

## ジチオカルバメート迅速スクリーニング法の開発

○安藤 孝<sup>1</sup>、小西賢治<sup>2</sup>、市来弥生<sup>1</sup>、佐々野僚一<sup>2</sup>、今井沙紀<sup>3</sup>、杉立久仁代<sup>4</sup>、  
穴沢秀峰<sup>4</sup>、坂 真智子<sup>5</sup>、関口博史<sup>3</sup>、石渡 智<sup>3</sup>

[<sup>1</sup>(一社)食の安全分析センター、<sup>2</sup>(株)アイスティサイエンス、<sup>3</sup>ホクレン農業協同組合連合会、<sup>4</sup>アジレント・テクノロジー(株)、<sup>5</sup>(一財)残留農薬研究所]

### 【目的】

ホクレン農業協同組合連合会が開発したジチオカルバメート系農薬迅速分析法<sup>1),2),3)</sup> (以下、ホクレン LC 法) は、試料溶媒中でメチル化し、QuEChERS 法を基に溶媒転溶を行うことを特徴とした、スクリーニングに有用な迅速試験法である。

今回、ホクレン LC 法の迅速な前処理を生かしつつ、GC-MS/MS で測定するための精製工程を検討した (以下、ホクレン STQ-GC 法)。また、ジチオカルバメート系農薬が実残留した農産物を用いて、通知試験法やホクレン LC 法と比較したので報告する。

### 【方法】

#### 1. 精製工程の検討

ホクレン LC 法はアセトニトリルによる抽出であるため、残留農薬迅速一斉分析 STQ-GCB 法による精製を行なうことで、GC-MS/MS へ注入可能なアセトン/ヘキサン混液に転溶するとともに、固相抽出による精製を行うこととした。

##### 1) C18 ミニカラムによる保持

C18 ミニカラムは、無極性夾雑物を除去できるほか、溶媒の極性を高めることで目的物質を保持させることが可能である。抽出液に NaCl 溶液を混合し、ジチオカルバメート系代謝物 3 種が保持される溶媒比率を検討した。

##### 2) PSA ミニカラムによる精製

C18 に保持したジチオカルバメート系代謝物 3 種を溶出する際に、PSA による精製を行うことで、C18 では除去しきれない極性、イオン性夾雑物の除去が可能となる。溶出溶媒のアセトン/ヘキサン比率による目的物質の溶出挙動を調査した。

#### 2. ジチオカルバメート系農薬が実残留した農産物での定量性比較

エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル (EBDC) として測定する農薬成分が実残留しているキンカンを用いて、図 1 のとおり定量した。

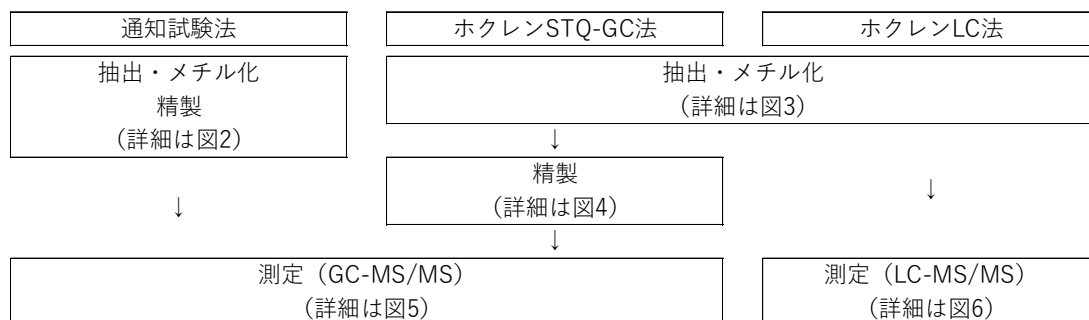


図 1 試験法の精度比較実験フロー

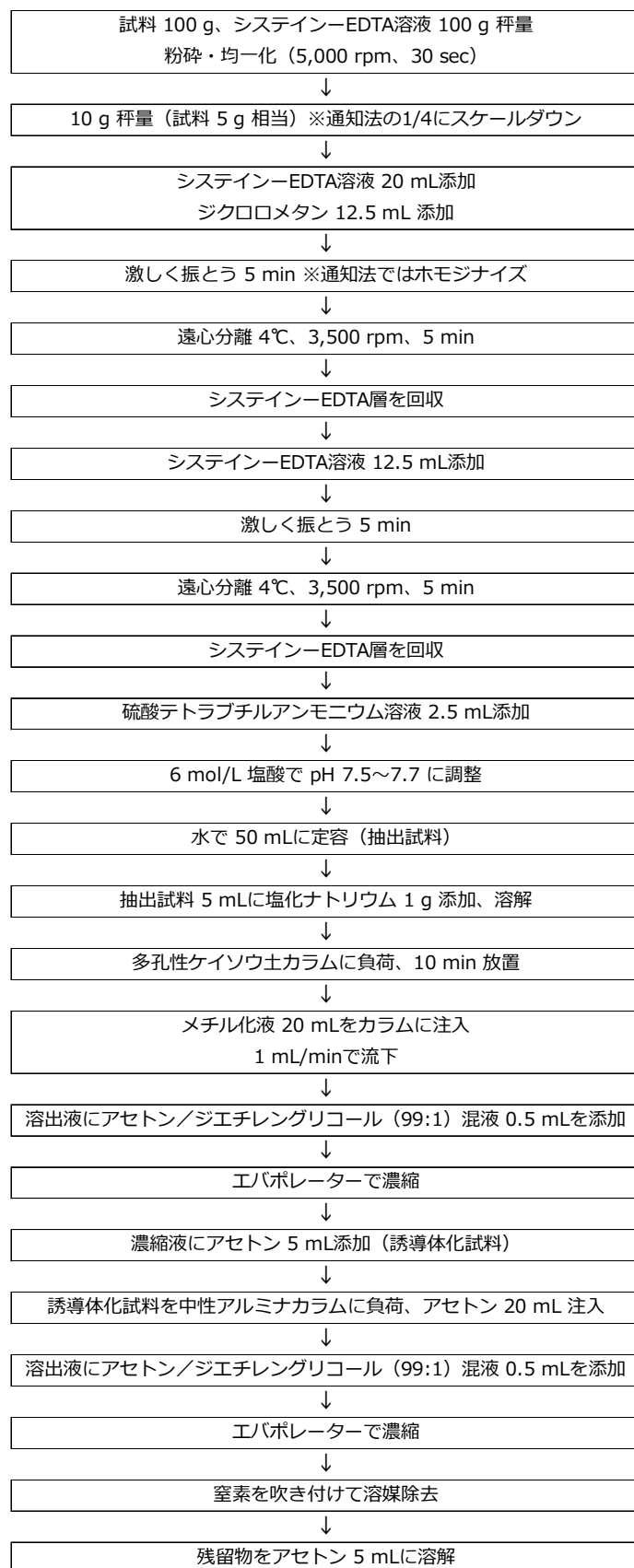


図 2 通知試験法の前処理フロー

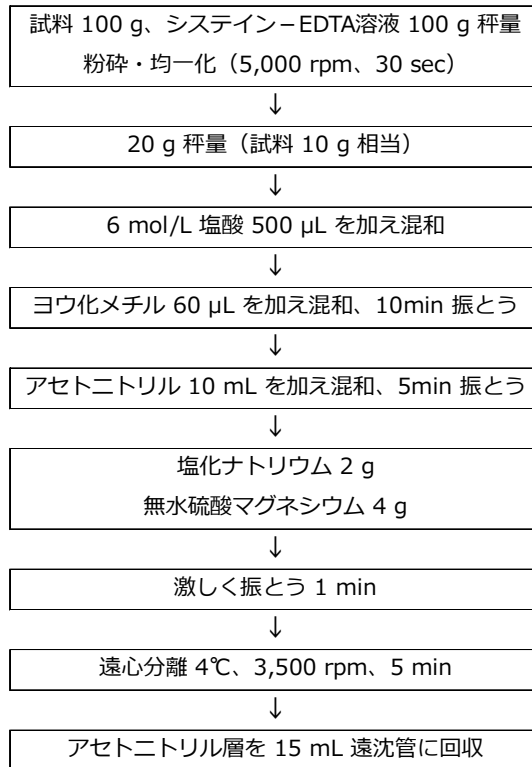


図3 ホクレンSTQ-GC法及びホクレンLC法の抽出・メチル化フロー

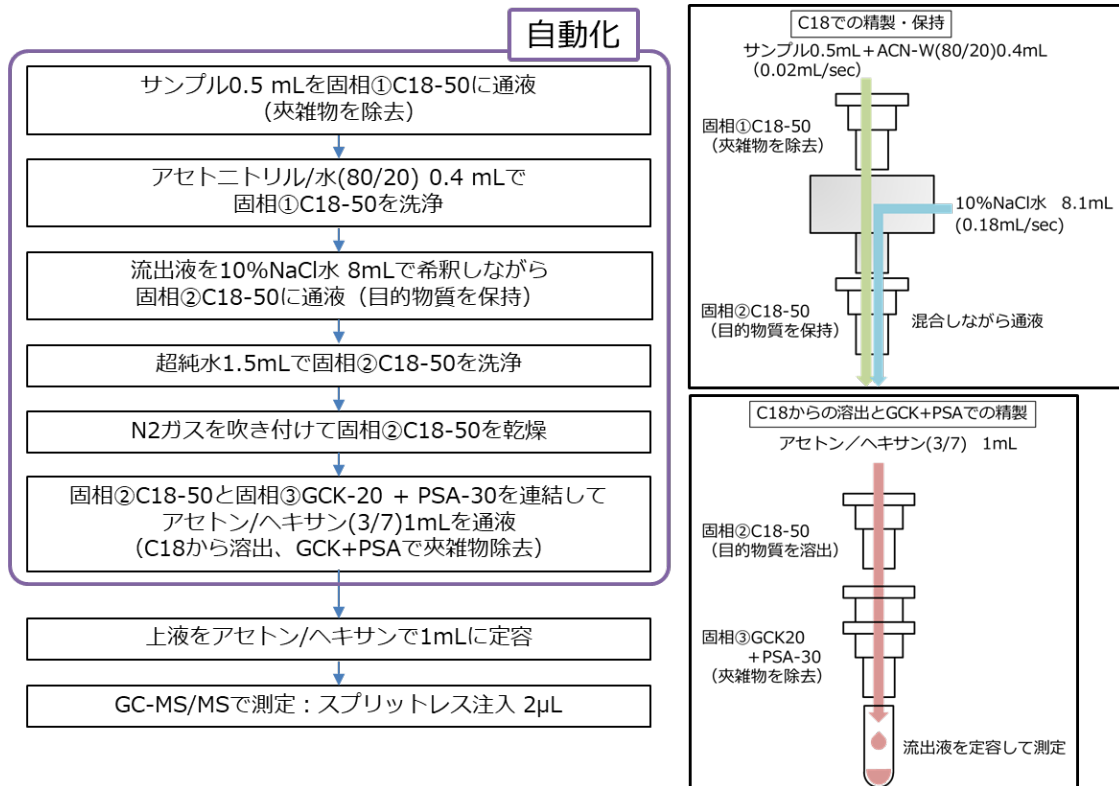


図4 ホクレン STQ-GC 法の精製フロー

GC	7890B(アジレント・テクノロジー)
カラム	VF-5MS 30m×0.25mm I.D., 膜厚0.25 μm(アジレント・テクノロジー)
オープン温度	60°C(3min)-10°C/min-125°C -25°C/min-300°C (2.5min) (total 14分)
注入口温度	250°C
ライナー	シングルテーパ ウルトライナートライナー ガラスウール入り
注入方法	パルスドスプリットレス(170kPa, 1分) 2 μL注入
トランスファーライン温度	290 °C
キャリアガス流量	1.0mL/min (コンスタントフロー)
コリジョンガス	N <sub>2</sub> 1.5ml/min
ヘリウムクエンチガス	2.25ml/min
MS	7000C(アジレント・テクノロジー)
測定モード	MRM
イオン源温度	250°C
四重極温度	150°C

	DBDC	PBDC	EBDC
定量イオン	135>88 10V	158>86 10V	144>72 8V
確認イオン	135>73 35V	158>88 24V	144>88 20V

図 5 通知試験法及びホクレン STQ-GC 法における GC-MS/MS 測定条件

HPCL	NexeraX2(島津製作所)
注入量	5 μl
カラム	SimPack FC-ODS 3 μm 2mm×150mm(島津製作所)
オープン温度	40 °C
移動相	A: 5mM 酢酸アンモニウム水溶液、B: 5mM 同メタノール溶液
流量	0.3 ml/min
グラジエント条件	B%(min) = 10(0)→10(1.5)→60(7.5)→60(12)→90(12.01)→90(15)→10(15.01)→10(22)
MS	LCMS-8040(島津製作所)
MRM	DMDC(+): 136 > 88, 73 EBDC(-): 239 > 58, 191 PBDC(-): 253 > 58, 205

図 6 ホクレン LC 法における LC-MS/MS 測定条件

## 【結果および考察】

### 1. 精製工程の検討

#### 1) C18 ミニカラムによる保持

サンプルをアセトニトリル/水 (80/20, v/v) で1段目のC18固相カートリッジに通液することで夾雑物を除去し、その後、10%NaCl水を混合することで2段目のC18固相カートリッジに農薬成分を保持する工程において、全流量中のアセトニトリル比率による保持効果の変化を調べた。

サンプル 0.5 mL をアセトニトリル/水(80/20) 0.4 mL (0.02mL/sec) で通液し、10%NaCl水 8.1 mL (0.18mL/sec) を混合 (全流量中のアセトニトリル比率 10%) したときに保持が最も良好であった (図7)。

10%のピーク面積値を  
100とした面積比

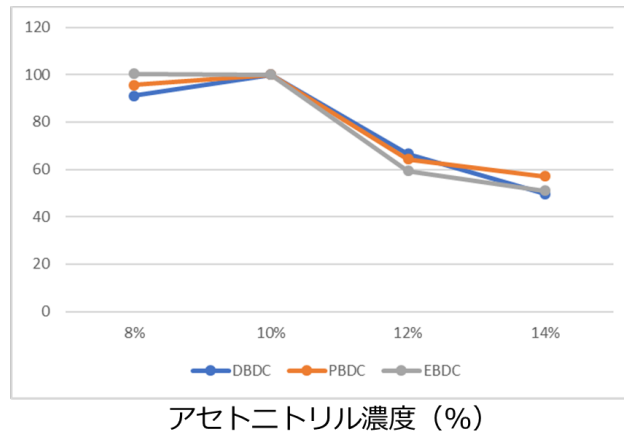


図7 C18固相カートリッジへの保持条件の検討

#### 2) PSA ミニカラムによる精製

GCK+PSA固相カートリッジでの通液溶媒のアセトン/ヘキサン比率を変化させたところ、アセトン比率が増えるほど、農薬成分の溶出量が増え、アセトン/ヘキサン (3:7, v/v) でほぼ全量溶出した (図8)。

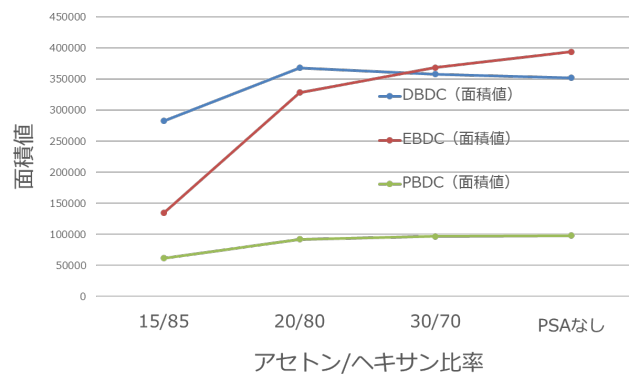


図8 GCK+PSA固相カートリッジでの溶出条件の検討結果

### 3) 添加回収試験

上記 1), 2) で検討した最適条件にてオレンジを用いた添加回収試験を行ったところ、表 1 のとおり、良好な回収率が得られた。

表 1 ホクレン STQ-GC 法での添加回収試験結果 (オレンジ)

サンプル検体	MRMによるピーク面積値		
	DBDC	PBDC	EBDC
ST	595,724	199,627	908,739
添加 1	646,826	213,771	939,190
回収率, %	109	107	103

### 2. ジチオカルバメート系農薬が実残留した農産物での定量性比較

表 2 のとおり、ホクレン LC 法及びホクレン STQ-GC 法は、通知試験法に比べて高くなる傾向が見られたが、その要因は、農産物に含まれる脂質や糖類によるものと推察され、このことについては、今後も検討していく。

表 2 各試験法での実残留試料の定量結果

	EBDC		
	通知試験法	ホクレンLC法	ホクレンSTQ-GC法
1回目	3.8	3.8	4.2
2回目	3.3	3.8	4.1
3回目	3.4	4.1	3.8
平均(ppm)	3.5	3.9	4.0
RSD(%)	7.2	4.5	5.5

#### 【まとめ】

ホクレン STQ-GC 法は、ホクレン LC 法同様、平均値、RSD 共に良好であった。また、固相抽出による精製工程が入るが、自動前処理装置を使用することで自動化できることから、スクリーニングにおいて有用な試験法であると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) 石渡智、関口博史：農産物中ジチオカーバメート系農薬の迅速分析法の検討、第 110 回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2015)
- 2) 石渡智、関口博史：農産物中ジチオカーバメート系農薬の迅速分析法の検討 (第二法)、第 111 回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2016)
- 3) S.Ishiwata,S.Imai:Simplified Method for the Determination of Dithiocarbamates in Agricultural Products by LC-MS/MS,12<sup>th</sup> European Pesticide Residue Workshop, Programme & Book of Abstracts,p.130-131 (2018)

# ジチオカルバメート迅速スクリーニング法の開発

○安藤 孝<sup>1</sup>、小西賢治<sup>2</sup>、市来弥生<sup>1</sup>、佐々野僚一<sup>2</sup>、今井沙紀<sup>3</sup>、杉立久仁代<sup>4</sup>、穴沢秀峰<sup>4</sup>、坂 真智子<sup>5</sup>、関口博史<sup>3</sup>、石渡 智<sup>3</sup>  
 [1(一社)食の安全分析センター、2(株)アイスティサイエンス、3ホクレン農業協同組合連合会、4アジレント・テクノロジー(株)、5(一財)残留農薬研究所]

## 目的

ホクレン農業協同組合連合会が開発したジチオカルバメート系農薬迅速分析法<sup>1),2),3)</sup> (以下、ホクレンLC法)は、試料溶媒中でメチル化し、QuEChERS法を基に溶媒転溶を行うことを特徴とした、スクリーニングに有用な迅速試験法である。ホクレンLC法の迅速な前処理を生かしつつGC-MS/MSで測定するための精製工程を検討した(以下、ホクレン+STQ-GC法)。また、ジチオカルバメート系農薬が実残留した農産物を用いて、通知試験法やホクレンLC法と比較した。

## 分析フロー

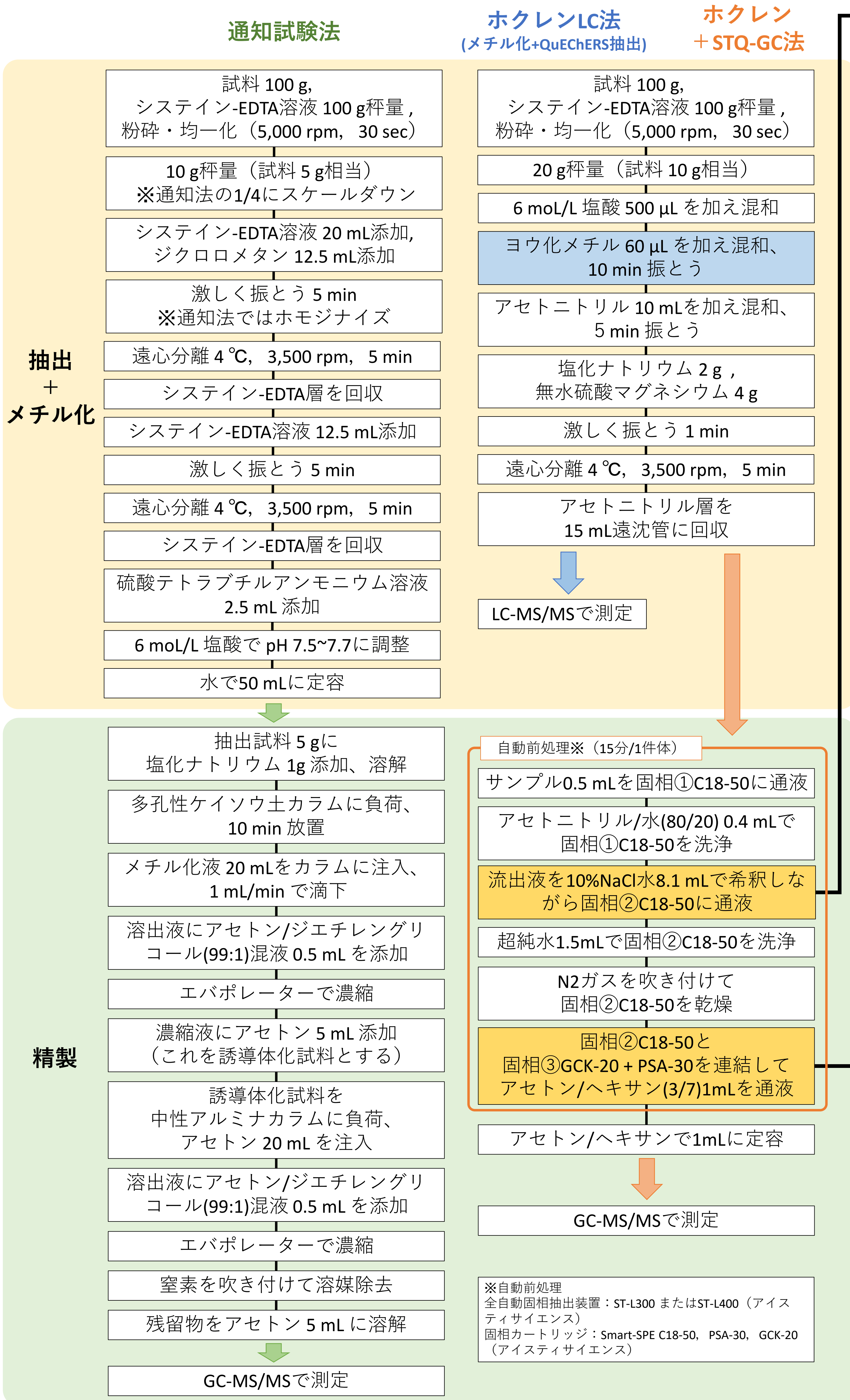
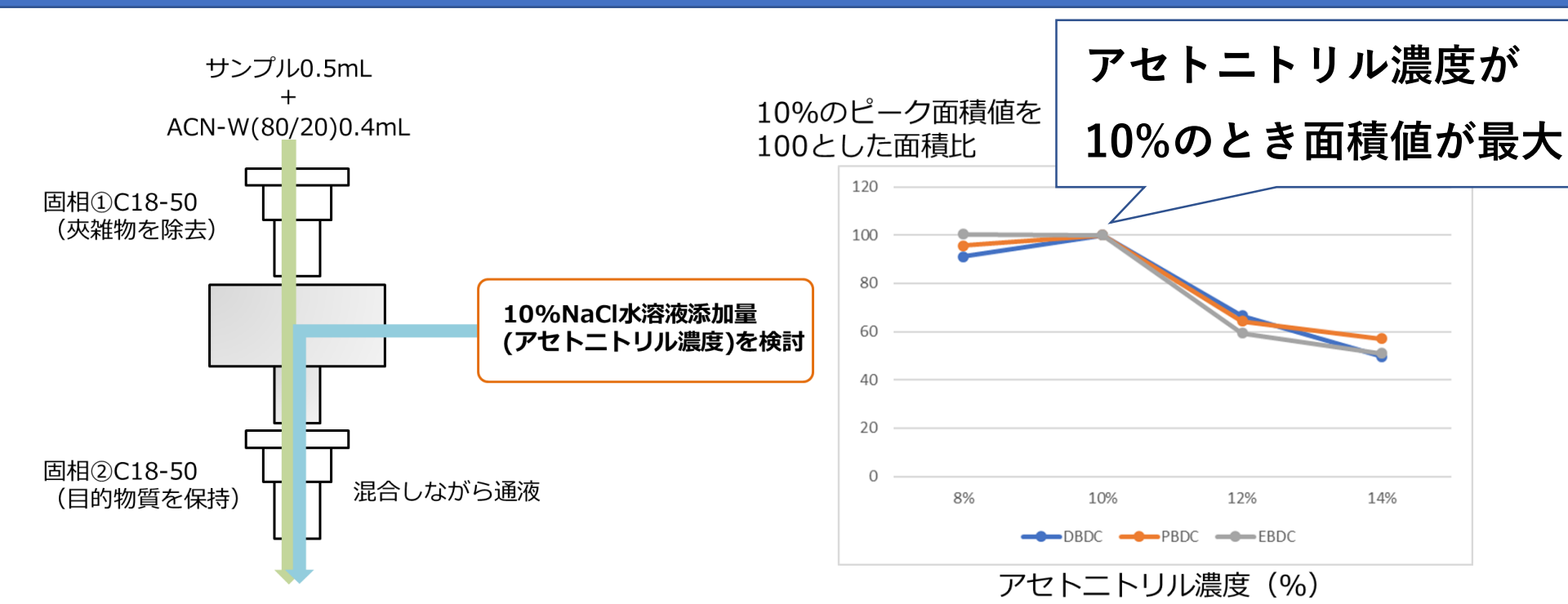


図1 試験法の精度比較実験フロー

## ホクレン+STQ-GCB法精製工程の検討

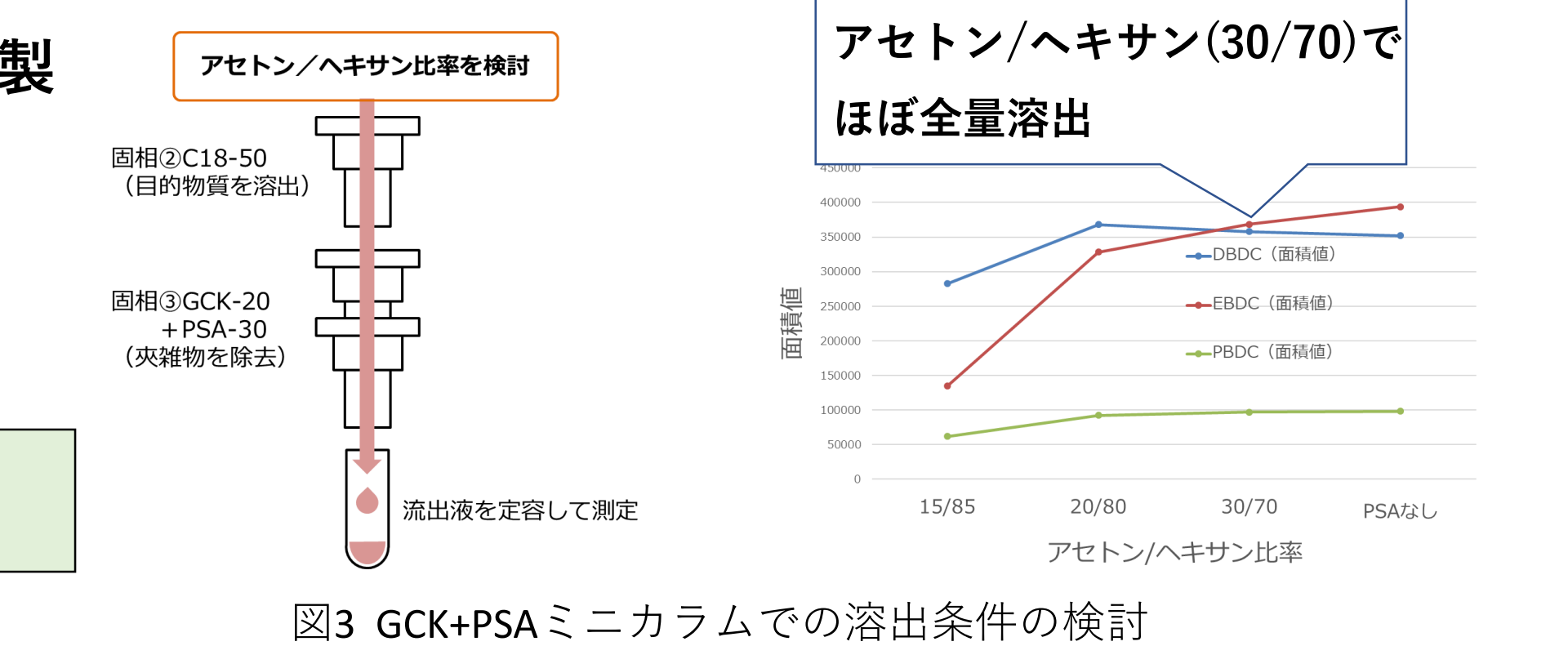
### 検討1 C18ミニカラムによる保持

抽出液に10%(w/w)NaCl水溶液を混合しC18ミニカラムに通液した際に、目的物質であるジチオカルバメート系農薬代謝物3種が保持されるアセトニトリル濃度を検討した。



### 検討2 GCK/PSAミニカラムによる精製

C18ミニカラムに保持したジチオカルバメート系農薬代謝物3種を溶出するアセトン/ヘキサンの溶媒比率を調査した。



### 検討3 添加回収試験

上記検討条件でオレンジを用いた添加回収試験によりホクレン+STQ-GCB法の評価を行なった。

表1 ホクレン+STQ-GC法での添加回収試験結果 (オレンジ) MRMによるピーク面積値

サンプル検体	DBDC	PBDC	EBDC
ST	595,724	199,627	908,739
添加 1	646,826	213,771	939,190
回収率, %	109	107	103

3成分とも良好な回収率を得られた。

## 実残留試料による定量性の比較

エチレンビスチオジカルバミン酸ジメチル(EBDC)として測定する農薬成分が残留しているキンカンを用いて通知試験法、ホクレンLC法、ホクレン+STQ-GCB法で分析し定量値を比較した。

表2 各試験法での実残留試料の定量結果

	EBDC		
	通知試験法	ホクレンLC法	ホクレン+STQ-GC法
1回目	3.8	3.8	4.2
2回目	3.3	3.8	4.1
3回目	3.4	4.1	3.8
平均 (ppm)	3.5	3.9	4.0
RSD (%)	7.2	4.5	5.5

## 測定条件

### 【GC-MS/MS測定条件】

GC: 7890B (アジレント・テクノロジー)  
 カラム: VF-5MS 30 m x 0.25 mm I.D., 膜厚0.25 μm (アジレント・テクノロジー)  
 オープン温度: 60 °C (3 min) - 10 °C/min - 125 °C - 25 °C/min - 300 °C (2.5 min) (total 14分)  
 注入口温度: 250 °C  
 ライナー: シングルテーパー ウルトライナートライナー ガラスウール入り  
 注入方法: バルスドスプリットレス (170 kPa, 1 min) 2 μL注入  
 トランスファーライン温度: 290 °C  
 キャリアガス流量: 1.0 mL/sec (コンスタントフロー)  
 コリジョンガス: N<sub>2</sub> 1.5 mL/min  
 ヘリウムクエンチガス: 2.25 mL/min

MS: 7000C (アジレント・テクノロジー)  
 測定モード: MRM  
 イオン源温度: 250 °C  
 四重極温度: 150 °C

### 【LC-MS/MS測定条件】

HPLC: NexeraX2 (島津製作所)  
 注入量: 5 μL  
 カラム: SimPack FC-ODS 3 μm 2mm x 150 mm (島津製作所)  
 オープン温度: 40 °C  
 移動相: A: 5mM 酢酸アンモニウム水 B: 5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール  
 流量: 0.3 mL/min  
 グラジエント条件: B% (min) = 10(0) - 10(1.5) - 60(7.5) - 60(12) - 90(15) - 10(15.01) - 10(22)

MS: LCMS-8040 (島津製作所)

## まとめ

ホクレンLC法を基に、STQ-GCB法の固相抽出操作を加えたホクレン+STQ-GCB法を検討した。オレンジでの添加回収試験で良好な回収率が得られた。ジチオカルバメート系農薬が残留したキンカンを試料に用いて通知試験法、ホクレンLC法、ホクレン+STQ-GC法を比較したところ、いずれの分析法であっても再現性良く分析可能であった。通知法とホクレンLC法およびホクレン+STQ-GC法の定量値に差が見られたが、試料由来の夾雑物によるものと推察され、今後調査する。ホクレン+STQ-GCB法では固相抽出による精製工程が入るが、自動前処理装置を使用することで自動化できることから、スクリーニングにおいて有用な試験法であると考えられる。

## 【参考文献】

- 1) 石渡智、関口博史: 農産物中ジチオカルバメート系農薬の迅速分析法の検討、第110回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2015)
- 2) 石渡智、関口博史: 農産物中ジチオカルバメート系農薬の迅速分析法の検討 (第二報)、第111回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2016)
- 3) S.Ishiwata, S.Imai: Simplified Method for the Determination of Dithiocarbamates in Agricultural Products by LC-MS/MS, 12<sup>th</sup> European Pesticide Residue Workshop, Programme & Book of Abstracts, p.130-131 (2018)