

食品中シアナミドの分析

富澤 早苗, 小林 麻紀, 田村 康宏, 立石 恭也, 酒井 奈穂子, 上條 恭子,
永山 敏廣, 高野 伊知郎

Analysis of Cyanamide Residue in Foods

Sanae TOMIZAWA, Maki KOBAYASHI, Yasuhiro TAMURA, Yukinari TATEISHI,
Naoko SAKAI, Kyoko KAMIJO, Toshihiro NAGAYAMA and Ichiro TAKANO

食品中シアナミドの分析

富澤 早苗*, 小林 麻紀*, 田村 康宏*, 立石 恭也*,
酒井 奈穂子*, 上條 恭子*, 永山 敏廣**, 高野 伊知郎*

シアナミドは農薬のひとつ石灰窒素の有効成分であると共に、単独でも使われる農薬である。シアナミドは国内で適用作物があり、海外でも基準値が設定されているものの、その試験法は確立されていない。食品中シアナミドを無水硫酸ナトリウム存在下で酢酸エチルにより抽出し、溶媒を水に置換後塩基性下でダンシルクロライドと反応させ、蛍光誘導体化して蛍光検出器付高速液体クロマトグラフで測定した。シアナミド標準溶液0.1 µg/g相当を野菜および果実に添加して添加回収試験を行った結果、おおむね良好な回収率が得られた。

キーワード：シアナミド，残留農薬，高速液体クロマトグラフィー，蛍光検出，ダンシルクロライド

はじめに

シアナミドは農薬として登録されている他、石灰窒素の有効成分としても知られている。石灰窒素の主成分であるカルシウムシアナミドが土壤中で加水分解され、この過程で生成したシアナミドが殺虫・殺菌・除草の薬効を示す。中間生成物であるシアナミドは数日から10日間で分解され、最終的には無毒な尿素やアンモニアなどの窒素肥料となる。このことから、石灰窒素は、土壌や環境にも良好に働く農業資材として長年使われてきた¹⁾。

シアナミドは国内でばれいしょ、おうとう、なし、ぶどうなどの適用作物があり²⁾、EU諸国では野菜・果実などに残留基準値（0.05～6.00 ppm）が設定されている農薬でもあるが、食品衛生法改正に基づき平成18年度より導入されたポジティブリスト制度ではシアナミドの基準値が定められていないため、すべての食品に対して一律基準値（0.01 ppm）が適用される。しかし、食品中に残留するシアナミドの定量方法はこれまで確立されていないため、今回定量方法の検討を行った。

食品中のシアナミドの測定を試みるにあたり、食品衛生検査指針における「不揮発性腐敗アミン」の定量試験法³⁾を応用した。塩基性下でダンシルクロライド（DNS-Cl）により蛍光化（ダンシル化）し、蛍光誘導体ダンシルシアナミド（DNS-Cyan）（Fig. 1）として蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）を用いて分析する方法を検討した。

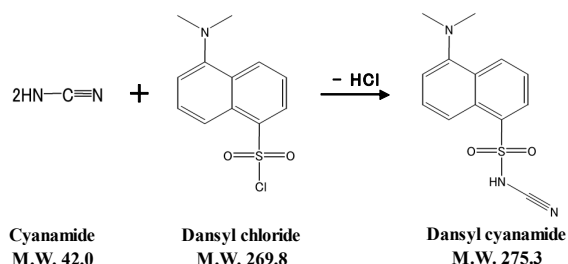


Fig. 1. Dansylate reaction of Cyanamide

実験方法

1. 試料

国内に流通していたチェリー、ぶどう、ばれいしょの計3種類の作物を対象とした。

2. 試薬および標準溶液

シアナミド：和光純薬工業（株）製 化学用、精製水に溶解し1 mg/mLの標準溶液とし、適宜精製水で希釈して用いた。

ダンシルクロライド：和光純薬工業（株）製 生化学用、残留農薬試験用アセトンに溶解し1%溶液とした。

ホウ砂：ナカライテスク（株）製 特級

リン酸緩衝液：和光純薬工業（株）製 生化学用、リン酸緩衝剤粉末（1/15 mol/L, pH7.0）一包（Na₂HPO₄ 5.7 g, KH₂PO₄ 3.6 g）を精製水1 Lに溶解して用いた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：SUPELCO 製 Discovery DSC-18 500 mgを用いた。

3. 装置および測定条件

1) 蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)

Waters社製 alliance 2690, 474

カラム：Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d.×150 mm, 粒径5 µm, GLサイエンス（株）製）、カラム温度：40℃、移動相A：2 m mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）－アセトニトリル（85：15）、移動相B：アセトニトリル、グラジエント条件：移動相B 0%（0分）－20%（20分）－82%（25分）－82%（30分）－0%（31分）Total 40分、流量1 mL/min、検出波長：蛍光検出器 励起波長 333 nm 測定波長 525 nm、注入量：10 µL、保持時間が約 17.5分になるよう流速を設定した。

2) ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS)

Agilent社製 6890N/5973 inert, カラム：DB-5MS（0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚0.25 µm, J&W社製）、カラム温度：50℃（1

* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター医薬品部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

分) -25°C /分 -125°C (0分) -10°C /分 -300°C (6.5分), 注入口温度: 250°C , キャリヤーガス: ヘリウム, イオン源温度: 230°C , イオン化モード: EI 70 eV, 主なイオンおよび相対強度 m/z (Int. %): 250 (100), 168 (70), 154 (35), 127 (32), 注入量: $1\ \mu\text{L}$ (スプリットレス), 保持時間が約19分となるようにガス圧を設定した。

4. 試験溶液の調製

1) 野菜および果実の抽出

試料10.0 gを量り採り, 酢酸エチル100 mLおよび無水硫酸ナトリウム75 gを加え, 5分間細砕した後, 吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を酢酸エチル150 mLで洗浄して得られたろ液を先のろ液と合わせて, 40°C 以下で溶媒を減圧留去して2 mLに濃縮した。

2) ダンシル化反応

1)で得られた抽出液0.5 mLを共栓褐色試験管に分取し, 溶媒を留去した。精製水0.5 mL, ホウ砂0.1 gおよび1% DNS-Cl・アセトン溶液0.5 mLを加えてボルテックスミキサーで激しく攪拌後, 40°C で60分間加温もしくは室温で終夜(2時間以上)静置した。この反応液の上清を孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過したものをHPLC-FL用試験溶液とした。

3) GC/MS用試験溶液の調製

DSC-18ミニカラムにメタノール 5 mLおよび精製水5 mLを注入し, コンディショニングを行った。このカラムに2)で得られた反応液の上清0.5 mLを負荷した。精製水5 mLで洗浄後, メタノール10 mLで溶出した。溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮後, 窒素気流下にて乾固し, 残さをアセトン0.2 mLに溶解したものをGC/MS用試験溶液とした。

結果および考察

1. HPLC条件の検討

1) 励起波長・蛍光波長の検討

不揮発性腐敗アミンの測定法³⁾において励起波長325 nm, 蛍光波長535 nmを使用していることを参考に, DNS-Cyanの測定に最適な波長を検討した。その結果, 励起波長333 nm, 蛍光波長525 nmでDNS-Cyanの測定値(ピーク面積)が最大となったためDNS-Cyanの測定波長とした。

2) 移動相の検討

DNS-Cyanの測定に最適なHPLCの移動相を検討した。不揮発性腐敗アミンのHPLCによる定量法³⁾では, ODSカラムを採用し, 移動相に水-アセトニトリル混液を用いていることから, 本法においてもODSカラムを用いて検討した。水-メタノールおよびギ酸-アセトニトリル混液の系ではDNS-Cyanのピークが検出されず, リン酸緩衝液(pH 7.0)-アセトニトリル混液を用いた場合にDNS-Cyanが検出された。リン酸緩衝液(pH 7.0)-メタノール混液を用いた場合もDNS-Cyanは検出されたが, アセトニトリル使用時に比べカラム圧が上昇した。また, 溶出時間が早く, 未反応の余剰DNS-Clとの分離が悪かった。そこで, より

良好な分離が得られるリン酸緩衝液(pH 7.0)-アセトニトリル系でグラジエントをかけて測定することとした。

なお, リン酸緩衝液は, 雑菌が増殖しやすく, また, リン酸緩衝液とアセトニトリルをHPLCポンプ内で直接混和させると結晶が析出しやすいことから, しばしばフィルターやカラムの目詰まりの原因となった。そこで, リン酸緩衝液とアセトニトリルを85:15の比であらかじめ混和させたものを移動相Aとし, アセトニトリルを移動相Bとしてグラジエント分析することで, これらの問題を解消した。

2. 試験溶液の調製方法の検討

1) 野菜および果実からの抽出

シアナミドは水・オクタノール分配係数($\log P_{ow}$)が -0.82 と高極性であり⁴⁾, 水に溶けやすいことから水抽出を行ったが, 食品成分による妨害が多く, 反応前の固相カラムによる精製やダンシル化後の定量が困難であった。そこで同様に高極性の農薬として知られる有機リン系殺虫剤メタミドホス試験法⁵⁾を応用し, 試料に無水硫酸ナトリウムを添加し, 脱水条件下で酢酸エチルによる抽出を行ったところ, 妨害成分の少ないクロマトグラムと良好な回収率を得ることができた。

2) ダンシル化反応の至適 pH

ダンシル化反応の至適pHを検討した。10 $\mu\text{g/mL}$ のシアナミド標準溶液のpHを緩衝液を用いて5~12に調整し, 1% DNS-Cl溶液1 mLを加え激しく攪拌し, 45°C で60分間加温し, この反応液の上清を用い測定を行った。その結果, ダンシル化は酸性~中性では起こらず, pH 9~12で進行した(Fig. 2)。

反応液のpHは生成する酸により反応が進行するに従い低下するため, 反応完了まで至適pHを維持するため過剰のホウ砂を添加することとした。なお, かんきつ類など試験溶液が酸性の場合は, 炭酸ナトリウムなどを用いる必要があると考えられた。

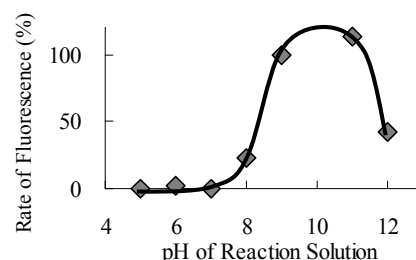


Fig. 2. pH-Rate of Response Curve

3) ダンシル化反応温度および時間

ダンシル化反応の温度および反応時間を検討した。室温(RT)~ 60°C で, 反応開始後0~120分(室温においては反応開始から24時間後を含める)における反応液を経時

的に採取し、DNS-Cyan 量を測定した。シアナミド標準溶液と DNS-Cl 溶液は等容量で反応させ、濃度は反応が飽和しないように設定して行った。同様の実験を日を改め、また試薬の濃度を変更して行っても同様の傾向が得られた。Fig. 3 に 40℃ 60 分後の測定値を 100%としたときの反応到達率の経時変化の代表例を、全ての温度で反応が安定していた 120 分後まで示した。

50, 60℃では約5分でDNS-Cyanの測定値が最大値の約90%に達したが、DNS-Clをアセトン溶液としていることから、時間の経過と共に溶媒が揮散し、測定値に若干のばらつきが生じた。40℃では30分後にはほぼ反応が完了したが、実験ごとに到達率にばらつきがあった。全実験において60分後以降で安定した結果が得られた。室温では約90分後に反応が完了し、24時間後も測定値は安定しており、同日に行った40℃および室温での安定時の値とほぼ同じであった。以上から、反応条件を40℃ 60分または室温 2 時間以上に設定した。

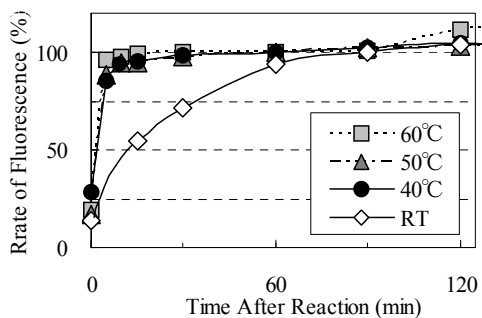


Fig. 3. Time - Rate of Response Curve
RT : room temperature

4) 試験容器

透明試験管と褐色試験管を用いてダンシル化を行い、日光の当たる窓際（室温30℃以下）に静置し、反応完了から断続的に3日後までDNS-Cyanの測定値を比較したが、大きな差は見られなかった。しかし、DNS-Cl試薬由来の黄色の色調が時間経過とともに透明試験管の方では退色し、クロマトグラム上の試薬由来ピーク強度が減少した。そこで、安定して反応を行うために試薬類は遮光保存し、反応時には褐色試験管を使用することとした。

また、試料抽出液中でシアナミドは分解する傾向が認められたので、抽出後は速やかにダンシル化し、測定することとした。

5) 余剰 DNS-Cl の除去と内部標準物質

シアナミドのダンシル化後、余剰のDNS-Clをアミン類を添加して反応させ、トルエンなどの有機溶媒を用いて転溶することでDNS-Cyanとその他の余剰DNS-Clの分離を試みたが物理化学的性状が類似することにより両者を分離することは出来なかった。

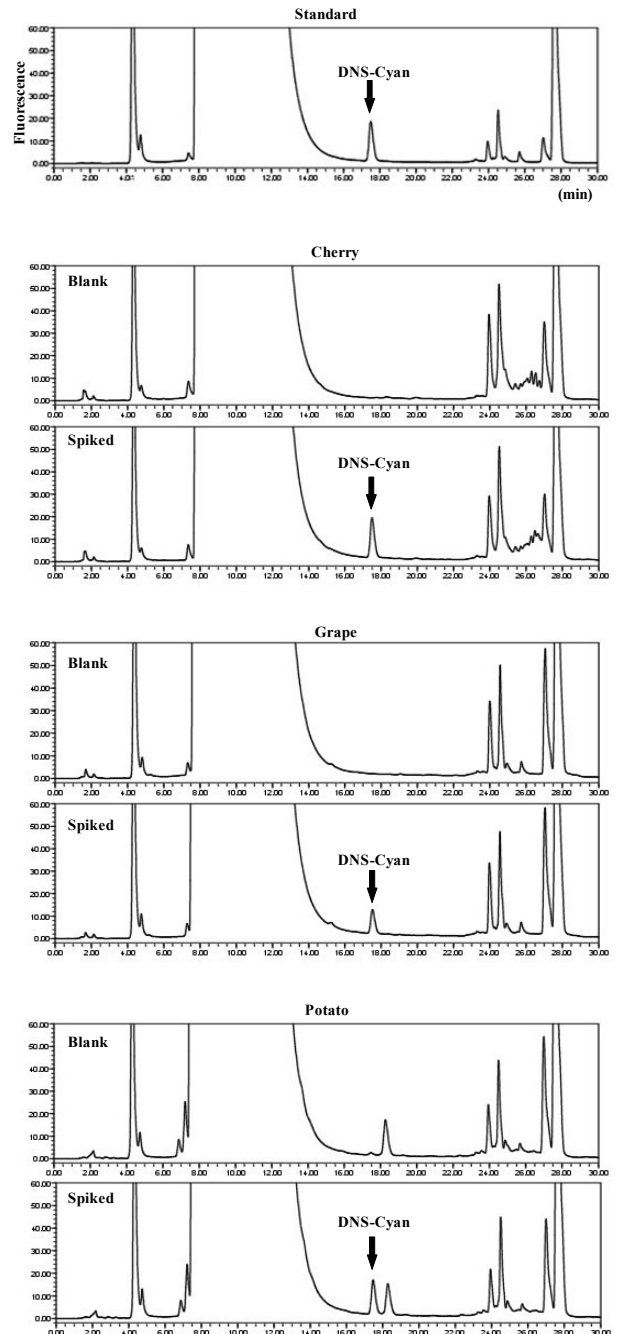


Fig. 4. HPLC-FL Chromatograms of Standard and Spiked Samples
(Cyanamide 0.1 µg/g added)

Table 1. Recovery of Cyanamide from Crops

	Recovery	RSD (%)
Cherry	92.0	12.1
Grape	62.7	8.6
Potato	78.9	9.9

n = 3

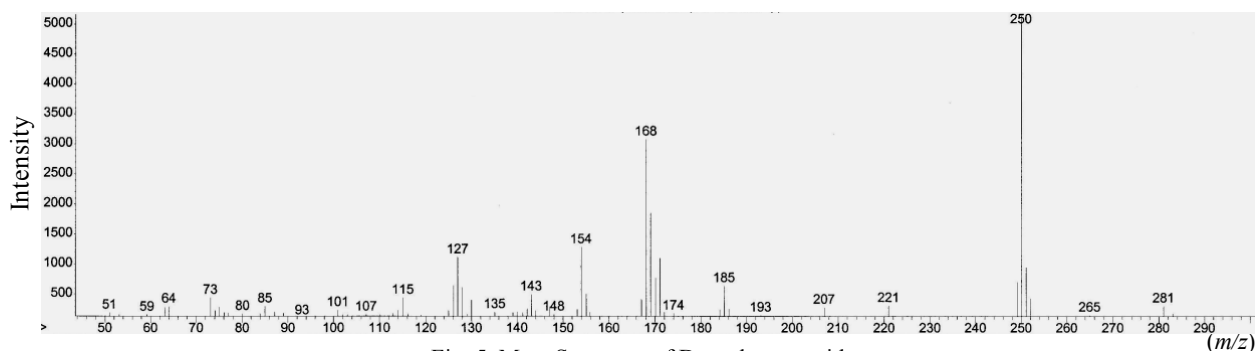


Fig. 5. Mass Spectrum of Dansyl cyanamide

また、内部標準物質としてカダベリン他いくつかの一級アミン類を添加し、シアナミドと同時にダンシル化させ測定値の補正を行う方法を検討したが、反応性やピークの分離など十分に内部標準物質としての機能を果たすアミンを見つけることが出来なかった。

そこで、DNS-Cyan の精製は反応液の上清をメンブランフィルターでろ過することとし、定量は絶対検量線法で行うこととした。

6) GC/MS用試験溶液の精製

ダンシル化後の反応液の各種ミニカラムによる精製を検討したが、定量に使用できる十分な回収率が得られる条件が見つからなかったため、カラム精製はGC/MSでの確認時のみ行うことにした。DSC-18ミニカラムを用いた精製における回収率は、添加回収に用いた食品試料で約38～61%と低かったが、余剰DNS-CI試薬由来と考えられるピークは減少した。この試験溶液を濃縮することでGC/MSによる確認が可能であった。

3. 添加回収試験

チェリー10 gにシアナミド標準溶液0.1 µg/g相当を添加して遮光室温下で30分放置後添加回収試験を行った。ぶどう、ばれいしょについても同様に添加回収試験を行った。

各試料n=3で行ったところ、ぶどうでやや回収率が低いもののほぼ良好な結果が得られた (Table 1)。

Fig. 4の最上段にシアナミド標準溶液0.5 µg/gの反応液、その下に各試料のブランク抽出液の反応液 (上段)、添加試料の反応液 (下段) のHPLC-FLクロマトグラムを示した。DNS-Cyanのピーク位置を矢印で示した。いずれも試薬由来のピークと分離し、良好なクロマトグラムが得られた。

DNS-Cyanの確認はGC/MSスペクトルの標準品との比較により行った (Fig. 5)。本法の定量下限値は0.03 µg/gであ

った。一律基準のチェックにはさらに高感度な分析方法が必要であると考えられた。

まとめ

食品中シアナミドの分析方法の検討を行った。食品の水分を無水硫酸ナトリウムで脱水し、酢酸エチルで抽出を行い、抽出液を濃縮後、水を加えて溶解し、塩基性下でダンシルクロライドと反応させ、蛍光誘導体であるダンシルシアナミドとしてHPLC-FLを用いて測定した。ダンシルシアナミドの確認はGC/MSにより行った。

シアナミド標準溶液0.1 µg/g相当をチェリー、ぶどう、ばれいしょに添加して添加回収試験を行った結果、おおむね良好な回収率が得られた。本法の定量限界は0.03 µg/gであった。

文献

- 1) 日本石灰窒素工業会：土壤中の石灰窒素 (シアナミド) 残留量, <http://www.cacn.jp/effect/shianamid.html> (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)。
- 2) 独立行政法人 農林水産省消費安全技術センター監修, 農薬適用一覧表2009年, 2009, 日本植物防疫協会, 東京。
- 3) 厚生労働省：食品衛生検査指針 理化学編 2005, 2005, 日本食品衛生協会, 東京。
- 4) C D S Tomlin : *The Pesticide Manual*, 14th ed., 226-227, 2006, British Crop Production Council, UK.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課：事務連絡平成20年2月4日, 食品中に残留する農薬メタミドホスに係る試験法について, 2008。

Analysis of Cyanamide Residue in Foods

Sanae TOMIZAWA*, Maki KOBAYASHI*, Yasuhiro TAMURA*, Yukinari TATEISHI*,
Naoko SAKAI*, Kyoko KAMIJO*, Toshihiro NAGAYAMA* and Ichiro TAKANO*

Cyanamide is an active ingredient of nitrolime, which is one of the agricultural chemicals, applied to domestic crops in Japan, and has the maximum residue limit in foreign countries. However, there is no evaluated method for cyanamide analysis. We determined cyanamide content in foods using high-performance liquid chromatography with a fluorescent detector (HPLC-FL). Samples were extracted with ethyl acetate in the presence of anhydrous Na_2SO_4 . The medium was replaced with water and reacted with Dansyl chloride under basic conditions, and Dansylated cyanamide was measured using HPLC-FL. Mean recoveries of compound from 3 agricultural products, except grape, fortified at the analyte concentration of 0.1 $\mu\text{g/g}$ were from 70% to 120%. Repeatability relative to standard deviation values was <20%.

Keywords: cyanamide, pesticide residue, HPLC, fluorescence detector, dansyl chloride

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan