ポーラスポリマーによる捕集と熱脱着による性フェロモン および類縁化合物の揮散量の測定法¹⁾

香西 修治・若村 定男

農林水産省四国農業試験場

A Rapid and Convenient Method for Quantitative and Qualitative Analysis of Sex Pheromones and Their Analogues by the Vapor Collection with Porous Polymer Beads. Shuji KOZAI and Sadao WAKAMURA (Shikoku National Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **26** : 91-95 (1982)

The vapor of sex pheromones or their analogues up to a few μg was collected completely by using 50 mg of porous polymer beads packed in a small glass tube (cartridge, 4 mm I.D., 45 mm length) and could be desorbed by the insertion of the cartridge into the sample injection part (220°C) of a gas chromatograph. The thermal desorption recovery rate of pheromone analogues ranged from 94 to 105% for three porous polymer beads, i.e., Tenax GC, Chromosorb 105 and Porapak Q, and Chromosorb 105 was considered most suitable for this purpose. A good correlation was obtained between the release rate of decyl acetate and the amount of pheromones determined by the use of Chromosorb 105. The component ratio of the desorbed compounds from Chromosorb 105 was found to reflect their ratio in the air.

鱗翅目を中心とした多種の害虫について揮発性の性フェロモンが単離同定され、誘引性が確認されてきた。合成性フェロモンを害虫防除に利用する場合、フェロモントラップ誘引源からの合成性フェロモンの揮散量を知ることが非常に重要であると考えられる。しかし、空気中に揮散した微量の物質を捕集することによる揮散量の測定が困難であったため、迅速簡便な揮散量の測定法が確立されていなかった。

著者らは、小さなガラス管に詰めたポーラスポリマービーズに性フェロモンのモデル化合物を吸着捕集し、それをガスクロマトグラフの試料注入部に直接挿入して熱脱着し、分析する方法に着目し、その問題点に検討を加え、この方法が、合成性フェロモンの揮散量の簡便迅速で高精度の分析方法であることを明らかにしたので報告する。

本文に入るに先立ち、有益な助言をいただいた京都大学農学部北村実彬博士（現 農林水産省九州農業試験場）ならびに、研究遂行上の助言と本文の校閲をしていただいた四国農業試験場虫害研究室気賀沢和男室長に厚くお礼申し上げる。

材料および方法

1. 合成化合物

性フェロモンのモデル化合物として decyl acetate, dodecyl acetate, tetradecyl acetate, hexadecyl acetate, dodecanol, dodecanal および 3-dodecanone を用いた。アセテート類は対応するアルコールをアセチル化して合成し、他は市販品を用いた。また、(Z)-7-decenyl acetate (Z-7-DA) および (Z)-5-decenyl acetate (Z-5-DA) は当研究室で合成したものを用いた。

2. ガラス毛細管揮散源

市販の定容採取用ガラス毛細管(MICROPET®, CLAY ADAMS 社)の 50 μl 用および 5 μl 用に化合物を約 1 cm 採取し、いったん毛細管の中央部に移動させて、一端を融封し、遠心分離機 (1,500 rpm, 5 分間) により液体を融封端に移動させ、液面から 7 mm の位置で毛細管を切断した。このようにして調製したガラス毛細管は室内に数日間放置し、ガラス毛細管の空気柱部分の内面に付着していた化合物を揮散させた後、実験に供した。ガラス毛細管の断面積は標線までの長さを実測し、表示容

1) 本報の一部は第 25 回日本応用動物昆虫学会大会 (1981 年 4 月, 岡山大学) にて発表した。
1981 年 7 月 20 日受領 (Received July 20, 1981)

量から計算で求めた。

3. ポーラスポリマー吸着剤

ポーラスポリマービーズは次の3種、すなわち, Chromosorb 105 (JOHNS-MANVILL 社, 100~120 mesh), Porapak Q (WATERS 社, 60~80 mesh) および Tenax GC (ENKA NV ARNHEM 社, 60~80 mesh) を用いた。ポリマービーズの表面積は Tenax GC 18.6 cm²/g, Chromosorb 105 600~700 cm²/g (MURRAY 1977) であり, Porapak Q はChromosorb 105 と同程度とされている。最高使用温度は Tenax GC 350°C, Chromosorb 105 と Porapak Q は 250°C である。また, ビーズ 1 g の占める体積を実測した結果は, Tenax GC が 6.0 cm³, Porapak Q が 2.8 cm³, Chromosorb 105 が 2.5 cm³ であった。

一端を水平に研磨した外径 6 mm, 内径 4 mm, 長さ 45 mm の硬質ガラス管に, 50 mg のポーラスポリマービーズを詰め, 両端は石英綿により軽く栓をした(以下このガラス管を単にカートリッジと呼ぶ)。カートリッジは蒸留ヘキサン約 20 ml を通じて洗浄したのち, ガスクロマトグラフの試料注入部に挿入し(第1図), 窒素ガスを通して 220°C に 24 時間以上保って焼出しを行ってから使用した。

4. ガスクロマトグラフ (GC)

柳本 G-80 型を用いた。分析カラムは, 10% PEG-20 M(担体 Cellite 545, 60~80 mesh) を充てんしたステンレス製カラム(内径 3 mm, 長さ 0.75 m)を用いた。試料注入部は 220°C に設定し, 検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。

5. 揮散物質捕集装置

制御された環境の下で揮発性物質を揮散させて捕集するために, 第2図に示したような装置を用いた。すなわ

第1図 カートリッジの構造と熱脱着のためにガスクロマトグラフの試料注入部に挿入した状態。

第2図 揮散物質捕集装置。銅管, 外径 6 mm, 内径 4 mm, 長さ 10 m。

ち, 揮散物質捕集容器(内径 3 cm, 長さ 17 cm)の内部に揮散源をつるし, 内部の空気を上部につけたカートリッジを通じて吸引ポンプで排気した(以下この操作を単に吸入操作と呼ぶ)。空気は屋外より取り入れ, 粒状活性炭, 乾燥用粒状シリカゲルの層, 長さ 10 m の銅管, 次いでポーラスポリマービーズ (Porapak Q) を充てんしたプレカラムを通した後, ガラス製の揮散物質捕集容器の下部へ導入した。銅管, プレカラム, 捕集容器は恒温水槽内に保った。

6. 揮散量の測定

被測定物を揮散物質捕集容器内につり下げ, 十分焼出しを行ったカートリッジを装着し, 所定の時間吸入操作を行った。吸入操作終了後, カートリッジの吸入側の石英綿に内部標準物質溶液の所定量をマイクロシリッジを用いて添加し, 1 分間吸引して, ポーラスポリマーに吸着させた。カートリッジを装置から取り外し, GC の試料注入部 (220°C) に手早く挿入して, ポーラスポリマーに吸着されている化合物を熱脱着させた。GC は, あらかじめカラム槽のふたを開放して十分に放冷しておき, カートリッジの挿入 9 分後に 50°C にセットし, ついで 10 分後から昇温分析 (50~200°C, 4°C/min) した。

7. 回収率の測定

石英綿だけを約 5 mm の長さ詰めたガラス管(カートリッジと同じ大きさ)とカートリッジを短いシリコンゴム管で接続し, ガラス管内の石英綿に試料溶液を注入し, 揮散物質捕集容器中で吸引して, 石英綿から試料を揮散させ, カートリッジに捕集した。吸引後, カートリッジとガラス管のそれぞれに内部標準物質を添加し, それぞれ GC 注入部に挿入して定量した。ガラス管内の石英綿に添加した試料の量, ガラス管内に残存した試料の量, および, カートリッジに捕集された試料の量から回収率を計算した。

結果および考察

1. ポーラスポリマー吸着剤の選択

市販されているポーラスポリマービーズのうち、Tenax GC, Porapak Q, Chromosorb 105 の3種について、decyl acetate を吸着させて熱脱着させた場合の回収率を調べた。その結果、第1表に示したように、いずれのポーラスポリマーも良好な回収率を示した。

ポーラスポリマーを加熱すると一部のポリマーが分解し、ガスクロマトグラム上にバックグラウンドとして現われた。3種のポーラスポリマーについて熱脱着時のバックグラウンドを調べたところ、Tenax GC < Chromosorb 105 < Porapak Q の順に多かった。

Tenax GC は表面積が他2者の30分の1以下であり、逆に1gのビーズが占める体積は2倍以上であった。カートリッジの大きさの制限からビーズの使用量を増すことにより吸着容量を増加させることは、Tenax GC については困難であった。Porapak Q はバックグラウンドが3者中最も多かった。これらの理由から、今回の実験には Chromosorb 105 が最も適していると結論した。

BYRNE et al. (1975) は、約 200 μg の揮発性物質を捕集するために、25 g のポーラスポリマービーズ (Porapak Q) を使用し、また SCHULZ et al. (1971) は、カンキツの揮発性物質を捕集する際に、約 23 cm のポーラスポリマービーズのカラムを使用している。しかし、著者らの実験結果は μg レベルの性フェロモン化合物を捕集するためには、50 mg のポーラスポリマービーズで十分であることを示している。

以下の実験は Chromosorb 105, 50 mg を充てんしたカートリッジを用いて行った。

2. ポーラスポリマービーズ自体に由来するバックグラウンド

ポーラスポリマービーズ Chromosorb 105, 50 mg を詰めたカートリッジを十分に焼出した直後のもの、揮散物質捕集容器内で空気だけを1時間吸引したもの、および、捕集容器内で Z-7-DA を含む空気を吸引した後 decyl acetate 0.5 μg を添加したものをそれぞれ GC

第3図 Chromosorb 105 を熱脱着した時のガスクロマトグラム A: 焼出し直後, B: 1時間, 空気のみ吸引, C: Z-7-DA を1時間吸引し, decyl acetate 0.5 μg を添加. 吸引条件 20°C, 590 ml/min. ▼印はアセテート同族体の保持時間.

の注入部に挿入して熱脱着させ分析した。

焼出し直後の未使用カートリッジでも熱脱着操作により、複数個のピークを生じた (第3図A)。これらのピークはポーラスポリマービーズ Chromosorb 105 自体およびカラム液相の熱分解物に由来すると考えられる。これらのピークはカートリッジとカラムの焼出しを十分に行うことによりかなり低くできるが、完全に除去することは不可能と思われる。

空気を吸引した場合、空気と装置に由来するバックグラウンドピークが現われた (第3図B)。これらのピークは導入する空気の浄化と装置内部を清澄に保つことによりかなり低くすることができた。その場合でも decyl acetate のピークに重なるバックグラウンドピークは約 0.1 μg 量に相当した (第3図C)。したがって、試料量が 0.2 μg 以下でバックグラウンドピークと重なる場合、定量値への影響が無視できなくなり、その補正が必要となった。

3. ポーラスポリマービーズへの吸着と脱着が成分の相対比におよぼす影響

第1表に示したように decyl acetate の熱脱着による回収率がほぼ 100% であったことから、複数の物質を吸脱着しても、その前後において相対成分比は変化しないことが期待された。このことを確かめるために Z-5-DA と decyl acetate を混合して、直接 GC の試料注入部に注入して測定した時の相対比と、同量の試料を回収率の測定法に準じて一度揮散させてカートリッジに捕集し、熱脱着して測定した時の相対比を比較した。

相対比を3段階に変えたが、両方の測定法において相対的にはほとんど差が認められなかった (第2表)。したがって、ポーラスポリマービーズ Chromosorb 105 に捕集し熱脱着される物質は空气中に存在していた各成分の相対比をよく反映しているといえる。

第1表 熱脱着による decyl acetate の回収率

種類	添加量 (μg)	定量値 (μg) ^{a)}	回収率 (%)
Tenax GC	0.50	0.472 $\pm$ 0.150	94
Porapak Q	0.51	0.536 $\pm$ 0.021	105
Chromosorb 105	0.51	0.505 $\pm$ 0.186	99

こ^{a)} (平均値) $\pm$ (標準偏差), 3回.

第2表 熱脱着が成分の相対比におよぼす影響
相対比^{c)} (Z-5-DA)/(decyl acetate)

直接法 ^{a)}	1.739±0.097	0.765±0.039	0.384±0.007
捕集法 ^{b)}	1.797±0.061	0.757±0.055	0.398±0.042

a) マイクロシリンジを用いて試料注入部に注入。

b) Chromosorb 105 に捕集，熱脱着。

c) (平均値)±(標準偏差)。

第4図 熱脱着法における定量性

ガラス毛细管揮散源断面積 A: 0.056 mm², B: 0.556 mm², 開口端より液面までの長さ: 7 mm, 試料: decyl acetate, 揮散条件: 20°C, 590 ml/min, 1時間, 内部標準: Z-7-DA

4. ポーラスポリマービーズによる捕集分析法における定量性

揮発性物質の捕集量が数 μg 以下のレベルにおいて、捕集分析法が定量性を保っているかどうかを調べるために、揮散速度が一定と考えられたガラス毛细管揮散源からの揮散量を測定した。

結果は第4図に示したように、揮散量すなわち毛细管の数を増すと測定値もそれに比例して増加し、両者には良好な直線関係が認められた。したがって、捕集量が数 μg 以下のレベルで捕集分析法が定量性を保っていることが示されたといえる。

5. 性フェロモンモデル化合物の回収率

Decyl acetate 以外の性フェロモンモデル化合物についても、Chromosorb 105 カートリッジからの熱脱着における回収率を測定した。各々の化合物の回収率は、97～103% の範囲であった(第3表)。測定値の変動を考慮するとほぼ100%回収されているといえる。

したがって、decyl acetate で確かめられたことは他の性フェロモンおよび類縁化合物にも適用できると推察される。

空气中に揮散した生理活性物質を捕集する方法には、コールドトラップ法、溶媒洗浄法や適当な吸着剤に吸着

第3表 熱脱着によるフェロモン類縁化合物の Chromosorb 105 からの回収率

化合物	添加量 (μg)	残存量 (μg)	捕集量 (μg)	回収率 ^{a)} (%)
Decyl acetate	1	—	1.01 ± 0.03	101 ± 3
Dodecyl acetate	1	0.083	0.892 ± 0.047	97 ± 2
Tetradecyl acetate	1	0.109	0.925 ± 0.103	103 ± 3
Hexadecyl acetate	1	0.597	0.411 ± 0.085	102 ± 3
Dodecanol	1	0.017	0.984 ± 0.01	100 ± 1
Dodecanal	1	0.013	0.989 ± 0.016	100 ± 1
3-Dodecanone	1	—	0.994 ± 0.038	99 ± 4

a) (平均値)±(標準偏差), 3 回。

内部標準物質 decyl acetate は Z-7-DA, 他は decyl acetate。

する方法などがある(北村ら, 1979)。吸着法では性フェロモンなどの極性が低い化合物を選択的に吸着できる吸着剤として、ポーラスポリマービーズが捕集分析に利用された(BYRNE et al., 1975 など)。しかし、これらの方法は吸着剤から吸着物質の回収を溶媒により行うため、溶媒の使用に伴う問題、たとえば微量物質の共蒸発などを解決する必要がある。一方、SCHULTZ et al. (1971), ZLATKIS et al. (1973) や MURRAY (1977) はポーラスポリマービーズに吸着された揮発性物質を加熱により脱着させ、直接 GC に導入する分析法を考案しているが、GC の改造や特別な付属装置が必要であった。

本研究で採用した方法は GC の改造や特別な付属装置が不要であり、簡便迅速に定量分析ができる利点がある。カートリッジの GC 注入部への挿入もすばやく行えば、キャップを締め終るまでの短時間における物質の損失は考慮しなくてもよかった。

ポーラスポリマービーズを加熱するとポリマービーズ自体に由来するバックグラウンドが生じるが、これについては KRUMPERMAN (1972) が指摘したように熱脱着の温度を低くすれば低下できる可能性がある。特定の物質についてのみ測定する場合にはガスクロマトグラフ質量分析計を用いたマスフラグメントグラフィー法により、バックグラウンドの影響を除去できると考えられる。CROSS et al. (1980) は、ガラス壁面への物質の吸着が測定結果に影響する可能性を示しているが、本研究の結果では特に問題にはならなかった。

化学的に不安定な物質、特に酸素と熱に対して不安定な物質については今回は検討しなかったが、吸着や熱脱着に際して分解や変性の可能性がある。吸着時の空気中の酸素による酸化反応については BYRNE et al. (1975) によって、二重結合を数個持つ化合物 myrcene と ips-diol について検討され、良好な回収率が得られている。

熱脱着時の酸化反応を防止するためには、MURRY (1977) が行っているようにカートリッジ内の空気を不活性ガスで置換してから加熱する必要がある。

ここに述べた方法を処女雌からの性フェロモン放出量の測定など生物試料に適用するためには捕集容器内部が吸入操作中にやや減圧状態になることや導入空氣の乾燥状態など生物にとって不適当な条件を改良する必要があると考えられる。すなわち、捕集容器内の気圧に関しては、大気圧を保って吸入操作ができるように装置を改良しなければならない。導入空氣の湿度に関しては、ポラスポリマービーズが水蒸気を吸着、吸収しないことから、導入空氣に水蒸気が含まれていても、性フェロモンの捕集率には影響しないと思われる。

摘 要

1. 空氣中に揮散した性フェロモンおよびその類縁化合物をポラスポリマービーズを詰めたガラス管（カートリッジ）で捕集し、これをガスクロマトグラフの試料注入部に挿入して吸着された物質を熱脱着させて分析し、性フェロモン等の揮散量を測定する方法について検討した。

2. 数 μg 量の性フェロモンおよび類縁化合物は、それを含む空氣をカートリッジ中の 50 mg のポラスポリマービーズ層に通すことにより、完全に捕集でき、捕集された化合物は加熱（220°C）により脱着、回収されることが示された。

3. ポラスポリマービーズとして、Tenax GC, Chromosorb 105 および Porapak Q の3種について検討し、バックグラウンドと吸着容量を考慮して、Chromosorb 105 を選択した。

4. Chromosorb 105 に吸着され、熱脱着された性フェロモンおよび類縁化合物は、ほぼ 100% の回収率が得

られ、空氣中に存在した量および相対比を反映していると考えられた。

5. 空氣中に揮散した decyl acetate の揮散量と Chromosorb 105 により捕集測定された定量値との間には良好な直線関係が認められた。したがって、この測定法は、微量の性フェロモンおよびその関連化合物の迅速簡便な定量法であるといえる。

引用文献

- BYRNE, K. J., W. E. GORE, G. T. PEARCE and R. M. SILVERSTEIN (1975) Porapak Q collection of airborne organic compounds serving as models for insect pheromones. *J. Chem. Ecol.* **1**: 1—7.
- CROSS, J., J. H. TUMLINSON, R. E. HEATH and D. E. BURNETT (1980) Apparatus and procedure for measuring release rates from formulations of lepidopteran semiochemicals. *J. Chem. Ecol.* **6**: 759—770.
- 北村実彬・杉江 元・若村定男 (1979) 行動制御物質の研究法 (2)——昆虫フェロモンの精製・単離. *化学と生物* **17**: 470—478.
- KRUMPERMAN, P. H. (1972) Erroneous peaks from porapak Q traps. *J. Agr. Food Chem.* **20**: 909.
- MURRAY, K. E. (1977) Concentration of headspace, airborne and aqueous volatiles on Chromosorb 105 for examination by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **135**: 49—60.
- SCHULTZ, T. H., R. A. FLATH and T. R. MON (1971) Analysis of organic volatiles with vapor sampling. *J. Agr. Food Chem.* **19**: 1060—1065.
- ZLATKIS, A., H. A. LICHTENSTEIN and A. TISHBEE (1973) Concentration and analysis of trace volatile organics in gases and biological fluids with a new solid adsorbent. *Chromatographia* **6**: 67—70.