

アセトニトリル抽出 / ミニカラム精製を用いたGC/MS及びHPLCによる農産物中の*N*-メチルカルバメート系農薬の分析

青柳陽子*, 佐藤 寛*, 都田路子*, 高田千恵子**
山田洋子*, 荻原 勉*, 天川映子*, 安田和男*

Determination of *N*-Methylcarbamate Pesticides in Agricultural Products by GC/MS and HPLC Using Acetonitrile Extraction / Clean-up by Mini-columns

Yoko AOYAGI*, Hiroshi SATOH*, Michiko MIYAKODA*, Chieko TAKADA*
Yoko YAMADA*, Tsutomu OGIWARA*, Eiko AMAKAWA* and Kazuo YASUDA*

An analytical method was studied for the determination of *N*-methylcarbamate pesticide (NMC) residues in agricultural products by GC/MS and HPLC. After NMC was extracted with acetonitrile, the acetonitrile layer was cleaned up on C18 and Envi-Carb/LC-NH₂ cartridges. NMC was determined by GC/MS and HPLC with post-column reaction and fluorescence detection. The recovery of NMC from agricultural products by GC/MS were between 75.0 and 121.9%, and by HPLC were between 71.2 and 110.3% except for ethiofencarb. This method was useful for the determination of NMC in agricultural products.

Keywords : アセトニトリル抽出 acetonitrile extraction, 固相抽出法 solid phase extraction (SPE), 農産物 agricultural products, *N*-メチルカルバメート系農薬 *N*-methylcarbamate pesticide (NMC), ガスクロマトグラフ/質量分析計 GC/MS, 液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

食品衛生法により定められた農産物中の農薬に関する残留基準は平成4年以降, 年々増加し平成13年8月現在, 217農薬について設定されており, 今後もさらに増加が予定されている. すでに残留基準が設定されている*N*-メチルカルバメート系農薬(NMC)は, 6種であり, 告示法では, ポストカラム法を用いたHPLCにより試験するように定められている¹⁾.

当所では, 将来的に, 膨大な数が見込まれる基準設定農薬に対し効率的な試験検査を行うために一斉分析法を検討し, GC/MSによりスクリーニングを行い, 検出した農薬について, GCあるいはHPLCにより定量している²⁾.

NMCには, 生体中や環境中で代謝され易いものや, 加熱により分解され易い農薬もある^{3,4)}. また, 極性の高い農薬ではGC/MSにより分析できないものや, 感度が低いものもある. そこで, 当所で使用している一斉分析法が, NMCに適用できるか否かを, コマツナ, キュウリ, トマト及び日本ナシの計4種の農産物を対象に検討したところ, 良好な結果が得られたので報告する.

実験方法

1. **試料** 平成12年10月~平成13年6月に多摩地域の小売店で市販されていたコマツナ(試料数: 1), キュウリ²⁾, トマト¹⁾, 日本ナシ¹⁾, カボチャ¹⁾, ジャガイモ²⁾, ハクサイ²⁾, キャベツ¹⁾, ニラ¹⁾, マイタケ¹⁾計10種13検体を試料として用いた.

2. **測定対象農薬** メソミル, カルボフラン, イソプロカルブ, カルバリル, メチオカルブ, ピリミカーブ, オキサミル, アルジカルブ, チオジカルブ, ベンダイオカルブ, エチオフエンカルブ, フェノブカルブの12種について検討した.

3. **試薬** 1) 農薬標準品: アルジカルブ, メソミルはジーエルサイエンス社製, オキサミル, イソプロカルブ, メチオカルブ, ベンダイオカルブはReidel-de-Haën社製, カルバリル, エチオフエンカルブ, フェノブカルブ, ピリミカーブは和光純薬工業^(株)製, チオジカルブは関東化学^(株)製のものをを用いた. 2) 検量線用混合標準溶液: 各農薬標準品50 mgを秤量し, それぞれアセトニトリルで正確に50 mlとして, 1000 µg/mLの各標準原液を調製した. HPLCで各農薬のピークの保持時間(*R_t*)がクロマトグラム上で重ならないように6種ずつA, Bの2グループに分けて調製

* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

** 東京都立衛生研究所 環境保健部水質研究科

した。Aグループはメソミル、カルボフラン、イソプロカルブ、カルバリル、メチオカルブ、ピリミカーブ、Bグループはオキサミル、アルジカルブ、チオジカルブ、ベンダイオカルブ、エチオフェンカルブ、フェノブカルブとした。各標準原液をグループごとに混合したのちアセトニトリルを用いて希釈し、0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように調製した。また、GC/MS用にはA, Bグループのそれぞれについてアセトニトリルを減圧濃縮し窒素気流下で乾固した後、残留物をアセトン/*n*-ヘキサン (1:1) 混液に溶解し、HPLC用と同濃度のものを調製した。3) 添加回収実験用混合標準溶液：標準原液をグループごとに0.5 mLずつ混合し、アセトニトリルで正確に100 mLとして各農薬の濃度が5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加回収実験用混合標準溶液を調製した。4) フタルアルデヒド：Merck社製、5) 2-メルカプトエタノール：関東化学(株)製特級、6) C18ミニカラム：Waters社製 Sep pak Vac 6 cc, 1 g, C18 cartridge, 7) 活性炭ミニカラム：SUPELCO社製 6 mL SPE tube Envi-Carb 500 mg/LC-NH2 500 mg, 8) アセトニトリル, アセトン, *n*-ヘキサン及びトルエン：残留農薬試験用 (300倍濃縮)。その他の試薬は残留農薬試験用, 水は電気抵抗18M以上のイオン交換水を用いた。

4. 装置及び測定条件 1) GC/MS装置：Finniganmat社製TRACKER (イオントラップ型), カラム：HP-5 MS 0.25 mm i.d. \times 30 m, 膜厚0.10 μm , キャリヤーガス：He, カラムヘッド圧：12 psi, カラム温度：40 (2 min) 10 /min 280 (4 min) 10 /min 290 (2 min), 注入口温度：250, インターフェース温度：260, イオン源温度：250, イオン化電圧：70 eV, イオン化法：EI, 注入量：2 μL (スプリットレス), 2) HPLC 装置：蛍光検出器付ポストカラムHPLCシステム 島津製作所製 LC-10 カルバメート分析システムを用いた (LC10AT型送液ポンプ, SPD-LC10型蛍光分光検出器, LC10AT型オートサンプラー, CLASS-LC10型データ処理システム)。ガードカラム：Shodex RSpac DE-G, 4.6 mm i.d. \times 10 mm, 分析カラム：Shodex CARB-413 (4.6 mm i.d. \times 150 mm), ラインフィルター (インジェクターとポンプの間に装着)：Shodex RSpac CARB-LF (4.6 mm i.d. \times 10 mm), 流速：0.8 mL/min, カラム温度：50, 移動相：アセトニトリル/水 (37:63), 検出波長：Ex340 nm, Em445 nm, 注入量：10 μL , 加水分解液：0.05 mol/L 水酸化ナトリウム溶液, 流速：0.4 mL/min, 発蛍光液：0.05% α -フタルアルデヒド, 0.1%メルカプトエタノール, 流速：0.4 mL/min, 反応温度：100. 装置：880-PU型送液ポンプ, FP-920型蛍光分光検出器, 865-CO型カラムオープンはいずれも日本分光工業(株)製, クロマトパックCR-6 Aデータ処理器は島津製作所製を用いた。カラム温度：40, 移動相：水/メタノール/リン酸緩衝液 (1:7:2), リン酸緩衝液 (水酸化ナトリウム 1.75 g, リン酸二水素ナトリウム二水和物 11.7 gを水に溶解し, 全量を1 Lとした.), 検出波長：Ex312 nm, Em382 nm, 注入量：10 μL , カラム：

LiChrosorb RP-18, 5 μm , 4.6mm i.d. \times 250 mm, 流速：1 mL/min.

5. 試験溶液の調製 Fig. 1 に示した。

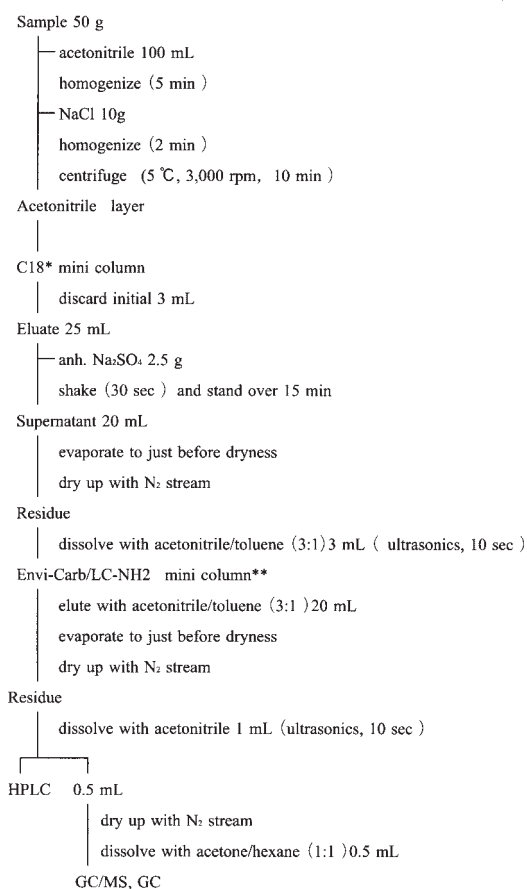
6. GC/MSによるスクリーニング試験 GC/MSでの測定が可能なカルボフラン, イソプロカルブ, カルバリル, メチオカルブ, ピリミカーブ, アルジカルブ, ベンダイオカルブ, エチオフェンカルブ, フェノブカルブの計9種についてスクリーニング試験を行った。

トータルイオンクロマトグラムを測定し, *Rt*及び Table 1 に示したモニターイオンのクロマトグラム及びマススペクトルにより定性を行った。

なお, 添加回収試験は, 2回ずつ注入し, モニターイオンの面積を測定し, その平均値から, 予め作成した検量線により検出量を算出した。

7. HPLCによる測定 アルカリ条件下で加水分解して, メチルアミンを生成し蛍光誘導体化が可能なメソミル, カルボフラン, イソプロカルブ, カルバリル, メチオカルブ, オキサミル, アルジカルブ, チオジカルブ, ベンジオカルブ, エチオフェンカルブ及びフェノブカルブ計11種について, HPLCの装置により分析した。

*Rt*により定性確認後, ピーク面積を用いて予め作成した



* Conditioned with acetonitrile (10 mL)

** Conditioned with acetonitrile/toluene (3:1) (10 mL)

Fig. 1. Sample Preparation Method for Determination of Pesticides in Agricultural Products

Table 1. Retention Time, Monitor Ion and Detection Limit (LOD) of *N*-Methylcarbamate Pesticides in GC/MS

Pesticide	Rt (min)	Quantifier ion(m/z)	Identificative ion(m/z)	LOD(ppm)
Aldicarb	3:29	68	68, 100, 89	0.003
Isoproc carb	12:54	121	121, 136, 91	0.001
Fenobucarb	13:44	121	121, 150, 91	0.001
Bendiocarb	14:31	151	151, 166, 126	0.001
Carbofuran	15:16	164	164, 149, 131	0.001
Ethiofencarb	16:23	107	107, 168, 106	0.001
Pirimicarb	16:26	166	166, 72, 238	0.001
Carbaryl	16:50	114	115, 114, 116	0.005
Methiocarb	17:20	168	168, 153, 109	0.003

検量線からそれぞれの農薬を定量した。

ピリミカーブはアルカリ加水分解でメチルアミンを生ずる化合物ではないがそれ自体が蛍光を持つ。GC/MSでピリミカーブが検出された場合は、ピリミカーブの特有の検出波長でHPLCの装置によりピーク面積を用いて予め作成した検量線から定量した。

8. 添加回収試験 試料50 gにA及びBグループの5 µg/mL添加回収実験用混合標準溶液2 mLをそれぞれ添加し(試料換算0.2 ppm, n = 3, 試料ブランク, n = 1), 30分間放置後, 本法に従い操作して試験溶液を調製しGC/MS及びHPLCにより測定し, 回収率及びCV値を算出した。

結果及び考察

1. 試料前処理法の検討

1) 抽出溶媒の検討 告示法では, 試料からNMCを抽出する際, アセトンを用いている。アセトンは油溶性物質の溶解性が大きいので, 農薬以外の試料中の成分も抽出され, HPLCクロマトグラム上に多くの妨害ピークが出現し試験溶液のより煩雑な精製操作が必要になる。

アセトニトリルは, 油溶性物質の溶解性は低い, 極性の比較的小さい物質から大きいものまで, 広範囲の物質を溶解し, 塩析により水相と分離も可能である。そこで, 本法では, Fillionら⁵⁾が用いたアセトニトリルを抽出溶媒として使用することにした。

2) 試験溶液の精製 固相抽出による精製は, 簡便性と効率の良さから農薬分析においても広く使用されている^{6,7)}。

種々検討した結果, C18ミニカラム及び前報⁸⁾で用いた活性炭(Envi-Carb)にアミノプロピル(LC-NH₂)を積層した2種のミニカラムの使用を試みた。

すなわちこれらのカラムを用いてコマツナ, キュウリ, トマト及び日本ナシに適用して試験溶液を調製し, HPLC装置, 及びGC/MSで分析したところ, いずれもクロマトグラム上に特に妨害となるピークはなかった。FillionらはC18, 活性炭カラム, アミノプロピルの3種のミニカラムを用いたが, 本法ではこれら2種のミニカラムを用いることで十分な精製効果が得られた。

2. GC/MS条件 GC/MSで測定可能な9種については本法の測定条件で相互に分離できた。しかし, 再現性では測定値が大きくばらつく場合もあった。これは, インジェクション部分, カラムや検出器部分の汚れなどによるものと考えられる。検量線は0.25~1 µg/mLで直線性(r = 0.98以上)を示した。

GC/MSによる9種のNMC検出限界は試料換算で, 0.01 µg/g以下であった(S/N = 3)(Table 1)。

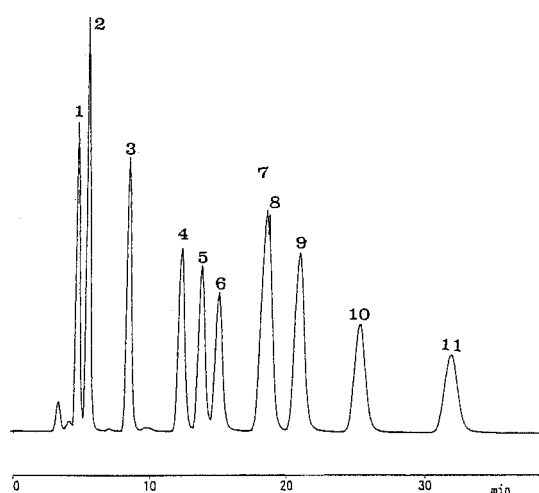
GC/MSは, HPLCに比べ再現性は低い, 検出感度も満足できるものであり, スクリーニング試験には十分使用できると考える。

3. HPLC条件 告示法のNMCの試験はグラジエントを用いたポストカラム法が採用されている。グラジエントは, 一般的にベースラインやRtが変動しやすく, また, 初期の移動相の溶媒組成で安定化させる時間も必要となる。日常業務でのスクリーニング試験では, 簡便で精度が高く, かつ迅速な測定法が求められている。

そこで, 今回は再現性にすぐれたアイソクラティックな条件下で分析を試みた。種々検討した結果, 分析カラムにShodex CARB-413, 移動相にはアセトニトリル/水(37:63)混液を用いることにより, 35分間で11種のNMCを分離できた。そのクロマトグラムをFig. 2に示した。再現性については, 各NMCの1 µg/mL標準溶液を3回注入した結果, RtのCV値は0.0~0.1%, 面積のCV値は0.7~2.1%であり, 非常に良好な結果が得られた。

検量線はチオジカルブを除き12農薬において0.25~1 µg/mLの範囲で, r = 0.99以上と良好な直線性を示した。なおチオジカルブはr = 0.98であった。

HPLCでの検出限界は, チオジカルブが試料換算で0.025 ppm

Fig. 2. HPLC Chromatogram of *N*-Methylcarbamate Pesticides

1: Oxamyl, 2: Methomyl, 3: Aldicarb, 4: Carbofuran, 5: Thiodicarb, 6: Bendiocarb, 7: Isoproc carb, 8: Carbaryl, 9: Ethiofencarb, 10: Methiocarb, 11: Fenobucarb

Table 2. Recoveries of *N*-Methylcarbamate Pesticides from Agricultural Products by GC/MS and HPLC

Pesticide group	Komatsuna				Cucumber				Tomato				Japanese pear			
	GC/MS		HPLC		GC/MS		HPLC		GC/MS		HPLC		GC/MS		HPLC	
	Recovery* (%)	CV** (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Methomyl A	ND***		97.5	9.7	ND		102.6	11.3	ND		99.7	5.5	ND		100.4	4.1
Carbofuran A	100.6	7.3	99.4	9.3	97.8	7.5	97.6	7.4	112.9	7.4	105.4	5.0	113.5	5.0	107.1	1.6
Isoprocarb A	113.1	0.9	106	11.5	102.1	4.0	94.7	2.4	113.2	1.1	109.5	5.0	117.6	1.9	110.3	1.9
Carbaryl A	104.1	13.9	97.7	6.8	89.2	1.0	95.6	3.7	111.8	5.3	106.4	4.5	114.9	1.9	109.6	2.1
Methiocarb A	97.8	8.7	96.1	4.0	96.1	8.7	91.0	1.9	117.8	5.5	106.9	6.2	121.9	4.0	108.6	1.6
Pirimicarb A	100.0	2.8	109.0	7.4	82.4	5.2	99.9	2.5	79.4	1.6	100.0	1.8	96.8	3.3	94.8	3.4
Oxamyl B	ND		102.2	3.1	ND		97.9	3.7	ND		71.2	3.6	ND		96.5	1.8
Aldicarb B	85.2	17.7	89.6	0.9	75.0	6.6	75.2	12.1	90.2	7.4	97.1	1.6	94.4	7.6	104.0	0.9
Thiodicarb B	ND		103.5	6.0	ND		88.8	5.7	ND		102.0	2.0	ND		110.0	8.9
Bendiocarb B	112.5	12.1	99.3	2.4	96.1	7.9	85.4	2.0	102.1	6.0	102.5	2.7	106.3	4.1	108.9	1.2
Ethiofencarb B	29.0	166.0	42.5	33.6	49.2	39.3	11.0	48.7	102.1	16.1	62.2	13.3	44.3	31.0	51.7	26.5
Fenobucarb B	111.0	6.4	96.2	2.8	94.6	2.0	89.3	3.8	89.6	7.1	101.1	4.6	97.0	4.2	108.0	1.3

n = 3

*Added amount was 0.2 ppm.

**CV = Coefficient of variation

***ND : Not detected

と高かったが、その他の11種のNMCは0.005 ppmであった。しかしチオジカルブでの登録保留基準値の最低値はイモ類の0.1 ppmであるので、本法は十分使用できると考える (Table 1)。

以上の結果から、NMCの分析には、簡易な操作で再現性がよく、測定時間の短いアイソクラティックな条件下で十分定量出来ることがわかった。

4. 回収率の検討 野菜3種果実1種を用いて行った添加回収実験の結果をTable 2に示した。

GC/MSでは回収率は29.0~121.9%、HPLCでは11.0~110.3%であった。GC/MSではメソミル、オキサミル、チオジカルブは検出されなかった。これらは、いずれも極性が高く、GC/MSで低濃度での測定は不可能なため、今後、LC/MSなど別の手段での検討が必要と考える。

また、酸化されやすいとの報告のあるエチオフェンカルブ^{9, 10)}は、トマトではGC/MSで102.1%、HPLCでは62.2%と比較的良好な回収率であった。しかし、他の3種の農産物ではHPLC、GC/MSいずれの場合も、回収率は51.7%以下で、CV値は、HPLC 26.5~48.7%、GC/MS 31.0~166.0%と再現性も悪かった。原因は抽出操作や加熱により酸化されてエチオフェンカルブがスルホキシド、スルホン体となったことが原因と考える。今回は、これらの酸化体を測定しなかったため、その変化を確かめることはできなかった。

チオジカルブは、HPLCで4種の野菜とも回収率は良好であった。また、このほかに前処理中に酸化されやすいアルジカルブ、メチオカルブもHPLCでは、回収率75.2~108.6%と良好であった。これは、本法は抽出や精製の過程で使用した有機溶媒量が、従来の方法に比べて少なく溶

媒の減圧留去に要する時間が短いために、加熱による酸化を防ぐことができたためと考える。また回収率が120%を越えたものは、GC/MSでは日本ナシのメチオカルブであり、他の3種の野菜の回収率は良好であった。

5. 実試料への適用 本法を用いてコマツナ、キュウリ、トマト、日本ナシ、カボチャ、ジャガイモ、ハクサイ、キャベツ、ニラ及びマイタケ計10種13試料について分析したところ、日本ナシから0.10 ppmのメソミルが検出された。

ま と め

農産物中のNMC12種について、アセトニトリルで抽出した後、C18とEnvi-Carb/LC-NH2の2種のミニカラムで精製し、GC/MS及びHPLCにより分析する方法について検討したところ、以下のことが明らかになった。

1. GC/MSでは、メソミル、チオジカルブ、オキサミルを除く9農薬についてスクリーニングが可能であり、検出限界は0.01 ppm (試料換算) 以下であった。

2. アイソクラティック溶出によるポストカラムを用いたHPLCにより、11種のNMCを分離し、測定時間の短縮及び操作を簡素化できた。

3. HPLCでの検出限界は、チオジカルブで0.025 ppm (試料換算)、それ以外の11農薬で0.005 ppmであった。

4. 回収率は、コマツナ、キュウリ、トマト、日本ナシの4種類の農産物でGC/MSではメソミル、チオジカルブ、オキサミル、エチオフェンカルブを除く8種の農薬で75.0~121.9%であり、HPLCではエチオフェンカルブを除く11種の農薬で71.2~110.3%と良好であった。

以上の結果から、GC/MSはスクリーニング法として、HPLCは定量法として使用できるものとする。

文 献

- 1) 食品衛生研究会：食品衛生小六法，平成13年度版 535-538, 2000，新日本法規出版(株)，名古屋。
- 2) 佐藤寛，青柳陽子，高田千恵子，他：東京衛研年報，52, 2001。
- 3) 外海泰秀，中村優美子，津村ゆかり，他：食衛誌，36, 506-515, 1995.
- 4) 津村ゆかり，中村優美子，吉井公彦，他：食衛誌，39, 357-367, 1998.
- 5) Fillion, J., Sauve, F. and Selwyn, J. : *J. AOAC Int.*, 83, 698-713, 2000.
- 6) 平井佐紀子，陰地義樹，佐々木美智子：食衛誌，36, 635-638, 1995.
- 7) 柴田吉有，小山真由美，佐藤ひとみ：食衛誌，39, 241-250, 1998.
- 8) 佐藤寛，大橋則雄，天川映子，他：東京衛研年報，50, 124-129, 1999.
- 9) 永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，他：食衛誌，35, 470-478, 1994.
- 10) 高瀬巖：農薬研究，29, 29-40, 1983.