

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

LC/MSによる残留農薬試験法に関する研究

分担研究者 永山敏廣 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 主任研究員

研究要旨

本研究では、LC/MSによる食品中残留農薬の確認方法及び定性・定量法の確立を目指している。今年度は、食品に残留した農薬の定性確認方法を検討し、定性条件の最適化を試みた。オキサミル、カルバリル及びメチオカルブについて標準品と当該農薬を残留した食品から得られた抽出試験液中の農薬のMSスペクトルを比較することにより、定性確認できることが明らかになった。

A. 研究目的

農作物に使用された農薬は、その一部が市場流通時の食品に残留し、食品とともに喫食されることがある。食品中に残留する農薬は、食品衛生法の食品規格で厳しく規制されている。平成11年3月1日現在、130種類以上の食品に対して179種類の農薬の基準が設定され（そのうち18種類は平成11年4月1日から適用される。）、残留量を試験して基準の遵守のチェックが行われている。

平成4年以前は、基準設定農薬数も26種類と少なく、有機塩素系農薬や有機リン系農薬など主な農薬の試験方法はガスクロマトグラフィー（GC法）によっていた。しかし、近年基準が設定された農薬は加熱分解されやすいものが多く、また、気化が困難な農薬もある。これら農薬は加熱気化して分離測定するGC法では精度良く測定できない。そこで溶媒に溶けた農薬をそのまま分離測定する高速液体クロマトグラフィー（HPLC法）による試験法が増えている。

食品から農薬が検出されたとき、食品成分や他の農薬との誤認を防ぐため、その農薬の定性確認が求められる。このとき、一般に質量分析法を用いて当該農薬を定性確認する。

現在、GCを用いるガスクロマトグラフィー質量分析法（GC/MS法）は、定性確認及び定量などの手法の研究が進み、すでに広く利用されている。しかし、今のところHPLC法による測定を行う農薬の確認方法はほとんど確立されていない。

一方、基準設定農薬179種類に係わる試験法は89通りあり、これら試験法をそのまま用いたのでは基準の遵守の確認に多くの手間と時間を要し、生鮮品の多くは病虫害などにより商品価値がなくなってしまう。あるいは、市場流通された生鮮品の多くはすでに消費されてしまう。従って、食品中の残留農薬をできる限り短時間で測定し、基準の遵守を確認できる超迅速分析法の開発が望まれる。このときGC法を利用した超迅速分析法は、検出器に質量分析計を用いて100~200種類の農薬を同時に試験する方法が報告され、さらに実用化への検討が進められている。しかし、HPLC法を利用した方法については、数種類の農薬を一斉に分析する手法に限られており、また、広く利用される検出器（紫外外部吸収検出器、フォトダイオードアレイ検出器など）の選択性がやや劣ることなどから煩雑な精製処理などの前処理が必要であり、迅速化が困難な状

況である。

最近、HPLCの検出器として汎用型の質量分析計 (MS) が開発され、高速液体クロマトグラフー質量分析計 (LC/MS) の利用が容易になってきた。その利用による農薬の確認や多成分を対象とした迅速分析の可能性が示唆されるようになった。

そこで今回、LC/MSによる農薬の検出感度、及び実試料から検出された農薬の確認手段としての適用の可能性を検討し、HPLC試験における確認手法の確立を試みた。さらに今後、定性・定量を目指した迅速分析への応用を図るための試験を実施する予定である。

B. 研究方法

1. 対象農薬

現在HPLC法を用いて試験する農薬のうち、多くの検査機関で試験されているカルバメート系農薬について残留実態を調査し、市販食品から実際に検出されたオキサミル、カルバリル及びメチオカルブの3種類の農薬を対象とした。

2. 試料

サニーレタス (検出農薬及び残留量; オキサミル: 0.04ppm、以下同様)、米 (カルバリル: 0.02ppm)、オクラ (カルバリル: 0.01ppm)、オレンジ (メチオカルブ: 0.03, 0.04, 0.05ppm) 及び加工品 (カルバリル: 0.01ppm) の7試料を対象とした。

3. 機器

(1) カルバメート分析用機器: 島津製作所製 LC-10A 蛍光検出器付きポストカラムシステム

(2) LC/MS: LC部 日本分光製 GULLIVER900シリーズ、MS部 マイクロマス社製 PLATFORMII

4. 試験方法

(1) 残留実態調査

平成7年8月14日厚生省告示第161号、アルジカルブ、エチオフエンカルブ、オキサミル、

カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ及びベンダイオカルブ試験法に準じた。

(2) LC/MSの測定

大気圧化学イオン化 (APCI) 又はエレクトロスプレイイオン化 (ESI) によりイオン化して測定した。

C. 研究結果

平成10年度は、LC/MSによる農薬の定性確認方法を検討した。オキサミル、カルバリル、メチオカルブについて定性条件の最適化を試み、APCI及びESIのいずれの手法を用いても、10ng以下の注入で良好なMSクロマトグラムが得られた。

LC/MSの測定は、以下の条件で行った。

カラム: TSK-GEL(TOSOH)

3.2mm i.d. × 15cm

カラム温度: 40°C

移動相: CH₃CN:H₂O(70:30)

流速: 0.10又は0.15mL/min

注入量: 20μL

スプリット(ESI): 1:10

イオン化モード: APCI⁺又はESI⁺

cone電圧: 15V

1. オキサミル

1 μg/mL濃度の標準溶液が感度良く測定できた (図1、2)。オキサミルの分子イオン (m/z=219) は小さいものの、擬分子イオン ((M+N a)⁺; m/z=242) が強度高く現れ、メチルカルバモイルオキシ部が解離したフラグメントイオン (m/z=163) も観察できた。

実試料への応用として、HPLC法による測定で0.04ppm検出されたサニーレタスの抽出試験液からオキサミルの確認を試みた (図3、4)。標準品から得られたMSスペクトルと良く一致したスペクトルが得られ、擬分子イオン及びフラグメントイオンなどが観察された。

2. カルバリル

ESI-MSで、カルバリルの分子イオン ($(M+H)^+$; $m/z=202$) とメチルカルバモイルオキシ部が解離したフラグメントイオン ($m/z=145$) が高い強度で観察された (図5、6)。

実試料では、米 (検出量: 0.02ppm; 以下同様)、オクラ (0.01ppm) 及びトマトとリンゴを原料とした加工品 (0.01ppm) からの確認を試みた (図7、8)。標準品から得られたMSスペクトルと同じ分子イオン及びフラグメントイオンなどが得られた。

3. メチオカルブ

ESI-MSで、 $1\mu\text{g/mL}$ 濃度の標準溶液が感度良く測定できた (図9、10)。メチオカルブの分子イオン ($(M+H)^+$; $m/z=226$) が高い強度で現れ、他のイオンはほとんど観察されなかった。

実試料への応用として、HPLC法による測定で0.03~0.05ppm検出されたオレンジ (全果) からの確認を試み、分子イオンを捕らえることができた (図11、12)。

D. 考察

1. 対象農薬について

オキサミル (図13) は殺虫、殺線虫作用を有するオキシムカルバメート系農薬のひとつで、わが国では1981年に登録され、ジャガイモ、ナス、キュウリ、トマト、レタス、ダイコンなどの野菜やスイカ、メロンなどの果実のアザミウマ類、アブラムシ類、線虫などの防除に利用されている。平成4年10月27日厚生省告示第239号により多くの種類の穀類、豆類、野菜、果実及び種実類などに0.02~5.0ppmの基準値が設定された。試験法は当初GC法であったが、平成6年6月9日厚生省告示第199号によりHPLC法に改正された。

カルバリル (NAC; 図14) は殺虫作用を有するカルバメート系農薬のひとつで、わが国では昭和34年に登録され、イネやキャベツ、ハ

クサイなどの野菜、ミカン、リンゴ、ブドウ、モモなどの果実のウンカ、ヨコバイ類やコナカイガラムシ、ハマキムシ類などの防除に利用されている。また、リンゴへの摘果効果が認められており、植物成長調整剤としても昭和41年に登録された。昭和46年12月20日厚生省告示第404号及び昭和50年11月7日厚生省告示第309号により米、だいこん類、はくさい、キャベツ、ほうれんそう、みかん、なつみかん、りんご、日本なし、もも、ぶどう、かき及び茶に1.0ppm、ばれいしょに0.1ppmの基準値が設定された。試験法は当初比色法であったが、平成7年8月14日厚生省告示第161号によりHPLC法に改正された。

メチオカルブ (図15) は殺虫作用を有するカルバメート系農薬のひとつで、わが国では登録されていない。平成6年6月9日厚生省告示第199号により多くの種類の穀類、豆類、野菜、果実及び種実類などに0.05~3.0ppmの基準値が設定された。試験法は、原体の他スルホキシド及びスルホン体を含めてHPLC法により測定する方法が採用されている。

2. 食品中残留農薬分析にLC/MSを利用した報告例

食品中の残留農薬を、LC/MSを用いて分析した報告例は少ない^{1)~3)}。

Chao-Hong Liu ら¹⁾は、果実及び野菜中のアルジカルブ、ベンフラカルブ、メチオカルブなどのカルバメート系農薬やジウロン、リニュロンなどの尿素系農薬、その他フェンバレレートやイプロジオンなど合わせて19種類の農薬をLC/サーモスプレイ-MSで分析した。リンゴ、レタス、トマトなどに、試料中濃度が0.5ppmになるように添加し、アセトン抽出によるLuke法を応用して試料を調製したときの回収率は、ジウロン、リニュロン、フェンバレレート、イプロジオンなど多くの農薬で69~110%、カルボキシシンで33~54%であった。

アルジカルブ、アルジカルブスルホキサイド、メソミル、オキサミル及びチオジカルブは、検出限界が1.0ppmであり、検出できていない。

K. A. Barnes ら²⁾は、マッシュルーム中のジフルベンズロンをLC/APCI-MSを用いて測定した。試料中濃度が0.06~0.58ppmとなるように添加し、アセトンで抽出した後GPCにより精製して測定したときの回収率は53~107%、平均85.5%であった。検出限界は0.02ppmであった。

K. A. Barnes ら³⁾は、トマト、キュウリ及びバナナ中の酸化フェンブタズをLC/APCI-MSを用いて測定した。試料中濃度が0.5ppmとなるように添加したときの回収率は80~88%であり、検出限界は0.01~0.02ppmであった。

これら報告では、多くの食品及び農業を対象としたときは検出感度が悪く、実試料への適用が困難である。高感度での測定は、特定の対象食品中の単成分分析への応用例に限られていた。

3. LC/MSによる定性確認

今回測定対象としたオキサミル、カルバリル及びメチオカルブは、いずれも比較的加熱分解されやすい農業である。従って、GC/MS法では、GC注入口で分解されるため分子イオンの検出が困難であり、また、低濃度時の確認はほとんどできなかった。LC/MSの導入により、良好な分子イオン又は擬分子イオンが補足され、確実に確認できるようになった。

農業が微量検出された実試料から抽出した農業についても、標準品で観察された分子イオンあるいは擬分子イオンが得られ、告示試験法における確認手法として十分に利用できることがわかった。

サニーレタスから検出されたオキサミルは、基準値の1/25のレベルであったが、擬分子イオン及びフラグメントイオンなど標準品から得られたMSスペクトルと良く一致したスペク

トルが得られ、確認手法として十分に利用できることが示された。

米から検出されたカルバリルは、基準値の1/50のレベルであったが、分子イオン及びフラグメントイオンなど標準品から得られたMSスペクトルと同様のスペクトルが得られた。オキサミルの場合と同様、確認手法として十分活用できることがわかった。また、オクラやトマトとリンゴを原料とした加工品から定量限界値のレベルで検出されたカルバリルも、目的とする分子イオン及びフラグメントイオンを補足できた。加工品は、生鮮品と異なり副原料が多く、原料由来の成分による妨害を受けやすい。今回の結果により、妨害成分を多く有する試料への適用も可能であり、ほとんどの食品に適用できることが示唆された。

オレンジから検出されたメチオカルブは、基準値である0.05ppm及びそれ以下のレベルでの確認を試みた。オレンジは妨害成分を多く有することや基準値が低いことなど、比較的確認が難しい試料である。今回、試料からの妨害成分が多く、MSスペクトル上に多くのピークが見られたが、いずれの試料も分子イオンが確実に捕らえられており、確認手法として十分利用できた。

E. 結論

LC/MSによる農業の定性確認方法を検討した。オキサミル、カルバリル及びメチオカルブについて、標準品とこれら農業を残留した実試料からの抽出試験液のスペクトルを比較したところ、良く一致するスペクトルが得られ、LC/MSにより定性確認できることが明らかとなった。

参考文献

(1) C.Liu, G.C.Mattern, X.Yu, R.T.Rosen and J.D.Rosen: J. Agric. Food Chem. 39,

718-723 (1991).

(2) K.A.Barnes, J.R.Startin, S.A.Thorpe, S.L.Reynolds and R.J.Fussell : Journal of Chromatography A 712, 85-93 (1995).

(3) K.A.Barnes, R.J.Fussell, J.R.Startin, H.J.Mobbs, R.James and S.L.Reynolds : Rapid-Commun-Mass-Spectrom. 11(2), 159-164 (1997).