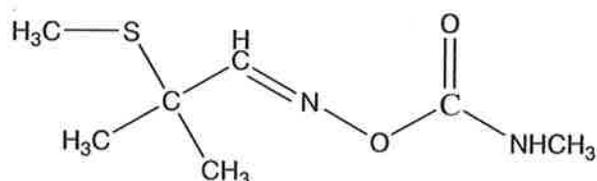


2-メチル-2-メチルチオピロピオンアルデヒド-*o*-メチルカルバモイルオキシム
(アルディカーブ)と

3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素 (ジウロン、DCMU)

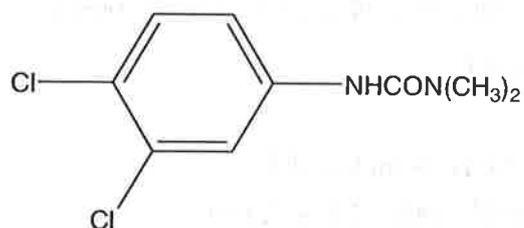
【対象物質の構造】



2-メチル-2-メチルチオピロピオンアルデヒド-*o*-メチルカルバモイルオキシム

(別名:アルディカーブ)

CAS 番号 116-06-03



3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素(別名:ジウロン)

CAS 番号 330-54-1

図 1 対象物質の構造

【物理化学的性状】

物質名	分子量	融点(°C)	蒸気圧(mPa)	水溶解度(mg/L)	LogPow
アルディカーブ	190.3	99~100	13 (20°C)	6000 (25°C)	1.13 ³⁾
ジウロン	233.1	158~159	0.41 (50°C)	42 (25°C)	2.6~2.96 ⁴⁾

【毒性、用途等】

アルディカーブ

毒性情報 : ラット(経口 LD₅₀) 0.65 mg/kg

極めて毒性が強く、ヒト変異原性あり

用途 : 殺虫剤、防虫剤

ジウロン

毒性情報 : ラット(経口 LD₅₀) 1017 mg / kg

用途 : 除草剤

§1 分析法

(1) 分析法概要

生物試料は約 10 g を用い、ホモジナイザーによるメタノール抽出を行う。メタノール抽出液は、ヘキサンと水を加え、ヘキサン/メタノール分配を行って洗浄する。その後、ジクロロメタンで液/液抽出を行う。脱水した抽出液を濃縮後、シリカゲルカートリッジを用いてクリーンアップを行う。精製後の試料は濃縮し、アセトニトリル/水へ転溶してから LC/MS-SIM 法で定量を行う。

(2) 試薬・器具

【試薬】

2-Methyl-2-(methylthio) propionaldehyde O-[(methylcarbamoyl) oxime (Aldicarb)

: Dr. Ehrenstorfer (純度 98.5%)

Aldicarb- d_3 : Dr. Ehrenstorfer (100 mg/L)

3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (ジウロン) : 関東化学株式会社 (純度 99%)

Diuron- d_6 (dimethyl D6) : Dr. Ehrenstorfer (100 mg/L)

アセトニトリル : 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用

固相カートリッジ LC-Si glass tube PTFE Frits 充填量 1g : Supelco 社製

メタノール、ヘキサン、ジクロロメタン : 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮保障)

【試薬の安定性・毒性】

アルディカーブは毒性が非常に強く、ヒト変異原性があるので暴露されないように注意する。

アルディカーブは酸化条件下では速やかに酸化されてスルホキシド体になり、徐々にスルホン体へと変化する。

【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、分液ロート、共栓付き遠沈管、丸底フラスコ、共栓付き試験管、ロータリーエバポレータ、ホモジナイザー

(3) 分析法

【試料の前処理及び試料液の調製】

〔生物試料〕

生物試料約 10 g を 50 mL 遠沈管に入れ、サロゲートとしてアルディカーブ- d_3 及びジウロン- d_6 混合溶液 (100 ng/mL、25%アセトニトリル溶液) を 100 μ L 添加する。これにメタノールを 15 mL 加えてホモジナイズを 5 分間行い、3000 rpm で 10 分間遠心分離したのち、メタノール層を分取する。この抽出操作を合計 2 回繰り返す、抽出液を合わせる。得られた抽出液は 5% 塩化ナトリウム水溶液 100 mL が入った 200 mL 分液ロートへ移し、ヘキサン 30 mL

を加え、10 分間振とうして静置する。下層(メタノールと水)を別の分液ロートに分取して再びヘキサン 30 mLを加えて同様な洗浄操作を行う。得られた水層を 200 mL 分液ロートに移し、ジクロロメタン 30 mLを加えて 10 分間振とうして、下層(ジクロロメタン)を分取する。この抽出操作を合計 2 回繰り返す、抽出液は合わせ、約 15 g の無水硫酸ナトリウムを入れた漏斗に通液して脱水を行う。約 60 mL の抽出液は浴温 30 °C のロータリーエバポレータで 1 mL 程度まで減圧濃縮する(注 1)。

濃縮後の試料は、LC-Si glass tube(注 2)でクリーンアップを行う。LC-Si glass tube はアセトン 10 mL、ジクロロメタン 10 mL でコンディショニングを行い、濃縮後の試料を負荷する。ジクロロメタン 10 mL をカラムに通し、この溶液は捨てる。続いてカラムに 10 mL 試験管の受けを設置し、10% アセトン/ジクロロメタン 10 mL を流して対象物質の溶出を行う。溶出液を窒素吹き付けにより 0.5 mL まで濃縮してからアセトニトリルを加え、さらに 0.5 mL まで窒素吹き付けにより濃縮する(注 1)。その後、精製水で 1 mL に定容して試料液とする。

【空試験液の調製】

【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し、得られた試料液を空試験液とする(注 3)。

【標準溶液の調製】

アルディカーブ及びジウロンを正確に秤取り、アセトニトリルに溶解して 1000 µg/mL の標準原液をそれぞれ調製する。標準原液を 25%アセトニトリル/水溶液で順次希釈し、0.1、1 及び 10 µg/mL の混合標準溶液を調製する。サロゲート混合溶液は、アルディカーブ-d₃、ジウロン-d₆ の各 100 µg/mL アセトン溶液を 25%アセトニトリル/水溶液で希釈、混合して、100 ng/mL の溶液を調製する。

検量線作成用標準混合溶液として、混合標準溶液を 25%アセトニトリル/水溶液で適宜希釈し、サロゲート濃度が 10 ng/mL となるように 100 ng/mL サロゲート混合溶液をそれぞれに 100µL 添加し、1~200 ng/mL アルディカーブ、ジウロン混合標準溶液 1 mL を調製する。

【測定】

[LC/MS 条件](注 4)

LC/MS 機種名 : Agilent 1100MSD

LC 機種 : Agilent 1100

カラム : Sumipax ODS K-05-2015 (2 mm×150 mm×5 µm)

移動相 : A : 0.1% HCOOH/H₂O B : CH₃CN

0 → 15min A:70 → 5

B:30 → 95 linear gradient

15 → 25min A:70 B:30 (post run)

流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 10 µL

MS機種 : Agilent MSD SL

キャピラリー電圧(V_{cap}) : 3000 V

ネブライザー : N₂(50psi)

ドラインガス流量及び温度 : N₂(10.0 L/min 200°C)

イオン化法 : ESI(+)-SIM

モニターイオンとフラグメンター電圧

測定対象物質	定量イオン		確認イオン	
	m/z	フラグメンター電圧	m/z	フラグメンター電圧
アルディカーブ	208	40	-	-
ジウロン	233	110	235	110
アルディカーブ-d ₃	211	30	-	-
ジウロン-d ₆	239	100	241	100

[検量線]

検量線作成用混合標準溶液 10 µL を LC/MS に注入し、対象物質とサロゲート(アルディカーブ-d₃、ジウロン-d₆)の濃度比とピーク面積比から検量線を作成する。

[定量]

試料液 10 µL を LC/MS に注入し、対象物質とサロゲートのピーク面積比から検量線より対象物質とサロゲートの濃度比を求め、次式により試料中対象物質の濃度を算出する。

[濃度の算出]

$$\text{生物試料中の濃度}(\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{検量線から求めた濃度比} \times \text{サロゲート添加量}(\text{ng})}{\text{分析試料量}(\text{g})}$$

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS (Agilent 1100 MSD SL) の IDL を下表に示す(注 5)。

物質	IDL (pg)	試料量 (g)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
アルディカーブ	0.62	10	1	0.0062
ジウロン	0.51	10	1	0.0051

〔測定方法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL)〕

本測定方法における検出下限及び定量下限を次に示す(注 6)。

物質	試料量 (g)	最終液量 (mL)	検出下限値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量下限値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
アルディカーブ	10	1	0.15	0.39
ジウロン	10	1	0.14	0.36

(注 1)

アルディカーブは揮発しやすいので濃縮操作により回収率が低下する。穏やかに濃縮操作を行い、乾固しないように注意する。

(注 2)

リザーバーがプラスチック製の固相抽出カートリッジからはジウロンの定量イオンである $m/z=233$ が検出されるのでガラス製のものを使用する。また、プラスチックからのブランクでは、確認イオンである $m/z=235$ は検出されない。図 2 にプラスチック製のリザーバーで、同様なクリーンアップ操作を空試験した場合のクロマトグラムを示す。

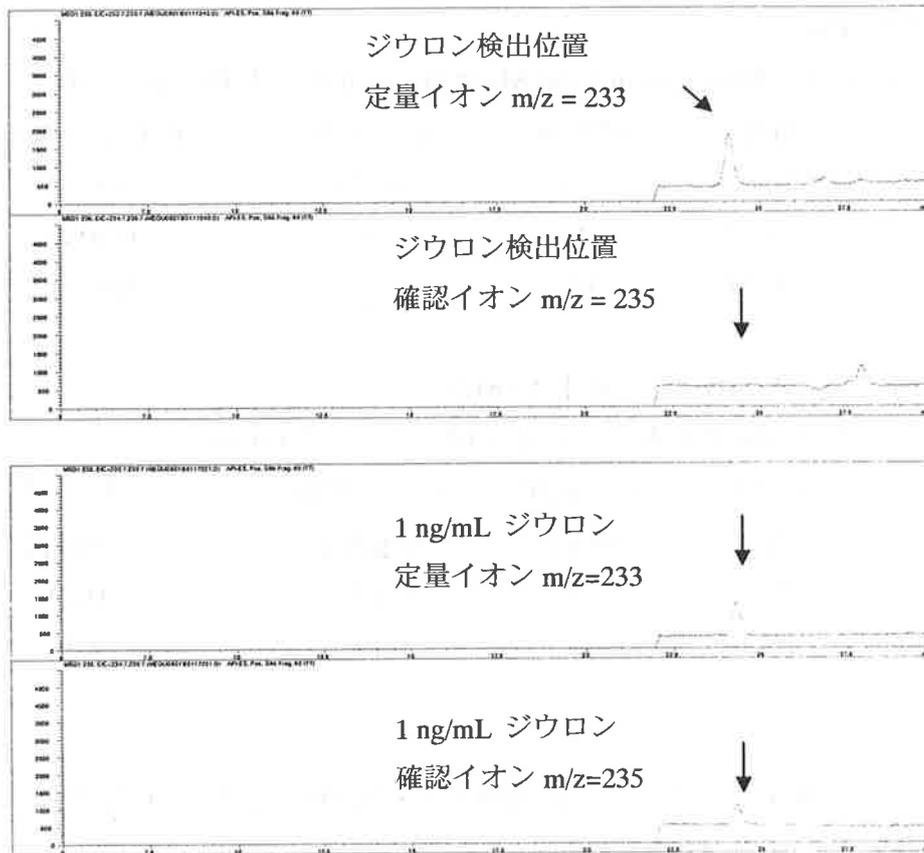


図2 プラスチックからのブランク(上)とジウロン(1 ng/mL)(下)の測定クロマトグラム
 注)内径が 5.0 mm の LC カラムを使用した測定のため、検出位置が他のクロマトグラムと異なっている。

(注 3)

検出下限以下であるが、前処理の操作ブランクとしてジウロンが検出されることがある。前処理操作中のコンタミネーションに注意する。また、(注 2)に示したように、プラスチック類からジウロンの定量イオンが溶出するので、前処理操作中は手袋等の樹脂からのコンタミネーションにも注意する。

(注 4)

LC/MS の条件は、本測定に使用した機種 (Agilent MSD SL) 特有のものである。

(注 5)

装置検出下限 (IDL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って、表 1 のとおり算出した。

(注 6)

測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 17 年 3 月)により、表 2 のとおり算出した。

表 1 装置検出下限(IDL)の算出(Agilent 1100LC/MSD SL)

物質名	アルディカーブ	ジウロン
試料量(g)	10	10
最終液量(mL)	1	1
注入濃度(ng/mL)	1	1
装置注入量(μL)	10	10
結果 1 (ng/mL)	1.008	1.008
結果 2 (ng/mL)	0.9991	1.026
結果 3 (ng/mL)	0.9947	1.032
結果 4 (ng/mL)	1.033	1.022
結果 5 (ng/mL)	1.006	1.014
結果 6 (ng/mL)	0.9827	1.005
結果 7 (ng/mL)	0.9878	0.9933
平均値 (ng/mL)	1.002	1.014
標準偏差	0.0164	0.0134
IDL(ng/mL)	0.062	0.051
IDL 試料換算値(μg/kg)	0.0062	0.0051
S/N	5.9	8.8
CV(%)	1.6	1.3

*IDL= $t(n-1, 0.05) \times s_{n-1} \times 2$

表 2 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出

物質名	アルディカーブ	ジウロン
試料量 (g)	10	10
添加量 (ng)	5	5
最終液量 (mL)	1	1
注入濃度 (ng/mL)	5	5
装置注入量 (μL)	10	10
操作ブランク平均(μg/kg)	N.D.	0.0250
無添加平均(μg/kg)	N.D.	0.0238
結果 1 (μg/kg)	0.5900	0.6259
結果 2 (μg/kg)	0.5540	0.6826
結果 3 (μg/kg)	0.6246	0.7199
結果 4 (μg/kg)	0.5251	0.7313
結果 5 (μg/kg)	0.6266	0.7245
結果 6 (μg/kg)	0.6065	0.7016
結果 7 (μg/kg)	0.5586	0.7091
平均値(μg/kg)	0.5836	0.6993
標準偏差	0.0388	0.0362
MDL(μg/kg)	0.15	0.14
MQL (μg/kg)	0.39	0.36
CV(%)	6.6	5.2

* MDL= $t(n-1, 0.05) \times s_{n-1} \times 2$

* MQL= $s_{n-1} \times 10$

- ①操作ブランク平均: 試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値
- ②無添加平均: MDL 算出用試料に標準溶液を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図3に示す。

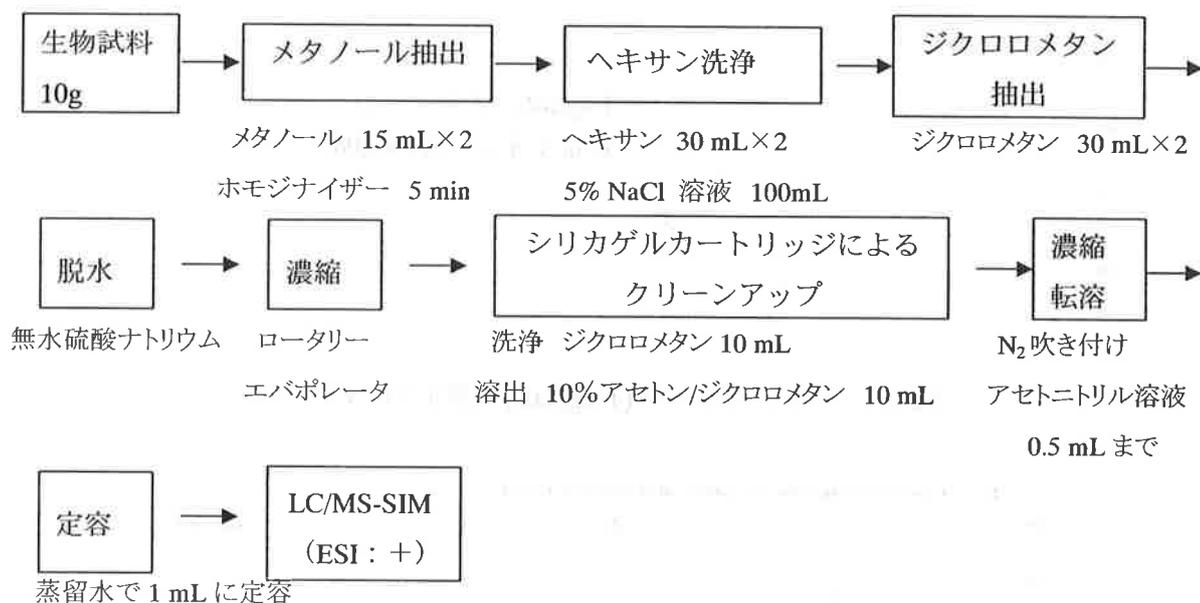


図3 分析フロー

〔検量線〕

アルディカーブとジウロンの検量線を図4～5に示す。なお、検量線作成に使用したアルディカーブとジウロンの標準溶液濃度は1～200 ng/mLである。

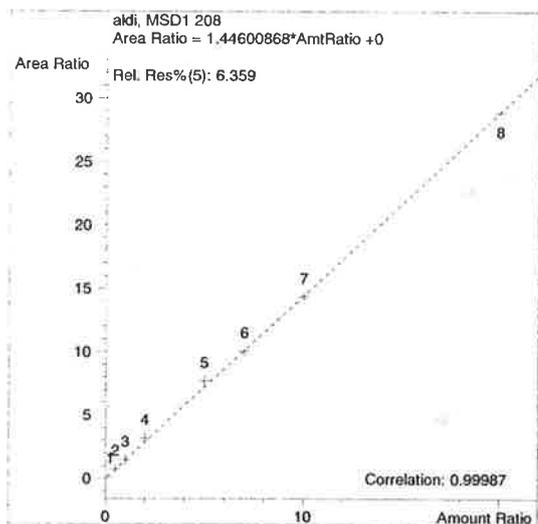


図4 アルディカーブ検量線

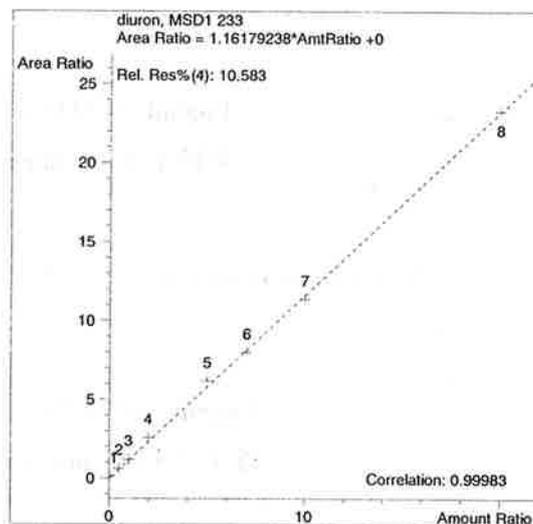


図5 ジウロン検量線

〔測定クロマトグラムとマススペクトル〕

アルディカーブとジウロンの測定クロマトグラム及びマススペクトルを図 6～7 に示し、サロゲートであるアルディカーブ-d₃ 及びジウロン-d₆ の測定クロマトグラムを図 8 に示す。

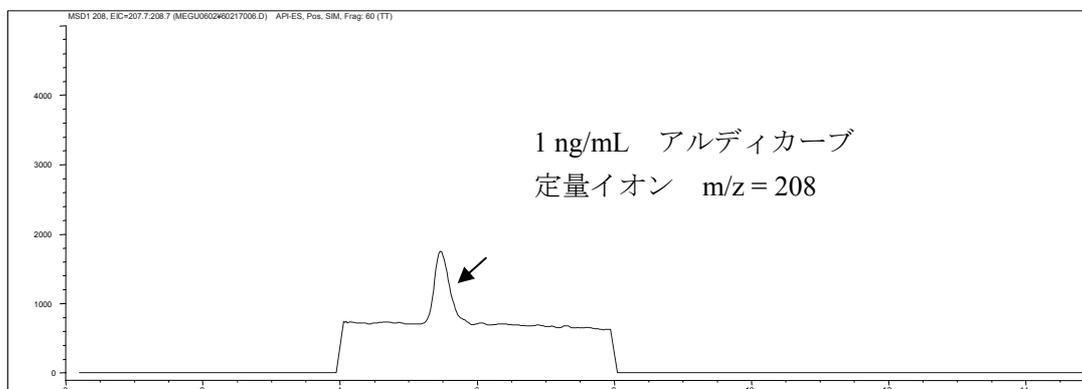


図 6-1 アルディカーブ(1 ng/mL)の測定クロマトグラム

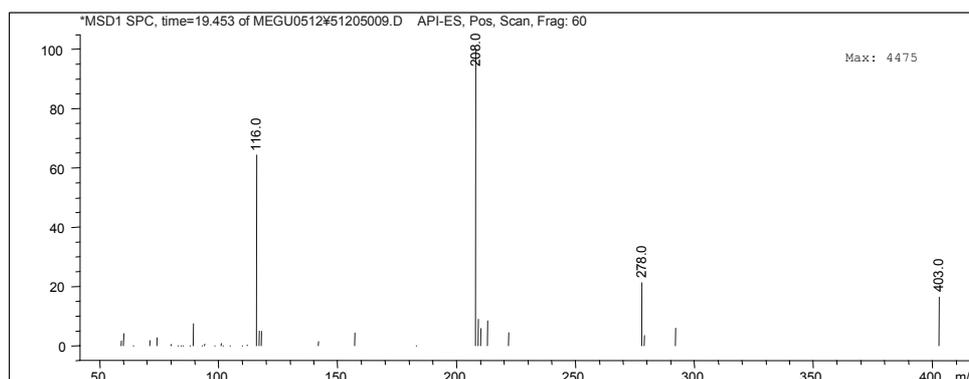


図 6-2 アルディカーブ(10 µg/mL)のマススペクトル

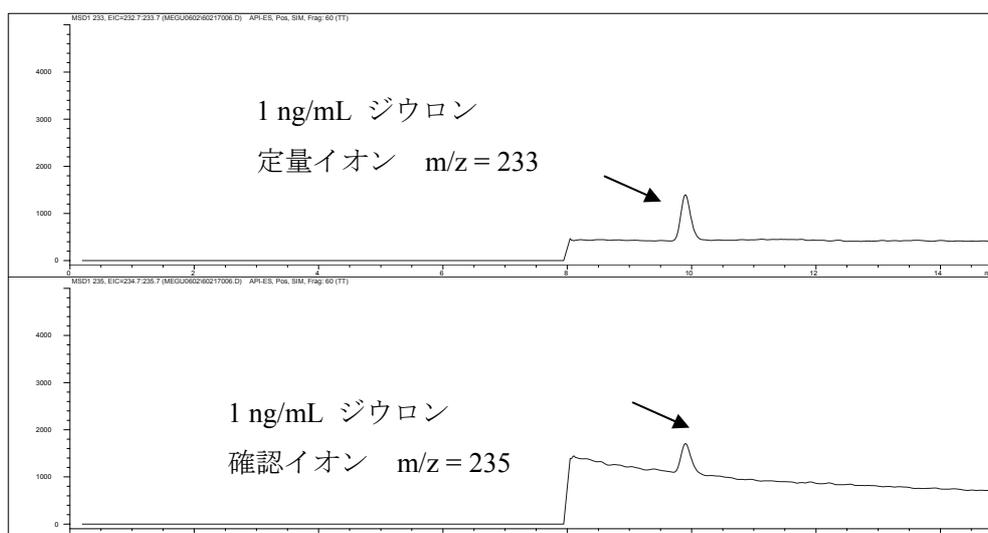


図 7-1 ジウロン(1 ng/mL)の測定クロマトグラム

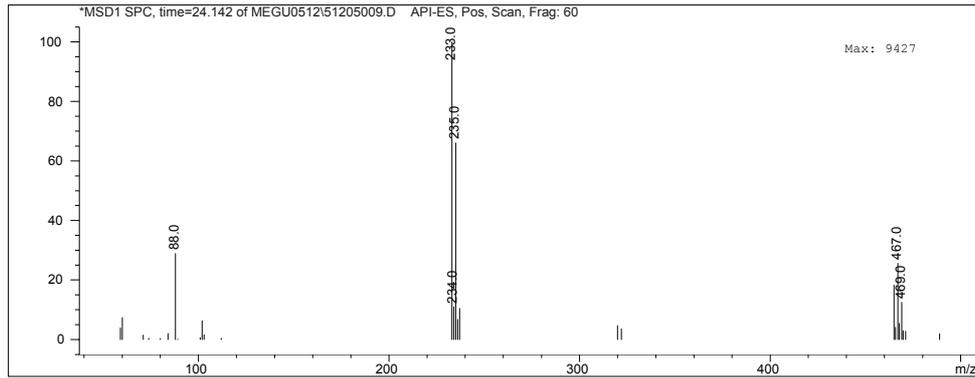


図 7-2 ジウロン(10 µg/mL)のマススペクトル

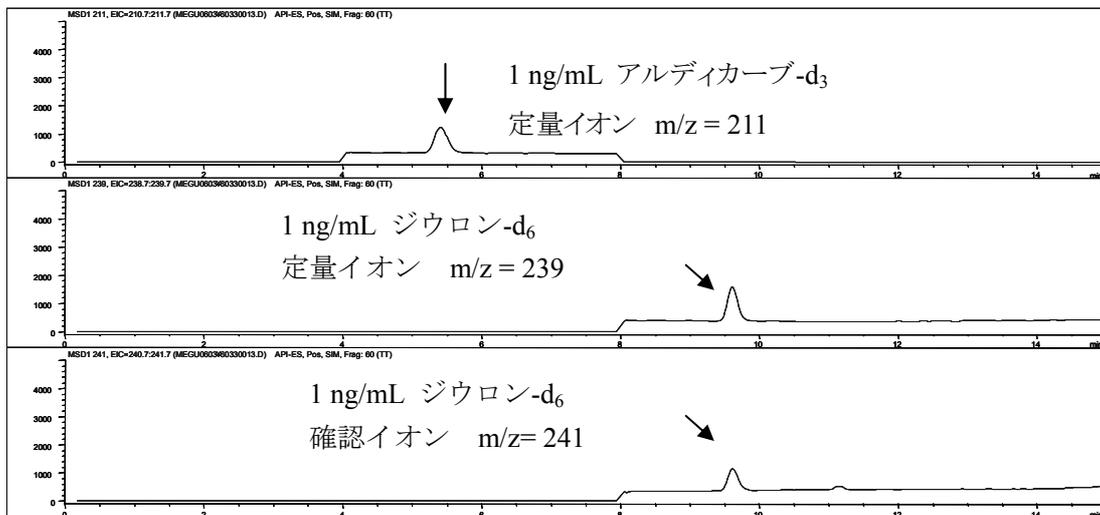


図 8 アルディカーブ-d₃ ジウロン-d₆(1 ng/mL)のマススペクトル

[操作ブランク]

本法を用いて生物試料(カレイ)の前処理を行ったところ、操作ブランクとしてジウロンを検出した例があった。生物試料を含まない場合でも検出されることがあるので、前処理操作中のコンタミネーションと考えられる。ガラス器具等は使用前に純水、アセトン、ヘキサンで2回ずつ入念に洗浄を行う必要がある。

なお、空試験の繰り返し測定の結果、いずれも検出下限(MDL)以下であった。

空試験の繰り返し測定の結果を表 3 に示した。また、本法を用いて前処理を行ったマコカレイの測定クロマトグラムを図 9 に示した。図 9 はジウロンのブランクが検出された例である。

表 3 空試験繰り返し測定結果

物質名	試料量 (g)	試験回数 (回)	平均検出量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV (%)
アルディカーブ	10	7	N.D.	N.D.
ジウロン	10	7	0.024	28

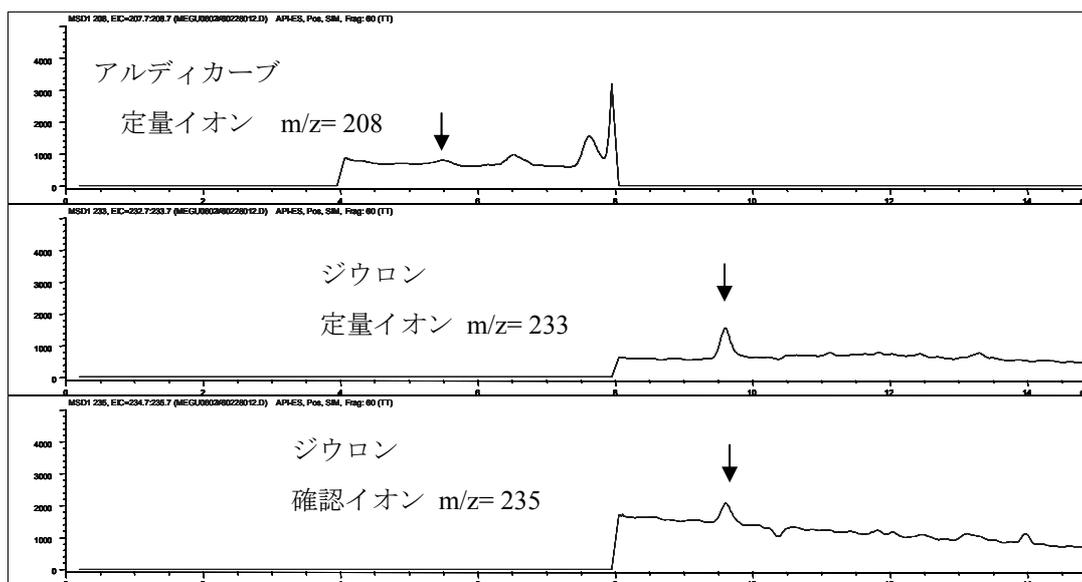


図 9 マコカレイ測定クロマトグラム

〔添加回収実験結果〕

生物試料(カレイ)への標準物質添加回収実験結果を表 4 に示す。

生物試料への添加量は、低濃度(MQL 値付近)と高濃度(MQL 値の 30 倍程度)の 2 条件とし、前述の【試料の前処理及び試料液の調製】に従って前処理を行った。

回収率の計算は、添加回収試験試料の検出濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)を添加量 (ng)及び試料量 (g)から求めた添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)で除して算出した。なお、参考として記載した回収率の絶対値は、絶対検量線を用いて算出した検出量(ng)を添加量(ng)で除して算出した。

表 4 添加回収実験結果

物質名	試料量 (g)	添加量 (ng)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	検出濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%)	測定 回数	変動係数 (%)	回収率(% (絶対値)
アルディ カーブ	10	5	0.50	0.52	104	3	1.6	64
	10	100	10.0	10.2	102	3	0.53	68
ジウロン	10	5	0.50	0.56	112	3	2.9	98
	10	100	10.0	10.3	103	3	1.9	79

[環境試料分析例]

本法を用いて標準溶液を添加してから前処理を行ったマコカレイの測定クロマトグラムを
図 10 に示す。

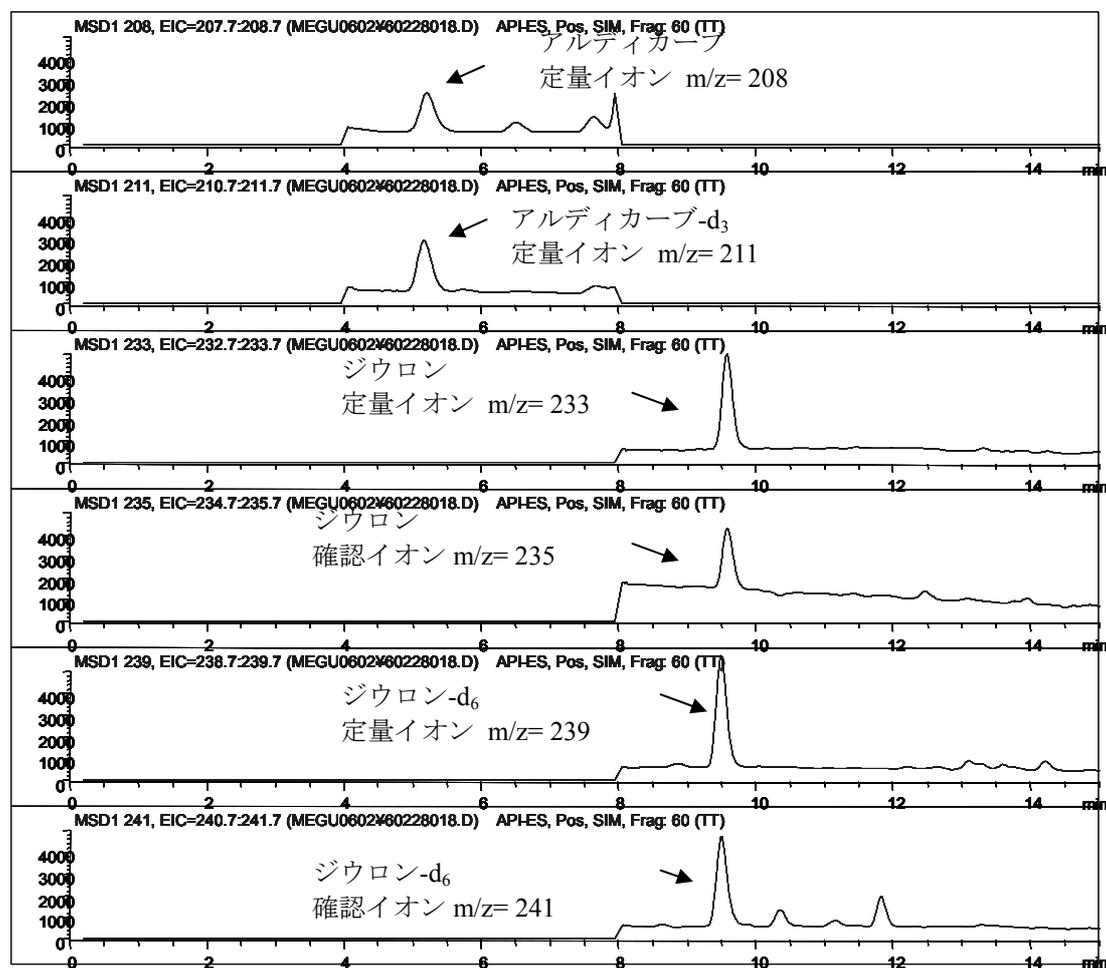


図 10 マコカレイ 添加回収試験クロマトグラム
(添加濃度:アルデヒドカーブ、ジウロン 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

[前処理法の検討]

以下の前処理法の検討では、アルデヒドカーブとジウロンの定量には絶対検量線を使用し、
回収率で比較した。

1. 試料液の溶媒置換の検討

前処理後の試料液を LC/MS で測定するため、試料液の溶媒をジクロロメタンから 50%アセトニトリル/水へ溶媒置換する際の検討を行なった。ジクロロメタンで調製した標準溶液を乾固してからアセトニトリル溶液へ置換した場合と、アセトニトリルに転溶してから 50%アセトニトリル/水に置換した場合の回収率を図 11 に示した。

ジウロンは両操作において 80%以上の回収率を得られたが、アルデヒドカーブは転溶した場合でも回収率は 40%程度であった。乾固すると回収率が 20%以下と低下し、溶媒の揮発

とともにアルディカーブが揮発していると考えられる。溶媒の置換や濃縮操作では、乾固しないように注意する必要がある。

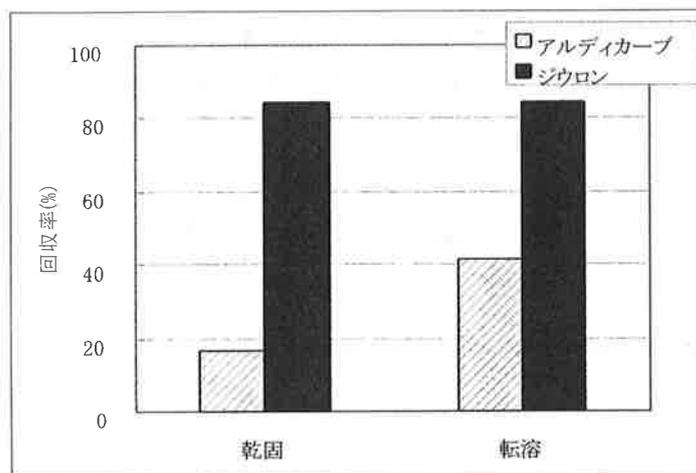


図 11 溶媒置換における回収率

(注) 前処理操作の回収率は絶対検量線を用いて定量を行い、算出した。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{検出量(pg)}}{\text{添加量(pg)}} \times 100$$

2. 溶媒抽出の検討

アルディカーブ及びジウロンのメタノール溶液からの抽出法の検討を行った。

メタノールで調製した標準溶液からジクロロメタンと酢酸エチルを用いてそれぞれ溶媒抽出を行い、その回収率を図 12 に示した。

ジウロンはどちらの溶媒でも 95%以上の回収率を得られたが、アルディカーブはジクロロメタンを用いた抽出では回収率は 75% 程度、酢酸エチルでの抽出は不可能であった。メタノール溶液からの抽出にはジクロロメタンを採用することとした。なお、アルディカーブの回収率が低いのは、溶媒置換する際の揮発によるものと考えられる。

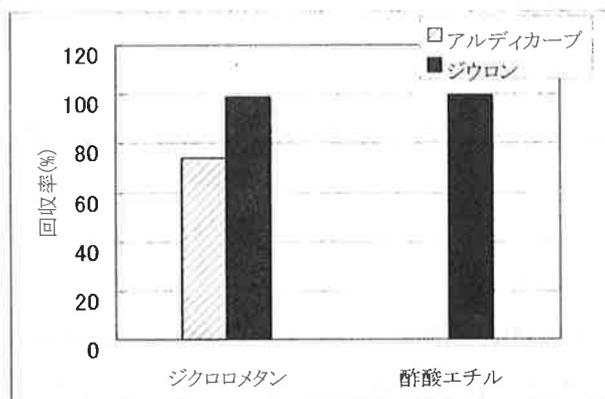


図 12 溶媒抽出による回収率

(注) 前処理操作の回収率は絶対検量線を用いて定量を行い、算出した。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{検出量(pg)}}{\text{添加量(pg)}} \times 100$$

3. LC-Si glass tube を用いたクリーンアップ条件の検討

LC-Si glass tube からのアルディカーブ、ジウロンの溶出パターンを図 13 に示す。カートリッジは 10 mL アセトン、10 mL ジクロロメタンを順に通液してコンディショニングを行い、ジクロロメタンで調製したアルディカーブとジウロンの標準溶液を 1 mL 負荷した。試料負荷後のカートリッジの洗浄には 10 mL ジクロロメタンを用い、溶出には 10%アセトン/ジクロロメタン溶液を用いた。

溶出量約 4mL でアルディカーブは約 70%、ジウロンは 90% 以上が溶出し、7 mL 以降では溶出されなかった。アルディカーブの回収率が低いのは濃縮過程での揮発によると考えられる。

以上により、LC-Si glass tube を用いたクリーンアップでは、洗浄に 10 mL ジクロロメタン、溶出には 10%アセトン/ジクロロメタン溶液を用いることとした。

なお、カートリッジはリザーバーがプラスチック製の場合、ジウロンの定量イオンである $m/z=233$ が操作ブランクとして検出されたため、ガラス製のカートリッジを使用した。

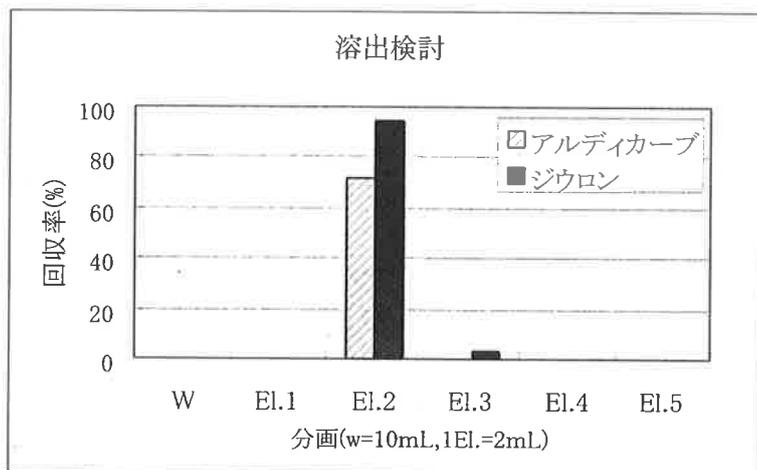


図 13 LC-Si glass tube からの溶出パターン

* w=洗浄液、El.=溶出液

(注) 前処理操作の回収率は絶対検量線を用いて定量を行い、算出した。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{検出量(pg)}}{\text{添加量(pg)}} \times 100$$

【評価】

本法により、生物試料中アルディカーブとジウロンの $0.5 \mu\text{g/kg}$ レベルの定量が可能である。さらに、検討によっては分析方法の簡略化や高感度化が可能になると考えられる。

【参考文献】

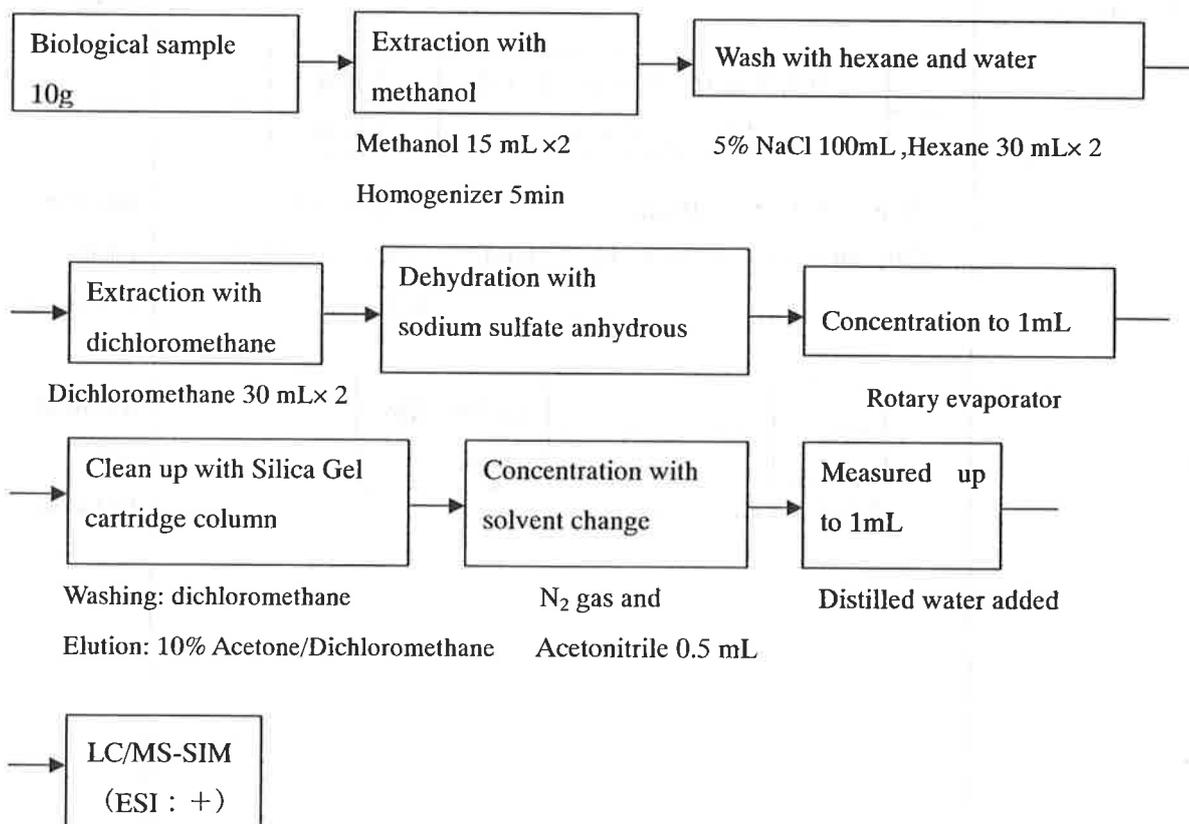
- 1) 農薬等の環境残留実態調査分析法、107-108、環境庁水質保全局 (2000)
- 2) 最新 農薬の残留分析法、34-37 and 241-243、中央法規出版 (1995)
- 3) International Chemical Safety Cards ICSC0094
- 4) Exploring QSAR-Hydrophobic, Electronic and Steric Constants, American Chemical Society(1995)
- 5) Makihata N., Kawamoto T., Teranishi K.: *Analytical sciences*, **19**, 543-549 (2003)

【担当者氏名・連絡先】 担当 (株)住化分析センター
住所 〒299-0266 千葉県袖ヶ浦市北袖 2 番地 1
TEL:0438-63-6176 FAX:0438-63-6921
担当者 目黒暢子 村上雅志
E-mail:n.meguro@scas.co.jp

Aldicarb and Diuron

An analytical method was developed for the determination of Aldicarb and Diuron in biological sample by liquid-chromatography mass spectrometry (LC/MS).

Biological sample(10 g) was homogenized and centrifuged twice with 15 mL of methanol. The methanol solution was added to 100 mL of 5% NaCl and was washed twice with 30 mL of hexane. The methanol solution was extracted twice with 30 mL of dichloromethane and the extract was dehydrated by sodium sulfate anhydrous. The dichloromethane was concentrated to 1mL with rotary evaporator and then cleaned up with Silica Gel cartridge column. The eluate was concentrated to 0.5 mL under N₂ gas flow and the solvent changed to acetonitrile. The concentrated solution was measured up to 1mL with distilled water. The analyte was determined by liquid-chromatography mass spectrometry - selected ion monitoring mode (LC/MS-SIM).



物質名	分析法フローチャート	備考
2-メチル-2-メチルチオピロピオンアルデヒド- <i>o</i> -メチルカルバモイルオキシム (アルディカーブ) 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素 (ジウロン)	<p>生物試料 10g</p> <p>メタノール抽出</p> <p>ヘキサン洗浄</p> <p>メタノール 15mL x2 ホモジナイザー 5min</p> <p>ヘキサン 30 mL x2 5% NaCl 100 mL</p> <p>ジクロロメタン抽出</p> <p>脱水</p> <p>濃縮</p> <p>ジクロロメタン 30 mL</p> <p>無水硫酸ナトリウム</p> <p>シリカゲルカートリッジによる クリーンアップ</p> <p>濃縮 転溶</p> <p>洗浄 ジクロロメタン 10 mL</p> <p>溶出 10%アセトン/ジクロロメタン 10 mL</p> <p>N₂吹きつけ</p> <p>アセトニトリル転溶 0.5 mLまで</p> <p>定容</p> <p>蒸留水で1 mLに定容</p> <p>LC/MS-SIM (ESI: +)</p>	LC/MS-SIM 正イオン カラム SUMIPAX ODS K-05-2015 長さ 150 mm 内径 2.0 mm 粒径 5 μm 検出下限 <生物> アルディカーブ 0.15 μg/kg ジウロン 0.14 μg/kg