

3) 農作物及び土壌中のニテンピラム, CPMA 及び CPMF 分析法の検討

吉田 達雄 飛野 敏明

要 旨

簡易分析法の確立を目的として、含水アセトニトリル抽出から LC/MS/MS 測定により、ニテンピラム及びその代謝物である CPMA と CPMF を同時に分析する方法の検討を行った。農作物試料として玄米, なす, メロン及びみかん, また土壌試料として黒ボク土壌を用いて添加回収試験を行った結果, 農作物試料について平均回収率 99~102%, 土壌試料について 72~89%の結果が得られた。

キーワード：ニテンピラム, CPMA, CPMF, 農作物, 土壌

はじめに

本研究所においては、食の安全安心確保のため、食品中の残留農薬分析を行ってきた^{1,2)}。さらに食の安全安心に関わる環境汚染リスク管理のため、土壌中の農薬分析法の開発を行ってきた^{3~5)}。

食品及び環境試料中の残留農薬においては、その代謝物にも強い活性を有するものがあり、代謝物も併せて分析を行う必要がある農薬成分が存在する。農薬成分の中で、ニテンピラムは厚生労働省食品規格によりニテンピラムと2種の代謝物2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸(以下「CPMA」という。)及びN-(6-クロロ-3-ピリジ

ルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン(以下「CPMF」という。)の含量で値を求めることとなっている⁶⁾。厚生労働省通知試験法では、親化合物であるニテンピラムと代謝物のCPMA及びCPMFについて分析を行い、CPMA及びCPMFは、最終的にN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチルホルムアミド(以下「CPF」という。)に変換して定量し、ニテンピラムに換算することとなっている⁶⁾。この分析法は、図1に示すように、CPMAとCPMFを加水分解後、誘導体化して同一化合物として測定しているのので、各代謝物の残留量を把握できない欠点があり、さらに手法が煩雑で、試薬や精製カラムなど使用する機材も多く、大変困難な分析法で

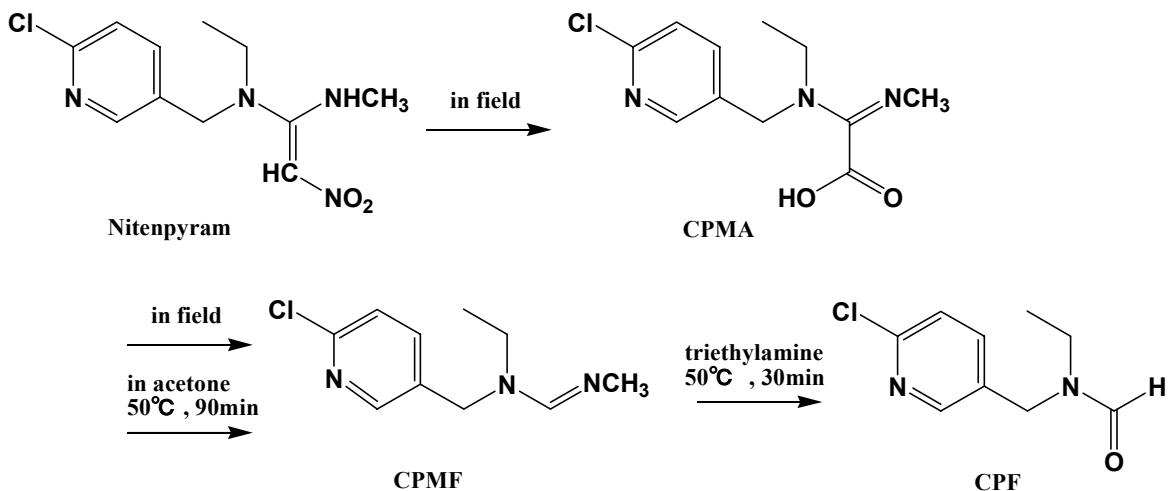


図1 ニテンピラム、CPMA、CPMF 及び CPF の構造

ある。代謝物を個別に分析することは、農薬成分の動態を把握するために重要であるため、様々な分析機関において、簡易個別分析法の検討が行われているが、開発には至っていない。これは、CPMAがアセトンや酢酸エチル中において、容易にCPMFに変換してしまうためと考えられている⁷⁾。津村らによるとCPMA 10 μ gを蒸留水20ml及びアセトン150mlで希釈してロータリーエバポレーターにて濃縮したところ、80.4%がCPMFに変化し、CPMAとして検出されたのは9.0%に過ぎず、CPMAとCPMFを分別定量するのは困難であるとしている⁸⁾。試料から抽出操作において、溶媒が必要であり、多くの分析法では、濃縮操作を伴うため、CPMAの分析は困難である。

本研究において、含水アセトニトリルを用いた超音波抽出法により、様々な農薬成分や試料に対して、良好な結果を得られている¹⁾。この方法は、抽出溶媒に含水アセトニトリルを用いるため、溶媒の割合が低く、更に濃縮操作が不要な方法である。そこで、これらの知見をもとに、農作物及び土壌中のニテンピラム、CPMA及びCPMFを簡易個別に分析する方法の確立を目的として、標準品添加回収試験により、検討を行った。また、検討において、抽出溶媒として用いる含水アセトニトリル中でのCPMAのピーク形状についても調べた。試料として農作物4種類（玄米、なす、メロン及びみかん）及び土壌1種類（黒ボク土壌）について検討を行った結果、良好な結果が得られたため、報告する。

実験方法

1 試料の調製

分析対象農薬であるニテンピラム、CPMA及びCPMFが不検出であることを確認した玄米、なす、メロン、みかん及び黒ボク土壌を試料とした。玄米については、フードミルで粉砕した。なす、メロン及びみかんについては、フードカッターで細切化し、さらにホモジナイザーにより均質化を行った。土壌試料については、金属ヘラで砕き、時々攪拌しながら5日間静置して風乾したものをふるいにかけて2mm以下に調製した。

2 分析方法

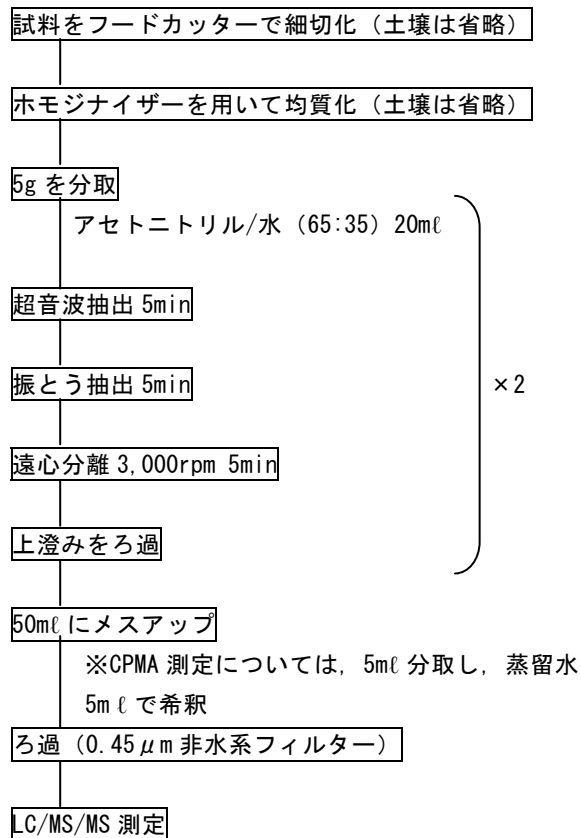


図2 分析方法のフロー

3 LC/MS/MS測定条件

LC: Waters2795(Waters),MS/MS: Quattro Premier(Waters),
カラム: Symmetry shield4.6 \times 100mm, 3.5 μ m (Waters),
移動相: A液(水) B液(メタノール) C液(500mM 酢

表1 LC/MS/MSグラジエント条件

時間 (min)	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)	流速 (ml/min)
0	94	5	1	0.2
3	94	5	1	0.2
3.01	49	50	1	0.2
15	19	80	1	0.2
25	1	98	1	0.2
35	1	98	1	0.2
35.01	0	100	0	0.2
40	0	100	0	0.2
40.01	94	5	1	0.5
60	94	5	1	0.5

表 2 LC/MS/MS 測定条件

	分子量	ESI	MRM trace (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
ニテンピラム	270.08	+	270.66>125.62	25	25
CPMA	255.70	+	256.18>126.12	20	25
CPMF	211.69	+	212.30>126.33	35	20

酸アンモニウム), グラジエント条件: 表 1 のとおり, カラム温度: 40°C, 注入量: 20µl, イオン化方法: ESI, 測定: MRM(表 2 のとおり), キャピラリー電圧: 3.45kV, ソース温度: 120°C, デゾルベーション温度: 350°C, デゾルベーションガス流量: 1,000l/h, コーンガス流量: 100l/h

4 CPMA クロマトグラムのピーク形状

極性の高い CPMA は, 水溶性が非常に高いため, 最終検液中の有機溶媒組成によって, ピーク形状が変化することが考えられる。ピーク形状の変化は, 定量分析の弊害となるため, 有機溶媒組成による CPMA 標準品のクロマトグラムピーク形状を比較し, 最適な溶媒条件を調べた。比較はアセトニトリル/水について, (0:100), (25:75), (50:50), (75:25) 及び (90:10) の割合で標準溶液を調製して行った。

5 添加回収試験

1 で調製した試料 5g にニテンピラム, CPMA 及び CPMF をそれぞれ試料中で 0.05mg/kg になるように添加, 30 分間放置後, 2 の分析方法により, 3 回の繰り返し測定を行った。また標準品の調製は, ニテンピラム及び CPMF はメタノール, CPMA は蒸留水を用いて行った。検量線用の標準溶液は, 農薬成分無添加試料抽出液を使用してマトリックス一致標準溶液により作製した。

結果及び考察

1 CPMA クロマトグラムのピーク形状

標準溶液の溶媒組成の違いによる CPMA 標準品のクロマトグラムピーク形状変化について, 図 3 に示した。アセトニトリル含有量が少ないほど, クロマトグラムピーク形状が良好になった。また, アセトニトリル含有量が 50%以上になるとクロマトグラムピークの解離が見られる。これは CPMA が高極性化合物であるため, 標準溶液中の水とアセトニトリルへの分配割合により, 水に溶解するものとアセトニトリルに溶解す

るものに分離し, この状態で分離カラムに負荷された

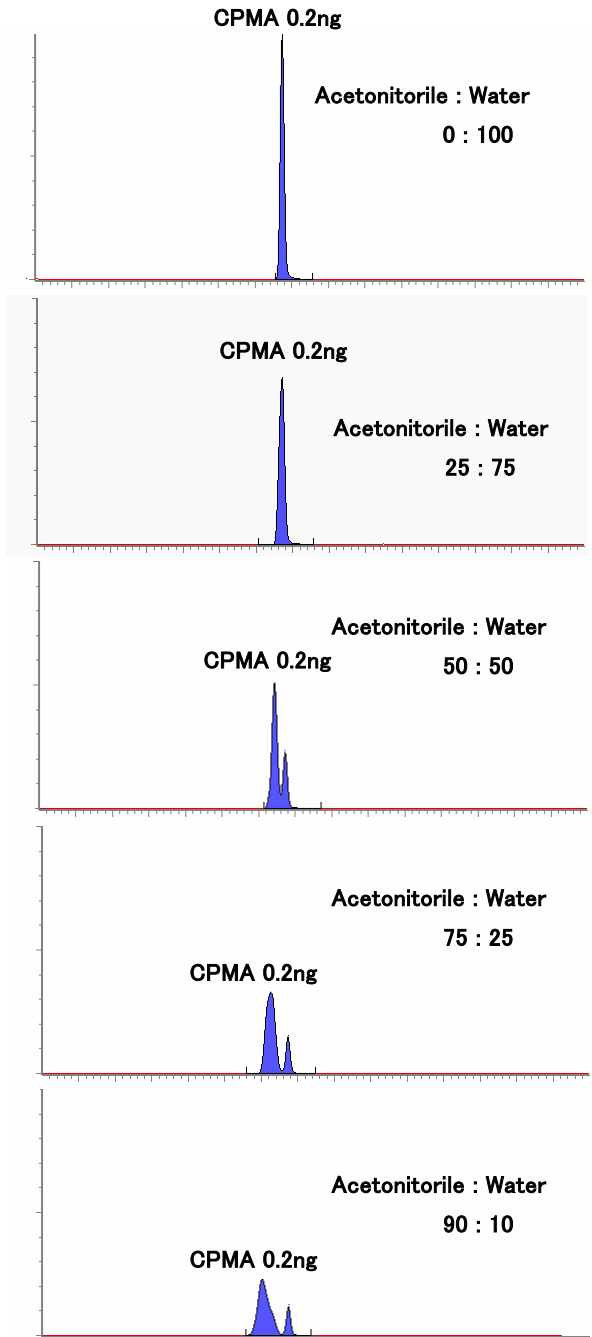


図 3 CPMA 標準品の MRM クロマトグラムピーク形状比較

表3 添加回収試験結果

農薬成分名	玄米		なす		メロン		みかん		土壌	
	平均 (%)	RSD (%)	平均 (%)	RSD (%)	平均 (%)	RSD (%)	平均 (%)	RSD (%)	平均 (%)	RSD (%)
ニテンピラム	99	1.8	99	1.7	100	4.2	99	1.4	89	5.4
CPMA	100	0.4	99	1.3	99	1.2	99	1.2	72	4.9
CPMF	99	2.6	99	1.3	100	0.2	102	0.3	80	3.5

とき、このアセトニトリルが水より早く流出していくため、引き起こされる現象と考えられる。そのため図2で示した分析法では、最終検液中のアセトニトリル含有量は65%となり、アセトニトリル含有量が50%を超え、CPMAのピークは解離する。よって、最終検液中のアセトニトリル含有量を低下させる必要があり、CPMA測定については、最終検液を5ml分収し、これを蒸留水5mlで希釈して、最終検液とした。このとき、最終検液中のアセトニトリル含有量は、約33%となり、このときクロマトグラムピークの解離は見られなかった。

2 添加回収試験

ニテンピラム、CPMA及びCPMFについて、農作物4種類、土壌1種類を試料として行った添加回収試験結果を表3に示す。農作物の平均回収率は、ニテンピラムで99~100%、CPMAで99~100%、CPMFで99~102%となった。土壌については、ニテンピラムが89%、CPMAが72%、CPMFが80%となり、農作物に比べて10~30%程度低い値となった。農薬成分は土壌中に含まれる有機炭素成分に強く吸着することが知られており⁹⁾、今回試料として用いた土壌は、有機炭素含量が7.4%と高いため、農薬成分と強く吸着し、超音波及び振とう抽出では、農作物試料に比べて、低回収率であったと考えられる。しかし農薬成分の添加回収試験において回収率の許容範囲の目安とされる値は70~120%^{10), 11)}であり、これは、今回すべての農薬成分及び試料について満たすものであった。

まとめ

含水アセトニトリル抽出からLC/MS/MS測定を用いてニテンピラム及びその代謝物であるCPMA、CPMFを同時に分析する方法を検討した。その中で、CPMA

については最終溶液の含水率を上昇させることによりクロマトグラムピークの解離を防ぐことが可能となった。また農作物試料4種類（玄米、なす、メロン及びみかん）、土壌試料1種類（黒ボク土壌）に対して添加回収試験を行った結果、農作物試料で平均回収率99~102%、土壌試料で72~89%であった。この方法は、通知試験法に示された加水分解、誘導体化や精製カラム操作を必要とせず、簡易で迅速な方法である。

文献

- 1) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝兵, 吉元秀和, 飛野敏明: 第31回農薬残留分析研究会講演要旨集, 150-165(2008).
- 2) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝兵, 吉元秀和, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 38, 40-50(2008).
- 3) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝兵, 吉元秀和, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 38, 51-57(2008).
- 4) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝兵, 吉元秀和, 飛野敏明: 第32回農薬残留分析研究会講演要旨集, 173-179(2009).
- 5) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝兵, 吉元秀和, 飛野敏明: 分析化学, 58, 931-935(2009).
- 6) 厚生労働省: 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知, 食安発第0124001号, 平成17年1月.
- 7) 小林祐子: 分析化学, 58, 985-997(2009).
- 8) 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 柿本芳久, 田中雄三, 柴田正: 食衛誌, 39, 127-134(1998).
- 9) 鍬塚昭三, 山本広基: “土と農薬”, p.84-97(1998), (日本植物防疫協会).
- 10) 厚生省: 厚生省生活衛生局食品保健課長通知, 衛食第117号, 平成9年4月.
- 11) 環境省: “化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版)”, p.119(2009).