ノート

農産物中のネオニコチノイド系殺虫剤ニテンピラム
及びその代謝物の分析

(平成9年9月1日受理)

津村ゆかり^{*1} 中村優美子^{*1} 外海泰秀^{*1}
柿本芳久^{*2} 田中雄三^{*3} 柴田正^{*1}Determination of Neonicotinoid Pesticide
Nitenpyram and Its Metabolites in Agricultural ProductsYukari TSUMURA^{*1}, Yumiko NAKAMURA^{*1}, Yasuhide TONOGAI^{*1}, Yoshihisa KAKIMOTO^{*2},
Yuzo TANAKA^{*3} and Tadashi SHIBATA^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; ^{*2}Kobe Center for Quality Control and Consumer Service: 1-4, Onohama, Chuo-ku, Kobe 651-0082, Japan; ^{*3}Osaka University of Pharmaceutical Science: 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1041, Japan)

An analytical method for the neonicotinoid pesticide nitenpyram and its metabolites CPMA and CPMF was investigated. Agricultural products were extracted with acetone followed by re-extraction using an Extrelut[®] column and purification by silica gel column chromatography. CPMA and CPMF were so unstable that they were derived to a more stable compound, CPF, prior to re-extraction. It was necessary to remove acetone from the extract before reaction of CPMF, because a by-product was found and the recovery of CPF decreased in the presence of acetone. Nitenpyram was determined using HPLC, and CPF, using GC-FTD. Recoveries from fruits, vegetables, rice and tea were 66~85% for nitenpyram (0.2~0.8 ppm added), and 64~120% for metabolites (0.5~2.0 ppm added), except for CPMA in tea. Detection limits were 0.0025~0.01 ppm for nitenpyram, and 0.025~0.1 ppm for metabolites.

(Received September 1, 1997)

Key words: ニテンピラム nitenpyram; 代謝物 metabolite; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; ガスクロマトグラフィー (FTD) GC-FTD; 農薬 pesticide; 農産物 agricultural product; エクストレルート Extrelut[®]; ボンドエルート SCX Bond Elut[®] SCX

緒言

ニテンピラムは平成7年に環境庁より登録保留基準が告示¹⁾されたネオニコチノイド系殺虫剤である。タバコ葉からとれるニコチンは古くから使用されてきた天然殺虫剤であるが、殺虫スペクトルはアブラムシ等に限られ、工業的に実施できる合成法もないため、今日使用が

少なくなっている²⁾。しかし、ネオニコチノイド系殺虫剤は、ニコチンに類似した作用機序を持ちながら、ニコチンより昆虫への浸透性が高く、ほ乳類への毒性が低い^{3)~6)}ため、今後の利用の拡大が予想される^{3)~6)}。ニテンピラムは、米、ばれいしょをはじめとした農産物に0.2~10 ppmの残留基準値が平成9年9月に厚生省から告示される見込みである。化学構造式をFig. 1に示した。

ニテンピラムは自然条件において2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸(以下CPMAという)及びN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン(以下CPMFと

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所: 〒540-0006 大阪市中央区法円坂1-1-43

^{*2} 神戸農林水産消費技術センター: 〒651-0082 神戸市中央区小野浜町1-4

^{*3} 大阪薬科大学: 〒569-1041 大阪府高槻市奈佐原4-20-1

Fig. 1. Chemical structures of nitenpyram and its metabolites

いう)の2種の代謝物を生じる (Fig. 1)。これらの代謝物は不安定で、分析操作中に分解することから、農薬登録保留基準の分析法ではこれらを *N*-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-*N*-エチルホルムアミド (以下 CPF という) に変換して測定することとしている。CPMA はアセトン中で加熱することによって CPMF に変換され、CPMF は更にアルカリ性水溶液中で CPF に変換される。CPF は自然条件下では生成せず、安定な化合物である。

登録保留基準の分析法では、ニテンピラムは HPLC で、CPF は GC で測定しているが、本報告においては、これらの同時抽出・測定を試みた。また、ジクロロメタンの廃液処理に伴う環境への悪影響を減らすため、別の溶媒で代替する方法についても検討した。結果的にはどちらも達成し得なかったが、ネオニコチノイド系農薬分析の参考になる若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 標準品

ニテンピラム：純度 99.9%；CPMA：10% 水溶液；CPMF：純度 96.2%；CPF：純度 97.7%

上記の標準品は、武田薬品工業(株)から供与された。各標準品約 20 mg を正確に量り採り、メタノールで希釈して 20 mL として標準溶液を調製した。

2. 試料

添加回収実験用の農産物は大阪市内の小売店で購入した。

3. 試薬

有機溶媒：残留農薬分析用；ケイソウ土：Celite 社製 Celite No. 545；エクストレルートカラム：内径 15 mm (米の場合は 20 mm)、長さ 300 mm のガラスカラムに、Merck 社製 Extrelut® 14 g を入れ、カラム管を叩いてよく詰まった状態にする；シリカゲル：Merck 社製 Kieselgel 60 粒子径 0.063~0.100 mm；スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤カラム：内径 15 mm、長さ 300 mm のガラスカラムに、三菱化学

(株)ダイイオン HP 20 20 mL をアセトンで充てんし、アセトン 50 mL、次いで水 200 mL を流し入れ、洗浄しておく；強酸性陽イオン交換シリカゲルミニカラム：Varian 社製 Bond Elut® SCX 3 cc/500 mg の上部に脱脂綿を詰め、アセトン 5 mL を流し入れ、洗浄しておく。

4. 試験溶液の調製

Scheme 1 及び 2 に試験溶液調製方法を示した。

5. HPLC 及び GC 条件

Table 1 に示した。

6. 検量線用溶液

ニテンピラムは HPLC の移動相で、CPF はアセトンで標準溶液をそれぞれ希釈して、0.1~2 µg/mL の検量線用溶液を調製した。

7. 添加回収実験

野菜・果実は 20 g、米は 10 g、抹茶は 5 g、抹茶以外の茶の浸出液は 360 mL に対し、ニテンピラムは 4 µg/mL 水溶液を、CPMA 及び CPMF は 10 µg/mL 水溶液を各 1 mL、抽出開始の 1 時間前に添加した。

結果及び考察

1. ニテンピラム及び代謝物のクロマトグラフィー条件

ニテンピラムと代謝物の UV スペクトルを測定した結果、4 化合物とも極大吸収波長は 268~270 nm の範囲内であり、単一の波長で検出が可能であった。極大吸収波長における吸光度はニテンピラムが最大で、最小の CPMA の約 3 倍であった。HPLC におけるニテンピラム、CPMA、CPMF の保持時間はそれぞれ 9.2 分、7.9 分、5.3 分であった。CPF は溶出が遅く、他の 3 化合物とは異なる分離条件 (移動相は 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム-メタノール 7:3) を用いる必要があった。ニテンピラムの検出限界は 0.01 µg/mL (S/N > 3) であった。

GC においては、ニテンピラム、CPMA、CPMF は全く検出されなかった。極性が高いために溶出しなかつた。

Scheme 1. Preparation of test solution for nitenpyram

熱分解して検出されないものと考えられる。CPF は GC で良好に測定でき、その検出限界は 0.1 µg/mL (S/N > 3) であった。

以上の結果より、GC を用いれば CPF のみが、HPLC を用いれば 4 化合物すべてが検出できることが分かった。

2. アセトン共存時の安定性

CPMA はアセトン共存下で容易に CPMF に変化する とされる*4。エバポレーターによる通常の減圧濃縮において、この変化がどの程度の割合で起こるのか検討した。

*4 私信

Scheme 2. Preparation of test solution for CPMA and CPMF

CPMA 10 μ g を蒸留水 20 mL 及びアセトン 150 mL で希釈してロータリーエバポレーターにて濃縮したところ、80.4%がCPMFに変化し、CPMAとして検出されたのは9.0%に過ぎなかった。したがって、試料中のCPMAとCPMFを分別定量するのは困難と考えられた。しかし、ニテンピラムとCPMF（分析中にCPMAから変化したCPMFも含む）の分別定量が可能ではないかと考え、以下の検討を行った。

3. 液々抽出の検討

ニテンピラムとCPMFを液々抽出することを試みた。Table 2に、各化合物の食塩水からの抽出率を示した。酢酸エチルによって良好に抽出できたのはCPFのみであり、ニテンピラム、CPMA、CPMFはほとんど回収されなかった。ニテンピラムは酢酸エチル抽出後の水層をジクロロメタンで再度抽出しても回収されなかったことから、酢酸エチルとの相互作用により他の化合物に変化している可能性がある。

次にジクロロメタンで抽出することを試みたが、ニテンピラムは88.8%抽出されたものの、CPMFは全く回収されなかった (Table 2)。以上のことより、液々抽出でニテンピラムとCPMFを同時に回収することはできないと考えられた。また、ニテンピラムの抽出溶媒としてはジクロロメタンが適当であり、3回の抽出が必要であるため、その使用量は200 mL程度になった。

4. エクストレルート抽出の検討

ニテンピラムと代謝物をエクストレルートで同時に抽出することを試みた。エーテル又は酢酸エチルを用いてニテンピラムの溶出条件を検討したところ、最高でも80%台の回収率であり、単過程の回収率として満足できる値ではなかった。したがって、*n*-ヘキサン 50 mL及び50%エーテル-*n*-ヘキサン 50 mLで洗浄し、ジクロロメタン 50 mLで溶出する条件が回収率96.3%で最適と考えられた。液々分配では200 mLのジクロロメタンを使用するのに対し、エクストレルート抽出は50 mLで溶出されるため、より望ましいと考えられた。なお、開封後数か月を経たジクロロメタンを使用した場合、回収率が低く、変動が大きかった。ジクロロメタンから酸化等によって生じた物質がニテンピラムと反応するものと考えられる。ジクロロメタンは開封後速やかに使用する必要がある。

CPMFの回収率は種々の溶出条件において40~70%にとどまり、エクストレルートを用いてもニテンピラムとCPMFの同時抽出はできないと判断された。

一方、CPFは*n*-ヘキサン 50 mLで洗浄し、エーテル 50 mLで溶出したとき95.6%の回収率が得られた。

エクストレルートを充てんするカラムは、厚生省告示分析法で標準的に使用されている内径15 mmのガラス管を用いた。ただし米を試料とした場合はカラムの目詰まりが起こったため、内径20 mmの管を用いた。

5. シリカゲルカラムによる精製の検討

登録保留基準の分析法では精製に市販のシリカゲルミニカラムが用いられているが、厚生省の告示法においては、ロット間のばらつきの影響を避けるためオープンカ

ラムが主に採用されている。また、エクストレルートカラムからの流出液を減圧濃縮しないで通過させる場合には、溶媒の負荷量が多くても扱いやすいオープンカラムの方が有利と考えられるので、本法においてもオープンカラムを採用した。

ニテンピラムはシリカゲルカラムによる精製において①ジクロロメタン 50 mL、②50%アセトン-ジクロロメタン 50 mL、③アセトン 50 mLの溶出条件を用いれば、③の画分に溶出し、回収率99.7%であった。CPFは①エーテル 50 mL、⑤20%アセトン-*n*-ヘキサン 50 mL、③アセトン 50 mLの溶出条件が最適で、③の画分に90.5%回収された。

Table 1. Conditions of HPLC and GC

HPLC
System controller: Shimadzu SCL-10A
Detection: 270 nm Abs.
Column oven temperature: 40°C
Column: Shimadzu Shim-pack HRC-ODS (4.6 mm i.d. × 15 cm)
Guard column: Shimadzu Shim-pack GHRC-ODS (4.0 mm i.d. × 1.0 cm)
Mobile phase: 0.05 mol/L KH ₂ PO ₄ -methanol (17:3) 1.0 mL/min
Injection volume: 20 µL
GC-FTD
Gas chromatograph: Shimadzu GC-14A (FTD)
Column oven temperature: 50°C (2 min)→(10°C/min)→250°C
Detector and injection port: 270°C
Column: J&W DB-17 (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm film thickness)
Carrier gas: helium 1.2 kg/m ²
Injection volume: 1 µL
Insert: Shimadzu (for splitless injection, silan coated)

Table 2. Recoveries of Nitenpyram and Its Metabolites by Solvent Extraction

Extraction	Volume	Nitenpyram		CPMA	CPMF		CPF
		AcOEt ^{a)}	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	AcOEt
First extraction	100 mL	12.0	73.9	ND	4.0	ND	85.3
Second extraction	50 mL	ND	11.4	ND	ND	ND	5.2
Third extraction	50 mL	ND	3.5	ND	ND	ND	ND
Total		12.0	88.8	ND	4.0	0	90.5

Ten µg of nitenpyram or metabolites was diluted with 100 mL of 10% NaCl solution, extracted with solvent three times. Each compound was detected by HPLC.

^{a)}AcOEt: ethyl acetate; The aqueous layer after extraction with ethyl acetate was re-extracted with dichloromethane. No nitenpyram was detected in the extract.

6. 変換反応の条件

CPMA から CPMF を導く反応はアセトン溶液中で行うが、CPMF から更に CPF を導く反応におけるアセトンの影響を調べた。CPF の水溶液に種々の量のアセトンを加えて反応を行ったところ、Fig. 2 に示したとおり、アセトンが混入する量が多いほど CPF の生成率が低下した。その際、HPLC のクロマトグラム上に CPF より保持時間の短い副生成物が見られた。これはアセトンを加えない場合にも生成したが、20% のアセトンを加えると生成量は 364 倍に増加した。すなわち、アセトンが混在することによって別の化合物が生成するため CPF の生成率が低くなると考えられた。CPMF の誘導反応の後には、冷却管から液滴が落下しなくなるまで減圧濃縮して、アセトンを除去する必要があった。な

Fig. 2. Effect of acetone on the production of CPF from CPMF

Bars indicate the production of CPF and dots indicate the relative amount of by-product compared to production without acetone. Ten μg of CPMF was added to 10 mL of water, and treated to produce CPF. Each value is average of two trials.

お、ニテンピラムを同条件下で処理しても、CPF は全く生成しなかった。したがって、ニテンピラムと代謝物を別個に定量して合算することに問題はないと考えられた。

7. HPLC による CPF 測定を試み

上記の検討より、Scheme 1 及び 2 に示したとおり、エクストレール抽出とシリカゲルカラムによる精製を組み合わせた試験溶液調製法を作成した。ニテンピラムは GC では測定できないが、CPF は GC 並びに HPLC で測定できるため、CPF の試験溶液を HPLC で測定することを試みた。農産物の中で比較的妨害ピークが少ないとされるりんご、きゅうり、ぶどうの抽出液で検討したが、いずれにおいても CPF の保持時間に相当する妨害ピークが見られた。これに対して GC では問題になる妨害ピークがなかったため、CPF は GC で定量することとした。

8. 抹茶及び茶の精製

抹茶を果実・野菜と同様の方法でアセトン抽出した後エクストレール抽出したところ、カラムが目詰まりして溶媒が流出しなかった。そこでジクロロメタンを用いて液々抽出したが、試験液の HPLC クロマトグラムには大きな妨害ピークが出現して定量不能であった。従来茶のタンニン除去に繁用されている酢酸鉛法⁷⁾も試みたが、妨害ピークの除去は十分でなく、回収率も 39.3% にとどまった。これらのことから、登録保留基準の分析法と同様に、スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤と強酸性陽イオン交換シリカゲルミニカラム (SCX) を用いて精製を行った後に、エクストレール抽出及びシリカゲルカラム精製をしたところ、良好なクロマトグラムが得られた。

SCX ミニカラムにアセトン溶液を通過させる過程は非常に長時間を要したが、カートリッジの上部に脱脂綿を詰めると、通過が速くなった。スチレンジビニルベン

Table 3. Recovery (%) of Nitenpyram and Its Metabolites from Agricultural Products

Products	Nitenpyram ^{a)}		Metabolites ^{b)}		
	Added ($\mu\text{g/g}$)	Average $\pm$ SD	Added ($\mu\text{g/g}$)	CPMA	CPMF
Apple	0.2	77.0 $\pm$ 2.1	0.5	89.9	89.4
Cucumber	0.2	71.3 $\pm$ 5.6	0.5	78.2	84.0
Grape	0.2	75.3 $\pm$ 7.6	0.5	74.3	76.3
Japanese radish (leaf)	0.2	70.9 $\pm$ 2.5	0.5	120.2	97.7
Japanese radish (root)	0.2	73.3 $\pm$ 0.8	0.5	88.9	87.7
Potato	0.2	72.8 $\pm$ 9.1	0.5	73.4	85.5
Rice (brown)	0.4	84.8 $\pm$ 5.3	1.0	64.3	76.6
Tea (leaf)	0.67	71.7 $\pm$ 3.2	1.67	27.9	73.5
Tea (powder)	0.8	66.4 $\pm$ 5.1	2.0	37.0	90.4
Tomato	0.2	79.4 $\pm$ 1.5	0.5	80.4	84.6

^{a)} Average of three trials

^{b)} Average of two trials

Fig. 3. HPLC chromatograms of nitenpyram and test solution

The arrows indicate retention time of nitenpyram. Chromatographic conditions are shown in Table 1.

ゼン共重合体吸着剤と SCX による精製においては、流出速度が速すぎると回収率が低下する傾向があり、それぞれ 5 mL/min 及び 3 mL/min 程度に調節することで良好な回収率が得られた。

抹茶及び茶中の CPMA は回収率が低く、25～40%程度であった。キャプタンなどの農薬は植物成分によって分析操作中に分解し、抽出条件を酸性にすることで分解を回避できるとされている⁸⁾。しかし CPMA は酸性条件でも低回収率であり、スチレンジニルベンゼン共重合体吸着剤カラムの段階で CPMA が失われるのではないかと疑われた。しかしこの過程の回収率は 88.6%と良好であった。したがって、CPMA の回収率が低い原因は、熱処理を経ても残る茶の成分が CPMA への反応を阻害するのではないかと考えた。本法によって抹茶又は茶より CPF が検出された場合は、残留物が CPMA とすれば低めの値が出ることを考慮して分析値を評価する必要がある。

Fig. 4. GC chromatograms of CPF and test solution

The arrows indicate retention time of CPF. Chromatographic conditions are shown in Table 1.

9. 添加回収実験

この試験法による各作物の添加回収実験の結果を Table 3 に示した。抹茶及び茶中の CPMA を除いて良好な回収率が得られた。抽出液の代表的なクロマトグラムを Fig.3 及び 4 に示した。大根（根、葉）、せん茶、抹茶は HPLC においても GC においても妨害ピークが多かったが、定量には差し支えなかった。本法の検出限界は、ニテンピラムが果実及び野菜で 0.0025 µg/g、米で 0.005 µg/g、茶及び抹茶で 0.01 µg/g、CPMA 及び CPMF は果実及び野菜で 0.025 µg/g、米で 0.05 µg/g、茶及び抹茶で 0.1 µg/g であった。ニテンピラムの確認はフォトダイオードアレイ検出 HPLC で行うが、極大吸収波長は 270.0 nm であった。CPF の確認は GC/MS（電子衝撃法、イオン源温度 250℃）で行い、*m/z* 198（分子イオンピーク）、126（ベースピーク）、169, 141 が特徴的なピークであった。

ま と め

ネオニコチノイド系殺虫剤ニテンピラム及びその代謝

物の分析法を検討し、若干の知見を得た。

1. ジクロロメタンを用いないでニテンピラムを分析することを試みたが、回収率が低いため、不可能であった。

2. CPMF から CPF を導く反応において、アセトンが存在すると回収率が低下することを見いだした。

3. 登録保留基準の分析法で用いられているシリカゲルミニカラムに替えてオープンカラムを採用した。

4. ニテンピラムと CPF を HPLC で同時分析することを試みたが、CPF は妨害があるため GC で測定する必要があった。

文 献

- 1) 環境庁長官告示：“作物残留に係る農薬の登録保留基準を改正する件”平成7年11月28日、環第73号(1995)。

- 2) 富澤元博：農薬誌. **19**, S229～S240 (1994).
3) Yamamoto, I., Yabuta, G., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Kagabu, S.: 同上 **20**, 33～40 (1995).
4) Tomizawa, M., Otsuka, H., Miyamoto, T., Eldefrawi, M. E., Yamamoto, I.: 同上 **20**, 57～64 (1995).
5) Tomizawa, M., Otsuka, H., Miyamoto, T., Yamamoto, I.: 同上 **20**, 49～56 (1995).
6) Minamida, I., Iwanaga, K., Tabuchi, T., Aoki, I., Fusaka, T., Ishizuka, H., Okauchi, T.: 同上 **18**, 41～48 (1993).
7) 小野田恭久, 今村昌子: 同上 **5**, 101～105 (1980).
8) 農薬残留分析法研究班編：“最新農薬の残留分析法” p. 103 (1995) 中央法規出版。