら、これらをガスクロマトグラフで測定した場合、試料中の共存物質(マトリックス)が存在しない標準液では、カラムやインサート部に吸着が起り定量が困難である³⁾。この原因はアセフェートが強極性物質であり、強極性物質は、キャピラリーカラムによる定量分析において、マトリックスの影響を受けやすいから

であると考えられる⁴⁾。

そこでこのような農薬を迅速かつ正確に測定することを目的とした定量法を作成した。アセフェート分析の際に、ポリエチレングリコール、酢酸共注入法が報告されているが⁵⁾、メタミドホスのピーク高補正が不十分であるため、これらの代わりに植物成分により近く、GC への影響を最小限に押さえられるように酵母エキスを使用した。

また、本法により福岡市中央卸売市場を流通する農産物のアセフェート、メタミドホスの残留実態を調査したので併せて報告する。

実験方法

1. 試 薬

アセフェート: 和光純薬工業(株)製、純度 98% を用いた。

* 福岡市食品衛生検査所: 〒816 福岡市博多区那珂 6-23-1

メタミドホス：Riedel-de Haen 社製，純度 99% を用いた。

標準原液：上記標準品をアセトンに溶解し，1 mg/mL に調製し，これを標準原液とした。

酵母エキス：Oxid 社製，Difco 社製，日本製薬(株)製，大五栄養化学(株)製を用いた。

ペプトン，トリプトン：Difco 社製を用いた。

ブドウ糖，デンプン，リノール酸，リノレン酸：和光純薬工業(株)製を用いた。

酢酸エチル，アセトン，無水硫酸ナトリウム：市販残留農薬試薬を用いた。

エチレングリコール，ジエチレングリコール，リン酸，酢酸：市販特級試薬を用いた。

ポリエチレングリコール 200：市販一級試薬を用いた。

2. 装 置

ガスクロマトグラフ：GC-FPD (ヒューレット・パッカード社製 5890 型)

3. GC 測定条件

カラム：DB-210 (内径 0.53 mm，長さ 15 m，膜厚 1.0 μ m)

注入口温度：270°C，検出器温度：280°C，カラム温度：100°C (2 min)→10°C/min→260°C (5 min)

4. 試験溶液の調製

厚生省告示の試験法⁶⁾に準じて行ったが以下の点に修正を加えた。

農産物由来の硫化物による GC 測定時の妨害ピークを除去するため，試料調製時にリン酸を添加した⁷⁾。

精製操作を行わなくてもガスクロマトグラフでアセフェート，メタミドホスを測定する際の妨害は見られなかったのをこれを省略し，酢酸エチルで 120 mL に調整したものを試験溶液とした。試験溶液 3 μ L をガスクロマトグラフに注入した。

5. 標準液の調製

下記に示す標準液を使用した。

酢酸エチル標準液：標準原液を酢酸エチルで適宜希釈した。

酵母エキス標準液 (YE 標準液)：酵母エキス 10 g に沸騰水 25 mL を加え溶解した。これに酢酸エチル 75 mL を加え，ホモジナイズした上清液を無水硫酸ナトリウムで脱水し，酢酸エチルで 120 mL に調整した液 (YE 液) でアセフェート，メタミドホスの標準原液を適宜希

Scheme 1. Analytical procedure for acephate and methamidophos in agricultural products, and preparation method of yeast extract solution

釈した。

試験溶液とYE標準液調製法のフローシートをScheme 1に示した。

ペプトン、トリプトン、ブドウ糖、デンプン各標準液：酵母の代わりに各試薬を使用してYE標準液の調製法によって同様に調製した。

リノール酸、リノレン酸、エチレングリコール(EG)、ジェチレングリコール(DEG)、ポリエチレングリコール(PEG)各標準液：酢酸エチル標準液に各試薬を0.25～10 mg/mLの濃度になるように調製した。

Table 1. Peak Height Ratios of Acephate and Methamidophos in Onion Test Solution to Those in Ethyl Acetate Solution with Various Capillary Column

Capillary column	Onion solution/ Ethyl acetate*	
	Acephate	Methamidophos
DB-1	3.5	2.2
DB-5	2.5	2.4
DB-17	15.3	6.0
DB-1701	4.0	3.6
DB-210	1.6	1.4
DB-WAX	—	1.2

* Peak heights of acephate and methamidophos in onion test solution were divided by peak heights of those in ethyl acetate solution.

Table 2. Peak Height Ratios of Acephate and Methamidophos in Solutions Added Various Materials to Those in YE Solution

Added material	Peak height ratio*	
	Acephate	Methamidophos
Non added	0.62	0.62
Ethylene glycol	0.71	0.71
Starch	0.73	0.70
Glucose	0.76	0.68
Diethylene glycol	0.74	0.84
Linolenic acid	0.87	0.84
Linoleic acid	0.89	0.84
Polyethylene glycol	0.89	0.84
Peptone	0.94	0.78
Tryptone	0.96	0.80
YE	1.00	1.00

* Peak heights of acephate and methamidophos in solutions of various material were divided by peak heights of those in YE solution of Oxid.

Fig. 1. Peak height ratios of acephate and methamidophos in yeast extract solution to those in ethyl acetate solution

Yeast was extracted with 120 mL of ethyl acetate.

Fig. 2. Calibration curves for acephate and methamidophos

Table 3. Peak Height Ratios of Acephate and Methamidophos in YE Solutions with Various Commercial Products

YE solution	Peak height ratio*	
	Acephate	Methamidophos
Difco	1.04	1.14
Nippon Seiyaku	0.94	1.01
Daigo Eiyo Kagaku	0.99	0.99

* Peak heights of acephate and methamidophos in YE solutions of Difco, Nippon Seiyaku and Daigo Eiyo Kagaku were divided by peak heights of those in YE solution of Oxid.

Table 4. Peak Height Ratios of Acephate and Methamidophos in Strawberry and Natsumikan Test Solution to Those in Yeast Extract Solution, in Various Conditions of Test Solution Volume/Sample Weight

Agricultural products*	Test solution/sample (v/w)	Peak height ratio	
		Acephate	Methamidophos
Strawberry	3	1.09	0.91
	6	1.06	0.93
	12	0.99	0.93
Natsumikan	3	1.20	1.19
	6	1.09	1.06
	12	1.02	0.99

* To strawberry, natsumikan test solution and yeast extract solution, 1.0 μg acephate and 0.5 μg methamidophos were added.

結果及び考察

1. 試験溶液調製法の検討

1) アセフェート及びメタミドホスの添加回収試験

たまねぎ 10 g にアセフェート 1.0 μg 、メタミドホス 0.5 μg を添加し、本法により抽出を行い、酢酸エチル標準液に対してアセフェート、メタミドホスの回収率を求めたところ、アセフェートは 150%、メタミドホスは 130% であった。

そこで、アセフェート、メタミドホスが含まれていないたまねぎより調製した試験溶液 120 mL と酢酸エチル 120 mL にそれぞれアセフェート 1.0 μg 、メタミドホス 0.5 μg を添加し、アセフェート、メタミドホスのピーク高比を比較した。その結果、たまねぎ試験溶液に添加したものの方がアセフェートでは 1.6 倍、メタミドホスでは 1.4 倍ピークが高かった。これは前述したようにたまねぎのマトリックスが、アセフェート、メタミドホスのガスクロマトグラフカラムやインサート部への吸着³⁾を防いでいるため、GC 測定時のピーク高が高くなることが原因であると推察される⁴⁾。

2) カラムの選択

試験溶液と酢酸エチル標準液でアセフェート、メタミドホスのピーク高に差が生じたので、この差がカラムの種類によってなくなるかを検討した。

液相の極性と膜厚が異なる 7 種のカラムで、標準液に対するたまねぎ試験溶液のアセフェート、メタミドホスのピーク高比を比較した。

結果は Table 1 に示すように DB-210 (内径 0.53 mm, カラム長 15 m, 膜厚 1.0 μm) を用いた場合、対照に対するたまねぎ検液のアセフェート、メタミドホスのピーク高比は最も小さくなり、カラムへのこれら農薬の吸着が最も小さいことが分かった。したがって、以後このカラムで検討を行うことにした。

3) 標準液の検討

標準液のアセフェートやメタミドホスが注入口やカラ

Table 5. Recoveries of Acephate and Methamidophos Added to Agricultural Products ($n=3$)

Agricultural products*	Recovery (%)			
	Acephate		Methamidophos	
	Mean	RSD	Mean	RSD
Radish	97	3.4	85	3.2
Tomato	99	0.5	80	2.6
Cabbage	98	1.0	87	2.6
Onion	98	4.0	92	3.0
Natsumikan	97	1.3	87	6.1

* To agricultural products, 1.0 μg of acephate and 0.5 μg methamidophos was added.

ムに吸着されるのを防ぐために、標準液を調製する溶媒である酢酸エチルに何らかの物質を溶解させることを試みた。

ここで溶解させる物質は、成分が安定していて常に同一のものが入手でき、しかも繰り返し使用したときに再現性が保て、カラムへの影響がないものが望まれる。

農作物のマトリックス中に含まれると思われるタンパク質、脂肪、糖など、その混合物である酵母エキス (Oxid 社製)、その他に EG, DEG, PEG で標準液を作成し、GC でピーク高を求め、YE 液に対するピーク高比の結果を Table 2 に示した。ブドウ糖、デンプン、EG では、ピーク高補正がほとんどできなかった。PEG, DEG, リノール酸、リノレン酸では、ある程度のピーク補正が可能であったが、YE 液に比べると不十分であった。ペプトン、トリプトンでは、アセフェートのピーク高は酵母とほぼ等しかったが、メタミドホスの補正が不十分であった。また DEG では、数回の注入で再現性が悪くなった。今回検討した中では、YE 液を用いた場合が最も農薬の吸着が少なく優れていた。

4) YE 液による標準液の調製及びその再現性

酢酸エチル 120 mL に、1.25～25 g の酵母エキス (Oxid 社製) を加えた。各 YE 液と対照とした酢酸エチルにそれぞれアセフェート 1.0 μ g 及びメタミドホス 0.5 μ g を加えた。各 YE 液で対照に対するピーク高比を求めて、結果を Fig. 1 に示した。

酵母エキス 10～25 g の YE 液ではピーク高比はほぼ一定となった。そこで調製に用いる酵母エキスは 10 g 以上、すなわち酵母エキスの 12 倍 (v/w) 以下の酢酸エ

チルで抽出した YE 液で標準液を調製するのが適当であることが示された。

また、YE 標準液をガスクロマトグラフに注入したときのアセフェート、メタミドホスのピーク高の再現性を検討した。アセフェート 1.0 μ g、メタミドホス 0.5 μ g を YE 液 120 mL に溶解し、GC で 100 回繰り返し測定したときの再現性は、1～10 回目の平均を 1.00 としたときの相対標準偏差 (RSD) はアセフェートが 0.9%、メタミドホスが 1.8% で、91～100 回目の平均と RSD

Table 6. The List of Imported and Domestic Agricultural Products Analyzed (Apr. 1995～Sep. 1996)

Fruits	Domestic	Imported	Total	Vegetables	Domestic	Imported	Total
Grape	22	1	23	Cucumber	21		21
Banana		19	19	Radish	17		17
Japanese pear	19		19	Tomato	16		16
Melon	14	4	18	Cabbage	14		14
Watermelon	15		15	Carrot	12	2	14
Strawberry	12		12	Garland chrysanthemum	13		13
Orange	1	11	12	Chinese cabbage	12		12
Lemon	1	10	11	Spinach	11		11
Apple	10		10	Onion	10	1	11
Satsuma orange	9		9	Potato	9		9
Grapefruit		9	9	Eggplant	8		8
Japanese apricot	8		8	Welsh onion	8		8
Peach	7		7	Lettuce	7	1	8
Natsumikan	7		7	Kidney bean	5	2	7
Japanese persimmon	5	1	6	Pumpkin	3	4	7
Pineapple		6	6	Melon cucumber	4		4
Plum	5		5	Peas with pod	3	1	4
Mango		5	5	Peking cabbage	3		3
Papaya		4	4	Amount rape	3		3
Kiwifruit	1	3	4	Pimiento	3		3
Citrus hassaku	2		2	Komatsu rape	3		3
Citrus iyo	2		2	Taro	2	1	3
Ponkan mandarin	1		1	Broccoli	1	2	3
Kumquat	1		1	Shiitake mashroom		3	3
Lime		1	1	Burdock	2		2
Tanjelo		1	1	Sweet potato	2		2
Avocado		1	1	Turnip	2		2
				Chinese yam	2		2
				Parseley	2		2
				Chinese mustard	1	1	2
				Okra		2	2
				Green soybean		2	2
				Garic		2	2
				Lotus root	1		1
				Garden pea	1		1
				Chinese leek	1		1
				Ginger	1		1
				Pot herb mustard	1		1
				Cauliflower	1		1
Total	142	76	218	Total	205	24	229

はアセフェートが 1.01, 1.8%, メタミドホスが 0.98, 4.4% であり, 両者に有意な差はみられなかった。

次にこの条件で標準液のピーク高は Fig. 2 に示すようにアセフェート, メタミドホスともに 0.0008~1.0 ppm で直線性がみられた。

次に市販されている酵母エキスをピーク補正効果にどの程度の差があるかを検討した。4 種類の酵母エキスを Scheme 1 の調製法により調製し, Oxid 社のピーク高に対するピーク高比を求めた。結果を Table 3 に示した。Oxid 社製に対するピーク高比は, Difco 社製酵母エキス以外は, ほぼ同じであった。以後 Oxid 社製の酵母エキスを使用した。

5) 農産物の検液量の検討

一定の検体量に対し検液量が異なると検液中のマトリックスが GC に及ぼす影響が異なると考えられる。そこで検液に添加したアセフェート, メタミドホスのピーク高が YE 標準液のそれらと同じになるような検液量を求めた。10 g のいちご又はあまなつかんを抽出して 30, 60, 120 mL に調整した各検液及び YE 標準液にアセフェート 1.0 μ g, メタミドホス 0.5 μ g を添加したときの YE 標準液に対するいちご又はあまなつかんの各検液のピーク高比を比較した。

Table 4 に示すようにいちご, あまなつかんともに検体の 12 倍量 (v/w) の検液のピーク高が YE 標準液のピーク高と最も等しくなった。

したがって, 検液は酢酸エチルで検体の 12 倍 (v/w) 量に調製することにした。

6) 農産物への添加回収実験

YE 標準液を使用して, 大根, トマト, キャベツ, たまねぎ, あまなつかん 10 g にアセフェート 1.0 μ g, メタミドホス 0.5 μ g を添加したときの回収率を求め Table 5 に示した。

アセフェートは 97~99%, メタミドホスは 80~

92% であり, いずれも良好な結果が得られた。

2. 青果物の残留実態調査

平成 7 年 4 月~8 年 9 月に福岡市中央卸売市場を流通した国産青果物 347 検体, 輸入青果物 100 検体, 合計 66 品目 447 検体について本法により残留実態を調査した。調査した検体の内訳を Table 6 に示した。

アセフェート, メタミドホスの残留実態は Table 7 に示した。

アセフェートはしゅんぎく, こまつな, ぶどうなど国内産青果物 10 検体から 0.03~1.2 ppm, メタミドホスはしゅんぎく, こまつなの国内産青果物 5 検体, 未成熟いんげん, グレープフルーツの輸入青果物 2 検体から 0.01~4.3 ppm 検出された。アセフェート, メタミドホスとも残留基準値のある農産物では, すべて残留基準値以下であった。

また, メタミドホスは, 国内で農薬として登録されていないにもかかわらず国内産のしゅんぎく, こまつなの 6 検体から検出された。この理由としてアセフェートがメタミドホスに代謝されたと考えられる⁸⁾。

ま と め

アセフェート, メタミドホスなどの強極性物質は, GC で測定する際, 試料中のマトリックスの影響でこれらの農薬の濃度は過大に評価されると報告されている⁴⁾。そこで YE 標準液を用いて標準液のマトリックスを農産物の試験溶液のマトリックスに似せて農薬濃度の評価を試みたところ, 青果物に添加したアセフェート, メタミドホスの回収率は, それぞれ 97~99%, 80~92% で良好な結果が得られた。

また本法を 66 品目の青果物に適用したがガスクロマトグラム上に, 妨害となるピークは認められなかった。

アセフェートやメタミドホスのように GC で測定する際に, カラムなどへの吸着が心配される高極性の農薬については, 今回の YE 標準液のように標準液を試験溶液

Table 7. Acephate and Methamidophos Residues in Vegetable and Fruits

Vegetables and fruit	Acephate (ppm)	Methamidophos (ppm)	Prefecture or country of origin
Spinach	0.12	<0.01	Fukuoka
Chinese cabbage	0.62	<0.01	Kumamoto
Carrot	0.03	<0.01	Hokkaido
Komatsu rape	0.85	0.10	Fukuoka
	0.19	0.04	Fukuoka
Garland chrysanthemum	1.2	0.03	Fukuoka
	1.0	0.04	Fukuoka
	0.44	0.01	Fukuoka
Grape	0.19	<0.01	Fukuoka
	0.06	<0.01	Fukuoka
Kidney bean	<0.01	0.23	China
Grapefruit	<0.01	4.3	U.S.A.

のマトリックスに近づける方法はこれらを迅速かつ正確に測定するための有効な手段であると思われる。

文 献

- 1) 平成 7 年厚生省告示第 161 号.
- 2) 佐々木久美子: 食品衛生研究 45(7), 13~18 (1995).
- 3) 奥村為男: 環境化学 2, 31~35 (1992).
- 4) 奥村為男: 同上 5, 575~583 (1995).
- 5) 環境庁環境保健部保健調査室: 平成 4 年度化学分析法開発調査報告書 p. 122~129 (平成 5 年 6 月).
- 6) 平成 5 年厚生省告示第 200 号.
- 7) 長南隆夫: 食衛誌, 33, 543~547 (1992).
- 8) 農薬残留分析研究班編: “最新農薬の残留分析法” p. 27~28 (1995) 中央法規出版.