

## 蛍光検出器付きHPLCによる玄米中のカルバリルの分析法

中村 正規<sup>1</sup>

### Studies on Residual Carbaryl in Unpolished Rice by High Performance Liquid Chromatography using Fluorescence Detector

Masanori NAKAMURA

蛍光検出器付のHPLCを用いて玄米中に残留するカルバリル（以下NACと略す）の分析法を開発した。カラムにInertsil ODS-2, 移動相に水：アセトニトリル=50：50を用いた。蛍光検出器の励起波長は275 nm, 蛍光波長は335 nm, 保持時間は約5.5分で0.5 ngから100 ngまでピーク高さ, ピーク面積とも直線性を示した。

玄米からの抽出方法は30%含水アセトン中で一夜放置し, ろ過操作を省略し, 20%ジクロロメタン含有n-ヘキサンで抽出した。抽出液を少量の水で洗浄した後, 脱水し, 溶媒を留去した。アセトニトリル-n-ヘキサン分配により脱脂を行い。アセトニトリルを留去し, フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製を行った。6%エチルエーテル含有n-ヘキサン30 mlで有機塩素系農薬を溶出させ, 続いて10%アセトン含有n-ヘキサン50 mlでNACを溶出した。溶媒留去後, アセトンに溶解しHPLCの検液とした。添加回収率は0.025 ppmから0.5 ppmの間で89.2%から94.9%で, 定量下限は0.005 ppmであった。

1984年より1990年までに市内で収去された玄米59件を測定したところ, 3件からNACが検出されたが, 食品衛生法の規格基準値の10分の1以下であった。

**Key words :** カルバリル carbaryl, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, 蛍光検出器 fluorescence detector,  
玄米 unpolished rice

#### I はじめに

カルバリル（以下NACと略す）はカーバメート系農薬に分類され, 殺虫剤や植物成長調整剤として使用されている。わが国での使用量も多く, 現在15種類のカーバメート系統農薬が登録されている<sup>1)</sup>が, 食品衛生法により食品への残留量が規制されているのは, NACだけである。分析法も数多く報告されており, 厚生省から示されている方法は比色法<sup>2)</sup>が採用されている。ガスクロマ

トグラフィーを使用した方法には, モノクロルアセチル化を行いECD-GCで検出する方法<sup>3, 4)</sup>, フルオロアセチル化物をECD-GCで測定する方法<sup>5, 6)</sup>があるが, 反応操作を必要とするため分析時間が長くなる。FTD-GCによりNACを直接検出する方法<sup>7, 8)</sup>もあるが, 検出頻度が高い有機リン系化合物が妨害したり, 長時間の測定を行う場合, 感度の安定性に若干の問題がある。またHPLCを使用した方法は, 紫外部に吸収を有することを利用して, UV検出器を用いた方法<sup>9, 10)</sup>, オルトフタルアルデヒドによるポストラベルを行い蛍光検出器により検出する方法<sup>11)</sup>, アルカリ性の溶離液を使用しクロ

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

マトグラフィーを行いながら $\alpha$ -ナフトールに変化させ蛍光検出器で測定する方法<sup>12)</sup>がある。蛍光検出器はUV検出器に比べ選択性や感度が高いが、ポストラベル法は通常のHPLCでは測定不可能で高価なシステムを必要とする。山崎ら<sup>13)</sup>は、NAC自体が蛍光を有することを利用して、HPLCによる測定を行っている。今回、この検出法を玄米中のNACの測定に利用し、測定条件及び抽出法と精製方法について更に検討を加えた。その結果、精度の高い分析法を開発することができた。また市販の玄米に残留するカルバリルについて調査を行ったので、合わせて報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料

昭和59年より平成2年までに、食品衛生監視員により福岡市内で取去された玄米59件を使用した。

### 2. 試薬

NAC標準品は和光純薬製

有機溶媒、無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を使用。

フロリジルカラムは60-100 meshのフロリジルを450℃、6時間活性化後5% (V/W)の水を加えて調整したもの3gを、内径1cmのガラスカラムに6%エーテル含有n-ヘキサンで湿式充填し、無水硫酸ナトリウムを1cmの高さに積層した。

ガラス繊維濾紙(GFP)は外経90mmのGS-25(ADVA NTEC社製)を500℃で1夜放置し冷却したもの。

水はn-ヘキサンで洗浄したものを使用した。

### 3. 分析方法

粉碎器で粉碎した試料約10gを200mlの遠沈管に取り、30%含水アセトン100mlを加え時々振とうしながら1夜放置した。20%ジクロルメタン含有n-ヘキサン30mlを加え、10分間激しく振とうし、遠心分離後溶媒層を分取し、さらに20%ジクロルメタン含有n-ヘキサン30mlとアセトン15mlを加え振とう、分離後、溶媒層を合わせて水10mlで洗浄した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。残渣をn-ヘキサン10mlで溶解し30mlのn-ヘキサン飽和のアセトニルで2回分配し、アセトニルをエバポレーターで完全に留去した。残渣を少量のn-ヘキサンで溶解しフロリジルカラムに負荷し6%エーテル含有n-ヘキサン30mlを有機塩素系農薬の画分とし、続いて10%アセトン含有n-ヘキサン50mlでNACを溶出させ溶媒留去後、1mlのアセトンで溶解しHPLCの検液とした。

## 4. 装置及び測定条件

### 1) HPLCシステム

送液ポンプ: LC-5A (島津製作所)

インジェクター: 7125型 (レオダイン)

蛍光検出器: RF-530 (島津製作所)

紫外検出器: SPD-6A (島津製作所)

データ処理装置: C-R5A (島津製作所)

### 2) 粉碎器: CM-601

コーヒーミル型 (日立)

### 3) ロータリーエバポレーター:

N-4型 (東京理化工器)

### 4) 蛍光分光光度計: RF-503A (島津製作所)

## 5. HPLC測定条件

カラム: Inertsil ODS-2 (5 $\mu$ m),  
4.6mmI.D.\*15cm

移動相: 水: アセトニル = 50 : 50

カラム温度: 室温

流速: 0.8ml/min

蛍光検出器: 励起波長275nm,

蛍光波長335nm

紫外検出器: 220nm

注入量: 10 $\mu$ l

## III 結果及び考察

### 1. 測定条件の検討

#### 1) 検出条件の検討

NACは分子内にナフトリン環を有し、NAC自体に蛍光があるが、使用する媒体により波長がシフトするため、移動相の50%含水アセトニルで溶解し、蛍光スペクトルを測定した。NAC 10ppmから得られた蛍光ス

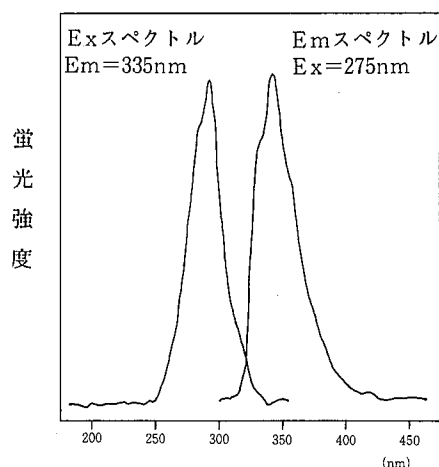


図1 NACの蛍光スペクトル

ペクトルを図-1に示した。励起波長 275 nm, 蛍光波長 335 nmで最大強度が得られ, これらの波長で測定を行った。紫外検出器は 220 nmの吸収が最も強いので, この波長で測定を行った。

### 2) 移動相の検討

分離カラムにはODS系のInertsil ODS-2 (5 μm)を使用し, 移動相の検討を行った。分配係数k'を3程度になる条件を検討したところアセトニトリル:水が50:50で得られた。この条件で得られたクロマトグラムを図-2に示した。メタノール:水が60:40でも同様のクロマトグラムを示したが, 玄米中の妨害物質との分離がアセトニトリル系の方が良好であった。しかし, 他のカラムや経歴の異なるカラムでは最適条件が異なる場合もあるため, 2種類の移動相を比較する事は有意義であると考えられる。

### 3) 検量線

NACの濃度を変え, 10 μl注入した場合のピーク面積とピーク高さを測定した。結果を表-1に示したが0.05 ppmから10 ppmまで, ピーク高さ及びピーク面積とも直線を示した。

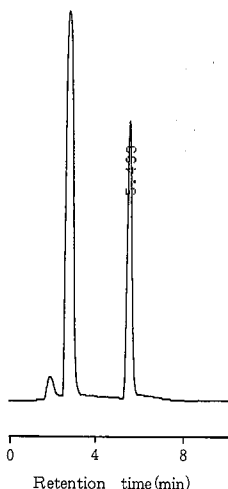


図2 0.5 ppm NACのHPLCクロマトグラム

#### HPLC測定条件

- カラム: Inertsil ODS-2 (5 μm)  
4.6 mm I.D. \* 15 cm
- 移動相: 水:アセトニトリル = 50:50
- カラム温度: 室温
- 流速: 0.8 ml/min
- 蛍光検出器: 励起波長 275 nm,  
蛍光波長 335 nm
- 注入量: 10 μl

表1 NACのピーク面積及びピーク高さ

濃度 (ppm)	ピーク面積		ピーク高さ	
	面積	面積 (%)	高さ	高さ (%)
0.05	5176	5287 ±1.9%	370	383 ±3.0%
	5271			
	5415			
0.25	26050	26293 ±0.8%	1880	1910 ±1.5%
	26255			
	26575			
0.5	55590	55410 ±0.2%	3831	3817 ±0.3%
	55322			
	55320			
10.0	1129069	1126128 ±0.3%	77998	77765 ±0.3%
	1128364			
	1120953			

## 2. 玄米からの抽出方法

玄米からのNAC抽出法にはジクロロメタン<sup>2,6)</sup>, 30%含水アセトン<sup>4)</sup>, アセトニトリル<sup>9)</sup>などによる方法が報告されている。これらの方法をNACが検出した玄米を用いて比較した。

**ジクロロメタン法:** 粉碎試料 10 g にジクロロメタン 100 mlを加え1夜放置後, GFPで吸引ろ過し, 残渣を50 mlのジクロロメタンで洗浄抽出し, ろ液を合わせてエバポレーターで溶媒を留去した。

**アセトニトリル法:** 粉碎試料 10 g にアセトニトリル 100 mlを加え1夜放置後, GFPで吸引ろ過し, 残渣を50 mlのアセトニトリルで洗浄抽出し, ろ液を合わせてエバポレーターで溶媒を留去した。

**30%含水アセトン法:** 粉碎試料 10 g に30%含水アセトン 100 mlを加え1夜放置後, ろ過操作を省略し, 20%ジクロロメタン含有n-ヘキサン 30 ml × 2で抽出

表2 抽出法の違いによるNACの定量値

抽出溶媒	定量値 (ppm)	平均 (ppm)
ジクロロメタン	0.019	0.019
	0.019	
	0.019	
アセトニトリル	0.013	0.014
	0.014	
	0.014	
30%含水アセトン	0.023	0.023
	0.024	
	0.023	

した。抽出液を合わせて 10 ml の水で水洗し脱水後、エバポレーターで溶媒を留去した。

3 種の方法で得られた抽出物を、分析方法に従い、アセトニトリル分配とフロリジルカラムクロマトグラフィー後、HPLCで測定を行った。

結果を表-2 に示した。最も定量値の高い 30 % 含水アセトン法を 100 とすると、ジクロロメタン法が 82.6 %、アセトニトリル法が 60.9 % であった。後藤ら<sup>9)</sup> は乾燥試料の場合、含水した溶媒により抽出した方が抽出率が増加すると報告しており、今回の結果もそれを証明していると考えられた。

### 3. クリーンアップ方法

試料からの抽出物には脂肪分を含むため、アセトニトリル-n-ヘキサンによる脱脂操作を行った。分配後のアセトニトリルは高木ら<sup>10)</sup>と同様にエバポレーターにより留去を行った。次にフロリジルを用いたカラムクロマトグラフィーの検討を行った。フロリジルは有機塩素系農薬の精製に多く用いられており、同一の抽出物で有機塩素系農薬とNACの系統分析が可能となれば、食品衛

生法の規格基準で定められた残留農薬の分析が省力化され、分析時間が短縮されることになる。そこで、5 % 含水したフロリジルを用いて、溶出条件を検討した。有機

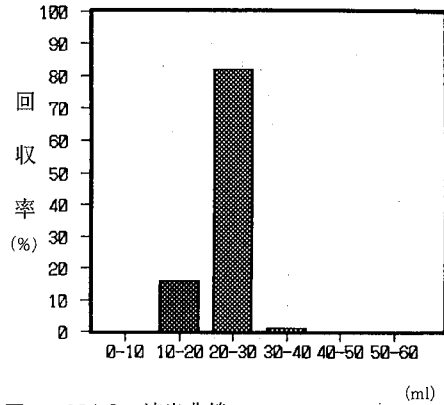


図3 NACの溶出曲線  
5%含水フロリジル 3g  
6%エーテル含有n-ヘキサン 30mlで洗浄後、  
10%アセトン含有n-ヘキサンで溶出。

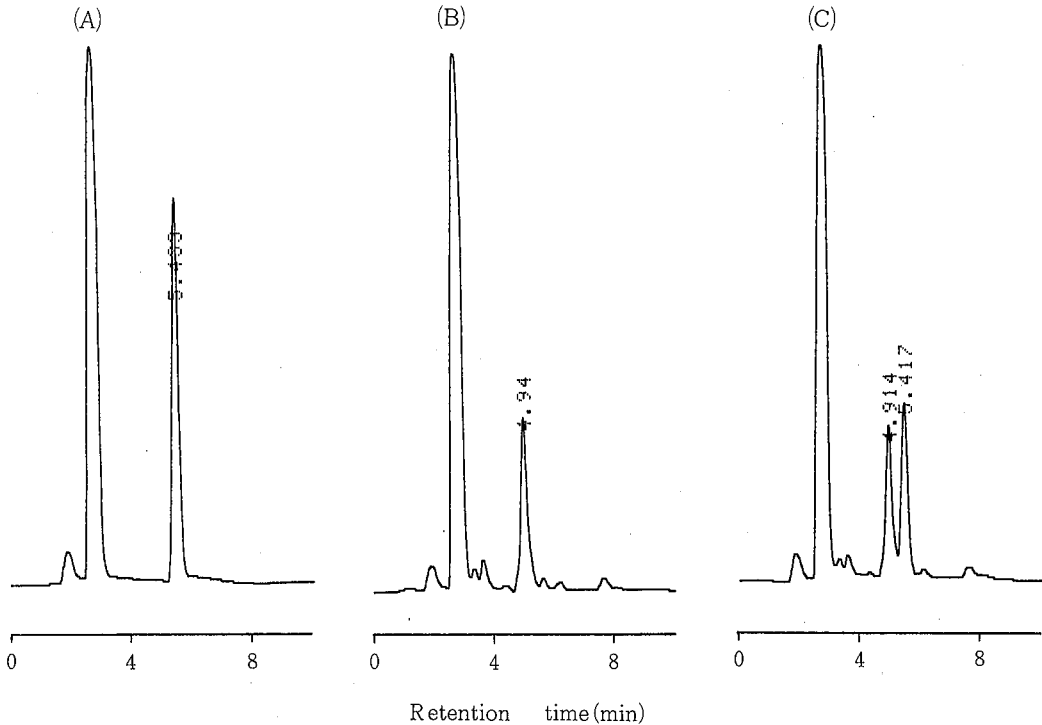


図4 玄米のHPLCクロマトグラム  
A : 0.5 ppmNAC標準液  
B : 玄米  
C : NAC 0.25  $\mu$ g 添加した玄米  
HPLC条件は図1と同じ

塩素系農薬を6%エーテル含有n-ヘキサン30mlで溶出した後、10%アセトン含有n-ヘキサン50mlでNACを定量的に溶出することができた。10μgのNACを用い回収率を測定したところ、98.5%であった。カラムからの溶出パターンを図-3に示した。

HPLC検液の溶媒は、移動相またはそれに近い溶媒に溶解させるが、今回はアセトンを用いた。標準品と試料を共にアセトンで溶解することで、保持時間の差は見られなかった。また、GC-Mass等での確認の際に溶媒を変換する操作が不要であった。

#### 4. 添加回収実験

NACの含有しない玄米10gにNACを0.25μg、0.5μgと5.0μg添加し分析操作の回収率を測定した。結果を表-2に示した。試料濃度0.025ppmで89.2-92.5%、0.05ppmで91.2-94.9%、0.5ppmで91.1-92.2%で、残留分析法として十分な回収率が得られた。更に、有機塩素系農薬との系統分析が可能な事を考えると非常にすぐれた分析法であるといえる。試料中のNACの最低検出量は0.005ppmであった。

表2 添加回収実験結果

添加量 (μg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.25	89.2	90.6±1.5
	90.0	
	92.5	
0.5	91.2	92.7±1.6
	94.9	
	92.1	
5.0	92.0	91.8±0.5
	92.2	
	91.1	

#### 5. 市販玄米中の残留量

昭和59年より平成3年まで計59件の玄米を測定し、収去日ごとの測定結果を表-3に示した。3件から検出したが、食品衛生法の規格基準の1ppmに比べ10分の1以下の値であった。

### 文 献

- 1) 農薬ハンドブック1989版：p65-81, 1989, 日本植物防疫協会
- 2) 武田明治, 他：食品中の残留農薬分析に関する研究(第10報), 食衛誌, 14(5), p467-473, 1973
- 3) 星野和行, 他：アルカリ加水分解物を用いたカーバ

表3 市販玄米中NACの残留濃度

収去日	検体数	検出数	検出濃度 (ppm)
S60. 1	7	0	
S60. 6	5	1	0.023
S61. 1	6	0	
S62. 6	4	0	
S63. 3	10	2	0.017, 0.063
H 1. 11	15	0	
H 2. 11	12	0	
計	59	3	

メート系殺虫剤のガスクロマトグラフィー, 食衛誌, 16(4), p275-281, 1975

- 4) 武田明治：食品中の残留農薬分析法, 食品衛生研究, 34(11), p1019-1045, 1984
- 5) 宮田秀昭, 榎本 隆：野菜と果実に残留するカーバメート系殺虫剤の分析法の検討, 食衛誌, 15(6), p485-490, 1974
- 6) 関田 寛, 他：食品中の残留農薬分析に関する研究(第15報), 食衛誌, 15(4), p219-225, 1974
- 7) 戸田和子, 藤原光雄：FTDガスクロマトグラフィーによる残留カーバメート殺虫剤NAC, APCの定量, 食衛誌, 16(6), p417-419, 1975
- 8) 後藤真康, 加藤誠哉：残留農薬分析法, p115-117, 1980, ソフトサイエンス社
- 9) 永山敏廣, 他：HPLCの食品分析への応用, 第24回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p44-45, 1987
- 10) 関谷安正, 他：SEP-PACK C18カートリッジによるカルバリルの定量法, 第24回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p45-46, 1987
- 11) DANIEL CHAPUT：Simplified Multiresidue Method for Liquid Chromatographic Determination of N-methyl Carbamate Insecticides in Fruits and Vegetables, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(3), p542-546, 1988
- 12) 石橋 亮, 他：蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによる農作物中のカルバリル(NAC)の分析法について, 日本食品衛生学会第60回学術講演会講演要旨集, p40, 1990
- 13) 山崎哲司, 他：高速液体クロマトグラフィーによる農作物中のCarbaryl(NAC)のケイ光分析法について, 日本食品衛生学会第33回学術講演会講演要旨集, p46, 1975
- 14) 高木靖弘, 谷田一男：玄米中カルバリルの比色定量

法における前処理について，食衛誌，14(5)，p 482

— 485, 1973