報 文

オンラインカラム濃縮/自動高速液体クロマトグラフィーによる 血清及び尿中のカーバメート系農薬の同時定量

一ノ木 進^{®1}, 渡辺 節子¹, 松井田紗妃¹, 藤井 洋一¹,
森田 俊博², 家入 一郎³, 大坪 健司³

Simultaneous determination of carbamate pesticides in human serum and urine
by automatic reversed-phase HPLC combined with on-line column enrichment

Susumu ICHINOKI¹, Setsuko WATANABE¹, Saki MATSUIDA¹, Youichi FUJII¹,
Toshihiro MORITA², Ichiro IEIRI³ and Kenji OTSUBO³

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho 3, Kanagawa-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1181

² Department of Hospital Pharmacy, Saiseikai Sakaiminato General Hospital, 44, Yonegawa-cho, Sakaiminato-shi, Tottori 684-8555

³ Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Tottori University, 36, Nishi-cho, Yonago-shi, Tottori 683-8504

(Received 26 January 2004, Accepted 24 March 2004)

Carbamate pesticides (pirimicarb, PHC, bendiocarb, XMC, NAC, ethiofencarb, and MIPC) in human serum and urine were determined by an automatic on-line column-enrichment technique followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometric detection. After human serum was filtered through a membrane filter (0.45 µm pore size), an aliquot of 0.1 ml of the filtrate was diluted with water up to 1 ml. A solution of 0.8 ml was directly injected to an automatic HPLC without any pretreatment. Human urine was incubated with β-glucuronidase/arylsulfatase for 16 hours at 37°C. The resultant solution was then filtered through a membrane filter and the filtrate was analyzed by a similar manner as the serum. Carbamates in the sample solution were concentrated on a pre-conditioned ODS mini-column. After washing the mini-column with 10% methanol, they were separated by an ODS analytical column (Cosmosil 5 C₁₈-MS-II, 250 × 4.6 mm ID, 5°C) with an acetonitrile/water eluent (32 : 68, v/v) and detected at 220 nm. The presented HPLC method requires neither a manual procedure of solid-phase nor liquid-liquid extraction. Calibration curves for seven carbamates were linear over the range of 0.1 ~ 50 µg/ml in serum, and 1 ~ 50 µg/ml in urine. Recovery tests were carried out with human serum and urine. Recoveries of 25 and 2.5 µg in serum were 100 ~ 103%, and those of urine were 98 ~ 104%. The relative standard deviations of the recoveries were less than 3%.

Keywords : carbamate pesticides; human serum; human urine; automatic reversed-phase HPLC; on-line column enrichment.

1 緒 言

¹ 北陸大学薬学部: 920-1181 石川県金沢市金川町ホ 3

² 鳥取県済生会境港総合病院薬剤科: 684-8555 鳥取県境港市米川町 44

³ 鳥取大学附属病院薬剤部: 683-8504 鳥取県米子市西町 36-1

農薬の定量法に関する最近の総説¹⁾によると, 前処理法としては固相抽出^{2)~4)}, 液液抽出⁵⁾⁶⁾あるいはオンラインカ

ラムカラム抽出^{7,8)}が用いられ、分離方法には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{2)~9)} やガスクロマトグラフィー (GC) がはん用されている。また、検出法には紫外吸光 (UV) 検出もはん用されているが、より高感度な検出法として質量分析法 (MS)^{6,8,9)} も用いられるようになってきた。

一方、できる限り多くの病院で使用できるような簡便な分析法としての HPLC 法の開発も行われている¹⁰⁾。

カーバメート系農薬は主に殺虫剤として用いられ、有機リン系農薬やパラコート含有農薬と比較すると、自殺目的に服用されることはまれである¹⁰⁾。しかし、誤飲あるいは田畑からの汚染水や農薬残留作物から人体に取り込まれることは容易に推察できる。

農薬中毒の治療方法¹¹⁾は主にその作用によって異なり、例えば有機塩素剤の摂取では神経系過剰刺激を発症し、抗けいれん剤や鎮静剤を投与するのに対して、有機リン剤やカーバメート剤ではコリンエステラーゼ活性阻害を発症し、硫酸アトロピンの投与が常とう手段として用いられる。このように農薬中毒の治療のためには、中毒作用の種類が重要であるので、同様の中毒作用を持つ農薬の一斉分析法が必要であろう。

一般に用いられている血清中及び尿中の農薬の定量法では、血液は遠心分離後にその上澄みを用い、尿は β -glucuronidase などによる加水分解後に、遠心分離をしてその上澄みを用いる。次にそれぞれの上澄みから目的成分を液液抽出又は固相抽出を行い、更に抽出溶媒を蒸発後に目的成分を再溶解してから、HPLC あるいは GC 分析に供することが多い。液液抽出はエマルジョンの生成によって有機層の分離が困難になる場合がある。また、固相抽出操作はコンディショニング、試料の注入 (保持と濃縮)、洗浄、溶離、溶媒の除去、再溶解といった煩雑な操作を必要とし、回収率の補正のための内標準物質の選択にも注意を要する。装置のはん用性に関しては、患者の血液や尿試料の分析のためにいつでも使用できる GC-MS や LC-MS を有する病院は少ない。

水中のカーバメート剤を定量した例^{3,4,7)~9)}は多く見受けられるが、血清及び尿中のカーバメート類を HPLC で一斉に分離定量した例は見当たらない。そこで著者らは種々のカーバメート剤を摂取した場合の農薬の特定と、治療のためのモニタリング方法として、ピリミカルブ、2-イソプロピルオキシフェニル-N-メチルカーバメート (PHC)、ベンダイオカルブ、3,5-キシリル N-メチルカーバメート (XMC)、カルバリル (NAC)、エチオフェンカルブ及びイソプロカルブ (MIPC) の同時定量法を検討した。前処理法としては、手作業の多い溶媒抽出法や固相抽出ではなく、自動オンラインカラム濃縮を用い、装置も最も一般的な UV 検出器を備えた HPLC を用いて、分析時間 60 分以

Fig. 1 Structural formula and molecular weight of carbamate pesticides used

内で7種のカーバメート系農薬を自動分析できたので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

メタノール、アセトニトリル及び蒸留水は HPLC 用 (和光純薬製) を用いた。農薬標準品 (和光純薬製) は 500 μ g/ml のメタノール溶液として冷蔵保存し、用時水で希釈して用いた。用いた農薬の構造式、分子式及び分子量は Fig. 1 に示した。コントロール血清 (ヒト血清) は、バイオラッド製の Lyphochek Drug Free Serum を用時蒸留水に溶解した後、コスモナイスフィルター W (ナカライテスク製、孔径 0.45 μ m, 25 mm ϕ) とデイスボ注射筒を用いて汙過した後に HPLC 分析に供した。コントロール尿には健常男性 (51 歳) の食事前の尿を冷凍保存 (-20°C) し、用時解凍して用いた。

尿の加水分解には β -glucuronidase/arylsulfatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 製, Germany) を用いた。操作は、酵素の製造元が推奨する以下の操作によって行った。解凍した尿試料約 10 ml に対して、2 M 酢酸/2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 1 ml を加えた後、 β -glu-

curonidase/arylsulfatase 0.2 ml を加えて 37℃で 16 時間インキュベーションして加水分解し, コスモナイスフィルター W で汙過した後に分析に用いた. 血清及び尿試料は調製後 10 日以内に使用した. 溶離液組成は容積比で示した. オートインジェクターの洗浄液には HPLC 用蒸留水を用いた.

2・2 装置と器具

高速液体クロマトグラフ (Fig. 2) は, 以下のユニットから成るものを用いた. LC-10Ai ポンプ (濃縮用, ポンプ B), LC-6A ポンプ (分析用, ポンプ A), SCL-10A システムコントローラー, SIL-10A オートインジェクター, SPD-10AV_{VP} 紫外可視検出器, FCV-12AH 高圧六方バルブ, C-R4A クロマトパック (以上, 島津製). 検出器の感度は,

Fig. 2 HPLC system for automatic determination of carbamate pesticides

Solvent: HPLC grade methanol

試料濃度に応じて切り替えた. オートインジェクター用の試料瓶は 1 ml のものを用いた. 恒温槽はサーモミNDER Mini-80 (タイテック製) と投げ込み式クーラー (ヤマト科学製, NEOCOOL DIP, BD-15) を組み合わせて使用した. 分離カラムには Cosmosil 5C₁₈-MS-II ステンレスカラム (ナカライテスク製, 250 × 4.6 mm ID, 5℃), ガードカラムと濃縮カラムには Develosil ODS-UG-5 ステンレスカラム (野村化学製, 10 × 4 mm ID, 室温) を用いた. 血清及び尿試料の分析に使用したカートリッジ式ミニカラムは, およそ 2 週間に一度新品に交換した. 1 ml 以下の溶液の採取にはマイクロピペットを使用した.

2・3 推奨する分析操作と HPLC 条件

汙過した血清試料, 又は加水分解後に汙過した尿試料 100 µl をオートインジェクター用の試料瓶に入れ, 水 900 µl を加えてかくはんする. 検量線作成には, 血清又は尿 100 µl と標準液及び水を加えて合計体積を 1000 µl とする.

Table 1 に示したタイムプログラムと下記に示した HPLC 条件に従って自動分析を行う. すなわち, あらかじめ溶離液 B を 2 分間流すことによってコンディショニングされた濃縮カラムに, 上述した方法によって調製された溶液の 800 µl を注入する. 注入完了の 5.9 分後に検出器の吸光度をゼロに補正し, 6.0 分後に高圧六方バルブを切り替えて, 溶離液 A の流れによって, 濃縮カラムに保持されたカーバメート類を分析カラムに導いて分離定量する. 高圧六方バルブは, 次の試料注入の 2 分前に濃縮位置へ切り替えてコンディショニングを行う.

HPLC 条件: 溶離液 A (分析用): アセトニトリル/水 (32 : 68), 溶離液 A 流量: 0.9 ml/min, 溶離液 B (濃縮用): メタノール/水 (10 : 90), 溶離液 B 流量: 1.0 ml/min. 検出波長: 220 nm. 分析カラム温度: 5℃.

3 結果及び考察

3・1 検出波長と分離条件の検討

当初 11 種類のカーバメート剤を一斉分離する予定であったが, アラニカルブは同定できるほどの大きなピークが得られなかったこと, また 3-メチルフェニル-N-メチルカ

Table 1 Time program for automatic determination of carbamate pesticides

#	Time	Command	Value	Action
0	5.90	Zero A		Adjust absorbance to zero
1	6.00	RV. A	1	Change six-way valve for elution
2	6.00	Start		Start data processor
3	55.10	S.Pret		Start sample injection
4	57.00	RV. A	0	Change six-way valve for concentration
5	59.00	Stop		Stop time program (Start next analysis)

Fig. 3 UV spectrum of carbamate pesticides used

ーバメート (MTMC) と 2-(1-メチルプロピル)-フェニル-N-メチルカーバメート (MPMC) は農薬の登録期限が切れて現在販売されていないこと、またメソミルは溶媒先端近くに溶出して、血清及び尿のきょう雑物ピークと完全にオーバーラップすることが分かったので、残り7種類の完全分離を検討した。7種類のカーバメート系農薬を同時定量するための検出波長を選択するために、それぞれのメタノール溶液の紫外吸収スペクトル (Fig. 3) を測定した。Fig. 3 から、すべてのカーバメート類を効率よく同時に検出でき、かつベースラインノイズがあまり大きくない波長として 220 nm を選んだ。また、この波長におけるベースラインノイズは、市販1級品メタノール、HPLC 用メタノール、HPLC 用アセトニトリルの順に小さく、高感度検出のためには HPLC 用アセトニトリルが最も有利であると

判断した。また、後述するように、分離条件の点でもアセトニトリルが有利であった。

7種のカーバメート剤を分離するための溶離液として、当初メタノール/水の溶離液について検討したが、分析カラム温度が室温から 50℃ の間では、検討したどの組成比でも7種類のカーバメート剤を完全に分離することはできなかった。そこで、カラム圧の低下のためにもアセトニトリル/水系の溶離液を用いて、5~50℃ の間で分離条件を検討した結果、Fig. 4 に示したように、5℃ において最も良い分離が得られたので、分析カラムの温度は 5℃ とした。溶離液組成は分析時間を考慮して Fig. 4a の条件をわずかに変更して、アセトニトリル/水 (32 : 68) を以後の実験に用いた。

Fig. 4 Effect of column temperature on separation of seven carbamate pesticides

▲: pirimicarb; ■: PHC; ○: Bendiocarb; ◆: XMC; □: NAC; ●: Ethiofencarb; △: MIPC; Eluent: a) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 31/69$ (0.9 ml/min), b) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 25/75$ (1.25 ml/min)

3.2 カラム濃縮条件の検討

低濃度 (ng/ml 程度) のカーバメート剤を分析するために, 血清や尿試料中の農薬成分の分離・濃縮によく用いられている固相抽出法を参考にして, オンラインでのカラム濃縮法による濃縮条件を検討した. 濃縮用の溶離液 B には, 固相抽出法で多用されているメタノール/水 (10:90) を用いた. アセトニトリルもよく用いられるが, アセトニトリル系廃液を少なくするためにメタノールを用いた.

コントロール血清の汙液又は加水分解後のコントロール尿の汙液に, 7 種類のカーバメート剤を添加したものをを用いて, HPLC 分析のための試料の調製法と注入量, 濃縮カラムのコンディショニング及び洗浄時間などを検討した.

その結果, 血清や尿試料を前処理なしに濃縮カラムへ注入すると, きょう雑物ピークが溶媒先端からスケールオーバーして, 目的物ピークとオーバーラップすることが分かったので, 水で 10 倍希釈したものを 800 μl 注入することとした.

試料注入に先立って濃縮カラムを溶離液 B でコンディショニングするための最適時間を検討した結果, 血清試料及び尿試料共に 1~5 分の間で一定のピーク面積が得られたので, コンディショニング時間は 2 分とした. 濃縮カラムに試料成分を保持させた後, 更に溶離液 B を流すことによって, ベースラインノイズは小さくなった. しかし, 溶離液 B を長時間流すと目的物が溶出したり, 分析時間が長くなったりするなどの欠点がある. そこで洗浄時間の検討を行った結果, 血清試料については 1~7 分の間

で最大かつ一定のピーク面積が得られた. 尿試料については 2~8 分までは最大かつ一定のピーク面積を与えたが, 8 分を超えると, XMC, NAC 及び MIPC のピーク面積が減少傾向にあったので, 両試料の実験結果から洗浄時間は 6 分とした.

3.3 血清及び尿試料中におけるカーバメート剤の安定性

カーバメート剤の分析待ちの試料溶液中での安定性を調べるために, 汙過したコントロール血清又は加水分解後に汙過した尿の 100 μl に, 7 種のカーバメート剤を添加した後, 水を加えて全量を 1000 μl とし, 一定時間ごとに HPLC 分析を行い, 分析に供するまでの放置時間が血清及び尿試料中のカーバメート剤の測定値に及ぼす影響を調べた. その結果, 尿試料では 6 時間以内に分解は認められなかったが, 血清試料については約 6 時間経過後のピーク面積は, エチオフェンカルブは約 91%, ベンダイオカルブは約 56%, XMC と NAC は約 37% にも減少した. これは, 血清中の諸酵素による作用が原因であると思われる. したがって, 血清試料については HPLC 分析の直前に試料調製をする必要があるが, 温度による分解のおそれも考慮して, 尿試料についても HPLC 分析直前に試料調製することにした.

3.4 血清及び尿試料を用いた検量線の作成

最適化した分析条件に従って, 7 種のカーバメート剤をコントロール血清の汙液, 又は加水分解後のコントロール

Table 2 Calibration curves for carbamate pesticides

Human serum (10 ~ 50 µg/ml) ^{a)}			
Carbamate	Equation of line	$R^{b)}$	Measuring point / µg ml ⁻¹
pirimicarb	$y = 66.201x - 0.8087$	0.9994	0, 10, 20, 30, 40, 50
PHC	$y = 103.21x + 0.8387$	0.9994	0, 10, 20, 30, 40, 50
bendiocarb	$y = 50.879x + 0.3247$	0.9995	0, 10, 20, 30, 40, 50
XMC	$y = 94.469x + 0.6517$	0.9996	0, 10, 20, 30, 40, 50
NAC	$y = 94.469x + 0.6517$	0.9994	0, 1, 2, 3, 4, 5
ethiofencarb	$y = 87.901x + 0.7728$	0.9995	0, 10, 20, 30, 40, 50
MIPC	$y = 33.814x - 0.6896$	0.9994	0, 10, 20, 30, 40, 50
Human serum (1 ~ 5 µg/ml) ^{a)}			
Carbamate	Equation of line	$R^{b)}$	Measuring point / µg ml ⁻¹
pirimicarb	$y = 120.4x + 0.37$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
PHC	$y = 192.31x + 0.5572$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
bendiocarb	$y = 102.97x + 0.0361$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
XMC	$y = 177.96x + 0.7877$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
NAC	$y = 155.05x + 0.4413$	0.9998	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
ethiofencarb	$y = 162.66x + 0.522$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
MIPC	$y = 59.882x + 0.007$	0.9999	0, 1, 2, 3, 4, 5
Human serum (10 ~ 50 ng/ml) ^{a)}			
Carbamate	Equation of line	$R^{b)}$	Measuring point / µg ml ⁻¹
pirimicarb	$y = 0.8921x + 0.2702$	0.9996	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
PHC	$y = 1.3603x - 0.1658$	0.9998	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
bendiocarb	$y = 0.7488x + 0.8952$	0.9981	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
XMC	$y = 1.2214x - 0.7025$	0.9997	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
NAC	$y = 1.1028x - 0.3473$	0.9996	0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05
ethiofencarb	$y = 1.1924x + 0.2249$	0.9997	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
MIPC	$y = 0.4464x - 0.9141$	0.9974	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
Human urine (10 ~ 50 µg/ml) ^{a)}			
Carbamate	Equation of line	$R^{b)}$	Measuring point / µg ml ⁻¹
pirimicarb	$y = 13.019x - 0.0884$	1.0000	0, 10, 20, 30, 40, 50
PHC	$y = 20.01x + 0.0047$	1.0000	0, 10, 20, 30, 40, 50
bendiocarb	$y = 9.6843x - 0.0762$	1.0000	0, 10, 20, 30, 40, 50
XMC	$y = 18.421x - 0.0553$	1.0000	0, 10, 20, 30, 40, 50
NAC	$y = 17.229x - 0.3388$	0.9999	0, 1, 2, 3, 4, 5
ethiofencarb	$y = 16.901x - 0.0635$	1.0000	0, 10, 20, 30, 40, 50
MIPC	$y = 6.5177x - 0.2132$	0.9998	0, 10, 20, 30, 40, 50
Human urine (1 ~ 5 µg/ml) ^{a)}			
Carbamate	Equation of line	$R^{b)}$	Measuring point / µg ml ⁻¹
pirimicarb	$y = 132.73x - 0.5699$	0.9996	0, 1, 2, 3, 4, 5
PHC	$y = 206.02x + 0.3589$	1.0000	0, 1, 2, 3, 4, 5
bendiocarb	$y = 96.106x + 3.7484$	0.9995	0, 1, 2, 3, 4, 5
XMC	$y = 183.29x + 0.6965$	0.9998	0, 1, 2, 3, 4, 5
NAC	$y = 151.43x - 0.5375$	0.9999	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
ethiofencarb	$y = 169.69x - 0.4118$	1.0000	0, 1, 2, 3, 4, 5
MIPC	$y = 58.664x - 0.286$	0.9972	0, 1, 2, 3, 4, 5

a) Concentration in original serum or urine ; b) Correlation of coefficient of the calibration curve

尿の汙液 100 µl に、標準液と水を添加して全量を 1000 µl とし、その 800 µl を HPLC 分析して濃度対ピーク面積の検量線を作成した。220 nm における NAC のピーク高さは他に比べてかなり大きかったので、NAC の濃度は他の 10 分の 1 に調製した。得られた検量線を Table 2 に示し

た。HPLC 用の試料溶液は血清及び尿試料 100 µl を水で 10 倍希釈したが、表中の濃度は希釈前の血清又は尿中の濃度に換算してある。血清試料については 0.1 ~ 50 µg/ml の間でほとんどすべての検量線について相関係数 0.999 以上であった。尿試料では 1 ~ 50 µg/ml の間でほとんどの

Table 3 Recovery tests with human serum and urine

Human serum						
Carbamate	Sample/ μg	Added/ μg	Found ^{a)} / μg	Recovery ^{a)}	Equation of calibration curve	R ^{b)}
pirimicarb	0.00	2.50	2.53 ± 0.02	101.3 ± 0.8	y = 12.201x + 0.5442	0.9997
PHC	0.00	2.50	2.55 ± 0.03	102.1 ± 1.1	y = 18.984x + 0.1091	0.9998
bendiocarb	0.00	2.50	2.57 ± 0.02	102.8 ± 0.9	y = 9.5015x + 0.0287	0.9999
XMC	0.00	2.50	2.55 ± 0.01	101.8 ± 0.3	y = 17.738x - 0.0574	0.9999
NAC	0.00	0.250	0.253 ± 0.001	101.1 ± 0.4	y = 16.85x - 0.2262	0.9998
ethiofencarb	0.00	2.50	2.54 ± 0.02	101.4 ± 0.6	y = 16.267x - 0.0141	0.9998
MIPC	0.00	2.50	2.51 ± 0.04	100.4 ± 1.5	y = 6.1476x - 0.1793	0.9997
Average	0.00	2.50	2.54 ± 0.02	101.6 ± 0.8		0.9998
Human serum						
pirimicarb	0.000	0.250	0.254 ± 0.002	101.6 ± 0.7	y = 11.346x - 0.019	0.9999
PHC	0.000	0.250	0.257 ± 0.003	102.9 ± 1.3	y = 18.055x - 0.3065	0.9999
bendiocarb	0.000	0.250	0.259 ± 0.003	103.4 ± 1.3	y = 9.6658x + 0.0552	0.9999
XMC	0.000	0.250	0.255 ± 0.002	102.0 ± 1.0	y = 16.263x - 0.1038	0.9999
NAC	0.000	0.0250	0.0256 ± 0.0003	102.3 ± 1.3	y = 14.147x - 0.084	0.9999
ethiofencarb	0.000	0.250	0.256 ± 0.001	102.5 ± 0.3	y = 15.277x + 0.0075	0.9999
MIPC	0.000	0.250	0.253 ± 0.003	101.0 ± 1.3	y = 5.5454x - 0.1495	0.9998
Average	0.000	0.250	0.256 ± 0.003	102.0 ± 1.0		0.9999
Human urine						
Carbamate	Sample/ μg	Added/ μg	Found ^{a)} / μg	Recovery ^{a)}	Equation of calibration curve	R ^{b)}
pirimicarb	0.00	2.50	2.55 ± 0.06	102.0 ± 2.5	y = 13.013x + 20.683	0.9995
PHC	0.00	2.50	2.50 ± 0.02	100.0 ± 0.8	y = 20.318x - 0.2975	0.9999
bendiocarb	0.00	2.50	2.52 ± 0.02	100.8 ± 0.9	y = 9.7664x - 0.0913	0.9999
XMC	0.00	2.50	2.51 ± 0.02	100.5 ± 1.0	y = 18.545x - 0.187	0.9999
NAC	0.00	0.250	0.250 ± 0.002	99.9 ± 0.9	y = 17.49x - 0.4113	0.9999
ethiofencarb	0.00	2.50	2.50 ± 0.02	100.0 ± 0.8	y = 17.141x - 0.2485	0.9999
MIPC	0.00	2.50	2.49 ± 0.02	99.6 ± 0.8	y = 6.624x - 0.08	0.9999
Average	0.00	2.50	2.51 ± 0.03	100.4 ± 1.1		0.9998
Human urine						
pirimicarb	0.000	0.250	0.246 ± 0.002	98.3 ± 0.6	y = 259.97x - 0.092	0.9999
PHC	0.000	0.250	0.261 ± 0.001	104.2 ± 0.5	y = 426.19x + 2.0993	0.9994
bendiocarb	0.000	0.250	0.254 ± 0.001	101.6 ± 0.5	y = 186.96x + 3.1228	0.9999
XMC	0.000	0.250	0.247 ± 0.002	98.6 ± 0.7	y = 364.37x + 21.602	0.9999
NAC	0.000	0.0250	0.0250 ± 0.0003	99.9 ± 1.1	y = 334.31x + 16.278	0.9999
ethiofencarb	0.000	0.250	0.257 ± 0.001	102.9 ± 0.2	y = 337.34x + 0.35	0.9999
MIPC	0.000	0.250	0.246 ± 0.001	98.5 ± 0.3	y = 125.43x - 0.4223	0.9997
Average	0.000	0.250	0.251 ± 0.001	100.6 ± 0.6		0.9998

a) N = 4; b) Correlation of coefficient

検量線が 0.999 以上の相関係数を示した。血清試料に比べて尿試料ではきょう雑物ピークが大きかったために、血清試料ほどの低濃度までは直線性がなかった。

3・5 検出限界

検出限界濃度を S/N 比 3 として求めたところ、ピリミカーブ、PHC、ベンダイオカルブ、XMC、NAC、エチオフェンカルブ及び MIPC の血清 100 μl 中における検出限界は、20, 20, 20, 10, 1.0, 20 及び 50 ng/ml であった。また、尿 100 μl 中における検出限界は、NAC については 0.05 μg/ml、ピリミカーブについては 0.2 μg/ml、それ以

外については 0.5 μg/ml であった。

3・6 添加回収実験

汙過した血清と加水分解後に汙過した尿のそれぞれ 100 μl に 7 種のカーバメート剤 25 μg 又は 2.5 μg (NAC は 10 分の 1) を添加して、新たに作成した検量線から回収率を求めた。その結果を Table 3 に示した。血清及び尿試料共に平均回収率 100~102%, 平均標準偏差は 1% 程度であった。また、血清と尿試料に一定量のカーバメート剤を添加したときのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

後日、同様の実験を行った結果、血清に 2.5 μg を添加

Fig. 5 Typical chromatograms of a) human serum and b) human urine added seven carbamate pesticides

Column: Cosmosil 5 C₁₈-MS-II (250 × 4.6 mm ID, 5°C); Eluent: acetonitrile/water (32 : 68, 0.9 ml/min); Detection: 220 nm; a) Peaks (μg/ml): ① pirimicarb (0.1), ② PHC (0.1), ③ bendiocarb (0.1), ④ XMC (0.1), ⑤ NAC (0.01), ⑥ ethiofencarb (0.1), ⑦ MIPC (0.1); b) Peaks (μg/ml): ① pirimicarb (0.5), ② PHC (0.5), ③ bendiocarb (0.5), ④ XMC (0.5), ⑤ NAC (0.05), ⑥ ethiofencarb (0.5), ⑦ MIPC (0.5)

したものについては、平均回収率 $99.9 \pm 1.0\%$ ($N = 4$), 検量線の平均相関係数は 0.9999 であった。同様に、血清に 0.25 μg, 尿に 2.5 μg, 尿に 0.25 μg 添加したものについての平均回収率 (平均相関係数, $N = 4$) は, $100.1 \pm 2.7\%$ (0.9995), $99.8 \pm 0.5\%$ (0.9998) 及び $100.6 \pm 0.6\%$ (0.9999) であった。

以上のように 2 回の分析結果がほぼ一致したことから,

隔日変化は無視できる程度であることが分かった。また、検量線の式もほぼ一致していることから、検量線は毎回作成しなくても、さほどの誤差は出ないと思われる。

4 結 語

本法は 1 試料についての抽出と HPLC 分析が 59 分で完全に自動で行えるので (Table 1), 省力化に役立つとともに高い再現性を有する。また吸光検出法の利点として、検量線の傾きの日間差がほとんどないことから、検量線は簡単に 2 点検量線でも十分であり、前日の検量線を使っても誤差はほとんど生じない。

本法で定量可能な 7 種類のカーバメート剤のマウスに対する急性経口毒性値 LD₅₀ は, 30 mg/kg (ベンダイオカルブ) から 440 mg/kg (NAC) の範囲である。本法の検量線範囲は、血清では 0.1 ~ 50 μg/ml, 尿では 1 ~ 50 μg/ml であるので、血清試料では致死量よりも 2 けた以上低い濃度の定量が可能であり、農薬の特定と同時に患者治療指針の一助になると思われる。

ただ、本法における農薬の同定は保持時間だけであるので、完全な同定は困難であるが、多波長同時検出器を用いて紫外スペクトルを参考にすれば、ほぼ完全な同定も可能になるであろう。

(2003 年 3 月, 日本薬学会第 123 年会において一部発表)

文 献

- 1) E. Hogendoorn, P. van Zoonen: *J. Chromatogr. A*, **892**, 435 (2000).
- 2) 堀 寧, 中島真理子, 藤澤真奈美, 嶋田健次, 廣田哲也, 吉岡敏治: 薬学雑誌, **122**, 247 (2002).
- 3) 北見秀明, 渡辺哲男, 北原滝男, 石原良美, 高野二郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 1069 (2002).
- 4) J. R. Strait, G. C. Thornwall, M. Ehrich: *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 710 (1991).
- 5) Y. T. Gebreegzi, G. D. Foster, S. U. Khan: *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5165 (2000).
- 6) T. R. Covey, J. B. Crowther, E. A. Dewey, J. D. Henion: *Anal. Chem.*, **57**, 474 (1985).
- 7) Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn: *J. Chromatogr. A*, **873**, 137 (2000).
- 8) 滝埜昌彦, 代島茂樹, 山口憲治, 中原武利: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 309 (2001).
- 9) H. Itoh, S. Kawasaki, J. Tadano: *J. Chromatogr. A*, **754**, 61 (1996).
- 10) 森 博美: 薬学雑誌, **122**, 625 (2002).
- 11) 農林水産省生産局: “農薬中毒の症状と治療法”, 第 9 版 (2002).

要 旨

血清又は尿試料 100 μ l を水で希釈して 1 ml とし, 試料中の 7 種類のカーバメート系農薬を自動高速液体クロマトグラフィーによって同時定量する方法を開発した. 試料中のピリミカルブ, 2-イソプロピルオキシフェニル-*N*-メチルカーバメート (PHC), ベンダイオカルブ, 3,5-キシリル-*N*-メチルカーバメート (XMC), カルバリル (NAC), エチオフェンカルブ, イソプロカルブ (MIPC) を溶離液 B (メタノール : 水 = 10 : 90) によって, C₁₈ 濃縮カラムに導いて保持させ, 一定時間後に溶離液 A (アセトニトリル : 水 = 32 : 68) によって C₁₈ 分析カラムに導いて一斉分離し, 220 nm で吸光検出した. 検量線の直線範囲は, 血清試料では 0.1 ~ 50 μ g/ml までほとんどの農薬について相関係数 0.999 以上であり, 尿試料では 1 ~ 50 μ g/ml の範囲でほとんどの農薬について相関係数 0.999 以上であった. 検量線の直線範囲における添加回収実験では, 血清及び尿試料共に 7 種農薬の回収率は 98 ~ 104% であり, 繰り返し再現性は RSD にして 3% 以内であった.