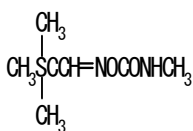


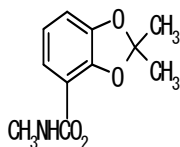
食品中の尿素系農薬の分析

北九州市環境科学研究所

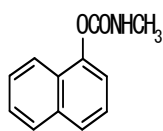
花田喜文、樋口雅之



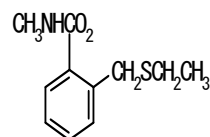
Aldicarb



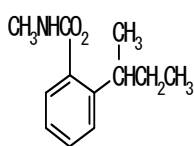
Bendiocarb



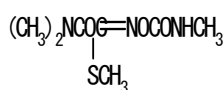
Carbaryl



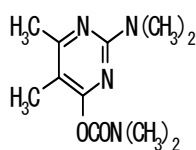
Ethiofencarb



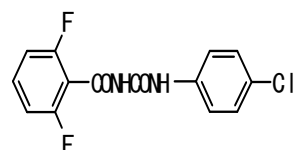
Fenobucarb



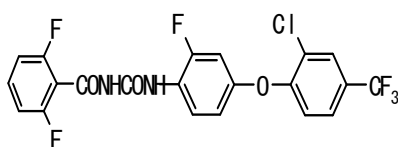
Oxamyl



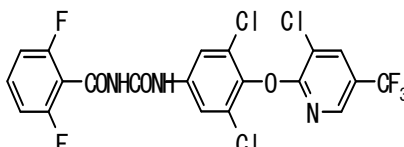
Pirimicarb



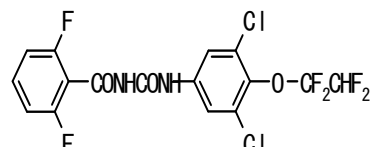
Chlorfluazuron



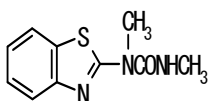
Diflubenzuron



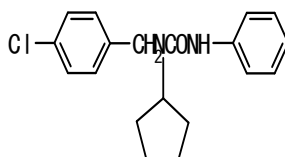
Flufenoxuron



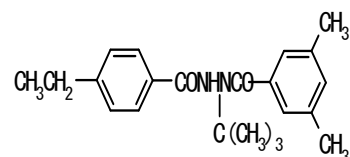
Hexaflumuron



Methabenzthiazuron



Pencycuron



Tebufenozide

1. はじめに

現在、食品衛生法に基づく「食品・添加物の規格基準」（昭和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号）によって、229 種類の農薬について基準値が定められている。さらに、今後、ポジティブリスト制の導入に伴い、対象農薬はさらに増加することが予測される。これらの農薬を告示分析法を用いて個々に分析することは実務上非常に困難であり、そのため、スクリーニング法として、多種類の農薬を迅速に一齐分析できる方法が求められている。現在までのところ多成分一齐分析法の多くは、検出に GC 法または GC/MS 法を採用しており^{1)～4)}、難揮発性農薬や熱に不安定な農薬については測定が困難である。また、このような

農薬の分析に一般に用いられている HPLC-UV 法は、GC/MS 法に比べ感度と選択性が十分でないため、夾雑物の多い食品試料を分析する際には、精製操作が必要となり、分析操作を煩雑にしてしまう。そのため、簡易な前処理で多数の難揮発性農薬や熱に不安定な農薬の分析が可能な、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いた農薬の一斉分析法の開発が望まれている。

N-メチルカルバメート系農薬は、コリンエステラーゼ阻害作用を有する殺虫剤で、告示分析法ではポストカラム誘導体化 HPLC 法が採用されている。この方法は、感度が高く実用的に優れているが、精製操作をほとんど行わないため、柑橘類等、農産物によっては、試料由来の妨害ピークが多数出現し、測定が困難になるという欠点がある。また、尿素系農薬は、キチン合成阻害作用を有する殺虫剤で、告示分析法では HPLC-UV 法が採用されているが、前処理が煩雑で、分析に長時間を要する。そこで、日常の監視業務の効率化を目的として、N-メチルカルバメート系農薬 7 種類および尿素系農薬 7 種類、合計 14 種類について、LC/MS によるスクリーニング法を検討したところ、良好な結果を得たので報告する。

2. 分析法

2. 1 試料

北九州市内で市販されている玄米、キャベツ、ニンジンおよびレモンを対象として検討した。

2. 2 試薬および標準品

農薬標準品：アルジカルブ 林純薬工業製、エチオフェンカルブ 関東化学製、オキサミル 和光純薬工業製、カルバリル 関東化学製、ピリミカルブ 林純薬工業製、フェノブカルブ 関東化学製、ベンダイオカルブ 林純薬工業製(以上 N-メチルカルバメート系)、クロルフルアズロン 林純薬工業製、ジフルベンズロン 林純薬工業製、テブフェノジド 和光純薬工業製、フルフェノクスロン 関東化学製、ヘキサフルムロン 林純薬工業製、ペンシクロン 関東化学製、メタベンズチアズロン 林純薬工業製(以上尿素系)の残留農薬試験用農薬標準品を用いた。

標準混合容液：標準品 20mg を精ひょうし、N-メチルカルバメート系農薬はアセトニトリル 20 mL に、尿素系農薬はメタノール 20mL に溶解して標準原液を調製した。各標準原液を混合し、メタノールを加えて各農薬が 10 μ g/mL の混合溶液を作製した。

各種有機溶媒：アセトン、n-ヘキサン、ジクロロメタン、アセトニトリルは和光純薬工業製の残留農薬分析用を用いた。メタノールは和光純薬工業製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。

水：精製水を Milli-Q 超純水装置 (日本ミリポア (株) 社製) により精製して用いた。

ろ紙：アドバンテック東洋(株)社制定量ろ紙 No. 5A (60mm) を用いた。

メンブランフィルター：日本ミリポア(株)社製マイレックス LH (0.45 μ m, 25mm i. d.) を用いた。

その他の試薬：試薬特級品を用いた。

2. 3 装 置

高速液体クロマトグラフ/質量分析計：日本ウォーターズ（株）社製 Alliance LC/MS システム（HPLC：Alliances2690， MS：ZMD4000）を使用した。

2. 4 分析操作

2. 4. 1 試験溶液の調製

玄米：粉碎均一化した試料 10 g に水 20mL を加え 2 時間放置した後，アセトン 100mL および 50mL で 2 回抽出した．ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した後，ろ液を 40℃以下で約 30mL に減圧濃縮した．これに 10%塩化ナトリウム水溶液 100mL を加えて，ジクロロメタン 100mL および 50mL で 2 回抽出した．抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後，40℃以下で濃縮乾固した．残留物を n-ヘキサン 30mL に溶解し，n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL で 3 回抽出した．抽出液を濃縮乾固した後，残留物をメタノール 10mL に溶解した．その 2mL を採り，メンブランフィルターでろ過し，試験溶液とした．

その他の農産物：細切均一化した試料 20 g を，アセトン 100mL および 50mL で 2 回抽出した．ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した後，ろ液を 40℃以下で約 30mL に減圧濃縮した．これに 10%塩化ナトリウム水溶液 100mL を加えて，ジクロロメタン 100mL および 50mL で 2 回抽出した．抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後，40℃以下で濃縮乾固した．残留物をメタノール 10mL に溶解した後，その 2mL を採り，メンブランフィルターでろ過し，試験溶液とした．

2. 4. 2 LC/MS 条件

(1) 高速液体クロマトグラフ

カラム：Inertsil ODS-80A (1.5mm i. d. ×250mm)，カラム温度：40℃，移動相：A 液；水-メタノール（85：15），B 液；水-メタノール（0：100），グラジエント条件；A 液 100%から 25 分間のリニアグラジエントで B 液 100%，その後 15 分間保持，流速：0.15mL/min，注入量：2 μ L

(2) 質量分析装置

イオン化法：ESI，コーン電圧：20V，キャピラリー電圧：3.5 kV，イオンソース温度：130℃，乾燥ガス流量：8L/min，乾燥ガス温度：350℃

2. 4. 3 定量

試験溶液の 2 μ L を LC/MS 装置に注入し，選択イオン検出法（SIM）により得られたクロマトグラムのパーク面積から，絶対検量線法により作成した検量線を用いて，各農薬の濃度を求め，試料中の含量を算出した．

3. 結果および考察

3. 1 MS 測定モードの検討

LC/MS の測定モードを決定するため、各農薬の $100 \mu\text{g/mL}$ 標準溶液をシリンジポンプで直接質量分析計に導入しながら、ESI 法で正および負イオンのマススペクトルを測定した。N-メチルカルバメート系の農薬およびメタベンズチアズロン、ペンシクロン、テブフェノジドは正イオンモードで高感度に検出でき、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ または $[\text{M}+\text{Na}]^+$ をベースピークとするマススペクトルが得られたため、正イオンモードを選択した。ジフルベンズロン、ヘキサフルムロン、フルフェノクスロン、クロルフルアズロンについては、負イオンモードの方が正イオンモードに比べ高感度に検出でき、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ をベースピークとするマススペクトルが得られたため、負イオンモードを選択した。いずれの農薬も、SIM 法のモニターイオンには、擬分子イオンを選択した。

3. 2 コーン電圧の影響

LC/ESI-MS 法では、コーン電圧が検出感度に最も大きな影響を与える。そこで、予備試験で比較的高い感度が得られるイオン化条件を検索し、その後、コーン電圧を $10\sim 60\text{V}$ の間で 10V ずつ変化させ、スキャン法で擬分子イオンのピーク強度を測定することで最適なコーン電圧を検討した。その結果を Fig. 1 に示した。今回対象とした農薬は、テブフェノジドを除き、コーン電圧が $10\sim 30\text{V}$ の間で感度が最大となり、 40V を超えると徐々に感度が低下した。そこで、コーン電圧は、多くの農薬が最も高感度に検出できた 20V に設定した。

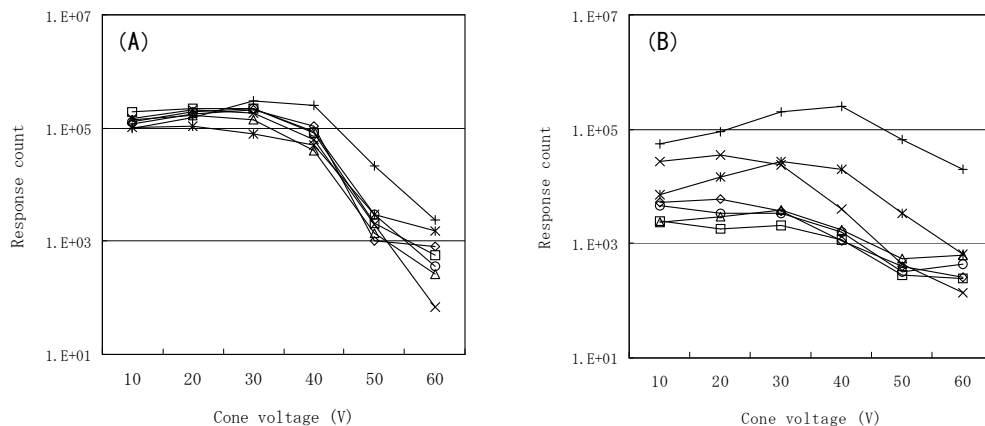


Fig. 1. Effect of cone voltage on peak intensity

- (A) $-\square-$: Aldicarb, $-\diamond-$: Bendiocarb, $-\triangle-$: Carbaryl, $-\circ-$: Ethiofencarb, $-\times-$: Fenobucarb, $-*$: Oxamyl, $-+-$: Pirimicarb
- (B), $-\square-$: Chlorfluazuron, $-\diamond-$: Diflubenzuron, $-\triangle-$: Flufenoxuron, $-\circ-$: Hexaflumuron, $-\times-$: Methabenzthiazuron, $-*$: Pencycuron, $-+-$: Tebufenozide

3. 3 前処理法

試料からの抽出は, 告示試験法等で最もよく使用され, 今回の農薬に対しても溶解性が高いアセトンを用いた. アセトンを留去した後の転溶に用いる溶媒はジクロロメタンを用いた. 近年, ジクロロメタンは環境への負荷を減らすため使用を減ずる傾向にあるが, 代替溶媒として用いられる酢酸エチルでは, オキサミルやエチオフェンカーブのように転溶の困難なものや分解などの理由で良好な回収率の得られないものがある⁵⁾ことや, 減圧留去する際に溶媒回収装置付きエバポレーターを使用することで, ジクロロメタンをほぼ全量回収できたことから, 今回は, ジクロロメタンを転溶溶媒に選択した.

農産物中の妨害成分の除去には, 通常, シリカゲルやフロリジルを用いた吸着クロマトグラフィーや分子量で分画するゲル浸透クロマトグラフィーが汎用されている. しかし LC/MS 法では HPLC-UV 法に比べ妨害物質の影響が少なく, 感度的にも余裕がある. そこで, 分析操作を簡略化するため, カラムによる精製操作を省略し, 最終液量を増やすことで妨害成分濃度の低減を図った. 濃縮倍率は, 野菜サンプルで2倍とし, 玄米では濃縮は行なわなかった. Fig. 2 に, 玄米に各農薬を $0.1 \mu\text{g/g}$ 添加した試料から得られた, SIM クロマトグラムを示す. 試料由来の妨害ピークの少ない, 良好なクロマトグラムが得られた. また, 玄米以外の試料についても同様に妨害ピークの少ないクロマトグラムが得られた.

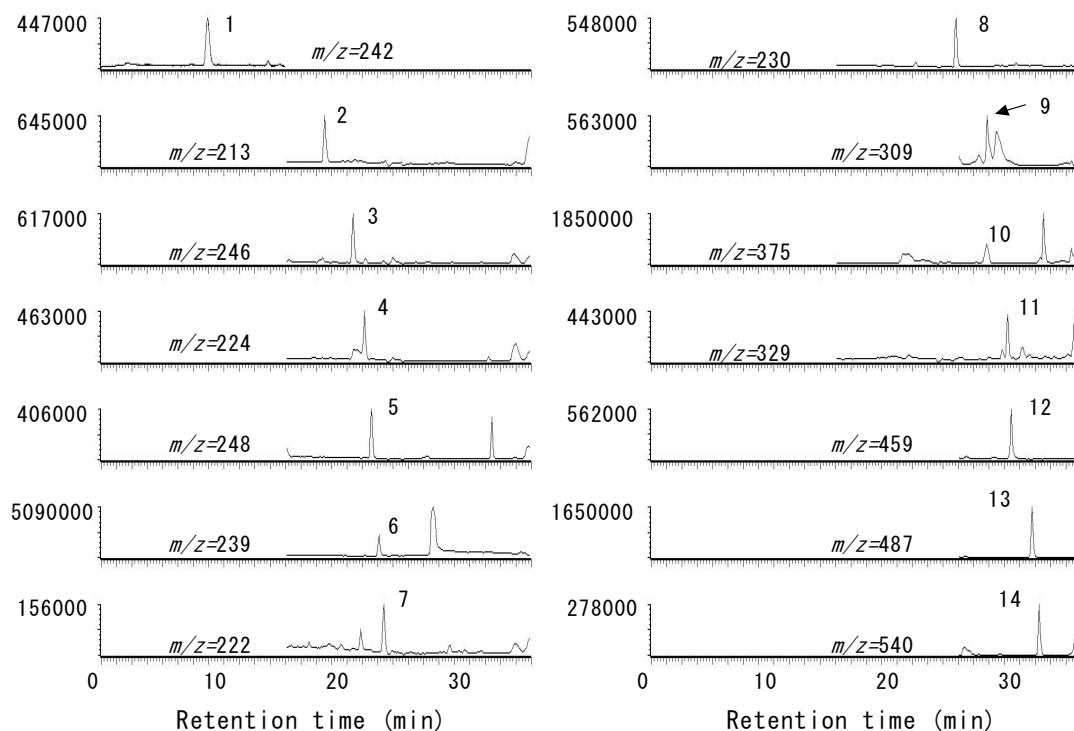


Fig. 2. SIM chromatograms of 14 pesticides in rice extract by LC/MS

1: Oxamyl, 2: Aldicarb, 3: Bendiocarb, 4: Carbaryl, 5: Ethiofencarb, 6: Pirimicarb, 7: Methabenzthiazuron, 8: Fenobucarb, 9: Diflubenzuron, 10: Tebufenozide, 11: Pencycuron, 12: Hexaflumuron, 13: Flufenoxuron, 14: Chlorfluazuron Concentration of each pesticide was $0.1 \mu\text{g/g}$.

3. 4 検量線および検出限界

0.01, 0.03, 0.05, 0.1 および 0.3 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製し, その 2 μL を LC/MS 装置に注入し検量線を作成した. 検量線の直線性は良好で, 各農薬の相関係数は, 1.000~0.994 であった. また, 検量線の最低濃度である 0.01 $\mu\text{g/mL}$ の標準混合溶液を 7 回測定し, その標準偏差 (σ) を求め, その 3 倍 (3σ) を検出下限とした. 以上の結果を Table1 に示す. 本分析法の検出下限値は 0.0012~0.0028 $\mu\text{g/g}$ (玄米については 0.0024~0.0056 $\mu\text{g/g}$) で, 本法は基準値レベルの分析に対して十分な検出感度を有していた.

Table 1. Correlation Coefficients of Calibration Curves and Detection Lim

Pesticide	Monitoring Ion (m/z)	Correlation Coefficient ^{*1}	Detection Limit ($\mu\text{g/g}$) ^{*2}
Oxamyl	242	1.000	0.0023
Aldicarb	213	0.999	0.0020
Bendiocarb	246	1.000	0.0018
Carbaryl	224	0.999	0.0028
Ethiofencarb	248	1.000	0.0022
Pirimicarb	239	0.998	0.0015
Methabenzthiazuron	222	0.999	0.0019
Fenobucarb	230	0.998	0.0016
Diflubenzuron	309	1.000	0.0019
Tebufenozide	375	1.000	0.0024
Pencycuron	329	0.997	0.0016
Hexaflumuron	459	0.999	0.0012
Flufenoxuron	487	1.000	0.0015
Chlorfluazuron	540	0.994	0.0014

^{*1} Concentration range of each pesticide was 0.01–0.3 $\mu\text{g/mL}$

^{*2} Concentration of each pesticide was 0.01 $\mu\text{g/mL}$, $n=7$

5. 添加回収率

玄米，キャベツ，ニンジンおよびレモンについて，各農薬を $0.1 \mu\text{g/g}$ になるように添加して，添加回収試験を行なった．その結果を Table2 に示す．クロルフルアズロンを除けば，添加回収率は概ね 70%以上，標準偏差は，10%前後と比較的良好な結果が得られた．

Table 2. Recoveries of 14 Pesticides Added to Agricultural Products

Pesticide	Recovery (%) ^{*1}			
	Rice	Cabbage	Carrot	Lemon
Oxamyl	108.0 $\pm$ 1.3 ^{*2}	101.0 $\pm$ 3.2	103.0 $\pm$ 8.4	89.4 $\pm$ 4.4
Aldicarb	111.3 $\pm$ 6.2	98.1 $\pm$ 5.2	97.6 $\pm$ 5.5	100.9 $\pm$ 2.9
Bendiocarb	101.3 $\pm$ 7.7	90.7 $\pm$ 7.5	84.0 $\pm$ 4.8	45.4 $\pm$ 3.9
Carbaryl	108.8 $\pm$ 9.0	95.9 $\pm$ 7.2	86.5 $\pm$ 2.0	88.6 $\pm$ 15.7
Ethiofencarb	83.5 $\pm$ 6.6	36.5 $\pm$ 10.8	90.4 $\pm$ 11.5	59.3 $\pm$ 16.4
Pirimicarb	112.5 $\pm$ 11.2	81.8 $\pm$ 7.9	96.1 $\pm$ 16.3	87.9 $\pm$ 4.0
Methabenzthiazuron	98.4 $\pm$ 1.2	48.5 $\pm$ 9.8	69.0 $\pm$ 6.5	46.5 $\pm$ 14.3
Fenobucarb	81.8 $\pm$ 4.1	72.6 $\pm$ 10.4	42.6 $\pm$ 14.7	55.3 $\pm$ 10.4
Diiflubenzuron	78.8 $\pm$ 4.4	91.7 $\pm$ 10.3	83.5 $\pm$ 13.6	83.9 $\pm$ 2.2
Tebufenozide	104.4 $\pm$ 15.6	86.2 $\pm$ 17.7	65.8 $\pm$ 19.2	88.9 $\pm$ 0.5
Pencycuron	90.1 $\pm$ 9.8	64.4 $\pm$ 27.0	84.6 $\pm$ 14.2	95.6 $\pm$ 18.5
Hexaflumuron	87.7 $\pm$ 2.3	90.2 $\pm$ 3.1	90.5 $\pm$ 2.8	60.6 $\pm$ 5.9
Flufenoxuron	73.3 $\pm$ 11.4	52.5 $\pm$ 13.2	83.1 $\pm$ 26.4	59.0 $\pm$ 5.0
Chlorfluazuron	45.4 $\pm$ 48.1	54.8 $\pm$ 9.1	52.5 $\pm$ 32.4	40.9 $\pm$ 13.2

^{*1} Sample was spiked at $0.1 \mu\text{g/g}$ of each pesticide

^{*2} Mean $\pm$ R. S. D., n=3

4. ま と め

農作物中の N-メチルカルバメート系農薬 7 種類および尿素系農薬 7 種類，合計 14 種類について，LC/MS を用いた一斉分析法を検討した．本法は，各農薬を試料からアセトンで抽出し，ジクロロメタンに転溶した後，脱水・濃縮し LC/MS で定量する簡易な分析法であり，短時間で，GC/MS での分析が困難な農薬のスクリーニングが可能となることから，回収率に若干の問題があるものの，日常の残留農薬分析法として，有用な手法となりうると考えられた．

なお，本研究の一部は，環境省環境安全課委託の化学物質の環境安全性総点検調査の一環として実施した．

引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知“残留農薬迅速分析法の利用について”平成9年4月8日, 衛化第43号(1997) .
- 2) Akiyama, Y., Yano, M., Mitsuhashi, T., Takeda, N., Tuji, M., Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **37**, 351-362 (1996).
- 3) Yamaguchi, S., Eto, S., Eguchi, Y., Kido, K., Hisamatsu, Y., Nakazawa, H., Screening analysis for multiple pesticide residues in agricultural products with the GC/MS-SCAN method. Bunseki Kagaku, **46**, 905-914 (1997).
- 4) Nemoto, S., Sasaki, K., Eto, S., Saito, I., Sakai, H., Takahashi, T., Tonogai, Y., Nagayama, T., Hori, S., Maekawa, Y., Toyoda, M., Multi-residue determination of 110 pesticides in agricultural products by GC/MS(SIM). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **41**, 233-241 (2000).
- 5) 日本薬学会編“衛生試験法・注解2000”東京, 金原出版, 2000, p. 441-444.