畜水産食品中のアルジカルブ及びその代謝物の分析

橋本 常生，牛山 慶子，立石 恭也，酒井 奈穂子，八巻 ゆみこ
馬場 糸子，大塚 健治，小林 麻紀，永山 敏廣

Determination of Aldicarb and its Metabolites in Livestock Products and Seafoods

Tsuneo HASHIMOTO, Keiko USHIYAMA, Yukinari TATEISHI, Naoko SAKAI, Yumiko YAMAKI,
Itoko BABA, Kenji OTSUKA, Maki KOBAYASHI and Toshihiro NAGAYAMA

東京都健康安全研究センター研究年報　第60号　別刷
2009

東京健安研セ年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 125-129, 2009

畜水産食品中のアルジカルブ及びその代謝物の分析

橋本　常生*, 牛山　慶子*, 立石　恭也*, 酒井　奈穂子*, 八巻　ゆみこ*
馬場　糸子*, 大塚　健治*, 小林　麻紀*, 永山　敏廣*

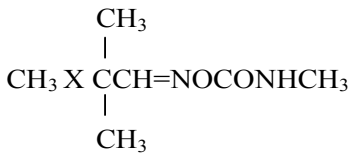
畜水産食品中のアルジカルブ及びその代謝物のアルジカルブスルホキシド，アルジカルブスルホンの分析法を検討した．試料からアセトンで抽出し，ジクロロメタンに転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂操作を行った．次いでSAX/PSAカートリッジカラムに負荷し，アセトン－*n*-ヘキサン混液で溶出して精製を行った．測定にはポストカラム反応蛍光検出器付きHPLCを用いた．畜水産食品にこれらの化合物を0.02 mg/kg添加したときの回収率は73.3 %～104.0 %であり，定量限界は0.005～0.01 mg/kgであった．本分析法は畜水産食品を対象とした残留農薬の個別分析法として十分適用できると考える．

キーワード：アルジカルブ，アルジカルブスルホキシド，アルジカルブスルホン，アルドキシカルブ，代謝物，畜水産食品，残留農薬，HPLC，ポストカラム反応システム，蛍光検出

はじめに

アルジカルブは*N*-メチルカルバメート系農薬のひとつで，その代謝物であるアルジカルブスルホン（アルドキシカルブ）も殺虫剤として農作物に使用されている．平成19年に中国産の生鮮しょうがからアルジカルブの代謝物であるアルジカルブスルホキシドが検出された事例が問題になり[1)]，いわゆる一律基準が適用されることになった[2)]．それにともないアルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの分析も可能とする試験法の改正が行われ通知された[3)]．この通知試験法は農産物を対象としたもので，畜水産食品を対象としたアルジカルブ等の分析法は今までに通知されていない．そのため畜水産食品に適用できる試験法の確立が求められた．

アルジカルブ等の*N*-メチルカルバメート系農薬は，ポストカラム蛍光誘導体化によるHPLCでの高感度かつ高選択性の分析[4,5)]が通知法のベースになっている．そのため著者らはこのポストカラムHPLCを用い，畜水産食品中のアルジカルブ及びその代謝物の分析法を検討したので報告する．



X = S　Aldicarb
X = SO　Aldicarb sulfoxide
X = SO_2　Aldicarb sulfone

図１．アルジカルブ及び代謝物の構造式

実験方法

1. 試料

市販の牛肉（筋肉，脂肪），牛肝臓，豚肉（筋肉），鶏肉（筋肉），エビ，サケ，ウナギ，牛乳及び鶏卵の合計10種類を対象として検討した．

2. 試薬及び標準品

1) 標準品

関東化学（株）製の農薬試験用標準品を用いた．

2) 標準溶液

各標準品それぞれ50.0 mgを量り採り，メタノールに溶解し，正確に50 mLとして標準原液とした．これをメタノールで適宜希釈してHPLC用標準溶液を作製した．

3) 添加回収及び検討用標準溶液

アルジカルブ及びアルジカルブスルホンの標準原液を合わせ，アセトンで希釈し各1 mg/L混合標準溶液を調製した．別にアルジカルブスルホキシドの1 mg/L標準溶液を調製した．

4) ケイソウ土

セライトNo.545（和光純薬工業（株）製）

5) カートリッジカラム

Bond Elut®SAX/PSA，500 mg/500 mg，6mL，VARIAN社製

6) メンブランフィルター

マイレックスLH25（0.45 µm，25 mm i.d.）日本ミリポア社製

7) その他の試薬

残留農薬試験用又は高速液体クロマトグラフ用を用いた．

3. 装置

1) 蛍光検出器付ポストカラム高速液体クロマトグラフ

Waters 2690 HPLCシステム（Waters社製）

* 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

2) 液体クロマトグラフ/質量分析計

Quattro LCシステム（Micromass社製）

4. 分析方法

1) 試験溶液の調製

(1) 抽出操作　厚生労働省通知の総則[6)]に従って採取した試料10.0 g（脂肪の場合は5.0 g）にアセトン50 mLを加え，3分間ホモジナイズした後，毎分2,500回転で3分間遠心分離した．アセトン層をケイソウ土を敷いたろ紙を用い吸引ろ過した．遠心分離管の残留物にアセトン25 mLを加え上記と同様にホモジナイズ後ろ過し，得られたろ液を合わせて40°C以下で約10 mLまで濃縮した．これに飽和塩化ナトリウム溶液200 mLを加え，ジクロロメタン100 mLで2回振とう抽出し，ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水して濃縮した．

(2) 脱脂操作　残留物に*n*-ヘキサン25 mLを加え溶解し，*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出した．アセトニトリル層を合わせ，アセトニトリル飽和*n*-ヘキサン50 mLを加え振とう後，アセトニトリル層を濃縮し，残留物にアセトン－*n*-ヘキサン（4:6）2 mLを加えて溶解した．

(3) 精製操作　あらかじめ，Bond Elut®SAX/PSA（500 mg/500 mg）カートリッジカラムをアセトン20 mL，次いで*n*-ヘキサン20 mLでコンディショニングし，脱脂操作で得られた溶液を負荷し，アセトン－*n*-ヘキサン（4:6）20 mLで溶出した．溶出液を濃縮し，残留物をメタノールに溶解し，1.0 mLとした．その0.3 mLを0.001 mol/L塩酸3 mLに加え，緩やかに振り混ぜた後，孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し，試験溶液とした．

2) HPLCの測定条件

カラム：Carbamate Analysis Column（3.9 mm i.d. x 150 mm）Waters社製

カラム温度：40°C

移動相：A；水，B；メタノール，C；テトラヒドロフラン，

濃度勾配：A:B（92:8）を2 分間送液，A:B（92:8）から（50:50）までの濃度勾配を10 分間，A:B（50:50）3分間保持．A:B（50:50）からA:C（70:30）までの濃度勾配を2 分間，さらにA:B（92:8）までの濃度勾配を10 分間で行った．

流速：1 mL/min

加水分解反応槽温度：80°C

加水分解液：0.05 mol/L水酸化ナトリウム溶液

発蛍光液：オルトフタルアルデヒド10 mg及び2-メルカプトエタノール5 μLを0.05 mol/Lホウ酸ナトリウム溶液で100 mLとしたもの．

加水分解液及び発蛍光液流速：0.5 mL/min

蛍光検出器：励起波長339 nm 蛍光波長445 nm

注入量：40 μL

3) LC/MSの測定条件

カラム：TSKgel ODS-100V（2.1 mm i.d. x 150 mm）東ソー（株）製，

カラム温度：50°C

移動相：A；水－メタノール（9:1）　B；水－メタノール（1:9）

濃度勾配：A:B（9:1）を0.1 分間送液後，A:B（9:1）から（1:3）まで24.9 分間濃度勾配，次にA:B（1:3）から（0:1）まで5分間濃度勾配し，A:B（9:1）を5 分間送液した．

イオン化モード：ESI（+）

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μL

結 果 及 び 考 察

1. 抽出操作

農産物を対象とした通知法に準じ，アセトン抽出を行った．畜水産食品には，精製などの操作性を悪くする原因となる脂肪を多く含む試料もあるため，試料採取量を10 g（脂肪の場合は5 g）とし，アセトン量も50 mL及び25 mLに減らし，スケールを小さくして実施した．

ジクロロメタン転溶では塩化ナトリウム濃度が低いとアルジカルブスルホキシドの回収率が悪い傾向が見られた．そのため飽和塩化ナトリウム溶液を用い，ジクロロメタン100 mLで2 回抽出することにより良好な回収率が得られた（表1）．

表1．ジクロロメタン転溶における回収率

（単位%）

	NaCl濃度			
	5%	10%	20%	飽和
アルジカルブスルホキシド	52.3	66.1	79.2	95.3
アルジカルブスルホン	92.2	98.9	97.5	99.9
アルジカルブ	93.7	98.7	96.7	94.4

各濃度のNaC l 溶液200 mLに標準品（0.2 μg）を添加し，ジクロロメタン100 mLで2回抽出した．

2. 脱脂操作

脱脂操作としてアセトニトリル/ヘキサン分配，ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）[7)]，Extrelut NT + Sep-Pak C18カラムクロマトグラフィー[5)]を検討した．牛脂肪を本分析法で抽出して得られた残留物400 mgを用い，それぞれ脱脂操作を行った．操作後の残留量はアセトニトリル/ヘキサン分配で3 mg, GPCで22 mg, Extrelut NT＋Sep-PakC18で11 mgであった．また，GPC及びExtrelut NT +Sep-PakC18でアルジカルブの一部がアルジカルブスルホキシドに変わることが確認された．以上の事から，脱脂操作は脂溶性成分の除去に有効で標準品の回収も良好であったアセトニトリル/ヘキサン分配を行うこととした．今回，牛脂肪，ウナギ及びサケなど，抽出後の脂溶性残留物が多く残る場合に，アセトニトリル及び*n*-ヘキサンの量を2倍にして操作したところ、分離などの操作性が向上した．

3. 精製操作

抽出及び脱脂操作後においても残留夾雑物が多く存在するため，更に精製操作が必要であった．脂肪酸などの夾雑

物を除く目的でSAXやPSAなどの陰イオン交換カートリッジカラムが，またクロロフィル等の色素を除く目的でグラファイトカーボンカートリッジカラムが使用されている．通知試験法[3)]の追加精製法として，これらカートリッジカラムを直列に連結して使用する精製法が採用されている．畜水産食品ではクロロフィル等の色素を含む試料が少ないことからグラファイトカーボンでの精製を省略したが，特に影響は認められなかった．またSAXとPSAを各500 mgを積層したカートリッジカラムを用い，溶出液のアセトン比率を上げて溶出液量を20 mLに減らし、操作の簡略化を図り良好な結果が得られた．

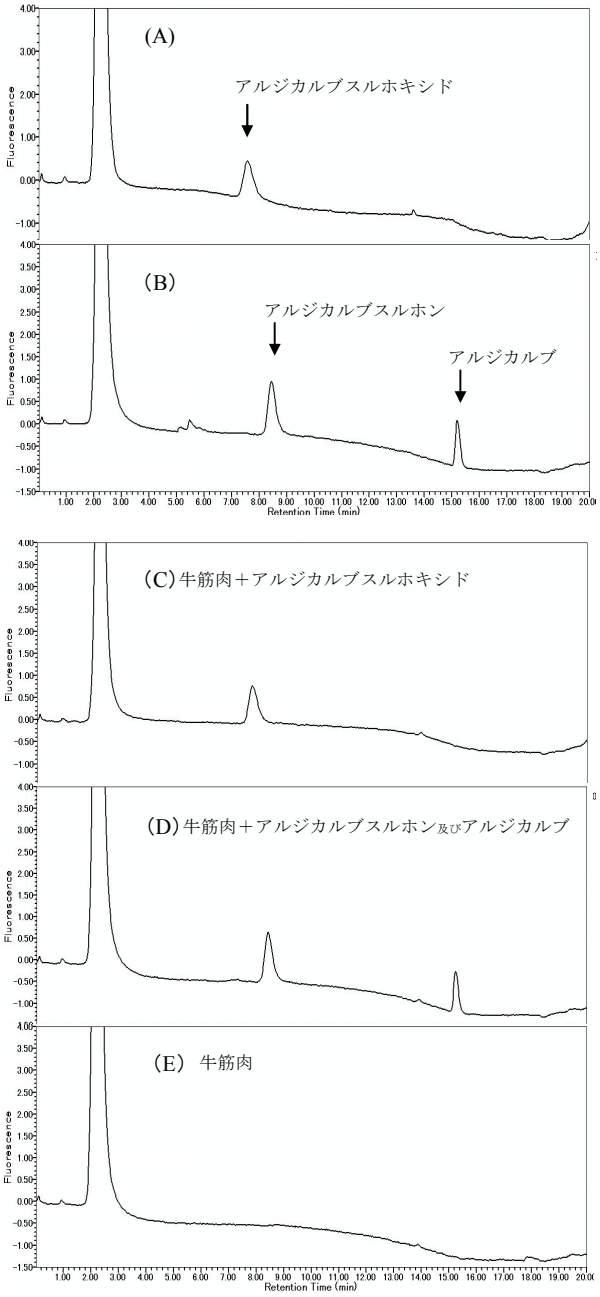


図2. HPLCクロマトグラム

（A，B）標準溶液（各0.2 mg/L）

（C，D）標準添加牛筋肉試験溶液（0.02 mg/kg相当）

（E）　　無添加牛筋肉試験溶液

4. 検量線

各標準品の0.05～2.0 mg/Lメタノール溶液を数点調製し，それぞれ0.3 mLを0.001 mol/L塩酸3 mLに加え，混和した後，40 μLをHPLCに注入し，ピーク面積で検量線を作成した．各化合物の相関係数（*r*）は0.997以上で良好な直線性を示した．

5. 確認試験

各標準品のLC/MSのマススペクトルから，主なイオン（*m/z*）はアルジカルブが213 ([M＋Na]$^+$)，116，アルジカルブスルホキシドが207，132，アルジカルブスルホンが223であった．添加試料の抽出・精製後のメタノール試験溶液を用いた測定により，マススペクトルのイオン確認が可能であった

6. 添加回収試験

アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンはアルジカルブの代謝物であり，分析中に試料などの影響により，アルジカルブの一部がこれらの代謝物に変化する可能性がある[5,8)]．今回の脱脂操作では，GPCやExtrelut NT＋Sep-PakC18の操作中にアルジカルブが一部分解されアルジカルブスルホキシドへの変化が観察された．また津村ら[8)]の添加回収試験でも一部の農作物でアルジカルブからアルジカルブスルホキシドへの変化が認められたが，アルジカルブスルホンへの変化は見られなかった．そこで，正しい添加回収結果を得るため，アルジカルブスルホキシド標準溶液，アルジカルブ及びアルジカルブスルホン混合標準溶液を別々に添加して検討した．それぞれの試料濃度として0.02 mg/kg（試料10 gに対し1 mg/L標準溶液0.2 mL，脂肪の場合は試料5 gに対し同標準溶液0.1 mL）となるように添加して回収試験を実施した．アルジカルブの分解や妨害ピークの影響は認められず（図2），回収率は73.3～104.0%，変動係数は1.9～14.8%とほぼ良好な結果が得られた（表2）．

表2．添 加 回 収 試 験

	アルジカルブスルホキシド		アルジカルブスルホン		アルジカルブ	
	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
牛筋肉	86.8	6.1	92.9	8.4	85.9	9.9
豚筋肉	85.1	3.1	95.0	2.5	90.7	3.2
鶏筋肉	83.3	2.6	94.6	4.5	95.9	6.8
牛脂肪	87.7	3.0	90.2	10.1	96.1	5.2
牛肝臓	73.3	14.8	88.8	8.7	86.8	5.6
エビ	82.9	5.4	89.4	2.0	79.8	2.1
サケ	76.1	9.4	90.1	8.6	92.7	4.2
ウナギ	74.3	6.2	86.7	4.6	96.7	3.3
牛乳	84.2	5.0	97.1	2.4	90.6	1.9
鶏卵	86.7	7.5	104.0	3.0	87.9	3.6

添加後30分放置、n=5

本法での定量限界はいずれも試料中濃度として0.005 mg/kg（脂肪の場合は0.01 mg/kg）である．畜水産食品を対象に，アルジカルブスルホキシドの一律基準（0.01 ppm）

やアルジカルブ，アルドキシカルブの暫定基準等の適合を判断する際に適用できると考える．

ま と め

畜水産食品を対象とし，アルジカルブ及び代謝物のアルジカルブスルホキシド，アルジカルブスルホンの分析法を検討した．試料からアセトン抽出，ジクロロメタン転溶を行い，アセトニトリル/ヘキサン分配，SAX/PSAカートリッジカラムで精製した．測定はポストカラム反応蛍光検出器付きHPLCを用いた．10種類の畜水産食品を用いた添加回収試験における回収率は73.3～104.0%，定量限界は0.005～0.01 mg/kgであった．

本研究は，平成19年度厚生労働省医薬食品局食品安全部の残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る分析法開発事業により実施したものである．

文 献

1) 厚生労働省医薬食品安全部監視安全課・輸入食品安全対策室長通知“中国産しょうがの取扱いについて”平成19年8月1日食安輸発第0801003号(2007).
2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“アルジカルブスルホキシドの取扱いについて”平成19年8月9日食安発第0809005号(2007)
3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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の一部改正について”平成19年8月9日食安発第0809001号(2007)
4) 永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，他：食衛誌，**35**(5), 470-478, 1994.
5) 小林麻紀，永山敏廣，高野伊知郎，他：食衛誌，**43**(3), 133-143, 2002.
6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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1章 総則 平成17年1月24日食安発第0124001号(2005)
7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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2章 一斉試験法 平成17年1月24日食安発第0124001号(2005)
8) 津村ゆかり，中村優美子，吉井公彦，他：食衛誌，**39**(6), 357-367, 1998.

Determination of Aldicarb and its Metabolites in Livestock Products and Seafoods

Tsuneo HASHIMOTO*, Keiko USHIYAMA*, Yukinari TATEISHI*, Naoko SAKAI*, Yumiko YAMAKI*, Itoko BABA*, Kenji OTSUKA*, Maki KOBAYASHI* and Toshihiro NAGAYAMA*

A procedure for the determination of aldicarb and its metabolites (aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone) in livestock products and seafoods by HPLC was developed. A sample was extracted with acetone and re-extracted with dichloromethane. The crude extract was partitioned between acetonitrile and *n*-hexane. The extract was cleaned up on a SAX/PSA cartridge column. Aldicarb and its metabolites were analyzed by HPLC with post-column reaction and fluorescence detection. Recoveries of these compounds added to several samples at a level of 0.02 mg/kg were between 73.3% and 104.0%. The limit of determination was 0.005-0.01 mg/kg.

Keywords: aldicarb, aldicarb sulfoxide, aldicarb sulfone, aldoxycarb, metabolite, livestock product and seafood, pesticide residue, HPLC, post-column reaction system, fluorescence detection

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