

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・機関では採用されておらず、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。

⑥本分担研究課題は「残留農薬基準設定における暴露評価の精密化に関する意見具申」（1998年）での課題を解決し、コーデックスなど国際的な場でより科学的な暴露評価として活用され初めているプロバビリティーモデルによる残留農薬の短期暴露量について、わが国でも推計するための試行を行うことを目的としている。特に、シミュレーション手法が、我が国で適合可能かどうかを検証することが重要な課題となっている。わが国においては、毎年大規模集団を対象として行われる国民健康・栄養調査における詳細な食品摂取量データが利用可能である一方、調査が11月に行われることにより季節変動の大きな農作物に由来する暴露評価が十分に行うことが出来ない等、制限事項も大きい。季節変動の考慮については、現在（独）国立健康・栄養研究所において、国民健康・栄養調査とは別に、四季にまたがる複数日における食品摂取量調査を継続的に行っており、そのデータベースの完成と活用が待たれるところである。

本分担研究課題では、残留農薬の暴露評価手法のうち、特に短期暴露量の確率論的アプローチによる推計手法の検討を最終目標として行ってきた。そのために、摂取量データベースの検討・構築作業を進めながら、補完的なデータの利用を試みてきた。一方、残留濃度のデータについては、実際の作物残留試験を行うとともに、JMPRに

よる既存データの活用を図ってきた。それらを踏まえて、最終年度で実際に2農薬の短期暴露評価手法について試行的解析を行った。その結果、下記のことが明らかとなった。ブロッコリ中のEndosulfanとトマト中のFenamiphosは予想に近い結果となったが、ピーマン中のFenamiphosは予想から大きく外れた結果となった。ユニット重量と97.5パーセンタイル消費量が大きく違うため、一点推定法との差が大きくなった可能性がある。さらに、今後の課題として次のようなことが考えられた。

- i) 摂食者の平均体重と対象者全員の平均体重が同じではない。
- ii) 残留濃度のデータポイントが少なく、対数正規分布から外れる。これは、実際の数値を抽出して計算に使う方がよい可能性を示している。どちらにしても、2点では問題にならない。また、LOQ以下の数値をどう取り扱うかを決定する必要がある。
- iii) 今後、加工品も計算に入れるならば、加工係数が必要となる。
- iv) 基準値の適正さを見るのではなく、可能な最も高い摂取量を算出する方法を検討する。この場合は、摂食者だけでなく、すべての対象者を含めて、対象者をランダムに抽出し、各人の消費量を用いて計算するが、この場合もユニット重量と消費量の関係について検討する必要がある。
- v) 今回のスイカの例のように、調査の時期に由来する数値の偏り（季節変動）が見られるので、これを克服すべくデータ収集の方法に改良が必要である。

今後、農薬の種類や対象とする農作物を拡大し、わが国での適合可能性とより良い短期暴露の評価手法の開発に向けた検討が必要と考えられる。今回の検討結果及びそれに至るプロセスや、作成した資料及びデータベースについては、様々な活用・展開ができるであろう。

E. 結論

① 信頼性のある毒性評価結果および農作物中の残留濃度調査結果を基に、対象化学物質のリスク評価を行うことができた。

② 通常の試験検査では、農薬/食品の全てに一律0.01 mg/kgの定量下限を達成することは困難であるという結論が得られた。

③ i) 珪藻土カラムとC18カラムの連結カラムで脱脂後、シリカゲルカラム及びPSAカラムで精製し、GC/MS測定する簡便で迅速な食用植物油中の残留農薬GC/MS一斉分析法を開発した。簡便な操作で短時間で分析できることから、検査業務の効率化・迅速化が期待できる。

ii) スプリットレス注入法の数十倍の40 μ Lを注入可能な大量注入-GC/MS法を開発した。これを食用植物油中の残留農薬GC/MS一斉分析法に用いることにより、PSAカラム精製後の溶出液を濃縮せずにそのままGC/MS測定することができ、分析の迅速化及び簡便化を図ることができた。

iii) 製粉化穀類、果実果汁、乾燥果実及びトマト加工品中の残留農薬GC/MS一斉分析法について検討し、農薬を試料からアセトニトリル抽出し、塩析により水層を除いた後、非脂肪性食品についてはそのまま、脂肪性食品についてはC18カラムで精製後、トルエン添加-無水硫酸ナトリウムにより脱水後、ENVI-Carb II/PSAカラムで精製する方法を開発した。本法は、市販のカートリッジカラムなどを用い、特殊な装置などは使用しないので、実際の行政検査等での残留農薬分析にそのまま活用が可能である。

iv) SBSE法は攪拌子に用いる液相の制約から、極性の高い農薬に対しては回収率が低いほか、測定にTD-GC/MSを用いた場合には、熱に不安定な農薬は分解しやすい特徴があるが、濃縮操作無しに試料溶液に攪拌子を入れて攪拌するといった簡便な操

作のみで短時間で分析できるため、SBSE法の特徴を踏まえて利用すれば残留農薬分析の迅速化・効率化が期待できる。

v) 農薬分析に適したLP-GC条件及びMS/MS条件について検討し、両手法を組み合わせたLP-GC/MS/MS測定法を開発した。本法では測定時間が短縮できかつ選択性の高い分析が可能となり、測定の一層の迅速化・効率化が期待できる。

vi) SFE法を用いて抽出し、LP-GC/MS/MSで測定する方法は、試験溶液の調製から測定までの分析時間を大幅に短縮でき、製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法として適用可能であることが分かった。開発した方法は従来の溶媒抽出法と比較して迅速性及び簡便性において優れた方法であり、更に抽出操作の自動化が可能であるため、分析時間の有効活用、分析精度の向上及び個人差の低減が期待される。

④ Dual CCCを用いた試料調製法とLC/MS/MSを組み合わせた方法により、食用油、穀物粉、食パン中の9種のカーバメート系農薬分析法及び3種の有機リン系農薬分析法、水系GPCを用いた試料精製法とLC/MS/MSを組み合わせた方法により、乾燥果実、香辛料中のカーバメート系農薬29種類及び殺菌剤3種類の一斉分析法を開発した。Dual CCCを用いた試料調製法は、農薬と測定妨害物質が同じ出口から溶出することがなく、妨害物質の溶出時間を考慮する必要がないため、多数の検体を短時間で処理することが可能であった。また、安定同位元素標識体を内部標準に用いたLC/MS/MS分析は、加工食品中の農薬を簡易に前処理したのみで高感度かつ精度の高い分析を可能にした。

水系GPCを用いた試料精製法は、操作を自動化することが可能で、精製効率の高い試験溶液を得ることができた。また、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、分析操作の省力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夾雑物質を多量に含有する加工食品においても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、複雑なマトリックスを含有する加工食品を対象とした分析において、非常に有効な手段になると考えられる。

⑤ 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、農薬のARfD設定の国際間の比較を行い、相違点を明らかにした。

⑥ 残留農薬の暴露評価、特に短期暴露評価のための確率論的アプローチを行うためには、多食者における摂取量の情報が必要となることから以下の事項を行った。

- i) 国民健康・栄養調査データから利用可能な情報を出来るだけ活用し、暴露評価に特化した摂取量データベースを作成した。
- ii) 残留農薬濃度については、JMPRでARfDが設定されている農薬を選び、当該農薬をGAPの最大条件の下で施用した場合の残留濃度のデータを抽出した。
- iii) 食品摂取量及び各農作物の残留濃度のデータベースに基づいて、確率論的アプローチによるシミュレーションにより短期摂取量を推定した。それにより、わが国においてもシミュレーション手法が適用できることを確認した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomomi Goto, Yuko Ito, Sadaji Yamada, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka, Hisamitsu Nagase, Yoichiro Ito: High throughput analysis of N-methylcarbamate pesticides in

cereals and beans by dual countercurrent chromatography and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr.*, 29, 2651-2661, 2006.

2) 米谷民雄：食品中残留農薬等のポジティブリスト制導入と分析法の開発—厚生労働省・農林水産省・環境省による最近の農薬規制の改正について— *食品衛生学雑誌*, 46, J327-J334 (2005)

3) 米谷民雄：食品中残留農薬等のポジティブリスト制度施行に向けた試験法開発にあたって *食品衛生研究*, 56(4), 7-12 (2006)

2. 学会発表

1) 後藤智美、伊藤裕子、岡 尚男、永瀬久光：双方向高速向流クロマトグラフィーを前処理に用いた豆類及び穀類中のカーバメート系農薬のハイスループット分析 日本食品衛生学会第88回学術講演会 2004. 11. (広島)

2) 米谷民雄：農薬等のポジティブリスト制と分析法の検討 日本食品科学工学会第52回大会 2005. 8. (札幌)

3) 藤井紘子、齋藤京子、草間かおる、由田克士、吉池信男：複数日の食物摂取量調査にみられる季節変動—食品群別摂取量に着目して— 第64回日本公衆衛生学会 2005. 9. (札幌),

4) 伊藤裕子、後藤智美、山田貞二、松本浩、岡 尚男、伊東洋一郎：双方向高速向流クロマトグラフィーを前処理に用いた食品中の有機リン系農薬分析法の基礎的検討 日本食品衛生学会第90回学術講演会 2005. 10. (大宮)

5) 米谷民雄：食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度の役割と進捗状況 日本分析化学会第271回ガスクロマトグラフィー研究会 2005. 12. (東京)

6) 石脇亜紗子、藤井紘子、齋藤京子、野末みほ、由田克士、吉池信男：食品中の化

学物質の急性暴露評価のための特定食品の“多食者”の把握 第60回日本栄養・食糧学会大会 2006. 05. (静岡)

7) 寺田久屋、野口昭一郎、丸山吉正、加藤陽康、岡 尚男：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 日本食品衛生学会第92回学術講演会 2006. 10. (春日井)

8) 根本 了、山口 拓、佐々木久美子、米谷民雄：GC/MSによる食用植物油中の残留農薬一斉分析法 日本食品衛生学会第92回学術講演会 2006. 10. (春日井)

9) 根本 了、山口 拓、佐々木久美子、米谷民雄：GC/MSによる加工食品中の残留農薬一斉分析—製粉化穀類、果実果汁、乾燥果実及びトマト加工品について— 第43回全国衛生化学技術協議会年会 2006. 11. (米子)

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. 食用油からのカーバメート系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Sesami oil		Olive oil		Rape seed oil	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Aldicarb	0.5	85	3.2	80	6.5	91	5.3
	0.1	80	4.7	85	4.8	91	5.8
Aldicarb sulfoxide	0.5	118	1.6	108	1.2	111	3.0
	0.1	115	1.1	102	4.6	99	4.9
Aldicarb sulfone	0.5	111	2.8	114	2.2	111	2.9
	0.1	98	2.2	102	8.3	92	1.7
Methiocarb	0.5	103	6.7	96	1.8	92	2.8
	0.1	101	2.4	86	3.9	78	7.9
Pirimicarb	0.5	115	1.2	101	2.5	109	3.1
	0.1	97	3.0	97	5.5	106	2.6
Carbaryl	0.5	106	1.9	102	2.4	105	2.2
	0.1	100	2.0	92	1.6	95	1.7
Methomyl	0.5	105	2.7	96	2.0	103	3.7
	0.1	98	2.0	100	7.7	94	3.1
Fenobucarb	0.5	103	2.2	97	2.7	104	1.8
	0.1	91	3.0	92	1.7	98	2.0
Oxamyl	0.5	107	7.3	100	4.5	95	6.7
	0.1	95	12.8	94	7.1	79	9.0

Table 2. 穀物粉からのカーバメート系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Wheat flour		Rye flour		Whole wheat flour	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Aldicarb	0.1	85	4.1	99	0.7	92	0.5
	0.01	99	1.7	116	4.9	94	1.9
Aldicarb sulfoxide	0.1	90	4.0	97	1.9	90	2.3
	0.01	84	7.4	60	4.2	90	1.2
Aldicarb sulfone	0.1	104	5.4	104	3.3	86	2.0
	0.01	103	7.8	93	9.4	100	6.9
Methiocarb	0.1	69	3.7	66	2.0	52	6.4
	0.01	74	2.6	79	6.3	66	3.9
Pirimicarb	0.1	104	2.9	107	1.6	122	1.8
	0.01	101	5.6	87	4.2	110	5.8
Carbaryl	0.1	99	2.5	99	2.8	98	4.5
	0.01	105	2.7	105	2.0	101	2.8
Methomyl	0.1	100	2.8	104	1.9	101	2.3
	0.01	102	3.0	102	4.6	99	3.5
Fenobucarb	0.1	97	1.1	100	1.3	97	0.7
	0.01	101	1.4	107	1.7	100	1.7
Oxamyl	0.1	93	3.6	106	4.1	90	5.3
	0.01	110	6.3	69	1.3	90	6.5

Table 3. 食パンからのカーバメート系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	White bread		Rye bread		Whole wheat bread	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Aldicarb	0.5	76	8.1	78	1.9	77	3.5
	0.1	76	5.9	78	6.9	88	4.8
Aldicarb sulfoxide	0.5	100	10.6	107	2.2	90	1.4
	0.1	100	2.7	97	4.6	100	3.7
Aldicarb sulfone	0.5	116	4.4	110	2.5	101	3.4
	0.1	117	0.9	123	5.4	123	1.8
Methiocarb	0.5	92	11.4	85	5.5	81	4.2
	0.1	89	2.8	102	5.7	96	4.9
Pirimicarb	0.5	109	2.9	109	3.9	116	0.9
	0.1	109	2.4	100	2.3	99	3.6
Carbaryl	0.5	104	1.2	102	1.1	98	1.2
	0.1	106	1.8	108	2.7	112	4.4
Methomyl	0.5	104	3.5	103	2.3	103	1.3
	0.1	113	1.3	103	1.2	118	4.0
Fenobucarb	0.5	100	1.8	99	1.2	101	1.3
	0.1	104	1.3	107	1.9	106	4.4
Oxamyl	0.5	101	4.6	97	2.1	102	2.3
	0.1	137	3.1	100	4.1	106	5.0

Table 4. 食用油からの有機リン系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Rape seed oil		Olive oil		Soybean oil	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Methamidophos	0.5	99	6.3	98	2.1	95	2.3
	0.1	94	1.8	95	3.4	96	3.4
Acephate	0.5	103	1.1	102	1.7	100	3.1
	0.1	99	1.5	100	1.6	100	1.7
Dimethoate	0.5	91	5.8	85	3.6	95	3.2
	0.1	102	6.7	105	6.1	101	7.8

Table 5. 穀物粉からの有機リン系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Wheat flour		Rye flour		Whole wheat flour	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Methamidophos	0.05	103	5.4	93	1.9	95	3.4
	0.01	78	3.4	88	6.6	107	3.7
Acephate	0.05	103	3.8	98	1.4	111	2.4
	0.01	104	5.2	101	6.1	100	6.0
Dimethoate	0.05	113	5.2	108	7.4	109	5.0
	0.01	107	10.4	92	5.1	108	3.8

Table 6. 食パンからの有機リン系農薬の添加回収試験結果

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	White bread		Rye bread		Whole wheat bread	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Methamidophos	0.5	70	8.4	64	3.1	67	2.7
	0.05	62	0.9	65	2.9	65	2.9
Acephate	0.5	86	1.4	100	1.1	102	1.1
	0.05	97	1.5	89	1.0	97	4.5
Dimethoate	0.5	92	4.1	91	7.4	87	4.4
	0.05	110	4.2	101	4.0	97	3.3

Table 7. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の添加回収試験結果 (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
Isoprocarb	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 7. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の添加回収試験結果 (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 7. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の添加回収試験結果 (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 8. 味噌及びしょう油からの農薬の添加回収試験結果 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
Iprovalicarb	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

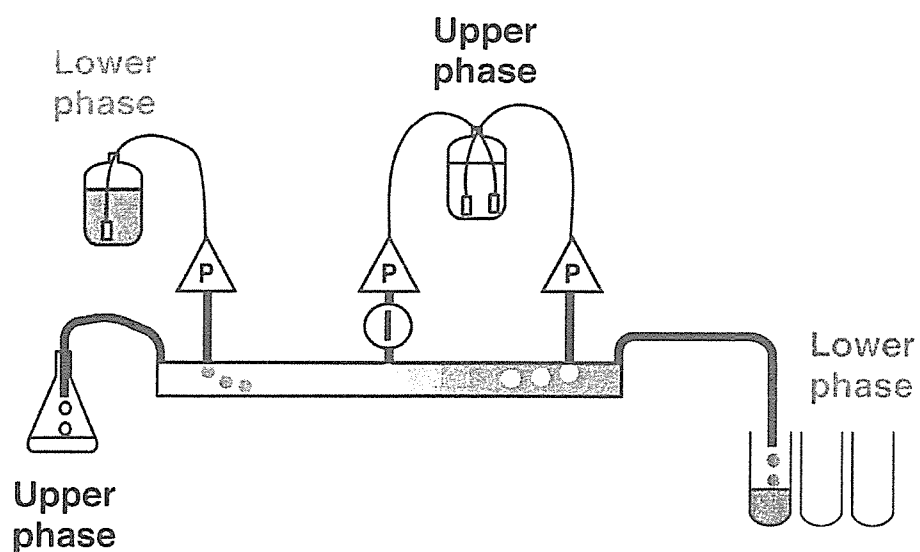


Fig. 1 Dual CCC システム

Sample 10 g
 add internal standard
 homogenize with 100 ml of ethyl acetate
 centrifuge (3100 rpm, 5 min)
 evaporate
 make up to 5 ml with ethyl acetate
Dual CCC
Acetonitrile layer (3~8 min)
 evaporate
 dissolve in 0.5 ml of 1 % methanol
Test solution
ESI LC/MS/MS

Fig. 2 食用油、穀物粉、食パン中のカーバメート系農薬及び有機リン系農薬分析法の操作法

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 μ m PTFE フィルター)
ろ液 (300 μ 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 μ L
かく拌 (超音波洗浄器)
遠心ろ過 (0.22 μ m) 12000 rpm
ろ液
|
LC/MS/MS 5 μ 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 μ m PTFE フィルター)
ろ液 (300 μ 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 μ L
かく拌 (超音波洗浄器)
遠心ろ過 (0.22 μ m) 12000 rpm
ろ液
|
LC/MS/MS 5 μ L

Fig. 3 乾燥果実、香辛料中のカーバメート系農薬及び殺菌剤の一斉分析法の操作法

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 RBC ChE 活性の阻害
	EU	2005	0.1	100	10	ラット急性、遅延性神経毒性試験
	USEPA	2000	0.005	100	0.5	ラット単回投与試験 血漿、RBC ChE 活性の阻害
	Australia	2000	0.1	10	1	ヒトの単回投与試験 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

Fenthion	JMPR	1997	0.01	100	1	ラット単回投与 脳 ChE 活性阻害
	USEPA	1999	0.0007	100	0.07	サル1週間投与 血漿 ChE 活性の阻害
	Australia	2000	0.007	10	0.07	ヒトの28日間試験 ChEに影響無し
Phosmet	JMPR	2003	0.2	10	2	ヒト RBC ChE 活性阻害
	EU	2006	0.045	100	4.5	ラット急性神経毒性試験 RBC、脳 ChE 活性の阻害
	USEPA	2000	0.045	100	4.5	ラット急性神経毒性試験 血漿、RBC、脳 ChE 活性の阻害
Methamidophos	JMPR	2002	0.01	25	0.3	ラット急性神経毒性試験 RBC、脳 ChE 阻害
	EU	不明	0.003	不明	不明	不明
	USEPA	2000	0.001	300 (FQPA*x3)	0.3	ラット急性神経毒性試験 血漿、RBC、脳 ChE 活性の阻害
	Australia	2004	0.003	100	0.3	ラット急性神経毒性試験 血漿、RBC、脳 ChE 活性の阻害

Malathion	JMPR	2003	2	10	20	ヒト RBC ChE 活性阻害
	EU	2006	0.3 1.5	100 10	30 15	動物 ヒト
	USEPA	2000	0.5	100	50	ウサギ発生毒性試験、母動物への毒性

*FQPA : 食品品質保護法(Food quality protection act)の安全係数 (×1,3 または 10)

研究成果の刊行に関する一覧表
及び 刊行物・別刷り

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Tomomi Goto, Yuko Ito, Sadaji Yamada, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka, Hisamitsu Nagase, Yoichiro Ito	High Throughput Analysis of N-Methyl Carbamate Pesticides in Cereals and Beans by Dual Countercurrent Chromatography and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry	Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies	29	2651-2661	2006
2	米谷民雄	食品中残留農薬等のポジティブリスト制導入と分析法の開発—厚生労働省・農林水産省・環境省による最近の農薬規制の改正について—	食品衛生学雑誌	46(6)	J327-J334	2005
3	米谷民雄	残留農薬等のポジティブリスト制度施行に向けた試験法開発にあたって	食品衛生研究	56(4)	7-12	2006

High Throughput Analysis of N-Methyl Carbamate Pesticides in Cereals and Beans by Dual Countercurrent Chromatography and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Tomomi Goto, Yuko Ito, Sadaji Yamada, and Hiroshi Matsumoto

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, Japan

Hisao Oka

Faculty of Pharmacy, Kinjo Gakuin University, Moriyama-ku, Nagoya, Japan

Hisamitsu Nagase

Gifu Pharmaceutical University, Mitahora-higashi, Gifu, Japan

Yoichiro Ito

Center for Biochemistry and Biophysics, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Abstract: We developed a new analytical method for analysis of N-methyl carbamate pesticides in cereals and beans using dual counter-current chromatography (dual CCC) and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI LC/MS/MS). After pesticides were extracted from cereals and beans with ethyl acetate, each extract was cleaned up by dual CCC using a non-aqueous binary solvent system composed of n-hexane-acetonitrile and analyzed by ESI LC/MS/MS with a short column. The average recoveries from cereals and beans fortified at the level of 0.01 ppm ranged from 73.9 to 119.6%, with the coefficients of variation from 0.7 to 6.8%. At the fortified level of 0.5 ppm, the recoveries ranged from 72.1

Address correspondence to Tomomi Goto, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan. E-mail: tomomi_3_gotou@pref.aichi.lg.jp

to 117.1% with coefficients of variation from 0.4 to 9.3%. The present analytical method of N-methyl carbamate pesticides in cereals and beans is considered to be useful for monitoring the pesticide residues in cereals and beans.

Keywords: High throughput analysis, N-Methyl carbamate pesticides, Beans, Cereals, Dual CCC, ESI LC/MS/MS

INTRODUCTION

N-Methyl carbamate pesticides are used for combatting a variety of pests throughout the world, and have been often found in agricultural products.^[1-4] Therefore, it is one of the most important roles for a public health agency to always inspect residues in foods. The analytical method used in the inspection is required to be simple and rapid.

In the past, we reported a simple and rapid method based on ESI LC/MS/MS, without a sample clean-up step, for the determination of nine N-methyl carbamate pesticides, shown in Fig. 1, in juice, wine, fruits, and vegetables.^[5,6] However, the samples we examined in our previous reports did not contain an aliphatic sample matrix that interferes with the analysis, and the method could not be applied to cereal and bean samples that contain the aliphatic sample matrix. Therefore, we considered that the clean-up step was needed for determination of these pesticides in these samples. The most widely used sample clean-up methods include liquid-liquid partitioning using a separatory funnel, prepacked cartridge, gel permeation chromatography, etc. However, these methods involve time-consuming processes that require skillful techniques.

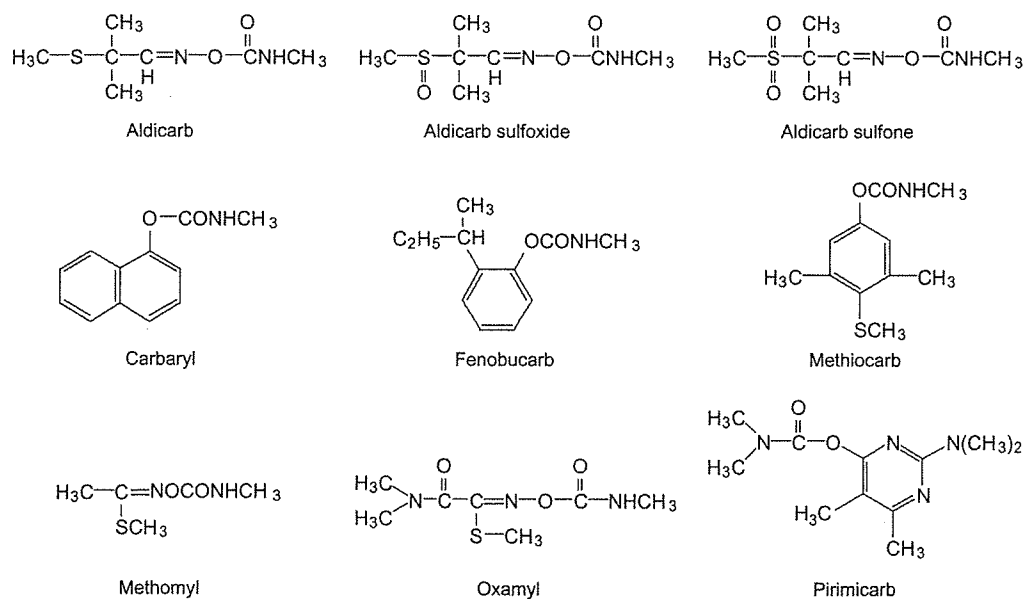


Figure 1. Chemical structures of N-methyl carbamate pesticides.