

報 文

カルバリル及び 1-ナフトールの固相抽出/同期二次微分
蛍光光度定量中 村 基^{®*}, 谷 口 寛^{*}, 山 田 眞 吉^{*}, 伊 東 琢 史^{*}Synchronous second-derivative fluorimetric determination of
carbaryl and 1-naphthol using solid-phase extractionMotoshi NAKAMURA, Hiroshi TANIGUCHI, Shinkichi YAMADA and Takushi ITOU^{*}^{*}Faculty of Engineering, Shizuoka University, 3-5-1, Johoku, Hamamatsu-shi, Shizuoka 432-8561

(Received 25 May 1999, Accepted 29 June 1999)

Carbaryl and its main metabolite, 1-naphthol, were determined simultaneously using a synchronous second-derivative fluorimetric method. The presence of cetyltrimethylammonium bromide resulted in a four-fold increase in the fluorescence intensity of 1-naphthol together with a large bathochromic shift of the emission spectrum, *ca.* 100 nm. The synchronous second-derivative spectra of carbaryl and 1-naphthol in the mixture in the presence of CTAB were completely separated by changing the synchronous wavelength interval; with 63 nm the second-derivative spectra of carbaryl were recorded, while with 163 nm those of 1-naphthol appeared. The intensities in the spectra were proportional to the concentration of carbaryl and 1-naphthol. The calibration graphs were linear up to at least 1×10^{-6} M, and both the correlation factors and detection limits were 0.997, 2.61×10^{-8} M for carbaryl and 0.999, 2.87×10^{-8} M for 1-naphthol. Carbaryl and 1-naphthol were completely recovered with a Sep Pak Plus C18 cartridge from some environmental water samples with an adjusted pH of below 6.5, and were successfully determined by the proposed method.

Keywords : carbaryl; 1-naphthol; synchronous second-derivative fluorimetry; solid-phase extraction; surfactant; environmental water.

1 緒 言

カルバリル (1-ナフチルメチルカルバメート) は、カルバメート系殺虫剤の 1 種であり、広範な害虫に効果があるため、最も良く使用される殺虫剤の 1 種である。カルバリルは、一般的に有機リン系殺虫剤より毒性は弱いとされているものの、ほ乳動物に対して有機リン系殺

虫剤と同様なコリンエステラーゼ阻害を示し、催奇形毒性も報告されている^{1)~4)}。また最近では、外因性内分泌かく(攪)乱作用を示すとの疑いも持たれており⁵⁾、カルバリルによる環境汚染にはよりいっそうの注意が必要である。「公共用水域等における農薬の水質評価指針値」(環境庁, 1994 年)では、カルバリルの指針値は 0.05 mg l^{-1} とされている。カルバリルは、その主たる代謝物として、1-ナフトールを生じる。したがって、カルバリルによる汚染状況や環境中の分散等を知る上では、1-ナ

^{*} 静岡大学工学部: 432-8561 静岡県浜松市城北 3-5-1

フトールをも同時にモニタリングする必要がある。

一般的にカルバリルの分析は、GC⁽⁶⁾⁷⁾やLC^(8)~11)により行われてきた。固相分光法⁽¹²⁾¹³⁾やFIA⁽¹⁴⁾による分析法も報告されている。一方、カルバリル及び1-ナフトールが共に比較的強い蛍光を発することを利用して、微分法や同期法を含む蛍光光度定量法も報告されている^(15)~17)。同期蛍光法は、励起及び蛍光波長との間隔を一定に保ち、両波長を同時に走査することにより、よりシャープなピークが得られる。また微分法は、重なって得られるスペクトルを波長で微分することにより、ブロードなスペクトルが消滅したり、重なったスペクトルのわずかな差異をより顕著にする。したがって、微分法も同期法も蛍光法の選択性を向上させる利点を有する。この両法を併せた同期微分蛍光法は、より選択的な蛍光定量法となり得る⁽¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、カルバリルと1-ナフトールの励起及び蛍光スペクトルバンドがほとんど重なるため、現在までに報告されているカルバリルと1-ナフトールのいずれの蛍光光度法も、1-ナフトールは直接定量できるものの、カルバリルを直接定量することはできない。したがって、カルバリルが蛍光を発しない波長で1-ナフトールの蛍光強度を測定することにより1-ナフトールをまず定量し、次にpHを10以上としてカルバリルを完全に加水分解し、強い蛍光を発する1-ナフトラト陰イオンとし、カルバリルと1-ナフトールの合計濃度を求め、後者と前者の差からカルバリル濃度を間接的に求める方法が用いられている。更には界面活性剤による蛍光増強効果を利用する蛍光光度法も報告されているが^(20)~23)、これらの方法でもカルバリルの直接定量は行われていない。

本研究では、界面活性剤添加による1-ナフトールのスペクトルシフトを利用し、同期二次微分蛍光光度法によるカルバリルと1-ナフトールの分別定量法、及び固相抽出法を用いる環境水中の両者の定量への適用性を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

カルバリルは残留農薬試験用(和光純薬製)を用い、 1×10^{-3} M メタノール溶液とした。これを使用の都度、適宜メタノールで希釈して用いた。保存溶液は、冷蔵庫(5℃)に保存した。

1-ナフトールは、試薬特級品を用い、カルバリルと同様に調製した。

界面活性剤は、非イオン性界面活性剤としてトリトンX-100、ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル

(Brij35)、ポリオキシエチレン(10)セチルエーテル(Brij56)、陰イオン界面活性剤として硫酸ドデシルナトリウム(SDS)、陽イオン界面活性剤として臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)を用いた。これらの界面活性剤は、試薬特級品もしくはそれに準ずるものを、それぞれ水溶液として用いた。

0.1 M リン酸二水素ナトリウム水溶液を、固相抽出時の試料水のpH調節のために用いた。

2.2 装 置

蛍光測定は、日立F-4500型蛍光光度計を使用した。

なお、固相抽出にはWaters製Sep Pak Plus PS-2, C18, tC2, C8, NH2, CN及びDIOLカートリッジを用いた。

2.3 方 法

リン酸塩水溶液でpHを6.5以下とした500 mlまでの試料水を、メタノール5 ml及び蒸留水5 mlでコンディショニングしたSep Pak Plus C18カートリッジに約10 ml/minで吸引して通す。試料水がすべてカートリッジを通過後、5~10分間通気乾燥する。次に、注射筒でメタノール5 mlを用いて25 mlメスフラスコに溶出する。0.05 M CTAB溶液を10 ml加え、蒸留水で定容とする。

固相抽出した試料溶液を、励起及び蛍光スリット幅5 nm、走査速度240 nm/min、同期波長幅63 nmで、同期蛍光スペクトルを測定し、二次微分する。次に同じ試料溶液で、同期波長幅を163 nmとし、同様に同期蛍光スペクトルを測定し、二次微分する。前者の337 nmにおける微分蛍光強度からカルバリルを、後者の同期二次微分蛍光スペクトルの496 nmの微分蛍光強度から1-ナフトール濃度を求める。なお、二次微分は、Savitzky-Golay 7点平滑化微分により、微分感度5として行った。

3 結果及び考察

3.1 カルバリル及び1-ナフトールの蛍光特性に及ぼす界面活性剤の効果

2.1に述べたタイプの異なる6種の界面活性剤を用いて、カルバリル及び1-ナフトールの蛍光特性に及ぼす影響をスペクトル観察により調べた。カルバリルでは、スペクトルのシフト及び蛍光強度増強の効果は、検討したすべての界面活性剤についてほとんど観察されなかった。一方1-ナフトールでは、陽イオン界面活性剤であ

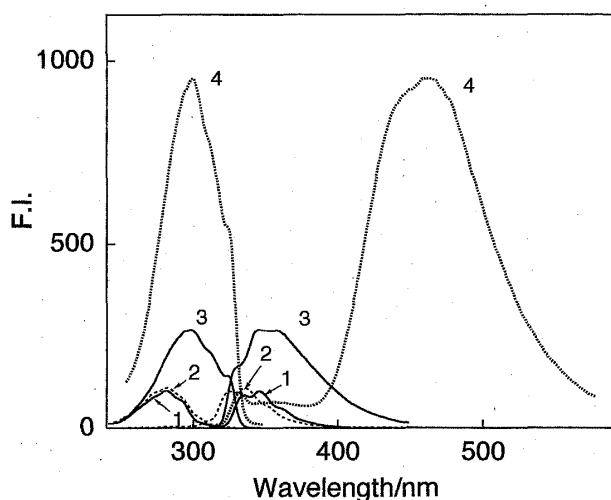


Fig. 1 Excitation and emission spectra of carbaryl and 1-naphthol

[Carbaryl], [1-Naphthol]: 5×10^{-6} M; 1, 2: carbaryl; 3, 4: 1-naphthol; 1 and 3: in methanol solution; 2 and 4: in solution in the presence of CTAB (0.03 M) and 20%v/v methanol; Excitation/emission (nm): 1: 280/337; 2: 280/343; 3: 299/366; 4: 304/467

る CTAB 及び CTAC のみが顕著な効果を示した。CTAB を添加した場合の励起及び蛍光スペクトルを Fig. 1 に示した。図中には固相抽出を用いることを考慮してメタノール溶液中のスペクトルも併せて示した。メタノール溶液中では、カルバリルと 1-ナフトールの蛍光強度には比較的大きな差があるものの、励起及び蛍光スペクトルはほとんど互いに重なる。CTAB を添加した場合、カルバリルはほとんど変化しなかったが、1-ナフトールではメタノール溶液中の蛍光強度と比較し約 4 倍の蛍光強度の増強及び蛍光スペクトルが約 100 nm 長波長側にシフトすることが観察された。Sancenon ら²²⁾も CTAB について同様な報告をしている。また、CTAC を用いた場合にも CTAB の場合とほとんど同様なスペクトルシフト及び蛍光増強効果が観察された。

Fig. 2 には、1-ナフトールの蛍光強度に及ぼす CTAB 濃度の影響を示した。 1×10^{-3} M 以上で蛍光強度は急激に大きくなり、 1×10^{-2} M 以上で蛍光強度はほぼ一定となった。蛍光強度が大きくなり始める CTAB 濃度は、CTAB の臨界ミセル濃度の報告値 (9×10^{-4} M)²⁴⁾²⁵⁾ とほぼ一致した。なお CTAC を用いた場合もほぼ同様な結果を得た。

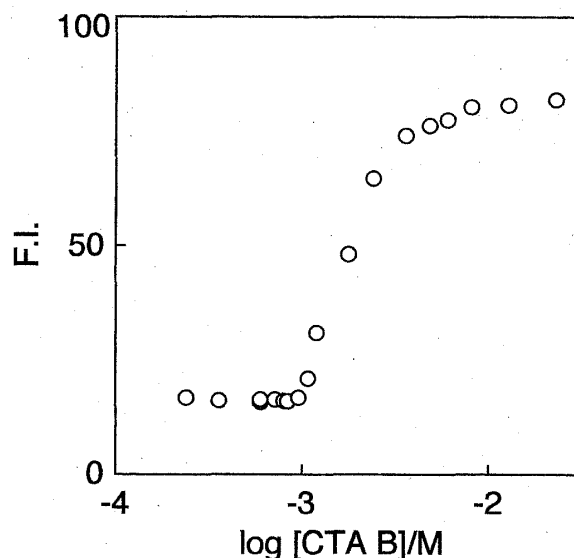


Fig. 2 Effect of CTAB concentration on fluorescence intensity of 1-naphthol

[1-Naphthol]: 5×10^{-7} M; Methanol: 20%v/v

3・2 カルバリル及び 1-ナフトールの分別定量

Fig. 1 に示したように、カルバリルと 1-ナフトールの励起及び蛍光スペクトルはほとんど重なるために、通常の蛍光光度法では分別定量できない。そこで、本研究では、Fig. 1 の結果に基づき、メタノール溶液中及び CTAB 及び CTAC 共存溶液中での微分、同期及び同期微分蛍光スペクトルを種々の微分次数及び同期波長幅 ($\Delta\lambda$) で測定し、カルバリルと 1-ナフトールの分別定量の可能性を検討した。

その結果、CTAB もしくは CTAC 共存下での同期二次微分法が適しているとの結果を得た。Fig. 3 にカルバリルと 1-ナフトール混合物の CTAB 共存下での同期二次微分スペクトルを示した。 $\Delta\lambda$ を 63 nm とし測定した同期二次微分スペクトルの強度は、カルバリル濃度のみに依存し、 $\Delta\lambda$ を 163 nm とした場合は 1-ナフトール濃度のみに依存することが分かった。したがって、同一試料で $\Delta\lambda$ を変えて同期二次微分蛍光スペクトルを測定することにより分別定量が可能である。定量の際の微分強度 (D.F.I.) 測定波長は、最大微分強度を示す波長、すなわちカルバリル 337 及び 1-ナフトール 496 nm を選択した。この方法で作成した検量線は、カルバリル及び 1-ナフトール共 1×10^{-6} M までは直線となり、相関係数及び標準偏差の 3 倍で定義した場合の検出限界は、それぞれ 0.997, 2.61×10^{-8} M 及び 0.999, 2.78×10^{-8} M であった。

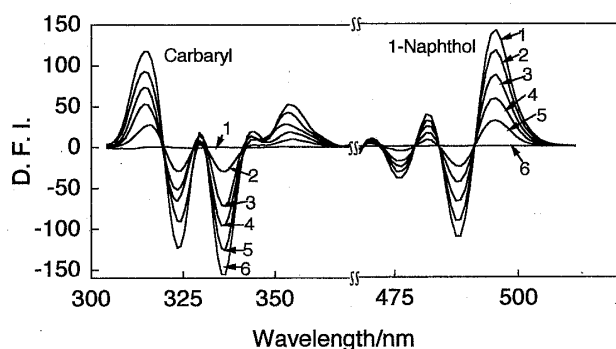


Fig. 3 Synchronous second derivative fluorescence spectra of 1-naphthol

[Carbaryl]/ 10^{-7} M + [1-Naphthol]/ 10^{-7} M: 1; 0 + 5, 2; 1 + 4, 3; 2 + 3, 4; 3 + 2, 5; 4 + 1, 6; 5 + 0; [CTAB]: 0.03 M; Methanol: 20%v/v

Table 1 Recovery of carbaryl and 1-naphthol from distilled water with seven cartridges

Cartridge	Recovery, %	
	Carbaryl	1-Naphthol
PS-2	100.0	101.2
C18	99.7	99.9
C8	99.4	99.2
tC2	89.8	78.6
NH2	3.6	16.8
CN	17.8	22.0
DIOL	5.6	18.6

Carbaryl and 1-naphthol; 4 μ g; Sample volume: 200 ml

CTACを用いても同様に定量可能であったが、CTABを用いた場合のほうが再現性が良かったため、CTABを用いることにした。

3.3 固相抽出条件

各種の固相抽出用カートリッジで回収率を調べた結果を Table 1 に示した。ポリスチレンゲル充填の PS-2、アルキルシリカ充填の C18、C8 で十分な回収率が得られた。アルキルシリカ系の 1 種である tC2 及び特殊な官能基を有する NH₂, CN, DIOL カートリッジでは十分に回収できなかった。これらは充填剤の保持力が弱く、カルバリル及び 1-ナフトールが一部カートリッジを通過してしまうためであろうと考えられる。固相抽出における農薬の $\log P_{ow}$ (P_{ow} : *n*-オクタノール/水分分配係数) と回収率及び濃縮効率との関係の報告²⁶⁾によれば、 $\log P_{ow}$ が 3 程度のカルバリルの固相抽出には、C18 カ

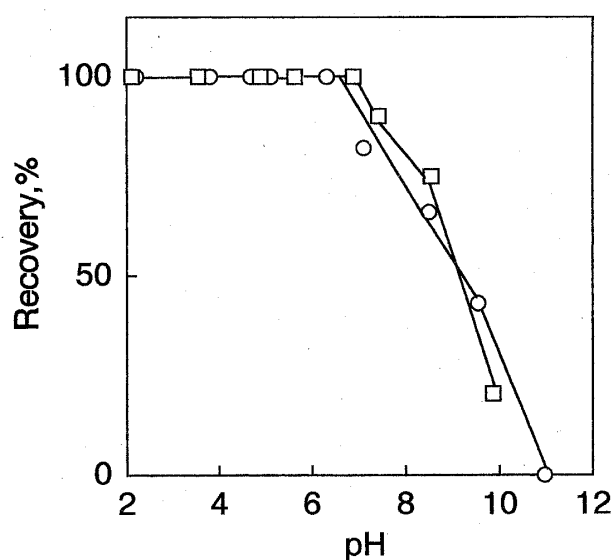


Fig. 4 Effect of pH on recovery

○: carbaryl 0.025 mg l^{-1} ; □: 1-naphthol 0.018 mg l^{-1} ; Sample volume: 200 ml; Cartridge: Sep Pak Plus C18

ートリッジが最適であると考えられ、以後の実験では C18 カートリッジを用いることにした。

Fig. 4 には、回収率に及ぼす抽出時の試料水の pH の影響を示した。pH 6.5 以上になると、pH の上昇とともにカルバリル、1-ナフトール両者とも回収率はしだいに減少した。この結果は、両者の pH による吸収スペクトル変化とほぼ対応している。カルバリルは pH の上昇とともにしだいに 1-ナフトールに加水分解し、1-ナフトールはプロトン解離により 1-ナフトート陰イオンとなり、C18 カートリッジに捕そくされにくくなるためであろう。したがって、以後の実験では pH を 6.5 以下とすることにした。試料水の pH を調節するために、数種の酸や緩衝液を用いて検討したが、リン酸塩溶液を用いることにした。これは実試料に適用した際に、水道水や井戸水などでは、カルバリルの回収率が低くなる場合があったが、リン酸塩溶液を用いると十分な回収率が得られたためである。pH を塩酸で調節し、EDTA を添加した場合にも、水道水及び井戸水からのカルバリルの回収率の減少が見られなかったことから、金属イオンが原因と考えられ、リン酸塩溶液を用いた場合には金属イオンがマスキングされるためと推測される。

試料水量は、500 ml までは回収率に影響を及ぼさなかった。また、C18 カートリッジからのカルバリル及び 1-ナフトールの溶出には、メタノール 4 ml で十分であった。試料水量及び溶出メタノール必要量から、125 倍

Table 2 Simultaneous determination of carbaryl and 1-naphthol in environmental waters

Water	Recovery, % [†]	
	Carbaryl	1-Naphthol
Tap	98.4 (±2.4)	99.6 (±1.8)
Well	102.2 (±3.1)	95.3 (±2.9)
River 1	98.8 (±4.0)	99.9 (±3.1)
River 2	99.1 (±4.4)	103.1 (±3.4)
Lake	110.7 (±5.7)	107.2 (±5.2)
Sea	99.9 (±4.8)	100.6 (±3.2)

[†] Average recovery ($n = 3$).

Carbaryl spiked: 5 µg; 1-Naphthol spiked: 3.6 µg;

Sample volume: 200 ml; Cartridge: Sep Pak Plus

C18

濃縮が可能であるが、定量操作においては測定試料を 25 ml 定容とすることにしたので、実際の濃縮率は 20 倍である。

カルバリル及び 1-ナフトールをそれぞれ 0.02 µg ml⁻¹ を含む蒸留水 200 ml の溶液から、C18 カートリッジを用いて固相抽出した 5 回の繰り返し回収実験を行った結果、カルバリルでは平均回収率 99.7%, 相対標準偏差 2.3%, 1-ナフトールでは 99.9% 及び 3.8% であった。

3.4 環境水への応用

浜松市及びその近郊で採取した環境水をメンブランフィルターで濾過し、カルバリル及び 1-ナフトールを添加し、定めた方法により固相抽出し、前述した同期二次微分蛍光法で定量し回収率を求め、環境水への適用性を検討した。Table 2 に結果を示した。

水道水、井戸水、河川水及び海水では良好な結果が得られた。湖水については、幾分高い回収率となった。この湖水は、浜松市にある佐鳴湖で採水したが、佐鳴湖は多量の家庭排水の流入により富栄養化が著しく進行し、化学的酸素要求量 (COD) は、10 年以上にわたって 10 ~ 13 mg l⁻¹ と日本の湖水中では 2 番目に高い値を示すほど、汚濁の進行している湖である。カルバリル及び 1-ナフトールを添加せずに湖水を固相抽出し、蛍光スペクトルを観察したところ、420 nm 付近にピークを有する幅広い蛍光スペクトルが観察された。この湖水に含まれる蛍光性物質は特定できなかったが、家庭排水の流入による著しい汚濁を考慮すると、家庭用洗剤中の蛍光増白剤やフミン質が考えられる。そこで、フミン酸水溶液及び数種の家庭用洗剤水溶液を固相抽出したところ、フミン酸の固相抽出物では、湖水の固相抽出物と形状及び

ピーク波長とも良く似た蛍光スペクトルを示した。一方、家庭用洗剤の固相抽出物ではいずれも湖水の固相抽出物よりスペクトル幅は狭いものの、ほぼ同波長にピークを有する蛍光スペクトルが観察された。したがって、汚濁の進行した湖水の幾分高い回収率は、フミン質や蛍光増白剤によるとも考えられる。これについては除去法も含めて現在検討中である。

汚濁の著しい環境水については、上記の問題のさらなる検討が必要であるが、本法は環境水中のカルバリル及び 1-ナフトールの分別定量に適用可能である。

(1996 年 9 月, 日本分析化学会
第 45 年会において一部発表)

文 献

- 1) R. Elspura, W. Lijinsky, J. K. Seltow: *Nature* (London), **247**, 386 (1974).
- 2) M. Uchiyama: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 589 (1975).
- 3) R. J. Bashway: *J. Chromatogr.*, **211**, 135 (1981).
- 4) J. Seifert, J. E. Casida: *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2611 (1978).
- 5) 環境庁リスク対策検討会監修: “環境ホルモン外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告”, p. 115 (1998), (環境新聞社).
- 6) O. Weest, W. Meier: *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, **177**, 25 (1985).
- 7) S. Sakaue: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1239 (1987).
- 8) M. C. Pietrogrande, G. Bio, C. Bighi: *J. Chromatogr.*, **349**, 63 (1985).
- 9) 河合 聡: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 574 (1987).
- 10) R. T. Krause: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1114 (1980).
- 11) R. T. Krause, E. M. August: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 234 (1983).
- 12) M. De Olmo, J. Rohand, J. L. Vilchez, J. Laserna, D. Romero: *Talanta*, **44**, 443 (1997).
- 13) J. L. Vilchez, R. Avidad, A. Navalón, J. Rohand, L. F. Capitan-Valley: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **53**, 139 (1993).
- 14) K. D. Khalaf, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia: *Anal. Chim. Acta*, **280**, 231 (1993).
- 15) J. Aaron, N. Some: *Analisis*, **10**, 481 (1982).
- 16) F. G. Sanchez, C. C. Blanco: *Talanta*, **37**, 573 (1990).
- 17) J. L. Vilchez-Quero, J. Rohand, R. Avidad-Castaneda, A. Navalón, L. F. Capitan-Valley: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **350**, 626 (1994).
- 18) M. Gellespie Allesia: “*Manual of Spectrofluorometric and Spectrophotometric Derivative Experiments*”, p. 7 (1994), (CRC Press, Boca Raton).
- 19) 梅澤喜夫, 澤田嗣郎, 中村 洋 監修: “最新の分

- 離・精製・検出法 原理から応用まで”, p. 331 (1997), (エヌ・ティー・エス).
- 20) J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. Gonzalez: *Mikrochim. Acta*, **1991**, 171.
- 21) J. Sancenon, J. L. Carrion, M. de la Guardia: *Talanta*, **36**, 1165 (1989).
- 22) J. Sancenon, J. L. Carrion, M. de la Guardia: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **336**, 389 (1990).
- 23) V. Gonzalez, J. H. Ayala, A. M. Afonso: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 171 (1992).
- 24) P. Lianos, R. Zana: *J. Colloid Interface Sci.*, **84**, 100 (1981).
- 25) R. Zana, S. Yiv, C. Strazielle, P. Lianos: *J. Colloid Interface Sci.*, **80**, 208 (1981).
- 26) M. Nakamura, M. Nakamura, S. Yamada: *Analyst (London)*, **121**, 469 (1996).

要 旨

同期二次微分蛍光光度定量法を用いるカルバリル及び1-ナフトールの分別定量法を検討し、環境水中の両者の定量に応用した。カルバリル及び1-ナフトールは、互いに類似した励起、蛍光スペクトルを示すが、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を共存させると、1-ナフトールの蛍光強度は約4倍強くなり、更に1-ナフトールの蛍光スペクトルのみが大きく長波長側にシフトする。CTAB共存下で、両者の混合溶液を同期波長幅63 nmとした同期二次微分蛍光スペクトルはカルバリルの濃度のみに依存し、163 nmとした場合には1-ナフトールの濃度のみに依存することが分かり、これにより両者の分別定量が可能となった。更に、環境水中の両者の固相抽出を用いる分別定量について検討したが、環境水を pH 6.5 以下として固相抽出後、本法により定量可能であった。