報 文

食品中の残留農薬の分析法に関する研究 (第 15 報)

ECD ガスクロマトグラフィーによる玄米中のカーバメート
殺虫剤の残留分析法

(昭和 48 年 9 月 5 日受理)

関 田 寛* 鈴 木 隆*
武 田 明 治* 田 辺 弘 也*

Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (XV)

Analytical Method of Carbamate Insecticide Residues in Unpolished Rice
by Gas Chromatography with Electron Capture Detector

Hiroshi SEKITA, Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA and Hiroya TANABE

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

It was investigated that gas chromatography with ECD (ECD-GC) of trifluoroacetyl derivatives from carbamate insecticides and trifluoroacetic anhydride for the purpose of the simultaneous analysis of 9 kinds of carbamate insecticides resistered in Japan.

The detectable minimum amount of trifluoroacetylcarbamates by ECD-GC on the condition in this study are 0.006~0.008 ng of BPMC, MTMC and MIPC, 0.01~0.02 ng of CPMC, MPMC, PHC and XMC, and 0.15 ng of NAC.

In the analytical method of carbamate residues in the unpolished rice devised in this study, the recovery tests of 8 kinds of carbamates (except APC) added to rice powder were desirable results (86% of CPMC to 108% of NAC).

(Received September 5, 1973)

我が国におけるカーバメート殺虫剤 (以下単にカーバメート剤と呼ぶ) としては Table 1 に掲げるように、現在 9 種類登録されている。そのうちで、食品中の残留基準としては、昭和48年12月現在カルバリルについてのみ設定されているだけであるが¹⁾、他のものについても順次追加設定されていくものと考えられる。

一方、厚生省の残留農薬分析公定法におけるカルバリル試験法²⁾には比色法が採用されているが、この方法はカルバリルに対してのみ適用できるもので、他のカーバメート剤に対しては応用することができない³⁾。近年カーバメート剤を高感度にしかもいっせいに分析する方法として ECD ガスクロマトグラフィーが応用されてき

ており、ハロゲノアセチル誘導体⁴⁾ならびにカーバメート剤を加水分解した際に生成するフェノール体のハロゲノアセチル誘導体^{5), 6)}あるいはジニトロフェニルエーテル誘導体として分析している。ジニトロフェニルエーテル誘導体法は、既登録カーバメート剤のうちの4種がフェノール骨格のオルト位に置換基を有しており、それらのうちには誘導体を形成しにくいものがあるので、既登録のカーバメート剤のいっせい分析には適用できない。

今回、著者らは既登録カーバメート剤9種類について、Lau らの方法⁴⁾に従って無水トリフルオロ酢酸と反応させてトリフルオロアセチル誘導体に変換し、それら誘導体の ECD ガスクロマトグラフィーの条件を種々検討し、次いで米 (玄米) についての試験法として十分

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1. Carbamate Insecticides Tested in the Present Experiment

Common or trade name	Chemical name	Structural formula
NAC (Carbaryl Sevin)	1-Naphthyl <i>N</i> -methylcarbamate
CPMC (Hopcide)	2-Chlorophenyl <i>N</i> -methylcarbamate
MTMC (Tsumacide)	3-Methylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
MIPC (Mipcin)	2-Isopropylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
BPMC (Bassa)	2- <i>sec</i> -Butylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
PHC (Suncide)	2-Isopropoxyphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
MPMC (Meobal)	3,4-Dimethylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
XMC (Maqbarl Cosban)	3,5-Dimethylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate
APC (Hydrol)	4-(Diallylamino)-3,5-dimethylphenyl <i>N</i> -methylcarbamate

実用に供し得る残留分析法を考案したので報告する。

実験方法

1. 試薬

カーバメート剤：農薬工業会を通じて農薬原体メーカーより分与されたものを再結晶法により精製した。各農薬のトリフルオロアセチル体が ECD ガスクロマトグラフィーにおいて単一ピークを示すことを確認してから使用した。

有機溶媒：すべて残留農薬試験用に適格するものを用

いた。

活性アルミナ：Merck 社製の カラムクロマトグラフィー用アルミナ（中性，活性度 I）を用いた。

無水硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム：市販の試薬特級品を用いた。

ガスクロマトグラフィー用担体：ガスクロム Q（60～80 mesh）は日本クロマト工業（株）より購入したものを用いた。

ガスクロマトグラフィー用液相：シリコン OV-225，

シリコン GE XE-60, およびシリコン DC QF-1 は日本クロマト工業(株)より購入したものをを用いた。

カーバメート剤標準溶液 A: 酢酸エチル溶液 1 ml 中に MTMC, CPMC, MPMC, PHC 各 5.0 μ g および NAC 10.0 μ g を含有する。

カーバメート剤標準溶液 B: 上記カーバメート剤の *n*-ヘキサン溶液。

カーバメート剤標準溶液 C: アセトン溶液 1 ml 中に MTMC, BPMC, MIPC 各 2.0 μ g, XMC, CPMC, MPMC, PHC, および NAC を各 4.0 μ g を含有する。

有機塩素剤標準溶液: *n*-ヘキサン溶液 1 ml 中に γ -BHC, アルドリン各 0.15 μ g, β -BHC, デイルドリン, エンドリン各 0.30 μ g, *p, p'*-DDT 0.60 μ g, およびジコホル 1.50 μ g を含有する。

2. ガスクロマトグラフィー

装置: 島津製作所製 GC-4BM 型 (^{63}Ni -ECD 付き)

カラム: 内径 3 mm 長さ 1.5 または 2 m のガラスカラム

カラム充てん剤: 2% OV-225, 2, 5% XE-60, 2, 5% QF-1, 2, 5% OV-17 (担体はいずれも Gaschrom Q)

カラム温度: 160°, 170°

試料注入口・検出器温度: 250°

キャリアガス: N_2 , 0.5~1.6 kg/cm²

感度: 10² M Ω , 8~32 $\times$ 10⁻² V

3. トリフルオロアセチル化

25 ml の共せん試験管にカーバメート剤標準溶液 A 0.2 ml をとり, これに無水トリフルオロ酢酸 0.2 ml を加え, 密せんを施した後, 室温で一夜 (約 18 時間) 放置した。次いで, これにエーテル 0.3 ml および *n*-ヘキサン 4.5 ml を加えた後, 水 5 ml を加え, 試験管用

ミキサーで激しくかき混ぜた。水層を除去した後, 有機層はさらに水 5 ml ずつで 2 回洗浄を繰り返した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 適当に希釈してガスクロマトグラフィー用検液とした。

4. アルミナカラムクロマトグラフィー

中性アルミナに 5% 相当量の水を添加し, 十分に振り混ぜた後, 密せんを施して一夜放置して調製した含水アルミナ 10 g を内径 1.5 cm, 長さ約 30 cm のクロマトグラフィー用ガラス管に *n*-ヘキサンをを用いた湿式法にて充てんして作製したアルミナカラムに有機塩素剤標準溶液ないしはカーバメート剤標準溶液 B を 1 ml 注入し, 初めエーテル・*n*-ヘキサン (6:94) で, 次いでアセトン・*n*-ヘキサン (10:90) で溶出した。エーテル・*n*-ヘキサン溶出分画は Kuderna-Danish (KD) 型濃縮器で減圧濃縮し, 5 ml とした。また, アセトン・*n*-ヘキサン溶出分画は同様の操作で溶媒を完全に留去した後, 前述の方法でトリフルオロアセチル化を行った。

5. *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配

100 ml の分液漏斗にカーバメート剤標準溶液 B 1 ml および *n*-ヘキサン 20 ml をとり, これに *n*-ヘキサン飽和のアセトニトリル 40 ml ずつで 2 回振とう抽出を行い, 下層はあらかじめ 4% 塩化ナトリウム溶液 250 ml を入れた 500 ml の分液漏斗に合わせた後, ジクロルメタン 50 ml ずつで 2 回振とう抽出を行い, ジクロルメタン層は水 50 ml ずつで 2 回洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, KD 濃縮器で減圧下溶媒を完全に留去し, *n*-ヘキサン約 5 ml に溶解した。

6. 玄米における残留分析

玄米約 1 kg を製粉機で全体が 60 mesh のフルイを通過するように粉砕して得られた試料から 50 g を 500

Fig. 1. Gas chromatogram of trifluoroacetyl derivatives of carbamate insecticides. Column, 5% XE-60 (1.5 m); column temp., 170°; inject and detector temp., 250°; carrier gas, N_2 0.5 kg/cm².

1, MTMC (0.4 ng); 2, MIPC (0.4 ng); 3, XMC (0.8 ng); 4, CPMC (0.8 ng); 5, BPMC (0.4 ng); 6, MPMC (0.8 ng); 7, PHC (0.8 ng); 8, NAC (1.6 ng).

ml の分液漏斗に取り、ジクロルメタン 100 ml ずつで 2 回振とう抽出を行い、得られた抽出液は KD 濃縮器にて減圧下溶媒を完全に留去し、残留物は *n*-ヘキサン 20 ml に溶解し、100 ml の分液漏斗に移した。これを前述の方法に従って *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配、次いでアルミナカラムクロマトグラフィーを行い、カーバメート剤溶出分画（アセトン・*n*-ヘキサン溶出液）を KD 濃縮器で減圧下溶媒を完全に留去した後、残留物を酢酸エチル 0.2 ml に溶解し、前述の方法に従ってトリフルオロアセチル化を行った後、ガスクロマトグラフィーを行った。

Table 2. Retention Time and Detectable Minimum of Trifluoroacetylcarbamates by ECD Gas Chromatography

Carbamates	Retention time (min)	Detectable minimum (ng)
MTMC	1.92	0.007
MIPC	2.37	0.006
XMC	2.52	0.012
CPMC	2.67	0.018
BPMC	2.97	0.008
MPMC	3.29	0.018
PHC	3.84	0.023
NAC	16.89	0.15
Organochlorine α -BHC	7.20	

Column, 5% XE-60 (1.5 m); column temp., 170°C; inject. and detector temp., 250°C; carrier gas, N_2 0.6 kg/cm²; sensitivity, 10^3 M Ω ; range, 16×10^{-2} V.

実験結果ならびに考察

1. ECD ガスクロマトグラフィー

現在我が国で登録されている 9 種類のカーバメート剤 (Table 1) のトリフルオロアセチル誘導体について ECD ガスクロマトグラフィーの条件を検討した。充てん剤として XE-60, QF-1, OV-17 (いずれも 2 および 5%) ならびに OV-225 (2%) を用いたカラムについて種々の条件を設定して検討したところ、Fig. 1 に示すように 5% XE-60 のカラムを用いた場合に各農薬の分離ならびに感度が最も良好であることが分かった。

本条件下での各農薬の保持時間ならびに最小検出量は Table 2 に掲げたとおりである。最も感度の良好なものは MTMC, MIPC, および BPMC の 3 種で最小検出量は 0.006~0.008 ng であり、最も感度が不良のものは NAC であり、その最小検出量は 0.15 ng であった。ま

Fig. 2. Time course of reaction of carbamate insecticides with trifluoroacetyl anhydride —○—, MTMC; —●—, CPMC; —△—, MPMC; —▲—, PHC; —×—, NAC.

Table 3. Peak Height of Trifluoroacetylcarbamates on ECD Gas Chromatogram

Carbamates	50°C, 3 hr						Room temp., overnight (18 hr)					
	Peak height (mm)					Average (σ) (mm)	Peak height (mm)					Average (σ) (mm)
MTMC	98	104	143	166	99	122.5 (± 28.66)	164	164	173	165	176	169.0 (± 5.77)
	101	105	143	166	100		165	163	176	167	177	
CPMC	52	55	76	84	51	63.7 (± 14.24)	72	72	77	72	78	74.3 (± 3.23)
	53	55	74	85	52		72	71	78	72	79	
MPMC	44	47	63	71	44	54.2 (± 11.63)	70	70	74	70	74	71.8 (± 2.20)
	46	47	63	72	45		71	69	74	71	75	
PHC	50	54	73	84	50	62.7 (± 14.42)	95	94	100	96	102	97.6 (± 3.75)
	52	55	73	85	51		95	93	102	96	103	
NAC	33	38	52	59	38	44.8 (± 10.34)	65	66	70	67	71	68.4 (± 3.10)
	36	39	53	61	39		67	65	73	67	73	

σ , standard deviation; column, 2% OV-225 (2 m); column temp., 170°C; inject. and detector temp., 250°C; carrier gas, N_2 1.2 kg/cm²; sensitivity, 10^2 M Ω ; range, 16×10^{-2} V.

Fig. 3. Elution pattern of organochlorine insecticides in column chromatography on alumina. Organochlorine insecticides were eluted with ether-*n*-hexane (6 : 94).

Hexane solution (1 ml) containing γ -BHC, aldrin (0.15 μ g, respectively), β -BHC, dieldrin, endrin (0.30 μ g, respectively), *pp'*-DDT (0.60 μ g) and dicofol (1.50 μ g) was added to alumina column.

Fig. 4. Elution pattern of carbamate insecticides in column chromatography on alumina.

Carbamate insecticides were eluted with acetone-*n*-hexane (10 : 90) after elution with ether-*n*-hexane (6 : 94) (100 ml).

Hexane solution (1 ml) containing MTMC, CPMC, MPMC, PHC (5 μ g, respectively) and NAC (10 μ g) was added to alumina column.

た, CPMC, MPMC, PHC, および XMC は中間の感度で, 最小検出量は 0.01~0.02 ng であった.

APC については, 標準品のトリフルオロアセチル誘導体のピークが同一条件下では観察されず, この点に関しては目下検討中である.

2. トリフルオロアセチル化の反応条件

カーバメート剤のトリフルオロアセチル化の反応温度を上げることにより反応が促進され, それに応じて反応時間を短縮することができると考えられるが, 他方では反応中にカーバメート剤自身あるいはトリフルオロアセチル誘導体が分解することもあると考えられる. そこで, 5 種のカーバメート剤を代表的に選んで室温で一晩(18時間)反応させた場合と, 50° で 3 時間反応させた場合とについてそれぞれのトリフルオロアセチル誘導体の ECD ガスクロマトグラム上のピーク高を比較検討した. 結果は Table 3 から明らかのように, 50° で 3 時間反応させた場合にはピーク高のバラツキが大きく, しかもトリフルオロアセチル体の生成率が全般的に室温で一晩反応させ

Table 4. Recovery of Added Organochlorine and Carbamate Insecticides Eluted from Alumina Column

Organochlorines	Addition (μ g)	Recovery (σ) (%)	Carbamates	Addition (μ g)	Recovery (σ) (%)
β -BHC	0.30	103.2 (± 2.39)	MTMC	5.0	105.6 (± 2.19)
γ -BHC	0.15	101.8 (± 3.35)	CPMC	5.0	98.8 (± 2.17)
<i>pp'</i> -DDT	0.60	104.6 (± 4.62)	MPMC	5.0	107.2 (± 1.64)
Aldrin	0.15	94.0 (± 2.92)	PHC	5.0	91.4 (± 0.89)
Dieldrin	0.30	91.0 (± 2.24)	NAC	10.0	99.2 (± 1.92)
Endrin	0.30	104.2 (± 3.77)			
Dicofol	1.50	104.6 (± 4.28)			

σ , standard deviation.

Recovery is the average of 5 samples.

Organochlorine insecticides were eluted with ether-*n*-hexane (6 : 94) (100 ml) and then carbamates were eluted with acetone-*n*-hexane (19 : 90) (50 ml).

た場合よりも低い傾向が認められた。今回の実験で室温を一定温度に設定しなかったのは、カーバメート剤の残留分析を日常的な業務として行う際に恒温槽などの装置を何ら必要とせず操作を簡便にしたいという理由からである。

また、反応時間によって誘導体生成率が変動することが考えられるが、反応の経時変化を検討したところ、Fig. 2 に示されるように反応時間が16時間以上経過すると、いずれのカーバメート剤についてもトリフルオロアセチル体のピーク高はほぼ平衡に達していることが分かった。したがって以後の実験においては午後に反応を開始して翌朝反応を停止させることにして、反応時間は操作の都合を考慮してその都度16~18時間の間の適当な時間とした。

3. アルミナカラムクロマトグラフィー

カーバメート剤のカーバモイル基をトリフルオロアセチル化して ECD ガスクロマトグラフィーを行う分析法としては Lau ら⁴⁾ および金沢⁷⁾ による報告があるが、前者は Landrin (3,4,5-trimethylphenyl *N*-methylcarbamate) についてのみに応用したものであり、また彼らの方法は試料の抽出液に共存すると考えられる有機塩素剤を分離除去する操作を行っていない。現在我が国において生産される野菜・果実・食肉魚介類などの生鮮食品には程度の差こそあれ、BHC, DDT などの有機塩素農薬が残留している事実を考慮するならば、食品中のカーバメート剤の残留分析を行うに当たっては、ECD ガスクロマトグラフィーによる分析を妨害すると考えられる共存する有機塩素農薬を分析の過程のある段階において分離除去する必要がある。そこで、今回の実験においてはアルミナカラムクロマトグラフィーを検討した。

アルミナカラムに有機塩素剤標準溶液あるいはカーバメート剤標準溶液 B を 1 ml 添加して両者の分離状況ならびに回収率を検討したところ、Fig. 3, 4, および Table 4 に示すように有機塩素剤はエーテル・*n*-ヘキサン (6:94) による溶出分画 (100 ml) に、またカーバメート剤はアセトン・*n*-ヘキサン (10:90) による溶出分画 (50 ml) にそれぞれほとんど完全に回収されることが見いだされた。

4. *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配

各種カーバメート剤について脂肪含有試料において広く応用されている *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配法を検討した。結果は Table 5 に掲げたようにカーバメート剤の回収率は93~103%の範囲の良好な値が得られ、*n*-ヘキサン・アセトニトリル分配による脂肪除去法はカーバメート剤の残留分析においても十分に応用できるものと考えられる。

5. 添加回収実験

前述までの実験結果を基にして、実験方法の項にあるような玄米におけるカーバメート剤の残留分析法を組み

Table 5. Recovery of Carbamate Insecticides in *n*-Hexane-Acetonitrile Partition Extraction

Carbamates	Addition (μg)	Recovery (σ) (%)
MTMC	5.0	103.2 (±3.77)
CPMC	5.0	98.6 (±6.54)
MPMC	5.0	93.6 (±4.33)
PHC	5.0	92.0 (±3.67)
NAC	10.0	100.8 (±6.18)

σ, standard deviation.

Recovery is the average of 5 samples.

Carbamate insecticides were extracted twice with acetonitrile (40 ml) from *n*-hexane solution (20 ml).

Table 6. Recovery of Carbamate Insecticides Added to Powdered Unpolished Rice

Carbamates	Addition (μg)	Recovery (σ) (%)
MTMC	10.0	99.4 (±2.79)
MIPC	10.0	100.0 (±2.59)
XMC	20.0	99.2 (±3.19)
CPMC	20.0	86.0 (±6.93)
BPMC	10.0	99.8 (±2.76)
MPMC	20.0	95.4 (±2.70)
PHC	20.0	97.4 (±3.13)
NAC	20.0	108.2 (±12.75)

σ, standard deviation.

Recovery is the average of 5 samples.

Acetone solution (5 ml) containing 8 carbamate insecticides was added to the powdered sample (50 g) of unpolished rice powder.

立てて、同法に従って玄米の粉末試料 50 g にカーバメート剤標準溶液 C 5 ml (0.2~0.4 ppm 相当量) を添加した場合の最終的な回収実験を検討した結果は Table 6 に掲げたとおりである。CPMC の 86% から NAC の 108% の範囲のほぼ満足すべき回収率が得られた。

以上述べたように、本法は我が国で現在登録済の 9 種のカーバメート剤のうち、BPMC, CPMC, MPMC, MTMC, MIPC, PHC, XMC, および NAC の 8 種について、玄米における残留分析法として十分実用に供し得る方法であると考えられる。また、本法に準じて大豆その他の比較的脂肪含有率の高い農作物についても応用できるものと考えられる。

結 論

食品中の残留農薬分析法の研究の一環として、現在我が国で登録されているカーバメート剤をいっせいに分析

する方法を確立するために、無水トリフルオロ酢酸を用いてカーバメート剤を直接トリフルオロアセチル誘導体とし、生成した誘導体の ECD ガスクロマトグラフィーによる分析法を検討した。

1) カーバメート剤のトリフルオロアセチル誘導体の ECD ガスクロマトグラフィーにおいては、今回検討した分析条件下では、MTMC, MIPC, BPMC の 3 種が高感度グループで、最小検出量は 0.006~0.008 ng であった。NAC は低感度で、最小検出量は 0.15 ng であった。また、CPMC, MPMC, PHC, XMC は中間の感度のグループで、最小検出量は 0.01~0.02 ng であった。

2) カーバメート剤と無水トリフルオロ酢酸との反応は生成物の ECD ガスクロマトグラフィーにおける感度ならびにピーク高のバラツキの点からも、加温して短時間で行うよりもむしろ室温に長時間 (約18時間) 放置して行う方が適当であると考えられる。

3) 玄米中のカーバメート剤の残留分析を行うに当たり、抽出液の精製法としては、脂肪分を除去するには *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配を行い、また共存する有機塩素農薬を除去するにはアルミナカラムクロマトグラフィーを行うのが妥当であると考えられる。

4) 今回考案したカーバメート剤の残留分析法を玄米試料について適用し、添加回収実験を行った結果では、

CPMC の86%から NAC の108%までのほぼ良好な回収率を示し、本法が十分に実用に供し得る分析法であると考えられる。

終わりに、本研究に当たりカーバメート剤を提供された農薬工業会ならびに関係農薬メーカー各位に感謝の意を表します。

本研究の一部は昭和47年度厚生科学研究費により行った。

なお、本研究の概要は日本食品衛生学会第26回学術講演会 (昭和48年11月、名古屋市) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省告示第 2 号, 第 3 号 (昭和 48 年 1 月 10 日)。
- 2) 厚生省告示第 177 号 (昭和 47 年 5 月 31 日)。
- 3) 武田明治, 関田 寛, 大槻久美子, 高松千賀子, 田辺弘也: 食衛誌, **14**, 467 (1973)。
- 4) Lau, S. C., Marxmiller, R. L.: J. Agr. Food Chem., **18**, 413 (1970)。
- 5) Argauer, R. L.: *ibid.*, **17**, 888 (1969)。
- 6) Butler, L. I., McDonough, L. M.: *ibid.*, **16**, 403 (1968)。
- 7) 金沢 純: 日本分析化学会 第 20 年会 講演要旨集, B 148 (1970)。