

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
「水道水質検査における対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定の  
農薬類の分析法開発」  
分担研究報告書

## カルタップの分析法開発

研究分担者	高木総吉	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
研究協力者	吉田 仁	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
研究分担者	小泉義彦	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課

### 研究要旨

対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のカルタップの分析法開発を行った。水試料中のカルタップ分析方法として、カルタップの分解物であるネライストキシンを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）により直接定量する方法を開発した。カルタップの類縁化合物であるベンスルタップとチオシクラムは、本法ではネライストキシんに分解されなかった。そのため、本法で得られたネライストキシン濃度はカルタップ由来と判断できると考えられた。カルタップの目標値である 0.3mg/L の 1/100 である 0.003 mg/L に対応するネライストキシン濃度 0.0019 mg/L で水道水試料および河川水試料を対象に妥当性試験を実施したところ、真度、併行精度および室内精度のいずれも良好な結果を示した。

## A. 研究目的

本研究では、対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のカルタップの分析法を開発することを目的とした。水試料中のカルタップ分析方法として、カルタップの分解物であるネライストキシンを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) により直接定量する方法について、検討した。

また、平成 25 年 10 月から「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」が適用されたことにより(厚生労働省 2012) 機器分析による全ての水道水質検査において、分析精度がガイドラインの目標を満たすかどうかを確認する必要がある。そこで、本研究では、同ガイドラインに従った妥当性評価を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 対象物質

カルタップは昆虫体内で活性体のネライストキシンに変化し、中枢神経節においてアセチルコリン受容体と結合し、神経伝達を遮断することにより殺虫作用を示す(日本植物防疫協会, 2011)。カルタップの類縁化合物としてベンスルタップおよびチオシクラムが農薬登録を受けている。カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの基本的情報をそれぞれ表 1~3 に示す(日本植物防疫協会, 2011)。

表 1. カルタップの基本的情報

化学名	1,3-ビス (カルバモイルチオ) -2- (N,N-ジメチルアミノ) プロパン塩酸塩
分子式	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
分子量	273.8
CAS NO.	15263-52-2
外観・臭気	白色粉末, 無臭
融点	187.8
沸点	-
蒸気圧	2.5 × 10 <sup>-5</sup> Pa (25 )
水溶解度	約 200 g/L (25 )
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	測定不能
密度	-
安定性	熱: 150 以下で安定。加水分解性: 酸性で安定, 中性およびアルカリ性で分解

**表 2. ベンスタップの基本的情報**

化学名	S,S'-2-ジメチルアミノトリメチレン=ジ (ベンゼンチオ スルホナート)
分子式	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> S <sub>4</sub>
分子量	431.6
CAS NO.	17606-31-4
外観・臭気	類白色結晶性粉末
融点	83 ~ 84
沸点	-
蒸気圧	< 1 × 10 <sup>-5</sup> Pa (20 °C)
水溶解度	0.448 mg/L (25 °C)
土壤吸着係数	-
オクタノール/水分配係数	log Pow = 2.28 (25 °C)
密度	-
安定性	熱: 150 °C 以下で安定。加水分解性: 酸性で安定, 中性 およびアルカリ性で不安定

**表 3. チオシクラムの基本的情報**

化学名	5-ジメチルアミノ-1,2,3-トリチアンシウ酸塩
分子式	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S <sub>3</sub>
分子量	271.4
CAS NO.	31895-22-4
外観	白色粉末
融点	131.6 ± 0.5 °C (分解)
沸点	融解時に分解するため測定不能
蒸気圧	6.2 × 10 <sup>-7</sup> Pa (25 °C)
水溶解度	16.4 g/L (20 °C, pH6.8)
土壤吸着係数	K <sub>oc</sub> = 292 ~ 739 (25 °C)
オクタノール/水分配係数	log Pow = - 0.0706 (23 °C)
密度	-
安定性	熱: 50 °C まで安定。加水分解性: 安定 (pH4) 92 日 (pH7), 安定 (pH9)

## 2. 標準品・試薬

### (1) 精製水

Direct-Q ( Millipore 製 ) により精製して得られたものを使用した。

### (2) アセトニトリル, メタノールおよびギ酸

和光純薬工業 ( 株 ) 製の LC/MS 用の規格品を使用した。

- (3) アンモニア水  
関東化学（株）製の鹿1級品を使用した。
- (4) アスコルビン酸ナトリウム  
和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。
- (5) カルタップ塩酸塩  
和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。
- (6) ベンスルタップ  
和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。
- (7) ネライストキシンしゅう酸塩  
和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。
- (8) チオシクラムしゅう酸塩  
Sigma-Aldrich 社製の製品を使用した。

### 3. 標準原液の調製

ネライストキシンしゅう酸塩を一定量を正確に秤量し、ネライストキシンとして 500 mg/L になるようにメタノールを加えて標準原液を調製した。カルタップ塩酸塩を一定量正確に秤量し、カルタップとして 500 mg/L になるように 1%ギ酸メタノールを加えて標準原液を調製した。ベンスルタップの一定量を正確に秤量し、500 mg/L になるように 1%ギ酸アセトニトリルを加えて調製した。チオシクラムしゅう酸塩の一定量を正確に秤量し、チオシクラムとして 500 mg/L になるように 1%ギ酸メタノールを加えて標準原液を調製した。

### 4. 標準系列の作成

検量線は、化合物ごとに調製した標準系列を測定して作成した。ネライストキシンは、メタノールで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0.0005 mg/L に調製したものをを使用した。なお、ネライストキシンの妥当性評価の際の標準系列は、0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0.0005 mg/L とした。カルタップおよびチオシクラムは、1%ギ酸メタノールで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/L に調製したものをを使用した。ベンスルタップは、1%ギ酸アセトニトリルで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/L に調製したものをを使用した。ネライストキシンは、精製水に希釈した標準系列とメタノールに希釈した標準系列の感度が同等であったことを確認した上で安定性の高いメタノールを希釈溶媒として採用した。ベンスルタップおよびチオシクラムは、精製水で調製した標準系列と 1%ギ酸アセトニトリルもしくは 1%ギ酸メタノールで調製した標準系列の感度が同等であったことを確認した上で安定性の高い 1%

ギ酸アセトニトリルおよび 1%ギ酸メタノールを希釈溶媒として採用した。カルタップは、精製水で調製すると即時に分解したため 1%ギ酸メタノールを希釈溶媒として採用した。

## 5. 分析条件の最適化

調製したネライストキシシン，カルタップ，ベンスルタップおよびチオシクラムの標準液を用いて LC-MS/MS (API-3000, AB Sciex) の分析条件の検討を行った。最初に，各農薬の個別標準液を用いて，スキャンモードにより各農薬の最も強度の強いイオンを SRM モードにおけるプリカーサイオンとして選択した。次に，選択したプリカーサイオンから得られるプロダクトイオンのスキャンを行い，最も強度の強いイオンを選択した。そして，各農薬のモニターイオンを決定後，LC-MS/MS の分析条件を検討した。その結果を表 3 に示す。

表 3. LC-MS/MS 分析条件

HPLC 装置条件	
機種	Agilent 1100 ( アジレント )
カラム	Ascentis Si (2.1 mm × 150 mm, 5μm) (Supelco)
移動相	0.1%ギ酸溶液：アセトニトリル = 40：60
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40
サンプルクーラー温度	4
注入量	2 μL
MS/MS 装置条件	
機種	API-3000 ( AB Sciex )
イオン化法	ESI-Positive
測定モード	SRM
イオン化法	EI 法
モニターイオン ( m/z )	ネライストキシシン：150 > 105 カルタップ：238 > 73 ベンスルタップ：432 > 105 チオシクラム：182 > 137

## 6. カルタップ ,ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水中における安定性の確認

カルタップ，ベンスルタップおよびチオシクラムの水中での安定性を明らかにするために，以下の方法で確認した。化合物ごとに精製水 50 mL を用意し，カルタップ，ベンスルタップもしくはチオシクラムの 500 mg/L 標準原液を 0.1 mL 添加して 1.0 mg/L 水溶液とした。添加直後から 1 時間ごとに 48 時間の連続測定を実施し，ネライストキシシン，カルタップ，ベンスルタップおよびチオシクラム濃度を定量した。定量した値をモル換算した後，ネライストキシシンとの比を算出した。

## 7. ベンスルタップおよびチオシクロラムのpH変動時におけるネライストキシン生成量

水試料中においてベンスルタップもしくは、チオシクロラムがネライストキシンへ変化してしまうと、カルタップの分析方法としてネライストキシンを測定することが困難になることが予想されたため、以下の方法で確認した。水道法は、pH の基準値を 5.8 以上 8.6 以下と定めている。そこで 0.1% アンモニア添加精製水にギ酸を加えて pH5, 6, 7, 8, 9 の水溶液を調製した。化合物ごとに pH 調整済み水溶液を用意し、ベンスルタップもしくはチオシクロラムの 500 mg/L 標準原液を 0.1 mL を添加して 1.0 mg/L 水溶液を調製し、0, 18, 24, 48 時間後のネライストキシン量を定量してベンスルタップおよびチオシクロラムとのモル比を算出した。

## 8. ネライストキシンの装置の検出下限値、装置の定量下限値および妥当性評価

ネライストキシンの装置の検出下限値 (IDL) および装置の定量下限値 (IQL) を検量線の最低濃度である 0.0005 mg/L 溶液の標準偏差から算出した (環境省, 2009)。

妥当性試験において、浄水には当所に給水されている水道水を、原水として大阪府の大規模水道水源である淀川の河川水を使用した。ネライストキシンおよびカルタップの分子量はそれぞれ 149 および 237 である。そのため、ネライストキシンからカルタップへの換算係数は、1.59 となる。ネライストキシンの添加濃度は、カルタップの目標値である 0.3 mg/L の 1/100 である 0.0030 mg/L を 1.59 で除して 0.0019 mg/L とした。浄水はアスコルビン酸ナトリウムで残留塩素を消去した後に、原水はガラスフィルターで浮遊物質をろ過した後にネライストキシンを添加した。この添加試料を最適化した分析条件を用いて、検査試料水および空試験用試料水の 2 μL を LC-MS/MS に注入し、各農薬のピーク面積および S/N 比を求めた。各農薬の添加試料中のモニターイオンのピーク面積から、空試験試料中のピーク面積を差し引いた後、作成した検量線を用いて添加試料中の各農薬の濃度を求めた。厚生労働省の示す妥当性ガイドラインに則り (厚生労働省 2012)、真度と併行精度および室内精度として相対標準偏差 (RSD) を求めた。妥当性評価では、2 人がそれぞれ 1 日 1 回 2 並行で 3 日間実施した。真度および RSD は (1) および (2) から算出した。

$$\text{真度}(\%) = (C - C_0) / C_{ad} \times 100 \quad (1)$$

C : 添加試料中濃度

C<sub>0</sub> : 無添加試料中濃度

C<sub>ad</sub> : 添加濃度

$$\text{RSD}(\%) = \text{SD} / \text{Av} \times 100 \quad (2)$$

SD : 標準偏差

Av : 平均値

表 4 に、検査試料水におけるネライストキシンの添加濃度と、検量線の濃度範囲についてまとめた。

表 4. ネライストキシンの添加濃度と検量線範囲との関係

名称	目標値 (mg/L)*	添加濃度 (mg/L)	検量線の範囲 (mg/L)				
			1	2	3	4	5
ネライストキシン	0.19	0.0019	0.0005	0.001	0.002	0.005	0.01

\*カルタップの目標値0.3mg/Lから算出した。

## C. 結果と考察

### 1. カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における安定性の確認

カルタップ、ベンスルタップおよびカルタップの水中における動態を明らかにすることを目的に、カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における安定性を算出した結果を図 1 に示した。

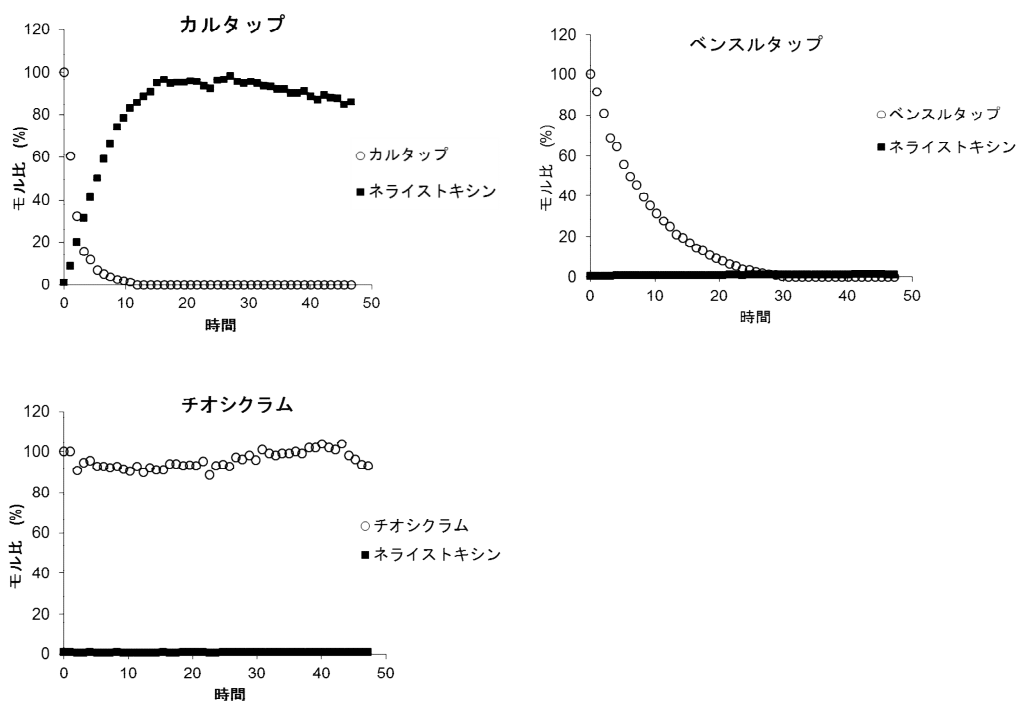


図 1. カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における分解の挙動

カルタップは、継時的に濃度が減少し、12 時間で添加量の 1% 未満に減少した。一方、ネライストキシン濃度は増加し、14 時間でほぼすべてのカルタップがネライストキシニンに分解された。ベンスルタップは、継時的に濃度が減少し、29 時間で 1% 未満に減少したが、カルタップと異なりネライストキシン濃度は増加しなかった。チオシクラムは、48 時間経過しても 93% が残存し、ネライストキシン濃度は、増加しなかった。

カルタップは、対象農薬リスト掲載農薬、ベンスルタップおよびチオシクラムはそ

の他農薬に分類されている．そのため，アルカリ分解で3種の農薬すべてをネライストキシンとして分析する食品分野の方法（厚生労働省，2005）よりも，カルタップをベンスルタップおよびチオシクラムとは別に評価できる分析法が有用と考える．本研究の結果より，検水をアルカリ分解することなく，直接 LC-MS/MS で測定してネライストキシンをカルタップの代替として定量することにより，カルタップのみを評価することが可能と考えられた．

## 2. ベンスルタップおよびチオシクラムの pH 変動時におけるネライストキシン生成

水道水の pH は 5.8 以上 8.6 以下と定めており，その変動内でベンスルタップもしくはチオシクラムからネライストキシンが生成されるとカルタップの正確な評価が困難となる．そこで，pH5，6，7，8，9 におけるベンスルタップおよびチオシクラムからのネライストキシン生成量を算出し，図 2 に示した．

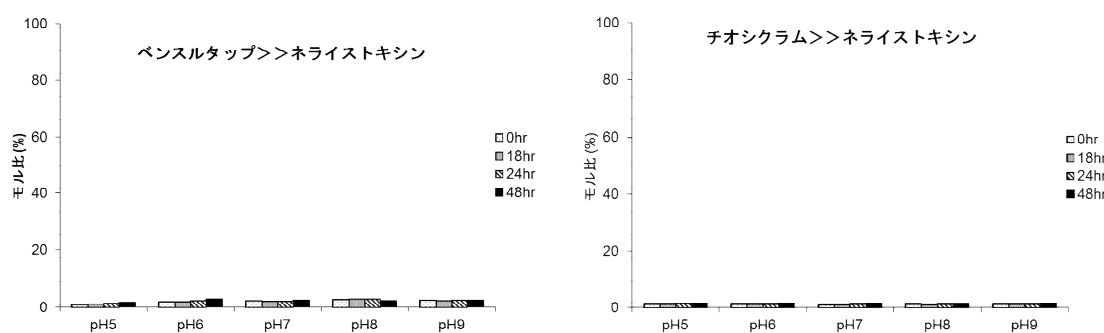


図 2. ベンスルタップおよびチオシクラムの pH 変動時におけるネライストキシンの生成割合

その結果，pH5 から 9 の間で 48 時間経過してもベンスルタップもしくはチオシクラムからネライストキシンは，ほとんど生成されなかった．したがって，ベンスルタップとチオシクラムは水道水中の pH ではネライストキシン量に影響を与えないことが確認できたため，水道水から検出されたネライストキシンは，カルタップ由来と判断できると考えられた．

## 3. 分析法の妥当性評価

本研究では水道水中のカルタップの検査方法として，ネライストキシンの LC-MS/MS による直接定量が適当と考え，ネライストキシンの妥当性試験を実施した．はじめに，ネライストキシンの IDL および IQL を算出したところ，IDL が 0.000032 mg/L，IQL が 0.000087 mg/L となった．この値は，カルタップの目標値の 1/100 である 0.003 mg/L に対応するネライストキシン濃度 0.0019 mg/L と比べて十分に低い値となった．ネライストキシンのクロマトグラムを図 3 に，妥当性試験の結果を表 5 に示した．

浄水試料における真度および室内精度はそれぞれ 81.9% および 3.6% となった．原水試料における真度および室内精度はそれぞれ 88.2% および 2.3% となった．浄水，



原水試料ともにガイドラインの基準を満たしたため、本分析法は、水道水および水道原水中カルタップ検査として有用と考えられた。

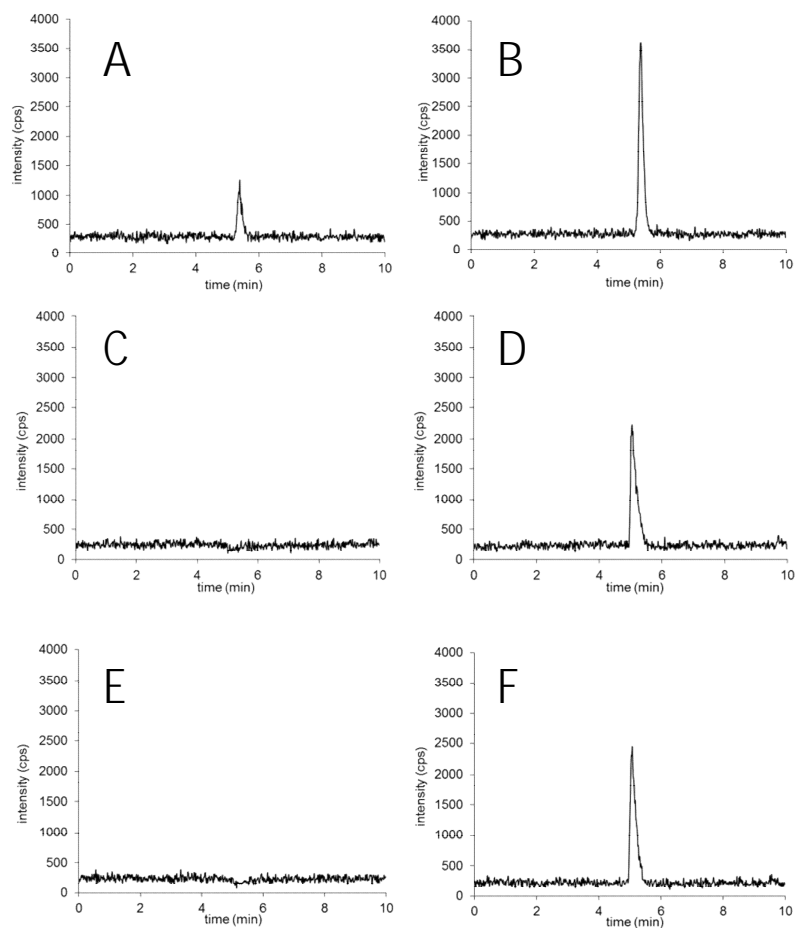


図3. ネライストキシンのクロマトグラム A;標準 0.0005 mg/L B;標準 0.0019 mg/L , C ;水道水 , D ;標準 0.0019 mg/L 添加水道水 , E ;河川水 , F;標準 0.0019 mg/L 添加水道原水 .

表 5. ネライストキシンの妥当性試験結果

	真度 (%) 作業者A					
	精製水	水道水 <sup>1)</sup>	河川水 <sup>2)</sup>	精製水	水道水 <sup>1)</sup>	河川水 <sup>2)</sup>
	92.6	97.9	98.9	100.5	105.3	106.8
	88.4	80.5	82.1	82.1	83.2	77.9
	88.4	86.8	88.9	90.5	85.3	87.4

	真度 (%) 作業者B					
	精製水	水道水 <sup>1)</sup>	河川水 <sup>2)</sup>	精製水	水道水 <sup>1)</sup>	河川水 <sup>2)</sup>
	102.1	100.5	103.2	100.5	98.9	93.7
	78.9	78.4	85.3	82.1	81.6	82.6
	88.9	89.5	91.6	87.4	84.7	88.9

	作業者A		作業者B		真度 (%)	室内精度 (%)
	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)		
精製水	101.1	5.1	99.8	3.3	100.1	4.2
水道水 <sup>1)</sup>	82.9	4.2	81.5	3.1	81.9	3.6
河川水 <sup>2)</sup>	88.3	2.0	88.5	2.6	88.2	2.3

<sup>1)</sup> アスコルビン酸ナトリウムで残留塩素を消去したものを使用した

<sup>2)</sup> フィルターろ過したものを使用した

水道水のネライストキシン分析の留意点として、ネライストキシンは残留塩素やアスコルビン酸ナトリウムにより継時的に分解されることがわかった。残留塩素の消去を行っていない水道水にネライストキシンを添加したところ、2 時間でピークが消失した。水道水におけるネライストキシンの妥当性試験を実施する際には、残留塩素をあらかじめ定量的に消去した後、速やかに試験を実施することが重要であった。

## D. 結論

水試料中のカルタップ検査方法として、その分解物であるネライストキシンを LC-MS/MS により直接定量することが有用であった。本方法は、カルタップの類縁化合物であるベンスルタップとチオシクロラムの影響を受けることなくカルタップ濃度を評価できると考えられた。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## **G. 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. 実用新案特許**

なし

### **3. その他**

なし

## **H. 参考文献**

環境省 (2009) 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版).

厚生労働省 (2005) 食品に残留する農薬、試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法、食安発第 0124 第 1 号 (平成 17 年 1 月 24 日).

厚生労働省 (2012) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて、健水発 0906 第 1 号 (平成 24 年 9 月 6 日).

日本植物防疫協会 (2011) 農薬ハンドブック 2011 年版.