

平成14年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究 研究報告書

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 食品試験部 外海泰秀

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

愛知県衛生研究所 生活化学部 岡 尚男

研究報告書目次

総括研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究 -----	1
-----------------------------	---

分担研究報告書

1. 安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトルメトリーによる 食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発 -----	5
2. LC/MSによる残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究 -----	16
3. 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	
(1) 昇音気化注入を用いたGC大量注入法の検討 -----	52
(2) GC-AEDを用いる残留農薬分析の効率化と精度向上 -----	69

総括研究報告書

残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

主任研究者 外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 食品試験部長

研究要旨

本研究では行政検査のニーズに適する農薬試験法の開発を目的として、平成13年度より3ヶ年計画で、以下の3課題の研究を実施している。

①「安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトロメトリーによる食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発」では、昨年度の柑橘類中のイマザリル、OPPについて、本年度は新分析技術である双方向向流クロマトグラフィー及びタンデムマススペクトロメトリーを用いて、植物油及び柑橘類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリルの効率的で迅速な分析法を開発した。検体採取から分析値の算出までがわずか15～30分間の、信頼性の高い分析法を開発することができた。

②「LC/MSによる残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究」では、昨年度の柑橘類中のN-メチルカルバメート系農薬について、本年度はエマメクチンとその3種の代謝物並びにアバメクチン、ミルベメクチン、イベルメクチンを誘導体化せずに直接LC/MSで定性・定量する方法を作成した。試験溶液の調製法もC₁₈カートリッジの精製のみとし、従来の誘導体化/HPLC法に比して試験操作は1/4程度となり、試験法を大幅に簡易化し、かつ精度向上させることができた。

③「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」では、第1には昨年度の超臨界流体抽出法の検討に引き続き、本年度はPTV(Programmed Temperature Vaporizing昇温気化)注入を用いたGC大量注入法についてGC/MSを用いて検討した。各種の約130種農薬を含む標準溶液を用いてPTV注入条件の最適化を行うことができた。これにより、濃縮操作を省力化でき、残留農薬分析の一層の効率化と精度向上が期待できる。

第2には昨年度に引き続き有機塩素系農薬、含硫黄農薬を妨害物の多い試料から分析する方法について検討し、GC-AED（原子発光検出器）を用いることにより、これら試料中農薬の検出を可能とした。試料中濃度0.1 ppmとなるように32種農薬を含硫黄作物（ネギ類、キノコ類）の抽出液に添加し、フロリジルミニカラムを用いて簡易精製後、GC-AEDで測定したところ殆どの農薬を検出することができた。

分担研究者名

外海泰秀 国立医薬品所食品衛生研究所 大阪支所食品試験部長

根本了 国立医薬品所食品衛生研究所 食品部主任研究官

岡尚男 愛知県衛生研究所 生活化学科長

A. 研究目的

農作物の残留農薬基準は毎年追加と見直しが行われ、平成15年1月現在、229農薬に基準値が設定されている。食品輸入量の急激な増加と多様化の中で、このように多数の農薬の基準値への適合性を検査するためには、迅速、簡便且つ精度が高いスクリーニング試験法が必要である。既存の局長通知法によるスクリーニング、すなわち作物試料中の農薬を有機溶媒で抽出し、精製した後、GC及びHPLCで測

定する方法は必ずしも効率的とは言えず、信頼性が高く、より効率的なスクリーニング法の開発が必要とされている。一方、分析に用いる手法、測定法は日進月歩であり、新たな手法を取り入れることによって、より簡便で質の高い公定試験法を作成する必要もある。本研究では行政検査のニーズに適する試験法開発を目的として以下の3課題の研究を実施した。

B. 研究方法

分担研究 1

試料精製法として双方向向流クロマトグラフィーを、検出法としてタンデムマススペクトルメトリーを用いる植物油及び柑橘類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリルの効率的で迅速な分析法を開発した。双方向向流クロマトグラフィーは互いに混じり合わない二相溶媒の上下層（今回は上層としてn-ヘキサン、下層としてアセトニトリル）を、強い遠心力場に置いたコイル状カラムの両端から、それぞれ逆方向から送液し、向流クロマトグラフィーを行うものである。この手法を試料精製法に導入し、安定同位体を内部標準物質として用いるタンデムマススペクトルメトリーにより検出することにより、迅速かつ精度の高い上記農薬の分析法を確立する。

分担研究 2

エマメクチン安息香酸塩及びその代謝物についての厚生労働省告示試験法は、抽出後3種のミニカラムで精製し、蛍光誘導体化してHPLCで測定している。本法の蛍光誘導体化反応には完全なる脱水条件が必要であり、だいこんでは誘導体化妨害物質を含むため精製を別法とする必要があるなど、試験操作が煩雑であるため試験溶液調製に1日を費やすという欠点がある。近年急速に普及しているLC/MSを用いれば、測定対象物質の特異的なm/zをモニターするため、UV検出器を用いた場合のように多くの作物由来の妨害ピークも少なく、蛍光誘導体化もなく短時間で測定できる可能性がある。これらエマメクチン類の、LC/MSによる簡便で迅速なスクリーニング用の試験法を作成することを目的として、LC/MS

測定における問題点やLC条件、試料調製法の簡易化などを検討した。

分担研究 3

①GC測定における大量注入法にはいくつかの方法があるが、今回はPTV(Programmed Temperature Vaporizing:昇温気化)注入口を用いた大量注入法について検討した。また、注入量を多くする方法としては、注入速度を制御して1回で多量の試験溶液を注入する方法と少量を多数回注入する方法（マルチプルインジェクション法）などがあるが、今回はマルチプルインジェクション法について検討した。検討にあたっては、様々な種類の約130農薬を含む標準溶液を用いて、PTV注入口における農薬と溶媒の分離、溶媒の排出及び農薬の分析カラムへの定量的な送出を達成するための操作パラメーターの最適化を行った。

②現在、有機塩素系及び含硫黄農薬は、一般的にGC-ECDあるいはSフィルターを装着したGC-FPDを用いて測定を行っている。しかし、ネギ類、キノコ類は成分中に妨害物質が多く含まれていることから、残留農薬を試験するには煩雑な前処理を行わなければならない等、分析が非常に困難であった。そこで、高い選択性を持ち、多くの種類の元素を同時に測定することができるGC-AEDを用いて、塩素及び硫黄を含有する農薬32種類について、簡易な精製により分析する手法を検討した。試験溶液の調製法は、細切した試料からアセトン-ヘキサン混液で抽出し、酢酸エチル-ヘキサン混液に転溶した。脱水後、濃縮して得られた抽出溶液はフロリジルミニカラムで精製し、GC-AEDに注入した。ターゲット元素として塩素、硫黄及び臭素を用いて測定した。

C. 結果及び考察

分担研究 1

コーン油及び大豆油に1及び10 ppmの濃度で添加したメソミル、フェノブカルブ、カルバリルの回収率は97-103 %、変動係数は0.9-4.9 %であった (n=5)。また、オレンジ及びグレープフルーツに0.1及び0.5 ppmの濃度で添加した時の回収率は91-107 %、変動係数は1.3-7.1%であった (n=5)。本法では、試

料調製から分析結果を得るまでの所要時間は、植物油で15分程、柑橘類で30分程度であった。本法ではカラムに注入した試験溶液中の農薬類がアセトニトリル層に、夾雑物質がn-ヘキサン層に移行し、それぞれ別々の出口から溶出される。即ち、一般のカラムクロマトグラフィのように農薬と夾雑物質が同じ出口から溶出することはないので、夾雑物質の溶出時間を全く考慮する必要がない。したがって、多数の試料を連続して短時間のうちに精製することが可能である。さらに、今後アセトニトリル層の出口を質量分析計に直結することによって自動化し、更なる効率化が可能と思われる。

分担研究 2

試料中のエマメクチン安息香酸塩及びその代謝物をアセトンで抽出し、 C_{18} ミニカラムで精製後LC/MSで直接測定する迅速分析法を作成した。

本試験法は、構造類似のエマメクチン類(アバメクチン、ミルベメクチン、イベルメクチン)にも適用できることを明らかにした。本試験法の特徴として、精製に使用するミニカラムは C_{18} のみで、蛍光誘導体化を必要としないため、簡便であり、短時間で試料調製が可能なことである。また、試験溶液調製中にエマメクチン類の化学構造変化が見られなかったため、各化合物の個別分析が可能となった。

簡易スクリーニング法としたためLC/MS測定においてイオン化抑制が見られたが、標準添加法を用いることによって、トマト、だいこんに各0.1ppm、茶に0.5ppm添加したエマメクチン類は、良好に回収された。しかし、茶試料では C_{18} ミニカラム精製だけでは妨害物の除去が不十分であり、更に高度な定量分析を目的とする場合には、他のミニカラムと併用して精製度を上げるなどの工夫が必要と考えられる。

分担研究 3

①PTVによる大量注入におけるステップは、注入口における農薬と溶媒の分離及び溶媒の排出(第1段階)及び農薬の分析カラムへの定量的な送付(第2段階)の2段階に大別される。

第1段階では、農薬は気化せずに溶媒のみが気化して排出される。この時、溶媒の気化の割合は溶媒により異なるため、今回は、既存の局長通知のスクリーニング分析法において、シリカゲルミニカラムを用いたクリーンアップの溶出溶媒に用いられているアセトン:n-ヘキサン(1:1)混液を注入溶媒に用いた。第1段階に関連するパラメーターとしては、溶媒の排出温度及び排出流速について、第2段階に関連するパラメーターとしては、送出温度、送出温度に達するまでの昇温速度及び送出時間について検討した。その結果、最適な条件として、溶媒の排出温度 10°C 、排出流速 50 mL/min 、送出温度 300°C 、送出温度に達するまでの昇温速度 720°C 及び送出時間 1 min の条件が得られた。この方法を用いることにより、試験溶液調製における濃縮操作を省力化でき、残留農薬分の一層の効率化と精度向上が期待できる。

②検討した32農薬のうち、BHC、DDT、クロロタロニル、ディルドリン、プロシミドンなど分子内に塩素のみを有する25農薬は塩素を、また、キャブタン、エンドスルファンなど6農薬は塩素及び硫黄を、テトラジホンは塩素及び臭素をターゲットにしたところ、 1 ng の注入量で十分に検出できた。これら32農薬について、多くの硫黄成分を含む長ネギ、タマネギ及びシイタケからの検出を試みた。いずれの農薬も試料中濃度 0.1 ppm となるように抽出溶液に添加し、フロリジルミニカラムを用いて簡易に精製したとき、ほとんどの農薬は検出することができた。しかし、カブタホールやジコホール、あるいは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。

D. 結論

本研究で検討し確立した各種の試験法を行政検査の現場で用いることにより、食品中の残留農薬を効率的にスクリーニングし、且つ精度の高い分析ができるようになる。その結果、検査に要する時間の短縮と省力化とともに、分析値の精度向上が期待できる。ひいては検査件数の増加、出荷前検査の実施等の残

留農薬に関する監視体制の充実につながり、食の安全性確保のより一層の向上が期待でき、さらに食品中の残留農薬に対する国民の不安を軽減することに貢献できると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1)津村ゆかり, 吉井公彦, 石光 進, 外海泰秀: HPLCによる柑橘類中のN-メチルカルバメート系農薬及びそれらの代謝物の含ハロゲン溶媒不使用同時分析, 食品衛生学雑誌, **43**, 330-338(2002)

2)Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Simultaneous determination of residues of emamectin and its metabolites, and milbemectin, ivermectin and abamectin in crops by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. AOAC. Int.*, **84**, 910-917(2001)

3)Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **27**; **896**, 75-85(2000)

4)Yuko Ito, Tomomi Goto, Hisao Oka, Hiroshi Matsumoto, Nobuyuki Takahashi and Hiroyuki Nakazawa: Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil and phenylphenol in citrus fruit using flowinjection electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 印刷中

2. 学会発表

1)伊藤裕子, 後藤智美, 岡 尚男, 斎藤 勲, 松本 浩, 高橋伸之, 中澤裕之, 伊東洋一郎: Preliminary studies on the use of high-speed countercurrent chromatography for the rapid determination of carbamate pesticides in vegetable oil, 2003 Pittsburgh Conference, 平成15年3月, オー

ランド, 米国

2)Tonogai Y., Tsumura Y., Yoshii K., Ishimitsu S.: Simultaneous determination of N-methylcarbamates in citrus fruits by HPLC(FL) and LC/MS(SIM), 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection, Aug. 2002, Basel, Switzerland

3)吉井公彦, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀: 農作物中のエマメクチン安息香酸塩及びその代謝物, アバメクチン, ミルベメクチン及びイベルメクチンのLC/MSによる迅速分析法, 日本食品衛生学会第85回学術講演会, 平成15年5月, 東京(予定)

4)根本 了, 鈴木良宏, 佐々木久美子, 米田民雄, 豊田正武: 農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—野菜・果実試料について—, 日本食品衛生学会第84回学術講演会, 平成14年11月, 大阪.

5)立石恭也, 永山敏廣, 高野伊知郎ら: 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, 日本食品衛生学会第81回学術講演会, 平成13年5月, 東京.

6)立石恭也, 永山敏廣, 高野伊知郎ら: 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(第2報), 日本食品衛生学会第85回学術講演会, 平成15年5月, 東京(予定).

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)

分担研究報告書

安定同位体を内標準物質として用いるタンデムマススペクトルメトリーによる
食品中残留農薬の効率的スクリーニング法の開発

分担研究者 岡 尚男 愛知県衛生研究所 生活化学科長

研究要旨

試料精製法として双方向向流クロマトグラフィーを、検出法としてタンデムマススペクトルメトリーを用いる植物油及び柑橘類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリルの効率的で迅速な分析法を開発した。3農薬をコーン油及び大豆油に1及び10 ppmの濃度で添加した時の回収率は97-103 %、変動係数は0.9-4.9 %であった(n=5)。また、オレンジ及びグレープフルーツに0.1及び0.5 ppmの濃度で添加した時の回収率は91-107 %、変動係数は1.2-7.1%であった(n=5)。本法では、試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は、植物油で15分、柑橘類で30分程度であった。

研究協力者

伊藤裕子、後藤智美、松本 浩

愛知県衛生研究所

中澤裕之 星薬科大学

A. 研究目的

農作物中の残留農薬には、平成14年3月現在、229農薬に対して基準値が設定されており、残留農薬基準の告示と同時に個別農薬について告示分析法を示している。また、食品衛生行政においては、食品の安全性を迅速に確保することが最重要課題であることを考慮して、迅速分析法(ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用いた局長通知法、平成9年4月付け)が作成されている。しかし、今日の食品の急激な輸入量の増加あるいは多様化に対し、通知法によるスクリーニングは必ずしも効率的な対応と言いきれないのが現状である。事実、一

般的な150種類の農薬に限定しても、検体の搬入から結果を算出するまでに3週間以上の時間と膨大な労力を必要とし、229農薬を迅速に分析する事は不可能に近い。従って、食品衛生行政の現場では、食品の安全性を確保するために簡便で信頼性が高く、効率的なスクリーニング法の開発が必要とされている。

上述の告示法及びスクリーニング法は、固体の固定相を用いたクロマトグラフィーを用いて試料精製を実施しているため、農薬が固体固定相に不可逆的に吸着されることが多く、これを防ぐために、目的の農薬の性質のみを考慮した煩雑なクロマトグラフィーを繰り返して分析が行われている。一方、液体の固定相を用いた向流クロマトグラフィー(Countercurrent chromatography, CCC)¹⁾は、農薬の固定相への不可逆的な吸着が起らないので、これを

農薬の精製に導入すれば、上述の問題は一気に解決され、迅速な残留農薬のスクリーニング法が開発されると考えられる。特に、互いに混じり合わない二液相(例えばアセトニトリルとn-ヘキサンのような二相溶媒系)を両相が逆方向になるように、それぞれ分離カラム内へ送液することにより、その分離能力の向上を目指した双方向向流クロマトグラフィー(Dual countercurrent chromatography, Dual CCC)²⁾は、有効と考えられる。本手法にアセトニトリルとn-ヘキサンを二相溶媒系として使用した場合には、カラムに注入した試験溶液中の農薬類がアセトニトリル層に、夾雑物質がn-ヘキサン層に移行し、それぞれ別々の出口から溶出される。即ち、一般のカラムクロマトグラフィーのように農薬と夾雑物質が同じ出口から溶出することはないので、夾雑物質の溶出時間を全く考慮する必要がない。従って、多数の試料を連続して短時間のうちに精製することが可能である。そこで我々は、試料精製法としてDual CCCを、検出法としてタンデムマススペクトルメトリー(MS/MS)を用いる植物油及び柑橘類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリル(Fig. 1)の効率的で迅速な分析法の開発を検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

標準品として、メソミル(Riedel- de-Haen製)、フェノブカルブ(和光純薬工業製)、カルバリル(和光純薬工業製)を用いた。

内標準用安定同位体として、メソミル-d3、フェノブカルブ-d3、カルバリル-d7(いずれも林

純薬工業製)を用いた。

その他の試薬はすべて和光純薬製の残留農薬分析用もしくは、特級試薬を用いた。

2. 試料

平成14年に名古屋市内で購入したオレンジ、グレープフルーツを用いた。コーン油、大豆油(いずれも和光純薬製)は日本薬局方品を用いた。

3. 操作方法

3-1. FI-ESI MS/MS 条件

MS 装置: QUATTRO II (Micromass 製)

キャリアー: 0.01 %ギ酸-90 %メタノール

流速: 0.2 mL/min

試料注入量: 1 μ L

デソルベーションガス(N₂): 200 °C、370 L/hr

イオン源温度: 100 °C

検出方法: 選択反応検出法(MRM)

その他の条件は、Table 1に示した。

3-2. 試料溶液調製法

Scheme 1に示した。

3-3. Dual CCC 条件

Dual CCC 装置: Dual CCC (米国 NIH 製、Fig. 2)。本装置は公転軸から対称に 20cm の位置に一对のカラムホルダーが取付けられている。片側のホルダーには後述するコイル状の分離カラムが、反対側には本装置のバランスを取るために分離カラムと同じ重さのダミーカラムが取付けられている。プーリーとギアの組み合わせにより、カラムホルダーと分離カラムが、同速度で同方向へ回転する惑星運動を行うように設計されている。本装置の回転スピードはスピードコントロールユニットによって

1000rpm まで調節することができるが、通常は 500rpm で使用される。この惑星運動がもたらす強力なアルキメデスのスクリー効果を利用して、細長いテフロンチューブ内で二液相の向流を行なわせることにより効率のよい分離を行なうことができる。Fig. 3 に分離カラムのデザインを示した。カラムは内径 2.6mm、長さ 10m のテフロンチューブのコイルの両端に、内径 0.55mm のテフロン製送液チューブを 3 方アダプターを介してカラム内に 50cm のところまで挿入する。ヘッド側(Head、回転するカラムに対して逆向きの口、即ち、アルキメデスのスクリーポンプにおける水の出口)は、ヘッドからの溶媒供給用に、テイル側(Tail、回転するカラムに対して同方向の口、即ち、アルキメデスのスクリーポンプにおける水の入口)は、テイルからの溶媒供給用に使用する。また同じ 3 方アダプターを介してヘッド側には内径 0.85mm のテフロン製チューブがヘッドからの溶媒回収用に、テイル側はテイルからの溶媒回収用に取り付けられている。さらに、ヘッドからの溶媒の流出量を制御するための抵抗管として、ヘッド回収ラインに長さ 1m23cm、内径 0.55mm のテフロンチューブが、テイル供給ラインには 7725 サンプルインジェクター(レオダイン製)が取り付けられている。

操作方法:

- 1) はじめに、n-ヘキサンとアセトニトリルを分液ロートで互いに飽和させ、それらを二相溶媒として用いた。
- 2) ヘッド側の供給口とテイル側の回収口を除いて、その他のラインの出入り口を閉じる。
- 3) ヘッド側からアセトニトリル飽和 n-ヘキサン

(以下、ヘキサンという。)を注入し、コイル状カラム内をヘキサンで満たす。

- 4) ヘキサンで満たされたことを確認し、コイル状カラムを毎分 500 回転で回転する。
- 5) ヘッド側から n-ヘキサン飽和アセトニトリル(以下、アセトニトリルという。)、テイル側からヘキサンを毎分 2.0 mL で送液し、カラム内が平衡状態に達するのを待つ。(テイル回収ラインからアセトニトリル、ヘッド回収ラインからヘキサンが、ポンプで送液した量と同量の流出が確認されることにより、カラム内は平衡に到達したと見なす。)
- 6) テイル供給ラインから、サンプルインジェクターを通じて試料溶液を注入する。
- 7) ヘッド回収ラインから流出するアセトニトリルの 2 から 6 分の画分を分取し、これを MS/MS 用試験溶液とする。

C. 結果と考察

1. Dual CCC 条件の最適化

1-1. 抵抗管について

あらかじめヘキサンで充填したカラムに、アセトニトリルをヘッド供給ラインから、ヘキサンをテイル供給ラインから流速 2.0 mL/min で送液した。その結果、ヘッド回収ラインからのみ、ヘキサンが流出し、平衡状態には達しなかった(テイル回収ラインからアセトニトリル、ヘッド回収ラインからヘキサンが、ポンプで送液した量と同量の流出が確認されることにより、カラム内は平衡に到達したと見なす)。そこで、ヘッドからの流出量を制御するために、ヘッド回収ラインに、種々の長さの内径 0.55mm のテフロンチューブを抵抗管として取り付け、平衡状態に

達するかどうかを検討した。その結果、抵抗管の長さを 1m23cm としたところ、ヘッド側、テイル側回収ラインからポンプで送液した量と同量の二液相の流出が確認され、カラム内は平衡に到達した。従って、以下の実験においては、ヘッド回収ラインに、長さ 1m23cm の内径 0.55mm のテフロンチューブを抵抗管として取り付け、実験を行うこととした。

1-2. 試料注入方法の影響

次に試料注入方法の影響について検討した。試料を注入する方法としては、ヘッド供給ラインからの注入及びテイル供給ラインからの注入の二つの方法がある(Fig. 3)。これら注入方法の与える影響については、10ppm の農薬混合液をヘキサン溶液で調製したものと、大豆油で調製したものをを用いて検討を行った。すなわち、それぞれの溶液0.2 mLを各位置で注入し、ヘッド及びテイル回収ラインからの流出液、即ち、ヘキサンとアセトニトリルを捕集し、これを MS/MS 分析した。まず、はじめに、ヘッド供給ラインからの注入を検討した。その結果、この方法による試料注入では、注入してから農薬が流出するまでに5から8分を要する上、ヘキサン溶液と大豆油の場合では農薬の流出時間に差が生じた。これは、ヘッド側からテイル側への移動距離が約 10 m と長いためと考えられた。一方、テイル供給ラインからの試料注入では、流出時間も 2 から 4 分と短く、ヘキサン溶液と大豆油の場合にも農薬の流出時間に差は認められなかった。しかし、この場合には、農薬の面分(アセトニトリル層)に、わずかに油が混入していることが確認された。これは、試料溶液がカラム内に注入される位置とアセトニ

トリルの流出口(テイル回収ライン)が近いためと考えられた(Fig. 3)。そこで、三方アダプターを介してテイルからカラム内に 50 cm 挿入されていたテイル供給ラインを、更に 50 cm 延長し、1 m としたところ、完全に農薬面分から脂肪の除去に成功した。従って、以下の実験においては、カラム内に 50 cm 延長し、1 m としたテイル供給ラインから試料を注入することとした。

2. 添加回収実験

はじめに、大豆油及びコーン油に、その濃度が 10 ppm 及び 1 ppm になるように農薬を添加し、添加回収実験をそれぞれ 5 回ずつ繰り返した。Dual CCC に繰り返し試料を注入する時間は、10 分間毎に行った。その結果は Table 2 に示すように、回収率は 97-103 %、変動係数は 0.9-4.9 % と非常に良好であった。

次にオレンジ及びグレープフルーツに、その濃度が 0.5 ppm 及び 0.1 ppm になるように農薬を添加し、添加回収実験をそれぞれ 5 回ずつ繰り返した。その回収率は 91- 107 %、変動係数は 1.2-7.1% であった(Table 3)。また、Fig. 4 及び 5 には、オレンジ及びグレープフルーツに、農薬を 0.1 ppm になるように添加したときに得られたMRMプロファイルを、農薬を全く添加しなかったブランク試料のプロファイルと共に示した。農薬を添加した試料からは、添加した3種の農薬とそれぞれの内部標準物質が6つのプロファイル上に明瞭なピークとして観察された。また、農薬を添加しなかったブランク試料からは、内部標準物質のみが良好に検出され、定量を妨害する物質は検出されなかった。以上のことから、Dual CCC による農薬精製の

有用性が確認された。

D. 結論

以上のように、試料精製法として Dual CCC を、検出法として ESI MS/MS を用いる植物油及び柑橘類中のメソミル、フェノブカルブ、カルバリの効率的で迅速な分析法を開発した。Dual CCC は互いに混じり合わない二相溶媒の上下層（今回は上層として n-ヘキサン、下層としてアセトニトリル）を、強い遠心力場に置いたコイル状カラムの両端から、それぞれ逆方向から送液し、向流クロマトグラフィーを行うものである。この手法を試料精製法に導入し、安定同位体を内部標準物質として用いるタンデムマススペクトルメトリーにより検出することにより、迅速かつ精度の高い上記農薬の分析法が確立された。コーン油及び大豆油に 1 及び 10 ppm の濃度で添加した時の回収率は 97-103 %、変動係数は 0.9-4.9 % であった (n=5)。また、オレンジ及びグレープフルーツに 0.1 及び 0.5 ppm の濃度で添加した時の回収率は 91- 107 %、変動係数は 1.2-7.1% であった (n=5)。本法では、試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は、植物油で 15 分程、柑橘類で 30 分程度であった。本法ではカラムに注入した試験溶液中の農薬類がアセトニトリル層に、夾雑物質が n-ヘキサン層に移行し、それぞれ別々の出口から溶出される。即ち、一般のカラムクロマトグラフィーのように農薬と夾雑物質が同じ出口から溶出することはないので、夾雑物質の溶出時間を全く考慮する必要がない。従って、多数の試料を連続して短時間のうちに精製することが可能

である。さらに、アセトニトリル層の出口を質量分析計に直結することによって自動化し、更なる効率化が可能と思われる。

E. 参考文献

- (1) Ito, Y., Conway, W. D.: "High-Speed Contercurrent Chromatography", (1995), (John Wiley & Sons, Inc., Chichester).
- (2) Lee, Y. -W., Cook, C. E., Ito, Y., *J. Liq. Chromatogr.*, 1988, 11, 37-53.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

Preliminary studies on the use of high-speed countercurrent chromatography for the rapid determination of carbamate pesticides in vegetable oil: 伊藤裕子、後藤智美、岡 尚男、斉藤 勲、松本 浩 (愛知衛研)、高橋伸之、中澤裕之 (星薬大)、伊東洋一郎 (米国・NIH)、2003 Pittsburgh Conference、2003、3月13日、オランダ、米国。

2. 論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Sample 5 g

add I.S. *n*-hexane solution.
(each 2.5 mg/l of methomyl-*d*3,
fenobucarb-*d*3 and carbaryl-*d*7) 0.5 ml
anhydrous Na₂SO₄ 20 g

homogenize with *n*-hexane

centrifuge (3100 rpm, 10 min)

evaporate to just dryness

make up to 5 ml with *n*-hexane

Dual CCC

200 μl inj.

Acetonitrile layer (2~6 min)

evaporate to just dryness

add 0.5 ml of methanol

FI-ESI MS/MS

1 μl inj.

Scheme 1. Analytical procedure of carbamate pesticides in citrus fruit.

Table 1. Compound-Specific ESI MS/MS Parameters for the Carbamate Pesticides and the Corresponding Internal Standards

	Precursor ion (m/z)	Monitor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Methomyl	163	88	15	8
Methomyl- <i>d</i> 3	166	92	15	8
Fenobucarb	208	95	25	15
Fenobucarb- <i>d</i> 3	211	95	25	15
Carbaryl	202	145	15	10
Carbaryl- <i>d</i> 7	209	152	15	10

Table 2. Recoveries of Methomyl, Fenobucarb and Carbaryl from Vegetable Oils

		Methomyl		Fenobucarb		Carbaryl	
		Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)
Corn oil	10 mg/kg spiked	97	1.5	100	1.0	97	1.5
	1 mg/kg spiked	98	3.4	100	1.2	103	4.7
Soybean oil	10 mg/kg spiked	96	1.4	99	0.9	103	1.4
	1 mg/kg spiked	103	4.9	101	1.4	101	3.7

^a Average of 5 trials. ^b Coefficient of variation.

Table 3. Recoveries of Methomyl, Fenobucarb and Carbaryl from Citrus Fruits

		Methomyl		Fenobucarb		Carbaryl	
		Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)	Recovery ^a (%)	C.V. ^b (%)
Orange	0.5 mg/kg spiked	94	2.4	97	1.2	103	1.4
	0.1 mg/kg spiked	91	7.1	97	6.1	107	2.8
Grapefruit	0.5 mg/kg spiked	92	3.5	99	1.5	94	2.0
	0.1 mg/kg spiked	97	6.1	102	3.0	102	1.3

^a Average of 5 trials. ^b Coefficient of variation.

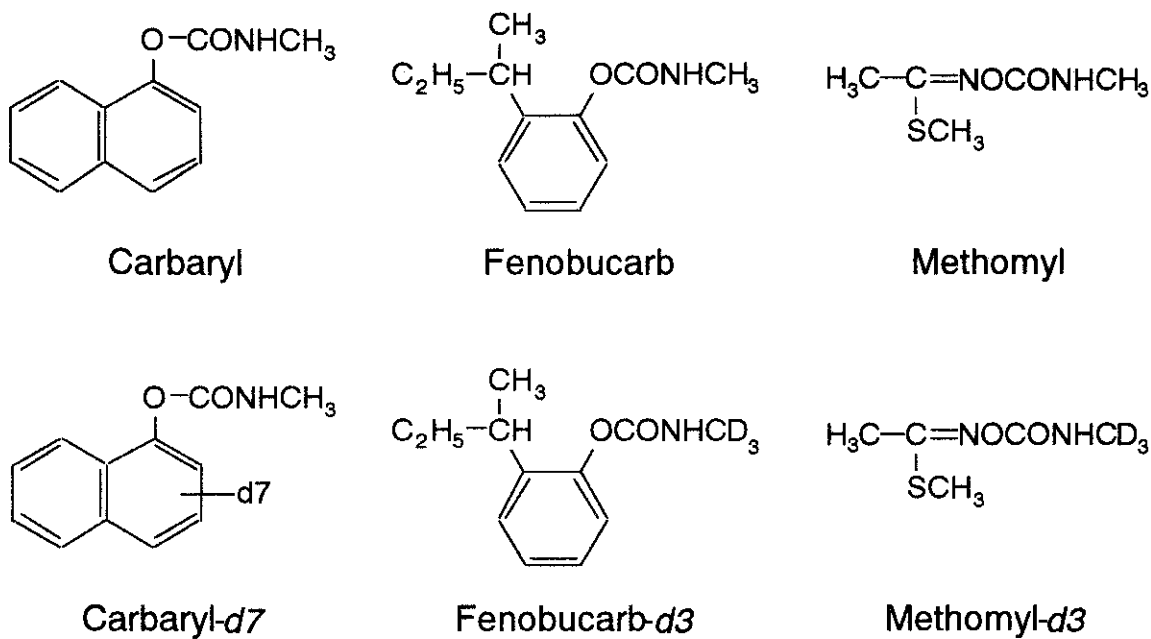


Fig. 1 Chemical structures of carbamate pesticides and each corresponding deuterated compounds.

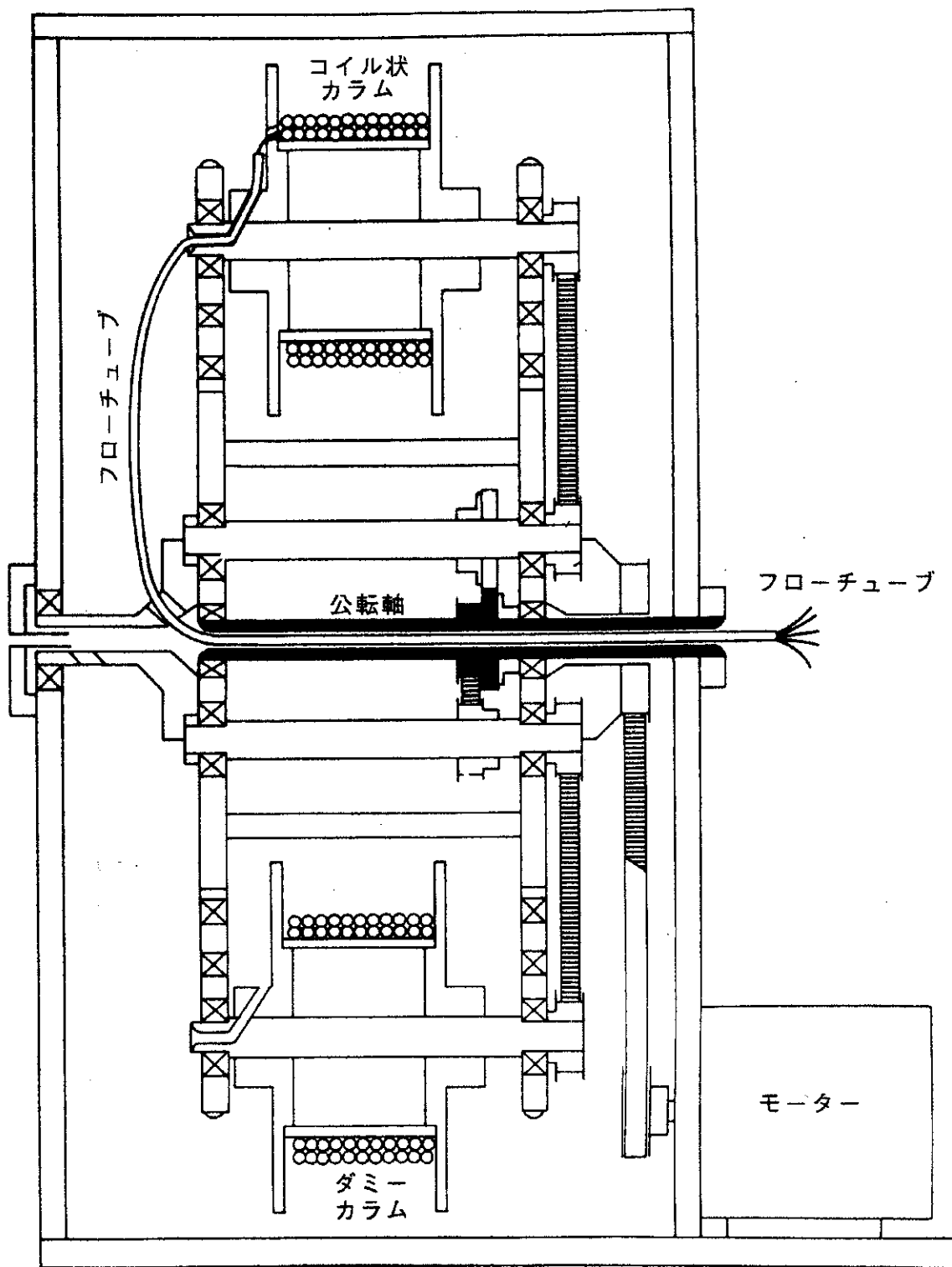


Fig. 2 Cross-sectional view of Dual C C C apparatus.

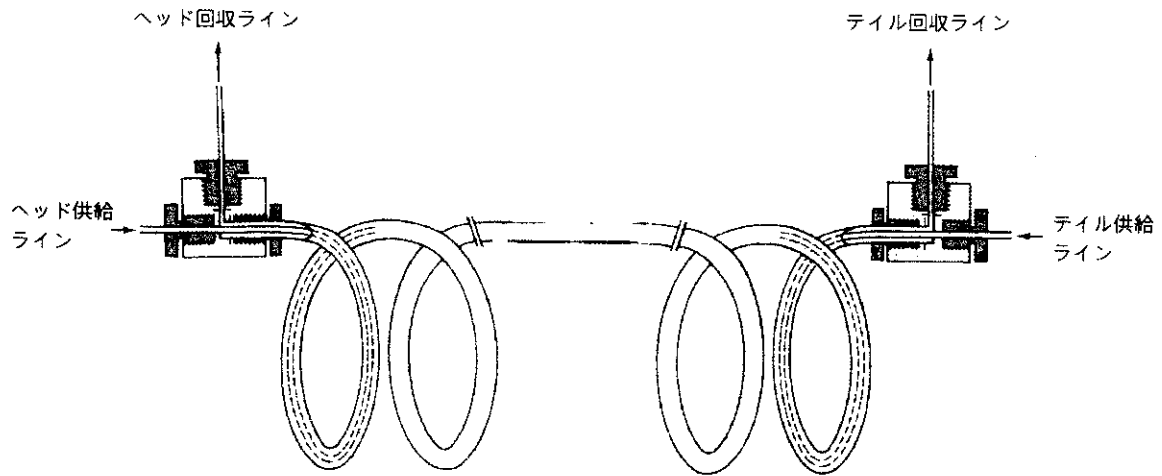


Fig. 3 Column design for dual CCC.

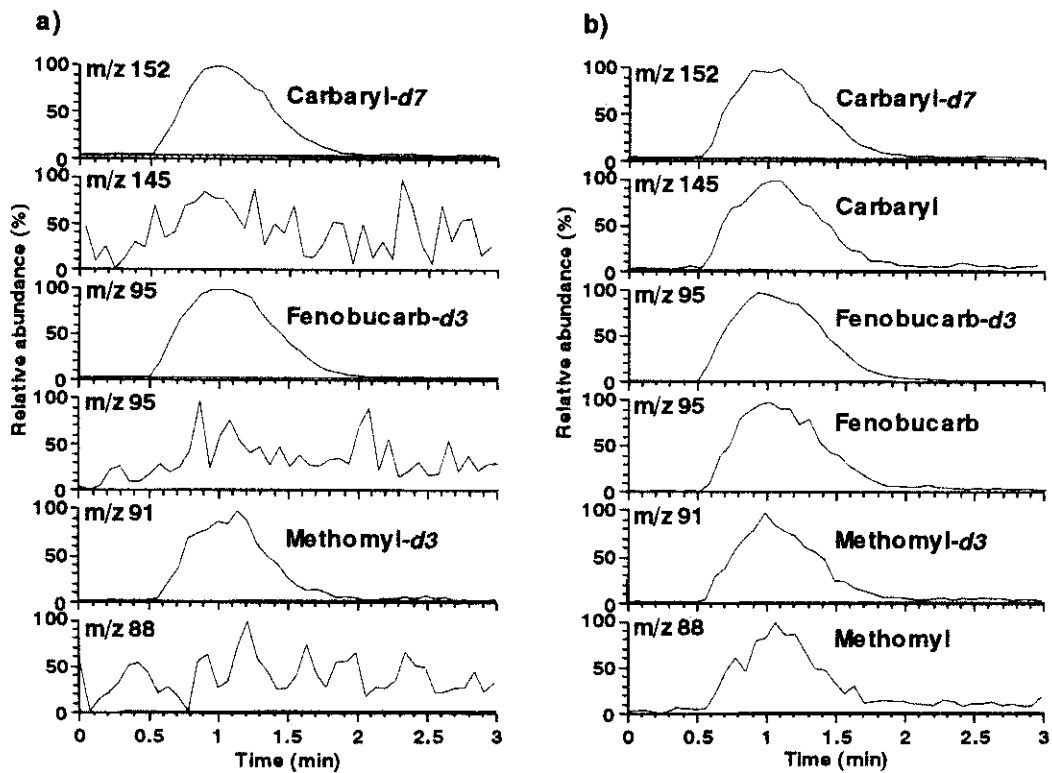


Fig. 4 Typical MRM profiles of the fortified orange sample under ESI MS/MS conditions. (a) Orange (control); (b) fortified with the carbamate pesticides at the concentration of 0.1 mg/kg.

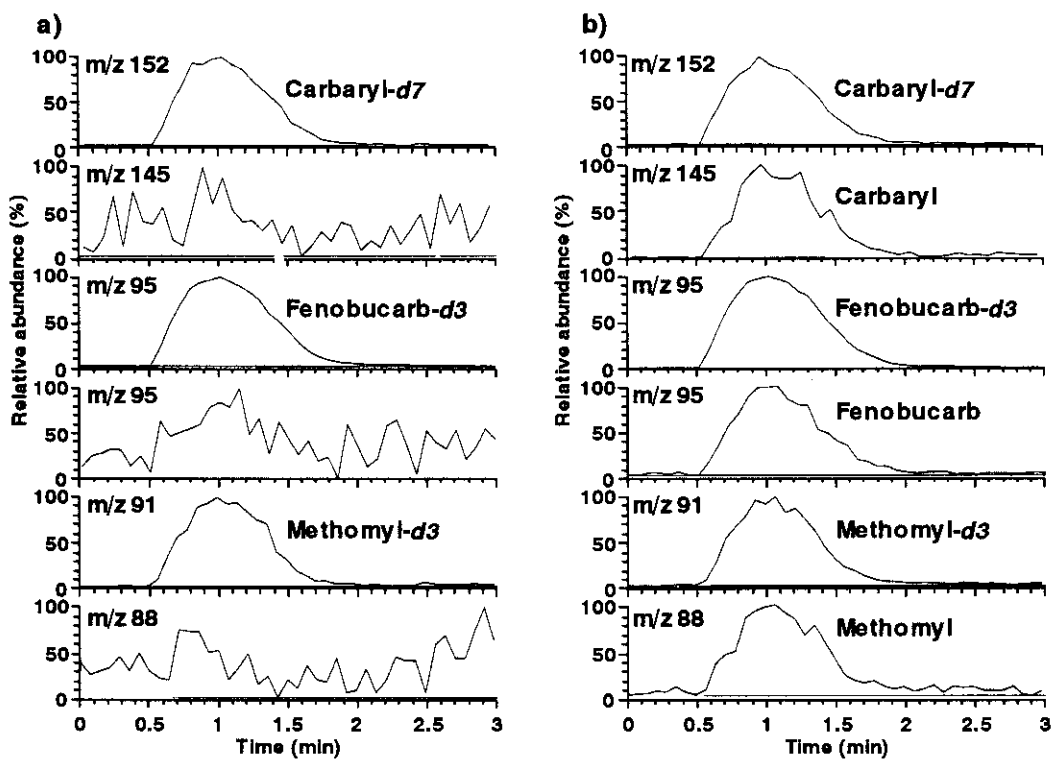


Fig. 5 Typical MRM profiles of the fortified grapefruit sample under ESI MS/MS conditions. (a) Grapefruit (control); (b) fortified with the carbamate pesticides at the concentration of 0.1 mg/kg.

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

LC/MSによる残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究
（農作物中の残留エマメクチン安息香酸塩類、アバメクチン、ミルベメクチン
及びイベルメクチンのLC/MSによる迅速分析法）

分担研究者 外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 食品試験部長

研究要旨

マクロサイクリックラクトン系化合物である、エマメクチン安息香酸塩類、アバメクチン、ミルベメクチン及びイベルメクチン（以下エマメクチン類）をアセトンで抽出し、オクタデシルシリカゲルカラムで精製後、LC/MS(ESI)で測定する簡便な分析法を検討した。本研究では、エマメクチン類のLC/MS測定における測定条件の設定や試験溶液調製法の改良などについて検討し、以下のような結論を得た。

測定に関して、①移動相の溶媒としては、アセトニトリル系よりもメタノール系移動相の方が高感度に測定ができる。特にミルベメクチンではその差異が著しかった。②最終試料溶液の溶媒はメタノール系よりもアセトニトリル系の方がエマメクチン類の分解を防止できるため適当と考えられた。③その他、注入量や測定範囲、検出限界、標準溶液の繰り返し測定などの検討を行った結果、注入量は10 μ Lが最適、基準値程度の測定範囲における検量線の直線性は R^2 値で0.97以上、検出限界は0.1から0.5ng/mL（10 μ L注入時）で蛍光法と同等以上の感度であった。

試験溶液調製に関しては、最小限の精製により短時間で試料調製が可能な C_{18} ミニカラムのみによる試験法を作成したが、さらに高度な精製を目的とする場合の基礎データとして、対象としたエマメクチン類に使用可能なミニカラムを検討した。その結果、告示試験法で用いている C_{18} 、 NH_2 及びPRSミニカラム以外に、SAX、SCXなども使用可能であった。しかし、 C_{18} に関しては、ロット間で差異があり、その使用に関しては注意を要することが判明した。

添加回収試験はトマト、だいこん及び茶を用いて行った結果、 C_{18} と NH_2 ミニカラムを用いて精製を行った場合と C_{18} のみの場合はマスクロマトグラム上も添加回収率の上でも差異は見られず、茶のアバメクチンとミルベメクチンA₄以外で、90.1から120.9%の良好な回収率が得られた。しかし、測定に際していずれの場合にも農作物由来成分によるイオン抑制が見られるため、標準添加法で定量する必要があった。また、本添加回収実験では、蛍光誘導体化を行わないためと考えられるが、告示試験法と異なり操作中にエマメクチンB_{1a}や8,9-Z異性体がアミノ体に、FA体がエマメクチンB_{1b}に変化する現象が見られなかったため、それぞれの個別分析も可能であった。また、LC/MS測定法としたため、だいこんを別法として特別に精製する必要もなかった。

研究協力者

石光 進 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所

津村ゆかり 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所

吉井公彦 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所

A. 研究目的

マクロサイクリックラクトン系化合物である、エマメクチン安息香酸塩、アバメクチン、ミルベメクチン及びイベルメクチンは、ダニ、寄生虫、蚤、体内に寄生するハエの幼虫などに対して駆虫作用を示すが、マクロライド系やポリエン系抗生物質と異なり、抗菌作用を有しない。本剤の作用機序は、線虫や節足動物の神経筋接合部におけるGABA受容体を介するクロライドチャンネルを開放し、麻痺させることによる。

エマメクチン(商品名:アフーム)安息香酸塩は平成11年11月に厚生省告示された殺ダニ剤である¹⁾。表1に厚生労働省食品残留基準値を示す。その後、他の作物についても環境庁において新規登録がなされており²⁾、これらの登録保留基準値を表2に示す。

アバメクチン(英名:Abamectin、商品名:Avid、Vertimec、AgriMekなど)はストレブ

トマイセス菌由来の殺ダニ剤で、家畜の駆虫薬としての適用もある。1986年に米国で殺ダニ剤としての販売が開始されているが、わが国においては現在まで登録にいたっていない。また、その使用実態に関する全貌は不明であるが、長崎県、愛媛県、香川県の一農家での違法使用が報告されている。

ミルベメクチン(商品名:ミルベノック)は平成5年に登録され、わが国で開発された農薬で、殺ダニ効果以外にも、松喰い防除剤としてマツノザイセンチュウの駆虫や動物用の駆虫薬としても用いられている。表3に最新の登録保留基準値を示す³⁾。

イベルメクチンは内寄生虫薬として用いられる動物用医薬品で、農作物への適用はされていない。

エマメクチン安息香酸塩の構造式は図1-aに示したように、アバメクチンから合成されたマクロサイクリックラクトン系化合物で、代謝物としてホルミルアミノ(FA)体、N-メチルホルミルアミノ(MFA)体、アミノ体(以上、図1-a)及び8,9-(Z)異性体(図1-b)等が存在する。アバメクチン(図1-a)、ミルベメクチン(図1-c)およびイベルメクチン(図1-d)も類似の構造式を持つ化合物である。

LCを用いた農薬分析において検出器としては、一般的に紫外吸光検出器が繁用されている。しかしながら、これらの検出器を

用いた場合、抽出してC₁₈カラムを通しただけでは、作物由来の妨害ピークが多数現れることが多いため、C₁₈の他にも精製カラムを用いるなど、複数の精製過程を経るか、エマメクチン安息香酸塩類のように蛍光誘導体化反応の後に蛍光分光検出器で測定するなど、試料調製法が複雑になり、調製に時間がかかる傾向にある。

エマメクチン安息香酸塩の厚生労働省告示試験法(図2)は、抽出後3種のミニカラムで精製し、蛍光誘導体化してHPLCで測定している。本法はエマメクチン以外にも、アバメクチン、ミルベメクチン、イベルメクチンなどエマメクチンと同様の構造を持った化合物(以下エマメクチン類と定義)であれば測定可能であるが、蛍光誘導体化反応などを含み、煩雑であるため試験溶液調製に1日を費やすという欠点がある。近年急速に普及しているLC/MSを用いれば、測定対象物質の特異的なm/zをモニターするため、UV検出器を用いた場合のように多くの作物由来の妨害ピークも少なく、蛍光誘導体化もなく短時間で測定できる可能性がある。本報告書では、これらエマメクチン類の、LC/MSによる簡便で迅速なスクリーニング用の試験法を作成することを目的として、LC/MS測定における問題点やLC条件、試料調製法の簡易化などを検討した。

B. 研究方法

1. 試料

添加回収試験用のトマト、だいこん、茶は大阪市内の小売店で購入した。

2. 農薬標準品、標準溶液

①標準品

エマメクチン安息香酸塩及びその代謝物であるFA体、MFA体、アミノ体並びにアバメクチン、イベルメクチン、ミルベメクチンA₃、ミルベメクチンA₄は林純薬工業(株)から購入した。8,9-Z異性体は北興化学工業(株)から入手した。

②標準溶液

エマメクチン安息香酸塩、FA体、MFA体、アミノ体、8,9-z異性体及びアバメクチン、イベルメクチン、ミルベメクチンA₃、ミルベメクチンA₄の標準原液は、それぞれについて1000 μg/mLアセトニトリル溶液を調製した。添加回収試験用標準混合溶液は、標準原液をアセトニトリルで希釈し、各々の濃度が10 μg/mLになるように調製した。

3. 試薬、器具

①試薬

残留農薬試験用アセトン、メタノール及びアセトニトリル、特級酢酸、酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製を用いた。

②カートリッジカラム