

LC/MS/MS を用いた残留農薬の一斉分析法を確立することを目的とした。試験法開発にあたっては環境汚染物質となる有機溶媒の使用は最小限とし、煩雑な試験操作は避けて自動化が可能な方法を開発することを目指した。この目標を達成するため、LC/MS の分析対象となる極性の高い農薬に対して効率の良い精製効果が期待でき、さらに自動化が可能な水系 GPC による試料精製法を検討した。さらに、試験操作の省力化を勘案して、高速溶媒抽出装置を利用した自動抽出法についても検討し、カーバメート系農薬 29 種類及び殺菌剤 3 種類の一斉分析法の開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 試薬及び試液

アセトニトリル、メタノール、ギ酸及びギ酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフィ用（関東化学工業(株)製）、珪藻土は Extrelut NT (Merck 社製) を使用した。その他の試薬はすべて残留農薬測定用または LC/MS 用を用いた。

0.2mol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 : 0.2mol/L のギ酸及び 0.2mol/L ギ酸アンモニウムを混合し、pH メータで pH6.0 に調整した。

農薬標準品：林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Riedel-de Haën 社製の残留農薬分析用標準品を用いた。

農薬標準原液：各農薬標準品をメタノールに溶解して 500  $\mu$ g/mL の濃度に調製し、1.5mL のガラス瓶に密封して冷凍庫(-30 $^{\circ}$ C)

に保存した。

農薬標準混合原液 (Mix A、Mix B、Mix C) : 各農薬標準原液 1.0mL (Mix A ; XMC、メソミル、プロパモカルブ、アルジカルブ、カルペンダジム、イソプロカルブ、カルバリル、フェノブカルブ、プロポクスル、オキサミル、カルボフラン、アルドキシカルブ、Mix B ; ベンダイオカルブ、メチオカルブ、エチオフェンカルブ、ピリミカーブ、フェノチオカルブ、エスプロカルブ、ジエトフェンカルブ、テルブカルブ、フェノキシカルブ、ピリブチカルブ、クロルプロファム、チオベンカルブ、Mix C ; プロメカルブ、ジメピペレート、イソプロバリカルブ、フラチオカルブ、アラニカルブ、ベンフラカルブ、チオジカルブ、インドキサカルブ、フェンメディファム、イミダクロプリド、メトキシフェノジド、テブフェノジド) を 25mL のメスフラスコに採り、メタノールを加えて全量 25mL とし、1.5mL のガラス瓶に密封して冷凍庫 (-30 $^{\circ}$ C) に保存した。(各 20  $\mu$ g/mL の農薬を含む)。

農薬標準混合液：農薬標準混合原液 (Mix A、Mix B、Mix C) 各 1.0mL を 10mL のメスフラスコに採り、アセトニトリルを加えて全量 10mL とした (各 2.0  $\mu$ g/mL の農薬を含む)。この溶液をアセトニトリルで適宜希釈して、検量線用標準溶液及び添加回収試験用標準溶液とした。

### 2. 試料

平成 18 年 6 月から 12 月に名古屋市内で購入した乾燥果実(干しぶどう、プルーン、マンゴー)、香辛料 (白コショウ、ターメリ

ック、セージ、タイム、マサラ、赤トーガラシ) 及び調味料 (味噌、しょう油) を用いた。

### 3. 操作方法

#### 3-1. 高速溶媒抽出装置条件

装置 : DIONEX 社製 ASE-200。

試料セル容量 : 33 mL

抽出溶媒 : アセトニトリル。

洗浄溶媒 : 50%(v/v) アセトニトリル水。

加熱温度 : 100°C。

加圧圧力 : 1500 psi。

#### 3-2. GPC 条件

装置 : 島津製作所製 LC-10Avp 高速液体クロマトグラフ分取システム。

分取カラム : 昭和電気(株)製 Shodex Asahipak GF-310 HQ (7.6mm i. d. x 300 mm)。

ガードカラム : 昭和電気(株)製 Shodex Asahipak GF-1G 7B (7.5mm i. d. x 50 mm)。

移動相 : アセトニトリル。

流速 : 0.7 mL/min。

カラム温度 : 40°C。

注入量 : 300  $\mu$ L

分取時間 : 13~18 分

#### 3-3. LC/MS/MS 条件

装置 : Waters 社製 Quattro Premier XE UPLC/MS/MS システム。

分析カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 $\mu$ m, 2.1 mm i. d. x 100 mm)。

移動相 : A 液 ; アセトニトリル・水・0.2mol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 (5 : 90 : 5)、B 液 ; アセトニトリル・水・0.2mol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0

(90 : 5 : 5)。

グラジエント条件 : B 液濃度 ; 0%  $\rightarrow$  8 min  $\rightarrow$  100%  $\rightarrow$  9 min  $\rightarrow$  100%  $\rightarrow$  9.01min  $\rightarrow$  0%  $\rightarrow$  11 min  $\rightarrow$  Stop。

流速 : 0.3 ml/min。

カラム温度 : 40 °C。

注入量 : 5  $\mu$ L。

イオン化モード : ESI (+)。

デソルベーション温度 : 350°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。

#### 3-4. 試験溶液調製法

##### 3-4-1. 抽出

##### ① 高速溶媒抽出

粉碎した試料 5 g を予め 1g の珪藻土を敷いた 100mL のビーカー中に量り、4g の珪藻土を加えてガラス棒でかく拌し、高速溶媒抽出装置の試料セルに充填した。さらに珪藻土を試料セルの入り口まで満たし、高速溶媒抽出装置に装着した。装置を運転し、得られた抽出液を 50mL のメスフラスコに移し、アセトニトリルを加えて全量 50mL とした。

##### ② 超音波抽出 (微粉末試料に適用)

試料 5 g を 50 mL の遠沈管中に量り、アセトニトリル 30 mL を加えて、超音波水浴中に 15 分間放置後、2500rpm で 5 分間遠心分離した。上澄液を 50mL のメスフラスコに移し、残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、超音波水浴中に 15 分間放置後、2500rpm で 5 分間遠心分離した。上澄液を合わせアセトニトリルを加えて全量 50mL とした。

##### 3-4-2. 精製

試料抽出液を0.45 $\mu$ mのPTFEメンブランフィルターでろ過し、その300 $\mu$ LをGPCカラムに注入して13~18分のフラクションを10mL共栓試験管中に分取した。この試験管をドラフト中に設置したアルミブロック恒温槽(東京理化学器械(株)製 MG-2200)に入れ、45 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流で溶媒を留去した。残留物に50%アセトニトリル-10mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200 $\mu$ Lを加え、超音波水浴中でかく拌した後、0.22 $\mu$ mフィルター付きの遠心ろ過フィルターに移し、12000rpmで5分間回転し、ろ液をLC/MS/MS用試験溶液とした。

Fig. 1 に分析操作のフローシートを示した。

#### 3-4-3. 検量線

農薬標準混合液をアセトニトリルで0.1~200 ng/mLに希釈し(検量線用標準溶液)、その300 $\mu$ LをGPCカラムに注入して13~18分のフラクションを10mL共栓試験管中に分取した。この溶液をアルミブロック恒温槽に入れ、45 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流で溶媒を留去した。残留物に50%アセトニトリル-10mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200 $\mu$ Lを加え、超音波水浴中でかく拌した後、その5 $\mu$ LをLC/MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法により検量線を作成した。

#### 3-4-4. 定量

試験溶液5 $\mu$ LをLC/MS/MSに注入し、標準品と同一保持時間に出現したピーク的面積から検量線により定量した。

### C. 結果と考察

#### 1. LC/MS/MS条件の検討

本研究においては、分離効率を低下することなく高速分析が可能な高圧送液ポンプ及び高性能分析カラムを装備したHPLCとタンデム型質量分析器を組み合わせたLC/MS/MSシステムを使用した。測定条件に関して種々検討した結果、上記『3-3』に示した条件により、分析することとした。

#### 2. 高速溶媒抽出装置条件の検討

農薬の抽出効率の向上、使用溶媒の削減及び抽出操作の自動化を目的として高速溶媒抽出装置による抽出法を検討した。加熱温度を60~140 $^{\circ}$ C、加圧を500~2500psiの範囲で検討した結果、加熱温度100 $^{\circ}$ C、圧力1500psiにおいて回収率が最大となる農薬が最も多く、この条件を採用した。しかし、微粉末状の香辛料(セージ)に適用したところ、装置の配管中に試料が漏れて目詰まりし、故障を生じた。そこで、微粉末試料(ターメリック、セージ、タイム、マサラ)については、超音波水浴中でアセトニトリル抽出することとした。

#### 3. 水系GPC条件の検討

農薬分析では有機溶媒系GPCが試料の精製の用いられている<sup>1)</sup>。しかし、抽出溶媒としてアセトニトリルを用いた場合、抽出液をヘキサン等の低極性の溶媒に置換する必要がある。この操作を省略してアセトニトリル抽出液を直接注入できる水系GPCカラムを検討した結果、ポリビニルアルコール系樹脂が充填されたShodex Asahipak GF-310 HQが、目的に適った分離を示すこ

とが判明した。カラムは使用溶媒の削減及び分離効率を考慮して、分取用ではなく分析用を採用した。移動相にアセトニトリルを用いた場合の溶出パターンを Fig. 2 に示した。各農薬はカルベンダジム、クロルプロファム、プロパモカルブ、フェンメディファムを除いて 13~18 分（容量 3.5mL）に溶出した。フェンメディファムは 18~21 分に溶出したが、分取範囲を拡大すると精製効率が低下するため本研究では分析対象から除外した。

#### 4. 添加回収実験

市販の乾燥果実（干しぶどう、プルーン、マンゴー）及び香辛料（白コショウ、ターメリック、セージ、タイム、マサラ、赤トウガラシ）について、添加回収実験を行った（n=5）。本研究で分析対象とした試料においては残留基準値が設定されている農薬の種類が少ないため、添加量は 0.1 mg/kg 及び一律基準値の 0.01mg/kg とした。結果は、0.1 mg/kg となるよう添加したとき、回収率 70-110%、変動係数 15%未満の条件を満たすものは全体の 61%、0.01 mg/kg となるよう添加したとき、回収率 60-120%、変動係数 25%未満の条件を満たすものは全体の 70%であった（Table 2）。さらに、本法が味噌、しょう油など夾雑物質を多量に含有する加工食品にも適用できることを確認するため、各農薬を 0.01mg/kg 添加して回収試験を行った（n=5）。分析対象とした 32 農薬のうち味噌では 23 農薬、しょう油では 21 農薬が回収率 60-120%、変動係数 25% 未満で定量することができた（Table 3）。

この実験で得られたクロマトグラムのうち、赤トウガラシに各農薬を 0.01 mg/kg となるよう添加したときに得られた MRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。夾雑物質を多量に含む試料においても、妨害されことなく一律基準値の残留農薬を定量することが可能であった。

なお、試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は約 90 分で、その大部分を自動化することができた。

#### D. 結論

以上のように、水系 GPC による試料精製法と LC/MS/MS を組み合わせた方法により、加工食品中のカーバメート系農薬 29 種類及び殺菌剤 3 種類（イミダクロプリド、メトキシフェノジド、テブフェノジド）の一斉分析法を開発した。水系 GPC による試料精製法は、簡便な操作にもかかわらず効率の高い精製が可能であった。高速溶媒抽出装置を用いた抽出法は、微粉末の試料には適用できなかったが、有機溶媒使用量の削減、分析操作の自動化を達成する上で有用な手段であった。これらの前処理法と LC/MS/MS 分析を組み合わせることにより、香辛料や調味料など複雑なマトリックスを含有する加工食品において高感度な一斉分析が可能であった。本研究で開発した手法は、今回の分析対象以外の残留農薬分析においても非常に有効な手段になると考える。

#### E. 参考文献

1) 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は

動物用医薬品の成分である物質の試験法について（一部改正）」（厚生労働省医薬食品局食品部長通知、食安発第 1129002 号、平成 17 年 11 月 29 日）。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

高速溶媒抽出装置および水系 GPC 精製を利用したカーバメート系農薬分析法の検討：寺田久屋、野口昭一郎、丸山吉正、加藤陽康（名古屋市衛研）、岡 尚男（金城学院大・薬）、日本食品衛生学会第 92 回学術講演会、2006 年、10 月 27 日、春日井。

2. 論文

現在執筆中。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. LC/MS/MS 測定条件

Pesticides	Precursor ion (m/z)*	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Monitor ion (m/z)
Alanycarb	400	17	10	238
Aldicarb	191	14	2	116
Aldoxycarb	223	27	14	86
Bendiocarb	224	21	8	167
Benfuracarb	411	26	27	195
Carbaryl	202	19	7	145
Carbendazim	192	30	20	160
Carbofuran	222	24	12	165
Chlorpropham	214	16	6	172
Diethofencarb	268	24	10	226
Dimepiperate	264	17	7	146
Esprocarb	266	32	16	71
Ethiofencarb	226	18	6	169
Fenobucarb	208	24	14	95
Fenothiocarb	254	20	17	72
Fenoxycarb	302	28	20	88
Furathiocarb	383	28	18	195
Indoxacarb	528	32	23	218
Iprovalicarb	321	24	22	119
Isoprocarb	194	25	14	95
Methiocarb	226	22	38	107
Methomyl	163	16	10	106
Oxamyl	219	13	20	145
Pirimicarb	239	30	19	72
Promecarb	208	22	16	109
Propamocarb	189	20	19	102
Propoxur	210	18	17	111
Pyributicarb	331	31	15	181
Terbucarb	278	22	14	166
Thiobencarb	258	24	22	125
Thiodicarb	355	22	15	88
XMC	180	19	8	123
Imidacloprid	256	25	20	84
Methoxyfenozide	370	16	19	149
Tebufenozide	354	18	20	133

[ M+H ] +

Table 2. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (1)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Raisin		Prune		Mungo	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	57	12.3	19	45.3	55	39.7
	0.1	58	1.9	11	19.7	27	71.0
Aldicarb	0.01	29	83.6	47	35.8	47	47.8
	0.1	31	47.0	37	24.1	25	54.7
Aldoxycarb	0.01	94	6.7	93	12.8	85	2.7
	0.1	100	5.3	88	2.9	88	4.4
Bendiocarb	0.01	73	9.9	83	14.1	61	15.1
	0.1	105	3.4	86	2.9	60	11.5
Benfuracarb	0.01	58	8.5	52	25.4	52	38.2
	0.1	65	4.6	56	9.1	32	13.9
Carbaryl	0.01	104	4.9	63	11.4	74	13.8
	0.1	98	3.5	68	4.6	88	7.3
Carbofuran	0.01	88	7.8	82	9.0	76	12.2
	0.1	90	1.6	83	5.6	78	4.9
Diethofencarb	0.01	71	16.6	82	14.1	72	20.1
	0.1	83	8.1	73	7.8	81	4.5
Dimepiperate	0.01	76	6.8	86	15.4	59	30.7
	0.1	97	9.5	78	3.3	74	4.6
Esprocarb	0.01	62	11.9	64	7.5	48	26.8
	0.1	87	4.9	84	5.4	65	14.0
Ethiofencarb	0.01	68	11.6	40	15.7	50	14.8
	0.1	73	10.9	70	12.4	67	16.1
Fenobucarb	0.01	59	15.2	94	8.9	36	26.9
	0.1	89	13.4	85	7.6	56	19.8
Fenothiocarb	0.01	82	6.5	79	4.9	68	11.5
	0.1	98	4.4	78	2.5	70	7.6
Fenoxycarb	0.01	79	8.9	100	9.0	83	28.8
	0.1	84	6.4	83	8.3	89	6.9
Furathiocarb	0.01	68	7.5	59	7.0	67	16.7
	0.1	68	5.2	71	3.5	75	3.9
Indoxacarb	0.01	67	18.5	58	35.8	81	45.2
	0.1	75	3.0	67	8.0	72	12.7
Iprovalicarb	0.01	81	10.3	61	13.3	86	28.1
	0.1	82	3.6	68	4.8	81	4.1
Isoprocab	0.01	67	14.5	84	15.2	37	37.4
	0.1	84	4.2	98	6.9	47	20.4
Methiocarb	0.01	67	14.3	121	13.3	102	84.0
	0.1	85	3.3	82	11.6	86	11.1
Methomyl	0.01	79	21.8	70	11.0	63	11.0
	0.1	82	6.1	65	6.2	64	20.3
Oxamyl	0.01	88	19.6	84	15.6	82	8.4
	0.1	94	5.7	77	7.2	77	9.3
Pirimicarb	0.01	82	8.7	52	4.4	90	11.1
	0.1	84	4.1	60	4.6	76	5.8
Promecarb	0.01	100	21.0	80	17.3	59	20.6
	0.1	95	9.3	92	4.3	63	12.1
Propoxur	0.01	73	16.1	74	7.9	66	21.3
	0.1	88	2.9	77	5.4	70	12.4
Pyributicarb	0.01	60	13.2	51	5.5	75	19.0
	0.1	66	3.5	56	6.3	75	4.4
Terbucarb	0.01	74	9.7	76	11.5	55	27.5
	0.1	83	3.7	85	4.5	76	12.2
Thiobencarb	0.01	66	18.5	63	10.5	79	46.1
	0.1	92	12.4	77	5.1	61	11.8
Thiodicarb	0.01	75	14.8	12	63.3	52	35.7
	0.1	58	16.5	4	22.9	26	113.2
XMC	0.01	58	13.3	58	12.5	41	21.3
	0.1	78	2.8	74	4.9	51	20.1
Imidacloprid	0.01	81	15.3	88	10.8	82	15.7
	0.1	94	5.9	85	5.1	88	3.4
Methoxyfenozide	0.01	69	49.0	65	11.8	66	17.8
	0.1	87	10.1	67	3.5	78	3.5
Tebufenozide	0.01	81	8.0	57	8.6	74	16.9
	0.1	74	6.6	77	4.9	75	5.2

Table 2. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (2)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	White pepper		Turmeric *		Masala *	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	45	14.5	113	8.2	80	10.8
	0.1	51	7.1	103	5.1	84	9.0
Aldicarb	0.01	112	54.3	63	55.0	51	64.6
	0.1	96	16.9	57	17.6	65	18.4
Aldoxycarb	0.01	105	8.0	96	7.1	78	9.4
	0.1	99	3.3	98	2.6	86	2.5
Bendiocarb	0.01	85	11.4	86	5.9	80	7.9
	0.1	90	6.0	84	3.5	89	14.2
Benfuracarb	0.01	61	9.2	90	5.9	78	8.0
	0.1	42	13.3	86	3.4	82	4.6
Carbaryl	0.01	69	15.5	71	8.6	85	17.7
	0.1	77	8.3	59	5.4	69	8.1
Carbofuran	0.01	93	8.5	71	10.4	83	21.6
	0.1	84	6.8	72	4.1	80	0.8
Diethofencarb	0.01	22	44.7	36	20.6	56	25.0
	0.1	23	11.8	33	18.5	62	9.5
Dimepiperate	0.01	39	18.0	85	22.6	64	17.6
	0.1	39	10.6	77	10.9	88	8.0
Esprocarb	0.01	71	7.8	61	6.4	69	11.0
	0.1	54	13.4	79	7.0	84	4.1
Ethiofencarb	0.01	12	32.1	35	20.9	67	9.7
	0.1	15	19.0	30	9.5	69	6.6
Fenobucarb	0.01	8	133.3	66	18.4	62	17.2
	0.1	22	6.2	56	8.0	70	7.5
Fenothiocarb	0.01	9	5.9	38	9.2	72	9.0
	0.1	11	6.8	36	4.5	45	7.1
Fenoxycarb	0.01	46	25.5	65	19.3	65	22.9
	0.1	33	10.0	52	8.5	62	4.5
Furathiocarb	0.01	75	7.5	69	10.6	79	4.8
	0.1	41	19.4	71	3.8	81	2.7
Indoxacarb	0.01	64	17.4	87	24.6	88	10.5
	0.1	75	9.5	89	11.3	92	9.7
Iprovalicarb	0.01	62	6.3	-	-	79	22.6
	0.1	61	6.1	214	28.4	63	5.1
Isoprocarb	0.01	-	-	78	9.4	101	11.4
	0.1	45	7.4	83	9.5	88	6.2
Methiocarb	0.01	9	64.6	37	25.0	55	28.7
	0.1	9	40.2	34	4.9	85	19.0
Methomyl	0.01	77	3.0	87	4.7	86	13.6
	0.1	98	5.6	89	7.2	91	2.9
Oxamyl	0.01	120	24.4	65	57.3	72	9.9
	0.1	89	5.2	65	6.1	72	1.2
Pirimicarb	0.01	109	3.0	49	4.5	58	6.0
	0.1	80	1.0	58	2.3	59	2.9
Promecarb	0.01	58	12.9	28	15.7	93	14.1
	0.1	64	3.7	34	10.5	80	6.5
Propoxur	0.01	75	6.2	65	5.0	77	10.6
	0.1	99	3.9	76	4.4	84	4.8
Pyributicarb	0.01	29	22.9	65	4.6	58	14.5
	0.1	27	6.4	66	2.3	63	7.2
Terbucarb	0.01	27	13.3	79	12.7	81	8.4
	0.1	27	9.5	90	2.4	88	4.0
Thiobencarb	0.01	27	24.4	69	8.8	27	21.1
	0.1	25	11.5	74	13.1	22	8.8
Thiodicarb	0.01	86	4.6	114	7.4	101	10.1
	0.1	101	3.2	96	2.3	95	4.8
XMC	0.01	73	7.6	61	12.0	63	12.5
	0.1	78	7.0	73	6.0	67	5.6
Imidacloprid	0.01	85	5.7	88	10.8	76	12.6
	0.1	87	7.0	85	5.1	91	4.5
Methoxyfenozide	0.01	115	14.0	80	13.6	104	14.1
	0.1	62	5.6	72	4.1	90	6.0
Tebufenozide	0.01	42	15.2	86	9.6	85	94.5
	0.1	44	3.2	94	7.7	86	6.4



Table 2. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (3)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Sage *		Thyme *		Red pepper	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	83	7.2	108	6.5	87	11.7
	0.1	98	5.6	108	7.3	94	6.2
Aldicarb	0.01	91	36.7	92	80.2	154	21.5
	0.1	84	16.6	48	9.5	127	15.5
Aldoxycarb	0.01	92	8.1	83	6.0	97	8.0
	0.1	90	5.7	88	6.6	100	4.2
Bendiocarb	0.01	82	16.0	58	13.9	92	6.5
	0.1	83	5.8	62	3.6	114	4.0
Benfuracarb	0.01	95	4.0	91	7.5	74	4.2
	0.1	85	5.0	95	2.1	86	4.4
Carbaryl	0.01	111	18.6	76	20.9	93	10.4
	0.1	73	6.4	56	12.8	120	4.9
Carbofuran	0.01	90	6.2	52	6.1	107	6.0
	0.1	82	3.6	60	6.4	99	3.9
Diethofencarb	0.01	87	16.9	73	26.4	69	14.2
	0.1	102	6.1	76	4.4	78	9.5
Dimepiperate	0.01	46	7.8	59	15.6	84	7.2
	0.1	43	10.1	61	5.9	84	3.5
Esprocarb	0.01	93	6.5	50	10.8	89	5.7
	0.1	65	10.8	49	6.3	97	9.9
Ethiofencarb	0.01	66	13.8	53	18.9	109	7.6
	0.1	95	9.5	55	8.0	96	13.3
Fenobucarb	0.01	74	11.8	63	21.9	90	20.4
	0.1	73	13.8	56	15.8	102	10.7
Fenothiocarb	0.01	69	14.2	56	4.4	86	7.7
	0.1	76	8.3	62	7.6	86	5.8
Fenoxycarb	0.01	50	15.6	63	17.4	64	24.0
	0.1	61	18.0	76	19.6	83	28.6
Furathiocarb	0.01	103	3.4	81	7.9	101	5.3
	0.1	91	4.6	70	2.9	103	2.4
Indoxacarb	0.01	79	11.7	87	6.9	95	21.6
	0.1	79	17.1	92	13.5	115	18.5
Iprovalicarb	0.01	95	8.1	86	17.8	59	10.1
	0.1	98	6.0	65	4.9	59	3.9
Isoprocarb	0.01	77	10.2	93	34.5	108	11.2
	0.1	101	6.3	59	3.8	101	7.0
Methiocarb	0.01	57	18.3	55	76.3	92	18.9
	0.1	70	20.7	29	11.4	83	13.9
Methomyl	0.01	97	6.4	77	17.0	83	9.6
	0.1	94	3.5	82	1.4	91	2.1
Oxamyl	0.01	99	25.5	65	9.4	82	17.4
	0.1	91	6.6	64	5.7	101	6.0
Pirimicarb	0.01	87	7.6	46	5.8	87	4.9
	0.1	86	3.5	53	8.4	95	2.7
Promecarb	0.01	79	8.8	32	10.1	31	62.7
	0.1	82	5.8	36	11.7	46	11.0
Propoxur	0.01	81	15.0	76	17.3	109	10.0
	0.1	86	4.3	61	4.4	120	5.4
Pyributicarb	0.01	84	5.0	53	8.4	79	5.1
	0.1	71	8.0	46	5.7	76	5.6
Terbucarb	0.01	82	14.1	83	7.2	92	4.1
	0.1	80	5.0	71	6.8	99	5.5
Thiobencarb	0.01	73	17.5	57	39.3	100	8.7
	0.1	74	9.8	70	17.2	107	11.2
Thiodicarb	0.01	98	6.8	83	11.4	77	7.9
	0.1	96	7.3	71	8.3	84	5.9
XMC	0.01	104	18.8	74	6.7	123	13.2
	0.1	98	8.3	74	9.0	128	6.6
Imidacloprid	0.01	88	19.5	82	10.3	81	10.5
	0.1	79	5.9	76	5.0	83	3.6
Methoxyfenozide	0.01	93	11.6	97	11.1	95	6.2
	0.1	81	2.3	81	5.2	98	5.2
Tebufenozide	0.01	96	8.2	84	12.3	81	9.6
	0.1	84	3.8	78	3.3	88	2.7

Table 3. 味噌及びしょう油からの農薬の回収率 n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Miso		Shoyu	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	-	-	-	-
Aldicarb	0.01	34	64.5	19	87.9
Aldoxycarb	0.01	74	9.9	86	8.2
Bendiocarb	0.01	74	14.2	112	13.5
Benfuracarb	0.01	29	11.2	16	10.8
Carbaryl	0.01	57	11.5	104	11.1
Carbofuran	0.01	76	9.5	123	8.0
Diethofencarb	0.01	86	20.9	103	7.1
Dimepiperate	0.01	105	4.2	99	16.2
Esprocarb	0.01	111	5.5	76	32.7
Ethiofencarb	0.01	48	23.4	106	6.4
Fenobucarb	0.01	95	13.6	89	27.6
Fenothiocarb	0.01	84	8.9	102	7.1
Fenoxycarb	0.01	84	18.9	92	11.5
Furathiocarb	0.01	84	4.3	103	3.8
Indoxacarb	0.01	109	8.3	104	17.5
lprovalicarb	0.01	79	11.5	117	8.3
Isoprocab	0.01	88	16.3	90	46.3
Methiocarb	0.01	87	14.7	104	13.7
Methomyl	0.01	47	15.6	60	15.4
Oxamyl	0.01	71	16.3	110	10.8
Pirimicarb	0.01	58	4.7	86	7.7
Promecarb	0.01	79	14.0	99	9.6
Propoxur	0.01	71	5.1	102	11.8
Pyributicarb	0.01	76	9.1	97	4.4
Terbucarb	0.01	93	9.8	97	6.0
Thiobencarb	0.01	91	11.8	87	32.9
Thiodicarb	0.01	3	83.4	8	31.8
XMC	0.01	57	10.1	89	48.7
Imidocloprid	0.01	81	14.9	85	9.5
Methoxyfenozide	0.01	61	8.9	81	14.0
Tebufenozide	0.01	84	9.4	107	7.8

## 高速溶媒抽出

試料 5 g  
|  
EXTrelut NT と混和  
高速溶媒抽出装置 (ASE-200)  
|  
(抽出溶媒: アセトニトリル)  
抽出液  
|  
アセトニトリルで全量 50mL  
ろ過 (0.45  $\mu$ m PTFE フィルター)  
ろ液 (300  $\mu$ L)  
|  
水系 GPC (Shodex Asahipak GF-310 HQ) 分取  
|  
農薬フラクション (13-18 min)  
|  
溶媒留去 (45°C, 窒素気流)  
残留物  
|  
50%アセトニトリル-10mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200  $\mu$ L  
かく拌 (超音波洗浄器)  
遠心ろ過 (0.22  $\mu$ m) 12000 rpm  
ろ液  
|  
LC/MS/MS 5  $\mu$ L

## 超音波抽出

試料 5 g  
|  
アセトニトリル 30mL, 20mL  
超音波水浴 15 min  
遠心分離 (2500 rpm, 5 min)  
上澄液  
|  
アセトニトリルで全量 50mL  
ろ過 (0.45  $\mu$ m PTFE フィルター)  
ろ液 (300  $\mu$ L)  
|  
水系 GPC (Shodex Asahipak GF-310 HQ) 分取  
|  
農薬フラクション (13-18 min)  
|  
溶媒留去 (45°C, 窒素気流)  
残留物  
|  
50%アセトニトリル-10mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200  $\mu$ L  
かく拌 (超音波洗浄器)  
遠心ろ過 (0.22  $\mu$ m) 12000 rpm  
ろ液  
|  
LC/MS/MS 5  $\mu$ L

Fig. 1 分析操作のフローシート

Pesticides	GPC Fraction ( min )										
	11 ~ 12	12 ~ 13	13 ~ 14	14 ~ 15	15 ~ 16	16 ~ 17	17 ~ 18	18 ~ 19	19 ~ 20	20 ~ 21	21 ~ 22
Alanycarb				■	■						
Aldicarb				■	■						
Aldoxycarb				■	■						
Bendiocarb				■	■						
Benfuracarb			■	■							
Carbaryl						■	■				
Carbendazim											
Carbofuran			■	■	■	■					
Chlorpropham											
Diethofencarb				■	■						
Dimepiperate				■	■	■					
Esprocarb				■	■						
Ethiofencarb				■	■	■					
Fenobucarb				■	■	■					
Fenothiocarb				■	■	■					
Fenoxycarb					■	■					
Furathiocarb			■	■							
Indoxacarb			■	■							
Iprovalicarb				■	■	■					
Isoprocarb					■	■					
Methiocarb						■	■				
Methomyl					■	■					
Oxamyl					■	■					
Phenmedipham								■	■		
Pirimicarb				■	■						
Promecarb				■	■						
Propamocarb											
Propoxur				■	■						
Pyributicarb				■	■						
Terbucarb				■	■						
Thiobencarb					■	■					
Thiodicarb				■	■						
XMC					■	■					
Imidacloprid						■	■				
Methoxyfenozide				■	■						
Tebufenozide				■	■						

Fig 2. GPC カラムからの農薬の溶出パターン

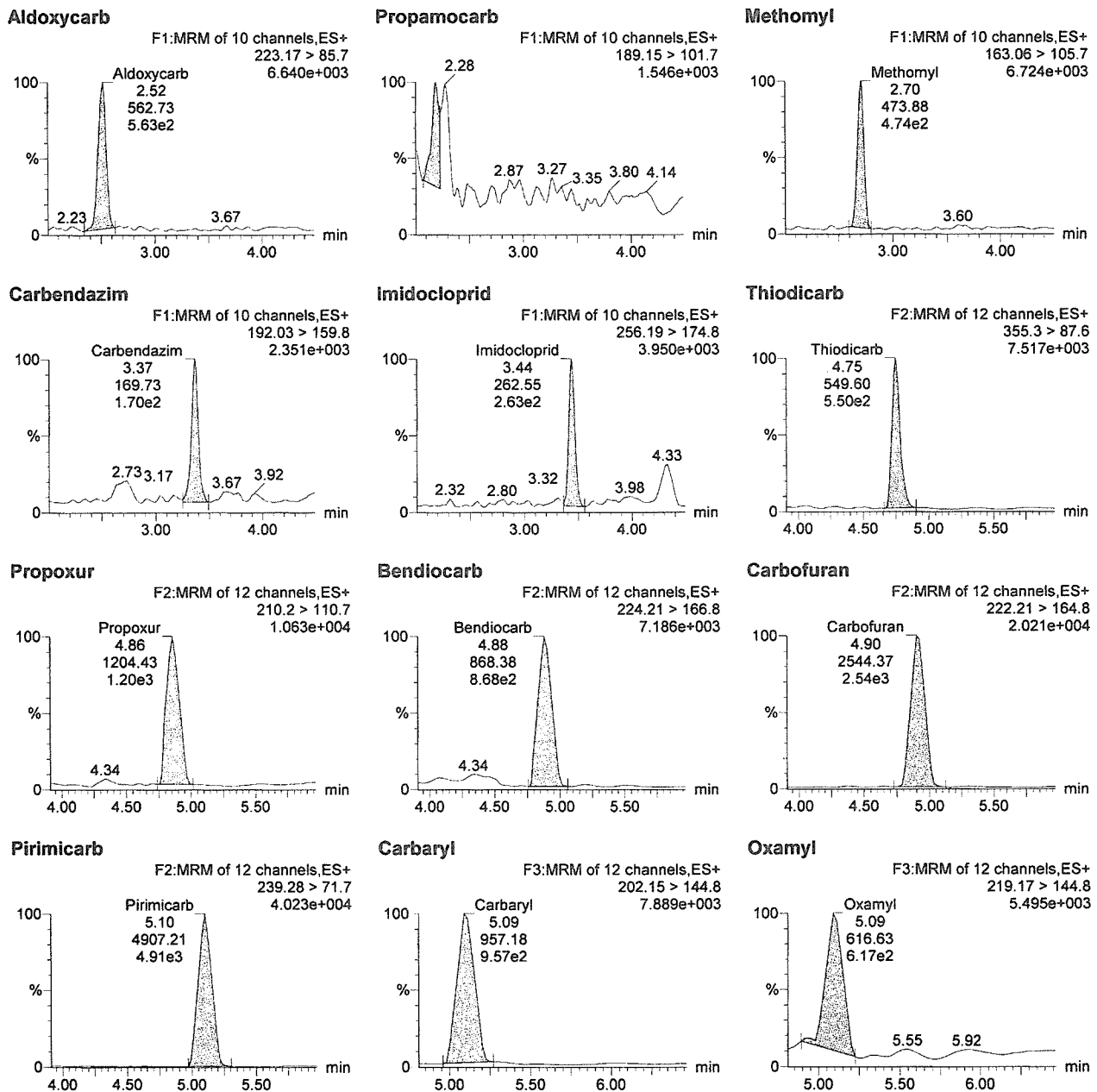


Fig. 3 赤トウガラシのクロマトグラム (1)  
(0.01mg/kg 添加)

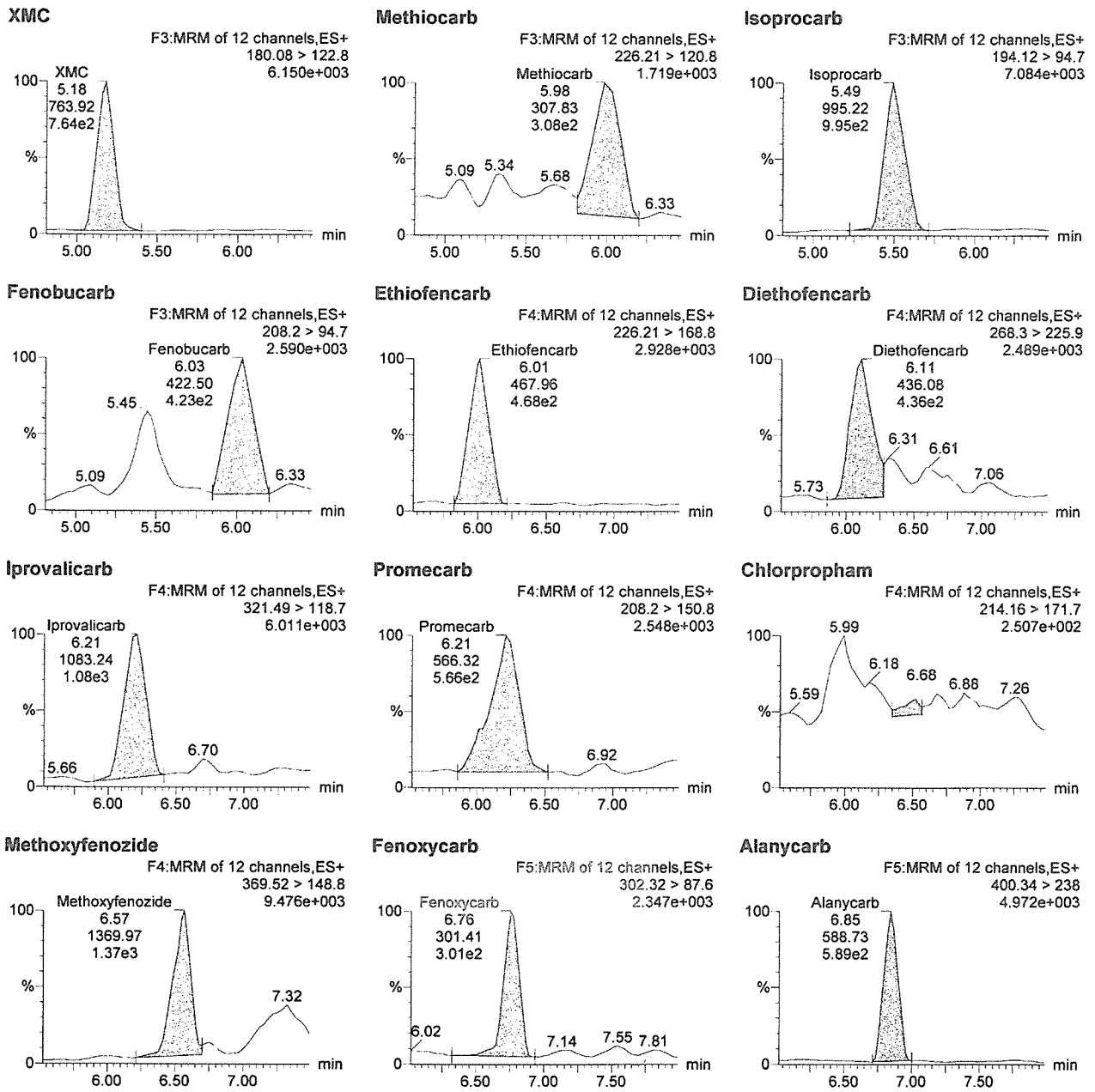
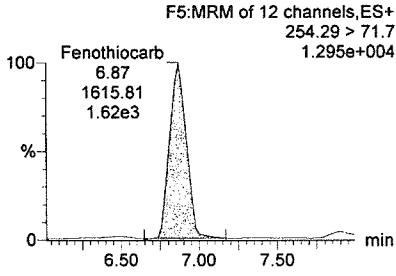
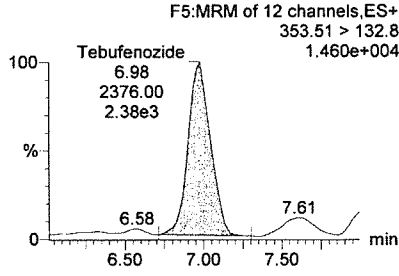


Fig. 3 赤トウガラシのクロマトグラム (2)  
(0.01mg/kg 添加)

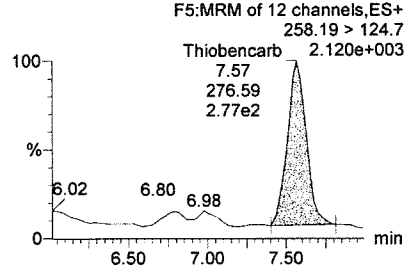
**Fenothiocarb**



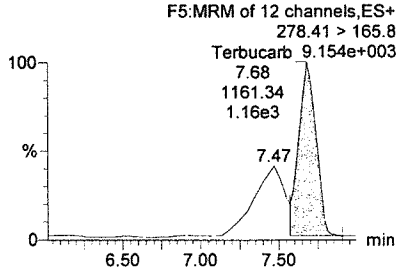
**Tebufenozide**



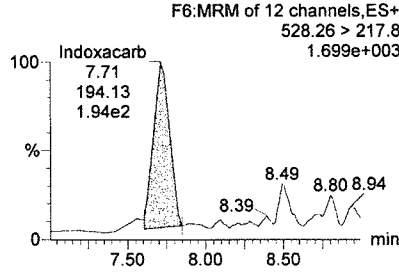
**Thiobencarb**



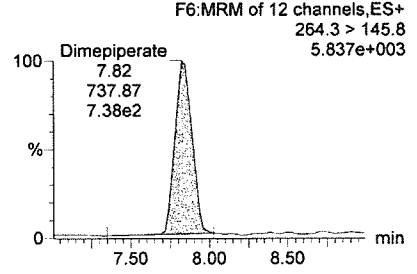
**Terbuticarb**



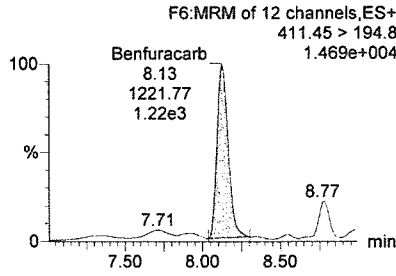
**Indoxacarb**



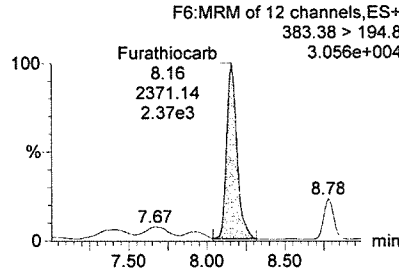
**Dimepiperate**



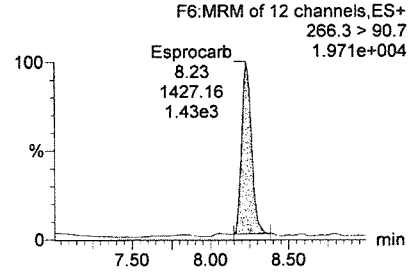
**Benfuracarb**



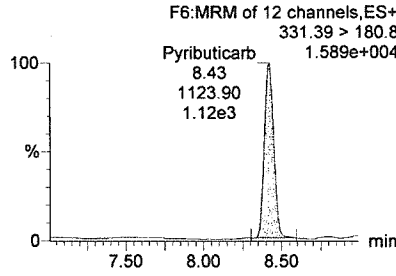
**Furathiocarb**



**Esprocarb**



**Pyributicarb**



**Aldicarb**

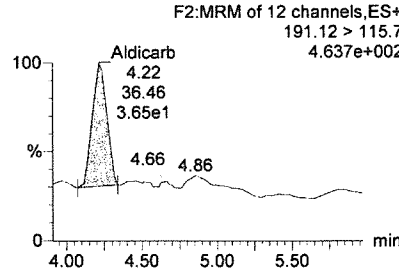


Fig.3 赤トウガラシのクロマトグラム (3)  
(0.01mg/kg 添加)

## Ⅱ. 分担研究報告書

### 3. 残留農薬等の急性参照用量に関する調査研究

分担研究者 菅野 純



残留農薬等の急性参照用量に関する調査研究

菅野純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部  
/高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨 残留農薬の急性毒性評価を NOAEL を指標に行う手法を確立する一貫として、残留農薬等の急性参照用量 (ARfD) に関連する情報を収集・整理するとともに、有機リン系農薬の ARfD 設定の JMPR、EPA、EU、オーストラリア等の比較を実施し、相違点について整理した。その結果、JMPR では chemical-specific adjustment factor (CSAF) に基づき、安全係数を下げる場合があることや（例えば 25）、有機リン系農薬の場合にはエンドポイント（コリンエステラーゼ活性）の採り方に各国間に違いが見られることなどを明らかにした。

A. 研究目的

残留農薬のリスク評価にこれまでは ADI が用いられてきたが、これは一生涯の暴露における安全指標である。一方、一回、あるいは短期暴露影響については残留農薬の観点からはことさら取り上げてこなかったが、ある種の農薬（アドリカーブ）の残留事例として、単回暴露で急性毒性症状を示唆する事象が生じた。この場合、明らかに生涯暴露により設定された ADI は、不適當である。このような短期暴露時におけるリスクアセスメントのために acute reference dose (ARfDs) の概念が作られ、JMPR や一部の国では ARfDs の設定が実施されているが、我が国では ARfDs の設定は行われていない。そこで残留農薬の急性参照用量 (ARfDs) 及びそれに関連した国際的な動向を調査・整理する。

B. 研究方法

JMPR における ARfDs 設定のガイダンス及び米国 EPA の ARfDs 設定のガイダンスを中心に参考

資料を前年度に引き続いて検索した。また、新たに、いくつかの農薬の ARfD 設定の国際間の比較を実施し、相違点について考察した。なお、用いた資料としては各機関の web 上で公開されている最新の情報等を利用した。

C. 結果

これまでに JMPR における ARfDs 設定のガイダンス (2004) 及び米国 EPA の ARfDs 設定のガイダンスを中心に参考資料を収集し、分析した。2002 年の JMPR において ARfDs 設定のガイダンスを公表したが、新たにいくつかの項目を追加したものを 2004 年に公表した。なお、2004 年の ARfDs のガイダンスと同様の詳細な内容の論文が WHO より Food and Chemical Toxicology (2005) に発表されており、双方を参照しつつ、EPA の ARfDs 設定のガイダンスとの比較も行った。今年度は、引き続き、JMPR をはじめ、ARfD 設定の新たなガイダンスを検索したが、新たな報告は無かった。一方、新たに、いくつかの農

薬の ARfD 設定の国際間の比較を実施し、相違点が以下のとおり明らかになった (表 1 参照)。

#### (1) クロルピリホス

クロルピリホスについては JMPR、EU、EPA、及びオーストラリアで ARfD の設定が行われている。ARfD 値は EPA が 0.005mg/kg bw で、それ以外はいずれも 0.1mg/kg bw である。JMPR とオーストラリアはいずれもヒト単回試験のデータの RBC (赤血球) ChE (コリンエステラーゼ) 活性阻害を用いている。一方、EU は最も新しい 2005 年の評価において、ヒトのデータを採用せず、ラット急性、遅延性神経毒性試験のデータを使用している。EPA においてはラット単回投与試験の結果を用いており、国・機関によりエンドポイントの採り方に違いが見られている。

#### (2) フェナミホス

フェナミホスの ARfD については JMPR、EPA、及びオーストラリアで設定が行われている。JMPR とオーストラリアでは 0.003mg/kg bw で、いずれもイヌの単回投与試験の RBC ChE 活性をエンドポイントにしている。一方、EPA では 0.0012mg/kg bw で、ラット急性神経毒性試験を採用しており、エンドポイントの採り方に違いが見られている。

#### (3) フェンチオン

フェンチオンの ARfD については JMPR、EPA、及びオーストラリアで設定が行われている。JMPR は 0.01mg/kg bw、EPA では 0.0007mg/kg bw と大きく値が異なっている。オーストラリアはその間の 0.007mg/kgbw となっており、それぞれ、エンドポイントの採り方に違いが見られている。

#### (4) ホスメット

ホスメットの ARfD については JMPR、EU、及び EPA で設定が行われている。JMPR は 0.2mg/kg bw で、ヒトの RBC ChE 活性阻害を用いている。一方、EU と EPA は 0.045mg/kg bw で、ラット急性神経毒性試験の血漿、RBC あるいは脳の ChE 阻害の結果を用いている。

#### (5) メタミドホス

メタミドホスの ARfD については JMPR、EU、EPA、及びオーストラリアで設定が行われている。JMPR が 0.01mg/kg bw で EPA が 0.003mg/kg bw、EU とオーストラリアはいずれも 0.001mg/kg bw である。JMPR、EPA とオーストラリアはいずれもラット急性神経毒性試験のデータを用いているが、エンドポイントならびに安全係数の設定に差が見られた。JMPR では RBC と脳の ChE 活性阻害を用いており、安全係数を 25 としている。一方、EPA は同じ試験で RBC と脳 ChE 活性に加えて血漿 ChE も用いており、さらに、Food Quality Protection Act (FQPA) による安全係数 300 を用いている。オーストラリアでは EPA と同じエンドポイントを用いているが、安全係数は 100 であった。なお、EU については ARfD 値設定の詳細は不明であった。

### D. 考察

以上、例数は少ないものの各国・機関の ARfD 設定法の相違点について解析した結果、以下のことが明らかとなった。ヒトのデータについては JMPR とオーストラリアは使用しているが、EU と EPA は今回調べた範囲では使用していなかった。また、default の 100 より小さい安全係数の使用については JMPR では既に使用しているが、EU、EPA、オーストラリアでは使用し

ていなかった。逆に、EPA では子供のため、さらなる追加の安全係数を設定する例も見られた(FQPA の安全係数)。有機リンの毒性のエンドポイントとしてEPA とオーストラリアは高感度な指標である血漿 ChE を採用しているが、JMPR と EU は採用していなかった。これらの決定要因により ARfDs は JMPR では高めに、EPA は低めに、EU とオーストラリアではその間の値を採る傾向が見られた。

ARFD のガイダンスについてはまだ改良途上であるが、定義等に JMPR や諸外国の間で大きな相違点は見られなかった。しかし、実際の ARFD 設定法の国際間の比較から、エンドポイントとなる試験の選択法に差が観られた。また、安全係数の考え方については、JMPR は通常用いられる安全係数 100 を、場合により、chemical-specific adjustment factor(CSAF) に基づき、さらに下げているが(例えば 25)、その他の国・機関では、この CSAF は採用されおらず、逆に米国では上げる場合もあり、日本が将来 ARFD の設定を行う場合にはこれらの考え方について、整理しておく必要があると考えられた。

#### E. 結論

残留農薬等の急性参照用量 (ARfDs) に関連する情報を収集・整理するとともに、農薬の ARfDs 設定の国際間の比較を行い、相違点を明らかにした。

#### F. 健康危惧情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1. 農薬 (有機リン系) の ARfD 設定法の国際間比較

化合物名	機関・国	年	ARfD (mg/kg bw)	Safety factor	NOAEL (mg/kg bw)	試験系と ARfD 設定のエンドポイント
Chlorpyrifos	JMPR	1999	0.1	10	1	ヒトの単回投与試験
	EU	2005	0.1	100	10	RBC ChE 活性の阻害
	USEPA	2000	0.005	100	0.5	ラット急性、遅延性神経毒性試験
	Australia	2000	0.1	10	1	ラット単回投与試験 血漿、RBC ChE 活性の阻害
Fenamiphos	JMPR	2002	0.003	100	0.25	イヌの単回投与試験 RBC ChE 活性の阻害
	USEPA	1999	0.0012	300	0.37 (LOAEL)	ラット急性神経毒性試験 血漿、RBC ChE 活性の阻害
	Australia	2005	0.003	100	0.25	イヌの単回投与試験 RBC ChE 活性の阻害