

ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによるカーバメイト系殺虫剤の分析

望月恵美子 小宮山美弘 山田一郎 中山 昭

Determination of Carbamate Insecticides by Gas Chromatography
and High Performance Liquid Chromatography

Emiko MOCHIZUKI, Yoshihiro KOMIYAMA, Ichiro YAMADA
and Akira NAKAYAMA

殺菌剤, 除草剤として, 近年, ますます, その重要性が認められつつあるカーバメイト剤は, 今日では, 有機りん系殺虫剤とともに, 主要な合成殺虫剤として広範に使用されている。一般に, 水稲栽培におけるヨコバイ類, ウンカなど吸虫性害虫に卓効をもつほか, 果樹, 野菜類の各種害虫にも有効で幅の広い適用性をもつことが認められている¹⁾。

カーバメイト系殺虫剤は一般に熱, 光および酸に安定であるが, アルカリ性で分解され, 容易にフェノールを生成する。植物体内, ほ乳動物体内および土壤中の分解代謝については詳細に研究されている。BPMC, MIPC, NAC, PHCなどは植物体中への浸透移行性を持ち, 水面に施用した時, 稲の根, 茎から吸収され, かなり稲体内を移行する²⁾といわれている。

カーバメイト系殺虫剤の残留基準 (食品衛生法) としては, カルバリル (NAC) が, 果実, 野菜, 米に1.0 ppmと設定されている³⁾のみであるが, 実際には多種類のカーバメイト系殺虫剤が多くの作物に施用されている。

カーバメイト系殺虫剤の多成分残留分析法は, いくつか知られており, 厚生省法 (Draft) では, カーバメイト剤を加水分解後, クロロアセチル化してガスクロマトグラフィー (ECD) で分析している⁴⁾。そのほか, カーバメイト剤を直接トリフルオロアセチル (TFA) 化し, N-TFA誘導体を調製し, ECD-GCを用い定量する方法, 2, 4-ジニトロフェニルエーテル (DNP) 誘導体を作り, ECD-GCで定量する方法⁵⁾, 加水分解物にけい光試薬を反応させ, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する方法⁶⁾等がある。これらの方法は, 操作が複雑で迅速性に欠け, かつ熟練が要求される。そこで, 今

回, アルカリ熱イオン化検出器 (FTD) とHPLCを用い, 誘導体操作が不要な, 簡便で, 精度の良い, カーバメイト系殺虫剤の分析方法を検討したところ, 良好な結果が得られたので報告する。本報でとりあげたカーバメイト系殺虫剤の名称と化学構造式を図1に示した。

実験方法

1. 試料

1988年に山梨県で収穫された, 茶, 桃, ぶどう, りんご, 柿を用いた。

2. 試薬

(1) 農薬標準品, BPMC, MIPC, MTMC, MPMC, NAC, PHC, XMCは, 和光純薬工業(株)製を用いた。各農薬標準原液は各農薬標準品10mgをアセトン50mlに溶解した。農薬標準溶液は, 農薬のGC, HPLCの感度に応じて, 農薬標準原液を適宜アセトンで希釈して調製した。

(2) メタノール, ジクロロメタン, ヘキサン, エチルエーテル, アセトン, 無水硫酸ナトリウムは, 和光純薬工業(株), 残留農薬試験用を用いた。

(3) アセトニトリルは, 和光純薬工業(株), 液体クロマトグラフ用を用いた。

(4) 塩化ナトリウムは, 和光純薬工業(株), 試薬特級を用いた。

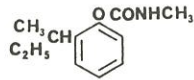
(5) セップパックフロリジルカートリッジ (日本ミリポアリミテッド製) は, あらかじめ, 5%エーテル含有ヘキサン10mlで洗浄して用いた。

3. 装置

(1) ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所 GC-12A (FTD検出器付き)

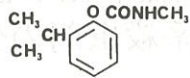
BPMC

Osbac
2-sec-butylphenyl
N-methylcarbamate



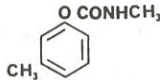
MIPC

Mipcin
2-isopropylphenyl
N-methylcarbamate



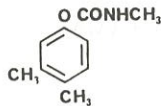
MTMC

Tsumacide
3-methylphenyl
N-methylcarbamate



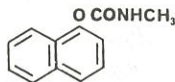
MPMC

3,4-dimethylphenyl
N-methylcarbamate



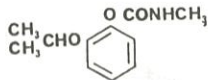
NAC

Carbaryl, Sevin, Denapon
1-naphthyl
N-methylcarbamate



PHC

Suncide, Baygon
Bayer 39,007
2-isopropoxyphenyl
N-methylcarbamate



XMC

Cosban
3,5-dimethylphenyl
N-methylcarbamate

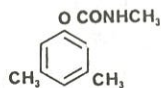


図1 試験に用いたカーバメイト系殺虫剤

- (2) 高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所 LC-2 (RF-510型けい光検出器付き)
- (3) データ処理装置：(株)島津製作所 クロマトパック CR-2 A

4. GC測定条件

カラム：2%OV-17/クロモソルブW (AW-DMCS)
80-100mesh 3.2mm i.d.×2.1m
温度：175℃ (カラム) 230℃ (検出器, 注入口)
N₂: 1.2kg/cm², H₂: 0.6kg/cm², Air: 0.5kg/cm²
Range: 1, Atten.: 64,
試料注入量: 5 μl, 記録紙速度: 2.5mm/min

検量線は, BPMC, MPMC, MTMC, XMCは, 1~10 μg/ml, MIPCは0.1~0.5 μg/mlの混合標準溶液を調製した。

5. HPLC測定条件

試料

メタノール 20ml×2 振とう
遠心分離 3,000rpm×5分間

溶媒層

水 150ml, 塩化ナトリウム 20g
ジクロロメタン 30ml×2 振とう
脱水 無水硫酸ナトリウム

減圧濃縮

5%エチルエーテル含有ヘキサン 5mlに溶解
クリーンアップ

セップバックフロリジルカートリッジ
5%エチルエーテル含有ヘキサン 5mlで洗浄
エチルエーテル 20mlで溶出

減圧濃縮

アセトン 1mlに溶解

試験溶液

(FTD-GC, HPLC)

図2 カーバメイト系殺虫剤試験法

カラム：NOVA-PAK C18 3.9mmi.d.×150mm
移動相：アセトニトリル/水 (3:7)

測定波長：280nm (Ex) -305nm (Em), Range: 16

流速：0.5ml/min, 試料注入量：10 μl

検量線は, NACは, 0.1~1.0, PHC1~10, MPMCは5~40 μg/mlの混合標準溶液を調製した。

6. 試験溶液の調製

ホモジナイズした試料20gを栓付き遠心管にとり, メタノール20mlを加えて10分間振とうした。遠心分離 (3,000rpm, 5分間) 後, 残さにメタノール20mlを加え, 同様に操作し, ろ液を合わせて, 分液ろうとに入れた。

水150ml, 塩化ナトリウム20gを加え, 軽く振り混ぜて溶解したのち, ジクロロメタン30mlずつで2回, 10分間振とうした。ジクロロメタン層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後, 40℃以下の水浴上で減圧濃縮した。

内容物を5%エーテル含有ヘキサン5mlに溶解し, セップバックフロリジルカートリッジに吸着させ, 5%エーテル含有ヘキサン5mlでカラムを洗浄した。エチルエーテル20mlを流し, 溶出液を40℃以下の水浴上で減圧乾固した。内容物をアセトン1mlに溶解し, 試験溶液とした。本操作の概要を図2に示した。

結果および考察

1. 前処理

(1) 抽出

カーバメイト系殺虫剤は一般に親水性溶媒に可溶であり, ジクロロメタン, アセトンなどが抽出溶媒として使用されている。Krauseは, からし, ラディッシュ, いちご中のカーバメイト系殺虫剤の一斉分析の際, アセトン, アセトニトリル, メタノールを比較検討し, メタノールが前2者に比べて, 抽出率がよいとしている⁶⁾。そこで,

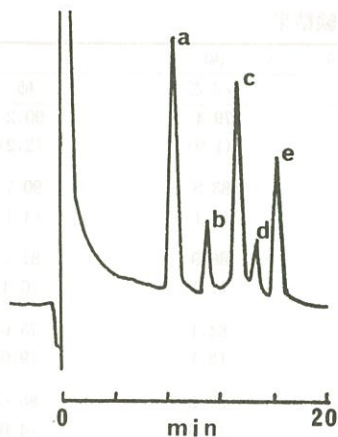


図3 GC-FTDによるカーバメイト剤5種のクロマトグラム

a: MTMC 20ng b: XMC 20ng c: MIPC 5ng
 d: BPMC 5ng e: MPMC 20ng
 (GC条件) カラム: 2%OV-17/クロモソルプW(AW-DMCS)
 80~100mesh, 3.2mmi.d.×2.1m, 175°C; N₂ 1.2kg/cm²

抽出溶媒として、アセトン、アセトニトリル、メタノールを選び、ホモジネートした桃試料にNAC, PHC, MPMCをそれぞれ0.4, 4.0, 20 μg添加し、操作法に従って処理し抽出溶媒の検討を行った。各農薬の抽出率はおおむねアセトン>メタノール>アセトニトリルの順であった。そこで、共存物質、色素等の影響を考慮して、抽出率、精度共比較的良好なメタノールを以後、抽出溶媒として用いることとした。

(2) 精製

クリーンアップは、外海らの報告⁷⁾に従い、セップバックフロリジル及びシリカ両カートリッジを用いて、溶出パターンを比較検討した。その結果、カーバメイト剤の保持力の強いフロリジルカートリッジを使用することとした。カートリッジに吸着されたカーバメイト剤は、5%エーテル含有ヘキサンでは全く溶出されないが、エチルエーテル20mlではほぼ全量溶出された。

2. GCによる定量

カーバメイト剤除草剤のFTDによる分析では、5%DC-200, 5%OV-17, 5%QF-1, 2%NPGSのカラム充填剤が使われている⁹⁾。そこで、4者を比較検討したところ、2%OV-17/クロモソルプWと2%QF-1/ガスクロムQでの分離および感度が良好であった。しかし、QF-1では、BPMCとXMCの保持時間が重なり、OV-17では、MPMCとPHCの保持時間が重なった。また、PHCはいずれのカラムにおいても感度が悪かった。MPMCとPHCはHPLCでの分離が可能であることがわかったため、本方法では、分析カラムとしてOV-17を使用することとした。NACはいずれのカラムにおいても測定不可能であったが、その他のカーバメイト剤については、良好に分離できた。上記測定条件におけるBP

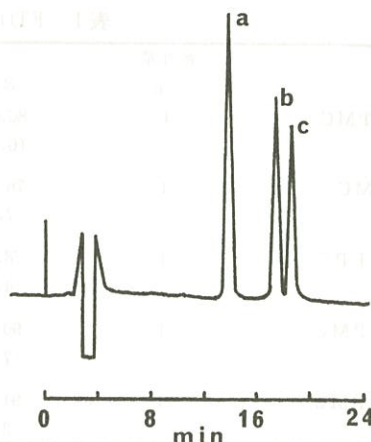


図4 HPLCによるカーバメイト剤3種のクロマトグラム

a: PHC 40ng b: MTMC 200ng c: MAC 4ng
 (HPLC条件) カラム: NOVA-PAK C18 3.9mmi.d.×150mm;
 移動相: アセトニトリル/水 (30:70); 流速: 0.5ml/min;
 測定波長: 280nm (Ex)-305nm (Em); 注入量: 10μl

MC, MTMC, MPMC, XMC混合標準溶液のクロマトグラムの一例を図3に示した。

本GC条件下における検量線は、BPMC, MTMC, MPMC, XMCは、1~10 μg/ml, MIPCは0.1~0.5 μg/mlの範囲で、いずれも良好な直線性が得られた。本法における定量下限は、BPMC, MIPCは5 ng/g, MTMC, MPMC, XMCは15 ng/gであった。

3. HPLCによる定量

HPLCによるカーバメイト剤の分析法がいくつか報告^{5,6,8)}されているので、それらを参考にしてHPLC分析条件の検討を行った。実験に用いた7種のカーバメイト剤のうち、NAC, PHC, MPMCに発けい光が認められた。最大けい光光度は、それぞれ、NAC290nm (Ex)-330nm (Em), PHC275nm (Ex)-305nm (Em), MPMC270nm (Ex)-295 (Em)であった。Krauseは、HPLCにおけるNACの測定波長を278nm (Ex)-306nm (Em)⁶⁾としている。3種のカーバメイト剤を同一波長で測定するため、種々の測定波長で各カーバメイト剤の感度と相互分離について検討し、測定波長は280nm (Ex)-305nm (Em)と決定した。

今回の実験では、分離カラムとしてNOVA-PAK C18を選択し、水-アセトニトリル系の溶離液によるNAC, PHC, MPMCの分離を検討した。分離能、感度、ピーク形状において3者及び夾雑物との分離が良好なアセトニトリル/水 (30:70)を用いることとした。上記測定条件におけるNAC, PHC, MPMC混合標準溶液のクロマトグラムの一例を図4に示した。

検量線は、NAC 0.2~1.0, PHC 1~10, MPMC 5~40 μg/mlの範囲で良好な直線性を示した。本法における定量下限は、NAC 5, PHC 15, MPMC 150ng/g

表1 FTD-GCにおける添加回収試験結果

	添加量 μg	回収率 \bar{x} (%)			
		茶	ぶどう	りんご	柿
MTMC	4	86.0 (6.9)	87.1 (5.5)	79.4 (1.9)	90.2 (2.2)
XMC	4	76.3 (7.3)	80.5 (3.0)	83.8 (2.1)	90.7 (4.1)
MIPC	1	78.6 (4.0)	100 (3.0)	86.9 (7.1)	81.2 (6.4)
BPMC	1	90.8 (7.1)	89.9 (9.9)	84.1 (3.1)	75.6 (9.0)
MPMC	4	91.3 (3.4)	92.9 (8.7)	87.2 (3.6)	85.6 (4.0)

n = 4 () = CV%

表2 HPLCにおける添加回収試験結果

	添加量 μg	回収率 \bar{x} (%)			
		桃	ぶどう	りんご	柿
NAC	0.4	84.5 (3.6)	91.7 (7.1)	102 (4.2)	82.7 (5.1)
PHC	4	77.7 (5.5)	79.6 (4.3)	80.9 (4.3)	76.8 (6.7)
MPMC	20	93.9 (3.5)	93.6 (5.9)	92.4 (4.1)	98.6 (7.5)

n = 4 () = CV%

であった。HPLCによるMPMCの感度は、FTDに比較すると、ほぼ1/10であった。

4. 添加回収実験

茶、桃、ぶどう、りんご、柿について、MTMC、MPMC、XMC各4 μg、MIPC、BPMC各1 μg (FTD-GC用)、PHC 4 μg、MPMC 20 μg、NAC 0.4 μg (HPLC用)を添加し、本法に従って操作し、回収率を求めた。その結果は表1、2に示すとおりで、おおむね良好な回収率が得られた。

まとめ

FTD-GCおよびHPLCを用いて、果実および茶中のカーバメイト剤7種 (BPMC、MIPC、MPMC、MTMC、NAC、PHC、XMC) の定量法を検討し、以下の結果を得た。

1. 試料からの抽出溶剤にメタノールを用い、ジクロロメタンに転溶した。抽出液の精製には、セップパックフロリジルを使用し、エチルエーテル20mlで溶出した。
2. NACを除く6種のカーバメイト剤は、FTD-GCで測定可能であった。分析カラムとしては、2%OV-17を選択し、2%QF-1をクロスチェック用とした。なお、QF-1では、BPMCとXMC、OV-17では、PHC、MPMCの保持時間が重なった。

3. NAC、PHC、MPMCは、発けい光があるため、測定波長を280nm(Ex)-305nm(Em)とし、HPLCによるけい光測定を行った。

4. 7種のカーバメイト剤を茶、桃、ぶどう、りんご、柿に添加した時の本法による回収率はおおむね良好であった。

文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 1980, 75 金原出版 (1980)
- 2) 後藤真康, 加藤誠哉：残留農薬分析法, 112~124, ソフトサイエンス社 (1980)
- 3) 厚生省食品保健課・乳肉衛生課・食品化学課共編：食品衛生関係法規集, 1253~1292, 中央法規出版 (1978)
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課編：残留農薬分析法 (Draft) 29~38, 日本食品衛生協会 (1986)
- 5) Krause, R. T.: J. A. O. A. C., 63, 1114~1124 (1980)
- 6) Krause, R. T. and August E. M.: J. A. O. A. C., 66, 234~240 (1983)
- 7) 外海泰秀, 中村優美子, 辻 澄子, 伊藤誉志男：衛生化学, 33, 206~215 (1987)
- 8) 神津 公, 細井要一, 大津留 修：衛生化学, 29, 232~236 (1983)