

Miura Technical Report

SPEEDIA[®]
食品中残留農薬の迅速前処理法

三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所

2023/05/19

SPEEDIA[®]によるジチオカルバメート系農薬の分析

【はじめに】

ジチオカルバメート系農薬は、野菜や果樹用の殺菌剤として広く使用されています。この農薬は金属イオンが結合した錯体構造を有しており、水や有機溶媒に溶けにくく、直接分析する事は困難とされています。厚生労働省から通知されている個別試験法¹⁾では、アルカリ性EDTA溶液でジチオカルバメート系農薬を水溶性のナトリウム塩にした後、ヨウ化メチルで誘導体化し、その生成した誘導体化物を測定する方法が示されています。

また、ホクレン農業協同組合連合会からジチオカルバメート系農薬迅速分析法^{2) 3) 4) 5) 6)}（以下迅速分析法）が報告されています。これはQuEChERS法を基に溶媒転溶を行う事の特徴としたスクリーニングに有用な迅速試験法です。

このアプリケーションでは抽出は迅速分析法を採用し、膜ろ過法（SPEEDIA法）で精製する事によって、マトリックスを効率的に除去し、簡易・迅速に食品中のジチオカルバメート系農薬が分析可能な方法を提案します。今回は、りんご、みかん、いちごにおける添加回収試験をn=5で実施し、真度（回収率）と併行精度について評価を行いました。

【試験内容】

- ・ 試料 : りんご、いちご、みかん（システイン-EDTA 溶液^{*1}を試料量と同量加え磨砕均一化したもの）
- ・ 対象農薬 : **チラム**
（測定物質は誘導体化物であるジメチルジチオカルバミン酸メチル（以下DMDC））
マンネブ
（測定物質は誘導体化物であるエチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（以下EBDC））
プロピネブ
（測定物質は誘導体化物であるプロピレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（以下PBDC））
- ・ 前処理法 : 抽出 迅速分析法に準拠（P.2 参照）
精製 膜ろ過法（SPEEDIA法）
- ・ 併行試験数 : n = 5
- ・ 添加濃度 : 0.01 ppm
- ・ 検量線^{*2} : 6点 絶対検量線
0.25、1.25、2.5、12.5、25、40 ppb

*1 L-システイン塩酸塩一水和物 50 g とエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 50 g を約 800 mL の水に溶かし、12 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.6~10.0 に調整した後、水を加えて 1000 mL に調製した。

【試薬】

農薬標準品

- ・ チラム システイン-EDTA 溶液で 200 ppm に調製
- ・ マンネブ システイン-EDTA 溶液で 200 ppm に調製
- ・ プロピネブ システイン-EDTA 溶液で 20 ppm に調製

試薬

- ・ アセトニトリル（残留農薬・PCB 試験用）
- ・ 塩化ナトリウム
- ・ 無水硫酸マグネシウム
- ・ L-システイン塩酸塩一水和物^{*3}
- ・ エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物
- ・ 水酸化ナトリウム
- ・ ヨウ化メチル
- ・ 塩酸

【測定装置】

LC-MS/MS 測定条件

LC-MS/MS	LC : Vanquish (Thermo Fisher) MS : TSQ Quantis (Thermo Fisher)
分析カラム	Cadenza CD-C18 長さ 150 mm、 内径 2 mm、粒子径 3 μm (Imtakt)
オープン温度	40 °C
注入量	みかん 1 μL りんご、いちご 2 μL
溶離液	A 液 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B 液 メタノール
流速	0.25 mL/min (0~23 min、34~35 min) 0.30 mL/min (23 min~34 min)
移動相条件	B 液 2% (0.1 min) → 5 min → 50% → 15 min → 98% (6 min) → 0.1 min → 2% (6.9 min)
イオン化法	H-ESI (Positive)
スプレー電圧	1000 V (Positive)
測定モード	Timed-SRM モード

【結果】

りんご、いちご、みかんを用いてチラム、マンネブ、プロピネブの添加回収試験を行いました。妥当性試験のガイドライン⁷⁾の目標値である『真度：70~120%、併行精度（RSD）：<25%』を全ての作物と農薬の組み合わせで満たしており、良好な結果が得られました（表1）。精製工程は SPEEDIA の膜ろ過 STEP のみであり、短時間での前処理が可能である事が示されました。

*2 検量線は蒸留水およびシステイン-EDTA 溶液各 10 g を 50 mL 遠沈管に秤量し、そこへ農薬標準品を 1000 ng 添加した溶液を実試料と同様に操作し、得られた抽出液を適宜希釈して調製した。

*3 ジチオカルバメート系農薬の酸化を防ぐため添加する。

【前処理フロー】

※操作方法の詳細は弊社の HP にて動画を掲載しておりますので以下のリンクからご覧ください。

http://www.miuraz.co.jp/e_science/products/speedia.html

抽出

20 g 秤量 (試料 10 g 相当)
 | + 農薬標準液添加
 6 mol/L 塩酸を pH 6.5 付近になるよう加え混和
 | (今回の pH 実測値 りんご pH 6.9、みかん pH 6.7、いちご pH 6.9)
 ヨウ化メチル 60 μL を加え混和
 |
 振とう 10 分間
 | + アセトニトリル 10 mL
 振とう 5 分間
 | + 塩化ナトリウム 2 g
 | + 無水硫酸マグネシウム 4 g
 手で激しく振とう 1 分間
 |
 遠心分離 (2,330×g、10 分間)

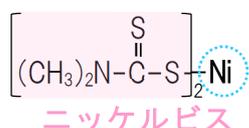
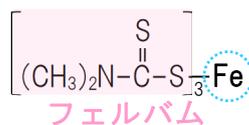
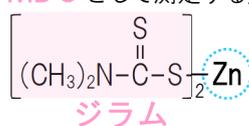
精製 前処理時間：30 分/20 検体

STEP
1

膜ろ過カートリッジに水 0.8 mL を添加
 |
 膜ろ過カートリッジに抽出液 1.0 mL を添加し混合
 |
 遠心分離 (1,490×g、10 分間)
 |
 ろ過液 0.45 mL をバイアルに分取
 |
 アセトニトリル 0.55 mL 添加し 1 mL に定容
 |
 LC-MS/MS 測定
 (最終試料濃度 0.25 g/mL 相当、農薬濃度 2.5 ppb)

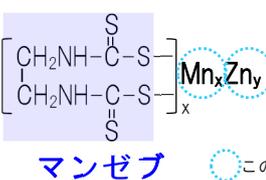
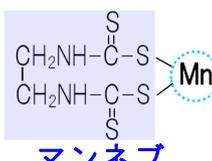
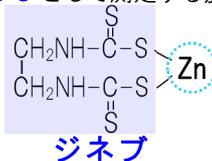
誘導体化後、

DMDC として測定する農薬



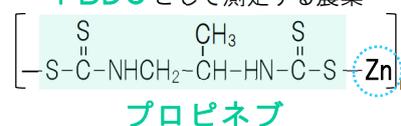
誘導体化後、

EBDC として測定する農薬



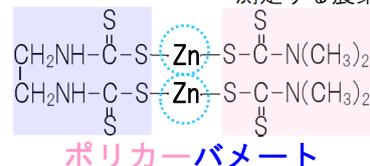
誘導体化後、

PBDC として測定する農薬



誘導体化後、

DMDC & EBDC として測定する農薬



この部分がアルカリ溶液中で EDTA によって Na 塩となり、その後ヨウ化メチルによって、メチル基(-CH₃)に変換される。

【回収試験結果】

表1 各作物における農薬添加回収試験結果 平均回収率とRSD (n = 5)

化合物名	りんご		みかん		いちご	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
DMDC	99	4.2	91	2.6	99	2.3
EBDC	95	6.6	76	2.0	81	1.6
PBDC	89	2.3	72	1.0	93	2.5

【補足データ】

メチル誘導体化時（塩酸添加後）の pH の違いによる誘導体化効率を検討し、その結果を図1に示しました。塩酸添加後 pH 6.3 であったサンプルのピーク面積を 100%として、各化合物の割合を算出しました。

DMDC、EBDC、PBDC ともに pH 8 以上になると誘導体化効率が大きく低下しました。また EBDC、PBDC は pH 3 程度になると大きく低下し始め、アルカリ側に比べると酸性側の方が影響は少なく、なだらかな曲線になりました。一方で DMDC は pH 5 程度からすでに誘導体化効率が著しく低下し始めました。そのため誘導体化後 DMDC として測定するチラム、ジラム、ニッケルビス、フェルバムについてはメチル化時の pH 調整が特に重要です。

安定した誘導体化を行うため、**pH 6.5 付近 (pH 5.5~7.5)** となるよう塩酸添加量を調整してください。

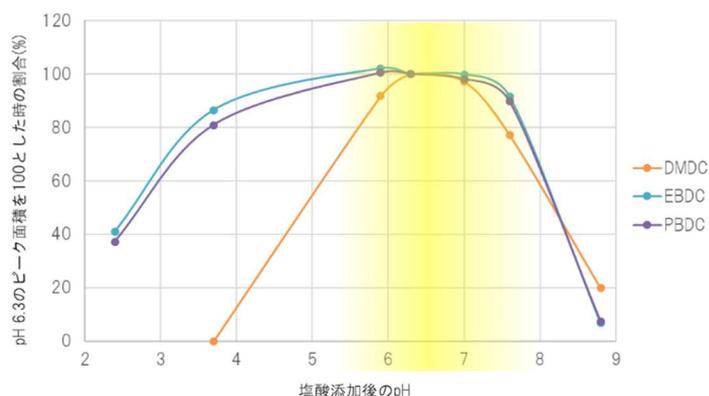


図1 塩酸添加後の pH の違いによるピーク面積の割合

【参考文献】

- 厚生労働省：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 第3章 個別試験法-（通知試験法）、ジチオカルバメート試験法（農作物及び畜水産物）
- 石渡智、関口博史：農作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)
- 石渡智、関口博史：農作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)
- S.Ishiwata,S.Imai：Simplified Method for the Determination of Dithiocarbamates in Agricultural Products by LC-MS/MS,12th European Pesticide Residue Workshop, Programme & Book of Abstracts, P.130-131(2018)
- 安藤孝、小西賢治、市来弥生、佐々野僚一、今井沙紀、杉立久仁代、穴沢秀峰、坂真智子、関口博史、石渡智：ジチオカルバメート迅速スクリーニング法の開発、第41回農薬残留分析研究会、講演要旨集、P.221-226(2018)
- S.Ishiwata：Rapid analysis method for determination of dithiocarbamate fungicides in agricultural products via liquid chromatography-tandem mass spectrometry, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Abstract ID 3415135(2021)
- 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン、平成22年12月24日 食安発1224第1号

	グリーンテクノロジーを創成する 三浦環境科学研究所
	愛媛県松山市北条辻864番地1 〒799-2430 TEL 089-960-2350 FAX 089-960-2351
	三浦工業株式会社
	http://www.miuraz.co.jp