

食品中の残留化学物質の理化学的分析法に関する研究 —カーバメート系農薬の迅速分析法について—

後藤 智美

Development of Analytical Methods for Residual *N*-Methyl Carbamate Pesticides in Foods

Tomomi GOTO

Department of Analytical Chemistry, Aichi Prefectural Institute of Public Health,
7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan

(Received December 4, 2009)

One of the major roles of public health agencies is to ensure safe products for consumers through analysis of residual agricultural chemicals and veterinary drugs in foods. The use of agricultural chemicals and veterinary drugs in agriculture is necessary to improve the quality of the food produced. They play a beneficial role in providing a plentiful, low-cost supply of high-quality food. On the other hand, as a consequence of this use, the presence of residues in food that is a critical element of overall public health is unavoidable, and residues in food are of great importance in the evaluation of food quality. *N*-methyl carbamate pesticides have anticholinesterase activity and are used worldwide. The postcolumn HPLC method is widely used for the detection of *N*-methyl carbamate pesticides in food. However, this traditional method involves a time-consuming process that requires skillful techniques. Therefore we developed a new analysis method for *N*-methyl carbamate pesticides as described in detail in this paper. The new method, including sample preparation and determination, is simple and rapid and allows simultaneous determination of pesticides in food within a much shorter analysis time as compared with the traditional method. This should provide high-quality analysis and ensure safe products for consumers.

Key words—*N*-methyl carbamate pesticide, high-throughput analysis; LC/MS/MS

1. はじめに

農薬や動物用医薬品の使用は、生産性の向上、安定化、品質向上と省力化に大きな役割を果たしている。今日の食料生産現場において、これらを使用することなく、必要とするだけの農産物及び畜水産物を供給することは不可能であり、農薬及び動物用医薬品は必要不可欠なものになっている。その一方で、これらは、他の化学物質と同様、ヒト及び環境生物に対してなんらかの活性を持っており、使用された農薬及び動物用医薬品の農畜水産物への残留による人体への悪影響が懸念される。そこで、食品衛生行政においては、その残留をチェックし、残留基準値を超えたものは速やかに排除する必要がある。

そのため、これらの残留を分析する方法は、農薬や動物用医薬品が基準値を超して残留した食品が消費されてしまう前に発見できるよう、迅速かつ簡便である必要がある。しかし、夾雑物の多い食品中に、微量に残留する農薬及び動物用医薬品を分析することは容易ではないため、従来の分析法は、複雑な反応に依存したものも多く、分析開始から結果が出るまでに長時間が必要である。

そこで筆者は、食品中に残留する可能性のある農薬及び動物用医薬品の簡便かつ迅速な分析法を確立した。¹⁻⁶⁾ 本稿では、このうちカーバメート系農薬の分析法について述べる。

2. カーバメート系農薬の分析法

カーバメート系農薬は、有機リン系殺虫剤と同じく、コリンエステラーゼ阻害作用を有し、昆虫にも哺乳動物にも効果をあらかず殺虫剤であり、様々な農作物中への残留が報告されている。^{7,8)} しかしながら、現在用いられている分析法は、非常に有用であ

愛知県衛生研究所衛生化学部 (〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6)

e-mail: tomomi_3_gotou@pref.aichi.lg.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会東海支部学術奨励賞受賞を記念して記述したものである。

る反面、作物由来の多数の妨害物質を除去するための煩雑な分析操作と熟練した技術が必要とし、その結果、分析に長い時間を要する。そこで筆者は、カーバメート系農薬の簡便かつ迅速な分析法を確立した。対象農薬は、残留実態及び毒性を考慮し、Fig. 1 に示した農薬、すなわち、カルバリル、フェノブカルブ、メチオカルブ、メソミル、オキサミル、ピリミカーブ、アルジカルブ及び、アルジカルブの酸化体であるアルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシドも生物活性があり、スルホキシドはアルジカルブ本体の 10–20 倍のコリンエステラーゼ阻害活性を示すことと、スルホンも欧米では別農薬として販売されていることから、これら酸化体も加えた 9 種を検討対象農薬とした。⁹⁻¹¹⁾

分析法の簡便迅速化を図るために、以下の手法を検討した。質量分析計を 2 台直列に配置した MS/MS は、優れた選択性を有した分析装置であり、初めの質量分析計により目的化合物由来のイオンを選択し、その選択したイオンを開裂させて得られるプロダクトイオンを 2 番目の質量分析計で測定するため、試料からの夾雑物の影響をほとんど受けず、転溶、分離等の精製操作を省略することが可能である。また、目的化合物由来のイオンを 2 台の質量分析計で選択することから、同時に異なる化合物の測

定をすることができる。¹²⁻¹⁴⁾そこで、物質を分離するのに優れた方法である液体クロマトグラフィー (LC) と MS/MS とを結合した LC/MS/MS を測定装置とし、測定時間を短縮することができる 10 mm のショートカラムを LC に用いた。また、安定同位体である重水素で標識された化合物は、対象となる化合物と質量数のみが異なり、物理化学的性質が非常に似ているため、その挙動はほぼ等しい。そのため、MS/MS を測定装置として用いる場合、このような性質を持つ重水素標識体を内標準物質として用いる分析法は、試料由来の夾雑物によるイオン化効率への影響を補正することが可能である。また、内標準物質を分析操作開始時に試料に添加した後、分析を行うことで、各操作、例えば抽出、減圧乾固、再溶解等における減損等の影響を補正することが可能である。^{15,16)}そこで、入手可能であったカーバメート系農薬の重水素標識体であるカルバリル-*d*₇、フェノブカルブ-*d*₃、メソミル-*d*₃ を内標準物質として用いた。

2-1. ワイン・ジュース等の液状食品の分析法

平成 18 年 5 月のポジティブリスト制施行以前は、農作物から加工・生産される液状食品、例えば、様々な果実より加工・生産されるワイン・ジュースのような液状食品には、残留基準値が設定さ

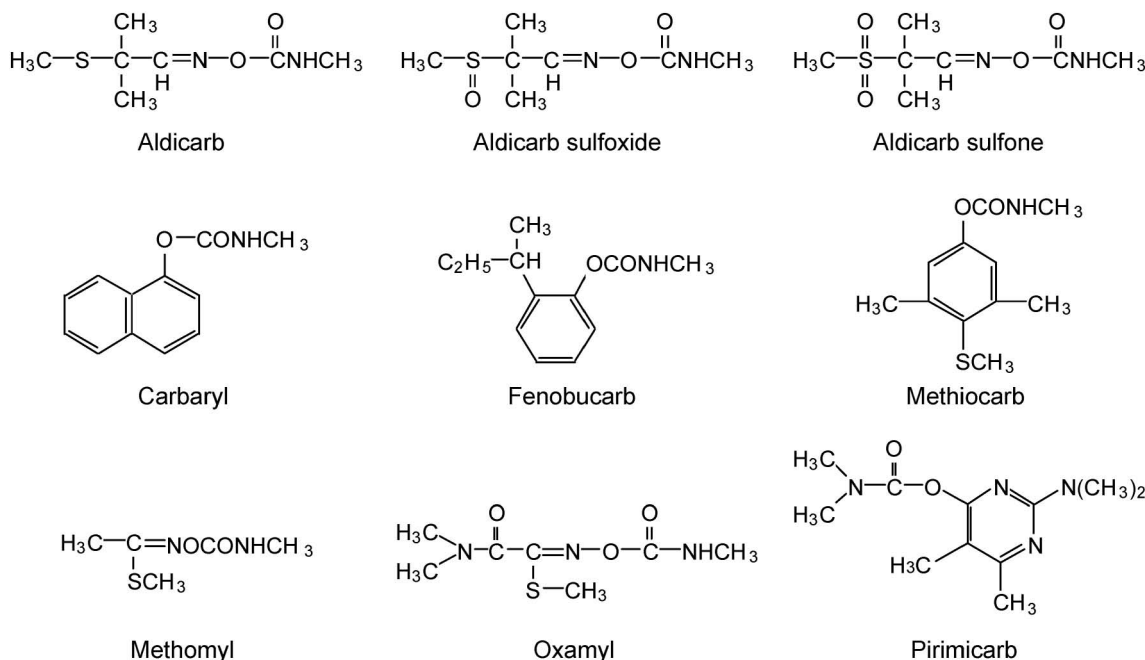


Fig. 1. Chemical Structures of the Carbamate Pesticides

れていなかった。しかし、これら食品への農薬の残留はしばしば報告されており、液状食品も分析する必要があったため、液状食品中のカーバメート系農薬の分析法の開発を行った。^{17,18)}

はじめに、各農薬の標準溶液をフローインジェクションし、ポジティブモードにおける ESI MS/MS スペクトルを測定して ESI MS/MS 条件を最適化した。この条件は Table 1 に示した。

ついで、この ESI MS/MS 条件を用いて LC 条件を最適化した。移動相 A 液として 0.01% ギ酸超純水を、移動相 B 液として 0.01% ギ酸メタノールを用いたグラジエント溶出を検討した。はじめに、試験溶液の注入量を検討した。カラムの保持容量を超えて大量に試験溶液を注入した場合、カラムに保持されなかった農薬が溶出し、MRM プロファイル形状に影響が生じることが考えられた。そこで、注入した農薬が確実に保持され、なおかつ最も強いイオン強度を得ることができる注入量を検討した。10, 50, 80 及び 100 μl の標準溶液を注入し、得られた MRM プロファイルの形状及びイオン強度を考察した。溶出時間が早いアルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシド、メソミル及びオキサミルが最も注入量の影響を受け、80 及び 100 μl 注入した場合、MRM プロファイルの形状に影響が生じ、定量に供することができないピークとなった。これらの農薬は、50 μl 注入した場合に、MRM プロファイル形状も良好で、かつイオン強度が最も高い値を示した。このことから、試験溶液の注入量は 50 μl と

した。ついで、グラジエント条件について種々検討した。確立したグラジエント条件は、次の通りである。試料注入から 0.5 分間は A 液 100% を保持することにより、極性の高い測定妨害物質のみ溶出させ、農薬はカラム内に保持させる。その後、A 液の濃度を、0.5 から 2 分の間は 85%、2 分から 3 分の間は 50% に保持し、3 分から 7 分の間は 50% から 25% までのリニアグラジエントを行うことで各農薬を溶出させる。この条件を用いて標準溶液を測定したとき、農薬は、溶出時間により 3 つのグループに分けることができ、かつ、各々のグループには内標準物質のピークが観察された。すなわち、リテンションタイム 3.5 分前後にはアルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシド、オキサミル、メソミル、メソミル- d_3 が溶出するため、これらを同時に測定することとし、メソミル- d_3 を内標準物質として設定した。同様に、リテンションタイム 5.5 分前後に溶出するアルジカルブ、カルバリル、ピリミカーブはカルバリル- d_7 を、リテンションタイム 7 分前後に溶出するフェノブカルブ、メチオカルブはフェノブカルブ- d_3 を内標準物質として分析することとした。

この ESI LC/MS/MS 条件について、実際の食品への応用を検討した。液状食品は、他の食品と比べ測定妨害物質が少ないため、前処理を行わず、直接測定することが可能と考えたが、ワインにおいて、回収率及び MRM プロファイルのピーク形状に、エタノールによる影響が生じた。そのため、エタ

Table 1. Compound-specific ESI-MS/MS Parameters for the Pesticides and the Internal Standard

Carbamate pesticides	Precursor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Monitor ion (m/z)
Aldicarb	116 ^{a)}	25	10	89
Aldicarb sulfoxide	207 ^{b)}	15	5	132
Aldicarb sulfone	223 ^{b)}	20	10	148
Carbaryl	202 ^{b)}	15	10	145
Carbaryl- d_7	209 ^{b)}	15	10	152
Fenobucarb	208 ^{b)}	25	15	152
Fenobucarb- d_3	211 ^{b)}	25	14	95
Methiocarb	226 ^{b)}	23	20	121
Methomyl	163 ^{b)}	15	8	106
Methomyl- d_3	166 ^{b)}	9	10	109
Oxamyl	220 ^{b)}	15	10	72
Pirimicarb	239 ^{b)}	30	2	72

a) $[\text{M}+\text{H}-75]^+$, b) $[\text{M}+\text{H}]^+$

ノールが結果に影響しない希釈倍率を検討し、超純水で10倍に希釈することとした。

以上の検討より、試料5gに、内標準物質を添加後、超純水で50mlにメスアップ、0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とし、その試験溶液をESI LC/MS/MSで測定する分析法を確立した。この分析法を用い、グレープフルーツジュース、グレープジュース、オレンジジュース、リンゴジュース、赤ワイン及び白ワインの添加回収実験を実施した。このとき得られた、赤ワインのMRMプロファイルとそのブランク赤ワインのMRMプロファイルと併せてFig. 2に示した。これらは、カーバメート系農薬の標準溶液のそれとよく一致し、また、ブランク赤ワインからは分析の妨害となるイオンは検出されなかった。回収率と変動係数は、いずれの試料のいずれの添加濃度においても、回収率67.1から124.8%、変動係数は6.9%以下と良好な結果を得た。これらの結果の詳細はTable 2に示した。

2-2. 野菜・果実等の固形食品の分析法 前述の分析法は、測定対象が液状食品に限られており、流通している多くの食品に適用することができない。しかし、カーバメート系農薬は広く世界中で使

用されており、一般によく食されている野菜・果実等の固形食品中への残留の報告がある。そのため、前述の分析法をそれら固形食品の分析に応用するために、有機溶媒により農作物から農薬を抽出した後、水相に移行させることで液状食品と同様の形態とする方法を検討した。

はじめに、酢酸エチルで抽出した後、減圧乾固した残渣を5mlの超純水で再溶解し定量したところ、2つの農薬の回収率に問題があった。すなわち、アルジカルブは147.7%、メチオカルブは46.1%の回収率であった。この理由として、希釈するのみでESI LC/MS/MS分析に供することができた液状食品の試料に比べ、野菜・果実等の固形食品の分析では、抽出、減圧乾固、溶解という操作が増える。これら一連の操作の中の、特に超純水で再溶解する際に大きな影響があると考えた。前述の分析法では、内標準物質を分析操作開始時に試料に添加した後、分析を行うことで影響を補正した。しかし、9種の農薬すべての内標準物質の入手は困難であったため、入手可能であった3種の内標準物質を用いて定量することとした。すなわち、通常、カラムへの保持に着目し、LCからの溶出時間が近い内標準物質と定量対象物質とを組み合わせで定量する方法が定

Table 2. Recoveries of the Carbamate Pesticides from Wine and Juice

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Grapefruit juice	Grape juice	Orange juice	Apple juice	Red wine	White wine
Aldicarb	0.1	81.6(1.2)	77.0(2.0)	77.9(1.4)	88.7(1.6)	76.1(2.0)	69.9(1.3)
	0.5	82.1(1.4)	88.2(4.3)	75.9(1.3)	97.3(3.4)	73.9(2.7)	69.4(1.3)
Aldicarb sulfoxide	0.1	109.4(2.2)	107.5(1.1)	107.5(2.0)	99.3(1.1)	87.4(2.3)	86.6(1.1)
	0.5	102.3(1.9)	101.7(1.9)	106.6(1.2)	105.9(1.7)	105.5(1.4)	92.1(1.2)
Aldicarb sulfone	0.1	97.3(2.2)	95.5(2.3)	103.2(0.5)	101.4(1.1)	110.3(1.7)	108.6(2.4)
	0.5	100.8(2.9)	94.7(1.8)	102.5(1.3)	102.0(2.2)	115.0(1.7)	114.3(3.0)
Carbaryl	0.1	101.4(1.9)	104.1(0.6)	105.8(0.6)	98.9(1.0)	101.0(1.4)	102.8(1.2)
	0.5	98.8(1.1)	97.5(1.5)	102.1(0.7)	101.0(1.8)	101.8(0.4)	97.8(0.8)
Fenobucarb	0.1	96.5(1.6)	97.2(0.9)	100.1(1.1)	100.0(2.1)	98.1(0.8)	98.7(0.5)
	0.5	100.4(3.0)	98.2(1.7)	97.2(0.9)	100.6(1.6)	100.8(1.1)	100.6(1.2)
Methiocarb	0.1	94.8(0.6)	100.6(1.2)	109.5(0.9)	101.3(1.1)	103.9(1.4)	110.3(1.4)
	0.5	88.4(0.9)	98.6(3.0)	90.9(1.5)	98.8(1.5)	114.4(1.5)	114.7(3.6)
Methomyl	0.1	100.8(2.0)	102.4(3.6)	100.6(1.0)	99.6(1.4)	102.5(0.9)	101.7(1.6)
	0.5	98.6(1.6)	99.3(0.9)	101.4(1.1)	101.0(2.3)	96.7(1.3)	98.1(1.8)
Oxamyl	0.1	124.8(5.1)	102.0(5.0)	119.1(2.5)	105.4(1.9)	92.8(3.2)	97.8(3.9)
	0.5	97.0(4.9)	98.0(5.6)	108.1(1.9)	102.1(4.8)	98.2(6.9)	99.4(3.5)
Pirimicarb	0.1	115.8(2.1)	100.6(2.6)	115.4(0.8)	87.7(1.2)	89.9(1.0)	78.8(1.9)
	0.5	112.2(3.1)	84.2(2.1)	114.0(1.0)	76.2(2.3)	74.6(2.1)	67.1(2.1)

The values given outside the parenthesis are recovery (%) and those inside the parenthesis are C.V. (%). Calculated from mean values (n=5).

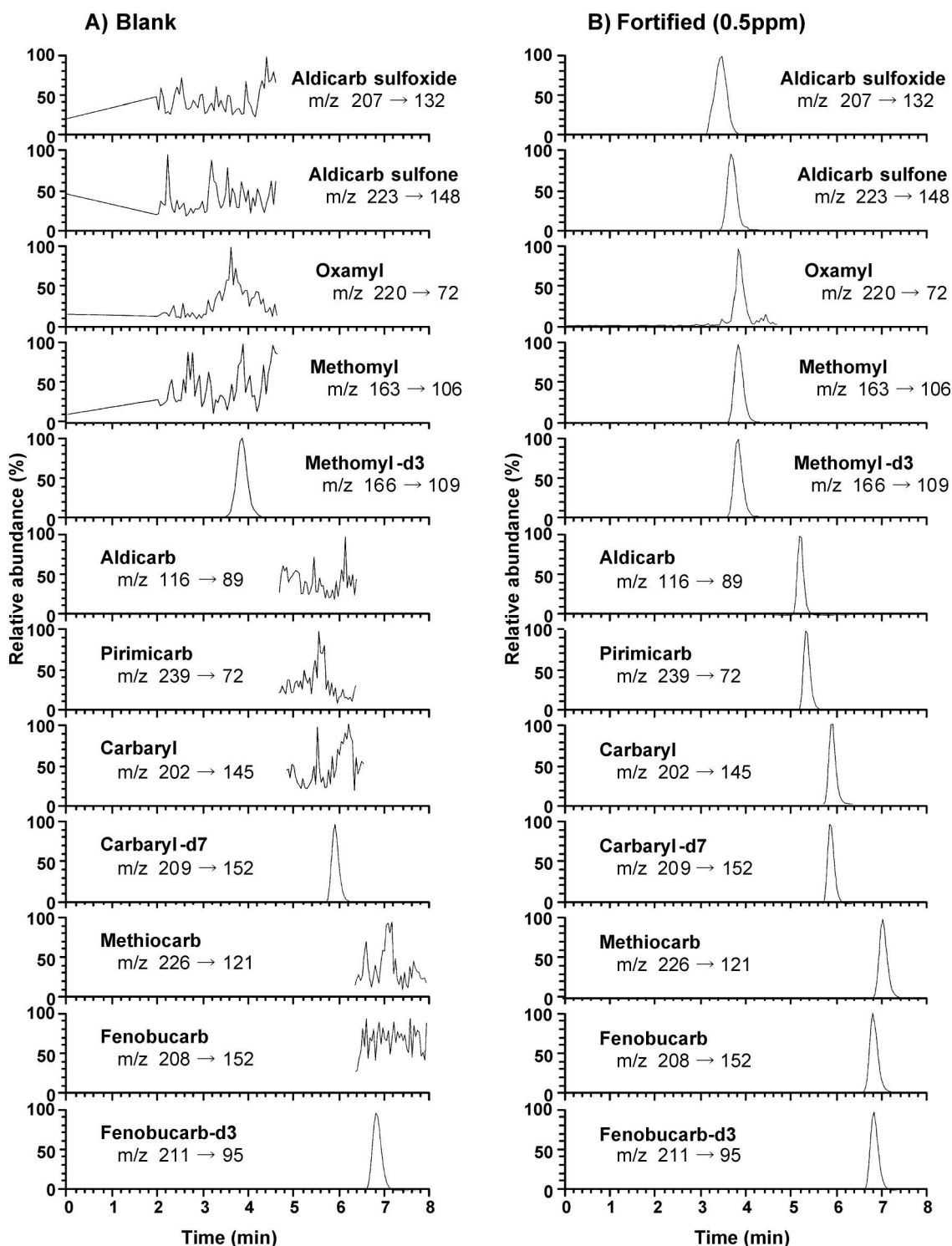


Fig. 2. Typical MRM Profiles of the Fortified Red Wine Sample under ESI LC/MS/MS

A) Red wine (control) and B) fortified with the nine *N*-methyl carbamate pesticides at the concentration of 0.5 ppm.

法であるため、3種の内標準物質は、溶出時間がそれぞれ近い農薬と組み合わせた。しかし、水に対する溶解度に着目し検討した結果、農薬と内標準物質の間に溶解度の大きな差がある組み合わせがあった。¹¹⁾ すなわち、アルジカルブの水に対する溶解度

は 5 g/100 g であるのに対し内標準物質であるカルバリル-*d*₇ のそれは 0.04 g/100 g, メチオカルブの水に対する溶解度は 0.027 g/100 g であるのに対し内標準物質であるフェノブカルブ-*d*₃ のそれは 0.61 g/100 g と 10 倍以上の大きな差があった。そこで、

溶解度の差がより小さい組み合わせ、すなわち、アルジカルブは、カルバリル- d_7 ではなくメソミル- d_3 を、メチオカルブはフェノブカルブ- d_3 からカルバリル- d_7 を内標準質としてそれぞれ組み合わせて定量を行った。その結果、アルジカルブは、82.6%と良好な回収率を得ることができた。また、回収率は73.5%と良好ではあったが、内標準物質であるカルバリル- d_7 との溶解度の差が大きいピリミカーブについても同様に検討した結果、90.3%となった。しかし、メチオカルブについては、内標準物質を変更したにもかかわらず、回収率は54.1%とわずかに向上したに過ぎなかった。この原因として、夾雑物によるイオン化抑制のため、あるいは水に対する溶解度が、カルバリル- d_7 よりもメチオカルブは小さいため、5 mlの超純水では十分な溶解が得られないためと考え、より大量の超純水、すなわち25 mlで溶解した結果、定量値、再現性ともに向上した。

以上の検討の結果、Scheme 1に示した分析法を確立し、これを用いてトマト、ほうれん草、じゃがいも、りんご、きゅうり及びみかんの添加回収実験を実施した。このとき得られた、ほうれん草のMRMプロファイルとそのブランクほうれん草の

MRMプロファイルと併せてFig. 3に示した。これらは、カーバメート系農薬の標準溶液のそれとよく一致し、また、ブランクほうれん草からは分析の妨害となるイオンは検出されなかった。回収率と変動係数は、ほうれん草、トマト、じゃがいも、りんご、きゅうり及びみかんのいずれの試料のいずれの添加濃度においても、回収率67.7%から119.3%、変動係数は8.7%以下と良好な結果を得た。これらの結果の詳細をTable 3に示した。

2-3. 脂質を多く含む食品の分析法 前述のとおり、ESI LC/MS/MSを用いた食品中のカーバメート系農薬の迅速かつ簡便な分析法を確立した。ジュース・ワイン等の液状食品は希釈するのみで、脂質をほとんど含まない食品である野菜・果実等の固形食品は、抽出・減圧乾固・再溶解のみで測定が可能であった。しかしながら、この前処理では脂質等の測定妨害物質を除去することができず、これらを多く含む食品に、この分析法をそのまま適用することは難しい。そのため、農薬を抽出した後、これら測定妨害物質を除去するなんらかの精製操作を行う必要があった。そこで、試験溶液の成分を迅速かつ効率よく分離することが可能であり、かつ、測定対象の農薬の溶出時間のみを考慮し、夾雑物の溶出時間を考慮する必要がない双方向高速向流クロマトグラフィー (Dual-CCC) を、脂質等と農薬との分離に用いることを検討した。¹⁹⁾

検討に用いたDual-CCCとは、固体充填剤を使用しない液-液分配クロマトグラフィーの一種で、互いに混じり合わない二液相を分離カラムの両端から双方向に送液することにより、2つの液相間で物質を分配し、効率よく分離を行う手法である。^{20,21)} その装置の概略として、Dual-CCCのカラムデザインをFig. 4に示した。²²⁾

内径2.6 mmのテフロン製チューブ10 mをコイル状に巻いたものをカラムとし、二相溶媒系として、食品分析で脂肪分の除去によく用いられるアセトニトリルと*n*-ヘキサンを用いて検討した。カラムを高速で回転させ、*n*-ヘキサンをFig. 4のC側、すなわちテイル側より送液し、アセトニトリルは、反対側であるA側、すなわちヘッド側より送液した。送液された2液体はそれぞれ攪拌と静置を繰り返しながらカラム内を移動し、導入された方とは反対側、*n*-ヘキサンはヘッド側 (A)、アセトニ

Sample 5 g

add internal standards

homogenize with ethyl acetate 50 ml
and anhydrous sodium sulfate 20 g

centrifuge at 3,100 rpm for 10 min

Ethyl acetate layer

evaporate

Residue

dissolve in water 25 ml

filtrater

Test solution

ESI LC/MS/MS

Scheme 1. Analytical Procedure for the Carbamate Pesticides in Fruits and Vegetables

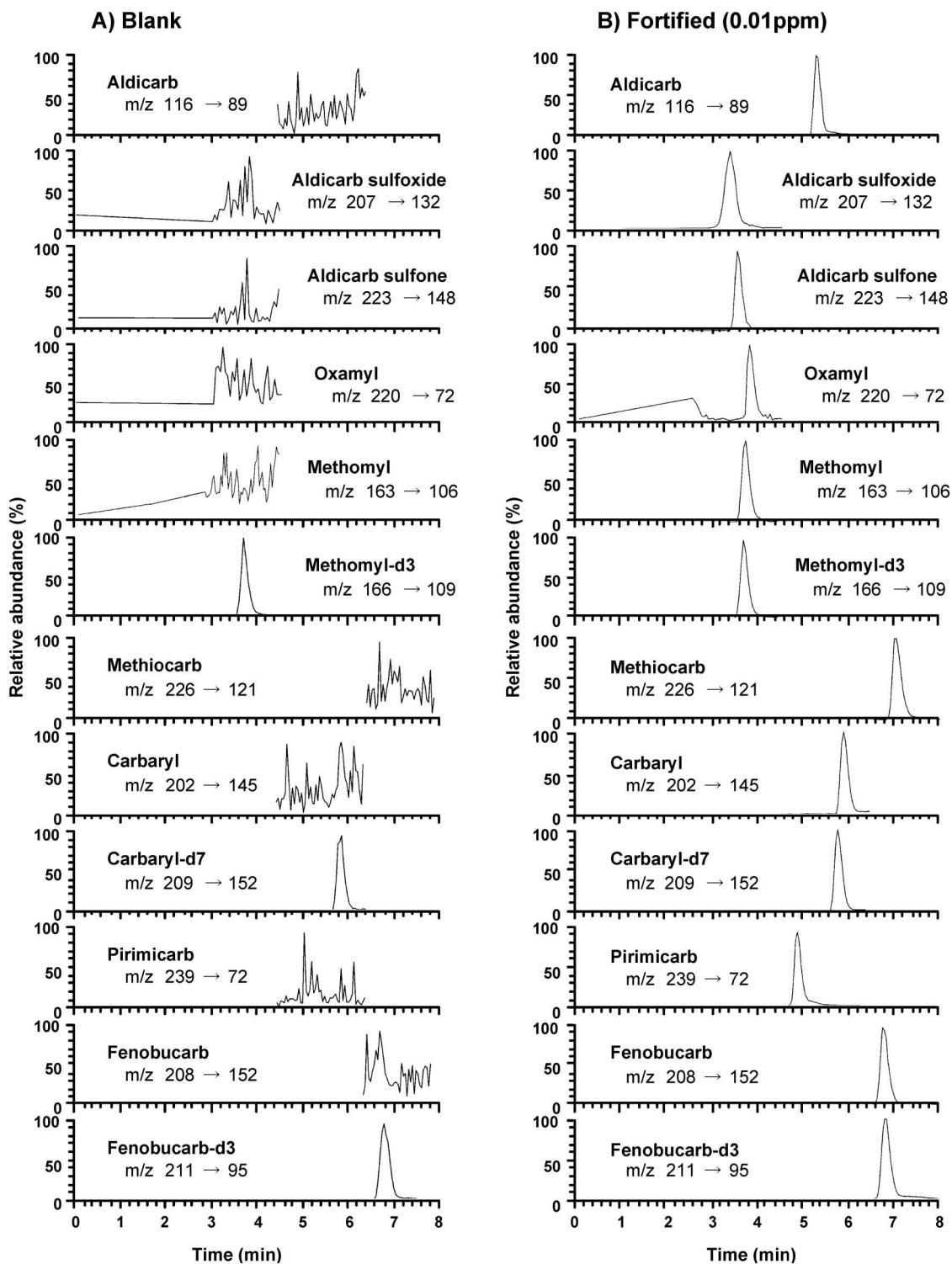


Fig. 3. Typical MRM Profiles of the Fortified Spinach Sample under ESI LC/MS/MS
 A) Spinach (control) and B) fortified with the nine *N*-methyl carbamate pesticides at the concentration of 0.01 ppm.

トリルはテイル側 (C) で捕集される。カラムの両端から流出する 2 液の流速を測定し、その値が等しい平衡状態に達した時点で試験溶液を注入すると、農薬類はアセトニトリル相へ移行し、夾雑物質はも

う片方の液相である *n*-ヘキサン相へ移行し、別々の出口から溶出される。一般のカラムクロマトグラフィーのように、農薬と夾雑物が同じ方向に移動することはないので、測定対象の農薬の溶出時間のみ

Table 3. Recoveries of the Carbamate Pesticides from Fruits and Vegetables

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Spinach	Tomato	Potato	Apple	Cucumber	Mandarin
Aldicarb	0.1	74.4 (2.6)	84.9 (2.9)	77.6 (2.2)	75.9 (2.6)	74.6 (4.6)	79.2 (1.8)
	0.5	75.9 (2.6)	76.4 (3.0)	79.2 (1.8)	67.1 (1.1)	83.8 (1.8)	73.1 (1.5)
Aldicarb sulfoxide	0.1	113.4 (2.5)	91.1 (3.6)	106.3 (3.6)	112.0 (3.7)	108.2 (2.9)	101.3 (3.9)
	0.5	112.0 (3.7)	74.1 (4.3)	101.3 (3.9)	114.5 (3.9)	116.4 (7.8)	119.3 (3.3)
Aldicarb sulfone	0.1	100.8 (2.0)	106.3 (3.4)	111.1 (2.6)	107.9 (3.8)	115.0 (2.8)	101.5 (2.5)
	0.5	107.9 (3.8)	106.3 (3.6)	101.5 (2.5)	99.9 (1.3)	104.7 (1.3)	117.3 (1.0)
Carbaryl	0.1	98.9 (1.0)	96.2 (1.7)	98.4 (0.9)	102.2 (0.5)	102.7 (1.1)	98.9 (1.7)
	0.5	102.2 (0.5)	101.1 (2.9)	98.9 (1.7)	99.9 (0.9)	96.9 (1.0)	106.2 (0.8)
Fenobucarb	0.1	101.8 (1.8)	103.0 (2.6)	103.8 (2.9)	100.8 (0.8)	101.0 (0.9)	95.7 (1.6)
	0.5	100.8 (0.8)	99.5 (0.9)	95.7 (1.6)	103.8 (1.2)	99.0 (1.0)	98.1 (0.6)
Methiocarb	0.1	76.7 (4.7)	88.5 (3.3)	96.8 (1.7)	74.9 (3.4)	106.4 (4.3)	98.4 (1.6)
	0.5	74.9 (3.4)	92.2 (2.0)	98.4 (1.6)	103.6 (0.9)	84.1 (3.0)	110.5 (2.2)
Methomyl	0.1	98.2 (2.0)	99.8 (3.3)	99.3 (2.4)	99.9 (1.6)	98.4 (2.0)	98.7 (0.8)
	0.5	101.0 (2.2)	96.5 (1.7)	98.6 (2.1)	96.9 (1.4)	98.6 (1.4)	100.1 (1.7)
Oxamyl	0.1	91.0 (3.7)	88.5 (8.7)	97.9 (3.4)	103.2 (6.4)	108.2 (3.7)	114.4 (3.0)
	0.5	103.2 (6.4)	103.8 (3.0)	114.4 (3.0)	98.2 (3.4)	102.1 (3.1)	100.5 (5.0)
Pirimicarb	0.1	103.9 (3.5)	67.7 (3.1)	92.6 (2.0)	104.2 (2.1)	91.4 (6.0)	102.8 (3.9)
	0.5	104.2 (2.1)	82.9 (1.8)	102.8 (3.9)	79.6 (1.7)	107.6 (3.5)	108.5 (2.5)

The values given outside the parenthesis are recovery (%) and those inside the parenthesis are C.V.(%). Calculated from mean values ($n=5$).

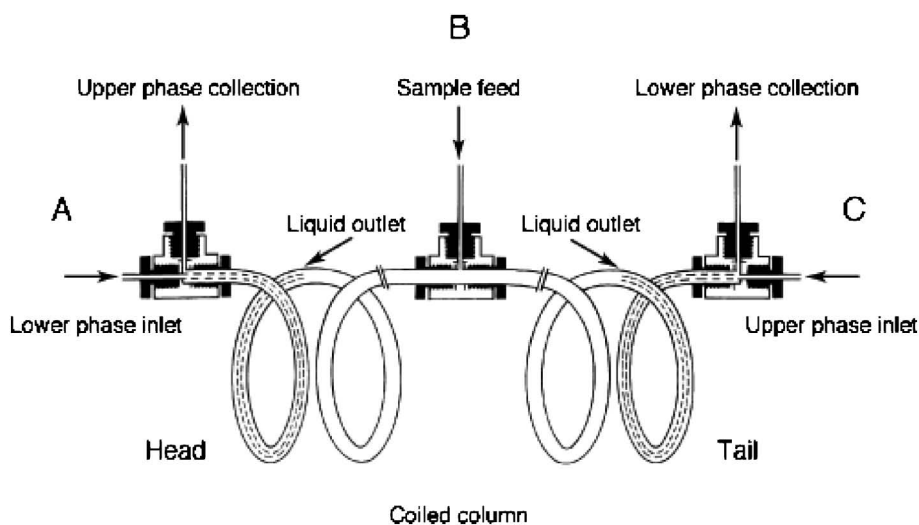


Fig. 4. Column Design for Dual-CCC

を考慮すればよく、夾雑物の溶出時間を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。

今回、Dual-CCCを、脂質を多く含む食品中のカーバメート系農薬の分析に適用を検討するにあたり、はじめに、Dual-CCC本体の様々な条件を検討した。

Dual-CCCでは、使用する二相溶媒系を用いて測

定対象物質の分配係数 K を求めることにより、溶出位置や分離状態を推測することが可能である。そこで、9種の農薬及び3種の重水素標識体の入った試験管内に、互いの溶媒で飽和したアセトニトリルと n -ヘキサンを等量入れ、攪拌、静置したのち、それぞれの液相を別々に ESI LC/MS/MS で測定し、上層の農薬の濃度を下層のそれで除して K を求めた。いずれの K も 0.1 以下と非常に小さい値

であった。これは、すべての農薬と重水素標識体はアセトニトリル層のみにほとんど分配し、*n*-ヘキサン層にはほとんど分配しないということを示しており、すべての農薬と重水素標識体は Dual-CCC 中の *n*-ヘキサン層にほとんど分配されることなく、試料溶液注入後、直ちにアセトニトリル中に溶出するものと考えられる。さらに、これらの K に差がないことから、ほとんど分離することなく同じ位置に溶出することが推測できた。

ついで、カラム回転数とカラム内が平衡状態に達するまでの時間を検討した。470, 450 rpm では、2液は平衡状態に達することはなかったが、400, 420 rpm では平衡に達し、420の方が400よりも早く平衡状態に達した。そこで、カラムの回転数は420 rpm とした。

試料溶液の注入口は、Fig. 4 中の A, B, C に設定することが可能であるので、最も適した位置を検討した。その結果、テイル側の *n*-ヘキサン送液ラインをカラム内に1 m 挿入した場合、良好な分離を得ることができたため、これを試料注入口として選択した。

脂質を多く含む食品として穀類及び豆類を選択し、カーバメート系農薬の抽出溶媒の検討を行った。種々の有機溶媒を検討した結果、アセトン、シクロヘキサン、ヘキサンで抽出した場合、アルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシド及びオキサミルの回収率が35%以下であった。また、アセトニトリルの場合は、アルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシドの回収率が70%以下であり、酢酸エチルのみが、良好な結果であった。そこで、抽出溶媒には、酢酸エチルを用いることとした。また、Dual-CCC へ注入する際の溶媒及び注入量の検討した結果、注入溶媒は酢酸エチル、試験溶液の注入量は100 μ l とすることとした。

以上のように、種々検討した結果、Scheme 2 に示した分析法を確立し、スキームに従って添加回収実験を実施した。試料には、あらかじめ分析対象であるカーバメート系農薬が含まれていないことを確認した玄米、小麦、大豆、トウモロコシ及び小豆を用いた。各農薬が0.5及び0.01 μ g/g となるよう、それぞれの試料に添加したものを ESI LC/MS/MS 分析した。このとき得られた玄米の MRM プロファイルとそのブランク玄米の MRM プロファイル

Sample 10 g

add internal standards

homogenize with 100 ml of ethyl acetate

centrifuge at 3,100 rpm for 10 min

Ethyl acetate layer

evaporate

make up to 5 ml with ethyl acetate

Dual CCC

Acetonitrile phase (1~4 min)

evaporate

Residue

redissolve in water 1 ml

Test solution

ESI LC/MS/MS

Scheme 2. Analytical Procedure for the Carbamate Pesticides in Cereals and Beans

と併せて Fig. 5 に示した。これらは、カーバメート系農薬の標準溶液のそれとよく一致し、また、ブランク玄米からは分析の障害となるイオンは検出されなかった。回収率と変動係数は、玄米、小麦、大豆、トウモロコシ及び小豆の試料のいずれの添加濃度においても、回収率72.1%から119.6%、変動係数は9.3%以下と良好な結果を得た。これらの結果の詳細を Table 4 に示した。以上の結果より、Dual-CCC は、脂質と農薬の分離に効果的であると判断できた。

2-4. まとめ 液状食品は、他の食品と比べ測定妨害物質が少ないため、超純水による希釈のみで試験溶液を調製し、試料溶液を濃縮するための長さ10 mm のショートカラムを備えた ESI LC/MS/MS を検出に使用することで、試料調製から測定までに要する時間は、わずか20分程度と格段に短縮することができた。また、液状食品の分析法を進展させ、野菜・果実等の固形食品の分析に応用した。抽出には酢酸エチルを用い、濃縮乾固した後、残渣を

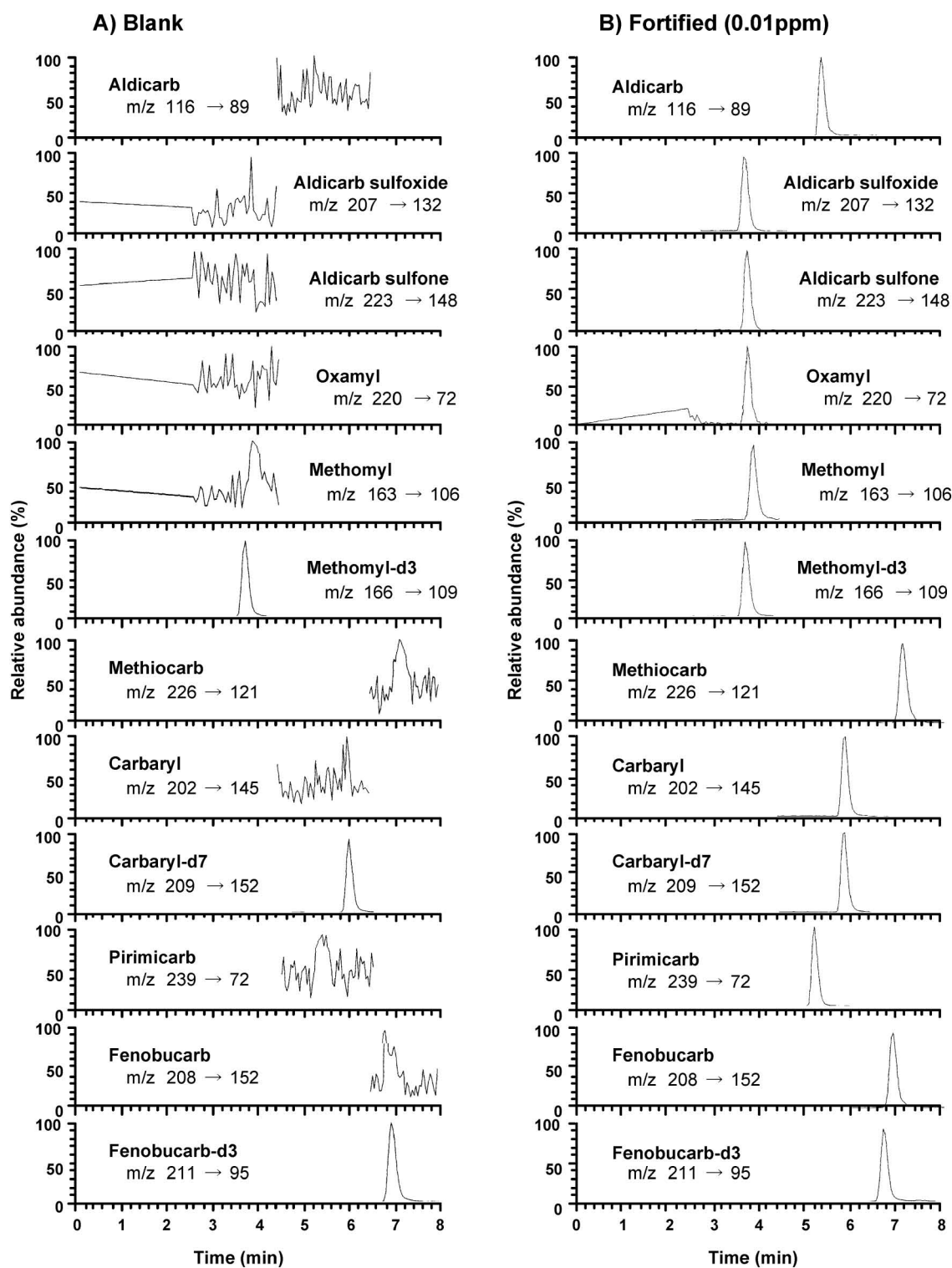


Fig. 5. Typical MRM Profiles of the Fortified Brown Rice Sample under ESI LC/MS/MS
 A) Brown rice (control) and B) fortified with the nine *N*-methyl carbamate pesticides at the concentration of 0.01 ppm.

超純水で再溶解した試験溶液を、確立したショートカラム ESI LC/MS/MS により分析することで、固形食品中のカーバメート系農薬の簡便かつ迅速な分析法を確立した。測定妨害物質である脂質を多く含

む食品においては、脂質の除去に Dual-CCC を用い、得られた溶出液を蒸発乾固した後、残渣を超純水で再溶解した試験溶液を、確立したショートカラム ESI LC/MS/MS により分析することで、脂質を

Table 4. Recoveries of the Carbamate Pesticides from Cereals and Beans

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Brown rice	Wheat	Soy bean	Corn	Red bean
Aldicarb	0.01	88.4 (2.4)	95.2 (5.0)	81.8 (1.4)	88.1 (3.6)	91.2 (4.2)
	0.5	92.9 (1.1)	95.4 (2.3)	82.1 (1.7)	102.4 (5.1)	83.2 (1.8)
Aldicarb sulfoxide	0.01	95.0 (2.3)	80.5 (1.8)	100.2 (1.5)	94.3 (5.4)	76.5 (5.9)
	0.5	95.2 (3.9)	84.5 (5.4)	83.6 (1.3)	79.2 (7.5)	80.2 (1.8)
Aldicarb sulfone	0.01	87.3 (5.4)	88.3 (11.2)	106.6 (5.2)	109.1 (9.1)	80.0 (4.3)
	0.5	93.5 (4.3)	89.1 (5.3)	93.4 (1.4)	76.6 (4.7)	89.3 (1.2)
Carbaryl	0.01	100.9 (1.9)	103.2 (1.1)	102.0 (1.7)	102.5 (4.3)	100.7 (0.9)
	0.5	96.0 (2.5)	96.1 (1.5)	101.8 (0.9)	94.8 (1.8)	100.3 (1.6)
Fenobucarb	0.01	99.8 (1.1)	95.4 (2.5)	99.1 (1.9)	95.1 (1.7)	103.0 (0.7)
	0.5	102.5 (1.5)	103.4 (0.6)	100.7 (0.6)	101.7 (2.1)	100.6 (2.2)
Methiocarb	0.01	78.6 (3.3)	79.7 (3.0)	90.1 (4.3)	86.0 (3.1)	74.8 (6.8)
	0.5	80.7 (6.3)	90.0 (1.6)	90.0 (1.6)	88.6 (3.9)	87.6 (1.6)
Methomyl	0.01	100.2 (2.2)	107.6 (4.2)	102.3 (2.3)	96.6 (3.4)	98.8 (2.7)
	0.5	100.1 (2.9)	99.7 (2.2)	101.0 (0.4)	102.4 (1.1)	100.8 (1.6)
Oxamyl	0.01	100.5 (3.1)	73.9 (4.1)	90.2 (5.6)	96.1 (6.1)	98.8 (6.0)
	0.5	103.8 (5.5)	94.2 (11.3)	83.7 (3.0)	94.3 (6.1)	85.6 (3.5)
Pirimicarb	0.01	110.6 (3.6)	110.2 (2.2)	106.1 (2.0)	113.0 (3.7)	119.6 (3.0)
	0.5	117.1 (1.2)	111.4 (3.8)	104.6 (1.9)	112.3 (4.1)	107.5 (2.7)

The values given outside the parenthesis are recovery (%) and those inside the parenthesis are C.V. (%). Calculated from mean values ($n=5$).

多く含む食品中のカーバメート系農薬の簡便かつ迅速な分析法を確立した。

3. 総括

現在の食品衛生検査体制から求められる分析法は、農薬や動物用医薬品が基準値を超して残留した食品が消費されてしまう前に発見できるよう、簡便かつ迅速である必要がある。これらを満たす理化学的検査法として、化合物の構造情報が得られる質量分析計を2台直列に配置したESI LC/MS/MSを測定装置に用い、イオン化抑制及び操作中の減損を補正することが可能な重水素標識体を内標準物質に用いることとした。また、試料精製法をできる限り簡便化し、分析条件を詳細に検討することにより、カーバメート系農薬の簡便かつ迅速な分析法の確立に成功した。これら一連の研究により開発した分析法は、従来の分析法と比較して、はるかに簡便かつ迅速であり、これらを食品の種類に応じて使い分けることにより、食の安全・安心を確保するための残留実態調査などへの応用も可能である。

平成18年5月よりポジティブリスト制が施行され、対象となる農薬及び動物用医薬品が大幅に増加した。そのため、今後、農薬及び動物用医薬品の食品への残留の問題はますます複雑になることが予想される。このような事態に対処するために、様々な

薬剤についての残留分析法が必要となるが、今回の一連の研究成果は、その分析法開発の一助となる知見であると確信している。

謝辞 本研究を推進するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました岐阜薬科大学衛生学教室永瀬久光教授に深く感謝申し上げます。さらに、本研究に際し、終始適切な助言を与えて下さるとともに、激励して下さいました金城学院大学薬学部岡尚男教授に篤くお礼申し上げます。最後に、愛知県衛生研究所猪飼誉友博士、同伊藤裕子博士、愛知医科大学近藤文雄准教授、星薬科大学薬品分析化学教室中澤裕之教授に厚くお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Goto T., Ito Y., Oka H., Saito I., Matsumoto H., Nakazawa H., *Anal. Chim. Acta*, **487**, 201–207 (2003).
- 2) Goto T., Ito Y., Oka H., Saito I., Matsumoto H., Sugiyama H., Ohkuo C., Nakazawa H., Nagase H., *Anal. Chim. Acta*, **531**, 79–86 (2005).
- 3) Goto T., Ito Y., Yamada S., Matsumoto H., Oka H., Nagase H., *Anal. Chim. Acta*, **555**, 225–232 (2006).

- 4) Goto T., Ito Y., Yamada S., Matsumoto H., Oka H., *J. Chromatogr. A*, **1100**, 193–199 (2006).
- 5) Ito Y., Goto T., Yamada S., Matsumoto H., Oka H., Takahashi N., Nakazawa H., Nagase H., Ito Y., *J. Chromatogr. A*, **1108**, 20–25 (2006).
- 6) Goto T., Ito Y., Yamada S., Matsumoto H., Oka H., Nagase H., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, 2651–2661 (2006).
- 7) U. S. Food and Drug Administration, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 121A–142A (1991).
- 8) Dogheim S. M., Alla S. A. G., El-marsafy A. M., *J. AOAC Int.*, **84**, 519–531 (2001).
- 9) Nunes G. S., Alonso R. M., Ribeiro M. L., Barcelo D., *J. Chromatogr. A*, **888**, 113–120 (2000).
- 10) Hau J., Riediker S., Varga N. Stadler R. H., *J. Chromatogr. A*, **878**, 77–86 (2000).
- 11) Takeda M., Kotanaka Y., Komatsu K., Maekawa Y., “Saishin Nouyaku no Zanyubunsekihou,” ed. by Nouyaku Zanryu Bunsekihou Kenkyuhan, Chuohoki Publishig Co., Ltd., Tokyo, 2006.
- 12) Straub R., Linder M. Voyksner R. D., *Anal. Chem.*, **66**, 3651–3658 (1994).
- 13) McLaughlin L. G., Henion J. D., Kijak P. J., *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 417–429 (1994).
- 14) Sheridan R. S., Meola J. R., *J. AOAC Int.*, **82**, 982–990 (1999).
- 15) Baumann C., Cintora M. A., Eichler M., Lifante E., Cooke M., Przyborowska A., Halket J. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 349–356 (2000).
- 16) Ito Y., Goto T., Oka H., Matsumoto H., Takeba K., *J. Chromatogr. A*, **1042**, 107–111 (2004).
- 17) Saito Y., Yamamoto A., Kodama S., Ohta M., Ohura T., Matsunaga A., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **41**, 321–325 (2000).
- 18) Soleas G. J., Yan J., Hom K., Goldberg D. M., *J. Chromatogr. A*, **882**, 205–212 (2000).
- 19) Murayama W., Kosuge Y., Nakaya N., Nunogaki Y., Nunogaki K., Cazes J., Nunogaki H., *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 283–300 (1988).
- 20) Oka H., Harada K., Ito Y., Ito Y., *J. Chromatogr. A*, **812**, 35–52 (1998).
- 21) Lee Y. W., Fang Q. C., Ito Y., Cook C. E., *J. Nat. Prod.*, **52**, 706–710 (1989).
- 22) Ito Y., *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 2131–2152 (1985).