—技術報告—

ピレスロイド系農薬の薄層クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィー
質量分析法および液体クロマトグラフィー質量分析法による一斉分析地中 啓^{*1}, 岩室嘉晃^{*1}, 飯尾麗子^{*1}, 高山成明^{*1}, 角田紀子^{*2},
数井優子^{*3}, 太田彦人^{*3}, 大津留 修^{*3}石川県警察本部科学捜査研究所^{*1}, 東京理科大学薬学部^{*2}, 科学警察研究所^{*3}〒920-8553 石川県金沢市鞍月 1-1^{*1}〒278-8510 千葉県野田市山崎2641^{*2}〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1^{*3}**Simultaneous Analysis of Pyrethroid Pesticides by Thin Layer
Chromatography, Gas Chromatography/Mass Spectrometry and
Liquid Chromatography/Mass Spectrometry**Satoshi Chinaka^{*1}, Yoshiaki Iwamuro^{*1}, Reiko Iio^{*1}, Nariaki Takayama^{*1},
Noriko Tsunoda^{*2}, Yuko Kazui^{*3}, Hikoto Ohta^{*3} and Osamu Ohtsuru^{*3}*Forensic Science Laboratory, Ishikawa Prefectural Police H.Q.**1-1 Kuratsuki, Kanazawa, Ishikawa 920-8553, Japan^{*1}**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science**2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan^{*2}**National Research Institute of Police Science**6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan^{*3}**(Received 25 January 2008; accepted 20 May 2008)*

Simultaneous analytical methods for 33 pyrethroids by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) have been developed. The detection limits of the pyrethroids were 1 μg or less by TLC, 10–100 pg by GC/MS (SIM mode) and 5–200 pg by LC/MS (SIM mode, except for transfluthrin (2 ng)). The proposed methods were applicable to the analysis of the pyrethroids mixed into drinks and foods.

Key words: Pyrethroid, TLC, GC/MS, LC/MS

緒 言

ピレスロイド系農薬は家庭用や農業用の殺虫剤として広く普及している。多くのものが低毒性である

ことから中毒原因となることは少ないが、入手が容易なことからいたずら等の目的で飲食物に混入する事案が散見される。中でも、家庭用殺虫剤として一

一般的なエアゾールタイプのものは、噴射口を飲料等の飲み口に差し込み、ボタンを押すだけで薬剤を容易に混入できることから、これを使用した事案が比較的多い。

ほとんどのピレスロイド系農薬は、シクロプロパン環とエステル結合を有するが、シクロプロパン環がないものや、エステルではなくエーテル結合のものもあり、その種類は数多い。ピレスロイド系農薬の一斉分析法については、残留農薬試験を目的とした方法等が報告されているものの¹⁻⁵⁾、対象としている化合物は多くても十数種類であり、網羅的分析を行っているものは見あたらない。また、微量成分を対象としていることから、検査試料の前処理も煩雑である。そこで、著者らは、飲食物への混入事案の様に、ある程度高濃度のピレスロイド系農薬が存在する試料に適した迅速簡便な一斉分析法の確立を目的として、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) および液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) による分析法の開発を行った。

材料および方法

1. 試薬類

実験に用いたピレスロイド系農薬 (合成ピレスロイド 27 化合物, 天然ピレスロイド 6 化合物) を Fig. 1 に示す。これらのうち, allethrin, bifenthrin, ethofenprox, fenpropathrin, fenvalerate, flucythrinate, permethrin, phenothrin, resmethrin, silafluofen, tefluthrin は関東化学製の, acrinathrin, cycloprothrin, cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fluvalinate, tralomethrin, transfluthrin は和光純薬工業製の残留農薬試験用を用いた。天然ピレスロイドは 6 化合物の混合標準品 (和光純薬工業製, 残留農薬試験用) を使用した。それ以外のものは殺虫剤メーカーより恵与されたものを用いた。各化合物はアセトンに溶解し, 1 mg/ml 標準溶液とした。標準溶液は -18°C で保管し, 用時アセトンで希釈し分析に用いた。これらの溶液は -18°C で保存で, 少なくとも 1 年間は安定であった。なお, メタノールを溶媒とした場合に, CN 基をもつピレスロイドの多くで分解が確認されたので, 注意が必要で

ある。

その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。超純水は Millipore 製の Milli-RX12 α /Milli-Q SP システムにより製造した。

2. TLC

TLC 板は, Merck 製 Silicagel 60F254 を用い, 3 種類の展開溶媒を使用した。展開溶媒 A は, *n*-ヘキサン-トルエン (45 : 55, v/v), 展開溶媒 B は, *n*-ヘキサン-クロロホルム (60 : 40, v/v), 展開溶媒 C は, *n*-ヘキサン-ジエチルエーテル (50 : 50, v/v) である。スポットの検出は, 以下の 3 種類の方法で行った。検出法 a : 254 nm の UV 照射により吸収を観察。検出法 b : 20% リンゴリブデン酸/エタノール溶液を噴霧後, 100°C で 5 分間加熱し発色を観察。検出法 c : 0.5% *o*-トリジン/エタノール溶液を噴霧後, 254 nm の UV 照射を 5 分間行い発色を観察。

3. GC/MS

装置は Agilent Technologies 製 5973N GC / MSD を用い, カラムは Agilent Technologies 製 DB-5 ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm) を使用した。カラム温度は, 初期温度 100°C で 1 分間保持した後, $20^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 200°C まで昇温し, 引き続き $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 300°C まで昇温した後, 5 分間保持した。注入口温度は 250°C , トランスファーライン温度は 300°C , イオン源温度は 230°C とし, キャリアガスとして He を 1.0 ml/分の定流量で用いた。試料注入量は 1 μl とし, 注入はスプリットレスで行った。イオン化法として電子衝撃イオン化法 (イオン化電圧 70 eV) を用い, m/z 50~550 のフルスキャンモードで測定した。

4. LC/MS

装置は Agilent Technologies 製 LC / MS 1100 SL を用い, カラムは化学物質評価研究機構製 L-column ODS (内径 2 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm) をカラム温度 40°C で使用した。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0) とアセトニトリルの混合液を用い, アセトニトリル濃度が 25 分間で 40% から 100% となるリニアグラジエント条件とし, さらにアセトニトリル濃度 100% で 5 分間保持した。試料注入量は 1 μl とした。イオン化法はエ

Synthetic pyrethroids

Natural pyrethrins

Fig. 1 Thirty-three pyrethroids used in the present study.

レクトロスプレーイオン化法（ポジティブ）とし、乾燥ガスには N_2 を10 l/分、 $300^\circ C$ で用い、ネブライジングガスには N_2 を20 psi で用いた。キャピラリー電圧は3000 V、フラグメンター電圧は60 V とし、 m/z 50～800のフルスキャンモードで測定した。

5. 検査試料および前処理

飲食物への混入事案を想定して、緑茶飲料、オレンジジュース、コーラおよびコーヒーの4種類の市販飲料各5 ml とレトルトカレー5 g に、エアゾールタイプの市販殺虫剤0.1 ml を添加したものを検査試料とした。これは、200 ml あるいは200 g の飲食物に殺虫剤を数秒程度噴射した場合に相当する。

検査試料約1～5 g を n -ヘキサン1～10 ml で抽出し、得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、孔サイズ0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、減圧下で0.1～1 ml 程度に濃縮し TLC 用並びに GC/MS 用の測定試料とした。この一部について、 N_2 気流下で乾固後、等量のアセトンに再溶解し LC/MS 用の測定試料とした。

結果および考察

1. TLC 分析法の検討および結果

シリカゲルプレートを用い分離を試みた。展開溶媒として各種溶媒について検討した結果、「材料および方法」項に示す3種類の展開溶媒 A, B, C で分離が良好であった。各化合物の R_f 値を Table 1 に示す。 R_f 値が2つあるものは、異性体が分離したものである。なお、天然ピレスロイド6種混合物については完全分離できず、展開溶媒 C により3種類ずつに分離するにとどまった。

検出については、蛍光剤入りのプレートを用いることで、全ての化合物について254 nm の UV 照射によりスポットの確認が可能であった。発色試液による検出では、リンモリブデン酸溶液を用いる方法⁶⁾と o -トリジン溶液を用いる方法⁷⁾の両方を用いることで、全ての化合物の検出が可能であった。各化合物1 μg をスポットした場合の検出結果を Table 1 に示す。

TLC では、3種類の展開溶媒と3種類の検出法を組み合わせることにより、cyfluthrin と cyper-

methrin, furamethrin と resmethrin を除くほとんどの化合物を分離識別することができた。

2. GC/MS 分析法の検討および結果

GC/MS 分析条件について、一般的な微極性キャピラリーカラムを用いて検討を行い、良好な分離の一斉分析条件を得た。合成ピレスロイド各10 ng と6種混合の天然ピレスロイド100 ng を分析したトータルイオンクロマトグラム (TIC) を Fig. 2 に、保持指標を Table 2 に、マススペクトルを Fig. 3 に示す。なお、cycloprothrin については検出感度が低く、また、tralomethrin については注入時に deltamethrin に変化するため⁸⁾、分析対象から外した。すなわち、33種のピレスロイド系農薬のうち、31の化合物の検出が本法により可能であった。また、本法では多くのピレスロイドでその異性体同士が分離し、TIC 上に複数のピークとして検出された。なお、pyrethrin I と pyrethrin II でピークの拡がりが生じたが、これは熱による異性化のためと考えられる⁹⁾。各化合物の検出下限はフルスキャンモードで0.1～1 ng、選択イオンモニタリング (SIM) モードで0.01～0.1 ng であった。

3. LC/MS 分析法の検討および結果

一般的な ODS カラムを用い、LC/MS 分析条件の検討を行った。グラジエント条件を用いることで、30分以内に全化合物を溶出させることができ、33化合物全ての一斉分析が可能であった。エレクトロスプレーイオン化の極性については、33化合物のうち31化合物でネガティブモードよりポジティブモードの方が高感度もしくは同等であったことからポジティブモードとした。Fig. 4 に合成ピレスロイド各36 ng と6種混合の天然ピレスロイド100 ng の混合標準品を分析したマスクロマトグラムを示す。GC/MS と同様、複数のピークが存在するものは異性体が分離検出されたものである。マススペクトルのベースピークは、silafuofen を除き、 $[M+H]^+$ または $[M+NH_4]^+$ であり (silafuofen はベースピークが m/z 287で、 $[M+NH_4]^+$ は2番目に大きなピーク)、全ての化合物で指標となる $[M+H]^+$ または $[M+NH_4]^+$ の m/z が異なっていた。したがって、LC での分離は必ずしも充分とは言えないが、マスクロマトグラフィーにより、全化合物を一

Table 1 Rf values and coloring results of TLC.

No.	Compound	Developing solvent			Chromogenic reagent		
		A	B	C	a	b	c
(1)	acrinathrin	0.18	0.34	0.6	+	—	yellowish green
(2)	allethrin	0	0.07	0.5	+	bluish gray	yellowish green
(3)	bifenthrin	0.51	0.56	0.65	+	bluish gray	yellowish green
(4)	cycloprothrin	0.07	0.23	0.5	+	—	yellowish green
(5)	cyfluthrin	0.19, 0.25	0.30, 0.34	0.6	+	—	yellowish green
(6)	cyhalothrin	0.29	0.37	0.6	+	—	yellowish green
(7)	cypermethrin	0.20, 0.25	0.30, 0.34	0.61	+	—	yellowish green
(8)	cyphenothrin	0.18	0.3	0.6	+	bluish gray	yellowish green
(9)	deltamethrin	0.25	0.33	0.59	+	±	green
(10)	empenthrin	0.38	0.46	0.66	+	bluish gray	—
(11)	ethofenprox	0.15	0.31	0.62	+	bluish gray	—
(12)	fenpropathrin	0.21	0.32	0.63	+	±	yellowish green
(13)	fenvalerate	0.22	0.32	0.61	+	±	green
(14)	flucythrinate	0.15	0.27	0.56	+	±	green
(15)	fluvalinate	0.10, 0.20	0.22, 0.27	0.57	+	±	green
(16)	furamethrin	0.23	0.34	0.64	+	bluish gray	—
(17)	imiprothrin	0	0	0.13	+	bluish gray	—
(18)	metofluthrin	0.1	0.18	0.62	+	bluish gray	yellowish green
(19)	permethrin	0.28, 0.41	0.36, 0.43	0.65	+	±	green
(20)	phenothrin	0.22	0.35	0.65	+	bluish gray	±
(21)	prallethrin	0	0.05	0.48	+	bluish gray	yellowish green
(22)	resmethrin	0.21	0.34	0.65	+	bluish gray	—
(23)	silafuofen	0.5	0.49	0.65	+	pink	—
(24)	tefluthrin	0.62	0.54	0.68	+	—	yellowish green
(25)	tetramethrin	0	0.06	0.42	+	bluish gray	—
(26)	tralomethrin	0.20, 0.28	0.28, 0.33	0.57	+	±	yellowish green
(27)	transfluthrin	0.49	0.46	0.67	+	±	yellowish green
(28)	cinerin I	0-0.1	0-0.1	0.53	+	bluish gray	green
(29)	jasmolin I						
(30)	pyrethrin I						
(31)	cinerin II	0-0.1	0-0.1	0.38	+	bluish gray	green
(32)	jasmolin II						
(33)	pyrethrin II						

+ or color name, detected; ±, detected slightly and color is unclear; and —, not detected. Developing solvents: A, *n*-hexane-toluene (45 : 55, v/v); B, *n*-hexane-chloroform (60 : 40, v/v); and C, *n*-hexane-diethylether (50 : 50, v/v). Chromogenic reagents: a, UV light at 254 nm; b, 20% phosphomolybdic acid/ethanol solution; and c, 0.5% *o*-tolidine/ethanol solution.

Fig. 2 GC/MS total ion chromatogram of 31 pyrethroids. The synthetic pyrethroids are 10 ng each, and the natural pyrethrins are 100 ng (a total of six compounds). For peak identification, see Table 3.

Table 2 Retention indices by GC/MS.

No.	Compound	Retention index
(1)	acrinathrin	2587, 2614
(2)	allethrin	2072, 2075
(3)	bifenthrin	2472
(4)	cycloprothrin	—
(5)	cyfluthrin	2776, 2790, 2800, 2804
(6)	cyhalothrin	2572, 2593
(7)	cypermethrin	2823, 2837, 2844, 2851
(8)	cyphenothrin	2653, 2666
(9)	deltamethrin	3031, 3061
(10)	empenthrin	1696, 1700, 1707, 1710
(11)	ethofenprox	2872
(12)	fenpropathrin	2496
(13)	fenvalerate	2951, 2981
(14)	flucythrinate	2846, 2875
(15)	fluvalinate	2966, 2976
(16)	furamethrin	1906
(17)	imiprothrin	2287, 2304
(18)	metofluthrin	1981, 1992
(19)	permethrin	2704, 2723
(20)	phenothrin	2529, 2545
(21)	prallethrin	2089, 2091
(22)	resmethrin	2401, 2417
(23)	silafuofen	2892
(24)	tefluthrin	1718
(25)	tetramethrin	2459, 2479
(26)	tralomethrin	—
(27)	transfluthrin	1903
(28)	cinerin I	2206
(29)	jasmolin I	2285
(30)	pyrethrin I	2310–2430*, 2316, 2433
(31)	cinerin II	2549
(32)	jasmolin II	2627
(33)	pyrethrin II	2700–2780*

—, not detected.

*, broad peak.

斉分離検出することが可能であった。検出下限は transfluthrin を除く全ての化合物で、フルスキャンモードで0.1～3 ng, SIM モードで0.005～0.2 ng であり, transfluthrin については, それぞれ30 ng, 2 ng であった。

4. 市販殺虫剤の分析

市販のエアゾールタイプの殺虫剤 6 種類（石油系溶剤タイプ 5 種類, 水性タイプ 1 種類）と熱拡散式の殺虫剤 2 種類（水性タイプおよび固形タイプ）について, 本法で分析を行った。これらの製品は, cyphenothrin, imiprothrin, metofluthrin, phenothrin, prallethrin, resmethrin, tetramethrin のうち, 1～3 種類を含有するものである。石油系溶剤タイプの製品については, TLC による直接分析, 並びに, アセトンで希釈した後, GC/MS および LC/MS 分析を行った。水性タイプおよび固形タイプの製品については, *n*-ヘキサンによる抽出液について TLC および GC/MS 分析を行ったほか, ヘキサン抽出液を乾固した後, アセトンに再溶解し LC/MS 分析を行った。

その結果, GC/MS と LC/MS では, 溶剤あるいはマトリックス成分の妨害無く上記ピレスロイド系農薬の検出が可能であった。TLC では, エアゾール製品の場合, 石油系溶剤タイプ, 水性タイプ共に含まれるテトラデカン等の炭化水素油成分が, 3 種類の展開溶媒のいずれにおいても Rf 値0.6～0.8付近に巨大スポットとして出現し, 同位置に出現するピレスロイド系農薬のスポットの検出を妨害した。

Fig. 3-(1) GC/MS spectra of 31 pyrethroids.

Fig. 3-(2) Continued.

炭化水素油成分と R_f 値が異なるスポットについては問題なく検出が可能であった。したがって、炭化水素油を含有する製品の分析においては、複数の展開溶媒を用いて検討する等の注意が必要である。

5. 添加飲食物の分析

飲食物への混入事案を想定し、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ レベル以上の比較的高濃度のピレスロイド系農薬を添加した検査試料を作製し、前処理法の検討を行ったところ、 n -ヘキサンによる液液抽出により、約80%以上の回収率が得られることが分かった。

そこで、tetramethrin 約2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および resmethrin 約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する石油系溶剤エアゾールタイプの市販殺虫剤を直接添加した飲食物を検査試料として分析を行った。緑茶飲料、オレンジジュース、コーラおよびコーヒー各5 ml とレトルトカレー5 g に殺虫剤0.1 ml を添加し、前処理の後、TLC, GC/MS および LC/MS で分析を行った。

TLC では、tetramethrin は展開溶媒 A および B ではほとんど移動しないことから、展開溶媒 C で分析し、いずれの検査試料でも tetramethrin を妨害無く検出できた。ただし、resmethrin は製品に含まれる炭化水素油の成分の妨害を受けた。resmethrin

に関しては展開溶媒 A あるいは B を用いて分析することで、妨害無く検出が可能であった。

GC/MS および LC/MS では、いずれの検査試料からも tetramethrin と resmethrin が妨害無く検出でき、マススペクトルの確認が可能であった。Fig. 5 に最も夾雑物成分が多く検出されたカレーの分析例を示す。各検査試料について、あらかじめ標準試料で作成した tetramethrin と resmethrin の検量線を基に回収率を求めたところ、いずれの検査試料も GC/MS および LC/MS とともに70%以上であった。この他に、cyphenothrin, prallethrin, tetramethrin を含有するエアゾール殺虫剤についても添加実験を行い、同様の結果を得ることができた。

以上、本法はピレスロイド系農薬の一斉分析法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005. pp. 459-471, 金原出版, 東京 (2005).
- 2) Columé, A., Cárdenas, S., Gallego, M. and Valcárcel, M.: Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilised agricultural samples. *J. Chromatogr. A.*, **912**, 83-90 (2001).

Fig. 4 LC/MS chromatograms of 33 pyrethroids. The synthetic pyrethroids are 36 ng each, and the natural pyrethrins are 100 ng (a total of six compounds).

- 3) Loper, B. L. and Anderson, K. A.: Determination of pyrethrin and pyrethroid pesticides in urine and water matrixes by liquid chromatography with diode array detection. *J. AOAC Int.*, **86**, 1236–1240 (2003).
- 4) Hu, X., Jianxin, Y., Zhigang, Y., Lansun, N., Yanfei, L., Peng, W., Jing, L., Xin, H., Xiaogang, C. and Yibin, Z.: Determination of multiclass pes-

ticide residues in apple juice by gas chromatography-mass selective detection after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J AOAC Int.*, **87**, 972–985 (2004).

- 5) Tagami, T., Kajimura, K., Satsuki, Y., Nakamura, A., Okihashi, M., Kitagawa, Y., Takatori, S. and Kitagawa, M.: Simultaneous analysis of 10 pyrethroid pesticides in natural medicines

Fig. 5 Mass chromatograms and mass spectra of curry sample spiked with an aerosol spray insecticide analyzed by GC/MS and LC/MS.

by GC/MS with negative chemical ionization. *Yakugaku Zasshi*, **126**, 991–995 (2006).

- 6) Shono, T., Ohsawa, K. and Casida, J. E.: Metabolism of trans and cis-permethrin, trans- and cis-cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 316–325 (1979).
- 7) Patil, V. B., Sevalkar, M. T. and Padalikar, S. V.: Thin-layer chromatographic detection of pyrethroid insecticides containing a nitrile group.

Analyst, **117**, 75–76 (1992).

- 8) Valverde, A., Aguilera, A., Rodriguez, M. and Boulaid, M.: What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin? *J. Chromatogr. A.*, **943**, 101–111 (2001).
- 9) Essig, K. and Zhao Z.: Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for pyrethrum extract. *J. Chromatogr. Sci.*, **39**, 473–480 (2001).