

GC/MSによる農産物中のニコチンの分析

月岡 忠*・小山和志**・花岡良信**・寺澤潤一***・和田啓子**

GC/MSを用いて農産物中に残留するニコチンのルーチン分析法を確立した。ニコチンはGC/MSで測定する際、マトリックスの影響を強く受けたため、サロゲートとしてニコチン-d₃を用いた。ホモジナイズした試料にニコチン-d₃を加えた後、アセトンを加えポリトロンホモジナイザーで抽出し、ロータリーエバポレータで濃縮した。濃縮液をアルカリ性にして珪藻土カラムに負荷し、ヘキサンで溶出させ、濃縮乾固した。濃縮物を少量の精製用混合溶媒（25%トルエン：アセトニトリル）で溶解し、Envicarb-NH₂カートリッジカラムでクリンアップし、GC/MS-SIMで定量した。

本法は操作が簡単で、検出限界は0.01 μg/g、回収率の変動係数は5%以内、選択性に優れ、溶媒使用量が少量で、ルーチン分析に適した方法と考えられる。

キーワード：ニコチン，GC/MS，農産物，残留農薬分析

1. はじめに

ニコチンは、野菜、果物、園芸等の天然殺虫剤として国内で年間約140トン使用されている。ニコチンはタバコの葉にクエン酸塩あるいはリンゴ酸塩として存在する。殺虫剤としてのニコチンはタバコの葉から抽出し硫酸塩として販売されているため、使用前に石灰等のアルカリを加え、遊離のニコチンとした形で散布されている。ニコチンの急性毒性は非常に強く、シアン化合物と同等で、急性毒性量は成人で50~60mg、子供で10~20mgである。また、人体に対する中毒量は1~4mgで、肝臓で代謝されてコチニンとなり排泄される。ニコチンは、皮膚、ノドからも吸収されるため、散布する際にはマスク、防水加工した帽子、衣類、手袋等が必要である。

昆虫に取り込まれたニコチンはアセチルコリン受容体と結合し、神経を興奮させる。アセチルコリンと結合したニコチンは分解されず、興奮が長時間継続するため、昆虫を死に至らしめる。

ニコチンの分析は、GC法^{1,2)}、GC/MS法³⁻⁷⁾、HPLC法⁸⁻¹²⁾及びLC/MS法¹³⁾が報告されている。これらの方法は尿、血清、唾液等の生体試料を対象とした報告が主で実際の農産物を対象とした分析法は少なく、しかも、操作が長いうえに感度も悪かった。著者らは先に、ヘッドスペース-SPME-GC/MSに

よる生体試料中のニコチンの高感度分析法⁷⁾を報告した。今回、農産物を対象として、平成18年5月から施行されるポジティブリスト制に適合できるような、操作性、選択性に優れたルーチン分析法の検討を行ったので報告する。

2. 実験

2.1 試薬・試液

ニコチンは和光純薬(株)製、残留農薬試験用標準溶液をアセトンで希釈して用いた。

ニコチン-d₃はケンブリッジアイソトープラボから購入し、アセトンに溶解して用いた。

珪藻土カラム (CHEM ELUT, 20ml用)、ENVI-Carb/LC-NH₂ (500mg/500mg)はバリアンから購入して用いた。

アセトンは和光純薬(株)、残留農薬分析用を、水酸化ナトリウムは和光純薬(株)、特級を用いた。

2.2 対象食品

米、ほうれん草、オレンジ、キャベツ、トマト、ナス、レモン、グレープフルーツ、ジャガイモ、キュウリ、及びサヤエンドウの以上11種類の農産物をスーパーマーケットから購入して用いた。

* 長野県飯田保健所 〒389-0034 飯田市追手町2-678

** 長野県環境保全研究所 〒380-0944 長野市安茂里米村1978

*** 長野県松本保健所

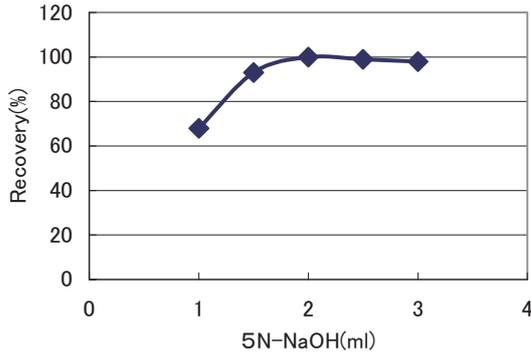


Fig.1 Relation between recovery and amount of 5-N NaOH from Chem-Elut column

2.3 装置及び測定条件

GC条件

GC：アジレント製，HP-5890シリーズII
 カラム：DB-5ms 0.32mm（内径）×30m（長さ）×0.25μm（膜厚）
 カラム温度：60℃（2min）-10℃/min-280℃（5min）

注入口温度：250℃

キャリアーガス：ヘリウム，流速 1ml/min

MS条件

MS：日本電子（株）製，JEOL GC-mate
 イオン化法：EI イオン化電圧：70V
 イオン化電流：300μA
 イオン源温度：250℃
 モニターイオン(m/z)：ニコチン84, 133, 162
 ニコチン-d₃ 87, 136

2.4 分析操作

100mlの遠心分離管にホモジナイズした試料15gを量り採り，これにニコチン-d₃ 1μg，アセトン50mlを加え，ポリトロンホモジナイザーで3分間抽出する．抽出物を毎分3000回転で5分間，遠心分離し，上澄み液をナス型フラスコにろ過する．抽出液をロータリーエバポレータで濃縮後，5規定水酸化ナトリウム溶液2mlを加え，混合した後，珪藻土カラムに負荷する．15分間放置後，n-ヘキサン80mlを流して，ニコチンを溶出させる．溶出液をロータリーエバポレータで濃縮乾固後，少量のトルエン：アセトニトリル混合溶媒(1：3)で溶解し，ENVI-Carb/LC-NH2カートリッジに負荷する．これにトルエン：アセトニトリル混合溶媒(1：3)10mlを流し，ニコチンを溶出させる．溶出液を濃縮し，アセトンで5mlに定容しGC/MS-SIMで定量する．

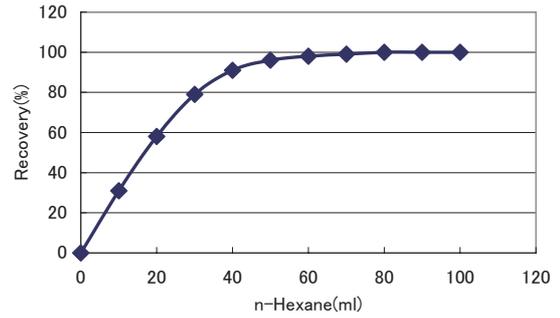


Fig.2 Relation between recovery and amount of n-Hexane from Chem-Elut column

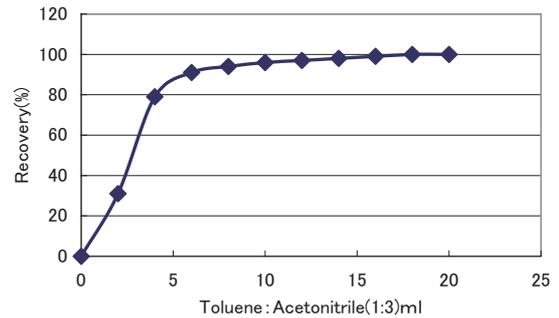


Fig.3 Relation between recovery and amount of toluene:acetonitril(1:3) from Envi-carb/NH2 cartridge column

3 結果及び考察

3.1 珪藻土カラムの検討

ニコチンは塩基性物質のためアルカリ性溶液からでないと溶媒抽出されにくい．また，アルカリ溶液からの溶媒抽出はエマルジョンを作りやすく，分離が困難な場合が多い．そこで，エマルジョンを作りにくい珪藻土カラムによる抽出法を採用した．中性に近い農産物の抽出液を珪藻土カラムに負荷した場合，ニコチンはn-ヘキサンや酢酸エチルで溶出された．しかし，レモン等の酸性の強い農産物の抽出液ではカラムから溶出されなかった．そこで，レモン15gを用いた抽出濃縮液に5規定水酸化ナトリウム溶液を0~3mlの間で添加し，珪藻土カラムに負荷した後にn-ヘキサン100mlで溶出させて，水酸化ナトリウムの必要量を検討した(Fig.1)．その結果，5N水酸化ナトリウム2.0ml以上を添加した抽出液でニコチンはほぼ100%回収された．次にニコチンを溶出させるのに必要なn-ヘキサン量を決定するため，10mlずつのフラクションをとり，測定した結果，ニコチンはn-ヘキサン70mlでほぼ100%回収された(Fig.2)．従って，本法ではアセトンの抽出濃縮液に5規定水酸化ナトリウム2mlを加えアルカリ性

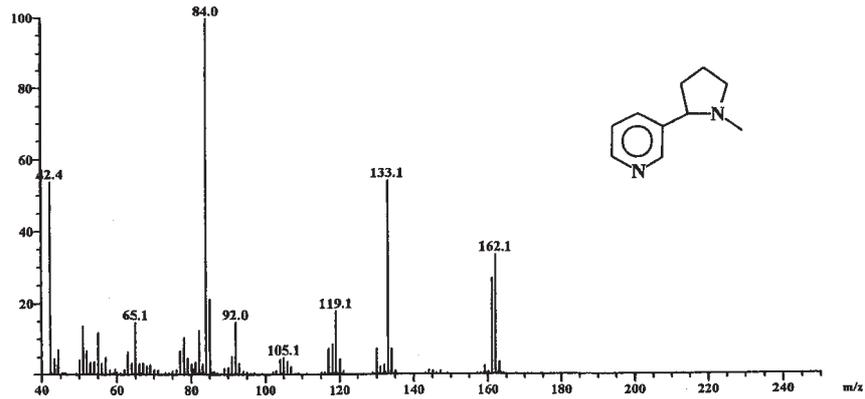


Fig.4 EI mass spectrum of nicotine

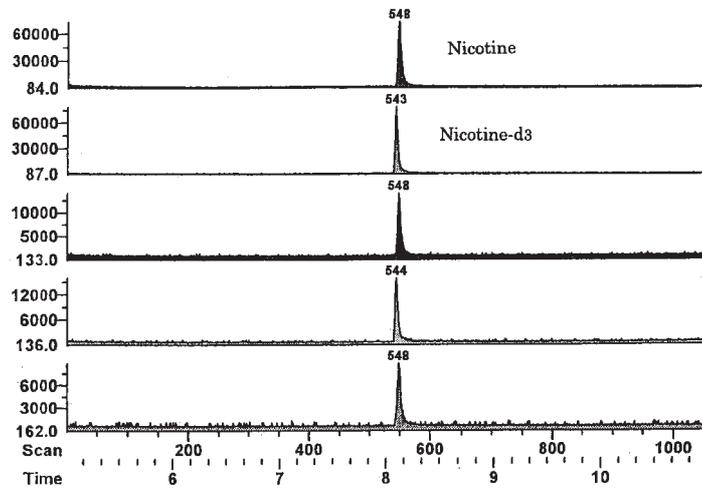


Fig.5 SIM Chromatogram of nicotine

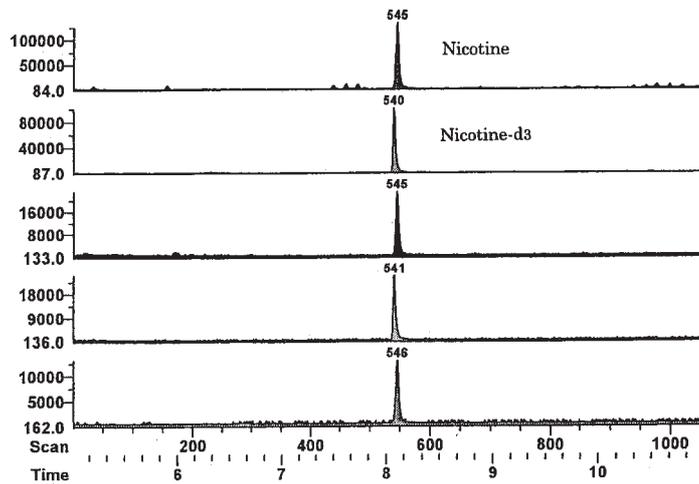


Fig.6 SIM chromatogram obtained from spinach after spiked with nicotine

にしたものを珪藻土カラムに負荷し、n-ヘキサン80mlで溶出させることにした。

珪藻土カラムをアルカリ性にするることにより、脂肪酸等の酸性物質の溶出が抑制され、クリンアップ効果も期待できる。

3.2 ENVI-Carb/LC-NH₂カートリッジの検討

農産物からの抽出液には色素や脂質等の様々な有機物が含まれている。これらの有機物をクリンアップなしで測定した場合、GCカラムを汚染し、定量に妨害を与える。本法では厚生労働省が農薬の一斉分析¹⁴⁾に採用している、ENVI-Carb/LC-NH₂カー

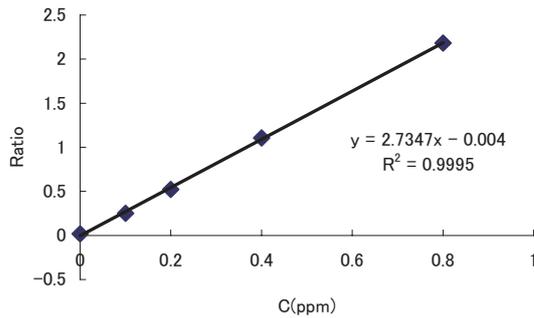


Fig.7 Calibration curve of nicotine

トリッジを用い、溶出溶媒にトルエン：アセトニトリル（1：3）混合溶媒を用いて検討した。その結果をFig.3に示した。トルエン：アセトニトリル（1：3）の混合溶媒10mlでニコチンは90%以上が溶出したが、その後は溶出速度が遅く、100%溶出するには20ml以上を要した。本法ではサロゲートを用いていることから、クリーンアップ効果を優先し、溶出に用いる溶媒量を10mlとした。このクリーンアップ法でほうれん草の色素はほぼ完全に除去され、無色透明な処理液が得られ、妨害ピークも少なかった。しかし、グレープフルーツでは、ニコチンの定量に直接妨害を与えなかったが、クリーンアップが十分ではなく、ニコチンの保持時間付近に妨害ピークが認められた。

3.3 GC/MS-SIMの測定条件

Fig.4にニコチンのEIマススペクトルを示す。ニコチンのベースピークは $m/z=84$ でありこれを定量イオンに、 $m/z=133$ を確認イオンとした。また、サロゲートの重水素体は $m/z=87$ を用いた。低濃度のニコチンを無極性のカラムで測定すると、テリングをおこしたため、検量線標準溶液に、PEGを $100 \mu\text{g/ml}$ 濃度になるように添加し、カラムに微極性のDB-5msを用いた。また、実試料の分析ではマトリックスの影響が強く認められ、回収率が200%を越える試料が認められたため、ニコチン- d_3 をサロゲートとして添加し、全ての操作を行い、マトリックス効果を補正することにした。

Fig.5に標準物質のSIMクロマトグラム、Fig.6にほうれん草の回収実験のクロマトグラム例を示す。このクロマトグラムは妨害ピークが殆ど無く、良好な結果が得られている。Fig.7に検量線の例を示し

Table 1 Recoveries of Nicotine added to agricultural products(n=5)

| Sample | Sample weight(g) | Spiked(μg) | Recovery(%) | S.D.(%) |
|------------|------------------|-------------------------|-------------|---------|
| Lemon | 15.0 | 1.0 | 101 | 1.9 |
| Cucumber | 15.0 | 1.0 | 105 | 3.6 |
| Eggplant | 15.0 | 1.0 | 91.6 | 2.5 |
| Spinach | 15.0 | 1.0 | 100 | 3.7 |
| Cabbage | 15.0 | 1.0 | 92.8 | 4.1 |
| Tomato | 15.0 | 1.0 | 100 | 2.7 |
| Grapefruit | 15.0 | 1.0 | 102 | 4.0 |
| Brown rice | 15.0 | 1.0 | 101 | 3.0 |

た。検出限界はGC/MSの最小検出量を 0.03ng 、試料採取量を 15g 、最終液量を 5ml 、注入量を $1 \mu\text{l}$ として計算すると $0.01 \mu\text{g/g}$ である。

3.4 添加回収実験と実試料への応用

各農産物にそれぞれ $0.1 \mu\text{g/g}$ 濃度になるように、ニコチンを添加し、30分間放置後、2.4の操作により回収実験を行った。結果をTable 1に示す。回収率は91.6%以上で回収率のS.D.(%)は5%以下であり良好な結果が得られた。実試料の応用例として、米、ほうれん草、オレンジ、キャベツ、トマト、ナス、レモン、グレープフルーツ、ジャガイモ、キュウリ、サヤエンドウの計11種類の農産物について測定したが、ニコチンは検出されなかった。

4. まとめ

GC/MSを用いて農産物中に残留するニコチンのルーチン分析法の検討を行った。ニコチンはGC/MSで定量する際、マトリックスの影響を強く受けたため、試料にサロゲートとしてニコチン- d_3 を加えた後、アセトンを加えてポリトロンホモジナイザーで抽出し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮液をアルカリ性にして珪藻土カラムに負荷し、ヘキサンで溶出させ、濃縮乾固した。これを少量の精製溶媒(25%トルエン：アセトニトリル)で溶解し、Envicarb-NH2カートリッジカラムでクリーンアップ後、GC/MS-SIMで定量した。本法は操作が簡単で、検出限界は $0.01 \mu\text{g/g}$ 、回収率の変動係数は5%以下、選択性に優れ、溶媒使用量が少量で、ルーチン分析に適した方法と考えられる。

(本研究の一部は2004.10に北京で開催された日中環境化学シンポジウムで紙上発表した.)

文 献

- 1) Holstege, D.M., Seiber, J.N. and Galey, F.D. (1995) Rapid multiresidue screen for alkaloids in plant material and biological samples, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 691.
- 2) Stan, H. J. and Linkerhaegner, M. (1996) Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection state-of-the-art of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting, *J. Chromatogr. A.* **750**(1+2, 4th international symposium on hyphenated techniques in chromatography and hyphenated chromatographic analyzers) 369.
- 3) Segmund, B., Leitner, E. and Pfannhauser, W. (1999) Development of simple sample preparation technique for gas chromatographic mass spectrometric determination of nicotine in edible nightshades (Solanaceae), *J. Chromatogr. A.*, **840**, 249.
- 4) Oshikawa, T., Kosaka, T. and Maeda, T. (1998) Rapid simultaneous analysis method for serious health damage situations related to poisonous chemical substances, *Miyazaki-ken Eisei Kenkyuusho Nenpo*, **10**, 133.
- 5) Siegmund, B., Leyden, D.E., Zikulnig, E., Leitner, E., Murkovic, M., Pfannhauser, W. and Reif, H. (2001) The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker, *Food Chemistry*, **74**, 259.
- 6) Shin, H.S., Kim, J.G., Shin, Y.J. and Jee, S.H. (2002) Sensitive and simple for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Scie.*, 25 Mar 2002, **769**, 177.
- 7) Tsukioka, T., Miyagawa, A. and Sato S. (2005) Determination of nicotine in biological samples by head-space-SPME-GC/MS, *J. Environ. Chem.*, **15**, 379.
- 8) Schepers, G., Rustemeier, K., Walkr, A. and Hackenberg, U. (1993) Metabolism of s-nicotine in noninduced and arochlor-induced rats, *J. Drug & Meta. Pharm.*, **18**, 187.
- 9) Smallwood, A. W., Tschee, C.S. and Satzger, R.D. (1997) Basic drug screen and quantitation of five toxic alkaloids in milk, chocolate milk, orange juice, and blended vegetable juice, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3976.
- 10) Baranowska, I. and Zydron, M. J. (2000) Analysis of biogenic amines, alkaloids and their derivatives by TLC and HPLC, *Pla. Chromatogr. Modern TLC*, **13**, 301.
- 11) Steenkamp, P.A., Van Heerden, F.R. and Van Wyk, B.E. (2002) Accidental fatal poisoning by nicotine glauca : identification of anabasine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry, *Fore. Sci. Int.*, **127**, 208.
- 12) Papadoyannis, I.N., Samanidou, V.E. and Stefanidou, P.G. (2002) Clinical assay of nicotine and its metabolite, cotinine, in body fluids by HPLC following solid phase extraction, *J. Liq. Chromatogr. & Relat. technol.*, **25**, 2315.
- 13) Moyer, T.P., Charlson, J. R., Enger, R.J., Dale, L.C., Ebbert, J.O., Schroeder, D.J. and Hurt, R.D., (2002) Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry with clinically relevant metabolic profiles, *Clin. Chem.*, **48**, 1460.
- 14) 厚生労働省 食安発第1129002号, 平成17年11月29日.

Determination of Nicotine in agricultural products by GC/MS

Tadashi TSUKIOKA*, Kazushi KOYAMA**, Yoshinobu HANAOKA**,

Jyun-ichi TERASAWA and Keiko WADA**

* *Nagano Prefectural Iida Public Health Center, 2-678, otemachi, Iida 395-0034, Japan*

** *Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1987 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan*

Abstract

A routine analytical method has been established for the residual nicotine in agricultural products by GC/MS. Because nicotine is affected strongly by matrixes, the authors used nicotine-d₃ as a salogate for the determination of nicotine.

The homogenized sample, after added with nicotine-d₃, is extracted with a Polytron homogenizer with acetone, and concentrated with a rotary evaporator. The concentrate is made alkaline, loaded onto a kieselguhr column, eluted with n-hexane, and finally concentrated to dryness. The concentrate is dissolved in a small amount of mixed solvent (25%-toluene:acetonitril), loaded onto an Envicarb-NH₂ cartridge column, eluted with mixed solvent, and subjected to a GC/MS-SIM determination.

This method is : simple in operation, has a determination limit of 0.01 μ g/g and the standard deviation of recovery is less than 5%, excellent in selectivity, and requires only a small amount of solvent. Therefore, this method is considered suitable for routine analyses.

Key words: Nicotine, GC/MS, Agricultural products, Residual pesticide analysis