

添加しても全く改善しなかった。このことから、Bond Elut PSA を用いずに以下の検討を進めた。

5. 精製方法の検討

Bond Elut SAX, Sep-Pak NH2 (MPA 添加), ENVI-Carb の 3 種のミニカラムを様々なパターンで組み合わせて柑橘類抽出液の精製の程度を比較検討した。

酢酸エチルで柑橘類を抽出した溶液は、アセトン溶液としては澄明でも、ヘキサンを加えると沈殿が生じ、カラムが詰まって流出しなくなった。これを解決するため、アセトン溶液として充てん剤中に吸着させた後にヘキサンを含む溶出溶媒を流す方法を考案した。

ミニカラムの組み合わせとしては、ENVI-Carb と Bond Elut SAX を連結し、かつ流出液を 3 つの画分に分けた場合に、最も NMC と妨害ピークが分離された。しかし試料の負荷量が 2 g 相当程度を越えると精製が不十分になった。そこで、Bond Elut (充てん剤量 500 mg) に換えて Mega Bond Elut (充てん剤量 1g) を用いたところ、5 g 相当の試料を負荷できた。

この条件でレモン、オレンジ、グレープフルーツに NMC を添加して試験液調製操作を行った場合の各 NMC と妨害ピークの溶出位置は、Table 8 にまとめたとおりになった。オレンジ中のメチオカルブ、グレープフルーツ中のベンダイオカルブ、カルボフラン等では、流出画分を 3 つに分けたことで妨害ピークと NMC のピークが分離できたことがわかる。妨害とピークの一部が重なっている NMC についても、分画したことでピーク頂上は分離して定量が可能になるものがあった。

各フラクションに NMC が溶出する比率を Fig. 4 に示した。HPLC で妨害と重なるものについては LC/MS での測定値を示してある。レモン、オレンジ、グレープフルーツを試料とした場合で、各 NMC の溶出位置は基本的に同じであった。しかし No.17 のアミノカルブはレモンとグレープフルーツからは全く回収されなかった。また、No.33 のメキサカルバメートは、3 種の試料において溶出位置が全く異なっていた。メキサカルバメートもアミノカルブと同じくトリアルキルアミンであり、試料中の酸性成分と何らかの相互作用を起こしている可能性が

ある。しかし、メキサカルバートは酢酸水溶液中でもアミノカルブのようにピークがブロードになることはなかった。今回対象とした NMC の中でトリアルキルアミンはこの 2 化合物のみである。

6. 各農産物への添加回収試験

レモン、オレンジ、グレープフルーツの試料溶液のクロマトグラムを、Fig.5-1,2,3 及び Fig.6 に示した。また、Table 9 にすべての NMC の回収率と標準偏差をまとめて示した。添加回収実験は各 3 試行を行った。酢酸エチル抽出を行った場合の特性として、チオエーテル基を有する NMC は分析操作中にスルホキシド体に変化するものがあった⁶⁾。それらの回収率も親化合物に換算して示した。レモン及びグレープフルーツ中のアミノカルブとメキサカルバートの回収率は、前述のとおり低い或不検出であった。

B1 はレモン・グレープフルーツでの回収率が極めて低かった。この化合物は他の NMC に比較して水溶性が高いため、前報⁵⁾でも良好な回収率が得られていない。グレープフルーツ中の B0 の回収率が 55.6%と低いのも、分析操作中に B1 に変化したものが回収されなかったためと考えられる。

レモンのチオジカルブの回収率は 48.5 %と低かった。グレープフルーツ中のメソミル、M2, T0, イソプロカルブの回収率はゼロないし 10%台と低かった。これらのうちイソプロカルブは、LC/MS では保持時間が後方へずれた位置で検出され、計算上の回収率は 274 %と異常な値であった。イソプロカルブと一致する保持時間に、蛍光を持たない妨害物質が溶出してイソプロカルブの溶出位置を移動させ、定量値にも影響したと考えられる。HPLC でもイソプロカルブの保持時間はずれたものと考えられるが、該当する位置に妨害ピークが出たため、明確な結果は得られなかった。

グレープフルーツ中のフェノブカルブは、HPLC においては妨害ピークと重なって測定できなかったが、LC/MS では保持時間が後方へずれて観測され、その回収率は 150.2%と異常値であった。フェノブカルブも妨害物質と保持時間が重なって溶出状態が影響されたと考えられる。

上記以外では、レモンでの回収率 64.2%

(E0)~97.8% (M1), オレンジでの回収率 60.1 (T2)~87.8% (B2), グレープフルーツでの回収率 60.2 (E1)~88.3% (3-ヒドロキシカルボフラン)であった。

7. HPLCとLC/MSの結果比較

Table 10にHPLCとLC/MSで得られた添加回収率の比較を示した。本研究はHPLCで妨害ピークと重なって測定できないNMCのみを補助的にLC/MSを用いて測定するとの方針で行ったため、33種類中13種類のデータしか得ていないが、全般にHPLCとLC/MSによる回収率はよく一致しており、LC/MSでは妨害ピークの影響もほとんど無かった。ただし、LC/MSにおける感度がHPLCにおける感度より低い化合物があり、そのようなものでは、濃度の低いフラクションにおいて不検出となつて、結果的に低い回収率が得られる場合があつた。また、グレープフルーツは特に妨害物質が多く、LC/MSではカルボフランの位置に過大なイオンが発生したため質量分析計のフィラメントが自動消灯して測定値が得られなかった。また、イソプロカルブとフェノブカルブは前述のとおり100%を大きく超える異常値となつた。複数のモニターイオンで同様現象が見られた。これらは液体クロマトグラフの問題であり、試験溶液の精製度をさらに向上させて解決するしかないと考えられた。

各フラクションについてHPLCとLC/MS双方でNMC濃度を測定して比較した83通りの組み合わせについて、相関をFig. 7に散布図で示した。 $R^2=0.9178$ ($R=0.958$)であり、両者の値はよく一致していた。

8. 本法の実用性

Table 9の最下段に示したとおり、本法によりレモン中で29種、オレンジ中で33種(全て)、グレープフルーツ中で26種のNMCが60~98%の回収率で定量できると考えられた。LC/MSの再現性・定量値の正確さは本研究開始当初の予測より高く、HPLCを用いずにLC/MSのみで定量してもかなり信頼性のある結果が得られるのではないかと考えられた。NMCが検出された場合の確認も、LC/MSを用いれば容易である。ただし、今回はすべてのNMCをLC/MSで測定したわけではなく、中には検出下限値が十分でないNMCがある可能性

もあり、今後の検討が必要である。

また、LC/MSにおいては妨害ピークが少なく、試験溶液を3画分に分ける必要は無い可能性がある。しかし、グレープフルーツ中のイソプロカルブやフェノブカルブの定量値が100%を超えたり保持時間がずれたりした結果からは、たとえ測定イオンが異なる妨害物質であっても液体クロマトグラフの溶出状態に影響することを示している。従つて、画分を合わせても良好な結果が得られるか否かは、さらに検討を重ねなければ判断できない。

HPLCにおける検出限界はほとんどのNMCで注入量として0.2ng(Table 1)であつたが、これは試料中濃度として約0.005 μ g/gに相当する。柑橘類中のNMCの残留基準値の中で特に低いのはメチオカルブ0.05 μ g/g、アルジカルブ0.3 μ g/g、フェノブカルブ(みかんのみ)0.3 μ g/gであるが、これらについても本法で測定可能と考えられた。LC/MSにおける検出限界は、検討した範囲内ではHPLCと同程度かやや感度が低いものが多かつた。

D. 参考文献

- 1) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 二島太一郎: 食衛誌, 35, 470~478(1994).
- 2) Tsumura, Y., Ujita, K., Nakamura, Y., Tonogai, Y., Ito, Y.: J. Food Protect. 58, 217~222 (1995)
- 3) 農薬環境保全対策研究会編: "残留農薬基準ハンドブック-作物・水質残留の分析法-" p.44~47 (1995) 化学工業日報社.
- 4) 同上 P.944~947.
- 5) 東京都立衛生研究所「平成11年度農薬告示分析法検討会報告書」(2000)
- 6) 津村ゆかり, 中村優美子, 吉井公彦, 外海泰秀, 肥後真美子, 柴田正: 食衛誌, 39, 357~367 (1998)
- 7) Newsome, W.H., Lau, B.P.-Y., Ducharme, D., Lewis, D.: J. AOAC Int., 78, 1312-1316 (1995)
- 8) Yang, S.S., Goldsmith, A.I., Smetena, I.: J. Chromatogr. A, 754, 3-16 (1996)

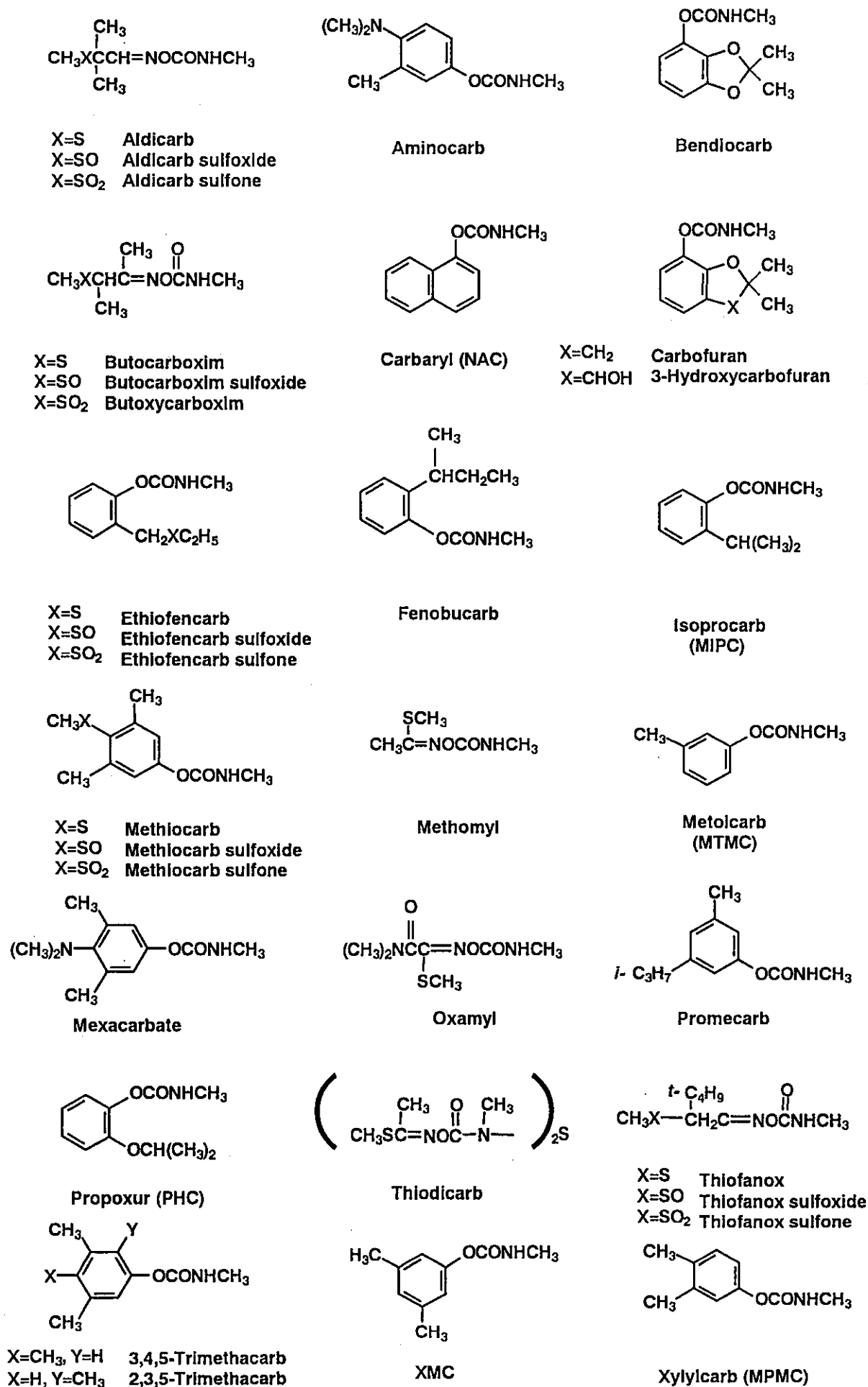


Fig. 1 N-メチルカルバメート系農薬及びそれらの代謝物の化学構造式

Table 1 対象としたN-メチルカルバメート系農薬及び代謝物

No.	化合物名	保持時間	グループ	検出下限値*(ng)		LC/MSIにおける 検出イオン
				HPLC	LC/MS	
1	Butocarboxim sulfoxide (B1)	5.772	B	0.1		
2	Aldicarb sulfoxide (A1)	6.379	C	0.1		
3	Butoxycarboxim (B2)	6.799	A	0.1		
4	Aldicarb sulfone (A2)	7.240	B	0.1		
5	Oxamyl	8.211	C	0.1		
6	Methomyl	9.772	B	0.1		
7	Ethiofencarb sulfone (E2)	13.911	A	0.2		
8	Ethiofencarb sulfoxide (E1)	14.851	B	0.2		
9	Thiofanox sulfoxide (T1)	15.040	A	0.2		
10	Thiofanox sulfone (T2)	15.940	C	0.2	0.2	380
11	Methiocarb sulfoxide (M1)	16.382	A	0.2	0.2	185, 242
12	3-Hydroxycarbofuran	16.837	C	0.2	0.2	367
13	Methiocarb sulfone (M2)	18.000	B	1		
14	Butocarboxim (B0)	20.398	C	0.5		
15	Aldicarb (A0)	20.766	A	0.2		
16	Metolcarb (MTMC)	22.391	C	0.2		
17	Aminocarb	24.581	B	0.2		
18	Propoxur(PHC)	24.637	C	0.2		
19	Bendiocarb	24.657	A	0.2		
20	Carbofuran	24.947	B	0.2	0.2	222
21	Carbaryl (NAC)	26.067	A	0.2		
22	Xylylcarb (MPMC)	26.391	B	0.2	0.5	180
23	Ethiofencarb (E0)	26.960	C	0.2	0.5	226
24	XMC	27.048	A	0.2	1	123, 164, 180
25	Thiofanox (T0)	27.563	B	2	0.5	178
26	Thiodicarb	27.585	C	0.2	0.2	355
27	Isoprocarb (MIPC)	28.535	B	0.2	0.5	194
28	2,3,5-Trimethacarb	29.623	C	0.2	0.2	194
29	3,4,5-Trimethacarb	29.889	A	0.2	0.5	137, 194
30	Fenobucarb (BPMC)	31.695	B	0.2	0.5	208
31	Methiocarb (M0)	32.243	C	0.2		
32	Promecarb	33.122	A	0.2		
33	Mexacarbate	33.695	B	0.2		

* S/N>3

注入量として0.2ngの検出下限値は、試料中濃度として約0.005 $\mu\text{g/g}$ に相当する。

Scheme 1

柑橘類中のN-メチルカルバメート試験法

ミニカラム ENVI-Carb スペルコ Supelclean 3mL (0.25g)
MEGA Bond Elut-SAX バリアン 1g (6mL)
それぞれアセトン20mL+ヘキサン10mLでコンディショニングして連結

柑橘類20 g (ホモジナイズしたもの)

アセトン100+50mLで抽出
40°C以下でアセトンが無くなるまで濃縮
分液ろうとに移し、塩化ナトリウム2.5gを加えて溶かす。
酢酸エチル100mlで3回抽出
(1回目の抽出溶媒100mlでナス型フラスコを洗浄して分液ろうとに移す)

溶媒層

無水硫酸ナトリウム20gを加えて15分間放置(脱水)後、ろ過
酢酸エチル(20ml x 2回)で無水硫酸ナトリウムを洗浄
40°C以下で溶媒除去
残留物をアセトンに溶解して2mLとする
0.5mLとり、カラムに負荷

カラムクロマトグラフィー ENVI-Carb+SAX

カラム下部から吸引してENVI-Carb中のアセトンを抜く。
① 5%アセトン/ヘキサン 15mL 流速0.5mL/min
② 10%アセトン/ヘキサン15mL
③ 20%アセトン/ヘキサン15mL
ENVI-Carbをはずす
④ 50%アセトン/ヘキサン15mL
①+②、③、④を40°C以下で溶媒除去
残留物を500 μ Lのメタノールに溶解し、その200 μ L採って1%酢酸2mlを加える。
メンブランフィルターろ過

ポストカラム反応蛍光検出HPLC

LC/MS (ポストカラム反応蛍光検出で妨害ピークと重なったものについて)

Table 2-1 ポストカラム反応蛍光検出HPLCの条件

Apparatus

Column : Shimadzu HRC-ODS 4.6 mm id x 150 mm
Work station : Shimadzu CLASS-LG10
Automatic injector : Shimadzu SIL-10A
Pumps for mobile phase : Shimadzu LC-10AD
Pumps for reaction solvents : Lab-Quatec Co., Ltd. MP-312
Degassor : Lab-Quatec Co., Ltd. GASTORR GT-104
Oven for column and OPA reaction : Shimadzu CTO-10A (50°C)
Oven for hydrolysis : Shimadzu CRB-6A (90°C)
Fluorescence detector : Shimadzu RF-10A (Ex. 340 nm, Em. 455 nm)

Operating parameters I

Mobile phase A : 5% methanol in distilled water
Mobile phase B : 80% methanol in distilled water
Sodium hydroxide solution: 2g of NaOH was dissolved in 1,000 mL of distilled water (0.05 N)
OPA solution : 100 mg of o-phthalaldehyde, 19.0 g of sodium borate (10 H₂O) and 50 μ L of 2-mercaptoethanol were dissolved in 1,000 mL of distilled water
Flow rate of reaction solvents : 0.35 mL/min for each solution
Flow rate of mobile phase
Total flow rate : 1.0 mL/min
Time program (ratio of mobile phase B)
start - 3min : 15.0%
3 - 35 min : 15.0%→100.0% (linear)
35 - 45 min : 100.0%
45 - 60 min : 15.0%

Operating parameters II

Column : Shodex RSpak CARB-413 (4.6mm i.d. x 150mm)
Guard column : Shodex RSpak DE-G (4.6mm i.d. x 10mm)
Oven for column and OPA addition : Shimadzu CTO-10A (40°C)
Mobile phase : 30% acetonitrile in distilled water
Flow rate of mobile phase : 0.8 mL/min

Table 2-2 LC/MSの条件

Apparatus

LC/MS system: Shimadzu LC/MS QP-2010
 Column : Shimadzu Shim-pak VP-ODS 2.0 mm id x 150 mm (mesh 5 μ m)
 Work station : Shimadzu LCMSsolution Ver. 2.02
 Automatic injector : Shimadzu SIL-10AD VP
 Pumps for mobile phase : Shimadzu LC-10AD VP
 Degassor : Shimadzu DGU14AM
 Oven for column : Shimadzu CTO-10AC VP (40°C)
 UV-visible detector : Shimadzu SPD-10A VP (200 - 300nm)

Operating parameters(LC)

Mobile phase A : 0.2% acetic acid in distilled water
 Mobile phase B : 0.2% acetic acid in acetonitrile
 Flow rate of mobile phase
 Total flow rate : 0.2 mL/min
 Time program (ratio of mobile phase B)
 0 - 20 min : 30 %→97 % (linear)
 20 - 24 min : 97 %
 24 - 25 min : 97 %→30 %
 25 - 30 min : 30 %
 Injection volume : 20 μ L

Operating parameters(MS)

Ionization mode : ESI (+)
 gas flow : 4.5 L/min
 Voltage : -4.5 kV
 Temperature : 200°C

Table 3 繰り返し注入における保持時間と定量値の変動

	<u>保持時間変動係数(%)</u>		<u>定量値変動係数(%)</u>	
	HPLC	LC/MS	HPLC	LC/MS
1 B2	0.11		1.74	
2 E2	0.04		2.70	
3 T1	0.05		1.74	
4 M1	0.05	0.00	3.97	3.06
5 A0	0.04		2.06	
6 Bendiocarb	0.05		2.37	
7 Carbaryl	0.05	0.11	2.28	2.47
8 XMC	0.05	0.08	2.43	1.80
9 3,4,5-Trimethacarb	0.04	0.11	1.35	3.10
10 Promecarb	0.05		2.52	

それぞれ混合溶液A (0.09 μ g/mL) を7回繰り返し注入して保持時間とピーク面積(HPLC) または高さ(LC/MS)を求めた。

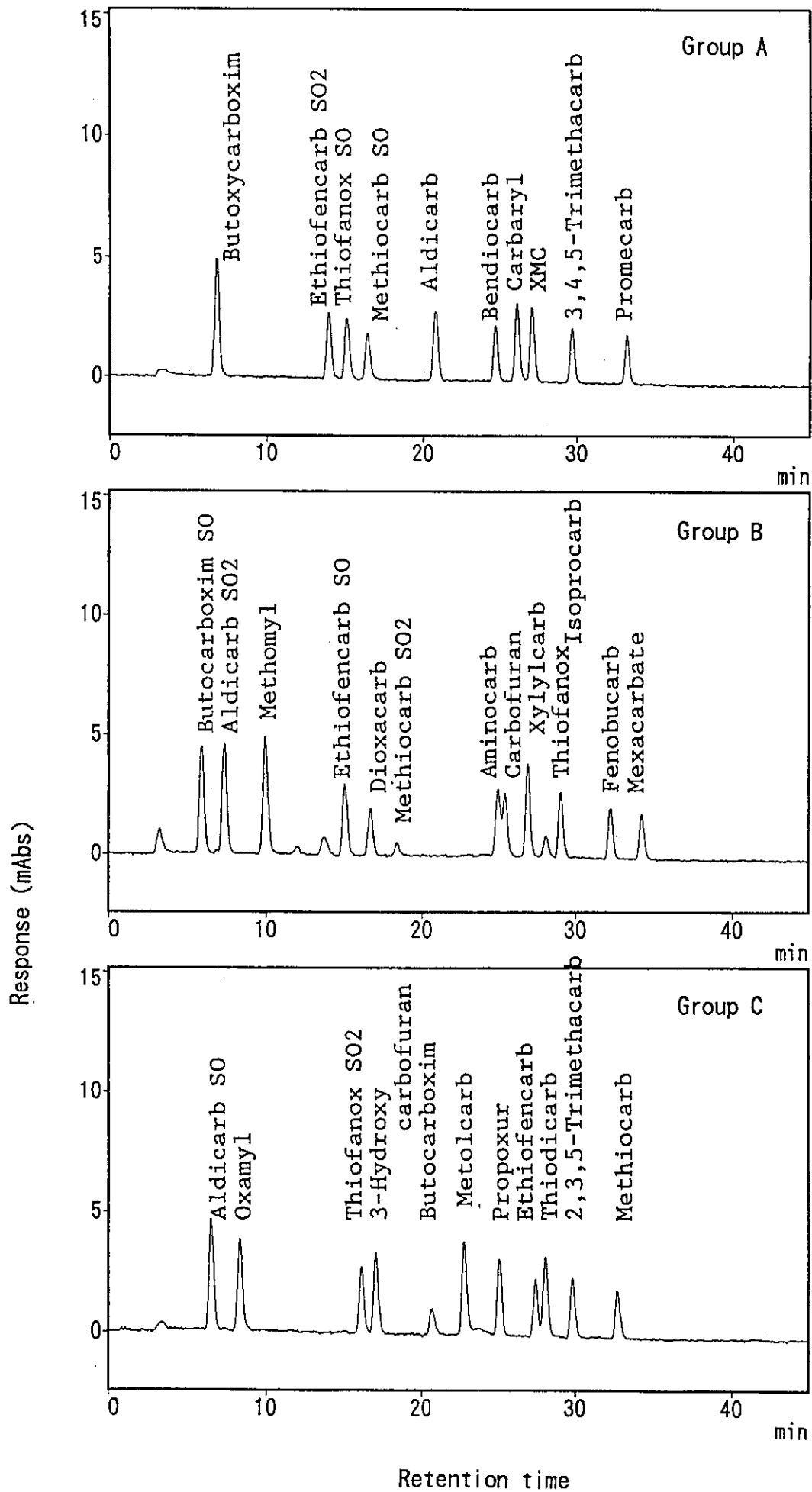
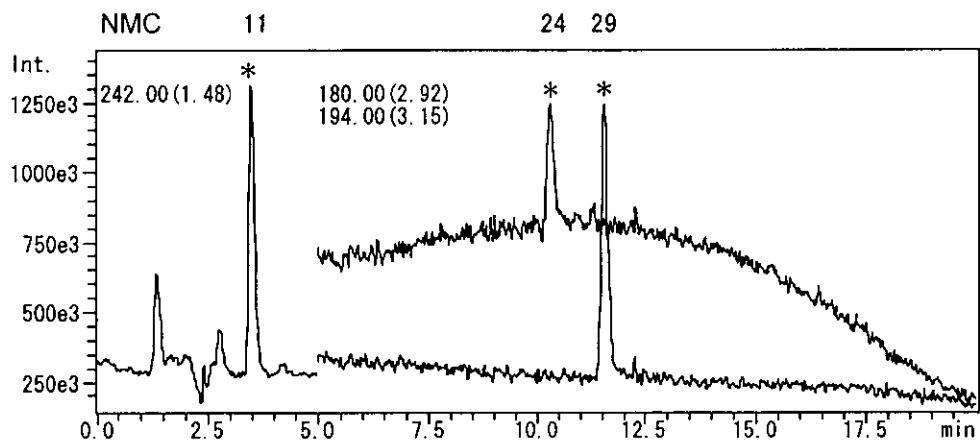
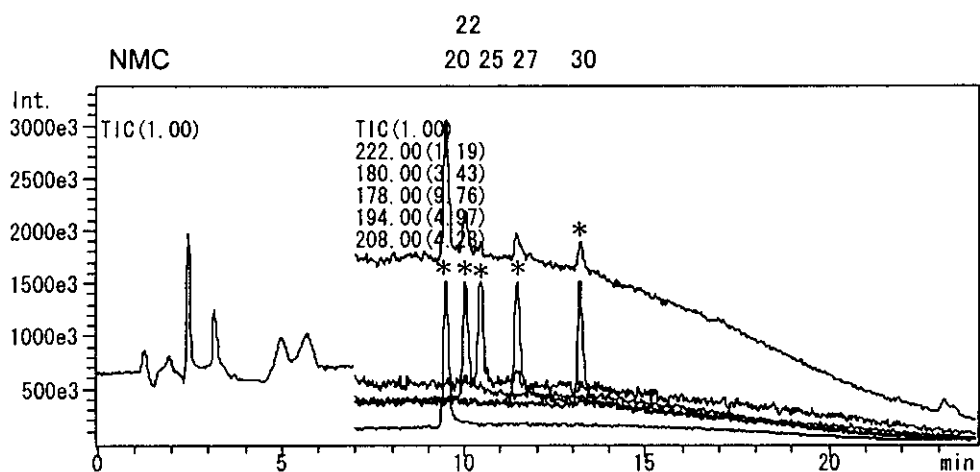


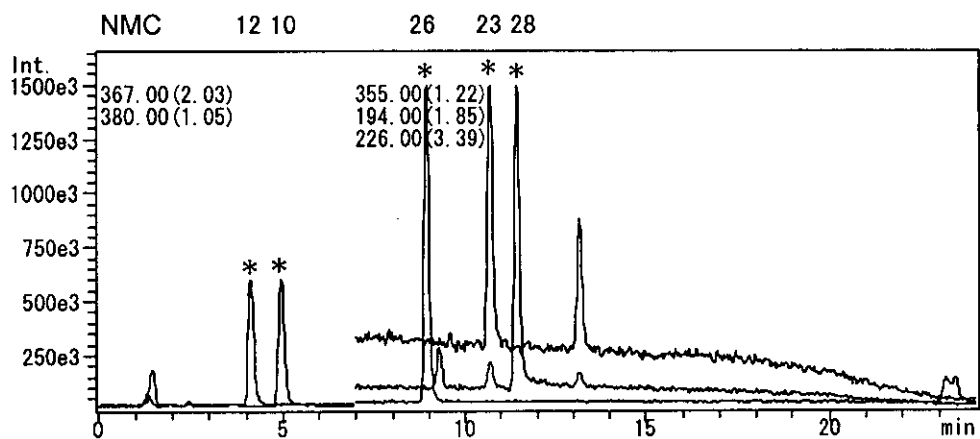
Fig. 2 HPLCのクロマトグラム (標準溶液)



標準溶液 A



標準溶液 B



標準溶液 C

Fig. 3 LC/MS のクロマトグラム(標準溶液)
各ピークがどのNMCに該当するか各クロマトグラムの上部に番号で示した。

Table 4 酢酸エチルによるカルババメートの抽出率(%)

抽出法(各3回)	A1	A2	Oxamyl	E2	E1	M1	M2	A0	Bendiocarb	Carbaryl	E0	Fenobucarb	M0
A													
1回目	6.5	42.1	25.3	82.4	44.5	61.8	101.8	93.2	102.0	105.6	82.0	104.1	109.3
2回目	tr	17.6	12.4	15.9	11.4	19.4	2.9	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3回目	tr	13.0	10.7	5.4	10.1	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	6.5	72.7	48.3	103.7	66.0	91.8	104.6	99.1	102.0	105.6	82.0	104.1	109.3
B													
1回目	11.3	61.2	52.0	87.9	69.9	84.6	91.8	89.7	94.1	95.2	72.8	105.4	99.3
2回目	4.2	17.3	16.6	6.3	16.2	8.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3回目	3.5	8.9	10.5	0.0	9.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	18.9	87.4	79.1	94.2	95.9	93.2	91.8	89.7	94.1	95.2	72.8	105.4	99.3
C													
1回目	56.7	97.6	92.5	104.8	135.2	103.8	106.2	96.0	103.9	106.9	65.0	104.6	110.9
2回目	17.5	5.6	7.5	tr	7.8	tr	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3回目	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	87.3	103.2	100.0	104.8	143.0	103.8	106.2	96.0	103.9	106.9	65.0	104.6	110.9

添加量:カルババメート各1 μ gを添加

A 5%食塩水200mlから酢酸エチル100、50、50ml用いて抽出。

B 20%食塩水200mlから酢酸エチル100、50、50ml用いて抽出。

C 20%食塩水20mlから酢酸エチル100、50、50ml用いて抽出。

Table 5 Bond Elut PSA精製におけるNMCの回収率(%)

	120334(新製品)		201196(旧製品)		123113(旧製品)		123122(旧製品)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
1 B1	82.4	9.3	96.7	2.5	90.7	1.7	89.3	4.6
2 MethomyI	98.5	3.0	102.4	4.1	102.8	0.8	101.6	1.9
3 M1	44.6	10.7	92.4	4.9	74.6	2.0	73.3	0.3
4 M2	ND	-	37.8	17.8	19.0	2.3	ND	-
5 Metolcarb	74.6	7.2	74.2	6.8	77.8	6.7	81.6	5.7
6 Bendiocarb	90.0	6.3	95.1	2.4	91.9	5.0	94.0	2.5

ポンドエルトPSA(0.5mg)をアセトン20mL、次いでヘキサン10mLでコンディショニング。
 予試験で回収率が低かった4種及び水溶性の高い2種のカルバメート0.5 μ gを負荷。20%アセトン/ヘキサン20mLで溶出。
 各3試行の平均値。

Table 6 Sep-Pak NH2精製で回収率が低い農薬への3-メルカプトプロピオン酸の効果(回収率%)

Name	MPA 0 μ L	MPA 20 μ L	MPA 50 μ L	MPA 100 μ L
1 B1	96.7	94.3	66.4	78.8
2 MethomyI	95.0	92.1	90.0	85.6
3 M1	74.2	90.2	90.2	95.8
4 M2	25.5	42.6	76.2	86.7
5 Metolcarb	73.6	71.0	72.5	84.2
6 Bendiocarb	78.8	74.8	75.8	79.9

農薬混合物をsep-Pak NH2にチャージし、2%酢酸エチル10mLで洗浄、アセトン20mLで溶出した。
 この際、3-メルカプトプロピオン酸(0.1mol/mLメタノール溶液)を種々の量で添加した。

Table 7 Bond Elut PSA精製における3-メルカプトプロピオン酸の効果(回収率%)

Name	開封後日数を経た溶媒		開封直後の溶媒			
	MPA 0.1mL	MPA 1mL	MPA 0mL	MPA 0.1mL	MPA 1mL	MPA 1mL
1 B1	94.0	107.3	97.0	99.6	107.9	
2 MethomyI	95.3	84.2	91.2	76.3	90.6	
3 M1	64.2	29.4	52.7	51.8	49.6	
4 M2	5.6	ND	ND	ND	ND	
5 Metolcarb	90.0	73.2	69.1	67.8	69.5	
6 Bendiocarb	92.8	84.9	81.6	81.7	87.7	

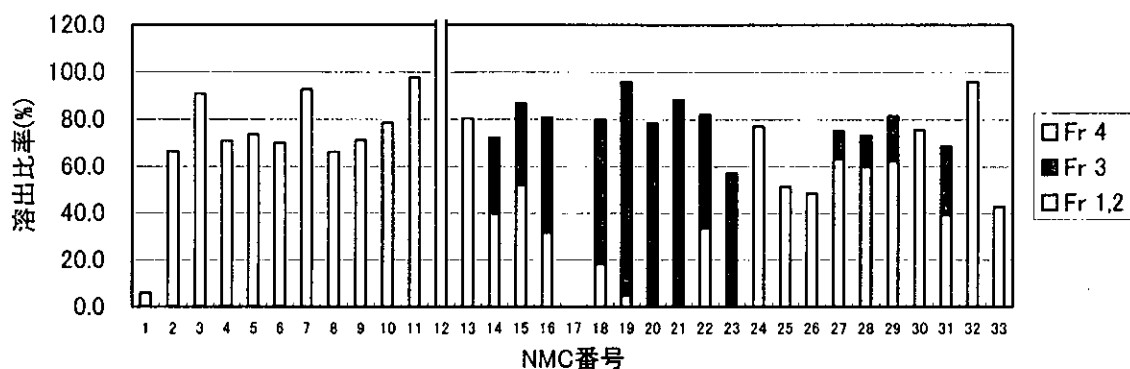
開封後の日数を経たアセトン、ヘキサンまたは開封直後のアセトン、ヘキサンを用いて比較した。

Table 8 各試験溶液におけるNMC溶出位置とHPLCクロマトグラム上の妨害ピークとの関係

Name	レモン			オレンジ			グレープフルーツ		
	Fr 1,2	Fr 3	Fr 4	Fr 1,2	Fr 3	Fr 4	Fr 1,2	Fr 3	Fr 4
1 B1			*			*			
2 A1			*			*			*
3 B2			*			*			*
4 A2			*			*			*
5 Oxamyl			*			*			*
6 Methomyl			*		*	*			*
7 E2			*			*			*
8 E1			*			*			*
9 T1			*			*			*
10 T2	妨害	妨害	* 妨害	妨害	妨害	* 妨害	妨害	妨害	* 妨害
11 M1			* 妨害			* 妨害		妨害	* 妨害
12 3-OH-carbofuran			* 妨害			*			*
13 M2			*			*			
14 Butocarboxim	*	*		*	*		*	*	
15 A0	*	*		*	*		*	*	
16 Metolcarb	*	*		*	*		*	*	
17 Aminocarb					*	*			
18 Propoxur	*	*		*	*		*	*	
19 Bendiocarb	*	*		*	*		*	*	妨害
20 Carbofuran		*		*	*		*	*	妨害
21 Carbaryl		*	妨害	*				* 妨害	
22 Xylylcarb	* 妨害	* 妨害	妨害	*	*		* 妨害		妨害
23 E0	妨害	* 妨害	妨害	*	*		* 妨害	* 妨害	妨害
24 XMC	* 妨害	妨害	妨害	*	*		*	* 妨害	妨害
25 T0	* 妨害		妨害	*				妨害	妨害
26 Thiocicarb	妨害	妨害	* 妨害			*	妨害	妨害	* 妨害
27 Isoprocarb	*	*		*	*				
28 2,3,5-Trimethacarb	*	*		*	*		*	*	妨害
29 3,4,5-Trimetacarb	*	*		*	*		*	* 妨害	妨害
30 Fenobucarb	*			*		妨害	* 妨害	妨害	妨害
31 Methiocarb	*	*		*	*	妨害	*	*	
32 Promecarb	* 妨害		妨害	*			*	妨害	
33 Mexacarbate			*	*	* 妨害	妨害	*		

「*」はNMCの溶出位置、「妨害」は妨害ピークの溶出位置を示す。

Fig. 4-1 レモン抽出液のミニカラム精製におけるMMCの溶出位置(3試行平均)



No.23 エチオフェンカルブはFr 1,2で測定できなかった。(LC/MSにおいてイオン過剰のため)

Fig. 4-2 オレンジ抽出液のミニカラム精製におけるMMCの溶出位置(3試行平均)

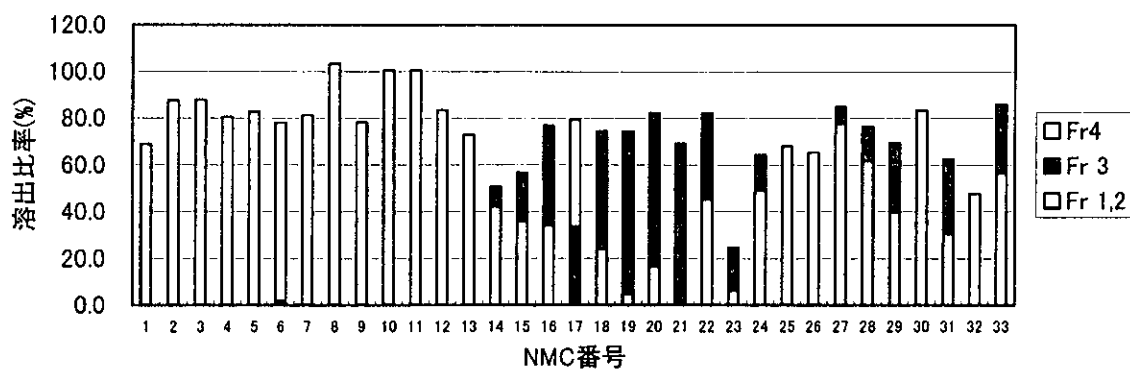
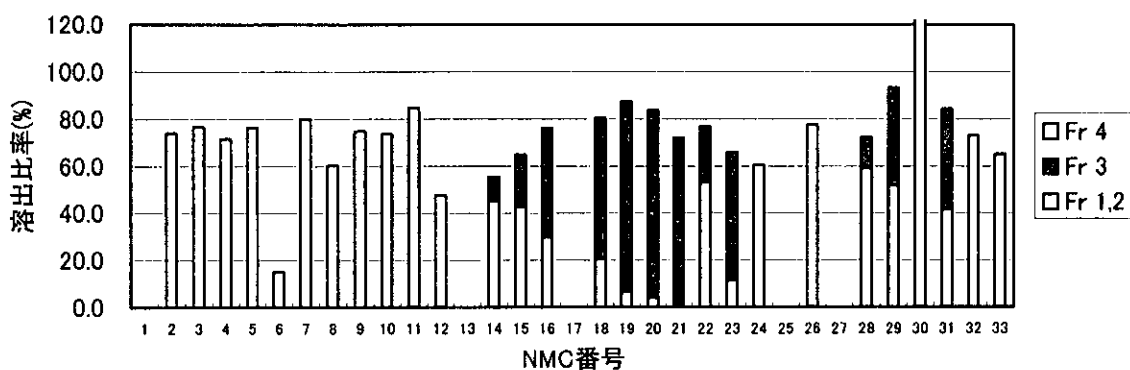
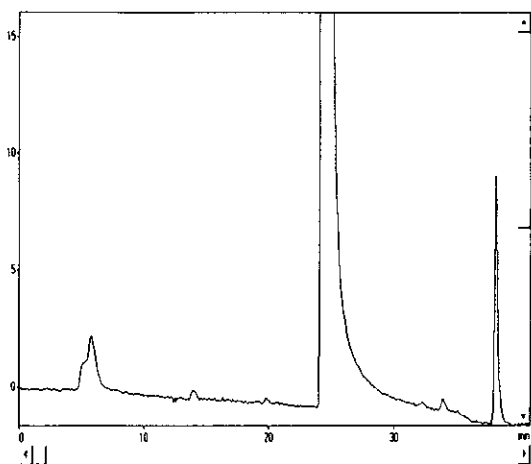


Fig. 4-3 グレープフルーツ抽出液のミニカラム精製におけるMMCの溶出位置(3試行平均)



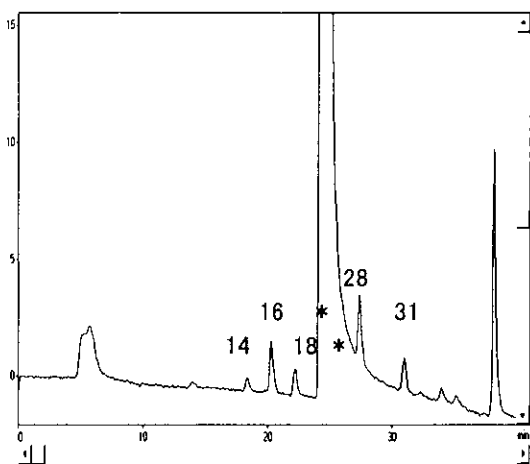
No.27 イソプロカルブはHPLCでもLC/MSでも保持時間が後方へずれ、定量値は100%を超えた。(溶出位置はフラクション1+2と3に分かれた。)

Data:02031106.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031106.C01 Back chron: RT 0.18 Level 15274 Attenu



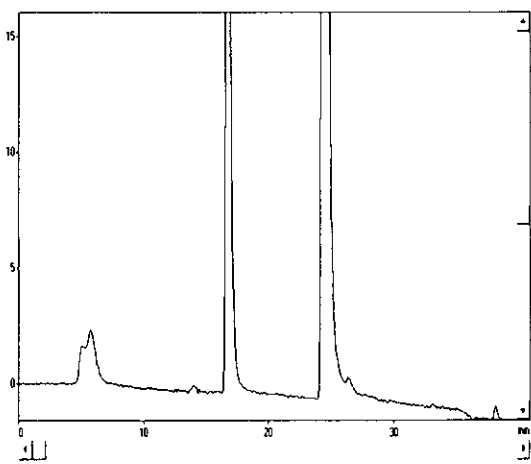
無添加, Fr 1,2

Data:02031103.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031103.C01 Back chron: RT 4.34 Level 15156 Attenu



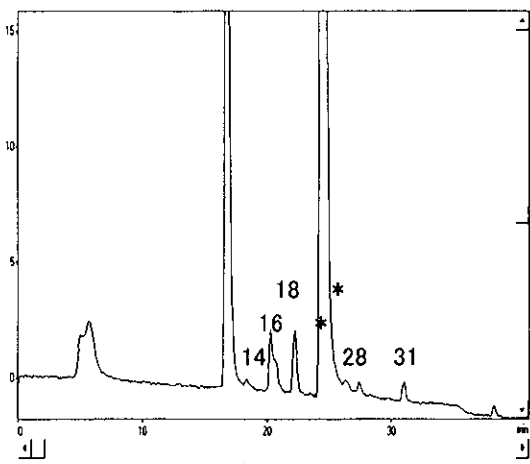
C添加, Fr 1,2

Data:02031107.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031107.C01 Back chron: RT 3.09 Level 15301 Attenu



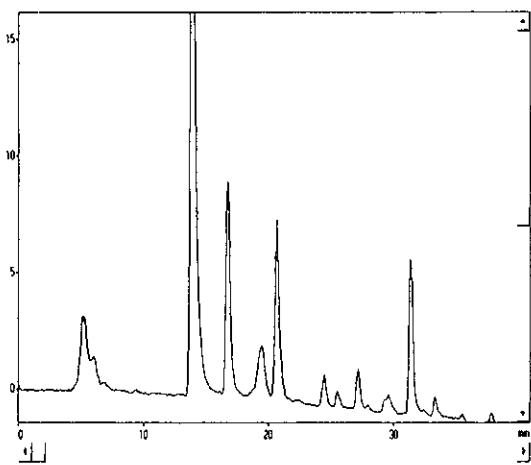
無添加, Fr 3

Data:02031104.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031104.C01 Back chron: RT 1.96 Level 15381 Attenu



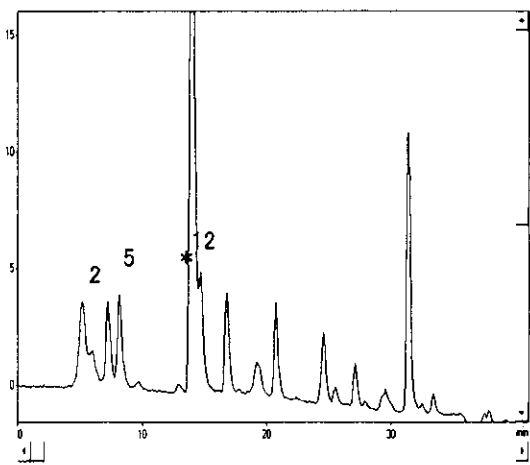
C添加, Fr 3

Data:02031108.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031108.C01 Back chron: RT 1.96 Level 15239 Attenu



無添加, Fr 4

Data:02031105.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02031105.C01 Back chron: RT 6.66 Level 15531 Attenu

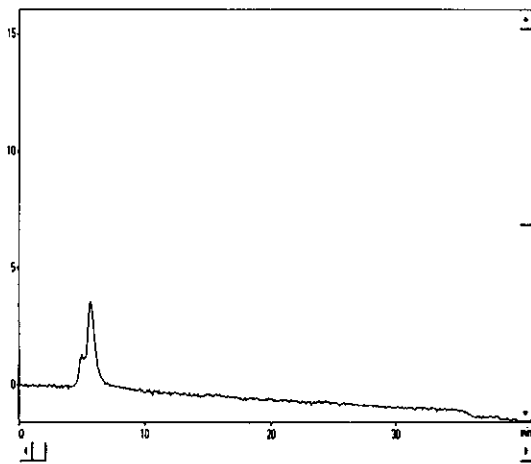


C添加, Fr 4

Fig. 5-1 ポストカラム反応蛍光HPLCのクロマトグラム例(レモン, 混合溶液C添加)

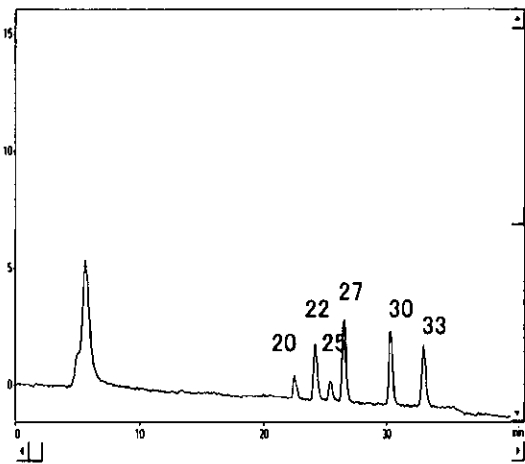
NMCのピークは番号で示した。妨害ピークと重なったNMCの溶出位置は*で示した。

Data:02032103.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032103.C01 Back chron: RT:012 Level:1511 Attend



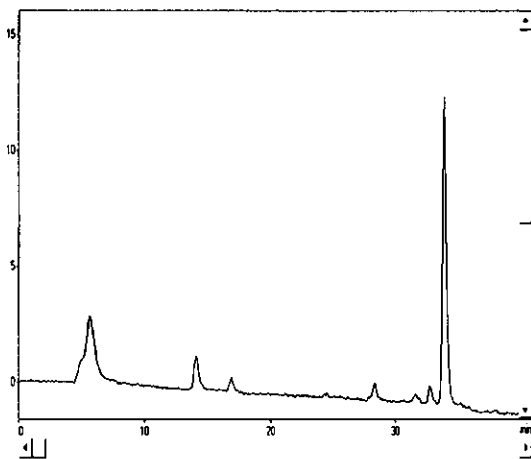
無添加, Fr 1,2

Data:02032006.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032006.C01 Back chron: RT:010 Level:1145 Attend



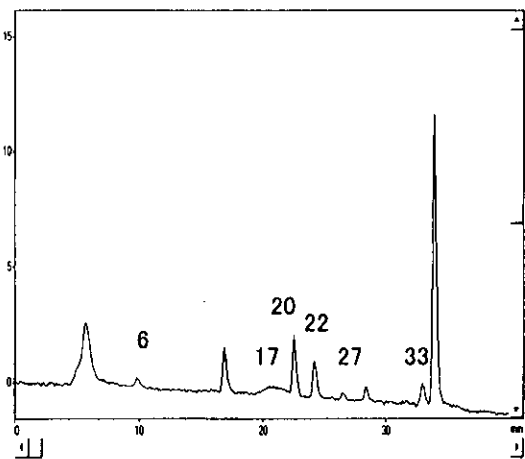
B添加, Fr 1,2

Data:02032104.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032104.C01 Back chron: RT:056 Level:1590 Attend



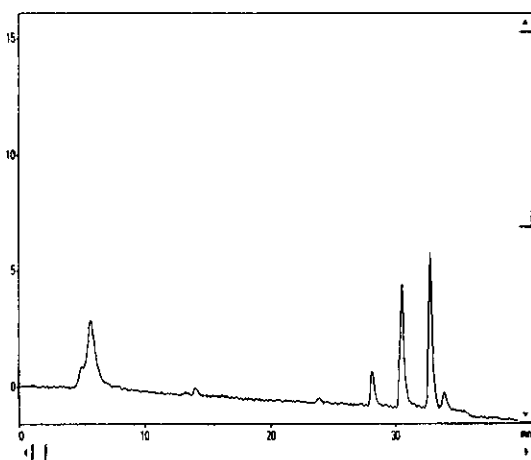
無添加, Fr 3

Data:02032007.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032007.C01 Back chron: RT:244 Level:1592 Attend



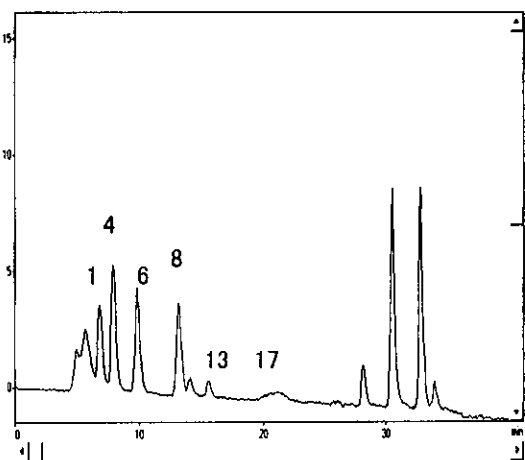
B添加, Fr 3

Data:02032105.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032105.C01 Back chron: RT:036 Level:1378 Attend



無添加, Fr 4

Data:02032008.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chron:02032008.C01 Back chron: RT:202 Level:1563 Attend

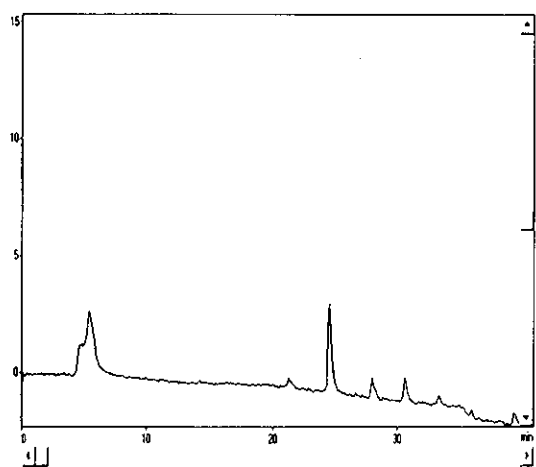


B添加, Fr 4

Fig. 5-2 ポストカラム反応蛍光HPLCのクロマトグラム例(オレンジ, 混合溶液B添加)

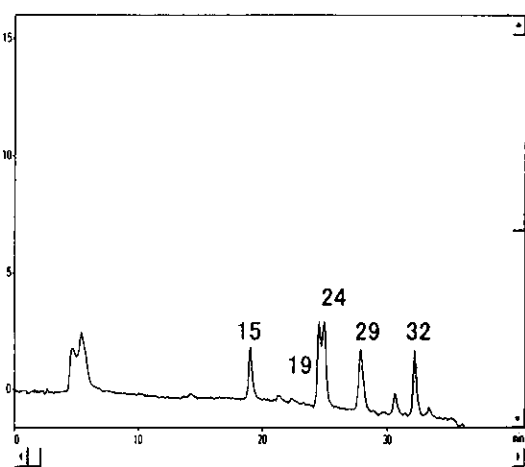
NMCのピークは番号で示した。アミノカルブ(No.17)のピークはブロードになった。

Data:02030203.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030203.D01 Back chrom: RT 844 Level 14132 Attenu



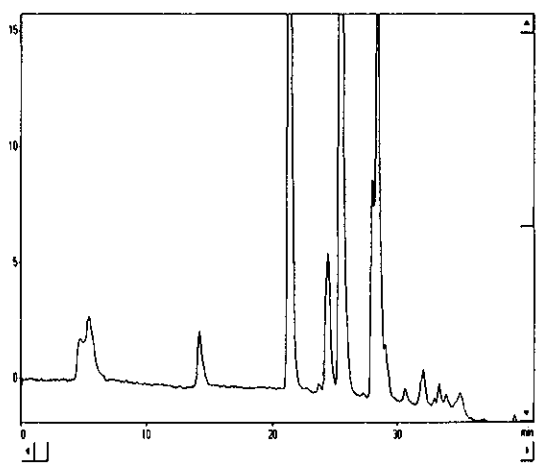
無添加, Fr 1,2

Data:02030206.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030206.D01 Back chrom: RT 594 Level 15653 Attenu



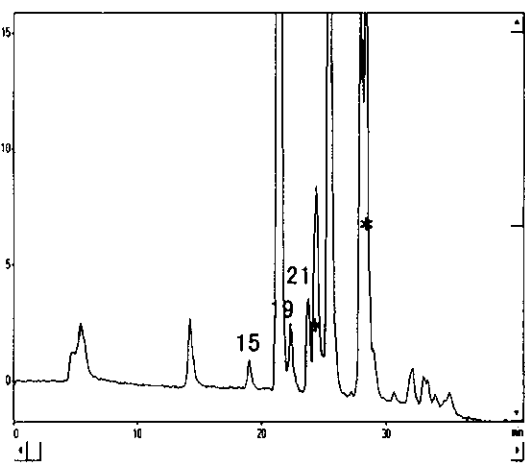
A添加, Fr 1,2

Data:02030204.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030204.D01 Back chrom: RT 380 Level 15236 Attenu



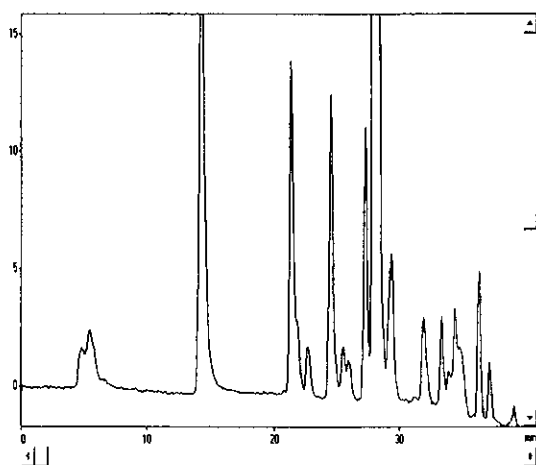
無添加, Fr 3

Data:02030207.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030207.D01 Back chrom: RT 487 Level 15722 Attenu



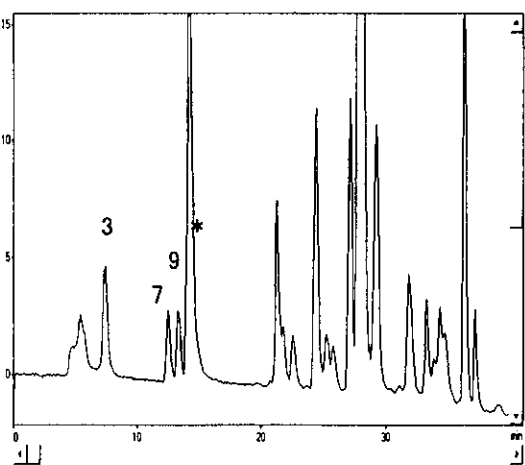
A添加, Fr 3

Data:02030205.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030205.D01 Back chrom: RT 826 Level 15011 Attenu



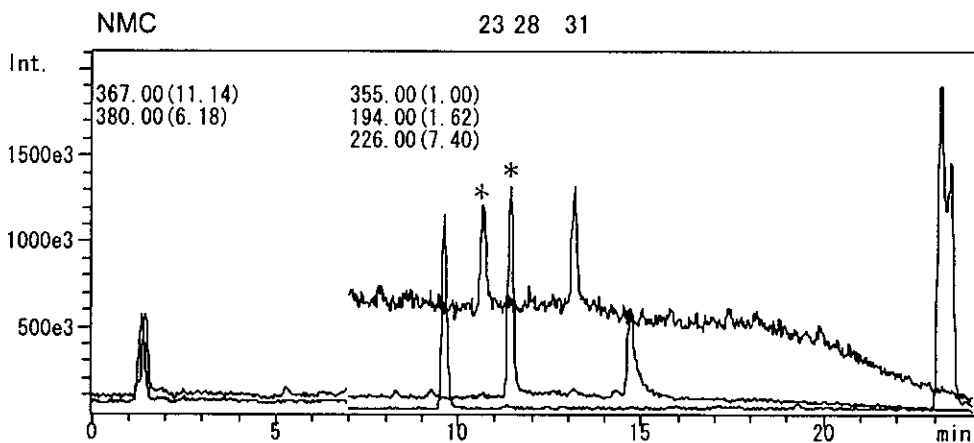
無添加, Fr 4

Data:02030403.D01 Method:CARB07.MET Ch:1
Chrom:02030403.D01 Back chrom: RT 871 Level 13582 Attenu

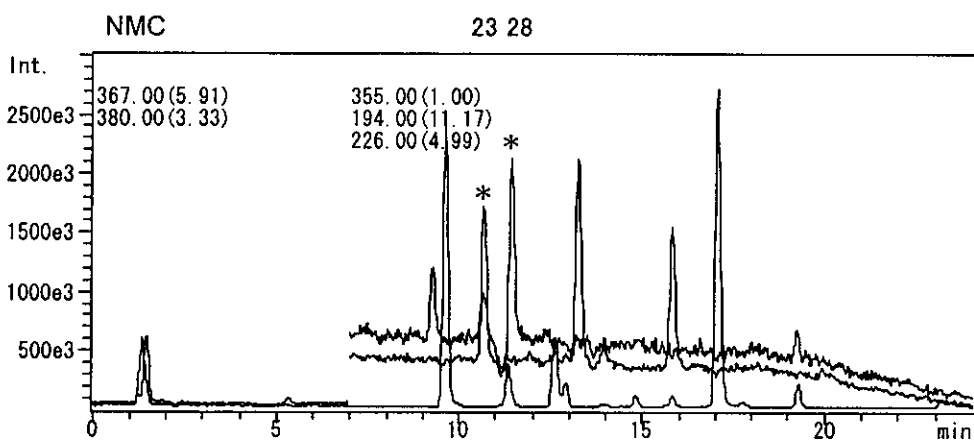


A添加, Fr 4

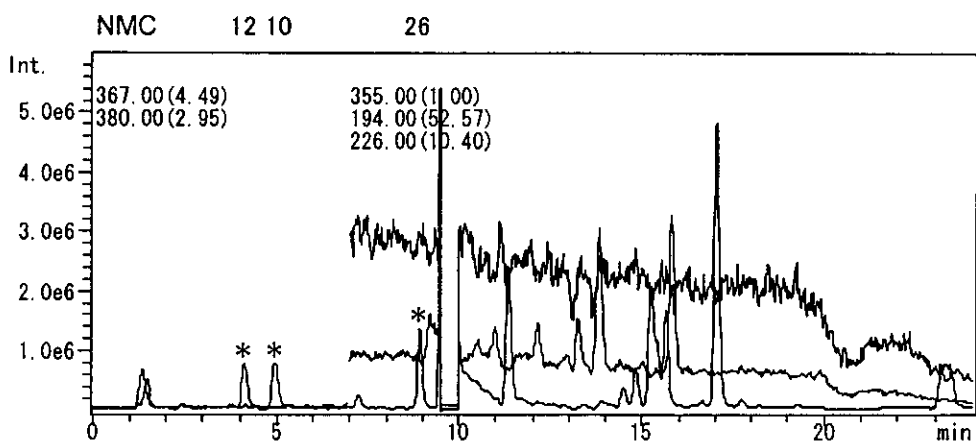
Fig. 5-3 ポストカラム反応蛍光HPLCのクロマトグラム例(グレープフルーツ, 混合溶液A添加)
NMCのピークは番号で示した。妨害ピークと重なったNMCの溶出位置は*で示した。



C添加、画分 1, 2



C添加、画分 3



C添加、画分 4

Fig. 6 LC/MS のクロマトグラム例(グレープフルーツ、C添加)
各ピークがどのNMCに該当するか各クロマトグラムの上部に番号で示した。

Table 9 柑橘類中のN-メチルカルバメート添加回収率

Name	レモン		オレンジ		グレープフルーツ	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
1 Butocarboxim sulfoxide (B1)	6.5	1.4	68.9	8.0	0.0	0.0
2 Aldicarb sulfoxide (A1)	66.3	0.9	87.6	6.0	74.0	5.2
3 Butoxycarboxim (B2)	88.0	11.6	87.8	8.3	76.6	5.0
4 Aldicarb sulfone (A2)	70.7	2.8	80.4	1.9	71.5	8.4
5 Oxamyl	73.4	6.7	82.8	8.6	76.3	3.1
6 Methomyl	70.5	1.2	77.9	1.8	15.1	26.2
7 Ethiofencarb sulfone (E2)	92.6	13.4	81.2	4.8	80.0	4.9
8 Ethiofencarb sulfoxide (E1)	67.2	6.4	78.8	13.0	60.2	4.1
9 Thiofanox sulfoxide (T1)	71.1	7.7	78.2	3.0	74.9	2.7
10 Thiofanox sulfone (T2)	<u>78.4</u>	<u>1.6</u>	60.1	5.2	<u>73.8</u>	<u>1.5</u>
11 Methiocarb sulfoxide (M1)	<u>97.8</u>	<u>12.8</u>	78.9	5.8	<u>84.8</u>	<u>3.9</u>
12 3-Hydroxycarbofuran	<u>81.0</u>	<u>2.8</u>	83.3	8.9	<u>88.3</u>	<u>1.0</u>
13 Methiocarb sulfone (M2)	82.7	4.6	72.9	5.4	ND	-
14 Butocarboxim (B0)	72.2	14.9	50.7	18.9	55.6	16.8
(B1)	(ND)	(-)	(10.2)	(1.3)	(ND)	(-)
15 Aldicarb (A0)	86.9	15.7	68.4	10.4	64.8	14.0
(A1)	(4.5)	(7.8)	(16.4)	(10.6)	(14.6)	(14.1)
16 Metolcarb (MTMC)	80.8	1.6	76.9	2.0	76.2	1.2
17 Aminocarb	ND	-	79.3	6.8	ND	-
18 Propoxur(PHC)	80.0	0.5	74.2	0.6	80.3	4.7
19 Bendiocarb	95.9	10.1	74.3	6.0	87.5	4.6
20 Carbofuran	80.4	5.9	82.2	5.1	83.8	4.6
21 Carbaryl (NAC)	88.2	10.3	69.2	8.0	72.0	4.2
22 Xyllylcarb (MPMC)	<u>82.1</u>	<u>7.9</u>	82.2	4.0	<u>76.8</u>	<u>3.6</u>
23 Ethiofencarb (E0)	<u>57.0</u>	<u>3.6</u>	24.6	7.5	<u>65.8</u>	<u>3.1</u>
(E1)	(7.2)	(1.7)	(37.0)	(4.9)	(6.0)	(0.9)
24 XMC	<u>77.1</u>	<u>27.2</u>	69.4	6.7	<u>60.5</u>	<u>1.7</u>
25 Thiofanox (T0)	<u>51.4</u>	<u>7.8</u>	67.9	3.9	(ND)	(-)
(T1)	(13.0)	(3.4)	(8.2)	(1.6)	(8.5)	(2.2)
26 Thiocicarb	<u>48.5</u>	<u>11.0</u>	65.3	7.4	<u>77.5</u>	<u>6.7</u>
(Methomyl)	(2.2)	(0.7)	(2.2)	(0.2)	(1.8)	(0.2)
27 Isoprocarb	75.7	4.1	85.0	2.1	ND	-
28 2,3,5-Trimethacarb	73.2	0.4	76.3	3.6	72.2	4.4
29 3,4,5-Trimetacarb	81.5	10.9	69.6	6.1	<u>93.3</u>	<u>8.7</u>
30 Fenobucarb (BPMC)	75.6	3.9	83.5	5.9	<u>150.2</u>	<u>6.5</u>
31 Methiocarb (M0)	68.7	0.4	62.5	4.6	84.3	4.6
(M1)	(ND)	(-)	(ND)	(-)	(ND)	(-)
32 Promecarb	95.8	10.5	70.4	1.8	73.0	0.9
33 Mexacarbate	40.6	8.7	86.0	8.3	65.1	2.8

HPLCで60%以上の回収率が
得られたNMCの数

22/33

33/33

16/33

LC/MSを併用して60%以上の
回収率が得られたNMCの数

29/33

33/33

26/33

()内に示したのは、分析操作中に生成した代謝物の回収率。

下線で示したのは、ポストカラム蛍光HPLCで妨害物質と重なったためLC/MSで求めた回収率。

オレンジ中のT2, M1の回収率は妨害ピーク面積を差し引いて求めた。

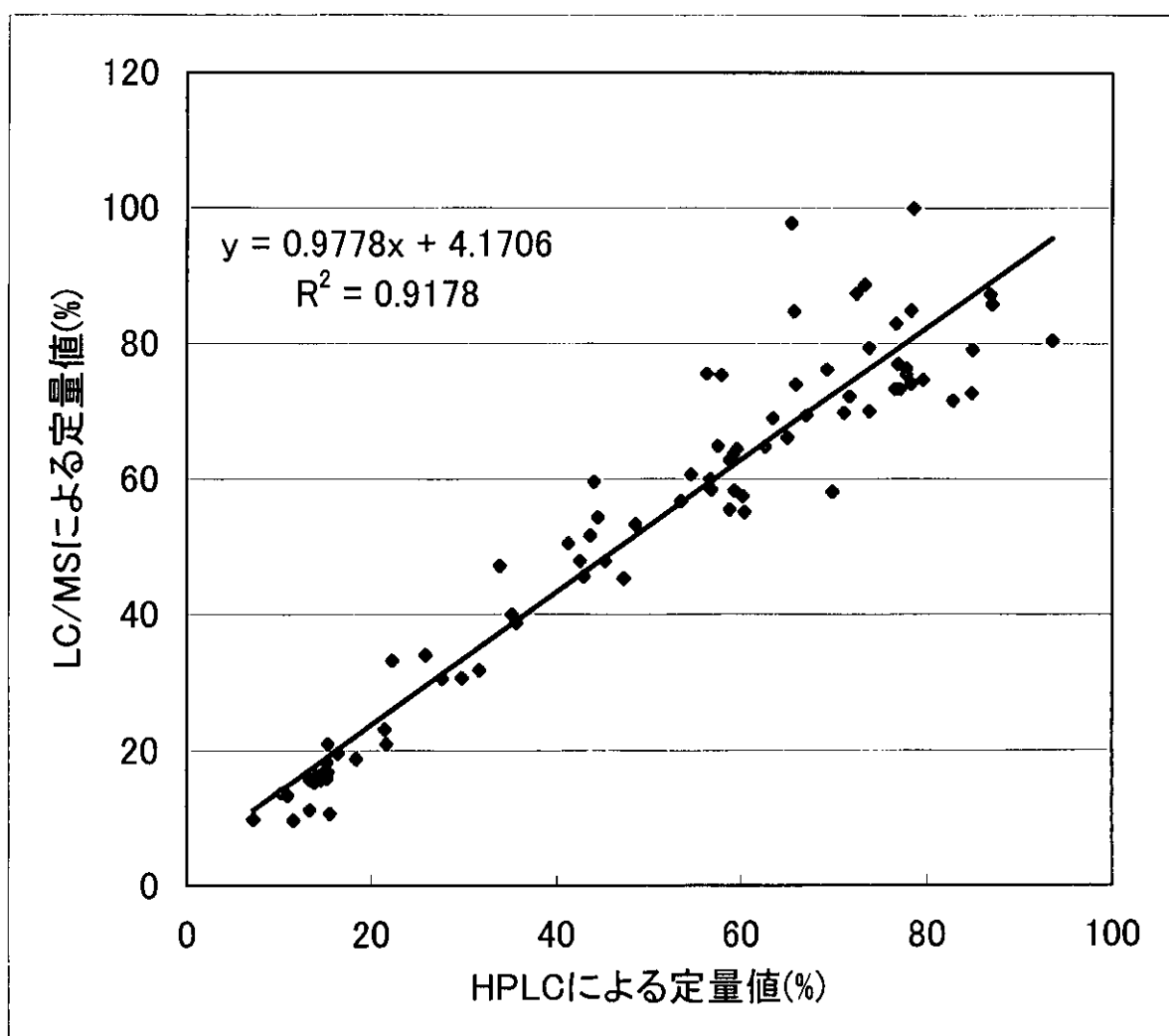
Table 10 柑橘類中のN-メチルカルバメート添加回収率(HPLCとLC/MSの比較)

Name	レモン		オレンジ		グレープフルーツ	
	HPLC	LC/MS	HPLC	LC/MS	HPLC	LC/MS
10 T2	妨害	78.4	60.1	75.0	妨害	73.8
11 M1	妨害	97.8	78.9	89.3	妨害	84.8
12 3-Hydroxycarbofuran	妨害	81.0	83.3	77.4	妨害	88.3
20 Carbofuran	80.4	76.6	82.2	85.7	83.8	則定不能*2
22 Xylylcarb	妨害	82.1	82.2	87.0	妨害	76.8
23 E0	妨害	57.0	24.6	29.6	妨害	65.8
24 XMC	妨害	77.1	69.4	69.0	妨害	60.5
25 T0	妨害	51.4	67.9	90.0	妨害	ND
26 Thiocicarb	妨害	48.5	65.3	64.3	妨害	77.5
27 Isoproc carb	75.7	73.6	85.0	77.4	ND	274.1
28 2,3,5-Trimethacarb	73.2	77.6	76.3	78.1	72.2	78.1
29 3,4,5-Trimetacarb	81.5	83.6	69.6	83.4	妨害	93.3
30 Fenobucarb	75.6	75.1	83.5	85.4	妨害	150.2
(M1*)	妨害	ND	ND	ND	妨害	ND

* メチオカルブから分析操作中に精製するメチオカルブスルホキシド

*2 グレープフルーツ中のカルボフランは、過大なイオンの発生する保持時間と重なったため測定不能。

Fig. 7 HPLCとLC/MSの回収率の相関(個々の溶出液中のNMC濃度)



分担研究報告書

各種手法による残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

(1) 超臨界流体抽出法の野菜・果実試料への適用

分担研究者 佐々木久美子

(国立医薬品食品衛生研究所)