

ISSN 1880-5701

No. 31

August, 1991

BULLETIN
OF THE
AGRICULTURAL CHEMICALS INSPECTION STATION
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
KODAIRA-SHI, TOKYO, JAPAN

農薬検査所報告

第 31 号

平成 3 年 8 月

農林水産省農薬検査所

(東京都小平市)

はじめに

昭和23年9月27日に我が国の登録農薬第1号として砒酸鉛が登録されてから、平成3年7月末までに登録された農薬は17,892件に達している。このうち、有効登録件数は6,261件、有効成分数は450種類となっている。

これらの数値は、農薬検査所が昭和22年に設立されて以来44年間の登録検査の実績でもある。今日まで当所は農薬の検査実施機関として地道な歩みを遂げてきたが、この間農薬をとりまく社会情勢は大きく変化してきている。

今日、農薬は農業の生産資材だけでなく、生活関連資材にもなりつつあり、これに伴い、農業者や植物防疫関係者だけでなく、国民各層にわたって農薬に対する関心が高まってきている。使用場面においては農地以外にも拡大し、いわゆる非農耕地での使用が社会問題となる時代になってきている。一方、農薬の使用者についても多様化し、新たな問題を提起されるケースが増加してきている。

このような情勢に対応するべく当所では登録内容の記載方法の見直しを行っている。従来の記載方法は農業、農家の方々を中心に記載されているので、これを広く国民各層の方々にも理解されやすい表現に改善を進めているところである。また、平成2年6月に我々の永年の念願であった農薬環境検査課が新設され、社会的関心が高まっている農薬の自然、生産及び生活環境への影響について、検査のより一層の充実を図れるものと期待しているところである。

以上のような状況のもとで、平成2年度の業務及び調査研究の一端を取りまとめたので、関係方面の参考になれば幸いである。

平成3年8月

農薬検査所長 上 垣 隆 夫

目 次

平成2年度における農薬検査所の業務概況

I 業務の背景	1
1. まえがき	1
2. 法令等の施行	1
II 検査業務	1
1. 登録検査	1
2. 指導・取締り	7
3. 農薬の毒性試験成績の信頼性確認に係る検証	8
4. 検査関連業務	8
5. 海外農薬情報収集管理	9
III 調査研究の概要	9
1. 農薬環境検査課	9
2. 技術調査課	9
3. 化学課	9
4. 生物課	10
5. 農薬残留検査課	10
6. 有用生物安全検査課	10
7. 成果の発表及び広報	11
IV 技術連絡・指導	11
1. 資 料	11
2. 打合せ会議等による連絡・指導	11
3. 研修会等における講義・講演	12
4. 研修生の受入れ	12
5. 技術協力のための職員の海外派遣	13
6. 見 学	13
V 機構・定員・予算等	14
1. 機構・定員	14
2. 職員の異動・研修	15
3. 予算・施設等	17
原 著	
石井康雄：効率的な残留農薬分析法の開発に関する研究	19
西澤幸夫・廣瀬欣也・鈴木 修：農薬製剤の補助成分に関する迅速多重検査法の確立（第2報）	135
短 報	
西内康浩：活性炭による水中からの農薬の除去と魚毒性低減化	141

BULLETIN OF THE AGRICULTURAL CHEMICALS
INSPECTION STATION

No.31 (August 1991)

CONTENTS

Outline of Main Activities of the Station in 1990 (April,1990~March,1991)	1
Originals :	
Ishii, Y. : Studies on the development of efficient analytical methods for pesticide residues in agricultural commodities	19
Nishizawa, Y., Hirose, K. and Suzuki, O. : Establishment of quick multiple analytical method for inert ingredients of pesticide formulation (Part 2)	135
Short Communication :	
Nishiuchi, Y. : Decreasing effect of activated charcoal on fish-toxicity of pesticides	141

平成2年度における農薬検査所の業務概要

I 業務の背景

1. まえがき

我が国の農業は、食料の安定供給や国土・自然環境の保全等を通じ、我が国の経済の発展と国民生活の安定に重要な役割を果たしてきているところである。しかしながら、今後は、さらに、最近における農業生産をめぐる諸情勢の変化等を配慮し、(1)農産物の需給の均衡を図りつつ、地域資源を最大限に活用し農業・農村の活性化を図ること (2)稲、麦、大豆等の土地利用型作物については、これらの生産を維持・振興するため、一層の生産性の向上に努めること (3)農産物に対する消費者ニーズの多様化・高度化に対応し、安全・衛生的・良質な国産農産物の安定的な供給を図ること等が一層重要となっており、これらに対処するための各種の施策が推進されることとなっている。

このような情勢の中にあって、農業は消費者ニーズに対応した高生産性・高品質生産等を実現するとともに、農作業の省力化等に大きく貢献しており、今後、各種の施策が推進される上で、農業はますます重要なものとなってきている。

一方、ゴルフ場等いわゆる非農耕地における農薬の適正使用や生活環境に対する農薬の影響問題、輸入農産物のポストハーベスト農薬の問題等、農薬の安全性等に関する国民の関心はますます高くなってきており、農薬の安全性確保が一層強く要請されてきているところである。

こうした農業・農薬をめぐる厳しい情勢に的確に対処するため、平成2年度においては農薬の品質の適正化とその安全かつ適切な使用の確保を図るため、厳正な登録検査及びこれらに関する調査研究を一層強力に推進するとともに、生産・流通の適正化を図るための適切な指導・取締りを実施した。また、海外における農薬の開発・登録・使用の状況及び輸入農産物の残留農薬に関する情報の収集・管理を行い、迅速かつ適正な登録検査に努めたほか、農薬の環境への影響調査のための検査手法・検査基準等の確立等調査研究を推進した。

近年の農薬登録申請の傾向は、これらの状況を背景として、次のようなものとなっている。

- (1) 新規化合物の登録申請は依然として多く、殺虫剤では昆虫の脱皮等を阻害するいわゆる IGR 剤、殺菌剤ではエルゴステロール生合成阻害剤 (EBI 剤) の申請が多く、除草剤では低薬量で活性を示す剤の

申請が目立っている。

- (2) 適用作物では、芝に対する農薬の申請が多くなっている。
- (3) 地域特産物の病害虫防除用農薬の要望が強くなり、これらの申請が依然として多い傾向にある。

2. 法令等の施行

農薬登録検査業務等に関連のある法令等の施行は、次のとおりであった。

- (1) 政令及び省令等

年月日	事 項	備 考
2.9.21	毒物及び劇物指定令の一部改正	政令第276号
3.3.19	肥料取締法施行令等の一部改正(農薬の登録手数料)	政令第40号
3.3.25	農薬依頼検定規程の一部改正(農薬依頼検定手数料)	農林水産省告示第361号

- (2) 通 達

年月日	事 項	備 考
2.5.10	無人ヘリコプターを用いて行う薬剤散布等の実施について	2農蚕第2796号
2.5.19	農薬危害防止運動の実施について	2農蚕第3004号
2.7.6	ゴルフ場における農薬使用の適正化について	2農蚕第3904号
2.12.25	病害虫・雑草防除における農薬の適正使用の徹底について	2農蚕第7657号

II 検査業務

1. 登録検査

- (1) 農薬登録の概要

平成2農薬年度に登録された農薬は2,691件で、その内訳は新規登録266件、再登録1,759件、現に登録を受けている農薬についての事項変更登録(適用拡大等)666件であった。前年度に比べると新規登録は減少、事項変更登録は増加、再登録はほぼ同等であった。

新規登録された新規化合物は15化合物(殺虫剤2, 殺菌剤4, 除草剤7, その他2)あり、新規化合物を含む農薬は30種類(殺虫剤2, 殺菌剤6, 除草剤20, その他

第1表 農薬年度別登録件数

種類	年度	61	62	63	元	2
新規登録		374	335	216	317	266
殺虫剤		97 (25.9)	120 (35.8)	55 (25.5)	151 (47.6)	57 (21.4)
殺菌剤		80 (21.4)	71 (21.2)	38 (17.6)	52 (16.4)	56 (21.1)
殺虫殺菌剤		137 (36.6)	41 (12.2)	72 (33.3)	51 (16.1)	55 (20.7)
除草剤		52 (13.9)	90 (26.9)	45 (20.8)	27 (8.5)	83 (31.2)
農薬肥料		0	0	2	4	0
殺そ剤		0 (2.2)	0 (3.9)	0 (2.8)	0 (11.4)	0 (5.6)
植物成長調整剤		4	10	0	22	4
その他		4	3	4	10	11
再登録		1,600	1,625	1,958	1,835	1,759
計		1,974	1,960	2,174	2,152	2,025
登録事項変更登録		331	580	460	6,351 525	666

注：平成2年9月末日現在 有効登録件数 6,299件

63, 元, 2農薬年度の3カ年合計の登録件数と異なるのは, 3カ年の有効期限までに製造廃止された農薬があることによる。

()内は新規登録されたそれぞれの剤の割合(%)を示す。

第2表 新規登録農薬の内訳

A 登録件数

区分	殺虫剤	殺菌剤	殺虫殺菌剤	除草剤	植調剤	その他	計
単剤	28	35	0	18	4	9	94
2種混合	29	16	28	32	0	2	107
3種混合	0	5	18	29	0	0	52
4種混合	0	0	9	4	0	0	13
計	57	56	55	83	4	11	266

B 種類別

区分	殺虫剤	殺菌剤	殺虫殺菌剤	除草剤	殺そ剤	植調剤	その他	計
新規化合物	2	6	0	20	0	0	2	30
新剤型	7	5	8	1	0	1	0	22
新混合剤	9	5	16	8	0	0	0	38
新製剤	4	5	6	4	0	1	6	26

注：新剤型：現に登録を受けている農薬の有効成分で、既登録と異なる剤型

新混合剤：現に登録を受けている農薬の有効成分を新たに2種以上混合した製剤

新製剤：現に登録を受けている農薬の有効成分であるが、有効成分含量が既登録農薬と異なる製剤

(既登録の種類名に包含される。)

殺菌剤	フルアジナム	フロンサイド水和剤	3-クロロ-N-(3-クロロ-5-トリフルオロメチル-2-ピリジル- α , α , α -トリフルオロ-2,6-ジニトロ-P-トリジン	石原産業	2.4.10	水和剤 (50%)	かんきつ, りんごなし, もも, ぶどう, 麦類, ばれいしょ, たまねぎ, あずき, いんげんまめ, 茶(覆下栽培を除く)	
		フロンサイド粉剤				粉剤 (0.5%)	キャベツ, ハクサイ	
除草剤	キザロホップエチル	タルガフロアブル	エチル=(RS)-2-[4-(6-クロロキノキサリン-2-イルオキシ)フェノキシ]プロピオナート	日産化学	元.11.16	水和剤 (10%)	だいず, えだまめ, あずき, いんげんまめ, らっかせい, かんしょ, てんさい, キャベツ, はくさい, たまねぎ, にんじん, すいか, いちご, いぐさ	
	キンクロラック	ファセット水和剤	3, 7-ジクロロキノリン-8-カルボン酸	BASF社 (ドイツ)	元.11.16	水和剤 (50%)	乾田直播水稻	
	キンクロラック・ベンスルフロメチル	ロザール粒剤 25				粒剤 (1.3%)	移植水稻	
		ロザール粒剤 17				粒剤 (1.0%)	移植水稻	
	キンクロラック・ベンタゾン	グラスゴン水和剤				水和剤 (8%)	移植水稻	
		グラスゴン粒剤				粒剤 (1.3%)	移植水稻	
	グリホサートトリメシウム塩	タッチダウン	トリメチルスルホニウム=N-(ホスホメチル)グリシナート	ICI (米)	元.11.16	液剤 (38%)	水稻, りんご, ぶどう, なし, 温州みかん, 公園, 庭園等	
	剤	ピラゾスルフロエチル	アグリーン水和剤	エチル=5-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イルカバモイルスルファモイル)-1-メチルピラゾール-4-カルボキシラート	日産化学	元.11.16	水和剤 (5%)	日本芝
			シリウス粒剤				粒剤 (0.07%)	移植水稻
		ピラゾスルフロエチル・プレチクロール	ライザー粒剤 20				粒剤 (0.07%)	移植水稻
ライザー粒剤 15			粒剤 (0.07%)				移植水稻	
ピラゾスルフロエチル・メフェナセット		アクト粒剤	粒剤 (0.07%)				移植水稻	

除 草	ピラゾスルフ ロンエチル・ モリネート	バルーフ粒剤			元.11.16	粒剤 (0.07%)	移植水稻
	キンクロラック・ ピラゾスルフ ロンエチル・ プレチラクロー ール	イナズマ粒剤				粒剤 (0.07%)	移植水稻
	キンクロラック・ ピラゾスルフ ロンエチル	サーベイヤ粒 剤				粒剤 (0.07%)	移植水稻
	キンクロラック・ ピラゾスルフ ロメチル・ プロモブチド	ボルサー粒剤				粒剤 (0.07%)	移植水稻
剤	ピリプチカブ・ プロモブチド	オリザガード 粒剤	0-3-tert-ブチル フェニル=6-メトキシ シ-2-ピリジル(メ チル)チオカルバマー ト	東ソー	元.11.16	粒剤 (3.3%)	移植水稻
	ピリプチカルブ・ プロモブチド・ ベンゾフェナ ップ	シーゼット フロアブル			2.2.16	水和剤 (5.7%)	移植水稻
	フラザスルフ ロン	シバゲン水和 剤	1-(4,6-ジメトキシ ンピリミジン-2- イル)-3-(3-トリ フルオロメチル-2 -ピリジルスルホニル) 尿素	石原産業	元.12.1	水和剤 (10%)	日本芝
	キンクロラック・ シノスルフロン・ プレチラクロー ール	セイラント粒 剤	1-(4,6-ジメトキシ ン-1,3,5-トリアジン -2-イル)-3-[2- (2-メトキシエトキシ) フェニルスルホニル]尿素	チバガイギー (スイス)	2.4.10	粒剤 (0.15%)	移植水稻
そ の 他	オリエンティ ールア	チャハマキ性 フェロモン剤	11-ドデセニル=アセ タート	武田薬品	2.7.2	中空円筒 (0.05 mg/1個)	かんきつ, なし, かき, 茶
	ビートアーミ ールア	ヨトウコン- S	(Z)-9-テトラデ セン-1-オール	信越化学	2.7.4	液体 (24%)	シロイチモジヨ トウの加害作物 栽培地帯

『殺虫剤』

1. モナクロスポリウム・フィマトパガム剤(ネマヒトン)
 たばこのサツマイモネコブセンチュウを対象に育苗肥
 土(育苗培土)調整時に慣行肥土3に対し本剤1を混合
 処理する。

本剤は,糸状菌(モナクロスポリウム・フィマトパガ

ム)を含有し,伸長した菌糸を線虫の体表面に密着させ,
 さらに突起を線虫体内に穿入させて内容物を吸収して,
 線虫を死に至らしめるものである。

2. 二酸化炭素くん蒸剤(炭酸ガス)

倉庫等においてパイナップルのカイガラムシ類,メイ
 ガ類,ヤガ類,ゾウムシ類,カメムシ類等を対象に臭化

メチルくん蒸剤の投薬前に投入する。

本剤は、酸欠により殺虫効果を示すものであるが、臭化メチルとの併用で効果が安定する。

『殺菌剤』

1. ピリフェノックス水和剤（ポジクロール水和剤5）
りんごの黒星病、赤星病、うどんこ病、なしの黒星病、赤星病、ぶどうのうどんこ病、てんさいの褐斑病、ばらの黒星病、うどんこ病を対象に散布する。

本剤は、エルゴステロール生合成阻害により殺菌効果を示す。なお、混合剤としてりんごを対象としたジラム・チウラム・ピリフェノックス水和剤が同時に登録された。

2. アグロバクテリウム・ラジオバクター剤（バクテローズ）

ばらの根頭がんしゅ病を対象に移植時または定植時に苗の根頭を希釈液に1時間浸漬処理する。

本剤は、真正細菌目のアグロバクテリウム・ラジオバクター ストレイン84を含有し、根頭がんしゅ病菌と拮抗的に作用するものと考えられている。

3. プロクロラス乳剤（スポルタック乳剤）

稲のいもち病、ごま葉枯病、馬鹿苗病を対象に種子浸漬する。

本剤は、エルゴステロール生合成阻害により殺菌効果を示す。

4. フルアジナム水和剤（フロンサイド水和剤）

かんきつのそうか病、灰色かび病、ミカンハダニ、ミカンサビダニ、りんごの斑点落葉病、黒星病、輪紋病、なしの黒斑病、黒星病、輪紋病、ももの灰星病、ぶどうの晚腐病、黒とう病、べと病、灰色かび病、枝膨病、麦類の紅色雪腐病、雪腐小粒菌核病、雪腐大粒菌核病、ばれいしょの疫病、たまねぎ及びあずきの灰色かび病、いんげんまめの炭そ病、菌核病、灰色かび病、茶（覆下栽培を除く）の炭そ病、輪紋病を対象に散布する。

本剤は、植物病原菌の細胞に作用し、抗菌活性を示すものと考えられている。また、ハダニの卵及び幼虫に対しても殺虫効果がある。なお、キャベツ、はくさいの根こぶ病を対象とした粉剤が同時に登録された。

『除草剤』

1. キザロホップエチル水和剤（タルガフロアブル）

だいず、えだまめ、あずき、いんげんまめ、らっかせい、かんしょ、てんさい、キャベツ、はくさい、たまねぎ、にんじん、すいか、いちごの畑地一年生イネ科雑草（スズメノカタビラを除く）、いぐさの水田一年生イネ科雑草を対象に雑草茎葉散布する。

本剤は、雑草の地上部及び地下部の分裂組織に移行し

て、細胞の構造あるいは細胞機能を急激に変化させ殺草効果を示すと考えられている。

2. キンクロラック水和剤（ファセット水和剤）

乾田直播水稻のノビエを対象に散布する。

本剤は、雑草の根部及び茎葉から吸収され、新葉を退色黄化させて殺草効果を示す。なお、混合剤として移植水稻を対象としたキンクロラック・ベンシルフロンメチル粒剤、キンクロラック・ベンタゾン水和剤、同粒剤が同時に登録された。

3. グリホサートトリメシウム塩液剤（タッチダウン）

水稻の一年生雑草、ミズガヤツリ及びセリ、りんご、ぶどう、なし、温州みかん、公園・庭園・堤とう・駐車場・道路・鉄道敷・運動場・宅地・のり面等の一年生及び多年生雑草を対象に雑草茎葉散布する。

本剤は、植物の蛋白質合成系に作用し、非選択的に殺草効果を示すと考えられている。

4. ピラゾスルフロンエチル粒剤（シリウス粒剤）

移植水稻の水田一年生雑草（イネ科を除く）、マツバイ、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ、ヘラオモダカ、オモダカ、セリ、クログワイを対象に散布する。

本剤は、雑草のアミノ酸の生合成阻害により殺草効果を示すと考えられている。なお、日本芝を対象とした水和剤及び混合剤として移植水稻を対象としたピラゾスルフロンエチル・プレチラクロール粒剤、ピラゾスルフロンエチル・メフェナセット粒剤、ピラゾスルフロンエチル・モリネート粒剤、キンクロラック・ピラゾスルフロンエチル・プレチラクロール粒剤、キンクロラック・ピラゾスルフロンエチル粒剤、キンクロラック・ピラゾスルフロンエチル・プロモブチド粒剤が同時に登録された。

5. ピリブチカルブ・プロブチド* 粒剤（オリザガード粒剤）

移植水稻の水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ミズガヤツリを対象に散布する。

ピリブチカルブは、植物の根部及び茎葉部の伸長を阻害して殺草効果を示すと考えられている。同じく混合剤として移植水稻を対象としたピリブチカルブ・プロモブチド・ベンゾフェナップ水和剤が登録された。

6. フラザスルフロン水和剤（シバゲン水和剤）

日本芝の一年生雑草、多年生広葉雑草、ヒメクグ、ハマスゲを対象に散布する。

本剤は、アミノ酸の合成阻害により殺草効果を示すと考えられている。

7. キンクロラック*・シノスルフロン・プレチラクロール*粒剤

移植水稻の水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ヘラオモダカ、ウリカワ、ミズガヤツリを対象に散布する。

シノスルフロンは、雑草の根部及び茎葉部から吸収され、成長点に移行し細胞分裂を抑制して殺草効果を示すと考えられている。

*は既登録化合物を示す。

『その他』

1. オリエンティール剤(チャハマキ性フェロモン剤) かんきつ、なし、かき、茶のチャハマキ雄成虫の誘引を目的に配置する。

本剤は性フェロモン剤である。

2. ビートアーミル剤(ヨトウコンーS)

シロイチモジヨトウの加害作物栽培地帯のシロイチモジヨトウの交尾阻害を目的に配置する。

本剤は性フェロモン剤である。

2. 指導・取締り

農薬の適正な製造、販売、使用を確保するため、製造業者、販売業者及び使用者に対する立入検査を実施した。

(1) 無登録農薬の取締り

無登録農薬の販売または使用に係る情報等に基づき、その疑いのある販売業者及び使用者を対象として、平成2年(平成2年1~12月)無登録の外国産農薬等違法農薬を中心に取締りを実施した。

立入検査は第4表に示す13道県下の販売業者(22)及び使用者(36)について実施し、検査のため75点の農薬等を集取した。

その結果、無登録のジエノクロル剤、プロピコナゾール剤、シベレリン剤及びダミノジット剤を愛知県下の4農家で確認した。これらの農家に対しては、登録農薬を

第4表 無登録農薬に係る立入検査状況

道県名	販売業者数	農薬等使用者数	集取農薬等数
北海道	0	2	0
茨城	2	3	3
栃木	3	3	8
埼玉	1	3	12
千葉	0	2	2
長野	2	4	7
静岡	2	2	7
石川	2	2	3
福井	2	2	5
愛知	3	5	10
山口	0	3	0
福岡	3	3	11
佐賀	2	2	7
13道県	22	36	75

(注) 農薬等使用者数にはゴルフ場を含む。

使用するよう指導するとともに本省に報告した。また、無登録のモグラ忌避剤を静岡県下の1業者が取り扱っていた。この業者に対しては、無登録農薬は販売しないよう指導するとともに本省に報告した。

また、帳簿の記載が不適正なもの(2業者)及び農薬の保管管理が不適正なもの(2業者)があったので、販売業者に対してその適正化を指導した。

(2) 製造業者に対する取締り

製造業者については、第5表に示す10都道県下15業者〔16(延べ17)工場〕を対象に立入検査を実施し、検査のため43点の農薬を集取した。平成2年は新規化合物農薬及び生物検定法で品質管理を行う農薬の製造及び品質管理状況等を重点に検査した。

その結果、登録票の備え付け不備が5業者、帳簿記載不備が1業者あったので、改善を指導した。

第5表 製造業者等立入検査状況

県名	製造業者名	工場名	集取農薬
北海道	北興化学工業(株)	北海道工場	5
	北海三共(株)	札幌工場	4
福島	日本農薬(株)	福島工場	5
	郡山ケミカル(株)	同社工場	2
埼玉	東京日産化学(株)	埼玉工場 (※2回)	8
千葉	野田食菌工業(株)	本社工場	1
	同	七光台工場	0
東京	産宏塗料(株)	同社工場	0
	三明ケミカル(株)	大崎工場	3
神奈川	高砂香科(株)	平塚工場	0
静岡	(株)理研グリーン	福田工場	0
	トモノ農薬(株)	島田工場	3
愛知	東亜合成化学工業(株)	名古屋工場	1
兵庫	塩野義製薬(株)	赤穂工場	4
山口	協和醸酵工業(株)	宇部工場	3
	保土谷化学工業(株)	南陽工業	4
10都道県	15社	16工場 (延べ17工場)	43

(3) ゴルフ場に対する検査

ゴルフ場における農薬の使用について社会的な関心が高いことから、ゴルフ場における農薬の使用状況について検査した。平成2年は第6表に示す11道県下の24ゴルフ場について実施した。

その結果、千葉県下の1ゴルフ場で無登録のグリホサート剤を保管していたので、登録農薬を使用するよう指導した。また、山口県下の1ゴルフ場で適用外使用を確認したので適正使用を指導した。

第6表 ゴルフ場に対する検査状況

道 県 名	ゴルフ場数
北 海 道	2
茨 城	2
栃 木	1
埼 玉	3
千 葉	2
長 野	3
静 岡	2
石 川	2
福 井	2
山 口	3
佐 賀	2
11道県	24か所

(4) 集取農薬等の検査結果

立入検査において集取した農薬について、有効成分及び補助成分の含有量、物理的・化学的性状、容器・包装の表示事項を重点に検査した。

その結果、容器・包装の表示内容が不適正なものが26点あり、そのうち3点については文書により、他のものは口頭により改善を指導した。

(5) 製品ラベルの検査

平成2農薬年度に製造実績のあった新規化合物農薬等について製品ラベルを提出させ、表示内容の検査を実施した。

その結果、237点中94点に表示内容の欠落、誤記、あるいは登録内容にない事項の表示等の不適正があり、改善を指導した。なお、このうち14点については文書により指導した。

3. 農薬の毒性試験成績の信頼性確認に係る検証

農薬の毒性試験の適正実施を図るための GLP (Good Laboratory Practice) 制度が、昭和59年に導入されてから6年を経過し、国内の毒性試験機関については、3回目の検証を実施した試験機関もあり、本制度は定着したといえる。

本年度は、合計28の毒性試験機関から確認申請が行われた。国内からは11機関で、そのうち2機関が新規申請であった。また、外国からは17機関から申請があり、そのうち7機関が新規申請であった。

農薬の毒性試験の信頼性確認に係る確認申請及び検証実施状況

年度	国内毒性試験機関		外国毒性試験機関	
	確認申請 受理試験 機関数	検証実施 試験機関数	確認申請 受理試験 機関数	検証実施 試験機関数
63	14	15	15	0
元	12	8	20	0
2	11	12	17	0
計	37	35	52	0

4. 検査関連業務

登録農薬に関する情報は膨大な量であり、これらを迅速・的確かつ効率的に処理し、農薬の登録・検査業務を能率的・合理的に推進させるための情報検索システムを昭和51年度から導入している。以後、検索操作の簡便化、検索項目の拡充等システムの改善を逐次実施しているところである。

a. 平成2年度は次の諸項目について改善を行った。

(1) 農薬情報検索プログラムの規模が大きくなり、プログラムの変更や追加等に時間を要するようになったため、検査項目を単位としたプログラムの分割を行い、保守管理の効率化を図った。

(2) 農薬情報検索機能を強化するため、現在の論理演算「論理積 (AND)」及び「論理和 (OR)」に、「論理差 (NOT)」を追加した。

(3) 農薬情報検索をより効率的に実施するため、検索結果のプリンターへの出力を農薬種類名 (五十音順)、剤型 (登録番号順)、会社名 (五十音順) で行えるようにした。

(4) 農薬種類名毎に登録番号を出力できるようにした。

(5) 工場関連資料として、工場単位に工場の種別 (自社、賃貸、委託) 及び生産農薬を編集して帳票にし、用途別件数表を出力できるようにした。

(6) 工場コードのコードマスタファイルの作成を迅速に行うため、コードマスタファイルへの追加、削除の一括入力を可能とした。

b. 農薬情報の検索の利用範囲

(1) 統計表の作成 (バッチ検索)

- ① 用途別剤型別登録状況
- ② 用途別魚毒性別登録状況
- ③ 用途別急性毒性別登録状況
- ④ 用途別混合数別登録状況
- ⑤ 用途別農薬種類別剤型別の登録番号、会社名、再登録または廃棄年月日一覧表
- ⑥ 適用農薬一覧表 (作物別、病害虫別、農薬種類別)

- ⑦ 適用農薬一覧表（作物毎適用病害虫別農薬種類別一覧表形式）
- ⑧ 魚毒性一覧
- ⑨ 種類名化学名一覧
- ⑩ 農薬年度別登録廃棄件数一覧
- ⑪ 会社別商品名一覧
- ⑫ 会社別用途別登録農薬件数一覧
- ⑬ 会社別製造工場保有状況
- ⑭ 所在地別製造工場
- ⑮ 製造工場別製造農薬一覧
- ⑯ 工場種別関係一覧

(2) 端末機による検索（TSS型会話検索）

検索は、失効農薬まで含めた全ての登録農薬を対象として、種類名、適用作物名などの30の検索項目の中から選択して行う。各項目毎に作成されているコードまたは検索用語を、AND、OR、NOTのいずれかをを用いて組み合わせることにより検索し、検索結果の出力は、12種類の出力様式の中から必要とする情報の入った様式を選択して行う。

5. 海外農薬情報収集管理事業

昨年度に引き続き海外における農薬の開発、登録、使用状況等に関する情報収集及び輸入農産物中の農薬の残留分析を行った。

(1) 残留分析

ぶどう、パパイヤ、にんじん（米国産）、メロン、アスパラガス、ライム（メキシコ産）、かぼちゃ（ニュージーランド産）、ニンニク（アルゼンチン産）、レモン（スペイン産）及びブロッコリー（台湾産）の10農産物について残留分析を実施した。

(2) 情報収集

残留基準に関する資料、オーストラリアの法律、米国における殺物くん蒸消毒の規制状況等資料9点を収集した。また、フランス及び台湾の残留基準値についてデータベース化した。

Ⅲ 調査研究の概要

1. 農薬環境検査課

環境における農薬の挙動調査

(1) 水中の農薬の分析法の検討

河川等における農薬の残留実態調査を迅速かつ簡便に行うため、固相抽出法によるクリーンアップ効果の検討を行った。その結果、以前から行ってきた抽出工程中で、セップパックフロリジルカートリッジから溶出する溶媒を、3種類使用し、その極性を変えることにより、より一層のクリーンアップ効果が得られた。

(2) モデル試験による水田水中での農薬の消長に関する調査

水田に散布された農薬の消長を把握するため、ラインメーターによるモデル試験を行った。試験区には、埼玉土壌及び新潟土壌を使用し、それぞれ、田面水の止水区（毎日減量分のみ給水）、流水区（毎日半量排水、減量分を給水）を設け、各区とも縦浸透約1cm/日の水管理を行った。処理した8農薬について、田面水中での濃度を経時的に測定し、各農薬の半減期及び流出率を求めた。

両土壌間で、農薬の土壌吸着性に差異がみられたが、流出率には、大きな違いは認められなかった。また、水田水中での農薬の濃度変化予測モデルの検討も併せて行った。

(3) ゴルフ場における農薬の残留実態調査

ゴルフ場における農薬の残留実態を明らかにするため、2カ所のゴルフ場において、1回/2カ月の割合で調整池、排水口、ゴルフ場内の井戸から採水し、調査を行った。調査の結果、調整池、排水口から一部農薬が検出されたが、井戸からの検出はなかった。

2. 技術調査課

(1) 土壌くん蒸剤の地下水に及ぼす影響についての実態調査

前年度に引き続き、土壌くん蒸剤が地下水に及ぼす影響をみるため、土壌くん蒸剤の使用量の多い3県7地点を対象に、地下水中の残留を経時的に調査した。その結果、土壌くん蒸剤は調査対象全地点の地下水から検出されなかった（検出限界0.1ppb）。

また、本調査の一環としてヘッドスペースガスクロマトグラフィーによる簡易測定法について検討した。

(2) 農薬の大気中への揮発速度と物理化学的性質との相関

農薬の大気中での残留状況を予測する方法を確立するため、水溶液、土壌、稲体、ガラス面からの農薬の揮発速度等を測定し、農薬の大気中への揮発速度とその物理化学的性質との相関について調査した。その結果、揮発速度は、分配比や一部の物理化学的性質との間に正の相関が認められた。

(3) イムノアッセイ法の農薬分析への応用

新たにイムノアッセイ法による生体成分から農薬の選択的な検出法を確立するため、ELISAキットを用いて基本的操作と農薬残留分析への応用について検討した。

3. 化学課

農薬製剤の補助成分に関する迅速多重分析法の確立
農薬製剤中に含まれている各種補助成分を簡便迅速に検査する方法を確立するため、昭和62年度に核磁気共鳴

装置（NMR）JMN-GSX-400を導入し、平成元年度までにNMRで測定したスペクトルを比較解析することにより製剤間の同等性を簡便に判定する方法いわゆるパターン分析法を概ね確立した。

平成2年度は、重要な補助成分である界面活性剤の定性分析法確立を目的に、市販製剤、模擬製剤及び各種補助成分を用いて、データポイント、フリップ角、パルス間隔、試料管、試料希釈濃度等の測定方法について検討を行った。

その結果に基づいて、ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテン等の界面活性剤について測定した結果、良好な測定結果が得られた。

4. 生物課

微生物農薬の検出

（BT剤散布後の圃場におけるB.t.菌の消長について）
微生物農薬が散布された後の作物体上での微生物の挙動を明らかにするため、キャベツ圃場にBT剤を散布し、B.t.菌検出法と消長について検討を行った。

圃場で生育させたキャベツの結球開始10日後に、BT水和剤1,000倍希釈液を1アール当たり20ℓで散布処理した。処理後7日毎にキャベツを採集し、外葉部と結球部を各々100g秤量した。この試料に滅菌生理食塩水500mlを加えブレンダーで磨砕した後、磨砕液を濾過し、滅菌生理食塩水で10倍希釈液と100倍希釈液を作製した。

この希釈液をB.t.選択培地上に塗布し、30℃24時間培養後培地上に発育したB.t.菌のコロニー数を計測した。

各サンプルともB.t.菌以外の細菌によるコロニーの形成がみられ、B.t.菌のコロニーの計測は困難であった。

今後、B.t.菌のキャベツ葉からの分離方法について、更に検討する必要がある。

5. 農薬残留検査課

農薬残留分析の省力化に関する研究

高速液体クロマトグラフ法による多成分分析法の開発前年度に引き続き、ガスクロマトグラフ（GC）による分析が困難な農薬を対象として、ゲル浸透クロマトグラフ（GPC）によるクリーンアップと組み合わせた高速液体クロマトグラフ（HPLC）での多成分分析法について、新たな農薬、作物を追加し本分析法の適用性について検討した。また、検出手段として新たにフォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器を導入し、スペクトル測定による定性能力、選択性及び感度の向上について検討した。

分析操作及びHPLCの操作条件は前年度に準じて行った。フォトダイオードアレイ検出器は取込波長を200～350nmに、蛍光検出器は励起波長280nm、蛍光波長

320nmに設定して測定した。

この結果、今年度新たに追加して検討したナプロアenリド、クロルフルアズロン、メソミル等6種の農薬のGPCからの溶出位置は、従来から設定していた分取範囲内に入ることが確認された。UV検出器（254nm）を用いた場合の検出限界は概ね0.04ppmで、一部の農薬・作物の組合せで妨害のため測定不能となったが、これ以外の場合は70%以上の回収率が得られることが確認された。蛍光検出器を用いた測定では、適用できる農薬が限定されるものの、選択性及び感度の点において格段の改善が認められ、スペクトルによる農薬の確認が可能性が示唆された。

フォトダイオードアレイ検出器によるスペクトルの確認は、各農薬とも0.1ppm程度で可能であり、特に農薬の散布層が不明な試料の分析に際してこのレベル以上の残留であれば、スペクトルによる農薬の確認が可能ことから、分析の信頼性の向上に有効な手段であることが確認された。また、UV検出器及び蛍光検出器による各農薬の最適波長での測定においても、感度の改善が図れたことから、分析対象農薬を定めて行う分析においては有効な手法として利用できることが確認された。なお、農薬の標準品のみによる本法への適用性については約90農薬についてフォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器による測定を行い、約7割の農薬についてUV吸収を認めるとともに14種類の農薬で蛍光検出器で測定可能であることを確認した。

6. 有用生物安全検査課

(1) 新規成分農薬の魚介類への毒性の検討

新規成分農薬14種類（殺虫剤5：フェノキシカルブ、ミルベメクチン、フェンピロキシメート、ピリダベン、アラニカルブ、殺菌剤4：ミクロブタニル、ジエトフェンカルブ、ヘキサコナゾール、プロピコナゾール、除草剤2：イマザキンアンモニウム塩、ジチオピル、植物成長調整剤3：メピコートクロリド、ウニコナゾールP、混合生薬抽出物）について、コイ及びミジンコに対する毒性試験を行いその結果に基づき、魚介類への毒性を評価した。

(2) 通常の使用状態に近い条件下におけるコイ及びヌカエビを供しての毒性試験

本年度はコイの他にヌカエビを供試生物として加え、水深5cmの模擬水田（1×2mのコンクリート枠）において実施した。

農薬散布後、コイの場合は0、1、3日後に、ヌカエビの場合は散布0、1、2、3、5日後に、供試コイ及びヌカエビを収容した金網籠を設置し、7日後まで毎日死亡個体数等を調査した。

供試農薬はコイについては、エスプロカルブ・ベンスルフロンメチル・SAP粒剤(7%+0.25%+3%)、エトフェンプロックス・カルタップ粒剤(1%+4%)、及び過酸化カルシウム粉粒剤(16%)を供し、ヌカエビについてはエトフェンプロックス乳剤(10%)を供した。

コイに対して、エスプロカルブ・ベンスルフロンメチル・SAP粒剤及びエトフェンプロックス・カルタップ粒剤は、農薬散布3日後でも、散布当日と同程度の影響を示した。また、水田に多量に使用される過酸化カルシウム粉粒剤のコイへの影響は認められなかった。

なお、甲殻類に対する影響が予測されるエトフェンプロックス乳剤のヌカエビに対する毒性消失には2~5日間を要した。

(3) 農薬の藻類に及ぼす影響

食物連鎖における第一次生産者の藻類(植物プランクトン)に対する農薬の安全性評価法検討を目的に、昨年度に引続き実験を行った。水田用空中散布剤の殺虫剤及び殺菌剤34剤(原体)を所定濃度添加したAAP培地に*Chlorella vulgaris*を接種し、経時的に藻類の増殖量を計測し、その濃度における阻害率を求め、EC50値を算出した。増殖量は自動粒子測定装置で、細胞数/ml及び細胞容積/mlを24時間毎72時間後まで測定した。なお、阻害率の算出は面積法によった。

藻類の増殖に影響を及ぼさなかった剤は、殺虫剤76%、殺菌剤47%で、前年度調査した除草剤23%より両者とも高率であった。殺虫剤においては、有機りん系化合物とカーバメート系化合物間で差異は認められなかった。殺菌剤においても化合物による差異は認められなかったが、細菌病防除剤は概ね中程度の増殖阻害を示した。

7. 成果の発表及び広報

(平成2年4月1日~平成3年3月31日)

本年度における所員の調査・研究活動は、原著及び短報として本報告に収録したほか、学会等で行った講演・報告は以下のとおりである。

○石井康雄・阪本 剛・朝倉健司・足立教好・谷内純一：活性炭フロリジルミニカラムを使用した農薬残留分析のための精製法 日本農薬学会誌, 15, 205~210 (1990)

○石井康雄：高速液体クロマトグラフィーによるチオフェネートメチルとその分解・代謝物の残留分析法 農薬誌, 15, 211~216 (1990)

○石井康雄・足立教好・谷内純一・阪本 剛：自動ゲル浸透クロマトグラフィーを用いた農薬残留分析のための精製法 農薬誌, 15, 225~230 (1991)

○石井康雄・谷内純一・阪本 剛：Hall型電気伝導度

検出器(ハロゲンモード)付ガスクロマトグラフを用いた有機塩素系農薬の残留分析 農薬誌, 15, 231~236 (1991)

○石井康雄・朝倉健司・阪本 剛：電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いたアニリン化合物の残留分析法 農薬誌, 15, 435~438 (1991)

○石井康雄・朝倉健司・阪本 剛：電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いたフェノール類の微量分析 農薬誌, 15, 445~448 (1991)

○渡辺高志：固体吸着法による大気中の土壌くん蒸剤の捕集方法 分析化学, 39, T77~T81 (1990)

○小倉一雄：植物葉の濡れに関する研究(第4報)ピーマン・サツマイモ・ダイズのepicuticular-waxの組成と濡れ特性 第16回日本農薬学会大会講演要旨集, 49 (1991.3)

○清野義人・伊藤和夫・木下光明・阪本 剛：ゲル液体クロマトグラフを用いた農薬の残留分析に関する検討IV. 高速液体クロマトグラフ法による多成分分析への適用(第2報) 同, 113 (1991.3)

○渡辺高志：シリカゲルカートリッジカラムを用いた大気中の農薬の捕集方法の検討 同, 116 (1991.3)

○北村恭朗・稲生圭哉・村川 昇：水田中での農薬の挙動に関する研究(第1報) 同, 119 (1991.3)

○西内康浩：農薬の魚毒性低減化に及ぼす活性炭の効果 同, 130 (1991.3)

○藤田肖子：農薬の藻類に及ぼす影響 同, 131 (1991.3)

IV 技術連絡・指導

1. 資料

下記の資料を取りまとめて関係機関に配布し、農薬の安全使用の指導を図った。

○平成2年度主要病害虫(除草剤は主要作物)に適用のある登録農薬一覧表(平成2年9月30日)

2. 打合せ会議等による連絡・指導

農薬関連の各種会議に出席し、連絡・指導を行ったが、主なものを列挙すると以下のとおりである。

農蚕園芸局関係

○農業資材審議会農薬部会

○農業資材審議会農薬部会小委員会

○平成2年度植物防疫地区協議会

○平成2年度農林水産航空事業検討会

○農薬安全指導等特別対策事業及び農薬安全使用推進特別対策事業の成績検討会

○ゴルフ場病害虫等安全防除対策打合せ会議

試験研究機関関係

- 平成2年度総合農業試験研究推進会議試験研究推進部会及び評価・情報部会
- 環境庁（水質保全局）関係
- 農薬登録保留基準設定技術検討会

- 農薬残留対策調査事業成績検討会
- 農薬生態影響評価法確立調査検討会
- 厚生省（生活衛生局）関係
- 残留農薬安全性評価委員会

3. 研修会等における講義・講演

派遣職員名	年月日	講義・講演内容	研修会等名称	開催場所
宮坂初男	2.4.19	農薬について	平成2年度農林水産航空事業新規従事者対象一般研修	農林水産航空協会
永吉秀光	2.10.5	農薬の安全性に関する指導について	平成2年度市町村環境担当課長研修会	滋賀県
田盛直一	2.10.25	農薬の安全使用について	ゴルフ場農薬使用管理研修会	静岡県
阪本剛	2.11.21	農薬の安全性評価及び各種基準の設定	農薬管理指導士養成研修	東京都
山下幸夫	2.12.18	農薬の安全性評価	農薬管理指導士養成研修	茨城県
坪井福俊	3.2.14 ～15	殺菌剤の生物検定法について	国際協力事業団農薬利用研修コース	兵庫インターナショナルセンター
阪本剛	3.2.18 ～26	農薬の残留分析法	国際協力事業団農薬利用研修コース	兵庫インターナショナルセンター
正垣優	3.2.22	農薬の安全性評価	農薬管理指導士養成研修	岩手県
西内康浩	3.3.5	水産生物に対する農薬の影響	化学物質生態影響特別研究セミナー	国立環境研究所
内藤久	3.3.13	農薬の安全性評価及び各種基準の設定	農薬管理指導士認定研修会	埼玉県

4. 研修生の受入

氏名	期間	事項	依頼者	場所
（国内研修生） 宮崎県総合農業試験場 三角敏明	2.10.8 ～ 2.10.27	農薬残留分析の技術と知識修得	宮崎県総合農業試験場	農薬検査所

5. 技術協力のための職員の海外派遣

派遣職員名	期 間	派 遣 目 的	依 頼 者	派 遣 国
永 吉 秀 光	2.4.10 ～5.8	農薬分析に係る技術指導	国際協力事業団	インドネシア
楯 谷 昭 夫	2.5.13 ～5.19	FAOフィールドプロジェクトに関する地域ワークショップ	国際連合食糧農業機関	中国
石 川 光 一	2.6.30 ～7.22	FAOフィールドプロジェクトに関する現地評価ミッション	国際連合食糧農業機関	タイ, 中国, マレーシア, ベトナム
山 内 淳 司	2.11.17 ～12.2	農業セミナー(農薬危害防止)	国際協力事業団	パラグアイ
阪 村 基	63.10.16 ～	FAOフィールドプロジェクト(農業国際行動規範)	国際連合食糧農業機関	タイ

6. 見 学

農薬は、農作物の安定生産に欠くことのできない重要な資材として使用されているが、近年、環境に及ぼす影響にも関心が持たれている。

本年も、農薬の使用に関して現場の指導者である農業協同組合の方や、東南アジアの諸国から多数の見学があった。平成2年度における依頼文書による見学状況は次のとおりである。

来 訪 者	年月日	来訪目的	依 頼 者
農薬利用集団研修コース 研修生 9名 引率者 1名	2.4.10	施設の見学及び業務内容の研修	国際協力事業団兵庫インターナショナルセンター所長代理
海外技術研修員 研修生 11名 引率者 2名	2.5.17	〃	国際協力事業団筑波国際農業研修センター所長
中国農業部農薬検査所訪日団 職 員 2名 同行者 2名	2.5.30	〃	財団法人植物調節剤研究協会会長
東京大学農学部農業生物学 学 生 31名 教 官 2名	2.6.21	〃	東京大学農学部農業生物学科主任
保内農協青年部 部 員 10名	2.8.8	〃	保内農業協同組合組合長
パキスタン農業省農業研究評議会局長 同 行 者 1名	2.9.18	〃	飛島建設(株) 国際事業部営業課長
韓国農村振興庁農薬研究所, 農薬資材検査所 職 員 2名 同行者 2名	2.10.23	〃	住友化学工業(株) 第2農薬事業部第2海外営業部長
タイ国カセサート大学農学部 教 官 2名 同行者 1名	2.11.1	〃	名古屋大学農学部教授
タイ国農業省訪日団 団 員 3名 同行者 1名	2.12.5	〃	農薬工業会専務理事
農業青年クラブ 部 員 16名	3.2.28	〃	群馬県農業改良普及所長
三重県環境保全事業団 職 員 3名	3.3.12	〃	三重県環境保全事業団理事長
東京農林規格検査所 職 員 6名	3.3.20	〃	東京農林規格検査所長

V 機構・定員・予算等

1. 機構・定員

(1) 機構(平成3.3.31現在)

職 名	現 在 員 数		
	行政(一)	行政(二)	計
所 長	1		1
總 務 課	9	1	10
課 長 補 佐			
庶 務 係			
人 事 係			
管 理 厚 生 係			
会 計 係			
用 度 係			
檢 查 第 一 部 長	1		1
企 画 調 整 課	9		9
檢 查 管 理 官			
連 絡 調 整 係			
取 締 企 画 係			
登 録 調 査 係			
情 報 管 理 係			
毒 性 檢 査 課	8		8
檢 査 管 理 官			
安 全 基 準 係			
毒 性 係			
作 業 安 全 係			
毒 性 試 験 機 関 審 査 係			
農 藥 環 境 檢 査 課	4		4
土 壤 檢 査 係			
水 質 檢 査 係			
大 気 檢 査 係			
技 術 調 査 課	6		6
檢 査 管 理 官			
資 材 調 査 係			
障 害 生 物 調 査 係			
原 体 副 成 分 調 査 係			
補 助 成 分 調 査 係			
檢 査 第 二 部 長	1		1
化 学 課	7		7
檢 査 管 理 官			
第 1 係			
第 2 係			
第 3 係			
第 4 係			

職 名	現 在 員 数		
	行政(一)	行政(二)	計
生 物 課	8		8
檢 査 管 理 官			
殺 虫 剤 係			
殺 菌 剤 係			
除 草 剤 係			
成 長 調 整 剤 係			
生 物 農 薬 係			
農 薬 残 留 檢 査 課	7		7
檢 査 管 理 官			
残 留 檢 査 第 1 係			
残 留 檢 査 第 2 係			
残 留 檢 査 第 3 係			
残 留 檢 査 第 4 係			
有 用 生 物 安 全 檢 査 課	4		4
檢 査 管 理 官			
淡 水 魚 介 類 係			
海 水 魚 介 類 係			
水 産 植 物 係			
陸 生 動 物 係			
調 整 指 導 官	1		1
農 薬 審 査 官	1		1
計	67	1	68

(2) 定 員 (平成2年度)

行政職(一) 所 長	1
部 長	2
課 長	9
課 長 補 佐	1
係 長	4
調 整 指 導 官	1
農 薬 審 査 官	2
檢 査 員	44
一 般 職 員	3
計	67
行政職(二) 技 能 職 員 (乙)	1
合 計	68

2. 職員の異動・研修

(1) 職員の異動(平成2.4.1~3.3.31)

1) 転入

官職	氏名	年月日	旧	新
技	野口 高俊	2.4.1		検査第一部毒性検査課(採用)
"	稲生 圭哉	2.4.1		検査第一部技術調査課()
"	廣瀬 欣也	2.4.1		検査第二部化学課()
事	岩本 紀代史	2.4.1	農蚕園芸局畑作振興課	総務課課長補佐
"	前田 保司	2.4.1	農業者大学校	総務課用度係長
技	山内 淳司	2.4.1	環境庁水質保全局	検査第一部技術調査課長
"	石嶋 直之	2.4.1	横浜植物防疫所東京支所	検査第一部企画調整課
"	鈴木 修	2.4.1	食糧庁管理部検査課	検査第二部化学課
"	木下 光男	2.4.1	仙台肥飼料検査所	検査第二部農薬残留検査課
"	扇田 哲明	3.1.1	横浜植物防疫所成田支所	検査第一部農薬環境検査課

2) 転出

官職	氏名	年月日	旧	新
技	松本 安生	2.4.1	農薬検査所長	横浜植物防疫所長
"	森田 征士	2.4.1	農薬審査官	農蚕園芸局植物防疫課
"	高橋 秀徳	2.4.1	検査第一部企画調整課	横浜植物防疫所東京支所
"	白垣 龍徳	2.4.1	検査第一部技術調査課兼農林水産 技術会議事務局研究開発課	農林水産技術会議事務局研究開発課
"	田中 稔	2.4.1	検査第二部生物課殺虫剤係長	関東農政局生産流通部農産普及課
"	佐伯 聰	2.4.1	検査第二部農薬残留検査課検査管理官	那覇植物防疫事務所
事	安玉 英夫	2.4.1	総務課課長補佐	農蚕園芸局総務課
"	兒藤 重典	2.4.1	総務課用度係長	農業者大学校
技	小峯 喜美夫	2.10.1	検査第一部農薬環境検査課土壌検査係長	農蚕園芸局植物防疫課

3) 所内の異動

官職	氏名	年月日	旧	新
技	上垣 隆夫	2.4.1	検査第一部長	農薬検査所長
"	刈屋 明	2.4.1	検査第一部企画調整課長	検査第一部長
"	小田 雅府	2.4.1	検査第一部技術調査課長	検査第一部企画調整課長
"	池田 淳一	2.4.1	検査第一部企画調整課	検査第二部生物課(兼)植物防疫課
"	大森 正和	2.4.1	検査第一部企画調整課	検査第二部生物課
"	土井 幸代	2.4.1	検査第二部化学課	検査第二部化学課第4係長
"	三井 幸生	2.4.1	検査第二部化学課	検査第一部企画調整課
"	土井 茂幸	2.4.1	検査第二部生物課成長調整剤係長	検査第二部生物課殺虫剤係長
"	沼野 義人	2.4.1	検査第二部生物課(兼)植物防疫課	検査第二部農薬残留検査課
"	坂治 己	2.4.1	検査第二部有用生物安全検査課	検査第二部生物課
"	百弘 弘	2.6.11	検査第二部化学課長	検査第一部農薬環境検査課長
"	渡辺 信久	2.6.11	検査第二部化学課検査管理官	検査第二部化学課長
"	内藤 久夫	2.6.11	検査第一部企画調整課検査管理官	検査第二部化学課検査管理官
"	山下 幸夫	2.6.11	検査第二部生物課検査管理官	検査第一部企画調整課検査管理官
"	村川 昇	2.6.11	検査第一部技術調査課管理官	検査第一部農薬環境検査課併任
"	金子 圭一	2.6.11	検査第一部技術調査課汚染調査係長	検査第一部技術調査課資材調査係長
"	渡辺 高志	2.6.11	検査第一部技術調査課資材調査係長	検査第一部技術調査課障害生物調査係長
"	小北 喜美夫	2.6.11	検査第一部技術調査課大気調査係長	検査第一部農薬環境検査課土壌検査係長
"	村家 恭朗	2.6.11	検査第一部技術調査課	検査第一部農薬環境検査課
"	稲生 圭哉	2.6.11	検査第一部技術調査課	検査第一部農薬環境検査課
"	谷内 純一	2.10.1	検査第二部農薬残留検査課	検査第二部農薬残留検査課(兼)植物防疫課

(2) 研 修

官職	氏 名	所 属	期 間	事 項	場 所
技	野 口 高 俊	毒 性 検 査 課	2.4.17 ~2.4.20	平成2年度Ⅱ種試験採用者研修	農林水産研修所(八王子市)
"	稲 生 圭 哉	技 術 調 査 課	"	"	"
"	廣 瀬 欣 也	化 学 課	"	"	"
事	岩 本 紀 代 史	総 務 課	2.5.17 ~2.5.24	第16回関東地区課長補佐研修	人事院関東事務局(千代田区)
技	石 川 光 一	毒 性 検 査 課	2.6.4 ~2.6.8	平成2年度管理者研修	農林水産研修所(八王子市)
"	伊 藤 和 男	農 薬 残 留 検 査 課	2.7.2 ~2.7.13	第185回専門課程	日本原子力研究所(文京区)
"	伊 藤 和 男	農 薬 残 留 検 査 課	2.7.16 ~2.8.9	第227回R I基礎課程	日本原子力研究所(文京区)
"	藤 田 肖 子	有 用 生 物 安 全 検 査 課	2.5.7 ~2.8.4	農薬に係る毒性評価技術研修	残留農薬研究所(小平市)
"	安 藤 由 紀 子	毒 性 検 査 課	2.9.1 ~2.11.30	専門技術(毒性)研修	国立衛生試験所
"	内 藤 久	化 学 課	2.9.26 ~2.11.15	外国語(会話)研修	植物防疫所研修センター(横浜市)
"	野 口 高 俊	毒 性 検 査 課	2.10.1 ~2.12.28	農薬に係る毒性評価技術研修	残留農薬研究所(小平市)
"	亀 谷 充	毒 性 検 査 課	2.10.1 ~2.10.30	平成2年度農村派遣研修	浅岡正玄宅(愛知県西尾市)
"	木 下 光 明	農 薬 残 留 検 査 課	2.10.16 ~2.10.19	平成2年度第2回行政研修(係員級)	人事院公務員研修所
"	渡 辺 信	化 学 課	2.11.15 ~2.11.21	第15回関東地区管理者研究会	人事院関東事務局
"	金 子 圭 一	技 術 調 査 課	2.12.10 ~3.3.8	農薬に係る毒性評価技術研修	残留農薬研究所(小平市)
"	宮 坂 初 男	生 物 課	3.1.21 ~3.1.25	課長補佐研修	農林水産研修所(八王子市)
"	刈 屋 明	検 査 第 一 部 長	3.2.12 ~3.2.15	平成2年度幹部研修	農林水産省本省
事	上 田 義 彦	総 務 課	3.2.18 ~3.3.1	平成2年度一般職行政研修(第2班)	農林水産研修所(八王子市)
技	薮 田 重 樹	有 用 生 物 安 全 検 査 課	3.2.25 ~3.2.28	平成2年度病害虫防除所実務研修	茨城県病害虫防除所

3. 予算・施設費

(1) 予算

平成2年度における歳入額及び歳出予算額は、過去3年間と比較すると次のとおりである。

1) 年度別歳入額

区 分	62	63	元	2
印 紙 収 入	156,791	127,384	147,082	181,480(千円)
農 薬 登 録 手 数 料	156,791	127,384	147,082	181,480
農 薬 依 頼 検 定 手 数 料	0	0	0	0
現 金 収 入	186	162	149	798
宿舎貸付料, 返納金及び不用物品売払代	186	162	149	798
計	156,977	127,546	147,231	182,278

2) 年度別歳出予算額

区 分	62	63	元	2
人 当 経 費	314,566	327,109	337,894	372,960(千円)
運 営 事 務 費	22,423	22,212	22,198	22,061
農 薬 検 査 事 業 費	57,883	59,800	59,394	60,214
庁舎等管理特別事務費	6,999	6,647	6,617	7,202
残留分析等調査研究事業費	14,606	14,606	15,015	15,131
農薬取締強化事業費	1,391	1,391	1,454	1,513
農薬毒性試験機関検査事業費	5,001	5,001	5,316	5,185
農薬製剤増強成分検査特別対策事業費	15,440	15,440	15,903	15,903
散布農薬変異挙動検査技術確立事業費	0	15,088	16,093	24,378
海外農薬情報収集管理事業費	0	0	7,951	7,991
生理活性農薬等登録検査基準確立事業費	6,755	6,960	0	0
水産動物毒性検査対策事業費	11,224	0	0	0
小 計	456,288	474,254	487,835	532,538
施 設 整 備 費	30,393	21,024	48,418	65,825
小 計	30,393	21,024	48,418	65,825
合 計	486,681	495,278	536,253	598,363

(2) 施設

1) 施設の現状

① 土地

区 分	所在地	敷地面積
庁舎及びほ場敷地	小平市鈴木町2-772	15,850 m ²
宿舎敷地	〃	757 m ²
計		16,607 m ²

② 建物

区 分	棟 数	延面積	備 考
事務所建	10 棟	3,729 m ²	
雑屋建	22	922	
倉庫建	2	79	
住宅建	3	206	
計	37	4,936	

2) 主要購入物品

品 目	規 格
ガスクロマトグラフ	ヒューレッドパッカード 5890A
デジタルイメージプリンター	富士フィルム FDI P6000
情報処理機	NEC PC-9801
分光光度計	島津 UV-1200
蛍光検出器	島津 RF-550
UVモニタ	島津 SPD-6A
検出器	横河 19234B

効率的な残留農薬分析法の開発に関する研究

石井 康雄

＜ 目 次 ＞

緒論	21
第1編 残留農薬分析の効率化のための各種手法の開発	24
第1章 分取液体クロマトグラフィーによる残留農薬分析のための試料の精製法	24
第1節 ゲル浸透クロマトグラフィーおよび分配クロマトグラフィーの残留農薬分析の精製法としての評価	25
第2節 自動ゲル浸透クロマトグラフィーの農薬の残留分析への応用—アルカリ熱イオン化検出器および電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーによる測定	34
第3節 ゲル浸透クロマトグラフィーと Hall 型電気伝導度検出器付ガスクロマトグラフィーの残留農薬分析への応用	39
第4節 摘要	45
第2章 残留農薬分析のための簡易分析法—活性炭・フロリジルミニカラムの利用	45
第3章 電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーの残留農薬分析への応用	50
第1節 フェノール化合物の汎用分析法	50
第2節 アニリン化合物の汎用分析法	55
第3節 摘要	59
第2編 代表的農薬の効率的残留分析法の開発とその相互比較	60
第4章 殺菌剤（ベンズイミダゾール系）	60
第1節 ベノミルおよびチオファネートメチルの想定分解・代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる分離条件の検討	60
第2節 チオファネートメチルの光分解生成物の分離	66
第3節 高速液体クロマトグラフィーによるチオファネートメチルとその分解・代謝物の残留分析法	69
第4節 薄層蛍光デンストメトリーによるMBCの残留分析法	73
第5節 摘要	77
第5章 除草剤（ピピリジリウム系）	77
第1節 高速液体クロマトグラフィーの操作条件の検討	77
第2節 パラコート除草剤の残留分析	83
第3節 摘要	85
第6章 殺虫剤（カーバメイト系）	86
第1節 カーバメイト系殺虫剤のジアゾカップリング反応および薄層クロマトグラフィーを用いた分光光度分析法の開発	86
第2節 カーバメイト系殺虫剤の蛍光光度法による分析法の開発	89
第3節 カーバメイト系殺虫剤のモノクロロアセチル誘導体のガスクロマトグラフィーによる分析法の開発	91
第4節 カーバメイト殺虫剤の高速液体クロマトグラフィーによる分析法の開発	99
第5節 カーバメイト殺虫剤のポリアミド薄層クロマトグラフィーによる定性分析法	105
第6節 摘要	110

総合考察および汎用多成分分析法の提案	113
結論	120
謝辞	121
引用文献	122
SUMMARY	127
付表	130
APPENDIX	131

緒 論

世界の人口は今世紀末には60数億に達すると予測されており、世界的にも食糧の増産は重要課題である。今日、我が国の食糧自給率はカロリー自給率で49パーセント、穀物自給率で30パーセントにまで低下し、我が国の農業は自給率の向上、生産費の引き下げ、生産規模の拡大などの重大な課題を抱えている¹⁾。しかし、我が国は、元来国土が狭小であるために土地の高度利用による生産性の向上を図ることが必要である。そのために、病害虫、雑草の防除は不可欠である。我が国は気候的にはアジアのモンスーン地帯に位置し、夏季は高温、多湿であり、栽培されている作物の種類が多く、多種類の病害虫が発生し、放置すれば被害は甚大である。世界的にも病害虫および雑草により生産可能生産高の約半が損なわれるといわれている²⁾。FAOの調査ではヨーロッパが平均25パーセント、アメリカ29パーセント、アフリカ42パーセント、アジア43パーセントの収獲が病害虫と雑草によって失われることを示している³⁾。

病害虫などの防除の方法は大きく三つに分けられる⁴⁾。第一は生物的防除方法で、抵抗性品種の利用などの耕種的防除方法と天敵などを利用する方法がある。耕種的防除方法だけでは病害虫防除には限界があり、雑草に対しては作物自体が雑草の生育を抑制する物質でも放出しない限り雑草を抑制することは不可能である。また、天敵などを用いる防除方法は研究例が多く、かなりの成果が期待できるが、大規模に実施しなければその効果进行评估することはできない。

第二は物理的防除法である。例えば、銀色のフィルムマルチを用いて野菜類のアブラムシを防ぐ方法、黄色の虫取りリボンによるオンシツコナジラミ防除などが実用化されているが、未だ応用範囲が狭く今後の研究を待つ必要があるが、雑草防除では除草機の利用がかなり普及している。

第三は化学的防除法であり、今日の病害虫、雑草の防除の主流をなしている方法である。農薬が本格的に使用されるようになったのは第2次世界大戦後であり、農薬はその幅広い効果と速効性から広く使用され、戦後の我が国の食糧増産に大きく貢献してきたことは衆目の一致するところであろう。

我が国で使用されてきた農薬は第2次世界大戦を境にして大きく変化している。昭和23年に農薬取締法が制定される以前は、ハ酸鉛、硫酸ニコチン、マシン油、chlorpicrin、無機銅、石灰硫黄合剤、硫黄、無機および有機水銀等が使用されていたが、昭和23年以降は戦時中に開発された有機合成農薬が次々に導入された。

昭和23年から25年にかけてはBHC, DDT, chlordane, TEPP, 2,4-Dが、昭和26年から29年にかけてはaldrin, dieldrin, endrin, EPN, parathion, malathion, zineb, captan, MCPなどが使用されるようになった。BHCによるウンカ類の防除、有機水銀によるいもち病の防除、parathionおよびmethyl parathionによるニカメイチュウの防除、2,4-D, MCPによる雑草防除は稲作に大きな変革をもたらして生産性が著しく向上した。

昭和30年代になるとheptachlor, diazinon, DDVP (dichlorvos), DEP (trichlorfon), NAC (carbaryl), maneb, PCPが実用化され、昭和36年から40年にかけてはMEP (fenitrothion), dimethoate, PA P (phenthoate), disulfoton, CPMC, PHC (propoxur), kasugamycin, blasticidin-S, NIP (nitrofen), CNP (chlornitrofen), paraquatなどが実用化された。この時代は急性毒性の低い農薬の開発に重点が置かれた。この傾向は昭和40年代になっても継続し、散布作業者の危害防止、農産物中の残留農薬対策、有用動植物に対する安全対策が重視され、昭和43年には食品衛生法に基づき、砒素、鉛、γ-BHC, DDTおよびparathionについて4作物(きゅうり、トマト、ぶどう、りんご)の残留基準が設定された。それ以来、農薬登録に当たり毒性および残留性に関する検査が強化された。その後、次々と残留基準が追加されており、今日26農薬、53食品について残留基準が定められた。さらに、昭和46年には農薬取締法が改正され、残留農薬の安全性、環境保全の対策が一層強化され、農薬の安全性評価の基礎ができた⁵⁾。

現代の農薬の安全性の評価は、主として、登録申請に当たり申請者から提出される毒性および残留性に関する試験成績を基にして実施されている。まず、種々の毒性試験成績(急性、亜急性、慢性、発癌性、催奇形性、繁殖性、変異原性、特殊毒性、薬理、動植物代謝など)を評価して、実験動物における農薬の最大無作用量を求め、ヒトと実験動物との種差およびヒトの個人差を考慮して、一定の安全係数(100倍以上)を乗じてヒトに対する最大無作用量としている。この値は農薬mg/ヒトの体重kg・日で表される。ヒトがその農薬を毎日一生涯食べた場合でもヒトの健康に悪影響を及ぼさない安全な量として1日許容摂取量(Acceptable Daily Intake, ADI)と呼ばれている。

次に、農薬の使用による各農作物における残留農薬の実態を測定することが必要である。農作物の病害虫を防除し、雑草を抑制するための農薬の使用方法に従って、実際の圃場において農作物を栽培し、防除計画に従って

農薬を散布する。収穫物について散布農薬の残留量を調査し、散布濃度、散布回数、散布間隔、最終散布日から収穫日までの日数など、いろいろの組合せについて対象作物ごとに農薬の残留量を調査する。全ての適用作物について農薬残留量を調査し、各作物の1日当りの平均摂取量を国民栄養調査などから算定し、その量に農薬の残留濃度を乗じた積の総和が、先に述べたADIに日本人の平均体重の50kgを乗じた値を越えないように農薬の残留濃度を作物ごとに定めている。この濃度が農薬の残留基準である。農薬取締法では、食品衛生法で残留基準が定められていない農薬（新たに開発された農薬など）について残留基準を設定し、登録検査の基準としており、この基準を登録保留基準値と呼んでいる。登録保留基準は作物群（米、麦・雑穀、果実、野菜、芋類、豆類、茶、糖料、ホップなど）ごとに基準が設定されており、現在229農薬について基準が定められている⁶⁾。

農薬の残留基準が定められるとともにこれらの基準を超えないような農薬の安全な使用方法が検討され、農薬の使用濃度、使用量、使用時期、使用回数などが定められる。

欧米先進諸国においては我が国と同様の残留農薬の安全性評価の体制が確立されているものの、発展途上国では必ずしも制度の整備が十分でない。また、食糧の貿易は世界的な規模で行われており、農産物の輸出国では国ごとの残留基準の相違による貿易上の摩擦を回避するために残留農薬に関する国際的な統一基準の設定を望んでいる。

このため、国際連合では食糧農業機構（FAO）と世界保健機構（WHO）が協力して、世界的に統一した食品規格を定めることになった⁷⁾。残留農薬に関する国際的な評価作業は1965年にその初めての成果がモノグラフの形で公表され⁸⁾、その後現在も精力的に評価が行われている。1988年までに、設定作業中のものを含めて160種類の農薬の残留基準が設定された⁹⁾。

一方、我が国の農薬の残留基準は国際基準などと異なり、一般に小さな値となっている。アメリカ合衆国、カナダあるいはオーストラリアなどの食糧輸出国は自国の残留基準またはFAO/WHOの国際残留基準に従って農産物の生産を行っており、その基準が我が国のそれと異なることがある。このため、輸入農産物の残留農薬問題は時として国際的な問題に発展しかねない状態にある。その大きな相違点は、国際基準および欧米の残留基準では農産物が収穫され、それが調理・加工され、食品として人が食する時点での残留基準を段階的に設定している点である。この段階的な基準は調理・加工の実験に基づき定められているので現実には人が食品と共に摂取する残留農

薬量は人の1日許容摂取量（ADI×50kg）をはるかに下回り、安全性上の問題はない。我が国においても、残留農薬の基準の設定に当たって少なくとも調理・加工による残留農薬の消失を考慮し、実質的な残留農薬の摂取量が1日許容摂取量以下となるような方策を採用することが国際的な調和を図る上で重要である。

しかし、我が国の消費者は輸入農産物の残留農薬に高い関心を持ち、輸入食品の安全性確保対策の強化を望んでおり、欧米先進諸国で行われているような食品中の残留農薬の総摂取量調査（Total Diet Study）¹⁰⁻¹⁴⁾を積極的に行なう必要がある。

我が国では、農薬が登録される時点で作物ごとに残留基準が定められるとともに残留分析法が定められている。この限りにおいては、感度、精度ともに必要十分な分析法ではあるが、これらの分析法は個々の農薬一作物ごとに定められており、複数の農薬を同時に分析できるようにはなっていない。残留農薬の総摂取量調査のためには多種類の農産物（食品）中の複数の農薬を分析する必要がある。そのためには別途分析法を工夫する必要がある。これらの調査では必ずしも高感度の分析法は必要でなく、なるべく簡便、迅速な分析法を必要としている。したがって、採用される分析法は農薬残留基準の $\frac{1}{10}$ ～ $\frac{1}{5}$ の濃度が検出できればよいと考える。ただし、高感度分析が容易であれば試料、試薬などの量が節約できるため、分析経費の節減が可能となる。また、高価な測定装置がなくても必要な分析ができるように1つの農薬についても複数の分析法が必要である。環境中のダイオキシン類の分析にみられるように残留レベルが低く、毒性の強い化合物の分析法は高感度を要求されるが、一般に使用されている農薬の残留調査では、むしろ分析の感度と精度を多少犠牲にしても迅速性を求められる。

残留分析法には、抽出-精製-測定のプロセスがある。抽出過程は、この20年間に多くの研究例があり、試料から残留農薬を抽出する場合アセトン、メタノールあるいはアセトニトリルのような極性溶媒が優れており、水分含有量の少ない試料では水で試料を湿らせ、組織を解かすことによって残留農薬の回収率が改善されることが判明した。測定法には比色法、蛍光光度法、ガスクロマトグラフィーあるいは高速液体クロマトグラフィーなどがあるが、どの測定法を採用するかによって精製法を工夫する必要がある。精製過程は残留分析法の迅速性、簡便性に大きく影響し、当該分析法の適用性、感度および精度を決定する重要な要素である。さらに、我が国では幅広い適用性を持つ残留分析法が未成熟であり、特に公定法としては未設定である。我が国では汎用分析法として報告されている研究例はあるものの、その適用範囲は有機りん

系農薬のような類縁化合物に限られており、種々の農薬の同時分析が可能な汎用分析法の開発は急務である。

このため、本研究においては

- (1) 残留分析の試料の精製のための分取液体クロマトグラフィーの応用
- (2) 従来の精製法の汎用化と分析経費の節減
- (3) 高速液体クロマトグラフィーなどの新しい分析技術の導入による高感度分析法の開発および従来の分析法の改良

について研究を行なった。

第1編 残留農薬分析の効率化のための各種手法の開発

第1章 分取液体クロマトグラフィーによる残留農薬分析のための試料の精製法

現在、我が国では食用農作物に使用される農薬は残留基準と残留分析法が定められている。今日の残留分析法ではガスクロマトグラフィー（GC）が最も多用され、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）がそれに次ぎ、ppbのオーダーの分析が可能になった。このような高感度分析が可能になったことは測定機器の発達に負うところが大きであるが、機器の性能を十分に発揮させるために残留農薬の抽出、精製に多くの開発、改善が行なわれたこともおおいに貢献している¹⁵⁻²⁵⁾。

有機りん系農薬の分析では炎光光度検出器付ガスクロマトグラフィー（FPD-GC）を用いることで精製操作を簡略化することができる。アルカリ熱イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー（FTD-GC）を用いればFPD-GCに比べて10倍程度の感度の向上を図ることができるが、その分高度の精製操作が必要である。このことはFTD-GCを用いてカーバメイト系農薬のような窒素を含む農薬を測定する場合も同様である。有機塩素系農薬を電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー（ECD-GC）で測定する場合は相当に高度の精製操作が必要である。また、紫外吸光検出器付高速液体クロマトグラフィー（UVD-HPLC）を用いて測定する場合も高度の精製手段が必要である。

試料からの残留農薬の抽出は振とう法または攪拌法が一般に用いられている。ソックスレー抽出は操作に長時間を要することおよび水分の多い試料が取り扱いにくいことなどの理由により最近では用いられなくなった。我が国で農薬残留分析が始まった当初（昭和40年代初め）はBHCやDDTなどの有機塩素系農薬の分析が主であったので抽出溶媒としてはそれらの農薬をよく溶解させ、しかも水と混合しないヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタンなどの無極性または中極性溶媒が多用された^{26, 27)}。極性溶媒は試料中の水分を取り込み、後の精製操作を煩雑にするために使用されなかった。しかし、その後の研究でアセトン、メタノールあるいはアセトニトリルなどの水と自由に混合する極性溶媒が優れた抽出効率を持つことが明らかになり、さらに試料は乾燥しているよりは湿っている方が残留農薬の抽出効率がよいことが明らかになった^{15-25, 38-48)}。これらの事実をいつ頃誰が提唱したかについては定かでない。これらのことは農薬の登録申請に必要な残留性に関する試験成績試料を作成する

過程で経験的に編み出されたものと思われる。しかし、極性溶媒を使用すれば抽出液は多量の水を含むため測定機器の性質上水を取り除く必要がある。

水を除去するために抽出液中の有機溶媒を蒸発させるか、または抽出液の一部を取り塩化ナトリウム溶液を加えて希釈した後、ヘキサンまたはジクロロメタンを用いて抽出する方法が一般的である。

精製法は多くの工夫、改善がなされてきた。現在、一般に使用されている方法はシリカゲル、アルミナあるいはフロリジルを吸着剤としたカラムクロマトグラフィー（CC）である。我が国の公定分析法ではフロリジルが最も多用されている¹⁷⁻²⁵⁾。CCは移動相溶媒の極性を順次強くすることによって極性の異なる多くの農薬の精製に用いられてきた。これに対し、薄層クロマトグラフィー（TLC）は高い精製効果を持ちながらその操作のはん雑さ故に最近では使用されることが少なくなった。CCに次いで多用されている手法は凝固法である²⁸⁻³⁵⁾。凝固法は当初 carbaryl の精製法²⁸⁻³¹⁾として用いられ、アセトンと水の混合液中の溶解度の差を利用して脂溶性のきょう雑物を凝固させて除く方法である。アセトンの混合割合を10%から最大50%程度まで変えることで幅広い農薬の精製に利用することができる³⁴⁾。しかし、アセトンの割合が多くなるほど精製効果は低下し、他の精製法を併用しなければならなくなる。

油脂を多く含む試料の場合は脱脂操作を行わなければならない。通常はヘキサン/アセトニトリル分配が用いられる。特殊な技法としては sweep co-distillation 法^{36, 37)}、酢酸亜鉛を用いる方法³⁸⁾あるいはアルミナ吸着剤を用いる方法³⁹⁾が報告されているが、応用例は少ない。

公定分析法は、以上に述べた各種の手法を応用して農薬と農作物の組合せごとに分析法が定められているために農薬の使用歴が既知の試料の残留農薬の分析は比較的容易である。しかし、市販されている食品には輸入農産物も多く、国内産でも加工食品では原料の農産物の農薬の使用歴を知ることは困難である。市販農産物などの食品の残留農薬のモニタリングでは雑多な試料を対象とし、残留している可能性のある全ての農薬に適応できる多成分分析法が必要である。さらに、モニタリング分析法は名人芸的な手法を排除し、分析時間が短いことが望ましい。

このため、多くの研究者が多成分同時分析法の開発を試みている⁴⁰⁻⁵⁰⁾が適用性に限界がある。多成分の農薬の同時分析では精製操作の過程で農薬を極性により分離して測定する方法と精製過程では農薬相互の分離は行なわ

ず、測定段階で測定装置の分離能と検出器の特異性により測定する方法が考えられる。前者の方法は理論的には可能であり、分析技術の妙を發揮できるが、名人芸的技術を必要とする。このため、後者の方法が適用範囲が広く、実用的であると思われる。

著者は近年目ざましい進歩を遂げた高速液体クロマトグラフィーの技術⁵¹⁾を応用した分取液体クロマトグラフィーを用いて操作が容易で再現性がよく、しかも幅広い適用性を持つ精製法の開発を試みた。

第1節 ゲル浸透クロマトグラフィーおよび分配クロマトグラフィーの残留農薬分析の精製法としての評価^{52, 53)}

多くの残留分析法に採用されている吸着クロマトグラフィーでは極性の異なる複数の農薬を精製する場合は溶出溶媒の極性を段階的に変えて溶出し、流出画分ごとに分取する方法が取られている⁵⁰⁾。この方式では油脂分、葉緑素などの色素類あるいはポリフェノール類などの試料由来の妨害物の影響を受ける画分が必ず存在する。さらに、従来使用されてきた吸着剤は粒子が粗く(例えば、フロリジルは60~100メッシュ)、不均一であるために溶出される物質のバンド幅が広く、農薬相互または農薬と妨害物質との微妙な分離は不可能である⁵¹⁾。

近年、液体クロマトグラフィーは目ざましい発達を遂げ、カラム充填剤が改良され、粒径が細かく粒度分布のそろった充填剤が入手可能となった。このため、再現性のよいクロマトグラムが得られるようになり、液体クロマトグラフィーの高速運転が可能となった。さらに、この技術を応用した大口径カラムを用いて物質の精製分取も可能となった⁵¹⁾。しかし、高性能の充填剤でもシリカゲルやアルミナのような吸着クロマトグラフィーでは一度使用すると吸着剤中に強極性物質が残留するために再使用する度に吸着剤の再生処理が必要となる。再生処理を必要とせず、繰り返し使用が可能なカラムクロマトグラフィーとして合成樹脂系の充填剤を用いたゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)と分配クロマトグラフィー(LPC)が考えられる。本節ではこれらのカラム充填剤を使用して農薬の残留分析の精製のための簡便で再現性のよい方法の開発を目指した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

アセトン、メタノール、アゼトニトリルおよびクロロホルム：残留農薬分析用または液体クロマトグラフィー用溶媒

塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム：試薬特級

濾過助剤：ハイフロスーパーセル(John Manville社製)
農薬標準品：bromacil, carbaryl, chlorothalonil, dichloram, EPN, fthalide, linuron, MBC(carbendazim), MCPA, oxadiazon, oxycarboxin, pirimicarb, swep, 2, 4-D

はそれぞれの製造会社より提供を受けた。

1.2 器具および装置

ホモジナイザー：Polytoron

桐山漏斗：内径95mm(桐山製作所製)

ロータリーエバポレータ：Büchi EL型(Büchi社製)
分取液体クロマトグラフィー用カラム：GPC用カラムはMerckogel OR PVA-2000(Merck社製)をクロロホルムで膨潤させ、内径22mm、長さ500mmのガラスカラム充填した。分配クロマトグラフィー(LPC)用カラムはHitachi gel 3019(日立製作所製)をアゼトニトリル・メタノール(1+4)混液(LPC用溶媒)で膨潤させ、内径22mm、長さ300mmのガラスカラムに充填した。

高速液体クロマトグラフィー用カラム：Partisil-10 ODS-2およびPartisil-10 PAC(Whatman社製)を内径4mm、長さ250mmのステンレススチール製カラムに比重平衡法により300kg/cm²の圧力で充填した^{54, 55)}。

ガスクロマトグラフィー用カラム：3% Silicon OV-17/Chromosorb WHP(80-100mesh)内径3mm、長さ1.2mのガラスカラムおよび3% Silicon OV-225/Gas Chrom Q(80-100mesh)内径2mm、長さ1.2mのガラスカラムを用いた。

分取液体クロマトグラフ：ポンプ(協和精密社 KHD-52)、六方バルブ、ガラスカラム(GPC用、LPC用)、検出器(UV 254nm、島津 UVD-1)、配管用テフロンチューブ(外径1/8、1/16インチ)

高速液体クロマトグラフ：Varian LC-8500型(Varian社製)、検出器：Shimadzu SPD-1型波長可変紫外可視検出器

ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 5710A(N-P FID)および5830A(ECD, Ni⁶³ 15mCi)

1.3 GPCおよびLPCの農薬の溶出位置の確認

農薬標準品をGPCおよびLPCのそれぞれの溶媒に溶かして数10ppmの標準溶液を調整した。標準溶液の濃度は波長254nmでの吸光度の強さに応じて調製した。これらの溶液をGPCおよびLPCのそれぞれのカラムに注入して溶出状況をUVDで観察した。GPCおよびLPCの操作条件をTable 1.1に示した。

1.4 分析操作

磨砕した試料100g(稲わらは20g)を500ml容のトルビーカーに計り取った。試料が玄米および稲わらの場

合は倍量の水を加えて約1時間放置した。試料の入ったトルビーカーにアセトン200mlを加えてホモジナイザーで2分間攪拌抽出した。抽出液を桐山漏斗を用いて濾過し、漏斗上の残留物を100~200mlのアセトンで洗浄し、濾液と洗液を合わせて40°Cで減圧下でアセトンを留去した。濃縮液を300mlの分液漏斗に移し、5%塩化ナトリウム100mlおよびクロロホルム50mlを加えて振とう抽出を行なった。抽出操作を3回行ない、抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水した。クロロホルム溶液を濾過し、40°Cで減圧濃縮し、5~10mlに定容とした。

この溶液5mlをルアーロック付注射器で取り、GPCのルーブインジェクター(3ml)を介して送液中のGPCカラムに注入した。カラムの出口にメスシリンダーを置き、溶出液を分取した。分取画分はchlorothalonil 100~140mlの40ml, fthalide 102~152mlの50ml, carbaryl 120~160mlの40mlであった。

分取した画分を40°C以下で減圧濃縮し、残液を送風して乾固させた。フラスコ内の残留物をHPLCまたはGC用の溶媒に溶かして検液とした。

妨害物が多くて測定ができない場合はLPCによる精製を行なった。

GPCカラムからの溶出液を濃縮乾固させてフラスコ内の残留物をLPC用溶媒に溶かし、5ml以上の一定量に定容とした。その5mlをGPCと同様にLPCカラムに注入し、カラム溶出液を分取した。LPCの分画はchlorothalonil 158~202mlの54ml, fthalide 200~260mlの60mlおよびcarbaryl 116~156mlの40mlであった。

分取した分画を40°C以下で減圧濃縮し、残液を送風により乾固させた。フラスコ内の残留物を測定方法に応じて最適溶媒の一定量に溶解させて検液とした。

1.5 測定

HPLCおよびGCの測定条件をTable 1.2 およびTable 1.3 に示した。

2. 結果および考察

2.1 GPCおよびLPCの特性

GPC用ゲルのMerckogel OR PVA-2000はビニルアセテート樹脂で、膨潤させる溶媒としてクロロホルムの他に酢酸エチル、ジクロロメタンなどの多くの溶媒が使用できる。酢酸エチルはUV254nmの波長の光を用いる検出器を使用できない。また、ジクロロメタンは夏季の高温時には気泡の発生が多く検出器にはノイズの原因となる(ただし、Heガスをを用いて脱気を行なえば気泡の発生を防ぐことができる)。

標準品のGPCからの溶出状況をFig. 1.1に示した。この場合、oxadiazon, linuron, dicloram, swepおよびbromacilはきれいに分離した。GPCでは分子ふるい効

果により分子量の大きい油脂や葉緑素などは先に溶出し、比較的分子量の小さい農薬は遅れて溶出する。

ビニルアセテートゲルを用いたGPCは分子ふるい効果のみならず分配クロマトグラフィーとしての効果もあるために必ずしも分子量の大きい化合物が先に溶出するとは限らない。Fig. 1.1に示した場合は、各々の農薬の分子量に大きな相違がないが、相互に分離した。

LPCの例をFig. 1.2に示した。LPCで用いたHitachi gel 3019はポリスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂で、その特性はおよそ次のとおりであった。

① 一般にメタノールのみで溶出するよりも、メタノールにアセトニトリルを混合すると各農薬の溶出容量が小さくなり、溶出するバンド巾が狭くなった。

② しかし、アセトニトリルのみを移動相とすると2, 4-D, MCPおよびMBCのような強極性農薬は溶出しなかった。

③ メタノールのみで溶出するとほとんどの農薬の溶出ピークはテーリングしたが、アセトニトリルを混合することでテーリングを抑制することができた。

④ 分子内にフェニル基を2個有する農薬は1個のものより遅れて溶出した。

Hitachi gel 3019はメタノールのような極性溶媒を溶出溶媒とした場合は分配クロマトグラフィーとして作用した。メタノールのみで溶出するよりはアセトニトリルを混合する方が溶出状況が改善され農薬のピークのテーリングが抑制されたのは吸脱着を支配する要因が水素結合よりは π 電子が支配する結合によっているためと思われる。2, 4-D, MCPおよびMBCがアセトニトリルのみで溶出ししない理由は、これらの化合物の吸脱着には水素結合が強く働いているためと思われる。なお、Hitachi gel 3019は移動相としてジクロロメタンまたは酢酸エチルを用いればGPCとして使用できる。

2.2 分取クロマトグラフィーの残留分析への応用

GPCおよびLPCの分取クロマトグラフィーが残留農薬の分析のための精製法への有用性を検討した。試料として、玄米、稲わらおよびキュウリを、農薬としてcarbaryl, chlorothalonilおよびfthalideを用いた。

Fig. 1.3(A), (B), (C)にGPCカラムの溶出状況を示した。分取画分は農薬標準品を用いて予め確認し、ピークの前後の10mlを合わせて分取した。

試料由来の妨害物である脂肪分、葉緑素およびその他の色素類などの妨害物のほとんどが100mlまでの溶出し、かなりの精製効果が得られた。しかし、なお測定の妨害となる試料由来のきょう雑物が残存していたためLPCによる精製の検討を行なった。

GPCカラムからの溶出画分を濃縮乾固してLPCで

精製した場合のLPCカラムからの溶出状況をFig. 1.4に示した。UVDでモニターしたLPCのクロマトグラムから見てかなりの精製効果があった。

LPCカラムからの溶出液をHPLCおよびGCで測定した。HPLCでの測定結果をFig. 1.5 (A)~(E)に示した。Partisil-10 PACカラムを用いたクロマトグラフィー (A)および(B)では大きなきょう雑ピークが観察されたが、測定の妨害にはならなかった。同じ検液をPartisil-10 ODS-2カラムを用いた逆相クロマトグラフィーで測定した図を(C)および(D)に示した。きょう雑ピークの影響がほとんどなかった。

上記と同様の試料をGCで測定した場合のクロマトグラムをFig. 1.6に示した。これらのクロマトグラム ((A)~(E))には各測定農薬に妨害ピークはなく、GPCとLPCの2段階の分取クロマトグラフィーは高度の精製効果があることが判明した。なお、carbarylの測定例である(A)および(B)では溶媒ピークのテーリングが見られたが、これはLPCの溶媒中にアセトニトリルが含まれていたためと思われる。

添加回収試験では carbaryl, chlorothalonil および fthalide を1~2 ppmの範囲で試料に添加して行なった。玄米、稲わらおよびキュウリを用いた試験の結果3農薬ともに90~120%の回収率が得られた。

以上の結果、GPCは脂肪を含む試料の精製にとどまらず葉緑素やポリフェノールなどの比較的大きい分子の除去に優れており、炎光光度検出器付ガスクロマトグラフィーのような有機りん化合物に特異的な検出器を用いて測定する場合にはGPCのみで十分な精製効果が得られ、電子捕獲型検出器を用いる場合でもGPC-LPC

を組み合わせることにより十分な精製効果を得ることができた。

このことから、GPCおよびLPCによる分取液体クロマトグラフィーは残留分析のための精製法として十分に利用可能であることが証明できた。

3. 要 約

農薬の残留分析のための応用範囲の広い精製法を開発するために分取液体クロマトグラフィーの応用を検討した。液体クロマトグラフィーとしてゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) および分配クロマトグラフィー (LPC) を用いた。

試料からアセトンを用いて抽出し、アセトンを留去後、クロロホルムに転溶した。クロロホルム溶液を濃縮し、GPCおよびLPCを用いて精製を行った。測定は高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーによった。

GPCの操作条件：カラム充填剤、Merckogel OR PVA-2000；カラム、内径22mm×長さ500mm；移動相溶媒、クロロホルム；農薬の分取分画、carbaryl 120~160ml, chlorothalonil 100~140ml, fthalide 107~147ml

LPCの操作条件：カラム充填剤、Hitachi gel 3019；カラム、内径22mm×長さ300mm；移動相溶媒、アセトニトリル・メタロール (1+4, v/v)；農薬の分取分画、carbaryl 116~156ml, chlorothalonil 160~200ml, fthalide 200~260ml

玄米、稲わらおよびキュウリを用いた添加回収試験の結果、carbaryl, chlorothalonil および fthalide は1~2 ppmの添加で90~120%の回収率を得た。

Table 1.1 Operating conditions of gel permeation chromatography (GPC) and liquid-liquid partition chromatography (LPC)

	G P C	L P C
Column	Merckogel OR PVA-2000 22mm I.D. x500mm	Hitachi Gel 3019 22mm I.D. x300mm
Eluent	Chloroform	Acetonitrile-methanol (1+4, v/v)
Flow rate	3.1 ml/min	3.6 ml/min
Injector	Teflon loading loop (3 ml)	
Detector	Shimadzu UV detector (254nm)	
Pump	Kyowaseimitu KHD-52	

Table 1.2 Operating conditions of high performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC operating conditions		
	Condition-1	Condition-2
Column	Partisil-10 ODS-2 4 mm I.D. x250mm	Partisil-10 PAC 4 mm I.D. x250mm
Eluent	A : water/acetonitrile (6 : 4 , v/v) B : acetonitrile	A : iso-octane B : iso-octane/iso-propyl alcohol (4 : 1 , v/v)
Flow rate	100ml/hr	100ml/hr
Temperature	Ambient	Ambient
Detector	UV 254nm	UV 254nm
Instrument	Varian LC-8500	Varian LC-8500

Table 1.3 Operating conditions of gas chromatography (GC)

GC operating conditions		
	Condition-1	Condition-2
Column	3% OV-17/Chromosorb WHP (80-100 mesh), 3mm I.D. x 1.2m	2% OV-225/Gas Chrom Q (80-100 mesh), 2mm I.D. x 1.2m
Temperature	Column: 195-205°C Injection: 250°C Detector: 300°C	Column: 180°C Injection: 250°C Detector: 300°C
Gas	Carrier: N ₂ 30ml/min Hydrogen: 3ml/min Air: 100ml/min	Carrier: N ₂ 30ml/min
Detector	N-P FID	ECD (15mCi, ⁶³ Ni)
Instrument	Hewlett Packard 5710A	Hewlett Packard 5830A

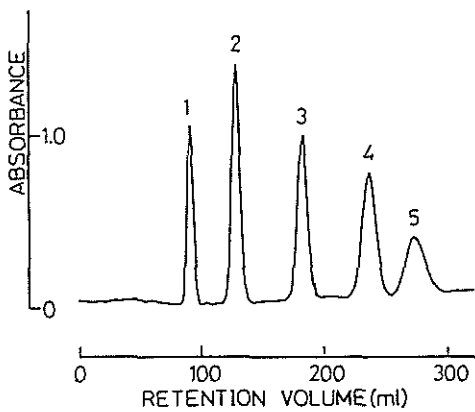


Fig. 1.1 GPC elution profile of a standard mixture of pesticides

Operating conditions are shown in Table 1.1. Peak identities: (1) oxadiazon, (2) linuron, (3) dicloram, (4) swep, (5) bromacil.

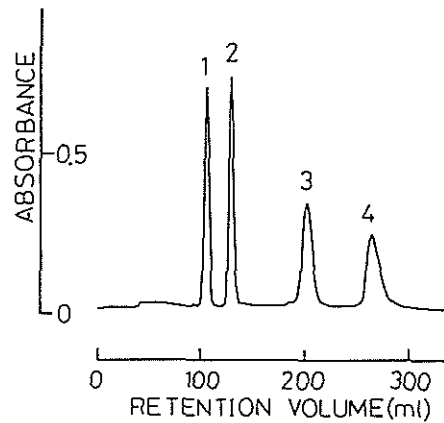


Fig. 1.2 LPC elution profile of a standard mixture of pesticides

Operating conditions are shown in Table 1.1. Peak identities: (1) oxycarboxin, (2) pirimicarb, (3) EPN, (4) chlornitrofen.

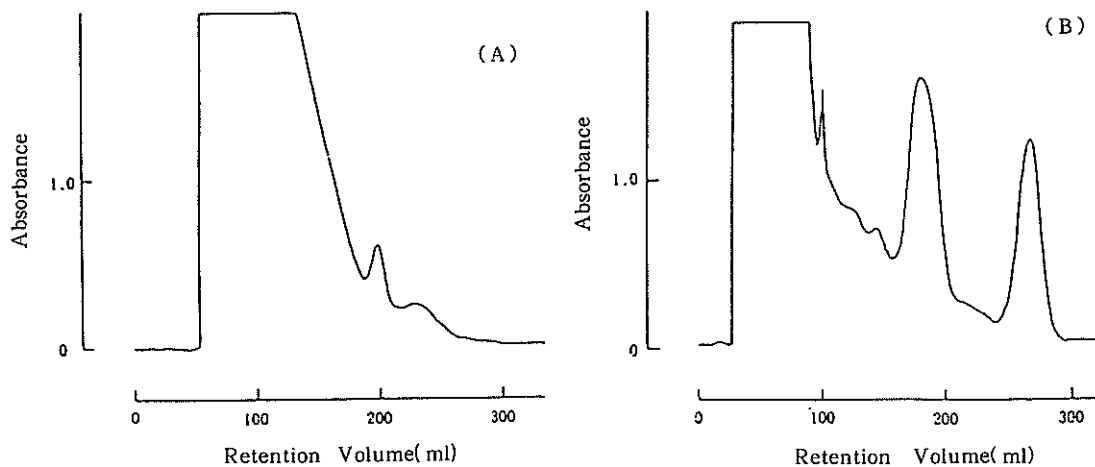


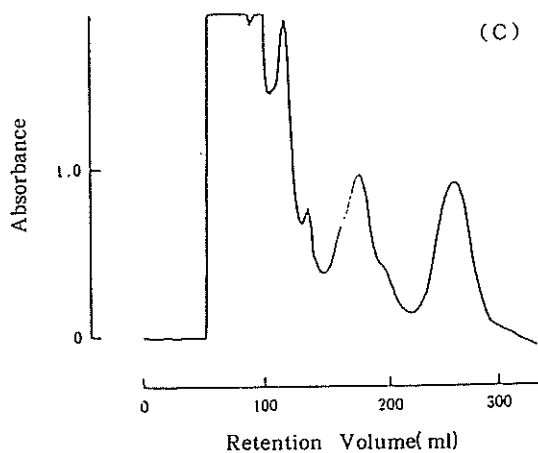
Fig. 1.3 GPC column elution profile of (A) brown rice, (B) rice straw and (C) cucumber.

A sample (100 g of brown rice, 20 g of rice straw and 100 g of cucumber) was extracted with acetone and partitioned into chloroform. The extract was evaporated to dryness.

The residue was dissolved in chloroform and transferred to a test tube.

The volume was adjusted to 5 ml. A 3 ml aliquot was injected onto GPC.

(Operating conditions are shown in Table 1.1)



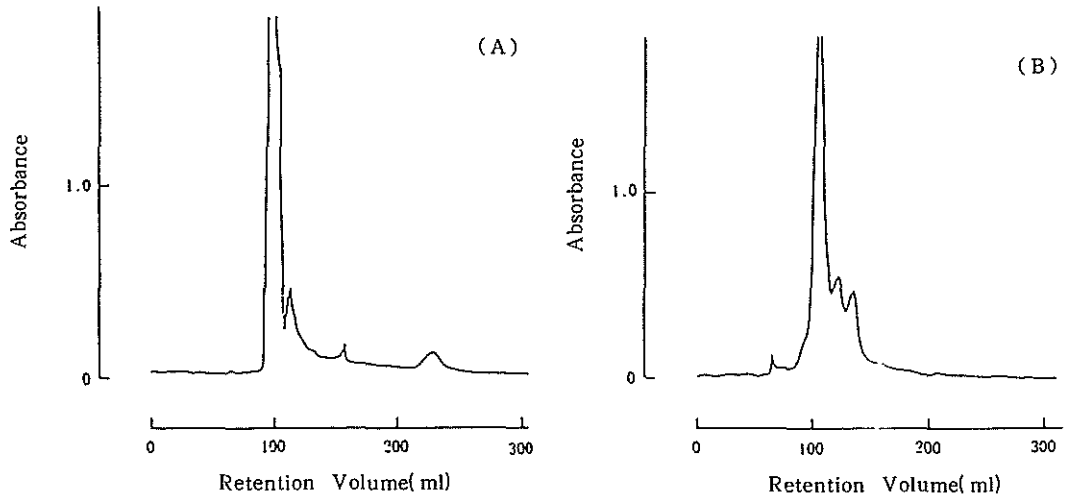
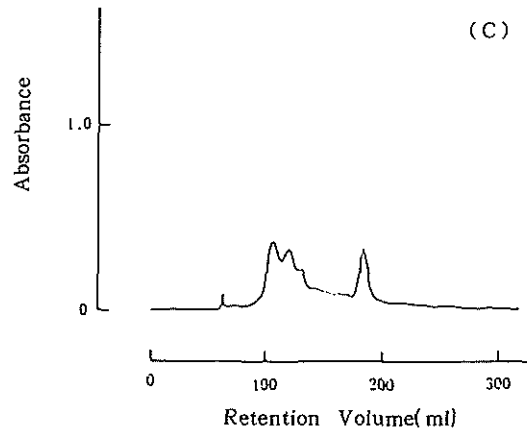


Fig. 1.4 LPC elution profile of the GPC eluate of (A) brown rice, (B) rice straw and (C) cucumber. The eluate from a GPC column was collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 ml of the LPC eluent. A 3 ml aliquot was injected onto LPC. Operating conditions are shown in Table 1.1.



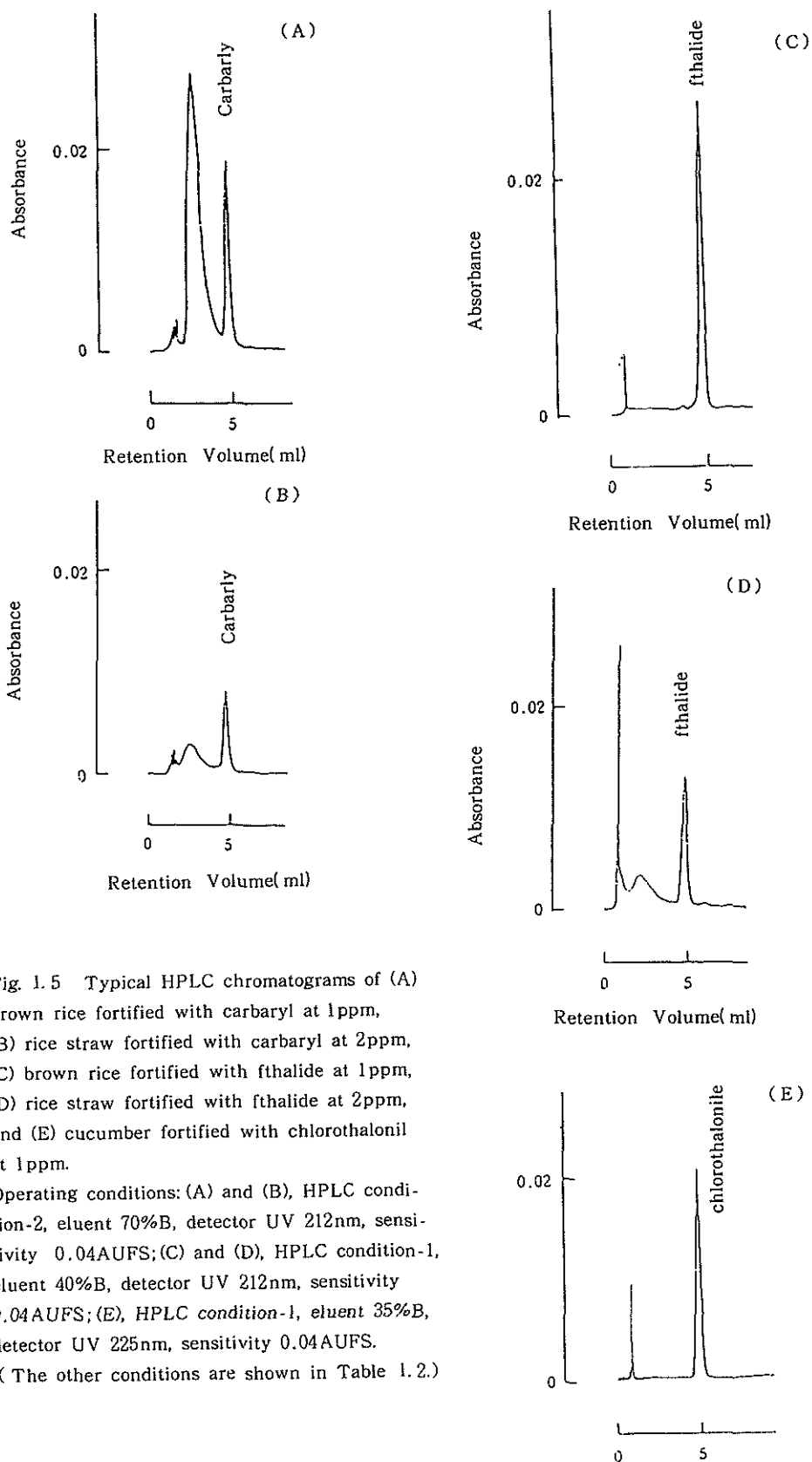


Fig. 1.5 Typical HPLC chromatograms of (A) brown rice fortified with carbaryl at 1ppm, (B) rice straw fortified with carbaryl at 2ppm, (C) brown rice fortified with fthalide at 1ppm, (D) rice straw fortified with fthalide at 2ppm, and (E) cucumber fortified with chlorothalonil at 1ppm.

Operating conditions: (A) and (B), HPLC condition-2, eluent 70%B, detector UV 212nm, sensitivity 0.04AUFS; (C) and (D), HPLC condition-1, eluent 40%B, detector UV 212nm, sensitivity 0.04AUFS; (E), HPLC condition-1, eluent 35%B, detector UV 225nm, sensitivity 0.04AUFS.

(The other conditions are shown in Table 1.2.)

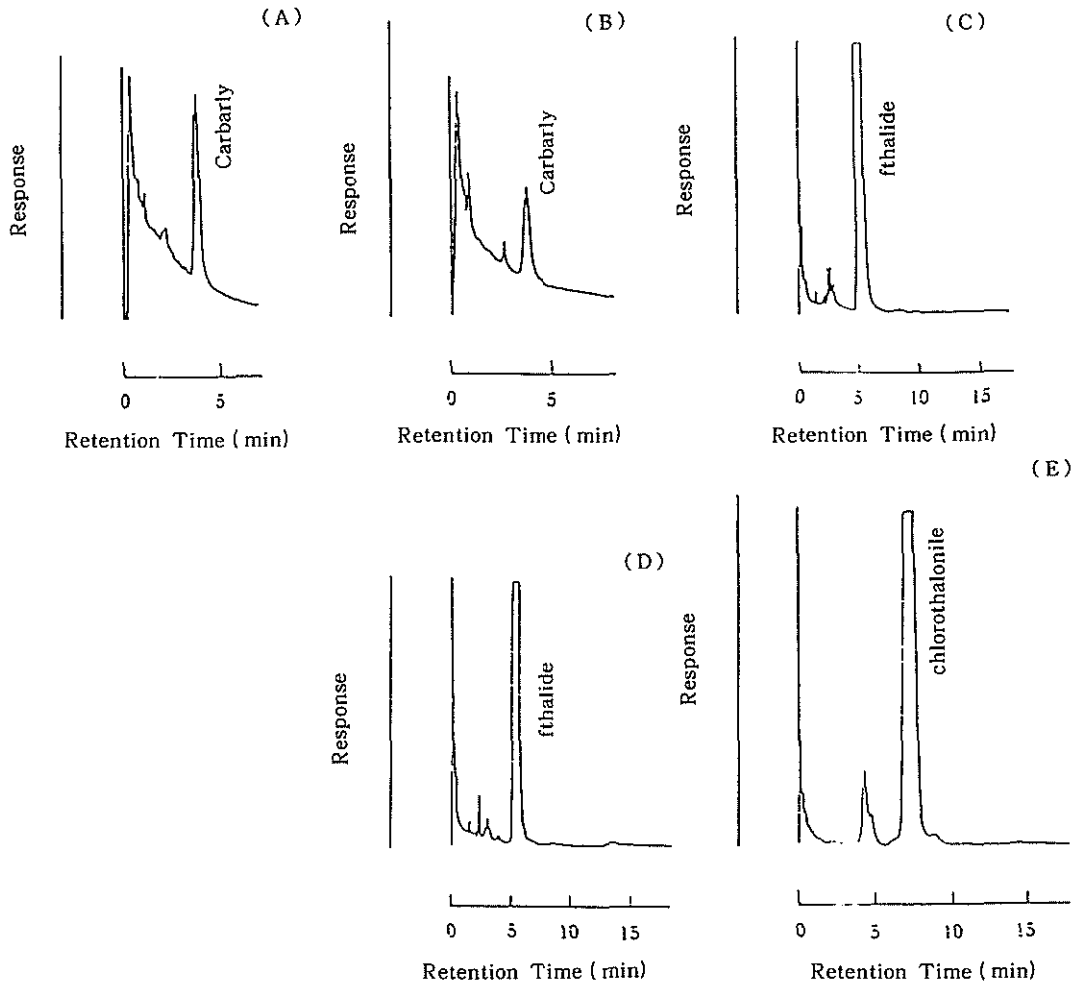


Fig. 1.6 GC chromatograms of (A) brown rice fortified with carbaryl at 1ppm, (B) rice straw fortified with carbaryl at 2ppm, (C) brown rice fortified with fthalide at 1ppm, (D) rice straw fortified with fthalide at 2ppm, and (E) cucumber fortified with chlorothalonil at 1ppm.

Operating conditions: (A) and (B), GC condition-1, attenuation 32, column temperature 195°C; (C) and (D), GC condition-2, attenuation 2⁹, column temperature 205°C; (E), GC condition-2, attenuation 2⁹, column temperature 180°C. (The other conditions are shown in Table 1.3.)

Minor chromatographic interferences are seen in chromatograms. Attenuation has been adjusted to allow interferences to be easily seen.

第2節 自動ゲル浸透クロマトグラフィーの残留農薬分析への応用^{58, 59)}—アルカリ熱イオン化検出器および電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーによる測定

残留分析の分野ではG P Cは当初油脂含量の高い試料から残留農薬を分離するために使用されたが^{60, 61)}、近年では脂肪含量の高い試料を含めて、前節で述べたように一般的な試料の残留農薬の分析の精製手段として利用可能であることが報告された⁶²⁻⁷²⁾。最近では定流量送液ポンプの改良、試料の注入と分取のための流路の接続と切り替えの自動化によりG P C装置は自動運転が可能となった。残留農薬のモニタリングは限られた時間内に多数の試料の分析が要求されるため試料の前処理の省力化が望まれる。このため、自動G P C装置による残留分析の精製過程の省力化の可能性について検討を行なった。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

アセトン、ジクロロメタン、シクロヘキサン、塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム：試薬特級

水：脱イオン水を蒸留したものを用いた。

濾過助剤：水およびアセトンで洗浄し、風乾させたハイフラスーパーセルを用いた。

フロリジルP R (60-100mesh)：一晚130℃で加熱活性化し、放冷後、重量で5%相当の水を加えてよく混合したものを用いた。

農薬標準品：それぞれの農薬の製造会社から提供されたものを用いた。使用した農薬の種類をTable 1.4に示した。検量線用および添加回収試験用の標準溶液は0.01~1ppmの範囲でアセトン溶液として調製した。G P C用の標準溶液はジクロロメタン/シクロヘキサン(50+50, v/v)溶液とし、各農薬ともに5ppmの濃度とした。

1.2 器具および装置

フードプロセサー(三菱FP-3000)、カートリッジミル(池田理化CM-10)、振とう機(宮本理研MW-L)、ホモジナイザー(Polytron)、ロータリーエバポレーター(Büchi RE2)、桐山漏斗、メンブランフィルター(ミリポア社または富士フィルム社 0.45 μ m)

自動ゲル浸透クロマトグラフ：G P C Auto Prep 1002A (Analytical Biochemistry Laboratories Inc.)：カラム, Bio Beads SX-3 200-300mesh (Bio-Rad Laboratories)25mm I.D. x 600mmガラスカラム；移動相, ジクロロメタン/シクロヘキサン(50+50, v/v) (Heガスをういて溶媒中の空気を追い出した後使用した)、流速 5 ml/分；試料注入量 5 ml

ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard HP-5710AおよびHP-5830A；検出器, FTD (N-PFID)；カラム, 5%シリコンDC-200/Gas Chrom Q (80-100 mesh) 2mm I.D. x 2 m, 5%シリコンOV-1/Gas Chrom Q (80-100mesh) 2mm I.D. x 1.2 m. (その他の操作条件はTable 1.4の脚注に記載した)。

1.3 農薬の溶出容量の確認

各農薬のG P C用標準溶液5mlをG P Cカラムに注入して、溶出液を15mlずつ分取し、濃縮乾固させ、残留物をアセトンに溶かした後、G L Cで分析し、各農薬の溶出容量を求めた。

1.4 分析操作(回収試験)

野菜および果物はミキサーで磨砕し、玄米および大豆はカートリッジミルで粉砕し、その30~100gを共栓付三角フラスコに取った。玄米および大豆には等量の水を加えて1時間放置した。これにアセトン100mlを加えて30分間振とうした。ミカンの皮は細切し、トールピーカーに取り、アセトンを加えてホモジナイザーで2分間高速で攪拌抽出した。抽出液を1cmの厚さに濾過助剤を敷いた桐山漏斗を用いて吸引濾過し、漏斗上の残留物を集めて50mlのアセトンを加えてよく振り混ぜ、再び濾過をした。濾液と洗液を合わせて35℃で減圧濃縮し、アセトンを留去した。残った水層を分液漏斗に移し、飽和塩化ナトリウム溶液を約30mlを加え、50mlずつのジクロロメタンを用いて三回抽出した。ジクロロメタン抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ジクロロメタン溶液をナス型フラスコに移し、約5mlまで濃縮し、空気を送ってジクロロメタンを蒸発させた。フラスコ内の残留物をG P C用移動相溶媒に溶かして10mlに定容とした。この溶液を孔径0.45 μ mのフィルターで濾過を行い、その5mlをG P Cカラムに注入した。予め、確認してある溶出画分を分取し、35℃で約5mlまで減圧濃縮し、空気を送って残りの溶媒を蒸発させた。フラスコ内の残留物を一定容量(5~10ml)のアセトンに溶かしG Cで測定した。

上記の方法で妨害ピークがあって測定できない場合には、脚部にグラスウールをつめた小型漏斗(直径約30mm)に5%含水フロリジル1.5gを乗せ、その層に上記のアセトン溶液を静かに注入し、その流出液を集めて検液とした。

2. 結果および考察

一般に、G P Cでは分子の大きいものほど早く溶出し、分子の大きさに差がある化合物の混合物の分離に適している。G P Cは吸着クロマトグラフィーなどのその他の液体クロマトグラフィーと比べて溶出幅が狭く、グラジエント溶出によらずに短時間に溶出することができる。

さらに、ゲル粒子が損傷を受けない限り繰り返し使用できて再現性がよい。その反面、分子の大きさが近似している化合物の分離はできないことおよび分離できるピークの数に制約があり、グラジエント溶出はできない⁵¹⁾。この特徴を踏まえて24農薬についてBio Beads SX-3を用いたGPCにおける溶出状況を観察した(Table 1.4)。これらの農薬のうちacephateとchlorothalonil(TPN)を除き、その他の農薬は100-200mlの範囲に溶出した。本実験で用いた農薬の分子量は最小がacephateの183.2, 最大がfenvalerateの419.9であった。これらの両農薬はかろうじて分離したが、その他は互いに溶出位置が重なった。chlorothalonilの溶出位置がやや遅れていること、diazinonがやや早く溶出すること、acephateの溶出幅が他に比べて広いことから、本実験に用いたGPCカラムの分離は単なる分子ふるい効果だけでなく液-液分配効果の影響があると考えられる。本実験ではGPCによる農薬相互の分離は期待せず、葉緑素や油脂などの分子量の比較的大ききょう雑物の除去の効果について検討した。その他のきょう雑物と農薬の分離および農薬相互の分離はGCなどの測定装置の分離性能を利用の方が得策である。油脂類の分離について、従前多くの工夫がなされており、液-液分配¹⁵⁾、sweep co-distillation法^{36, 37)}、酢酸亜鉛を用いる方法³⁸⁾あるいはアルミナを用いる方法³⁹⁾などが行なわれてきた。これらの操作はかなりはん雑な操作を必要とする。この点、GPCは操作中に農薬の分解また吸着による損失がなく、極めて穏やかな条件で油脂を分離できた。Table 1.4に示したようにGPCカラムからの回収率はおおむね90~110%であり、優れた精製手段であることが証明された。なお、GPCの移動相溶媒は脱気が不十分であると、特に夏季の高温時にはカラム内に気泡が発生し、分取容量に誤差を生じるので注意を要する。脱気には通常溶媒を沸騰させる方法がとられるが、本実験のように沸点の異なる溶媒の混合液ではHeガスによる脱気が優れている。

Table 1.5に19農薬, 16作物を用いた添加回収試験の結果を示した。0.1~0.2ppmの添加濃度で75~110%の回収率を得た。また、Fig. 1.7にホウレンソウにdichlorvos, chlorothalonil, malathionおよびmethidathionを添加した場合のクロマトグラムを示した。GPCのみの精製で妨害ピークはなく十分な精製効果が得られた。なお、Table 1.5に示した16作物材料のほか添加回収試験は実施していないが、カキ、ニンジン、ネギ、グリーンピースおよび稲わらについてクロマトグラムを測定したところ妨害ピークは認められなかった。

しかし、本実験ではGCの検出器としてFTDを用いたため、キャベツにdiazinon, dichlofenthion,

triadimefonおよびphenthoateを添加した場合のクロマトグラム(Fig. 1.8A)のようにGPCの精製だけでは妨害ピークが多く、測定できない場合があった。この外、ダイコンおよび大豆でもGPCのみの精製では妨害ピークが多く測定ができなかった。このため、これらの作物の場合は検液のアセトン溶液を5%含水フロリジルの層を通過させたところFig. 1.8Bに示したように妨害ピークを除くことができた。しかし、フロリジルによる精製を行ってもなおキャベツのdimethoate, dichlorvosおよびchlorothalonilが、ダイコンのmalathion, dichlorvosおよびchlorothalonilが妨害ピークと重なって測定できなかった。しかし、これらの農薬のうち有機りん系農薬は蛍光光度型検出器(FPD)により測定が可能であり¹⁵⁾、chlorotaronilは塩素原子を持つためにHall型電気伝導度検出器により妨害はなく測定することができた^{73, 74)}。

本分析法のGCの操作条件では有機りん系農薬の最小検出量は0.05~0.1ng, carbofuran, chlorothalonil, iprodione, oxadixyl, metalaxyl, procymidone, triadimefonおよびvinclozolinは0.2~0.4ng, fenvalerateはECDを用いて0.05ngであった。なお、allethrinについては測定しなかった。本法の検出限界は試料50gを用い、最終液量5ml, GCへの注入量2 μ lとした場合有機りん系農薬およびfenvalerateは0.005~0.01ppm, その他の農薬は0.02~0.04ppmであった。なお、ここに示した最小検出量および検出限界は日常モニタリングに使用する感度であり、必要な場合はさらに感度を高くすることができる。残留農薬のモニタリングを行なう場合は検出限界を農薬残留基準の1/10~1/5に設定すれば目的は十分に達成されるので本分析法は十分な感度を有していると考えられる。

著者は同一のGPCカラムを500点以上の試料の分析に使用してきたが、溶出位置の変動はなく、さらにカラムの着色もなく、安定した結果が得られている。本実験で使用したGPC装置は自動運転が可能であり、一試料の処理時間は一時間以内であった。このことから、この自動運転装置を用いたGPC法は残留農薬のモニタリング分析のための精製法に十分に適用できるものと考えられる。

3. 要 約

自動ゲル浸透クロマトグラフの農薬残留分析への応用の可能性について実験を行なった。試料をアセトンで抽出し、ジクロロメタンへ転用し、GPCによって精製する。GPCのゲルとして、Bio Beads SX-3を、移動相としてジクロロメタン/シクロヘキサン(50+50, v/v)を用いた。測定はFTD-GCを用いた。GPCのみで精製が不十分な場合は検液のアセトン溶液を少量のフロリジル層を通過させることで妨害物を除去することができた。

24農薬についてGPCの溶出容量を求め、19農薬-16作物を用いて添加回収試験を行なった。0.1~0.2ppmの添加で75~110%の回収率を得た。本法の検出限界は0.005

~0.05ppmであった。

自動運転ができるGPC装置は残留農薬の分析のための精製法として広い適用性があった。

Table 1.4 GPC Elution Profile and GC Retention Times of 24 Pesticides.

Pesticide	Elution volume (ml)	Recovery (%)	Retention time (min.)
Acephate	150 - 285	89	1.3
Allethrin*	105 - 150	89	2.0
Carbofuran	150 - 180	92	2.1
Chlorothalonil	165 - 210	110	3.2
Diazinon	110 - 165	90	2.7
Dichlofenthion	120 - 175	94	3.7
Dichlorvos	135 - 180	94	0.7
Dimethoate	150 - 195	91	2.3
Edifenphos	135 - 180	94	16.3
EPN	130 - 175	98	21.6
Fenitrothion	225 - 255	90	1.4
Fenvalerate*	120 - 150	89	20.4
Iprobenfos	120 - 150	98	3.1
Iprodione	150 - 180	92	21.2
Isoxathion	130 - 175	86	10.3
Oxadixyl	135 - 165	90	11.5
Malathion	120 - 160	98	4.7
Metaxyl	120 - 150	91	4.0
Methidathion	150 - 180	80	6.9
Phenthoate	130 - 175	91	6.5
Procyimdone	150 - 180	93	6.8
Prothiophos	135 - 165	93	9.0
Triadimefon	135 - 165	92	5.2
Vinclozolin	150 - 180	90	3.7

GPC operating conditions: column, Bio Beads SX-3 (200-400 mesh) 25mm, I.D. X 600mm glass column; mobile phase, dichloromethane/cyclohexane (1+1, v/v); flow rate, 5 ml/min; injection volume, 5 ml
 GC operating conditions: column, 5% DC-200/Gas Chrom Q (80/100 mesh) 2mm I.D. X 2m; temperature, injection 250°C; oven 200°C; detector 300°C; gas, carrier N₂ 30 ml/min; H₂ 3 ml/min; air 100 ml/min; detector, N-P FID (*: ECD)

Table 1.5 Recoveries of fortified pesticides from crops.

Pesticide	A	B	C	D	E	F	G	H **	I **	J	K	L	M	N	O **	P
Chlorothalonil	—	—	—	98	—	—	97	×	×	94	—	—	—	92	92	94
Diazinon	100	102	101	90	84	88	91	94	95	92	88	93	90	84	98	100
Dichlofenthion	102	103	105	90	86	85	95	99	99	95	88	91	93	91	103	96
Dichlorvos	—	—	—	82	—	89	84	×	×	94	—	—	89	85	75	92
Dimethoate	—	94	—	97	95	—	92	×	85	96	—	91	—	90	—	—
Edifenphos	95	100	107	—	102	90	—	94	94	93	91	—	—	—	—	103
EPN	—	—	—	—	—	91	—	90	88	—	—	—	83	—	97	85
Fenvalerate*	—	—	—	—	—	—	—	88	—	—	—	—	—	—	—	—
Iprobenfos	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Iprodione	97	97	103	—	103	89	—	90	93	91	93	—	—	—	97	102
Oxadixyl	—	90	—	90	98	—	80	95	95	90	—	102	—	85	—	—
Malathion	—	—	—	80	—	99	93	110	×	96	—	—	96	88	102	89
Metaxyl	102	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	102	—
Methidathion	—	—	—	82	—	—	98	95	95	94	—	—	90	86	81	89
Phenthoate	100	101	103	89	—	100	—	93	94	92	86	99	91	87	95	97
Procymidone	—	89	—	82	—	—	99	90	103	92	—	—	—	80	—	—
Prothiophos	—	87	—	89	83	—	99	92	99	98	—	91	—	82	87	—
Triadimefon	101	95	101	82	—	98	93	100	101	94	100	91	88	85	105	99
Vinclozolin	—	88	—	96	98	—	95	98	102	93	—	86	—	91	—	—

Fortification level: 0.1~0.2ppm. **: ECD-GC was used for determination. **: Florisil, deactivated by 5% water, was used for further cleanup of the GPC eluate to facilitate determination by GC. ×: Determination failed because interferences were not yet eliminated with a supplemental Florisil. —: not tested.

A: brown rice. B: corn. C: apple. D: Unsyuu orange (flesh). E: Unsyuu orange (peel). F: egg plant. G: sweet pepper. H: cabbage. I: radish. J: spinach. K: garland chrysanthemum. L: leek. M: onion. N: potato. O: soybean. P: red bean.

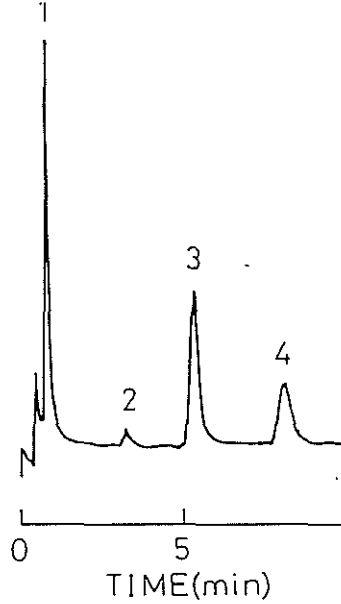


Fig. 1.7 Gas chromatogram of spinach sample cleaned up by GPC

Peak identities: (1) dichlorvos, (2) chlorothalonil, (3) malathion, (4) methidathion.

Operating conditions were same as Table 1.4.

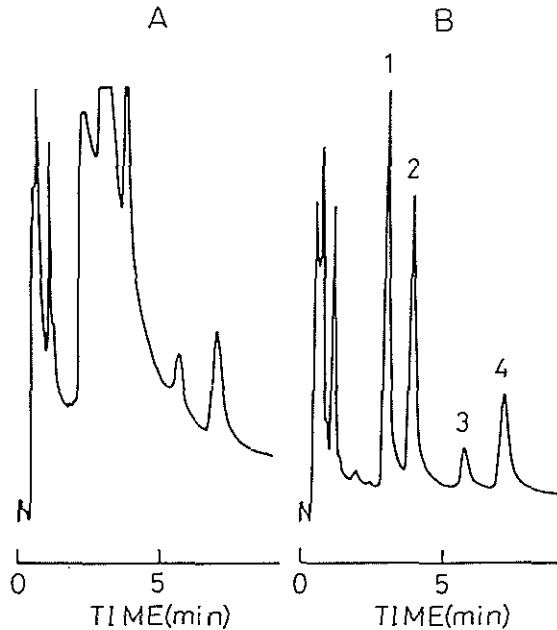


Fig. 1.8 Gas chromatograms of: A, cabbage sample cleaned up by only GPC; B, cabbage sample cleaned up by GPC and Florisil.

Peak identities: (1) diazinon, (2) dichlofenthion, (3) triadimefon, (4) phenthoate.

Operating conditions were same as Table 1.4.

第3節 ゲル浸透クロマトグラフィーとHall型電気伝導度検出器付ガスクロマトグラフィーの残留農薬分析への応用^{73, 74)}

残留農薬の実態調査には数多くの分析を短時間に行なうことが必要であり、分析法は経済的かつ簡便でなければならない。前節において有機りん系農薬およびカーバメイト系農薬などの窒素を含む農薬についてGPCによる精製法を応用した多成分分析法を報告した。

今日、BHCやDDTのような長期残留性の有機塩素系農薬は姿を消したが、塩素を含む農薬は今なお多い。従来、塩素を含む農薬の残留分析には主として電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー(ECD-GC)が用いられてきた^{15, 25)}。ECDは高感度である反面、特異性に乏しく、高度な精製操作を必要とするため農薬のモニタリングを行うには取り扱いにくい検出器である。

このため、ECDに代わる検出器としてHall型電気伝導度検出器(Hall Electrolytic Conductivity Detector, HECD)の有機塩素化合物に対する特異性⁷⁵⁾とGPCの幅広い試料への適用性を利用して残留農薬の新しい分析法の開発を行なった。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

アセトン、ヘキサン、ジクロロメタン、シクロヘキサン、1-プロパノール、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、りん酸：試薬特級または残留農薬試験用

濾過助剤：ハイフろスーパーセル(Johns-Manville Sales Corp. 製)

農薬標準品：Table 1.6 に示した。それぞれの標準品は製造会社より提供を受けた。純度はいずれも99%以上であった。ガスクロマトグラフィー用の標準溶液はヘキサン溶液とし、0.1~5ppmの範囲で調製した。

試料のキャベツ、ダイコン、タマネギ、パレイショ、大豆、玄米は近所の商店より購入した。茶は神奈川県園芸試験場より農薬無処理の試料の提供を受けた。

1.2 器具および装置

カートリッジミル(池田理化製 CM-10)、振とう機(宮本理研製 MW-1)、桐山漏斗、ロータリーエボレーター(Büchi 製)、メンブレンフィルター(富士フィルム製 FLSP 45 1.3CMD、またはミリポア製 AP20 01300)、ゲル浸透クロマトグラフ(A analytical Biochemistry Laboratories, Inc., GPC Model 1002B)、HECD(Tracor Model 700)付ガスクロマトグラフ(Varian Model 3600)

1.3 GPCの操作条件

前節参照

1.4 HEC D-GCの操作条件

カラム：メガボアカラムDB-1 0.53mm I.D. × 15m (J & W Scientific, Inc. 製)

温度：注入口、220℃；恒温槽、初期温度100℃で0.5分間保持し、10℃/分で昇温、280℃で1.5分間保持した；検出器、300℃

キャリアガス：He 30ml/分

HECD：反応管、ニッケル製；反応炉温度、800℃；反応ガス、H₂ 50ml/分；反応ガス吸収用溶媒、1-プロパノール 0.5ml/分；イオン交換樹脂(溶媒精製用)、Amberlite IRN-77/Amberlite 150N(1+1, v/v)の積層

1.5 分析操作

野菜類、芋類などの水分の多い試料は重量比で10%相当の85%りん酸を添加して磨砕した。大豆、茶などの乾燥試料はカートリッジミルで粉砕した。試料(野菜類、パレイショ、玄米は100g、大豆は50g、茶は5g)の一定量を共栓付三角フラスコに取った。玄米、大豆、茶は1.5倍量の水を加えて室温で2時間放置した。これらの試料にアセトン100~150mlを加えて30分間振とうし、抽出液を予めハイフろスーパーセルを約1cmの厚さに敷いた桐山漏斗を用いて吸引濾過を行なった。漏斗上の残渣を集め、50~100mlのアセトンを加えて振り混ぜた後、洗液を濾別した。濾液と洗液を合わせて40℃で減圧濃縮しアセトンを留去後、残った水層を分液漏斗に移し、5%塩化ナトリウム溶液を200ml加え、100mlずつのヘキサンを用いて2回抽出した。ヘキサン溶液を40℃で約2mlまで濃縮し、空気を送ってヘキサンを蒸発させた。フラスコ内の残留物をGPC用移動相溶媒(ジクロロメタン/シクロヘキサン=1+1, v/v)に溶解させて10mlに定容とし、この溶液を孔径0.45μmのメンブレンフィルター(大豆の場合は1μmのフィルター)で濾過した。その5mlをループ式注入器を用いてGPCカラムに注入した。GPCからの溶出画分(100~240ml)を取り、40℃で約2mlまで減圧濃縮した後、空気を送り乾固させた。残りを2mlのヘキサンに溶解させて検液とし、その2μlをHECD-GCに注入した。

2. 結果および考察

HECDのハロゲンモードではGCのカラムにより分離された有機ハロゲン化合物が、予め高温に加熱されているニッケル反応管中で水素と反応し、ハロゲン化水素を生成する。そのハロゲン化水素をキャリアガスおよび水素ガスと共に電気伝導度セルに導き、一定流速の溶媒(1-プロパノール)に吸収させ、電気伝導度を測定する(この溶媒は、予めイオン交換樹脂によって脱イオ

ンされ、高純度に精製されたものを用いる)。ハロゲン化水素の生成割合は反応管の温度に依存しており、およそ800°Cで一定となった。このことはRamusら⁷⁶⁾の実験結果と一致した。また、H E C Dの感度は水素ガス流量を50ml/分以上に増加させてもほとんど感度の向上がなく、1-プロパノールの流速を0.5ml/分よりも少なくするとクロマトグラムが不安定になり、これ以上に多くすると相対的に感度が低下した。

本実験では上記の条件でハロゲンを含む45農薬についてハロゲン一個当りの面積感度を算出し、chlorothalonilを100として相対感度を求めた (Table 1.6)。この結果、flucythrinateやflutolanilのようなふっ素のみを含む農薬は感度が極めて悪かったが、これらの農薬は窒素原子を持つのでH E C Dよりはアルカリ熱イオン化検出器(F T D)により測定する方が感度がよかった。

Ramusら⁷⁷⁾およびNultonら⁷⁸⁾は塩素化炭化水素類について塩素の重量当りのH E C Dの面積感度を求めたところ化合物が異なってもほぼ一定の感度を示したと報告した。しかし、本実験では、塩素のみを含む農薬の場合についても一つの塩素原子当りの感度に差がみられた。分子内の塩素の位置について検討したが、芳香環に置換している塩素と側鎖の炭素に結合している塩素との間に明確な感度の差はみられなかった。ハロゲンの種類によるH E C Dの感度を比較したところ、感度はCl>Br>Fの順であり、この順序はHCl, HBrおよびHFの酸としての強さの順であった。

H E C DとE C Dの感度比較を行なった。例えば、chlorothalonilの場合、最小検出量がH E C Dで0.2ng, E C Dで0.002ngと100倍の差があったのをはじめ他の農薬についても約100~200倍の感度差がみられた。

Fig. 1.9にタマネギに15種の農薬を添加して調製した試験溶液のガスクロマトグラムを示す。G P Cによる精製だけで特に妨害もなく測定を行なうことができた。Fig. 1.9の試料溶液を500倍に希釈し、E C Dで測定したときのクロマトグラムをFig. 1.10に示した。E C Dでは多数の妨害ピークがあり、測定は不可能であった。このことからH E C Dは非常に優れたハロゲン特異性を有することがわかった。

最近ではキャピラリーカラムの入手が容易となり、キャピラリーカラムの高分解能を利用することで多くの残留農薬を分離定量することができるようになった。本実験においてもそれらのカラムの高分解能とH E C Dのハロゲン特異性により試料由来の妨害を受けずに優れた結果を得た。本実験ではカラムの寿命を延ばすためにG P Cによる精製操作を行なった。しかし、バックドカラムを使用すれば試料をアセトン抽出しヘキサン転溶後濃縮し

た液を注入するだけでも検出器の選択性により十分分析可能であり⁷⁵⁾、炎光光度型検出器(F P D)で有機りん系農薬を測定するのと同様に扱うことができた。また、キャピラリーカラムを用いた分析の場合、多成分の分離のために昇温分析が有利であるが、本検出器は、F P Dと同様に昇温を行なってもベースラインの変動が全く見られなかった。なお、本実験では精製のためにG P Cを用いたが、分析に供した各農薬のG P Cの溶出面分は全て100~240mlの間であった。添加回収試験の際にも、同様に140mlという広範囲の溶出面分を分取したにもかかわらず、ほとんど妨害はみられなかった。Fig. 1.11は5種の農薬を添加した茶の直接溶媒抽出による分析例を示した。茶は、直接抽出すると多量の葉緑素等の色素類やタンニンが溶出して来るため、分析の難しい試料の一つであるが、本方法により何等妨害もなく分析することができた。また、Fig. 1.12に油脂を含む試料の例として玄米に12種の農薬を添加した場合のクロマトグラムを示した。

このように、H E C Dは作物由来の妨害成分の影響を受けないため、E C Dに比べて感度は劣るものの、最初の試料量を多く取るにより検出限界を下げる事が可能であり、結果としてE C Dに匹敵する検出限界を得ることができた。例えばchlorothalonilはH E C Dにより最小0.2ngが検出可能であり、試料採取量100gとして検出限界は0.004ppmとなり残留分析に十分適用可能である。

40農薬、7作物について行なった添加回収試験の結果をTable 1.6に示す。一部の例外を除いては、ほとんどの農薬-作物の組合せにおいて73-119%の良好な回収率を得ることができた。dichlorvosは全ての作物において低い回収率を示した。その原因として、dichlorvosは蒸気圧が高く揮発しやすいため、精製過程で損失が考えられる。また、flucythrinateについては分子中のハロゲン原子はフッ素のみを含み最小検出量が10ng程度であったので感度不十分のため十分な測定ができなかった。

H E C Dをハロゲンモードで使用する場合には溶媒に留意が必要である。今回のようにジクロロメタンを使用するときには溶媒を完全に留去しないとG Cに注入した際に妨害ピークを生じる。また、分析点数が増えるに従って電気伝導度セルが汚れ、ピークの形状が不良になってくるため月に一度程度の分解掃除が必要である。また、1-プロパノールの精製と再生に用いるイオン交換樹脂は高価であるので、その寿命をのばすために溶媒は循環させずに廃棄した。そのほうが安定した状態で検出器を長時間操作できた。以上のことから、H E C D-G Cを用いる残留分析法は従来のE C D-G C法に代わる方法

として塩素を含む農薬の残留分析のために有用な方法であると考えられる。

3. 要 約

Hall型電気伝導度検出器付ガスクロマトグラフ（H E C D-G C）の残留分析への適用性を検討した。試料をアセトン抽出、ヘキサン転溶後、ゲル浸透クロマトグラフィー（G P C）により精製を行ないヘキサンで定容としてH E C D-G Cで分析した。精製はG P Cにより試料由来の油脂および葉緑素等の色素の大半を除去することができたため、G Cでキャピラリーカラムを用いてもカ

ラムを損うことなく高感度分析が可能であった。H E C DはE C Dに比べ有機塩素化合物に対して絶対感度は1/100程度と低いが、きわめて高い選択性を有するために作物由来の妨害を受け難く、簡易な精製法で測定が可能であった。このため、供試する試料の量を100 g程度とすることで、ppb オーダーの検出感度が容易に得られた。40農薬について7作物を用いた添加回収試験を行い、dichlorvosおよびflucythrinateを除いて73~119%の回収を得た。

Table 1.6 Relative response and recovery of selected pesticides by HECD-GC.

Pesticide	Relative response ^a		Recovery (%)						
	Number of halogen	RRF ^b	A ^c	B ^c	C ^c	D ^c	E ^d	F ^e	G ^e
Anilazine	Cl ₃	48	—	—	—	—	—	112	—
Bifenox	Cl ₂	70	90	—	—	—	—	—	93
Captafol	Cl ₄	78	76	—	—	—	—	—	76
Captan	Cl ₃	96	97	—	—	—	—	—	101
Chlorobenzilate	Cl ₂	109	95	—	—	—	—	—	95
Chlorfenson	Cl ₂	109	97	—	—	—	—	—	94
Chlorfenvinphos ^f			—	—	—	—	73	92	—
E Isomer	Cl ₃	43							
Z Isomer	Cl ₃	39							
Chlornitrofen	Cl ₃	87	—	—	—	—	—	99	—
Chlorothalonil	Cl ₄	100	95	101	91	106	—	89	—
Chlorpyrifos	Cl ₃	61	—	91	—	—	—	—	—
Cycloprothrin	Cl ₂	30	84	87	80	97	83	93	90
Cyhalothrin	F ₃ , Cl	13	—	—	—	—	82	98	—
Cyfluthrin	F, Cl ₂	48	—	—	—	—	—	96	—
Cypermethrin	Cl ₂	57	91	92	87	105	—	—	—
Dichlofluanid	F, Cl ₂	39	—	—	—	—	—	91	—
Dicloran	Cl ₂	57	108	96	86	101	—	—	—
Dichlorvos	Cl ₂	91	56	50	54	47	43	62	49
Etridiazol	Cl ₃	70	94	87	98	98	—	—	—
α-Endosulfan	Cl ₆	83	91	100	88	107	—	—	—
β-Endosulfan	Cl ₆	104	98	101	86	110	—	—	—
Endosulfan sulfate	Cl ₆	96	101	97	83	109	—	—	—
Fenarimol	Cl ₂	91	92	—	—	—	—	—	101
Fenvalerate	Cl	52	—	—	—	—	—	96	—
Flucythrinate	F ₂	3	—	—	—	—	—	—	ND ^g
Flutolanil	F ₃	4	—	—	—	—	—	—	—
Fluvalinate	F ₃ , Cl	13	—	—	—	—	—	—	—
Fthalide	Cl ₄	130	96	106	87	109	—	—	—
Iprodione	Cl ₂	61	114	100	90	109	—	—	—
Isomer of iprodione ^h	Cl ₂	22	119	97	96	110	—	—	—
Kelthane	Cl ₅	113	—	—	—	—	101	—	—
Linuron	Cl ₂	57	97	—	—	—	—	—	96
Metolachlor	Cl	57	—	—	—	—	78	79	—
Permethrin	Cl ₂	70	84	88	83	100	—	—	—
Phenisobromolate	Br ₂	52	—	—	—	—	—	—	—
Phosalone	Cl	43	—	89	—	—	—	—	—
Pretilachlor	Cl	52	—	83	—	—	—	—	—
Procymidone	Cl ₂	74	—	97	—	—	—	—	—
Profenofos	Cl, Br	91	—	—	—	—	—	85	—
Propanil	Cl ₂	65	94	—	—	—	—	—	94
Propyzamide	Cl ₂	65	—	—	—	—	73	109	—
Prothiofos	Cl ₂	104	—	—	—	—	—	91	—
Pyrazoxyfen	Cl ₂	52	85	—	—	—	—	—	98
Quintozene	Cl ₅	77	—	77	—	—	—	—	—
Tetradifon	Cl ₄	113	—	—	—	—	—	107	—
Toleclofomethyl	Cl ₂	109	—	—	—	—	—	—	—
Tralomethrin	Br ₄	17	89	87	—	100	—	—	—
Triadimefon	Cl	35	—	—	—	—	—	—	—
Triadimenol	Cl	39	—	—	—	—	—	—	—
Vinclozolin	Cl ₂	91	93	101	92	107	—	—	—

—: not tested. ^a: The operating conditions are shown in Figure 1. ^b: The relative response factors are based on chlorothalonil (=100). Response factor = {(peak area) × (molecular weight)} / {quantity, ng} × (number of halogens). ^c: fortification level, 0.5ppm. ^d: fortification level, 1ppm. ^e: fortification level, 10ppm. ^f: total of E- and Z-isomers. ^g: not detected due to weak response. ^h: 3-(1-methyl-ethyl)-N-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioxo-1-imidazolidinecarboxamide. A: cabbage. B: radish. C: onion. D: potato. E: soybean. F: tea. G: brown rice.

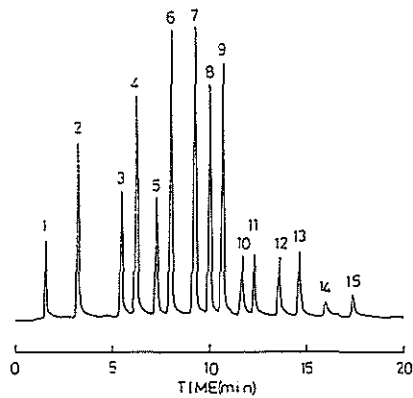


Fig. 1.9 HECD gas chromatogram of onion fortified with 15 pesticides (0.5pp each).

Operating conditions: column DB-1 (0.53mm I.D. x15m); temperature, inlet 220°C, oven initial 100°C for 0.5 min, 10°C/min to 280°C and 280°C for 1.5 min, detector base 300°C, furnace 800°C; carrier gas, He 30ml/min; reaction gas, H₂ 50ml/min; solvent, 1-propanol 0.5ml/min.

Peak identities: 1. dichlorvos, 2. echlomezole, 3. dichloran, 4. chlorothalonil, 5. vinclozolin, 6. fthalide, 7. α -endosulfan, 8. β -endosulfan, 9. endosulfan sulfate, 10. iprodione, 11. isomer of iprodione, 12. permethrin, 13. cypermethrin, 14. tralomethrin, 15. cycloprothrin.

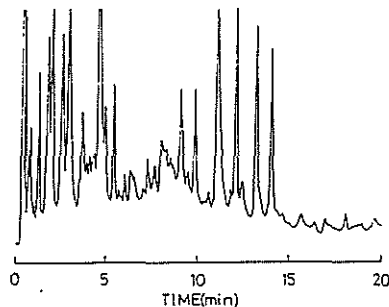


Fig. 1.10 ECD gas chromatogram of a 2- μ l injection of the 500-fold diluted solution of the same sample as shown in Fig. 1.9.

Operating conditions: column, DB-5 (J&W) 0.53mm I.D. x 15m; inlet temperature, 220°C; column temperature, initial 100°C for 0.5 min, then 10°C/min to 280°C and at 280°C for 1.5 min; detector, 300°C; carrier gas, N₂, 10ml/min; make-up gas, N₂ 60ml/min.

The chromatogram is compensated for baseline drift.

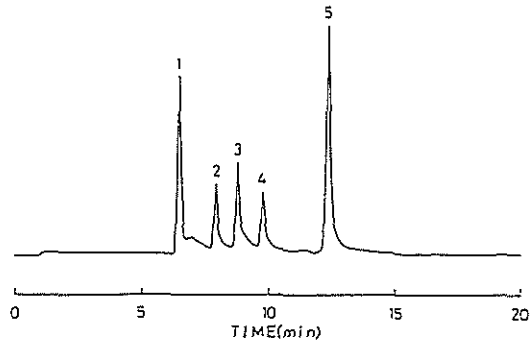


Fig. 1.11 HECD gas chromatogram of tea fortified with 5 pesticides (10ppm each). Operating conditions are shown in Fig. 1.9. Peak identities: 1. chlorothalonil, 2. dichlofluanid, 3. anilazine, 4. profenofos, 5. tetradifon.

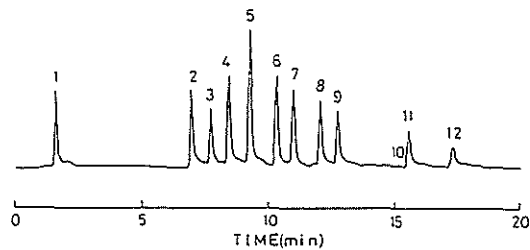


Fig. 1.12 HECD gas chromatogram of brown rice fortified with pesticides (0.5ppm each). Operating conditions are shown in Fig. 1.9. Peak identities: 1. dichlorvos, 2. propanil, 3. linuron, 4. captan, 5. chlorfenson, 6. chlorobenzilate, 7. captafol, 8. bifenox, 9. fenarimol, 10. flucythrinate, 11. pyrazoxyfen, 12. cycloprothrin.

第4節 摘要

多成分の農薬の残留分析に適用できる汎用分析法のための精製法として分取液体クロマトグラフィーの応用を検討した。分取液体クロマトグラフィーのカラム充填剤は繰り返し使用できる必要がある。シリカゲルやフロリジルなどの吸着剤は使用の度に再生する必要があり、安定したクロマトグラムを得ること難しいためこの条件に適合しない。再使用が可能で安定したクロマトグラムを得るためにゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)または液・液分配クロマトグラフィー(LPC)の可能性を検討した。充填剤としては品質が安定している合成樹脂製の高速液体クロマトグラフィー用充填剤を使用した。分取用のカラムは試料からの粗抽出液を注入するために大きな保持容量を必要とするため内径22~25mmのものを用いた。現在入手可能な樹脂としてはポリスチレンジビニルベンゼン共重合体製のものがある。この樹脂はジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、トルエンあるいはヘキサンなどの溶媒を用いればGPCとして使用可能であり、水、メタノールあるいはアセトニトリルを用いればLPCとして利用可能である。

GPCは分子の大きい化合物ほど早く溶出するため試料由来の脂肪分や葉緑素などの比較的分子の大きなきょう雑物は早く溶出され、農薬のような比較的分子の小さい化合物は遅れて溶出するために精製効果が得られた。さらに、ゲル粒子が損傷を受けない限り繰り返し使用することができた。

しかし、GPCは分子量の近似している化合物の分離はできないため、試料由来の分子量の小さいきょう雑物を除去できない。例えば、FTD-GCでアブラナ科の野菜類の有機りん剤やカーバメイト剤を分析する場合GPCのみの精製ではきょう雑物の除去が不十分であった。このような場合は検液のアセトン溶液を含水フロリジルの層を通過させるだけできょう雑物を除くことができた。この場合でもFPD-GCを用いれば有機りん剤の測定は支障なく行なうことができた。有機塩素系農薬の残留分析では従来ECD-GCが用いられてきた。ECD-GCは高感度ではあるがきょう雑物の妨害を受け易く、高度の精製操作を必要とするために分析操作ははん雑である。従って、残留農薬と小さな分子のきょう雑物の分離ができないGPCによる精製だけではECD-GCによる測定は不可能である。この問題を解決するためにHall型電気伝導度検出器(HECD)の応用を検討した。HECDをハロゲンモードで使用した場合塩素と炭素の感度比は 10^4 あり、GPCのみの精製で妨害ピークはなく高感度でしかも簡便な残留分析法を確立することができ

た。

さらに、同じ充填剤をメタノール/アセトニトリルを移動相としたLPCはGPCと同様に再現性のよいクロマトグラムを示し、GPCで比較的大きな分子を取り除いた後に使用することでECD-GCでの分析にも十分に利用できる程度の精製効果が得られた。

以上のことから、従来GCまたはHPLCで分析されてきた農薬については、GPCおよびLPCを精製手段として極めて汎用性の高い残留分析法を確立することができた。

第2章 残留農薬分析のための簡易分析法—活性炭・フロリジルミニカラムの利用⁷⁹⁾

第1章で述べたGPCやLPCを用いる精製法はGPC装置があれば半永久的に繰り返し使用可能であるためモニタリング分析に極めて有力である。能率の点からはやはり自動化が不可欠であるが、自動化GPC装置は高価である。一方、公定分析法などの従来の分析法によくみられるようにフロリジルや活性炭は移動相の極性などを調節することで数多くの農薬の精製に利用されてきた¹⁵⁻⁵⁰⁾。従来のフロリジルや活性炭を使用した分析法においてフロリジルまたは活性炭単独のカラムクロマトグラフィーだけでは精製が不十分な場合は凝固法などを併用して精製効果を上げた³²⁻³⁵⁾。また、複数の農薬を一本のカラムで精製する場合には移動相溶媒の極性を段階的に変えて極性の弱い農薬から順に溶出させる方法が用いられてきた^{34, 43)}。しかし、それらの方法は1回の分析操作に長時間を要し、対象化合物の溶出は吸着剤の活性および移動相中の水分などの影響を受け易く、さらに移動相の段階的変更を行なうために操作がはん雑であり、再現性に問題があった。このため、本章においては活性炭とフロリジルの特性を利用し、カラムクロマトグラフィーは妨害物を除くことのみを重点を置き、農薬相互の分離はGCの高分離能に期待することとして極めて簡易でしかも経済的な分析法を開発した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

トルエン、アセトン、メタノール、塩酸、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：試薬特級

濾過助剤：ハイフロスーパーセルを水およびアセトンで洗浄し風乾した。

活性炭：Darco G-60を2N塩酸で洗浄し、水で酸を洗い流し、アセトンで脱水洗浄した後風乾させた。

セルロース粉末：カラムクロマトグラフィー用微結晶セルロース(アビセル)をアセトンで洗浄し、風乾させ

た。

フロリジル：60～100メッシュのものを130℃で24時間活性化し、デシケーター中で冷却し、フロリジルの重量の4%に相当する量の水を加えてよく混和した。

農薬の標準品：anilazine (triazine), buprofezin, chlorothalonil (TPN), cyanophos (CYAP), cyhalothrin, cypermethrin, diazinon, dichlofluanid, dichlorvos (DDVP), dimethoate, endosulfan (α 体, β 体およびendosulfan sulfateのそれぞれの標準品), EPN, etridiazole, iprodione, isoprocarb (MIPC), isoxathion, malathion, methidathion (DMTP), metolcarb (MTMC), osfencarb (BPMC), oxadixyl, propoxur (PHC), prothiofos, tralomethrin および 3, 5-xyllyl methylcarbamate (XMC)の標準品はそれぞれの農薬を製造販売している農薬会社より提供されたものを用いた。各標準品の純度は99%以上であった。各農薬の標準溶液はトルエン溶液とし、0.01～1ppmの範囲で調製した。

分析用試料：玄米、温州ミカン、日本ナシ、ブドウ、サクランボ、イチゴ、メロン、カボチャ、トマト、ナス、ハクサイ、漬菜類（ノザワナ、カラシナ、チンゲンサイ、タカナ、ゲンスケカブナ、ヒロシマナ）、同漬物（カラシナ、ヒロシマナ、ゲンスケカブナ）、キャベツ、大豆（いずれも食用部分）。

漬菜類および同漬物は長野県植物防疫協会から提供を受けた。玄米、ブドウ、トマトおよびナスは自家栽培品を用い、その他は市販品を用いた。

1.2 器具および装置

フードプロセサー（三菱FP-3000）、カートリッジミル（池田理化CM-10）、振とう機（宮本理研MW-L型）

ガスクロマトグラフ：Hewlett・Packard HP-5710A および HP-5830A；検出器，FTD(N-P FID) および ECD；カラム，メガボアカラム J & W DB-5 および DB-17 (0.53mm I.D. x 15m)，5%シリコン DC-200 / ガスクローム Q (80-100 mesh) 3mm I.D. x 2m，5%シリコン OV-1 / ガスクローム Q (80-100 mesh) 3mm I.D. x 1.2m

ガスクロマトグラフの操作条件は Fig. 2.1 および Fig. 2.2 の脚注に記載した。

ミニカラムの作成：ガラス管（内径8mm，長さ250mm）の細く絞った下端にガラスウールを詰めて、垂直に保ち、下から順番に、4%含水フロリジル0.5g，活性炭-結晶セルロース混合粉末（1+4，w/w）0.2g および無水硫酸ナトリウム1.5g を乾式で充填して積層させた。このカラムに、使用直前にトルエン10mlを注いで流下させ

てトルエンは捨てた。

1.3 分析操作

磨砕した試料50～100g（玄米および大豆は50g，野菜および果実は100g）を共栓付三角フラスコに採取した。玄米および大豆には等量の水を加えて1時間室温で放置し、この試料にメタノール100mlを加えて30分間振とう抽出した。抽出液をハイフロスーパーセルを約1cmの厚さに敷いた桐山漏斗を用いて吸引濾過し、漏斗上の残渣を集め、50mlのメタノールを加えて攪拌した後、洗液を濾過した。濾液と洗液を合わせてその容量を測定したのち、この抽出液の20mlを分液漏斗に取り、飽和塩化ナトリウム溶液約30mlおよびトルエンを正確に10ml加え5分間振とうした。静置後、トルエン層を分取し、その内の5mlを取り、予め用意しておいたミニカラムに注いだ。トルエン層の上端がカラム充填剤の上端に達した時に、さらにトルエン5mlを注いで流下させた。流出したトルエンを目盛り付き試験管に集めて10mlに定容とし、この一定量をマイクロシリッジに取りガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから残留農薬の量を算出した。

2. 結果および考察

25農薬，15作物について本法の汎用性を検討した。Table 2.1 に添加回収試験の結果を示した。試料への添加濃度はそれぞれの農薬の残留基準値⁶⁾を目安とした。Table 2.1 中の○印は回収率が90%以上得られた場合を、×印は回収率が著しく不良であった場合を、そして、空欄は試験未実施を示している。実験を行なった25農薬中、dimethoate と oxadixyl を除き、23農薬で90%以上の回収率を得た。dimethoate はトルエンに易溶 (>300 g/kgトルエン)⁸⁰⁾ であるが、水溶性が高く (21℃, 25 g/l 水)⁸⁰⁾、メタノールにも易溶 (>300 g/kgメタノール)⁸⁰⁾ であるため、一回の抽出操作では農薬のトルエン層への移行が十分でなかったと思われる。また、oxadixyl の水、メタノールおよびトルエンへの溶解度は25℃でそれぞれ3.4 g/l，96 g/l および37 g/l⁸⁰⁾ であり、水-メタノール層からトルエン層への転溶が不十分であったと思われる。

Hollandら⁴⁹⁾の実験でも acephate, dimethoate および dichlorvos の回収率が低く、いずれも水およびメタノールへの溶解度が大きいと思われる (acephate, 室温で650 g/l 水, dichlorvos, 20℃で10 g/l 水)⁸⁰⁾。本実験では dichlorvos の回収率は良好であった。Hollandらの実験では転溶時のNaCl濃度が約8%であったが、dichlorvosの残留分析法には水-アセトン層から高濃度のNaClの共存下で石油エーテルで抽出している例¹⁵⁾があり、本実験では飽和のNaClの共存下、dichlorvosをト

ルエンで抽出して良好な回収率を得た。

Dimethoate と oxadixyl の回収率の低下はミニカラムからの溶出にも原因があったと考えられる。これらの2農薬はフロリジルカラムに強く吸着されるため溶出に強極性溶媒（例えば、50%アセトン/ヘキサン）を必要としたが、その他の農薬は中程度の極性溶媒（例えば、15%アセトン/ヘキサン）で溶出された^{15, 50}。

これらのことから、dimethoate および oxadixyl の4%含水フロリジルからの溶出にはトルエンでは不十分であったことおよび水-メタノール層からトルエン層への転溶が不十分であったことが重なって両農薬のみ回収率が著しく低下したと考えられる。

このため、この精製法を残留分析に適用する場合は対象農薬の水への溶解度が数 g/l を超える場合には回収率の検討を十分に行なうことが必要と思われる。

Kawamuraらは有機りん系農薬の精製に活性炭カラムでベンゼン、アセトニトリルおよび酢酸エテルの混合溶媒を用いて良好な回収率を得た⁴⁵。トルエンは活性炭に対してはベンゼンと同程度に溶出力の強い溶媒であり⁸¹、農薬は吸着による損失がなく溶出されるが、葉緑素などの比較的分子の大きい化合物は活性炭に吸着されて除かれると考えられる。

一般に、有機りん剤はアセトン抽出、ジクロロメタン転溶またはヘキサン転溶だけで、F P D-G Cによる分析が可能である¹⁵（但し、高脂質試料ではヘキサン-アセトニトリル分配などによる脱脂操作が必要）。しかし、有機塩素剤の E C D-G C、合成ピレスロイドの E C D-G C または F T D-G C あるいはカーバメイト剤の F T D-G C による分析では相当高度の精製操作を必要とする¹⁵⁻²⁵。その手段としては凝固法²⁸⁻³⁵、T L C^{43, 44} あるいはカラムクロマトグラフィー¹⁵⁻²⁵などが用いられてきた。これらの手段を導入するためには、抽出、溶解および濃縮の操作を頻繁に行なう必要があるため、相当の時間を必要とする。この点、本法は濃縮操作を全く行わず、1本のミニカラムで、活性炭とフロリジルの2段階のクロマトグラフィーを済ませることができて極めて簡便である。

Fig. 2. 1 は玄米に11種の農薬を添加して F T D-G C で測定した場合のクロマトグラムを示した。メガボアカ

ラムを使用したので良好な分離が得られ、測定の妨害はなかった。

Fig. 2. 2 はサクランボ摩擦砕物に α -および β -endosulfan 並びに endosulfan sulfate を同時にそれぞれ 0.1 ppm ずつ添加して E C D-G C で測定した例を示した。パックドカラムを用いた E C D による高感度分析にもかかわらず妨害ピークはなく、ミニカラムの有用性を示すことができた。

一方、本法は抽出液の一部（最終的に最初の試料の 1/20）を分析に供するために、それだけ、最初の試料量を多くするか、または、高い感度の検出器を用いる必要がある。しかし、残留農薬の検出限界を残留基準値の概ね 1/10 ~ 1/5 に設定することは可能であり、これはモニタリングの性質上必要十分な感度であると考えられる。本法の検出限界は有機りん剤で 0.01 ~ 0.02 ppm、カーバメイト剤および合成ピレスロイドで 0.05 ppm、endosulfan のような有機塩素剤では 0.005 ppm 程度となった。しかし、anilazine は感度が悪く、検出限界は 0.2 ppm であった。

なお、本法では玄米や大豆のような油脂を多く含んでいる試料についても、少数例の分析ではあるが特別の脱脂操作をすることなく良好な結果を得た。しかし、G C カラムを長持ちさせるためには、脂肪分が抽出されにくい条件で農薬を抽出することが望ましく、最初の抽出溶媒をアセトニトリルに代えた方が好ましいと考えられる。

3. 要 約

ガスクロマトグラフィーによる残留農薬の簡易分析法のための精製法として、活性炭-フロリジルのミニカラムの有用性について検討した。試料をメタノールで抽出し、抽出物をトルエンへ転用させ、トルエン溶液をミニカラムを用いて精製し、ガスクロマトグラフ（E C D および F T D）で定量した。

25農薬、15作物について回収率試験を行った結果、dimethoate および oxadixyl 以外の農薬は全て 90% 以上の回収率を得た。検出限界は有機りん系農薬が 0.01 ~ 0.02 ppm、カーバメイト系および合成ピレスロイド系農薬が 0.05 ppm、有機塩素系農薬が 0.005 ppm であった。本法は簡便かつ迅速な方法であり、多くの農薬のモニタリングに広く適用できると思われる。

Table 2.1 Availability of the procedure for multiresidue analysis.

Sample Pesticide	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Anilazine											○	○	○	○	
Buprofezin	○						○		○						○
Chlorothalonil	○						○		○		○	○	○	○	
Cyanophos			○												
Cyhalothrin*							○								
Cypermethrin*							○								
Diazinon			○	○											
Dichlofluanid			○												
Dichlorvos											○	○	○	○	
Dimethoate									×						
Endosulfan*					○										
EPN	○						○		○						○
Etridiazole*									○						
Iprodione		○				○	○	○	○	○					
Isoprocarb	○														
Isoxathion	○								○						○
Malathion	○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Methidathion				○											
Metolcarb	○														
Osfencarb	○														
Oxadixyl	×														
Propoxur	○														
Prothiofos		○				○	○	○	○	○					
Tralomethrin*							○				○	○	○	○	
XMC	○														

○: Good recovery (average recovery $\geq 90\%$). ×: Poor recovery (average recovery $\leq 50\%$). Blank: not tested. *: detected with ECD-GC. (The others were detected with FTD-GC.)

sample: A, brown rice; B, unsyuu orange; C, pear; D, grape; E, cherry;
F, strawberry; G, melon; H, pumpkin; I, tomato; J, egg plant; K, cabbage;
L, chinese cabbage; M, Brassicas; N, pickled Brassicas; O, soy bean.

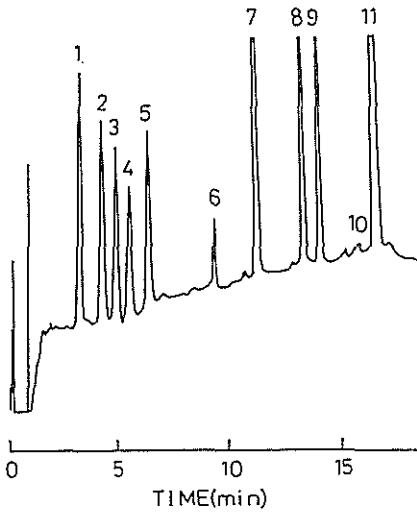


Fig. 2.1 Gas chromatogram of a brown rice sample fortified with each 1.7ppm of metolcarb(1), isoprocarb(2), XMC(3), osfencarb(4), propoxu(5), chlorothalonil(6), malathion(7), buprofezin(8), isoxathion(9), oxadixyl(10) and EPN(11).

Operating conditions: column, J & W Scientific DB-5 (0.53mm I.D. x15m); injection temperature, 250°C; oven temperature, initial 150°C for 5 min, then programmed 10°C/min to 250°C, and 250°C for 3 min; detector temperature, 300°C; carrier gas, N₂ 10 ml/min; H₂, 3 ml/min; air, 100 ml/min; make-up gas, He 30 ml/min; instrument, HP 5890A with N-P FID.

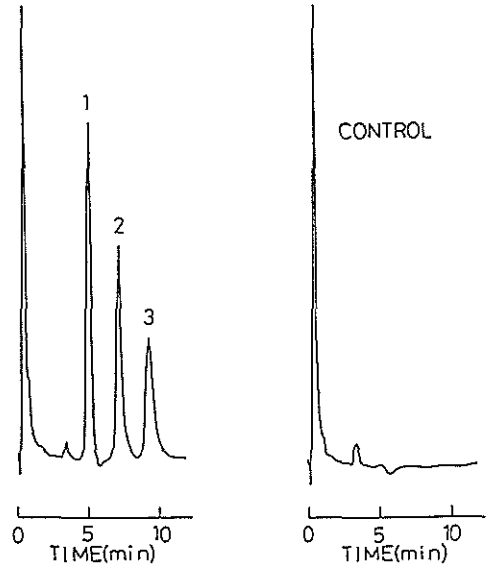


Fig. 2.2 Gas chromatograms of a control cherry sample and a cherry sample fortified with each 0.1ppm of α -endosulfan(1), ν -endosulfan(2) and endosulfan sulfate(3).

Operating conditions: column, 2% OV-101/Gas Chrom Q (80-100 mesh) 3mm I.D. x1.2m, carrier gas, N₂ 30 ml/min; make-up gas, Argon + methane = 9 + 1, 40ml/min; injection temperature, 200°C; oven temperature, 180°C; detector temperature, 250°C; instrument, HP-5830A with ECD (⁶³Ni, 0.15GBq).

第3章 電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーの残留農薬分析への応用

農薬の残留基準は親化合物である農薬本体の外に毒性的に意味のある分解・代謝物を合せて規制している⁶⁾。これらの化合物の分析に当たっては親化合物と分解・代謝物を別々に測定する方法と親化合物と分解・代謝物を分解して共通の分解物を生成させてその分解物を測定し、その値を親化合物に換算する方法がある^{15, 16)}。前者の方法は親化合物と分解・代謝物の存在比が明らかになり、残留農薬の消長をより詳細に把握することができるが、測定手順が複雑になる。後者の方法は測定化合物が1つであるので測定操作が簡便で残留性のおおよそを把握するのに適しており、抱合体をも包含した測定が可能である。

農薬はその分子構造中にフェノールあるいはアニリン残基を持つ化合物が多く、さらにそれらの分解・代謝物は親化合物と類似の化学構造を持つために加水分解により相当するフェノール化合物またはアニリン化合物を生成する。例えば、動植物あるいは微生物による分解・代謝により fenitrothion からは3-メチル-4-ニトロフェノール⁸²⁾が生成し、BHCやHCBの動物による代謝物としてグロロフェノール化合物⁸³⁾が、MCPや2, 4-Dの作物の代謝物として4-クロロ-2-メチルフェノール⁸⁴⁾および2, 4-ジクロロフェノール⁸⁵⁾が生成することが報告された。また、iprodione を散布した農作物を iprodione の加水分解物である3, 5-ジクロロアニリンを測定して iprodione に換算すると親化合物を測定するよりも高い値を示した⁸⁶⁾。

農薬が作物体内で代謝されて生じる抱合体が動物に摂取された場合に吸収されるかどうかおよび抱合体の毒性については今後の研究が必要であるが、少なくとも水溶性の抱合体は動物に吸収されることを示す報告がある⁸⁷⁻⁸⁹⁾。

通常の農薬の残留分析では抱合体などの水溶性の化合物は有機溶媒への転溶ができないため分析の対象外となっていることが多いが、今後残留農薬の安全性を検討する場合には抱合体を含める考慮することとなるであろう^{90, 91)}。

従来、フェノール化合物やアニリン化合物はエステルや酸アミドなどの誘導体に変えてGCで分析されており、ナノグラム以下の微量の検出が可能であった⁹²⁻⁹⁸⁾。しかし、誘導化反応に用いる試薬には保健衛生上の問題があり、さらに反応試薬の純度、反応生成物の精製、副反応生成物などの測定の妨害になるものの除去が必要であり、

はん雑な分析操作を必要とする。

このため、フェノール化合物やアニリン化合物をできるだけ簡便な操作で高感度に分析する方法を開発することは今後の農薬の残留分析にとって有用である。本章では、近年医学、生化学分野の分析で生体アミン化合物など⁹⁹⁻¹⁰³⁾や飲料や河川水中のフェノール化合物¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾の分析に応用されている電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを応用した簡便な残留分析法を開発した。

第1節 フェノール化合物の汎用分析法^{107, 108)}

近年、GCに代わって河川水、飲料あるいは尿などの液体試料中のフェノール化合物の分析に紫外吸光度検出器(UVD)^{109, 111, 113)}、蛍光光度検出器(FD)¹¹⁰⁻¹¹²⁾または電気化学検出器(LCECD)^{104-106, 112)}を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の応用例が報告された。UVDは簡便で汎用的であるが試料由来の妨害物の影響を受け易く、感度も十分でない。FDは特異的で高感度であるがなんらかの誘導体の形成が必要である。LCECDは酸化または還元され易い化合物に特異的かつ高感度の検出器としてフェノール化合物などの測定に応用されてきた。本論文では残留農薬の簡易分析法としてフェノール化合物をLCECDによって測定する手法について検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

フェノール化合物：Table 3.1 に示す。標準液はメタノール溶液とした。

塩酸、硫酸、りん酸、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウム：試薬特級

メタノール、アセトニトリル、イソプロピルアルコール、n-ヘキサン：液体クロマトグラフィー用

水：脱イオン水を一回蒸留した。HPLCの移動相には Milli QII (Millipore 社製)により精製した高純度水を用いた。

吸着用樹脂：XAD-4 (Rohm and Haas)を用いた。樹脂は3N HClで18時間ソックスレー抽出し、水でよく洗浄し、0.1N NaOHで数回洗浄し、さらに水でよく洗浄した。樹脂を乾燥させ、メタノール、アセトニトリル、アセトン、ヘキサンを用いてそれぞれの溶媒ごとに8時間ソックスレー抽出した。精製した樹脂はメタノール中に貯蔵した⁹⁰⁾。

1.2 器具および装置

水蒸気蒸留装置、ロータリーエバポレーター、pHメーター

高速液体クロマトグラフ：ウォータース600Eマルチ送液システム、同712 WISP 全自動サンプルプロセサー、ロ

ーダイニンインジェクター(20 μ l), ウォータース 490E多機能検出器, 島津製作所製UVD-2型検出器(254nm), クーロケム5100A LCECD (Environmental Sciences Associates, Inc.), S I Cクロマトグラムプロセッサー (System Instrument)

1.3 HPLCの操作条件

カラム: Lichrosorb RP-8(4.6mm I.D. x 250mm) および Shodex RSpak DE-613 (6mm I.D. x 250mm)

移動相: アセトニトリル/りん酸緩衝液(0.01 M, pH 2.4~5.5), 流速 1 ml/分, 40 $^{\circ}$ C

検出器: LCECDの電位, 下流側セル 700~1200mV, 上流側セル 下流側セルより低電位, ゲイン 1X1-5X 10; UVD, 波長 254nmおよび270nm, 感度 0.002-0.032AUFS

注入量: 20 μ l

1.4 分析操作

磨砕した試料20gを1lの二口フラスコに取り, 4N KOH 75mlを加えて, 還流冷却器を付けて2時間加熱還流した。必要に応じてシリコン消泡剤を加えた。放冷後, 冷却管の内部を少量の水で洗った後, 水蒸気蒸留の用意をした。二口フラスコに8N H₂SO₄ 75mlをゆっくりと加えた後, 緩やかに加熱した。受器には, 予め2N NaOH 20mlを入れ, 留出水の量が約150mlになった時に蒸留を停止した。

精製したXAD-4を内径18mm, 長さ300mmのガラスカラムに10cmの高さに充填し, 蒸留水50ml, 3N HCl 75mlを順次流下させた。3N HClの最初の25mlが流下した時に活栓を閉じて5分間そのまま保ち, その後, 残りの塩酸を流下させた。このカラムに, 水蒸気蒸留して集めた留出液に3N HClを加えて液のpHを3以下にしたものを注入し, 4ml/分の流速で流下させた。留出液の受器を3N HCl 10mlずつで2回洗浄しカラムに注入し, さらに3N HCl 100mlを流下させた。次いで, 水100mlを流下させ, 樹脂粒子間にある水をできるだけ完全に流下させた後活栓を閉じた。樹脂カラムに10%イソプロピルアルコール/ヘキサン混液25mlを注ぎ, 細いガラス棒で樹脂を攪拌し, そのまま5分間静置した。活栓を開き, 溶媒を流下させながら, さらに75mlの溶媒を流下させ, 流出した有機溶媒を集めて濃縮し, アセトニトリルに転溶して20mlに定容とし, 検液とした。

2. 結果および考察

2.1 HPLCのカラム

フェノール化合物の標準品のメタノール溶液を用いて分離条件を検討した。クロマトグラムはUVD(254nm)を用いて観察した。LCECDは水系の移動相を必要とするため, カラムは逆相分配系カラムのLichrosorb R

P-8およびShodex RSpak DE-613を用いた。移動相はアセトニトリルまたはメタノールとりん酸緩衝液との混合溶媒を用いた。Lichrosorb RP-8は1つひとつのフェノール化合物の分析には十分に使用できるが, 異性体(例えば, 2, 4-ジクロロフェノールと2, 6-ジクロロフェノール)間の分離が不良であった(Table 3.1)。また, 添加回収試験では用いた5種のフェノール化合物間の分離はLichrosorb RP-8よりShodex RSpak DE-613の方が良く, 測定に支障のない程度での分離が得られた(Fig. 3.1)。

2.2 LCECDの操作条件

フェノール化合物の検出条件(酸化反応系)を検討するためにまず, 測定対象化合物の電流-電位特性を測定した。各フェノール化合物を50~60ngの一定量をHPLCに注入し, 検出器の一定の電位(正確には標準電池に対する電位差)ごとに発生する電流を検出し, 縦軸に電流, 横軸に電位をとり, 各フェノール化合物について電流-電位曲線を作成した。この曲線では限界電流電位(E_L)の1/2の電流が生じる電位を半波電位($E_{1/2}$)と呼び, 設定された条件下での化合物の特性を示している。従って, 同一条件下では $E_{1/2}$ と電流-電位曲線を標準品と比較することで, 保持時間と合わせて化合物の同定に利用することができる。ニトロ置換フェノール化合物は $E_{1/2}$ が高く, 塩素置換体は低い。なお, 2, 4-ジニトロフェノールの E_L は電位が高く測定できなかったため, $E_{1/2}$ 値は推定値である。検出感度については塩素の置換数が増すほど低下し, 2-位より4-位の置換の方が感度が劣った。このことはニトロ置換体についても該当した。なお, ニトロ置換フェノール化合物は還元反応系で測定することができるがHPLCの移動相中の酸素分子の除去が必要であるために酸化反応系よりは手数を要する。なお, LCECDは繰り返して使用している間に電極表面が汚れて感度が低下することがあるが, 本実験ではガードセルを使用したことおよび測定セルが二連式となっているために長時間の使用に耐えた。

2.3 LCECDの直線性と検出限界

フェノール, 2-ニトロフェノール, 2, 4-ジクロロフェノールおよび2, 4, 6-トリクロロフェノールの4種の混合標準溶液を用いてLCECDの直線性について試験した。測定はUVDとLCECDを直列に連結して行なった。各検出器の最小検出量をTable 3.2に示した。検出感度はLCECDがUVDより5~10倍高感度であった。セル電位は2-ニトロフェノール以外は700mVで, 2-ニトロフェノールは900mVで測定した。フェノールは0.1~60ng, 他のフェノール化合物は0.4~55ngの範囲で直線性が得られた。2-ニトロフェノール

は700mVで測定可能であるが、感度が著しく低下し(フェノールの約30%の感度)、ピーク面積の変動が大きかった(5回の繰り返し測定で変動係数13.8%)。なお、同時に測定したUVDの変動係数は3.1%であった。フェノール、2,4-ジクロロフェノールおよび2,4,6-トリクロロフェノールの5回測定での変動係数はLCECDではそれぞれ2.2%, 3.7%および3.6%であり、UVDではそれぞれ0.5%, 3.5%および3.2%であった。なお、変動係数の測定でHPLCへ注入した量はフェノールが60ng, その他のフェノール化合物がそれぞれ55ngであった。

これらのことから、LCECDのセル電位が測定化合物の限界電流電位(E_L)より低い電位である場合は検出感度が低くなり、さらに測定値の変動が大きくなるおそれがあった。このため、複数の化合物を測定する場合は対象化合物中の最も大きい E_L をセル電位とする必要があると思われる。

2.4 フェノール化合物の捕集

アンバーライトXAD系の樹脂は河川水や尿から有機化合物を効率よく吸着、濃縮するために利用されている^{92, 96, 114-116})。水蒸気蒸留の流出液からフェノール化合物を回収するために0.2N NaOH 200mlにフェノール化合物(各約20 μ g)を加え、稀硫酸を加えて酸性とし、XAD-4カラムによるフェノール化合物の回収率を求めた。4-ニトロフェノール、3-メチル-4-ニトロフェノール、4-クロロフェノール、4-クロロ-2-メチルフェノールおよび2,4-ジクロロフェノールの回収率は、それぞれ119, 126, 80, 93, 88%であった。

2.5 添加回収試験

磨砕したナス20gを水蒸気蒸留用のフラスコに取り、水75ml、フェノール化合物を各1ppm相当量添加し、4N H₂SO₄ 75mlを加えて水蒸気蒸留を行ない、回収率を求めた。その場合のクロマトグラムをFig. 3.2に示した。4-クロロフェノール、4-クロロ-2-メチルフェノールおよび2,4-ジクロロフェノールの回収率はそれぞれ78, 99, 102%を得たが、4-ニトロフェノールは試料由来の大きな妨害ピークに接近してクロマトグラ

ム上ではわずかにショルダーピークが観察されるに過ぎず、また3-メチル-4-ニトロフェノールは試料由来の妨害物と重なるため測定ができなかった。このため、ニトロフェノールの誘導体については試料が河川水の場合はアルカリによる加水分解で生じたフェノール化合物をXAD-4を用いて捕集することができるが、試料が作物体の場合は一旦適当な溶媒で抽出する方法を検討する必要があった。さらに、ニトロ置換フェノール化合物の場合はニトロ基のアミノ基への還元系での測定¹¹⁷⁾を検討する必要があると思われる。

以上、二連式検出セルを備えたLCECDは従来型よりは電極の汚染に対し強く、フェノール化合物をナノグラム以下の微量で検出することができる。また、XAD-4樹脂は水からフェノール化合物を効率よく回収することができた。これらのことから、河川水や地下水中のフェノール化合物および加水分解によってフェノール化合物を生成する農薬の分析のために、XAD-4樹脂でサンプルを精製し、LCECDを検出器とするHPLCによる分析法は従来法よりは妨害を受けにくく、感度もよくUVDを用いるよりは有利な方法である。ただ、固形物の多い試料を分析する場合には溶媒抽出などの精製を行う必要があった。

3. 要 約

HPLC-LCECDを応用した農薬由来の14種のフェノール化合物の微量分析法を開発した。加水分解して生じたフェノール化合物を水蒸気蒸留によって試料から抽出し、XAD-4樹脂で濃縮し、HPLC-LCECDによって分析した。カラムはShodex RSpak DE-613が分離状況が良好であった。移動相はアセトニトリル/りん酸緩衝液(0.01M, pH5.5)=6/4を用いた。フェノール化合物の最小検出量は0.1~0.4ng、回収率は1ppm添加で4-クロロフェノール、4-クロロ-2-メチルフェノールおよび2,4-ジクロロフェノールがそれぞれ78, 99, 102%であった。4-ニトロフェノールおよび3-メチル-4-ニトロフェノールは本法では回収率は不良であった。

Table 3.1 Voltammetric characterization and UVD response of selected phenolic compounds.

Phenolic compound	Relative retention time	LCECD			Response ratio at 1150 mV	UVD response ratio at 254 nm
		E ₀	E _{1/2}	E _L		
Phenol	1.00 ^a	350	435	650	1.00	1.00
2-Chloro-	1.22	350	405	650	0.65	0.63
2,4-Dichloro-	1.64	350	385	500	0.42	0.59
2,6-Dichloro-	1.56	300	375	600	0.51	0.32
2,4,6-Trichloro-	2.22	300	375	400	0.18	0.35
2,4,5-Trichloro-	2.26	350	420	500	0.20	0.10
2,3,4,6-Tetrachloro-	2.89	350	375	400	0.08	0.17
2,4-Dimethyl-	1.46	300	380	550	0.46	0.58
3,5-Dimethyl-	1.36	300	395	650	0.68	0.59
2-Nitro-	1.39	500	690	800	0.84	0.61
4-Nitro-	1.08	500	775	1000	0.39	0.50
2,4-Dinitro-	1.25	600	1100 ^b	>1200	0.13	0.59
4-Chloro-2-methyl-	1.62	300	335	450	0.34	0.92
3-Methyl-4-nitro-	1.21	500	765	1000	0.30	0.54

E₀: zero current potential at the foot of the C-V curve. E_{1/2}: half-wave potential. E_L: limiting current potential

HPLC conditions: column, Lichrosorb RP-8 (10 μm) 4.6mm I.D.X 250mm; mobile phase, 50% 0.01M phosphate buffer (pH 2.4) and 50% acetonitrile; flow rate, 0.5ml/min.

^a: retention time of phenol, 4.3 min. ^b: estimated value.

Table 3.2 Minimum detectable quantities of phenolic compounds with a LCECD and a UVD

Phenolic compound	Minimum detectable quantities (ng)	
	LCECD	UVD
Phenol	0.1	0.5
2,4-Dichloro-	0.4	4
2,4,6-Trichloro-	0.4	4
4-Nitro-	0.4*	4

LCECD: 700 mV (* 900 mV), gain 5X10

UVD: wave-length 254nm, 0.002 AUFS

(HPLC conditions as described in Table 1.)

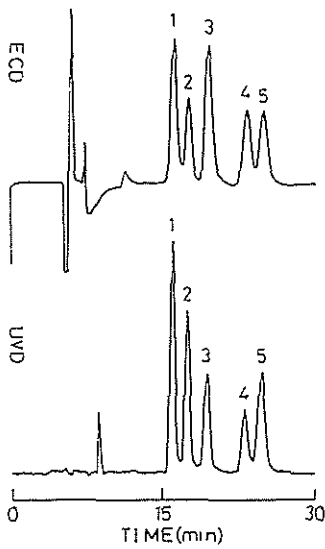


Fig. 3.1 Chromatograms of a standard mixture of 5 phenolic compounds

HPLC conditions: column, Shodex RSpak DE-613 (6mm I.D. x150mm); mobile phase, 40% 0.01M phosphate buffer (pH 5.5) and 60% acetonitrile; flow rate, 1 ml/min; column temperature, 40°C; sample size, 20 μ l; detector, LCECD (cell-1300mV, cell-2 800mV).

Peak identities: (1) 4-nitro-, (2) 3-methyl-4-nitro-, (3) 4-chloro-, (4) 4-chloro-2-methyl-, (5) 2, 4-dichlorophenol.

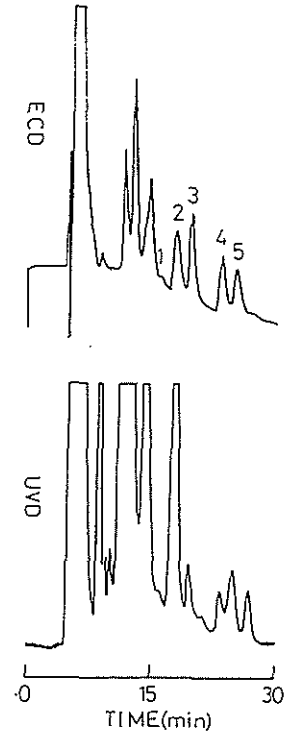


Fig. 3.2 Chromatograms obtained from 20g of egg plant samples fortified with 1ppm each of 5 phenols. Chromatogram A obtained by using LCECD and chromatogram B obtained by using UVD (270nm, 0.01AUFS). Other HPLC conditions as described in Fig. 3.1. Peak identities: (1) 4-nitro- (poor recovery), (2) 3-methyl-4-nitro- (determination failed due to an interfering peak.), (3) 4-chloro-, (4) 4-chloro-2-methyl-, (5) 2, 4-dichlorophenol.

第2節 アニリン化合物の汎用分析法^{107, 118)}

近年、発展が目ざましいHPLCでは電気化学検出器(LCED)を用いて、ナノグラムの生体アミン化合物⁹⁹⁻¹⁰³⁾や尿中のクロロアニリン化合物の抱合体¹¹⁹⁻¹²¹⁾を誘導化反応を行わずに分析した例が報告されている。

本論文ではLCED-HPLCを用いて加水分解によってアニリン化合物を生じる一群の農薬の残留分析法について検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

塩酸、りん酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム：試薬特級

アセトニトリル、メタノール、ヘキサン：液体クロマトグラフィ用溶媒

HPLC用移動相：0.01Mりん酸緩衝液とメタノールおよびアセトニトリルの混合液

アニリン化合物：Table 3.3 に示した。

農薬：Table 3.4 に示した。

1.2 器具および装置

水蒸気蒸留装置：Dean-Stark 蒸留装置^{86, 122)}

高速液体クロマトグラフ：前節と同じ。

検出器：前節と同じ。

記録計：前節と同じ。

1.3 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム：Zorbax (CN 4.6mm I.D. x 250mm) または μ -Bondapak C18 Radialpack (8mm I.D. x 100mm)

移動相：0.01Mりん酸緩衝液-メタノール(1+1) 混液または0.01Mりん酸緩衝液-(1+2)アセトニトリル・メタノール混液(1+1)、流速：1~2ml/分

カラム温度：40°C

検出器：操作条件はTable 3.3 およびFig. 3.3の脚注に記載した。

ガードセル：移動相の送液ポンプとインジェクターとの間に連結し、溶媒中の妨害物質の除去を行なった。ガードセルの電圧は検出器セルの電圧よりも100mV 高く設定した。

1.4 電流-電位曲線の測定

HPLCの操作条件の検討はUVDを用いて行なった。次いで、個々のアニリン化合物の約40ngの一定量を操作条件を一定にしたHPLCに注入し、得られたクロマトグラムから各アニリン化合物のピーク面積を求め、電流-電位(C-V)曲線を描いた。C-V曲線は測定物質ごとに異なるため、測定しようとする全てのアニリン化合物についてC-V曲線を求めた。複数のアニリン化合物を同時に測定する場合は対象化合物の限界電流電位

(E_L)中の最高の電位を下流側セル(cell-2)の電位とし、上流側セル(cell-1)には測定対象化合物のピークが検出されない最高の電位とした。

1.5 分析操作

磨砕した試料50gを500ml容の丸底フラスコに取り、3N HCl 100mlを加え、フラスコに逆流冷却管を装着し、緩やかに1時間煮沸した。加熱を停止し、フラスコの内容物を室温にまで冷却し、冷却管の内部を少量の水でフラスコに洗い込んだ。

分解フラスコに8N KOH 100ml、ヘキサン10mlおよびシリコン消泡剤数mlを加えてDean-Stark 蒸留装置を組み立て、蒸留装置を緩やかに3時間加熱還流させた。留液だめのヘキサンと水を分液漏斗に移し、留液だめをヘキサン約5mlずつ二回洗浄し、洗液を分液漏斗に加え、ヘキサン層と水層を分離した。ヘキサン層を取り、pH2~3のりん酸緩衝液2~3mlを加えてヘキサン層を40°Cで減圧下で留去した。さらに、りん酸緩衝液を加えて40mlに定容とし、HPLCにはその20 μ lを注入して測定した。

2. 結果および考察

2.1 HPLCの操作条件の検討

カラムとしてZorbax CN, Radialpak CN, 同phenyl, 同C18, 同C8, Lichrosorb RP-2およびNucleosil NH₂を用いて、りん酸緩衝液/アセトニトリル・メタノール混液を移動相としてアニリン化合物の分離条件を検討した。

Nucleosil NH₂はpH5.5のりん酸緩衝液では全てのアニリン化合物の相互分離は不可能であった。その他のカラムでは異性体間の分離は十分でない場合があるにしても、個々のアニリン化合物の測定には支障がなかった。緩衝液と有機溶媒の混合比は70/30~50/50の間で良好なクロマトグラムを得ることができた。アニリン化合物の相互の分離と保持時間は緩衝液/有機溶媒の混合比、緩衝液のpH およびアセトニトリル/メタノールの混合比によって影響されたが、供試した6種類のアニリン化合物の相互の分離はFig. 3.3の脚注に示す条件が最も良好であった。

2.2 電流-電位曲線

9種類のアニリン化合物についてC-V曲線を測定し、各アニリン化合物のゼロ電流電位(E_0)、半波電位($E_{1/2}$)および限界電流電位(E_L)を求めた(Table 3.3)。複数のアニリン化合物を測定するために、直列二連セルの電位をcell-1, 500mV およびcell-2, 1,000mVに設定した場合の相対感度を求めた。アニリン化合物の置換基が多くなるほど感度が下がり、特にハロゲンやニトロ基の置換数が増すほど感度が低下した。この現象はフェノ

ール化合物と同じ傾向であった¹⁰⁸⁾。

2.3 アニリン化合物の回収試験

加水分解液からのアニリン化合物の回収方法として水蒸気蒸留法を検討した。50gのナスのアルカリ加水分解液に既知量のアニリン化合物を添加し、緩やかに煮沸して水と共に蒸留されてくるアニリン化合物を稀硫酸で捕集し、捕集液をアルカリ性にしてヘキサンで抽出する方法について検討した。6種のアニリン化合物の回収率は4-フルオロアニリンおよび3, 5-ジクロロアニリンが50~60%, 2-クロロアニリンおよび2, 6-ジクロロアニリンが80~90%, 4-クロロアニリンおよび3, 4-ジクロロアニリンが100%であった。前2者の回収率が不良であったためDean-Stark 蒸留装置を用いて蒸留と溶媒抽出を同時に行なったところ、上記6種のアニリン化合物の回収率は全て90%以上に改善された。

2.4 農薬の回収試験

農薬の加水分解のための条件として磨砕したナス50gに対してfluoroimide, anilazine, linuron, alachlorおよびiprodisoneの5種の農薬を約20 μ gずつを添加し、酸またはアルカリによる加水分解を行なった場合の回収率を求めた。アルカリ加水分解は4N KOH 200mlを加え、3時間の加水分解および蒸留を行ない、酸加水分解は1.5の分析操作によった。回収率を比較した結果をTable 3.4に、その時のクロマトグラムをFig. 3.3 AおよびBに示した。クロマトグラムAはアルカリ加水分解の場合を、Bは酸加水分解の場合を示した。Fig. 3.3 AおよびB中のピーク2に相当する適当な農薬が入手できなかったため4-クロロアニリンの溶出位置のみを記載した。

Fluoroimideは酸およびアルカリ加水分解ともにUVDでは妨害ピークのため測定できなかったが、LCECDでは若干の妨害はあるものの十分に測定可能であった。Anilazineは酸分解の方が回収率が良好であった。Linuronは酸加水分解よりアルカリ加水分解の方が高い回収率を得たが、いずれの場合も回収率が不良であった。酸加水分解の場合UVD (270nm)での回収率が90%を示したが、無処理区試料のクロマトグラムからは明確ではないが、妨害ピークと重なっているものと思われる。Linuronの残留分析法として加水分解によって生じる3, 4-ジクロロアニリンをクロロアセチル化しECD-GCにより測定する方法が報告されている¹⁵⁾が、この場合はlinuronを溶媒で抽出し、2N HCl 20ml, 110 $^{\circ}$ C 1時間の加水分解を行なった。本法は試料由来の多量のきょう雑物が共存する条件で加水分解を行なったため、酸の量が過少であったと思われる。Alachlorでは酸、アルカリ加水分解ともに回収率が不良であった。Alachlorの加水分解条件として溶媒抽出物を6N HCl, 20mlで2時間加熱還流さ

せる方法が報告されている⁹⁸⁾。本実験は酸の量が過少であったため加水分解が十分には進まなかったと考えられる。一方、iprodisoneでは酸、アルカリ加水分解ともに良好な結果を得た。UVDを用いて測定した場合妨害ピークとの分離が不十分であるために見かけの回収率が大きくなった。Iprodisoneの類縁殺菌剤のvinclozolin およびprocymidoneも加水分解によって3, 5-ジクロロアニリンを生成するので同一の方法でこの三者の殺菌剤の残留分析を行なうことができる。しかし、この三者の加水分解条件は異なりiprodisoneおよびvinclozolinが試料50g当り2N KOH 200mlで3時間の加熱還流で加水分解されるが、procymidoneは4N KOHを必要とすると報告されている⁸⁶⁾。また、化学構造が類似しているlinuron およびdiuronは、前者は2N HCl 20ml 2時間で加水分解されるが、後者は5時間を要すると報告されている¹⁵⁾。

本実験条件では、alachlorおよびlinuronで観察されたように、加水分解条件が農薬によりかなり異なるため同一加水分解条件で全ての農薬を分析することは困難であった。さらに、本実験では残留農薬を何らかの溶媒で抽出することなく直接加水分解を行なったが、加水分解の効率の改善および妨害物質を少なくするためには、溶媒抽出を行なった方が良好な結果が得られるものと思われる。

さらに、加水分解に使用する酸またはアルカリの量と濃度、加熱時間などは農薬ごとに異なり、そのことが回収率の良否を左右したと思われる。しかし、加水分解条件をより過激にすることはかえって十分分解の進んでいる農薬の回収率の低下を招くおそれがあるため、一つひとつの農薬について最適加水分解条件を検討する必要がある。

以上のことから、加水分解条件やHPLCの操作条件についてはなお検討を行う必要はあるが、HPLC-LCECD法はナノグラムの微量のアニリン化合物を誘導体化を行わずに分析できるため、加水分解によってアニリン化合物を生じる一群の農薬およびその分解・代謝物の残留分析法のため十分に有用な分析法であると考ええる。

3. 要約

HPLC-ECDを用いて加水分解によってアニリン化合物を生成する農薬およびその分解代謝物の残留分析法について検討した。農薬を酸またはアルカリを用いて相当するアニリン化合物に加水分解し、水蒸気蒸留/溶媒抽出によってアニリン化合物を分離し、LCECD-HPLCで分析した。

HPLCの操作条件は次の通りであった：カラム、ODS (4.6mm I.D. x250mm)；移動相、0.01M リン酸緩衝液 (pH2.4) / (1+2) アセトニトリル・メタノール混液 (50+50, v/v)；流速、1ml/min；カラム温度、40 $^{\circ}$ C

; LCECD, 印可電圧, 500mV~1000mV (酸化系)
 ナスを用いた回収率試験では0.4ppm添加で次の値を得
 た: fluoroimide 100%, anilazine 85%, linuron 68%,

alachlor 27%, iprodione 89%。

この実験条件では linuron と alachlor の回収率が不良
 であった。原因は加水分解時間が短すぎたためと思われる。

Table 3.3 Voltammetric characterization and UV response of selected aniline compounds

Aniline	RRT	LCECD				UV Response ratio at 254nm
		E ₀	E _{1/2} (mV)	E _L	Response ratio at 1000mV	
Aniline	1.00	500	630	700	1.00	1.00
4-Chloro-	1.63	500	620	700	0.70	0.70
3-Chloro-	1.61	550	700	900	0.71	0.49
3,4-Dichloro-	1.97	550	690	900	0.51	0.41
3,5-Dichloro-	1.94	650	780	900	0.50	0.25
2,6-Diethyl-	1.90	400	540	650	0.75	0.70
2,4,6-Tribromo-	2.77	650	730	800	0.20	0.10
3-Chloro-p-touidine	1.81	500	630	850	0.60	0.53
2,6-Dichloro-4-nitro-	1.74	800	900	1000	0.28	0.17

RRT: relative retention time based on aniline (=2.1 min).

E₀: zero current potential at the foot of the C-V curve. E_{1/2}: half-wave potential. E_L: limiting current potential

HPLC conditions: column, Zorbax CN (4.6mm I.D. X250mm); mobile phase, 50% 0.01M phosphate buffer (pH 8.4) and 50% methanol; flow rate, 2.0 ml/min.

Table 3.4 Recovery of selected pesticides from egg plant samples fortified with 0.4ppm each of pesticides

Pesticide	Alkali hydrolysis (%)		Acid hydrolysis (%)	
	ECD	UV	ECD	UV
Fluoroimide	78	— ^a	100	— ^a
Anilazine	30	27	85	63
Linuron	68	66	48	90
Alachlor	4	— ^b	27	78
Iprodione	83	89	89	127

^a: The determination failed due to interferences.

^b: not detected due to inefficient hydrolysis.

HPLC conditions as described in Fig. 1.

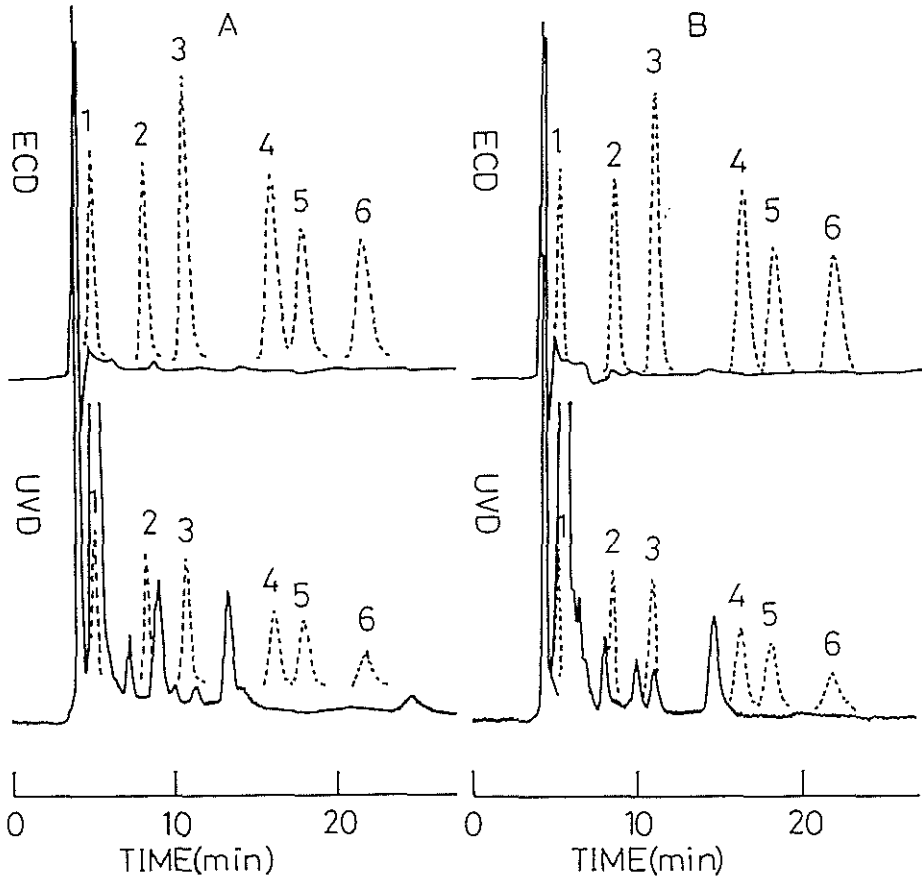


Fig. 3.3 Typical chromatograms obtained from 50-g control samples (solid line)
 Chromatogram A: alkali-hydrolysis; upper, LCECD-detection; lower, UVD-detection.
 Chromatogram B: acid-hydrolysis; upper, LCECD-detection; lower, UVD-detection.
 Operating conditions: column, μ -Bondapak C18 Radialpak (8mm I.D. x 100mm); mobile phase, 50% 0.01M phosphate buffer (pH 2.4) + 50% acetonitrile-methanol (1+2) mixture; flow rate, 1 ml/min; column temperature, 40°C; detector, LCECD (cell-1, 300mV; cell-2, 800mV; gain, 10x1); UVD (270nm, 0.02AUFS); sample size, 20 μ l.
 The peaks of 6 authentic anilines are superimposed in broken lines on the chromatograms obtained from control egg plant samples.
 Peak identities: (1) 1.05ppm 4-fluoro-, (2) 1.08ppm 4-chloro-, (3) 1.02ppm 2-chloro-, (4) 1.08ppm 3,4-dichloro-, (5) 1.06ppm 2,6-diethyl-, (6) 1.06ppm 3,5-dichloroaniline.

第3節 摘 要

残留農薬の分析対象化合物として親化合物である農薬本体の他に毒性学的に意味のある分解・代謝物を含めることが一般的となった。最近ではさらに代謝されて抱合体として作物中に残留している化合物をも残留農薬の安全性評価の対象とする考え方が提唱されている。作物に残留している抱合体が摂取された時になんらかの毒性を示すか否かは明確な証拠はない。この分野の研究の進歩を待つ必要があるが、抱合体は比較的簡単に加水分解酵素により分解され、農薬の分解代謝物が生成するために農薬の残留分析の対象を抱合体まで広げて研究する必要がある。しかし、農薬の分解代謝物の一つひとつを分析することは多大な手数を必要とする。このため、実用的には分解代謝物を含めた農薬の残留量を包括的に把握する方策を採用する必要がある。

従来、包括的に農薬の残留量を把握するためにフェノ

ール化合物やアニリン化合物の共通の化合物に分解して分析する方法が行なわれ、これらの化合物の分析のためにECD-GCが用いられてきた。この方法は高感度であるが、精製操作が煩雑であるために高度の分析技術を必要とする。このため、本研究ではLCECDの特異性を応用し、フェノール化合物の場合は水蒸気蒸留およびXAD-4カラムによって濃縮し、アニリン化合物の場合はDean-Stark蒸留装置を用いて水蒸気蒸留と溶媒抽出を同時に行なって濃縮しただけで分析が可能であった。本分析法はナノグラムのレベルのフェノールおよびアニリン化合物の検出が可能である。抽出した農薬をフェノール化合物またはアニリン化合物にまで加水分解する条件は農薬ごとに異なるため分析対象農薬およびその関連化合物について加水分解条件を検討する必要があるものの、加水分解によりフェノール化合物またはアニリン化合物を生じる農薬とその分解代謝物の残留分析法として本分析法は極めて有用であると認められた。

第 2 編 代表的農薬の効率的残留分析法 の開発とその相互比較

第 4 章 殺菌剤（ベンズイミダゾール系）

ベノミル { benomyl, methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbamate, BM } およびチオファネートメチル { thiophanate methyl, dimethyl 4,4'-*o*-phenylene-bis(3-thioallophanate), TM } は我国では 1971年に登録され、野菜や果樹用の殺菌剤として、さらに稲や麦の種子消毒剤として広く使用されている浸透性殺菌剤である¹²³⁾。

BM および TM はともに散布後作物体上または体中で分解・代謝され、殺菌力の強いカルベンダジム { carbendazim, 2-(methoxycarbonylamino) benzimidazol, MBC } が生成することが知られている¹²⁴⁻¹²⁸⁾。Soeda らは TM の光分解物中から MBC のほか TM の硫黄原子が酸素と置換した分解物の生成を TLC を用いて確認した^{129, 130)}。

農薬の残留基準は親化合物の他に毒性および残留性の観点から重要な分解・代謝物を含めて規制している。BM および TM の残留基準ではそれぞれの親化合物と主分解代謝物である MBC が規制対象となっている⁶⁾。このため、両剤の公定残留分析法では両剤を MBC に交換させ、作物体中で生成した MBC との含量が測定されている²¹⁾。BM は抽出操作中に容易に MBC に変わるため特別の交換操作を必要としない¹³¹⁾。一方、TM は抽出後酢酸銅を用いて閉環させて MBC を生成させる操作が必要である。しかし、この閉環反応の収率が 70~80%¹⁵⁾であるために分析値に誤差を生じることとなる。

さらに、Soeda らが報告した TM の酸素置換体の従来法での測定の可能性および残留基準で規制の対象とするほどの残留性の有無などについて全く不明である。

このため、BM/MBC および TM の残留分析法を見直すために TM の光分解物の HPLC による分離を検討するとともに主要な分解代謝物の微量分析法を検討した。

第 1 節 ベノミルおよびチオファネートメチルの想定分解・代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる分離条件の検討¹³²⁾

BM および TM の光分解物の分離と同定を行なうため想定分解物を用いて HPLC の分離条件を検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

分析用標準化合物：BM, TM, TM の酸素置換体 (OA-1 および OA-2, Fig. 4.1' にその構造式を示した), MBC, 2-アミノベンズイミダゾール (2AB), ベンズイミダゾール, *o*-フェニレンジアミン。使用した標準品は高速液体クロマトグラフィーできょう雑ピークがないことを確認した。

n-ヘキサン, ジクロロメタン, イソプロパノール, エタノール：液体クロマトグラフィー用溶媒

1.2 器具および装置

高速液体クロマトグラフ：Shimadzu-DuPont Model 830, Varian Model 8500

検出器：波長可変 UV 検出器, 波長固定 UV 検出器 (254nm)

カラム：Permaphase ETH (2.2mm I.D. x 1000mm), ステンレススチール製カラムに振とう法によって充填した。Lichrosorb NH₂ (2mm I.D. x 500mm), ステンレススチール製カラムに、充填剤をグリセリン-メタノール (35+65, v/v) に懸濁させ、水を用いて 300 kg/cm² の圧力で充填した後、イソプロピルアルコールを用いてカラム内の水分を除いた。

1.3 分析操作

HPLC：移動相溶媒は Permaphase ETH の場合 *n*-ヘキサン/イソプロピルアルコールを、Lichrosorb NH₂ の場合は *n*-ヘキサン/ジクロロメタン/エチルアルコールを用いた。その他の操作条件は各クロマトグラムの脚注に記載した。

2. 結果および考察

標準化合物のうちベノミルは溶液中で容易に分解して MBC に変わるため分離条件の検討から除外した。また、*o*-フェニレンジアミンは溶液中で不安定であったので一部のカラムでのみ検討した。

紫外吸収スペクトル (Fig. 4.2) から明らかなようにこれらの化合物を感度よく検出するには検出波長は 200~220nm の範囲が望ましいが、この波長領域では移動相に制限があるために各化合物の吸光強度と移動相の紫外線吸収特性の両面から検出器の波長を 244nm とした。

Fig. 4.3 に定組成の移動相を用いた場合のクロマトグラムの例を示した。最初に溶出する MBC と最後に溶出する TM の保持比 (*k'*) 値はそれぞれ 0.3 および 25 と大きな差があった。ただし、*k'* 値は次式で与えられる。

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

ここで t_R , t_0 はそれぞれ当該物質の保持時間および保持

されない物質の溶出時間である。

高速液体クロマトグラフィーの分離状況は k' の他に分離能(R_s)、分析時間(t)をも検討しなければならない。これらの3因子は相互に拮抗する要素を持っている。これらの3因子を含む理論式は次式で表される。

$$R_s = (1/4)(\alpha - 1) \sqrt{(tu/H) \{ k'^2 / (1 + k')^3 \}}$$

ただし、 $\alpha = k_2/k_1$ (k_1 および k_2 はそれぞれ隣接する二つのピークの k' 値)、 t は分析時間、 u は移動相の流速、 H はカラムの理論段の高さを表す。

この式から、 k' は概して2~5の範囲が良く、実用的には1~10の範囲であれば良いと言われている⁵¹⁾。

Fig. 4.3のように k' 値に大きな相違のある混合試料を能率良く分離する手段としてグラジエント法がある。その例をFig. 4.4およびFig. 4.5に示した。このうち、同一のカラムを用いたFig. 4.3とFig. 4.4を比較するとグラジエント溶出によりMBCの k' 値は0.3から2.2と大きくなり、TMの k' 値は25から14と小さくなり、分離状況が改善されるとともに分析時間を短縮することができた。なお、OA-1、OA-2および2ABの k' 値はFig. 4.4でそれぞれ9.8、3.8、1.5であり、Fig. 4.5ではそれぞれ9.5、6.5、5.8であった。

現在、BMとTMの残留分析法では親化合物であるBMおよびTMをMBCに変換し、それと主代謝物であるMBCの含量を吸光度法または高速液体クロマトグラフィーで測定する方法が採用されている。しかし、現行の分析法ではTMとMBCの分別定量はできないが、本法によりFig. 4.6に示すような良好な分離が可能であった。さらに、MBC以外の代謝物については適当な分析法が確立されていないためにBMやTMの分解・代謝物の残留実態は明らかにされていないが、ここに示した高速液体クロマトグラフィーはこれらの化合物の分解・代謝物を含む残留分析法の確立に有用であると思われる。

3. 要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いてペノミルとチオファネートメチルの分解・代謝物の残留分析法について検討し、チオファネートメチル、MBC、チオファネートメチルの2種類の酸素置換体、2-アミノベンズイミダゾール(2AB)、ベンズイミダゾールおよび o -フェニレンジアミンをPermaphase ETHおよびLichrosorb NH₂を用いて相互分離に成功した。これらの分析方法を応用することによりペノミルおよびチオファネートメチルの製剤および残留分析が可能となった。

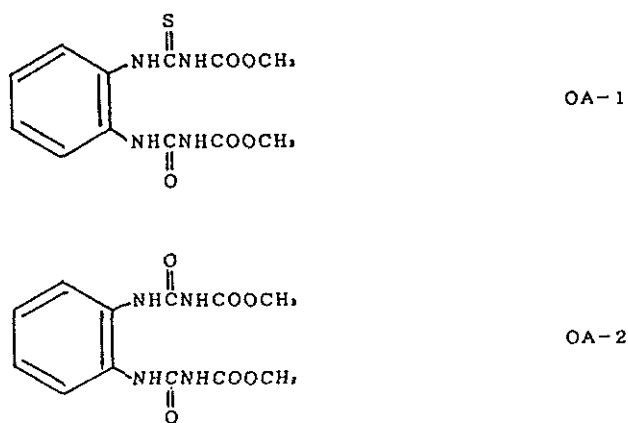


Fig. 4.1 Chemical structure of 2 oxygen analogues of thiophanate methyl

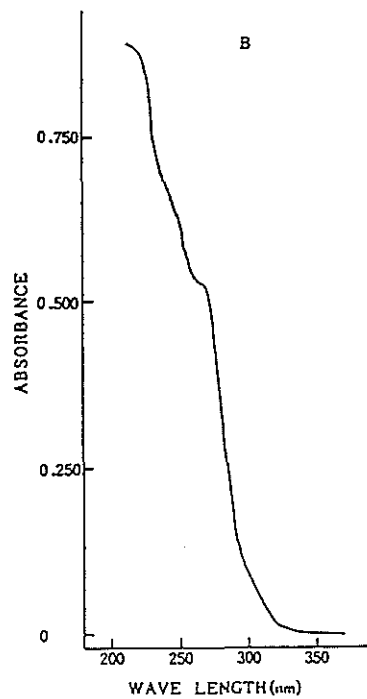
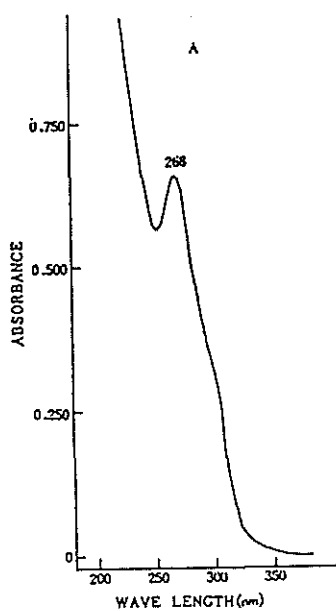
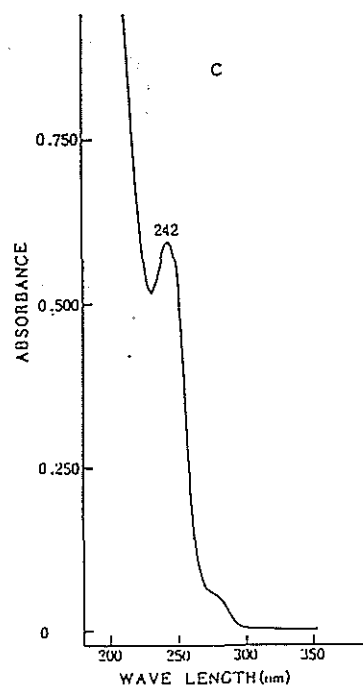
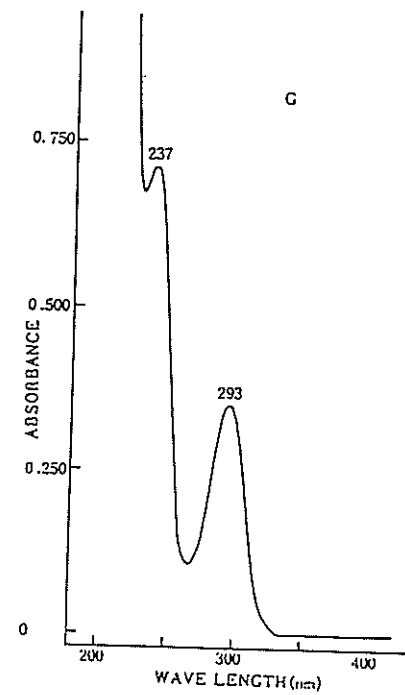
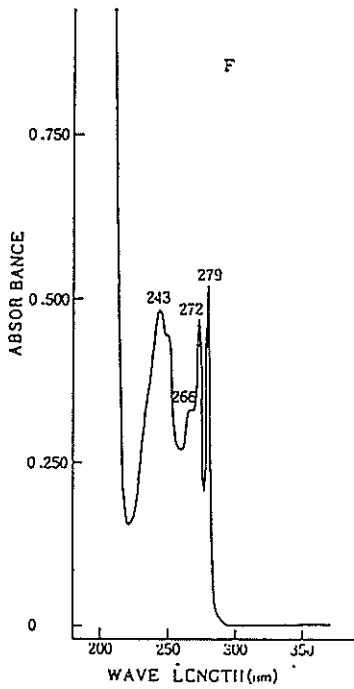
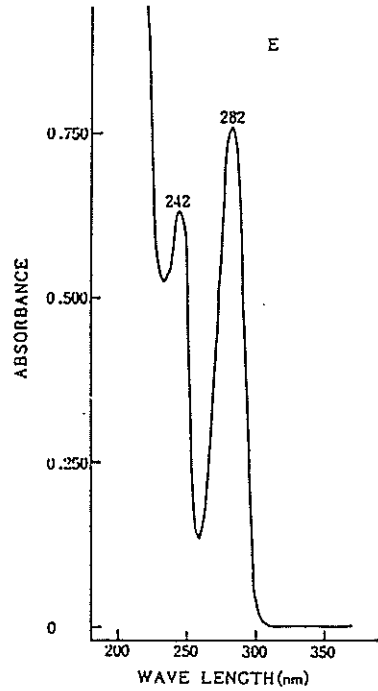
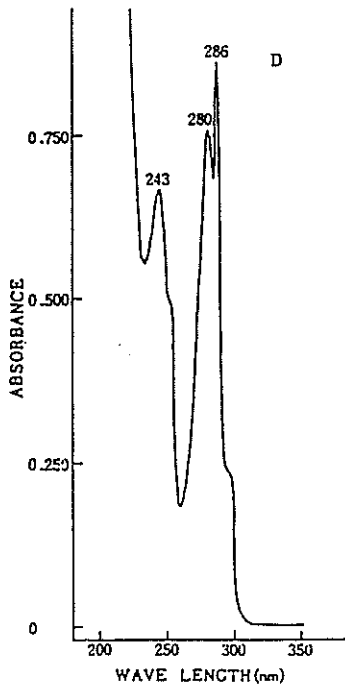


Fig. 4.2 UV spectra of thiophanate methyl and related compounds in methanol

A: TM (10.0 $\mu\text{g/ml}$), B: OA-1 (12.0 $\mu\text{g/ml}$),
 C: OA-2 (10.0 $\mu\text{g/ml}$), D: MBC (8.32 $\mu\text{g/ml}$),
 E: 2AB (12.0 $\mu\text{g/ml}$), F: benzimidazole
 (10.0 $\mu\text{g/ml}$), G: *o*-phenylenediamine
 (11.6 $\mu\text{g/ml}$).





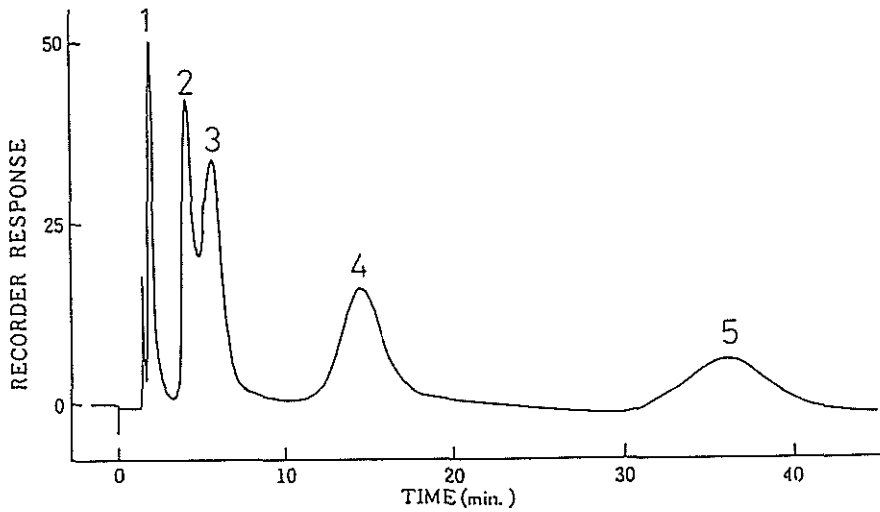


Fig. 4.3 Chromatogram of TM and related compounds-I.
 Column: Permaphase ETH, 2.2mm I.D. x 1m. Mobile phase:
n-hexane/iso-propanol (9+1). Pressure: 50 kg/cm². Column
 temperature: ambient. Detector: UV 254nm, 0.08 AUFS.
 Peak identities: (1) 0.5 μg MBC, (2) 2 μg 2AB, (3) 1 μg OA-2,
 (4) 1 μg OA-1, (5) 2 μg TM.

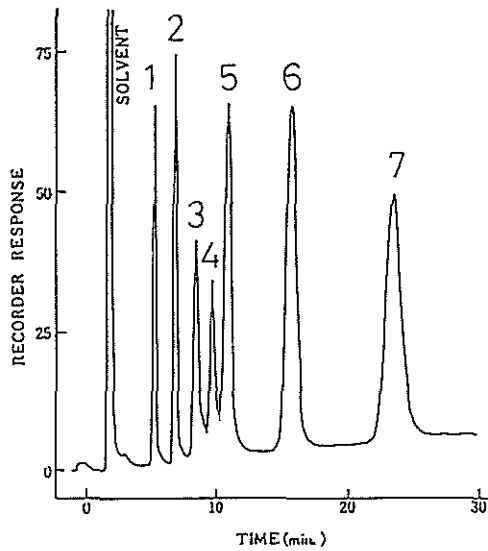


Fig. 4.4 Chromatogram of TM and related compounds-II.
 Column: Permaphase ETH, 2.2mm I.D. x 1m. Mobile phase: linear
 gradient from 1% iso-propanol/99% *n*-hexane to 60% iso-propanol
 /40% *n*-hexane at 2 %/min. Pressure: 40 kg/cm². Column temperature:
 ambient. Detector: UV 254nm, 0.32 AUFS.
 Peak identities: (1) 1.35 μg MBC, (2) 1.55 μg benzimidazole,
 (3) 3.35 μg *σ*-phenylenediamine, (4) 2.50 μg 2AB, (5) 2.45 μg
 OA-2, (6) 2.85 μg OA-1, (7) 2.70 μg TM.

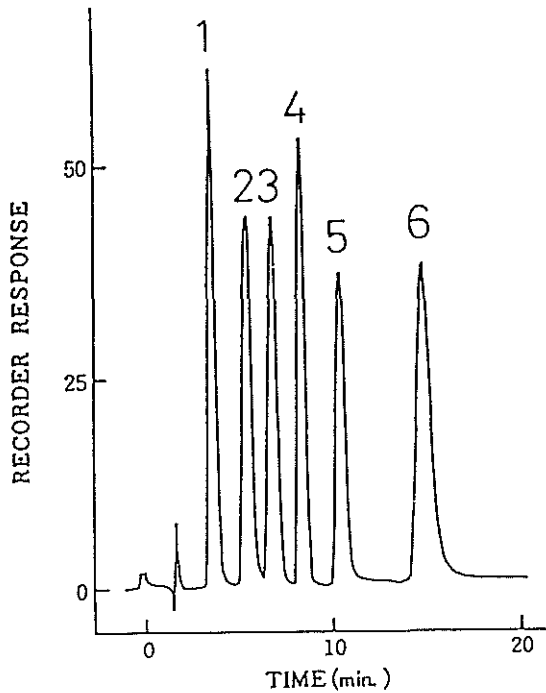


Fig. 4.5 Chromatogram of TM and related compounds-III

Column: Lichrosorb NH_2 , 2mm I.D. x50cm.
 Mobile phase: solvent A; *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v), solvent B; dichloromethane/ethanol (50/50, v/v), linear gradient from 5% B to 100% B at 5% B/min. Flow rate: 60 ml/hr. Column temperature: ambient. Detector: UV 254nm, 0.5 AUFS.

Peak identities: (1) 1.70 μg MBC,
 (2) 2.20 μg TM, (3) 2.50 μg OA-1,
 (4) 2.10 μg OA-2, (5) 2.20 μg benzimidazole,
 (6) 3.10 μg 2AB.

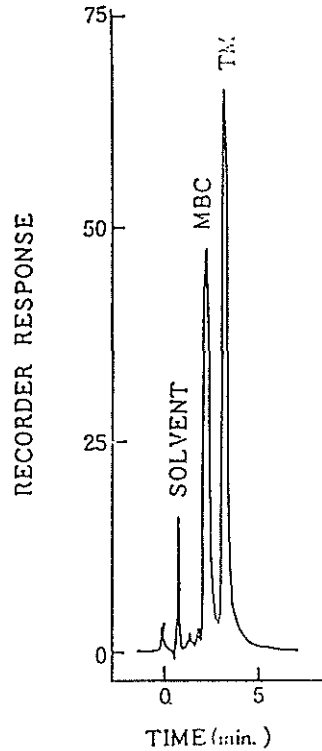


Fig. 4.6 Separation of TM and MBC

Column: MicroPak NH_2 , 2mm I.D. x25cm. Mobile phase: solvent A; *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v), solvent B; dichloromethane/ethanol (50/50, v/v), 5% B isocratic. Flow rate: 60 ml/hr. Column temperature: ambient. Detector: UV 254nm, 0.5 AUFS.

Sample size: 0.72 μg MBC,
 1.68 μg TM.

第2節 チオファネートメチルの光分解生成物の分離^{135, 136)}

TMが作物体に散布された後の分解・代謝の経路を推定するために殺菌灯および太陽光による分解物の同定をHPLCの高い分離性能を利用して検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

n-ヘキサン, クロロホルム, ジクロロメタン, アセトン, イソプロパノール, エタノール, メタノール: HPLC用溶媒

りん酸緩衝液: M/10 pH6.85

標準化合物: TM, OA-1, OA-2, MBC

1.2 器具および装置

器具: 殺菌灯(19W), 光分解装置(内容量800ml, 石英ガラス製水冷ジャケット付き100W高圧水銀灯内蔵), シャーレ(内径90mm), メンブランフィルター(孔径0.45 μ m)

高速液体クロマトグラフ: Shimadzu-DuPont Model 830, Varian Model 8500, Waters Model 600.

カラム: Lichrosorb NH₂(2mm I.D. x500mm), Partisil-10 PAC(2.1mm I.D. x250mm) および Nucleosil-NH₂(4.6mm I.D. x250mm)

移動相: *n*-ヘキサン・ジクロロメタン・エタノールの混合溶媒を用いた。組成は各クロマトグラムの脚注に記載した。

検出器: 波長可変UV検出器(Shimadzu SPD-1およびWaters Model 490E)

1.3 実験操作

高速液体クロマトグラフィーの操作条件: TM, OA-1, OA-2 およびMBCの標準品の分離状況をFig. 4.8に示した。操作条件はその脚注に記載した。

水中での光分解: M/10りん酸緩衝液800mlに4000ppmのTMメタノール溶液4mlを攪拌しながら滴下して20ppmの溶液とし, 光分解装置(出力100W)に移し, 光分解装置の周囲をアルミニウム箔で覆い, 液を攪拌しながら光を照射した。光の照射中は液温の上昇を防ぐために流水で冷却した。一定時間照射後, 液を分液漏斗に移し, クロロホルム100mlずつで3回抽出し, クロロホルム層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水した後100mlに定容とした。この液の1~20 μ lをHPLCを用いて分析した。

薄膜状態での光分解: TM, OA-1, OA-2 およびMBCのメタノール溶液をシャーレに取り, メタノールを蒸発させて各化合物の薄膜を調製した後, 一組は晴天の戸外で太陽光(1988年5月の晴天日の午前9時から午後3時)に1~4日間暴露させ, 別の一組は殺菌灯(19

W)の光を30cmの距離から連続1~4日間暴露させた。一枚のシャーレ当りの各化合物の量は約200 μ gであった。

暗所におけるTMの分解: TMの20ppm水溶液を調製して30℃で6日間暗所に置いた後, クロロホルム100mlずつを用いて3回抽出し, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 濃縮して100mlに定容とした。この溶液の1~20 μ lをHPLCを用いて分析した。

2. 結果および考察

2.1 水中での光分解

抽出物をHPLCで分取して個々のピークのUVスペクトルをメタノール中で測定した。分解生成物のほとんどはUVスペクトルからMBCであることが明らかになった。MBCの生成量の経時変化を測定した結果をFig. 4.7に示した。この結果, 照射4時間後のMBCの生成量は32.7 μ M(TMの初期量は48.5 μ M)で, TMの約70%がMBCに変換した。MBCの他に2個のピークを得たが, UVスペクトルからは同定できなかった。

OA-1, OA-2 およびMBCについて水中での光分解の実験を行なった。2時間の照射ではOA-1 およびOA-2 からはほとんどMBCは生成せず, またMBCは安定でHPLCのクロマトグラム上に何等のピークを見いだせなかった。

2.2 乾式薄膜状態での光分解

Fig. 4.9 A~DはTM, OA-1, OA-2 およびMBCの薄膜に殺菌灯の光を照射して得られた分解物のクロマトグラムである。24時間の照射でTMは消失し, MBCが生成した。MBCの生成量はモル比でTMの20%であった。MBCを出発化合物とした場合, MBCは初期量の約10%が残存した。OA-1は初期量の約15%が残存し, MBCとOA-2の位置に小ピークが観察された。OA-2は比較的安定で初期量の約50%が残存しており, 他にMBCの位置に小ピークが観察されたが同定はできなかった。

太陽光に4日間暴露させた場合の生成物のクロマトグラムをFig. 4.10 A~Dに示した。分解の速度はTMが最も速く主生成物はMBCであり, 少量のOA-1 およびOA-2が生成した。OA-1を出発化合物とした場合はTMよりは安定であったが, MBCとOA-2が少量生成した。OA-2は比較的安定で, これからMBCはほとんど生成しなかった。MBCを出発化合物としたときの分解物として2ABが考えられるが, HPLCのクロマトグラムからは確認できなかった。

2.3 暗所での水中における分解

TMの20ppm水溶液(初期濃度48.5 μ M)中の分解生成物の経時変化を6日間調査した。6日後, 8.5 μ MのTMが消失し, 代わって3.8 μ MのMBCが生成した。分

解したTMの約40%がMBCに変化したが、その他の生成物は同定できなかった。

以上のことからTMは光分解によってMBCを生成するが、MBC以外にTMの硫黄が酸素に置換した2種の化合物OA-1およびOA-2が少量生じた。OA-1およびOA-2はTMよりはMBCに変換することが少なく、別の分解経路を経て分解されるものと考えられる。このため、この種の残留調査にあたっては、これらの2種のTMの酸素置換体の残留量を調査する必要がある。

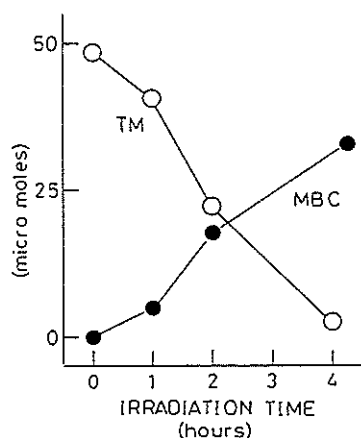


Fig. 4.7 Time course of TM photodegradation to MBC.

Four milliliters of a methanol solution containing 16.6 mg (48.5 μ moles) of TM were pipeted into a 1-l flask containing 800 ml of 0.1M phosphate buffer at pH 6.85. The mixture in the flask was stirred continuously while irradiated with a 100-W mercury high-pressure lamp for various time intervals. The photolysates was extracted with chloroform, and the solvent extract was concentrated to a small volume. The analysis of the photolysates was carried out by HPLC on a Partisil-10 PAC column (2.1mm I.D. x250mm) using a solvent mixture of hexane/dichloromethane/ethanol (67/28/5) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 ml/min. The effluent from the column was monitored by UV at 254 nm.

3. 要 約

水中および薄膜状態でのチオファネートメチル(TM)の光分解生成物を高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。水中でのTMの主分解物はMBCであり、TMの初期量の70%がMBCであった。また、暗所に於いてもMBCが主分解物であった。薄膜状態でもMBCは主分解物であったが、この他TMの硫黄原子が酸素原子に置換した2種類の化合物の生成が推定された。

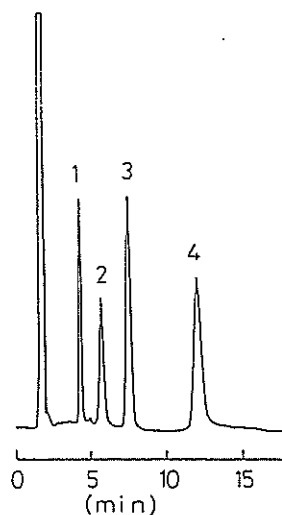


Fig. 4.8 Chromatogram of a standard mixture of TM and its degradation products.

HPLC conditions: column, Nucleosil-NH₂ (4.6mm I.D. x250mm); mobile phase, hexane/ethanol (91/9, v/v); flow rate, 2ml/min; column temperature, 40°C, detector, UV 220nm, 0.01AUFS; sample size, 20 μ l.

Peak identities: 1. 30ng MBC, 2. 33ng TM, 3. 78ng OA-1, 4. 68ng OA-2.

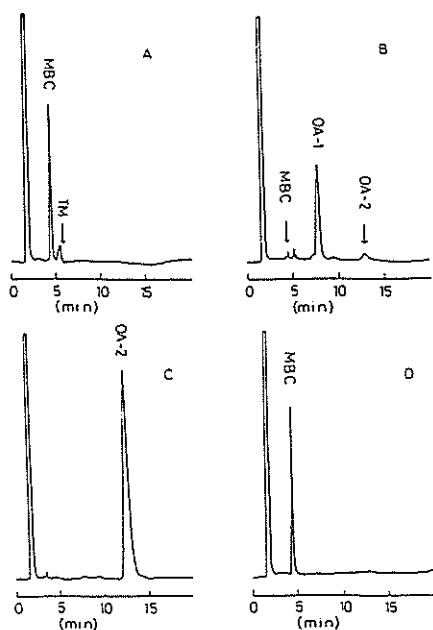


Fig. 4.9 Chromatograms of the photodegradation products of (A) TM, (B) OA-1, (C) OA-2 and (D) MBC irradiated with UV-light.

Two hundred micrograms of TM, 216 μg of OA-1, 200 μg of OA-2 and 264 μg of MBC were respectively coated as thin films on the inside surface of separate 300-ml beakers by evaporating methanol solutions. The beaker were exposed to UV-light for 24 hours at which time photolysates were rinsed from the beakers with dichloromethane and analyzed by HPLC. HPLC conditions as described in Fig. 4.8.

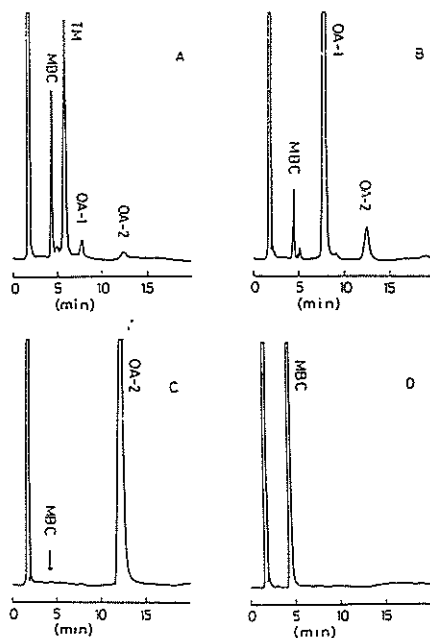


Fig. 4.10 Chromatograms of the photodegradation products of (A) TM, (B) OA-1, (C) OA-2 and (D) MBC in natural sunlight.

Two hundred and sixteen micrograms of TM, 260 μg of OA-1, 204 μg of OA-2 and 212 μg of MBC were respectively coated as thin films on the inside surfaces of separate 300-ml beakers. The beakers were placed outdoor in natural sunlight for 4 days. Other experimental conditions as described in Fig. 4.8.

第3節 高速液体クロマトグラフィーによるチオファネートメチルとその分解・代謝物の残留分析法^{137, 138)}

TMの残留分析法は当初TMのみをTLC板上で沃素蒸気に曝して黄色に発色させ、比色する方法が取られた¹³⁹⁾。その後の研究でTMは抗菌力の強いMBCを生成することが明らかになり¹²⁶⁻¹³⁰⁾、TMの残留分析ではMBCをも合わせて測定されるようになった^{127, 140)}。TMの現行の公定残留分析法はTMを抽出し、酢酸銅の存在下で加熱してMBCに閉環させ、試料中に残留しているMBCと合わせてHPLCにより測定する方法が採用されている²¹⁾。MBCの測定方法は多くの方法が開発されており、比色法^{131, 141)}、紫外吸光度法^{127, 140-142)}、蛍光光度法^{131, 141)}、TLC蛍光デンストメトリー¹⁴³⁻¹⁴⁶⁾、GC¹⁴⁷⁻¹⁵⁰⁾およびHPLC¹⁵¹⁻¹⁵⁸⁾が応用されてきた。しかし、TMからMBCへの変換の収率は70~80%で定量的でない¹⁵⁾。さらに、従来のいずれの分析法もTMの酸素置換体を測定することができない。

このため、本節ではTMとその主要分解物であるMBC、OA-1およびOA-2を同時に分別定量する分析法を開発した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

りん酸一ナトリウム、りん酸二ナトリウム、りん酸三ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、メタノール：試薬特級

エタノール、ジクロロメタン、酢酸エチル、ヘキサン：HPLC用溶媒

アルミナ：クロマトグラフィー用（Merck, Art1077）、110℃で一晩加熱活性化し、デシケーター中で放冷後、2%相当の水を加えてよく混合する。

濾過助剤：ハイフろスーパーセル

農薬および分解物の標準品：TM、MBC、およびTMの2種類の類縁体（OA-1およびOA-2）

1.2 器具および装置

ホモジナイザー、ロータリーエバポレーター、桐山漏斗、ガラスカラム（20mm I.D. x 300mm）

高速液体クロマトグラフ：前節と同じ。

カラム：Nucleosil NH₂（10 μm）（4.6mm I.D. x 250mm）およびPartisil 10 PAC（2.1mm I.D. x 250mm）

検出器：前節と同じ。

1.3 分析操作

検量線の作成：TM、MBC、OA-1およびOA-2をジクロロメタンに溶かして0.5~10ppmの標準溶液を調製する。この溶液を5~20 μlの範囲でHPLCに注入

して得られるクロマトグラムからピーク面積を測定し、検量線を作成した。

抽出および精製操作：磨砕した試料50~100gを500mlのトルビーカーに取り、M/5りん酸緩衝液（pH 6.5）50mlを加えて、りん酸三ナトリウム飽和溶液を用いて、試料のpHを6.5~7.0に調節し、この試料に等量のメタノールを加えてホモジナイザーで3分間高速攪拌抽出した。約1cmの厚さにハイフろスーパーセルを敷いた桐山漏斗を用いて抽出液を濾過し、漏斗内の残留物をメタノール・M/10りん酸緩衝液（pH 6.5）混液（1+1）100mlで洗浄した。濾液と洗液を合わせて1lの分液漏斗に移し、10%塩化ナトリウム・M/10りん酸緩衝液300mlおよび酢酸エチル100mlを加えて1分間振とう抽出した。酢酸エチル層を分取し、500mlの分液漏斗に移した。この操作をさらに2回繰り返して、全酢酸エチル抽出液を合わせ、M/10りん酸緩衝液100mlずつで4回洗浄して水層を捨てた。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、35℃で減圧下約10mlまで濃縮した（この時、乾固しないように注意）。この液をアルミナカラム（2%含水アルミナ40gを酢酸エチルに懸濁させてガラスカラムに充填し、アルミナの上に2cmの高さに石英砂を充填）に注入し、少量の酢酸エチルでフラスコ内を洗い、アルミナカラムに注入し、酢酸エチルを流下させた。さらに、酢酸エチルを注入して全体で70mlの酢酸エチルを流下させ、流出した酢酸エチルは捨てた。次に、メタノール/水（1+1, v/v）100mlを用いて溶出した。メタノール/水流出液を200mlの分液漏斗に移してM/10りん酸緩衝液（pH 6.5）50mlおよび酢酸エチル50mlを加えて1分間振とうし、酢酸エチル層を分取し、残った水層に酢酸エチル50mlを加えて振とうした。この操作をさらに1回繰り返して、酢酸エチル抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、35℃で減圧濃縮した。濃縮液を10~20mlの目盛り付き試験管に移し、ジクロロメタンを加えて5~10mlに定容とし、検液とした。

2. 結果および考察

2.1 高速液体クロマトグラフィーの操作条件

TM、MBC、OA-1およびOA-2のHPLCによる分離条件を検討した。MBCについてはZipax SC X陽イオン交換カラム^{151, 152)}、Hitachi Gel 3010^{153, 154)}あるいはODS系の逆相分配カラム¹⁵⁵⁻¹⁵⁸⁾を用いた例が報告されている。TM、OA-1およびOA-2についてはシリカゲルカラムを用いた例が報告されている¹⁵⁹⁾。さらに、著者らはPermaphase ETH^{132, 135)}、Lichrosoro-NH₂およびPartisil-10 PAC¹³⁷⁾を用いて4成分の分離を行った。本実験ではNucleosil NH₂およびPartisil 10 PACを用いた。Nucleosil NH₂で測定した場合の典型

的なクロマトグラムをFig. 4.11に示す(操作条件は脚注に記載した)。

Fig. 4.11中の破線は4成分の溶出位置を示している。OA-2は他の3成分よりかなり保持時間が長いので移動相のエタノールの比率を大きくする必要があった。このために、グラジエント溶出を行なった。測定位置に若干の妨害ピークが見られるが、その大きさは0.05ppm以下であった。また、同様にCN型であるPartisil 10 PACについても4つの対象化合物の分離条件を検討した。保持時間は移動相がヘキサン/シクロロメタン/エタノール=73/24/3、流速0.81ml/分で、MBC 2.3分、TM 3.3分、OA-1 4.5分であった。OA-2はこの条件では保持時間が長すぎるため移動相の組成を67/28/5としたところ4.7分に溶出した。このことからこれら4つの化合物のNH₂型カラムとCN型カラムでの分離の様相はほぼ同じであった。

2.2 抽出溶媒

TMとMBCはアルカリ性の水溶液に可溶であるが、TMはアルカリ液中では不安定である。一方、酸性水溶液にはMBCは易溶であるが、TMは不溶である。TM、OA-1、OA-2およびMBCは中ないし強極性有機溶媒に可溶であり、MBCはpHが中性付近で水溶液から有機溶媒で抽出される^{140, 159)}。このため、抽出時の試料のpHは中性付近が都合がよい。小野ら^{140, 159)}は抽出溶媒としてメタノールを、伊藤ら^{142, 148)}は酢酸エチルを抽出溶媒として用いた。酢酸エチルは葉緑素などの色素類をよく抽出するためアルミナまたはシリカゲルカラムクロマトグラフィーでは精製が困難であった。メタノールを用いる場合もメタノール/水の比率が50/50になるように工夫することで葉緑素などの溶出を少なくすることができた。このため、抽出時の試料のpHを6.5~7.0とし、溶媒としてメタノールを用い、洗浄時はメタノール/緩衝液(50+50)を用いた。

2.3 精製方法

精製方法としてシリカゲルTLCおよびシリカゲルおよびアルミナカラムクロマトグラフィー(CC)について検討した。TLCはヘキサン/酢酸エチル(1+1)で展開して測定対象の4成分を相互に分離できたが、4つのバンドは接近しているために個々の成分を別々に抽出することはできなかった。シリカゲルCCではTLCと同様の溶媒を用いて、TM+MBC+OA-1とOA-2に分けることはできたが、試料由来の色素との分離が不十分であった。アルミナCCでは酢酸エチル70mlでは4成分ともに溶出しないが、色素類が先に溶出して精製効果があった。しかし、OA-2はアルミナに強く吸着され、酢酸エチルでは溶出しないため、伊藤らの方法¹⁴⁸⁾

に準じ含水メタノールを用いて溶出させた。アルミナカラムからの溶出液は淡黄色程度まで精製できた。抽出溶媒として酢酸エチルを用いる場合およびアルミナカラムで精製が不十分な場合はGPC⁵⁹⁾が有効な精製法であった。

2.4 添加回収試験

試料として、ピーマン、トマト、イチゴおよびブドウを用いて添加回収試験を行なった。4成分の添加回収試験の結果をTable 4.1に示す。MBCの回収率が100%を上回っているが、これは主として同時に添加したTMおよびOA-1の一部がMBCに分解したことによるものと思われる。

ピーマンを用いて、4成分を個々別々に添加して回収試験を実施した結果をTable 4.2に示した。MBCは97%の回収率を得、分析操作中での損失はほとんどなかった。また、OA-2は比較的良好な回収率を得たが、TMおよびOA-1の回収率はやや低かった。このため、TM、OA-1およびOA-2が分析操作中にMBCに変わる割合を測定したところTMは10%、OA-1は6~7%がMBCに変化した。OA-2についてはMBCの生成は確認できなかった。なお、この際のMBCの測定には蛍光検出器(Ex=285nm, Em=315nm)を用いた。

各成分の最小検出量はUVD(波長254nm)で0.01A UFSで4成分ともに5ng程度は測定可能である。蛍光検出器を用いた場合、1ngのMBCが測定可能であった。このため、本法の検出限界は、試料50gを取り最終液量5mlとした場合HPLCへの注入量を20 μ lの場合0.025ppmとなるが、妨害ピークの大きさを考慮した場合0.05ppmとなった。

チオファネートメチル水和剤を散布したピーマンを散布2日後に収穫して分析した結果、TM0.2ppm、MBC 2ppmが検出されたが、OA-1およびOA-2は0.05ppm以下であった。

TMとBM(またはMBC)は毒性学上の安全性評価に違いがあり、FAO/WHOのJMPRにおけるADIはそれぞれ0.08mg/kg¹⁶⁰⁾、0.02mg/kg¹⁶¹⁾と違いがあるので農作物における残留基準に相違が生じている⁶⁾。このため、TMとBM/MBCを分別して定量することは意義がある。本法はTMとBM/MBCの分別定量が可能であり、さらに従前未知であったOA-1およびOA-2を含む4成分を同一のカラムを用いて分別定量できる。しかし、現行のTMあるいはBM/MBCの残留分析法はADIの小さなMBCを定量することで残留農薬の濃度を規制していることから、現行の残留分析法は実用上での問題はないと考える。

3. 要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いたチオファネートメチル (TM) とその分解・代謝物 (MBC および 2 種類の TM の酸素置換体) の残留分析法を報告した。試料の pH を 6.5~7.0 に調節し、メタノールを用いて抽出し、酢酸エチルへ転溶した。酢酸エチル層を濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフィーで精製した。溶出は酢酸エチルおよびメタノール・水混液を用いて行った。測定は

化学結合型の NH₂ カラムと移動相としてヘキサン/エタノール混液を用い、UVD (254nm) により行った。検出限界は 4 成分共に約 5 ng であった。ピーマン、トマト、イチゴおよびブドウに 0.5 ppm の濃度で 4 成分を添加して得た回収率は TM 75%, MBC 104%, OA-1 70% および OA-2 75% であった。検出限界は試料 50 g を用いた場合は 0.05 ppm であった。

Table 4.1 Recoveries of TM and its degradation products/metabolites from fortified fruits and vegetables (50 grams)

Compound	Fortification level, ppm	Recovery, %				
		Grape	Straw berry	Green pepper	Tomato	Average
TM	0.5	76	72	74	78	75
MBC	0.5	105	100	103	109	104
OA-1	0.5	69	66	68	75	70
OA-2	0.5	74	75	70	80	75

Table 4.2 Analytical results of separated 100-g green pepper samples fortified with each of TM, OA-1, OA-2 and MBC

Fortified compound	Expected quantity (μg)	Detected quantity (μg)				
		TM	OA-1	OA-2	MBC ^a	total
TM	41.2	30.6	nd	nd	3.8	37.4 ^b
OA-1	37.2	nd	22.6	nd	2.6	27.0 ^c
OA-2	40.8	nd	nd	35.4	nd	35.4
MBC	40.0	nd	nd	nd	38.9	38.9

^a: detected with a fluorescence detector (Ex 285nm, Em 315nm)

^b: TM + 1.79MBC, ^c: OA-1 + 1.71MBC

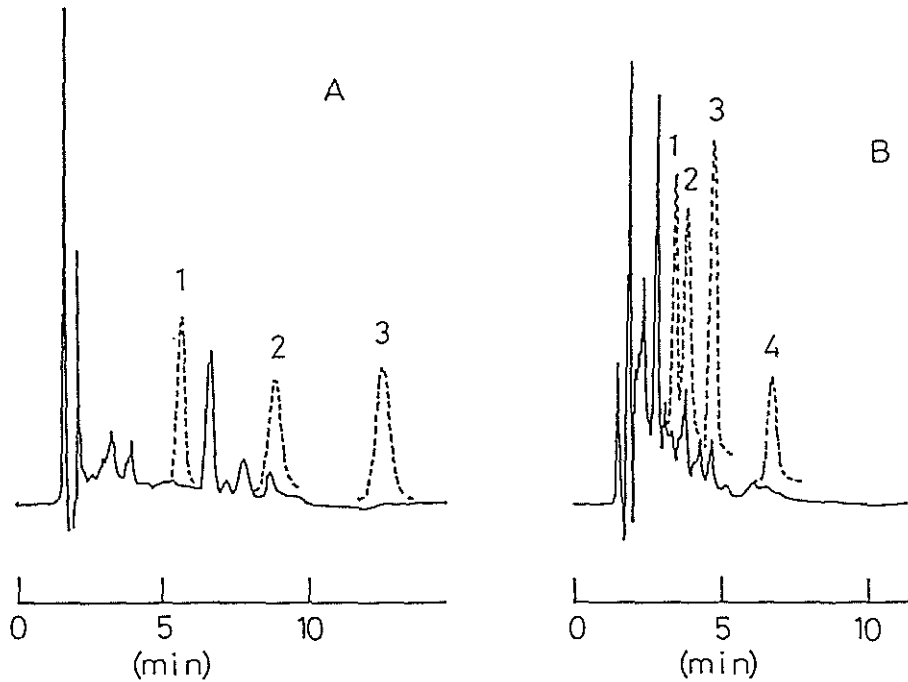
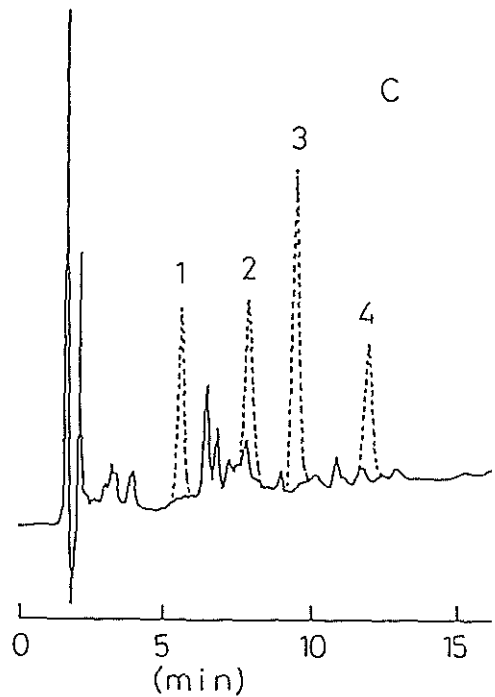


Fig. 4.11 Typical chromatograms obtained from 50g of green pepper samples.

HPLC conditions: column, Nucleosil NH_2 (4.6mm I.D. x 250mm); column temperature, 40°C; detector, UV 254nm, 0.01 AUFS; mobile phase, chromatogram A, *n*-hexane/ethanol (95/5, v/v); chromatogram B, *n*-hexane/ethanol (85/15, v/v); chromatogram C, linear gradient from 5% to 45% ethanol in hexane in 20 min; flow rate, 2ml/min.

A 20 μl aliquot of the final solution (5ml) was injected. The peaks of MBC, TM, OA-1 and OA-2 are superimposed in broken lines on the chromatograms.

Peak identities: 1. 42ng MBC, 2. 46ng TM, 3. 46ng OA-1, 4. 40ng OA-2.



第4節 薄層蛍光デンストメトリーによるMBCの残留分析法^{145, 146)}

BMは散布後速やかにMBCに分解して作物体中にMBCが残留することが知られている。このため、現在のBMの公定残留分析法はMBCを測定し、その値をBMに換算する方法が採用されている²¹⁾。前節で述べたようにMBCの測定には種々の方法が開発されている。分光光度法や蛍光光度法は試料によっては精製の度を向上させないと妨害物質のため測定ができない場合がある¹⁴¹⁾。

近年、TLC蛍光デンストメーターの開発により蛍光物質をTLCで精製し、そのままの状態でも蛍光強度を測定することができるようになった。さらに、1枚のTLC板で多数の試料を分析できて分析経費が安いこと、TLC蛍光デンストメトリーによるMBCの微量分析法を検討し良好な結果を得た。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

酢酸エチルおよびクロロホルム：試薬特級品を一回蒸留した。

濾過助剤：ハイフろスーパーセル（Johns Manville 製）

TLC板：Merck社製のシリカゲル薄層板（厚さ0.25mm, 20cm×20cm, Art5721）、使用直前に100℃で30分間加熱活性化し、デシケーター中で放冷した。

農薬標準品：BMおよびMBC

1.2 器具および装置

分光蛍光光度計（日立MPF-4型薄層クロマトグラフ付属装置付）、pHメーター（Beckmann SS-2）、ロータリーエバポレーター（Büchi EL）

1.3 分析操作

分光蛍光光度計の測定条件：励起波長、285nm；蛍光波長、315nm；スリット幅、励起側および蛍光側ともに10nm；光源、Xeランプ；薄層スリット幅、2×6mm

検量線の作成：MBCの標準品を酢酸エチルに溶解し、0.5, 1, 2, 3, 4ppmの標準溶液を調製し、その10μlをTLC板に添付した。酢酸エチルを展開溶媒として12cm展開し、溶媒を蒸発させた後蛍光薄層デンストメトリーにより測定し、得られたクロマトグラムからピーク面積を測定して検量線を作成した。

分析操作：ミキサーで均一化した試料（キュウリを用いた）100gを500mlの三角フラスコにとり、ハイフろスーパーセル15g、酢酸エチル100mlを加え、15分間振とうした。抽出液をハイフろスーパーセルを敷いた桐山漏斗を用いて吸引濾過を行ない、漏斗上の残渣を三角フラスコに戻して酢酸エチル100mlを加えて、再び15分間振とう

した。抽出液を濾過し、抽出液を合わせてWhatmann IPS濾紙を用いて酢酸エチル層を濾過し、酢酸エチル抽出液を1～2mlまで減圧濃縮した。濃縮液を酢酸エチル約20mlで100mlの分液漏斗に移し、0.1N塩酸15mlずつで5分間3回抽出した。塩酸層を合わせ、クロロホルム50mlを加えて5分間振とうし、クロロホルム層は捨てた。塩酸層に6.5N水酸化ナトリウムを加えて中和し、pH6.5～7に調節し、200mlの分液漏斗に移した。この液にクロロホルム50mlずつで5分間振とう抽出した。クロロホルム層を300mlの三角フラスコに移した。この操作をさらに2回繰り返し、クロロホルム層を分取した。クロロホルム層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、クロロホルム溶液を濾過し、減圧下で1～2mlまで濃縮し、少量の酢酸エチルで10mlの目盛り付試験管に移して再度濃縮し、さらに、送風して完全に溶媒を蒸発させ、試験管内の残留物を酢酸エチル1mlに溶解させ、以下検量線作成と同様に操作し、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、検量線からMBCの量を求め、1.52を乗じてBMの量とした。

2. 結果および考察

BMの従来の残留分析法はBMを加水分解して生じた2ABを蛍光光度法で測定する方法であった。この方法は多数の検液の測定には簡便迅速であった。従来の装置（例えば、日立MPF-2型）では2ABの最小検出濃度は最終検液中の濃度として0.4～0.7μg/10mlであった。現在では装置の改良が進み、10倍以上の感度を得ることができるようになった。このため、従来は分析の妨害とならなかったラマン光や無水硫酸ナトリウムから溶出してくる微量の妨害物質や有機溶媒中の微量の物質が定量の妨害となった（Fig. 4.12）。このうち、ラマン光は励起側と蛍光側のスリットを狭めることによりスペクトルの分解能を高め、さらに蛍光波長を少し移動させて励起波長を掃引することによりラマン光と2ABの分離したスペクトルが得られた。しかし、無水硫酸ナトリウムなどの試薬に由来する妨害物質の影響を避けることはできなかった。

このため、これらの妨害物質を除くためにシリカゲルTLCを応用し、さらに分析操作の簡素化のためにそのままデンストメーターで測定する方法について検討した。2ABは強い蛍光を発生するが、極性が強くシリカゲルTLC上でピークがテーリングするために良好なクロマトグラムが得られなかったため加水分解はMBCまでとした。MBCは2ABに比べて蛍光強度は1/20であるが十分な測定感度を得ることができた。使用したシリカゲルTLC板は表面の平滑性、活性の強さの再現性および測定時のシリカゲルがはがれ落ちないように考慮して市

販のTLC板を用いた。TLC板への試料の添付量は10 μ lに固定し、検量線はMBCの5~40ngの範囲で直線性が得られた(Fig. 4.13)。

なお、TLCはRf値の再現性をよくするためにTLC板の活性化方法と保存方法をできるだけ一定になるように工夫したが、なおMBCのRf値は0.3~0.6の間の変動がみられた。このため、試料の測定を行なうときには標準溶液と試料溶液を交互にTLC板に添付し精度の向上を図った。

本法の最小検出量は、MBCで5ng(ピーク高でフルスケールの5%)であり、BMの7.5ngに相当した。試料100g、最終液量1ml、TLC板への添付量10 μ lとすると、検出限界は0.008ppmとなった。回収率は0.2ppmの添加濃度で平均114%であった。添加回収試験で得られた典型的なクロマトグラムをFig. 4.14に示した。

本法を用いてベノミルの残留調査を実施した。試料は京都府および栃木県の露地栽培のキュウリ並びに宮崎県のビニールハウスで栽培されたキュウリを用いた。作物へのBM剤の散布歴をFig. 4.15に示した。また、その調査結果をTable 4.3に示した。

また、志賀らの方法¹⁵⁴⁾によりHPLCを用いて上記の試料を分析した結果をTable 4.3に示した。本法とHPLCの結果は良好な一致を示した。

実際の試料の分析において本法は妨害はなく十分良好な結果を得ることができたが、本方法はなお次の点で改

良する余地があった。

(1) 試料および標準溶液のTLC板への添付に長時間を要する。一枚のTLC板に9点を添付するために30分間を要した。

(2) Rf値の変動が大きいので、一枚のTLC板に必ず標準溶液を添付する必要がある。

(3) 一枚のTLC板の中でも両端と中央ではRf値が異なるため、展開方向に対して直角の掃引ができなことがあり、1スポットずつ測定しなければならないために測定に長時間を要した。

3. 要約

蛍光薄層デンストメーターによるキュウリのベノミル(BM)とその分解・代謝物であるMBCの残留分析法を開発した。

試料からBMとMBCを酢酸エチルで抽出し、稀塩酸に転溶してBMをMBCに加水分解した。塩酸層をクロロホルムで洗浄後、水酸化ナトリウムで中和し、水層からMBCをクロロホルムで抽出し、脱水、濃縮乾固し、残留物を酢酸エチルに溶かし、その一定量をTLC板に添付し、酢酸エチルで展開し、風乾後蛍光薄層デンストメーターで測定した。

検出限界は試料100gを用いた場合BMとして0.008ppm(MBCとして0.005ppm)であった。回収率は0.2ppm添加で平均114%であった。本法と高速液体クロマトグラフィーを比較した結果分析値は良好な一致を示した。

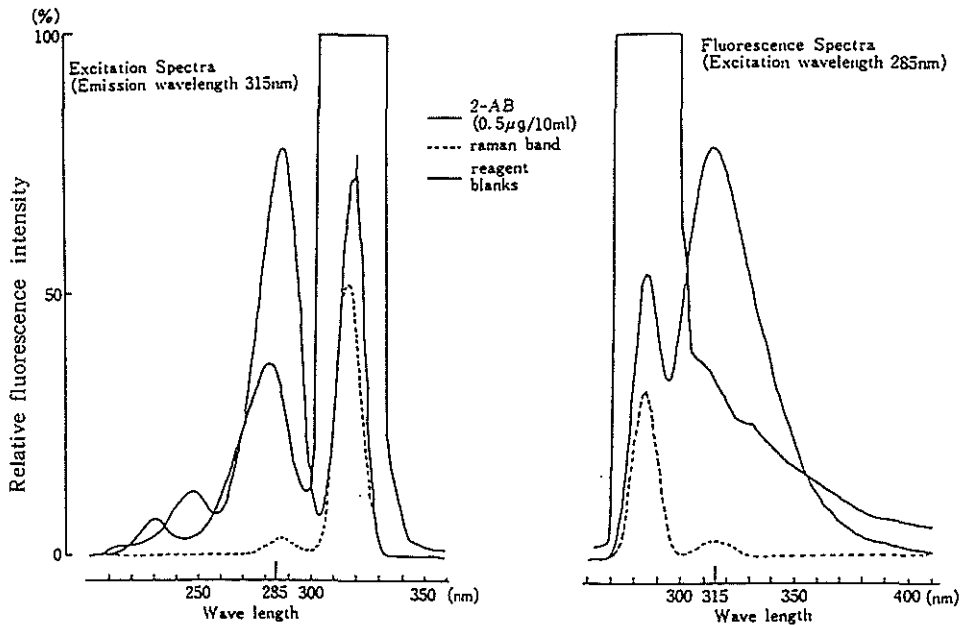


Fig. 4.12 Excitation and fluorescence spectra of 2-AB and a reagent blank

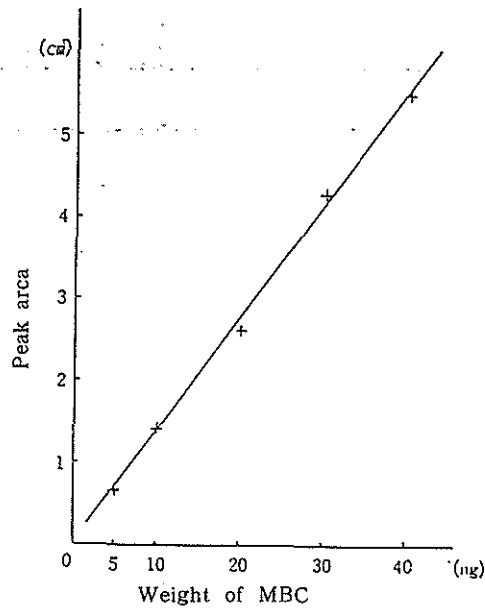


Fig. 4.13 Calibration curve of MBC

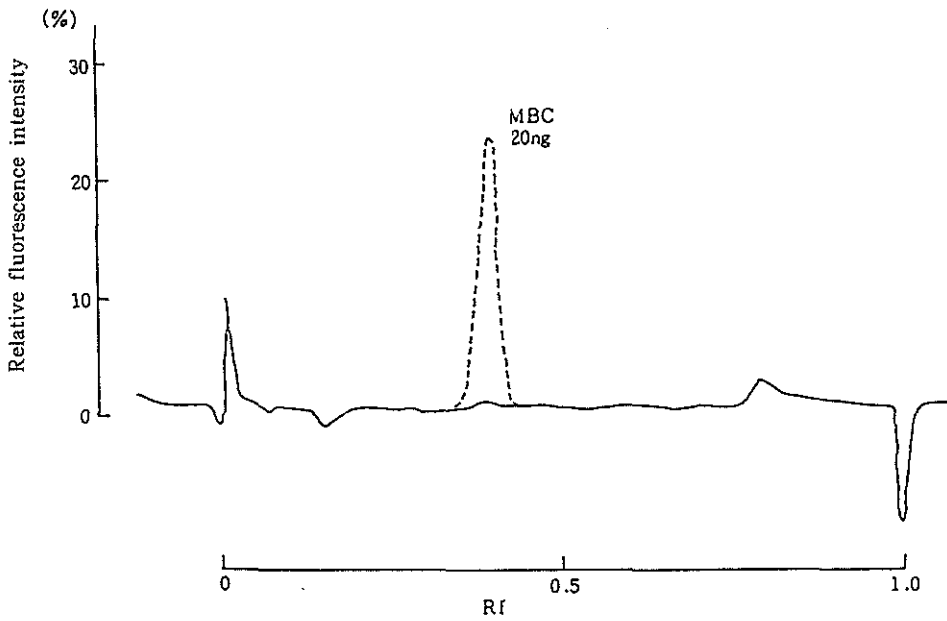


Fig. 4.14 Chromatogram obtained from untreated cucumber
The peak of MBC (broken lines) is superimposed on the chromatogram.

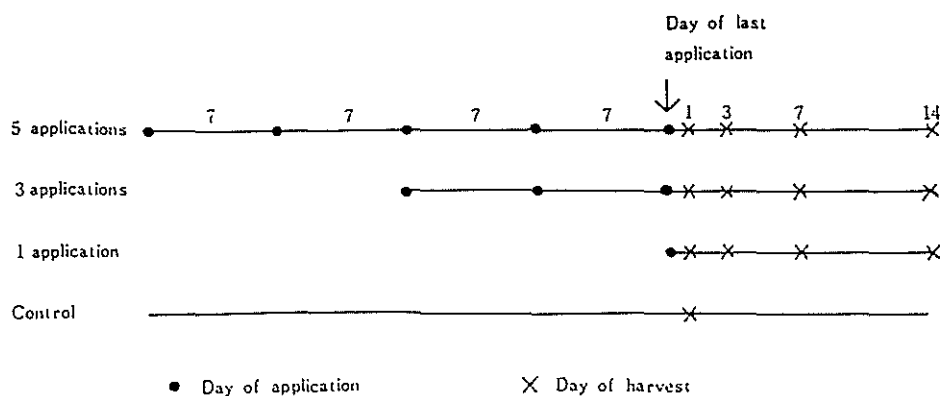


Fig. 4.15 Schedule of benomyl application and harvest for cucumber

Table 4.3 Comparison of the analytical results obtained by the different methods in samples of field-treated cucumber.

A: This method B: HPLC

Application frequency	Days after the last application	Residue in ppm					
		Sample-1		Sample-2		Sample-3	
		A	B	A	B	A	B
0	—	< 0.008	< 0.008	< 0.008	< 0.008	< 0.008	< 0.008
5	1	0.295	0.263	0.286	0.285	0.362	0.320
	3	0.187	0.158	0.088	0.086	0.201	0.205
	7	0.074	0.058	0.114	0.067	—	0.067
	14	0.067	0.050	< 0.008	< 0.008	0.009	0.017
3	1	0.251	0.245	0.246	0.242	0.209	0.355
	3	0.186	0.163	0.068	0.063	0.361	0.239
	7	0.136	0.113	0.036	0.038	0.032	0.039
	14	0.056	0.048	< 0.008	< 0.008	< 0.008	0.015
1	1	0.217	0.163	0.200	0.166	0.471	0.365
	3	0.166	0.119	0.034	0.031	0.253	0.201
	7	0.167	0.106	0.014	0.016	0.038	0.053
	14	0.047	0.032	< 0.008	< 0.008	< 0.008	< 0.008

第5節 摘 要

現在、我が国で使用されている主要なベンズイミダゾール系殺菌剤としてはベノミル(BM)とチオファネートメチル(TM)がある。これらの農薬は広く使用されているが、公定残留分析法は主分解・代謝物であるMBCを測定する方法が採用されている。BMの分解・代謝物は単純で作物体中ではBMのほとんど全てがMBCを経て分解するが、TMの光分解生成物をHPLCにより分離し、その紫外吸収スペクトルと保持時間から生成物を同定したところTMはMBCを経由する場合とTMの酸素置換体を経る場合があることが判明した。さらに、この酸素置換体は一部MBCを経て分解するがその他は別の分解経路を経ると考えられた。

従来のTMの残留分析法はTMを酢酸銅を用いて閉環反応によりMBCに変換し、既存のMBCと合わせて全MBCを紫外吸光度法またはHPLCにより測定してきたが、TMの酸素置換体は酢酸銅により閉環しないために従来法ではこれらの酸素置換体を測定できない。このため、新たにTMの残留分析法としてNucleosil NH₂などの順相系のカラムを用いたHPLCによりMBCと2種類の酸素置換体を含む分析法の開発を行ない、TM、MBCおよび酸素置換体(OA-1およびOA-2)のそれぞれの残留実態を調査した。ピーマンを栽培し、TM水和剤を散布した試料では酸素置換体はほとんど残留せず、主残留物はMBCであることが判明した。このことから、TMの残留分析では親化合物であるTMと主分解・代謝物であるMBCを測定対象とする現行法で問題はないと考える。なお、4成分の最小検出量は5ngであった。MBCは蛍光検出器により1ngが検出可能であった。

また、BMおよびTMの残留分析法としてTLC蛍光デンシトメトリーを応用した簡易分析法を開発した。この分析法とHPLCによる分析法とは測定値において良好な一致を示した。最小検出量はMBCで5ngであった。

第5章 除草剤(ビピリジリウム)^{162,163)}

パラコート(paraquat, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum dichloride)およびジクワット(diquat, 1,1'-ethylene-2,2'-dipyridylum dibromide)は広い範囲で使用されている莖葉処理用の非選択除草剤である。我が国では主として果樹園や桑園の下の除草および畑作のは種前の除草に用いられてきた。本剤は散布されて土壌へ落下すると土壌中の粘土鉱物などに強く吸着されるために散布直後に植え付けた作物に影響を与えず、さらに作物に直接散布されない限り収穫物に本剤が残留することはないと考えられている。

これらの除草剤の残留分析は従来吸光度法が一般に行なわれてきた。これらの除草剤は水溶性で溶液中でイオン交換樹脂のカラムに容易に吸着される。このため、精製法として試料から抽出されてくる妨害物を除去するためにイオン交換クロマトグラフィーが用いられてきた^{164,165)}。

パラコートの水溶液は256nmに極大吸収を持つ幅広い吸光スペクトルを示す。しかし、この波長領域では試料に由来する妨害物質の影響が大きいためイオン交換クロマトグラフィーの精製だけでは微量の測定は不可能である。このため、実用的にはアルカリ性溶液中で亜シチオン酸ナトリウムを用いてパラコートを極大吸収波長396nm($\epsilon=38,000$)¹⁶⁵⁾の吸収スペクトルを持つ化合物に還元し、380nmから420nmの吸光度をベースライン補正法により測定する方法が一般に行なわれてきた。同様に、ジクワットは水溶液中では極大吸収波長310nm($\epsilon=19,200$)¹⁶⁴⁾の幅広い吸光スペクトルを示し、還元により378nmに極大吸収を持つスペクトル($\epsilon=28,000$)を示す化合物に変わるため、波長370nmから400nmの吸収スペクトルを測定し、吸収極大379nmの吸光度を補正し定量する方法が行なわれてきた。

しかし、パラコートおよびジクワットが還元されたフリージカルは飽和塩化アンモニウム溶液中で10分間程度の短い時間しか安定でなく、還元試薬を添加後は速やかに吸光度を測定する必要がある。このように、パラコートおよびジクワットの吸光光度法による分析法は妨害物質の影響を受け易く、測定液が不安定であるため数多くの試料の残留農薬のモニタリングのためには十分ではなく、さらに比色法では両剤が共存する場合は測定できないなどの問題がある。

一方、GCによる分析法は酸化白金を触媒にしてパラコートあるいはジクワットを水素化した後測定する方法¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾または熱分解後GCで測定する方法¹⁷⁰⁾が報告されているが、検出感度は0.01~0.1ppmと手数をかけた割には高感度とは言えない結果であった。

このため、本研究ではパラコートおよびジクワットが水溶液中で比較的強い紫外吸光光度をもつことを利用してUV検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による高感度の残留分析法を検討した。

第1節 高速液体クロマトグラフィーの操作条件の検討

パラコートおよびジクワットはイオン性の化合物で水溶液中では解離しているためにHPLCによる分離はイオン交換クロマトグラフィーか、またはイオンペアークロマトグラフィーによる方法が利用できるが、後者は対

になるイオンの選択がはん雑であるために前者すなわちイオン交換クロマトグラフィーについて検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

硫酸、塩酸、りん酸二水素アンモニウム、塩化アンモニウム、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウムおよびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)：試薬特級 アセトニトルおよびメクノール：液体クロマトグラフィー用溶媒

陽イオン交換樹脂：Bio-Rad 50w×8H型

カラムクロマトグラフィー用溶媒：飽和塩化アンモニウム溶液85部とアセトニトリル15部を混合し、静置し、上澄み液を使用した。

パラコートおよびジクワット標準品：アイ・シー・アイジャパン(株)より提供された。純度99%以上のものを用いた。

1.2 器具および装置

ミキサー、ガラスカラム(内径20mm、長さ300mm 活栓付)、ガラスフィルター(G5)、桐山漏斗、ガラス繊維濾紙、マントルヒーター、ナス型フラスコ、ガラス冷却管、高速液体クロマトグラフ(Shimadzu-Dupont Model 830および島津LC-3A)、検出器(紫外吸光検出器、島津UVD-2)

1.3 分析操作

HPLCの操作条件：カラム、Partisil 10 SCX(4mm I.D.×250mm、ステンレススチール製)；移動溶媒、2Mりん酸アンモニウム緩衝液(pH3.5)85部およびアセトニトリル15部を混合し、しばらく室温で放置した後、ガラスフィルターで濾過した(この溶液は室温の低下により沈澱を生じ易いので使用時には十分注意すること)；流速、3ml/分；カラム温度、50℃；検出器、UVD 254nm；感度、0.002~0.08A UFS；試料注入量、50~100μlの量をループインジェクターを使用して注入した。

検量線の作成：パラコートジクロリド標準品をカラムクロマトグラフィー用溶媒に溶かして1~1000ppbの範囲の標準溶液を調製し、その一定量をHPLCに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、検量線を作成した。

分析操作：試料が作物の場合は、等量の水を加えてミキサーで均質化し、その200g(試料として100g)を、試料が土壌の場合はよく混合均質化し、その25gを500mlのナス型フラスコに計り取り、18N硫酸70mlを加えた後、還流冷却管を取り付けてマントルヒーターを用いて5時間緩やかに煮沸した。放冷後、分解液を水で約500mlに

希釈した。還流冷却管を少量の水で洗い、洗液を分解液と合わせてガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗を用いて吸引濾過した。フラスコ内および濾紙上の残渣を3N硫酸30mlおよび水100mlで洗浄し、濾液と洗液を合わせ、1lのビーカーに移し、水を加えて約700mlとした後、10N水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した。この溶液に必要な応じて5%EDTA溶液25mlを加えて室温で一晩放置し、桐山漏斗を用いて沈澱物を除去した。この場合、EDTAの添加は試料が作物の場合は必要がないが、土壌の場合は必要である。

濾液を、予め用意してある陽イオン交換樹脂カラム(樹脂量10ml)に注入し、流速10ml/分で流下させてパラコートを吸着させた後、蒸留水100ml、2N塩酸溶液50ml、蒸留水100ml、2.5%塩化アンモニウム50mlおよび蒸留水100mlを順次流下させ、それらの流出液は捨てた。次に、飽和塩化アンモニウム-アセトニトリル混液を流速3ml/分で流下させ、最初の10mlをメスフラスコに集めて定容とした。その一定量をマイクロシリンジで取り、HPLCに注入して得られたクロマトグラムからパラコートの量を算出した。

2. 結果および考察

2.1 EDTAの添加量

土壌を試料とする場合は硫酸で加熱抽出後の中和時に多量の沈澱を生じ、濾過やイオン交換クロマトグラフィーの実行が困難になることがあるために、EDTAを加えて沈澱の生成をある程度抑制する必要がある。しかし、EDTAの添加量が多くなると沈澱の量は減少するが、パラコートの回収率が低下したため、EDTAの添加量について検討した(Table 5.1)。分析操作の容易さとパラコートの回収率とから、土壌25g当り2.5gのEDTAを添加した。なお、試料が作物の場合は、沈澱物の量が少ないため、EDTAの添加は必要ないと思わ

Table 5.1 Effect of EDTA amount on the recovery of paraquat from soil samples.

Soil (g)	Paraquat added(μg)	EDTA added(g)	Recovery of paraquat(%)
25	25	0	91.4
25	25	1.25	86.6
25	25	2.5	79.9
25	25	5	68.6
25	25	10	65.5

Soil : volcanic ash soil, clay loam

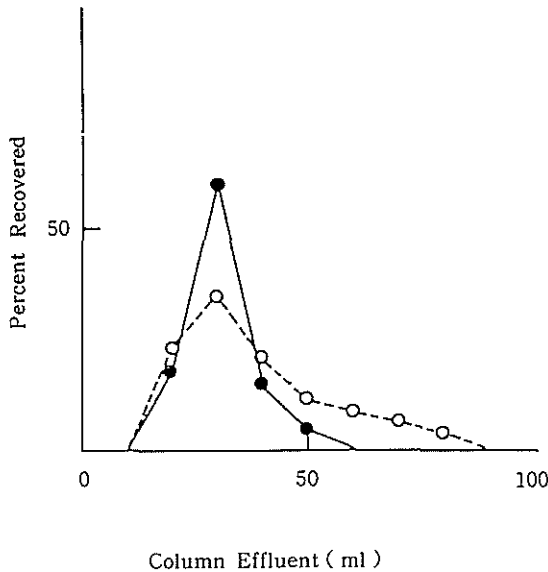


Fig. 5.1 Elution profile of paraquat from a gravity-flow cleanup column of cation ion-exchange resin.

Column : Bio-Rad Ag 50w × 8(H⁺type)10ml, 20mm I.D. glass column.

Mobile phase : solid line, sat. NH₄Cl/CH₃CN (85:15, v/v) ; broken line, sat. NH₄Cl

れる。

2.2 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーの条件
従来用いられてきた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーの操作条件では樹脂量が10mlの場合、飽和塩化アンモニウム溶液によるパラコートの溶出は90mlを必要とし、最終検液の量が多く、抽出したパラコートが薄められて測定感度の低下をまねいた (Table 5.1)。このため、イオン交換カラムからのパラコートの溶出幅をできるだけ狭くするために塩化アンモニウム、過塩素酸アンモニウムおよびこれらの塩溶液とアセトニトリルあるいはメタノールとの混合溶液についてパラコートの溶出状態を調査した。その結果、飽和塩化アンモニウム85部とアセトニトリル15部を混合し、その上澄み液を用いた場合が最も少ない量 (60ml) で100%のパラコートを溶出できた (Fig. 5.1)。なお、硝酸アンモニウムはアンモニウム塩中最も水溶性が高いが254nmの波長の光を吸収するために使用を避けた。

2.3 高速液体クロマトグラフィーの操作条件

各種の溶媒を用いてパラコートの保持時間と保持比を測定した結果をTable 5.2に示した。パラコートの溶出溶媒としては過塩素酸アンモニウム溶液が保持比からみて最適であったが、ポンプやカラムの素材がステンレススチールであるために過塩素酸塩は好ましくないと考えて磷酸アンモニウム溶液 (pH 3.5) を用いることとした。

磷酸アンモニウム溶液のみでは保持比が約12と大きく

Table 5.2 Selection of the mobile phase in high performance liquid chromatography.

Mobile phase ^{a)}	Column length (mm)	Flow rate (ml/min)	Retention time (min)	Capacity factor ^{b)}
M Sodium phosphate	100	2.5	6.7	16.7
M Ammonium perchlorate	100	2.5	1.1	2.6
M Ammonium phosphate	100	2.5	4.8	12.0
M Ammonium phosphate	250	2.2	19.1	26.5
2M Ammonium phosphate	250	2.2	16.3	20.2
M Ammonium phosphate + acetonitrile (85+15)	250	2.2	6.3	6.3
M Ammonium phosphate + methanol (85+15)	250	2.2	8.1	6.8
2M Ammonium phosphate + acetonitrile	250	2.2	5.0	4.6

a) : All buffer solution were adjusted to pH 3.5. b) : The retention time and the capacity factor of paraquat were determined on Partisil 10 SCX column (4mm I.D.) with different mobile phases.

現実の分析には十分でないため、メタノールまたはアセトニトリルを添加した場合のクロマトグラムを観察した。ピークの形状や保持比などから2 M 磷酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) 85部, アセトニトリル15部の混合液が最適であった。

高速液体クロマトグラフィーの検出器として水銀ランプを光源としたUV検出器 (254nm) を用いた。パラコートの水溶液中での極大吸収は256nmにあるために高感度の分析が可能となった。最小検出量はパラコートジクロリドとして0.1ng (感度 2×10^{-3} A U F S) であった。検出限界は試料100g, 最終液量50ml, HPLCへの注入量100 μ lの場合0.5ppbであった。

2.4 類縁化合物の分離

パラコートおよびジクワットの同時分析のための分離条件の検討を行った結果をFig. 5.2に示した。ジクワットの水溶液中での極大吸光波長は310nmにあり, 測定は254nmで行なったためジクワットのピーク高がパラコート

のそれと比較して低くなった。

2.5 添加回収試験

Table 5.3およびTable 5.4に作物および土壌を用いた添加回収試験の結果を示した。作物の場合は0.1~0.5 ppmの添加濃度で80~103.8%と良好な回収率を得た。土壌の場合は土質によって回収率が多少異なり, 火山灰土壌で回収率がやや低かったが0.4~2 ppmの添加で70.3~100.1 ppmの回収率を得た。

2.6 土壌からの簡易抽出法

土壌中のパラコートの簡易抽出法を検討した。試料1~5gを共栓付三角フラスコに取り, 飽和のアンモニウム塩溶液50mlを加え, 30分間振とう抽出した。その上澄み液をガラスフィルターで濾過し, その一定量をHPLCで測定した。簡易抽出法の溶媒として塩化アンモニウム, 硫酸アンモニウムおよび過塩素酸アンモニウムの各々の飽和溶液を用いた。抽出効率は塩化アンモニウム溶液が最も良好であった。添加回収率は試料量が5gの場合は

Table 5.3 Recovery of paraquat obtained from fortified crop samples (100 grams)

Crop	Paraquat added (ppm)	Recovery (%)
Carrot	0.1	99.0
	0.5	93.4
Raddish	0.2	103.8
	0.5	100.2
Potato	0.2	80.0
	0.5	98.8
Sweet potato	0.5	95.2

Table 5.4 Recovery of paraquat obtained from fortified soil samples.

Soil	Sample size (g)	Paraquat added (ppm)	Recovery (%)
Diluvial soil, sandy loam	50	1	84.0
Volcanic ash soil, clay loam	50	1	70.3
	25	1	81.0
Volcanic ash soil, clay	25	0.4	71.8
	25	2	91.5
Alluvial soil, clay loam	25	0.4	100.1
	25	2	84.8

Table 5.5 Examination in a rapid extraction procedure from soil samples.

Solvent	Paraquat added (ppm)	Paraquat found (ppm)	Recovery (%)
sat. NH_4Cl	6	3.92	65.4
sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6	—	—
sat. NH_4ClO_4	6	1.10	18.3
sat. $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{ACN}$ (4+1)	6	3.97	66.1
sat. $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{MeOH}$ (4+1)	6	1.23	20.4

Soil: 5g. Volume of each extraction solution: 50ml. Extraction time by shaking: 30min.
ACN: acetonitrile. MeOH: methanol. —: not detected.

Table 5.6 Extraction efficiency of paraquat from a soil sample by the rapid extraction procedure.

Sample weight (g)	Recovery (%)
1	89.3
2	78.9
3	67.9
4	67.7
5	67.7

Fortification level of paraquat: 1ppm. Solvent:
sat. $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{ACN}$ (4+1), 50ml

65.4%であった (Table 5.5)。

簡易抽出法の抽出効率の改善のために飽和塩化アンモニウム溶液にアセトニトリルおよびメタノールを混合した場合の抽出効率を測定した。アセトニトリルを添加することで回収率が若干改善された。飽和塩化アンモニウム溶液とアセトニトリルの混合割合と抽出効率について検討し、20%アセトニトリルが最も効率が良好であった。なお、飽和の塩溶液と有機溶媒を混合した場合に生じる沈澱はガラスフィルターで除去した。

さらに、土壌の量と抽出効率の関係について検討した。土壌の量が1~2gと少ない場合は簡易抽出法でも80~90%の回収率を得た (Table 5.6)。

2.6 考察

従前のパラコートの微量分析法は試料を硫酸で煮沸抽出し、イオン交換クロマトグラフィーで精製し、亜ジチオン酸ナトリウムにより還元し吸光スペクトルを測定する方法が一般的であった。この方法の検出限界は0.05 ppm程度であり、さらに亜ジチオン酸ナトリウムによる

発色はパラコートの還元反応によるものであり、この還元体は空気中の酸素により酸化され易いため発色液が不安定であった。

比色法によらない方法としてガスクロマトグラフィーが開発された。これらの方法はパラコートおよびジクワットを酸化白金を触媒にして水素ガスで還元するか、または熱分解によりパラコートおよびジクワットをそれぞれ2,2'-bipyridylおよび4,4'-bipyridylにしてFTD-GCで測定する方法が報告された。これらの方法は0.01 ppmの検出限界を有し感度は改善されたが、パラコートおよびジクワットを揮発性の化合物に変える操作が必要であった。

この点、パラコートおよびジクワットが水溶液中で強いUV吸収性を持つことからUVD-HPLCはこれらの化合物を直接測定することができた。両化合物の極大吸収波長が異なるため両化合物を同時に最高感度で測定することができなかったが、最近では複数の測定波長を同時に観察できる検出器が利用できるように測定波長の相違は障害にはならなくなった。

パラコートおよびジクワットは水溶性が高いが、試料に強く吸着されていることがあり、水だけでは抽出されないため抽出には従来法を用いた。さらに、抽出液からパラコートを回収する方法も従来法に勝る手段が見いだせなかったため従来法によった。試料が土壌の場合はアセトニトリル添加の飽和塩化アンモニウム溶液で振とうするだけで良好な回収率 (試料量1g, パラコート添加量1ppm, 回収率89.3%)を得ることができた。従来の抽出法では加熱、冷却、濾過および中和と行程が多く時間がかかり、回収率は著者の実験ではTable 5.4に示したように0.4~2ppmの添加で70.3~100.1%であった。一方、簡易抽出法は30分間の抽出操作で抽出が完了するので極めて簡便であった。しかし、簡易抽出法は抽

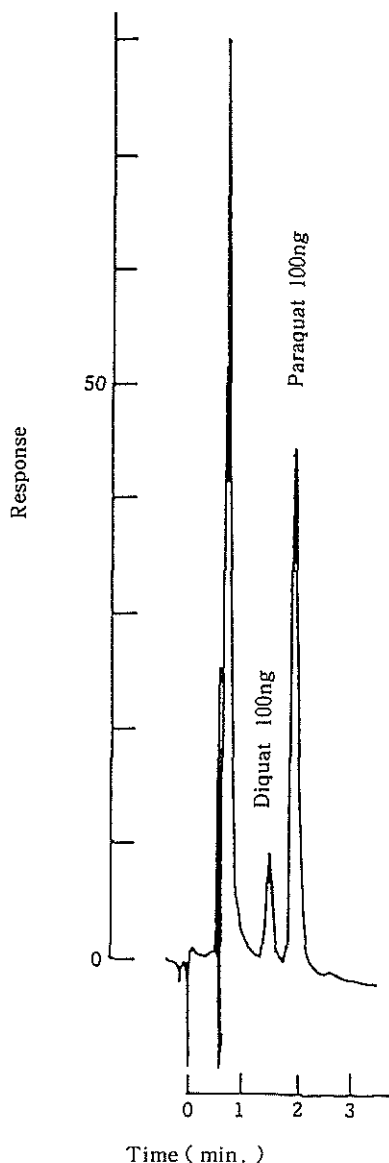


Fig. 5.2 Chromatogram of a standard mixture of paraquat and diquat.

Column : Partisil 10 SCX, 4mmI. D. × 25cm

Mobile phase : 2M ammonium phosphate buffer(pH 3.5)/acetonitrile (85+15, v/v) ; Flow rate, 3ml/min ; Temperature, 50°C, Detector : UVD, 254nm, 0.02AUFS.

出できる試料量が従来法より少ないために残留濃度の高い試料(0.1ppm以上)のみに適用が可能であり、残留濃度の低い試料では試料量を増して(試料量100g)本研究で述べた高感度分析法により分析する必要があった。

なお、硝酸アンモニウムの方が塩化アンモニウムより

高い濃度を得ることができてこれらのパラコートの抽出効率が改善されるが、硝酸アンモニウムは強いUV吸収を持つために使用を避けた。

Pryde¹⁷¹⁾はイオン交換法(固定相 Spherisorb A20Y, 移動相 0.01M りん酸カリウム緩衝液 pH2.45)を用いて尿中のパラコートを測定した。Pryde の操作条件は移動相のイオン強度が低いことと陽イオンがカリウムであったために保持時間が長くなりピーク幅が広がり、パラコートの定量限界は100μg/lであった。本実験ではTable 5.2に示したように陽イオンとしてアンモニウムイオンを用い、イオン強度を高くすることにより良好なクロマトグラムを得ることができた。Table 5.2から明らかかなように過塩素酸アンモニウムが最適の保持比を示したがHPLCのポンプ、配管およびカラムへの悪影響を懸念して使用を避けた。しかし、その後、Paschalら¹⁷²⁾およびNeedhamら¹⁷³⁾は過塩素酸イオンをペアーイオンとしたHPLCによりパラコートを分析した。過塩素酸のステンレススチールへの影響は心配するほどの悪影響を与えることはないと思われる。また、塩化アンモニウムは塩素イオンのステンレススチールへの悪影響を考慮して使用しなかった。りん酸アンモニウム溶液は254nmでUVの吸収がないが本実験での濃度はほぼ飽和に近いために室温の低下により移動相中にりん酸アンモニウムの結晶が析出するおそれがあった。このため、先に述べたようにイオン交換クロマトグラフィーでも移動相として過塩素酸アンモニウム溶液を用いれば操作はより簡便になると思われる。移動相のpHは3.5の時保持比が最も小さくなった。また、移動相にアセトニトリルなどの水と自由に混合する有機溶媒を加えることでパラコートおよびジクワットの保持比を適切に小さくする効果があった。これは移動相の粘性が低下したためにクロマトグラムが改善されたと考えられる。さらに、イオン交換クロマトグラフィーであっても分配クロマトグラフィーの効果も働いていると思われる。

本法は従来の比色法およびガスクロマトグラフィーと比べて試料由来の妨害を受けにくく、感度は10~100倍向上した。さらに、本法はパラコートおよびジクワットの分離定量が可能であるために両剤の残留している試料の同時分析が可能であるので種々の試料の残留分析に応用することができると考える。

3. 要 約

パラコートおよびジクワットの公定残留分析法は比色法であり、試料に由来する妨害物質の影響を受け易く、さらに発色液の安定性が悪い。このため、より感度の良い分析法を開発するために陽イオン交換クロマトグラフィーによるHPLCを用いる方法について検討した。抽出

および精製方法は従来の方法を用い、さらに土壌については飽和塩化アンモニウムを用いる簡易抽出法について検討し良好な結果を得た。

本法はその高い感度と簡便な操作性から従来の公定法に取って変わり得る方法であり、すでにシクワットでは高速液体クロマトグラフィーが採用されたことからパラコートについても近い将来高速液体クロマトグラフィーが採用されるものと思われる。

本法の最小検出量は0.1ng、検出限界は農作物が0.0005ppm、土壌が0.002ppmであった。回収率は農作物が0.1~0.5ppmの添加濃度で80~103.8%、土壌が0.4~2ppmの添加濃度で70.3~100.1%の値を得た。また、簡易抽出法の回収率は土壌1~5gを用いて67.7~89.3%の値を得た。

第2節 パラコート除草剤の残留分析

散布されたパラコートは最終的に土壌に落下し、土壌粒子に強く吸着されるために散布直後に播種または苗の植付けを行っても作物を枯死させることがなく、さらに作物に吸収されることがないために作物残留性はないと考えられてきた。また、土壌粒子に吸着されたパラコートは安定であるが吸着が強力であるので不活性化されると考えられていた。

しかし、これらの現象は従来の比色法による分析法の感度が十分でないために低い濃度での変化が把握できなかったことがあったと考えられる。

著者は前節で述べたパラコートの高感度分析法を用いて市販の試料、自家栽培試料および採取した土壌についてパラコートの残留実態の解明を行なった。

1. 実験材料および方法

試薬および器具：光分解装置（内容800ml、石英ガラス製水冷ジャケット付き100W高圧水銀灯内蔵）およびその他は第1節に同じ。

バレイショ、サツマイモ、ダイコン、ニンジン：近所の商店より購入した。

自家栽培試料：バレイショを用いた。植付け3日前にパラコート（有効成分含有量24%）を10a当り300mlを散布し、植付け当日に圃場を耕起した後、種芋を植え付けた。収穫は植付け87日後に行なった。

土壌試料：通年パラコートを使用した圃場の土壌中のパラコートの縦方向の分布を調査した。さらに、土壌表層のパラコートの光分解について調査した。

分析方法：第1節の方法によった。

2. 結果および考察

2.1 市販試料の分析

芋類および根菜類は土壌と長く接触しているために地

上部よりはパラコートが残留している可能性があると考えられたため市販の試料について分析を行なった。その結果をTable 5.7に示した。従来の残留分析法では検出限界が0.05ppmであったために検出限界以下と評価していたが、本法では0.5ppbの分析が可能であるために従来は検出限界以下とされていた濃度の試料についても十分に分析が可能であった。しかし、残留量はパラコートの残留基準以下であったため安全性の観点からは問題はない。

さらに、土壌に残留している農薬を比較的吸収し易いと考えられているニンジンではパラコートが検出されずにバレイショやサツマイモで検出されたことについては、当該作物の圃場で前作を含めてパラコートを全く使用しなかったとは考え難いため、これらの2作物にはなんらかのパラコートを吸収する機構があると考えられる。しかし、その吸収量は極めて微量であった。

2.2 自家栽培したバレイショの分析

市販のバレイショから若干のパラコートの残留が認められた。これが芋に付着していた土壌によることが考えられる。この点を確認するため自家栽培により土壌中のパラコート濃度と芋中のパラコート濃度について調査した。Table 5.8にパラコートを散布した区と無散布区のそれぞれのパラコートの残留濃度を示した。

この分析を行なうに当たり試料のバレイショはよく泥を落とし表皮部分とそれ以外の可食部に分けて分析した。このことからパラコートは極微量であるがバレイショの内部まで浸透していることが判明した。なお、無散布区でも微量のパラコートの残留が認められるのは前作でパラコートをを用いたためと思われる。このため、両区の土壌中のパラコートの残留量を調査した結果をTable 5.9に示した。無処理区の土壌にもパラコートが残留していた。これは前作でパラコートをを使用したためであった。処理直後の残留濃度が高く、植え付け時に約1/3に下がったのは耕起により薄められたためと思われる。

試料中濃度/土壌中濃度の比は散布区では約1%、無処理区は0.8%でありほぼ同じ傾向にあった。

また、土壌からパラコートを抽出する方法として公定法で採用されている方法と簡易抽出法の比較を行なった。両者の分析値はよく一致した（Table 5.9）。

Table 5.7 Paraquat content in some crops purchased from a vegetable store.

Sample	Result (ppm)
Potato	0.0258
Sweet potato	0.0278
Rasish	<0.0005
Carrot	<0.0005

Table 5.8 Paraquat content in potato samples cultivated by the author.

Sample	Result (ppm)	
	Paraquat applied	Control
Potato (whole)	0.013	0.007
Potato (peel)	0.007	<0.003
Potato (flesh)	0.026	0.016

2.3 パラコートの土壌への吸着量と光分解

パラコートを散布したところのある圃場内で数カ所の土壌を縦方向に順次採取して分析した。表層0~1cmが平均0.64ppm, 1~10cmで1.6ppmのパラコートの残留が見いだされた。さらに、地表下1.2m(黒色の耕土層の最下部分)で0.49ppm, 地表下2.5m(茶色の粘土層)ではパラコートは全く見いだせなかった。パラコートは土壌に強く吸着されて移動しないと考えられていたが、表層の濃度が低く、その理由として化学肥料を使用することによるパラコートの土壌粒子からの脱着と雨水による溶脱および太陽光による分解が考えられる。

Table 5.9 Paraquat content in soil samples of the potato field.

Soil sample	Extraction method (ppm)	
	Official method	Simple method
Before the application (April 21, 1978)	0.778	0.832
Immediately after the application (April 21, 1978)	4.562	4.118
Planting time (April 23, 1978)	1.378	1.567
Harvest time (July 16, 1978)	1.344	1.377
Control soil sample	0.889	0.798

Soil samples : volcanic ash soil, clayey loam.

さらに、土壌のパラコート吸着能について調査した。3種類の土壌各10gを内径18mmのガラスカラムに詰め、0.36%のパラコート水溶液100mlを注入してパラコートを吸着させた。蒸留水100mlを注入して遊離のパラコートを溶脱した後土壌中のパラコートの濃度を測定した。火山灰殖壌土4760ppm, 洪積砂壌土4410ppm, 沖積殖壌土14500ppmであった。各土壌の粘土鉱物含量は測定していないが粘土鉱物の含有量の多い土壌は土パラコートをよく吸着した。パラコートの通常の散布量はパラコートジクロライドとして72g/10aであり、散布したパラコートが全て表層10cmに吸着されると仮定すると1回の散布当り0.72ppmとなる(ただし、土壌の比重を1と仮定した)。土壌に吸着されたパラコートが全く脱着しないならば、前述の各土壌では6000回以上の散布でパラコートは飽和に達し、通常の使用形態では何千年に渡

て使用できることになる。しかし、実際にはパラコートの脱着は起こっている。中村らは、継年パラコートを使用してきた桑園などを改植した場合にパラコートによると思われる作物の生育障害について報告した¹⁷⁴⁻¹⁷⁶。

また、最表層の1cmの濃度が特に低い理由として太陽光による分解が考えられるためパラコート水溶液およびパラコートを処理した土壌を光分解装置を用いて高圧水銀灯(100w)の光を照射した。半減期は水中で270時間、重量比で80%の水分を添加した土壌では330時間であった。しかし、風乾した土壌では500時間後で約80%が残存していた。なお、パラコートの初期濃度はそれぞれ1ppmであった(Fig. 5.3)。このことからパラコートは十分な水が存在すると土壌に吸着されていたパラコートが土壌粒子から遊離し、光により分解されるものと考えられる。このため、最表層の土壌のパラコートは雨水などの

水の存在により、従来考えられていたよりはより多く分解されるものと思われる。なお、パラコートの光分解実験の場合は光分解物とパラコートを分離させるため高速液体クロマトグラフィー条件を次のように若干修正した。

カラム：Partisil SCX, 4.6mm I.D. × 250mm
 移動相：2 M リン酸アンモニウム (pH3.5) + アセトニトリル=85+15
 流速：1.5ml/min
 カラム温度：45°C
 検出器：UV 検出器, 測定波長254nm,
 感度0.02 AUFS

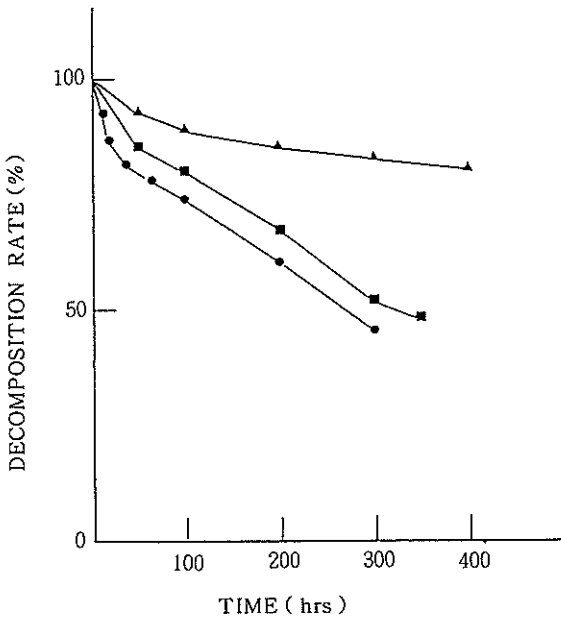


Fig. 5.3 Photodegradation of paraquat in dry soil (▲), wet soil (■), contained 80% water in weight, and water (●) by irradiating with a high pressure mercury lamp (100 w).

保持時間 (Rt) および保持比 (k') :

	Rt	k'
ジクワット	4.48	2.67
パラコート	6.24	3.56
パラコートの光分解物*	5.25	3.01

(* : 化合物の化学的形態は未確認であるが、パラコートの光分解物の分析で観察された。)

3. 要 約

従前、パラコートは作物に吸収されず、したがって残留することはないと考えられていたが市販の芋類から極微量のパラコートを検出した。この残留量は残留基準値以下であり、安全性上の問題はなかった。また、バレイ

シヨを栽培して栽培土壌中のパラコート濃度とバレイシヨ中の濃度の関係について調査した。バレイシヨ中のパラコートの残留濃度は土壌中のパラコート濃度の約1%であった。

土壌中のパラコートの垂直分布を調査したところ通常耕作に利用される部位の残留が高く、深さ2.5mではパラコートの残留は見い出せなかった。

また、パラコートは光分解を受けるもののかかなり安定であった。

第3節 摘 要

パラコートおよびジクワットの従来の残留分析法は試料を硫酸で煮沸分解してイオン交換樹脂で精製し、亜ジチオン酸ナトリウムで還元発色させる方法が採用されている。この方法は発色液の安定が悪く、検出感度も0.03~0.05ppmと十分でない。

パラコートおよびジクワットは水溶液中で強いUV吸収を示すことおよび両農薬ともにイオン性の化合物であるためにイオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを検討した。試料からの抽出は従来法によった。抽出液の精製はイオン交換クロマトグラフィーを用いたが、溶出溶媒にアセトニトリルを混合しパラコートの溶出時のテーリングを防ぐことができた。

試料が土壌の場合は飽和の塩化アンモニウム溶液を用いて振とう抽出し、その上澄み液を直接高速液体クロマトグラフィーで測定することができることを示した。

高速液体クロマトグラフィーの移動相としては比較的高濃度のアンモニウム塩溶液を必要とした。溶出状況からは過塩素酸アンモニウム溶液が最も優れていたが、装置の配管などへの悪影響を懸念してりん酸アンモニウム溶液 (pH3.5) を用いることとした。さらに、移動相にアセトニトリルを混合することでパラコートおよびジクワットのピーク形状が著しく改善された。しかし、メタノールではその効果は観察されなかった。

本法によるパラコートの最小検出量は0.1ng, 検出限界は0.0005ppmであった。従来法による抽出操作を行なった場合の添加回収試験の結果、作物では0.1~0.5ppmの添加で80~104%, 土壌では0.4~2ppmの添加で70~100%の回収率を得た。

市販の芋類および根菜類並びに自家栽培のバレイシヨについて本法を用いてパラコートの分析を行なった。従来法では検出限界以下を示す試料から極微量のパラコートを検出したが、その濃度は残留基準以下であり何等問題はなかった。

さらに、土壌中からのパラコートの簡易抽出法を開発した。1gの土壌に1ppmのパラコートを添加し、アセ

トニトリル含有の飽和塩化アンモニウム溶液50mlで30分間振とうするだけで89.3%の回収率を得た。本法を用いて永年バラコートを使用してきた圃場のバラコートの垂直分布を測定した。バラコートは表層の1cmまでの濃度は比較的low、1~10cmの層が最も高く、さらに深くなるにつれて漸減し、耕作される黒色の土壌層では検出されたがその下の粘土層では検出されなかった。

なお、同一試料中のバラコートを本法と現行の公定残留分析法とで分析したところ両者の分析値は良好な一致を示した。従来法は上述のように測定液の安定性が悪く、しかも測定波長が紫外領域に近いため試料由来の妨害を受け易い。これに対して本法は高速液体クロマトグラフィーにより試料由来の妨害物を避けることができるため従来法に比較して10倍以上の感度の向上が得られており、今後公定分析法として十分に活用されるものと考えられる。

第 6 章 殺 虫 剤 (カ ー バ メ イ ト 系)

昭和30年代の後半から昭和40年前半にかけて我が国を初め、世界各国においてBHC、DDTなどの有機塩素系農薬の使用に伴う農作物や土壌への残留性、野生生物の生態への影響などの環境への弊害が表面化した。このため、それらに代わる農薬の開発が急がれ、その中で有機りん系とカーバメイト系の農薬が相次いで開発された。有機りん系殺虫剤とカーバメイト系殺虫剤はともにコリンエステラーゼ阻害作用を有し、残留性は有機塩素系農薬よりはるかに少ないため、有機塩素系農薬に代わり広く使用されるようになった。このころ、我国でも欧米諸国と同様に残留農薬問題は社会の大きな関心事となり、農作物の食品としての安全性確保のため残留農薬の実態調査が不可欠であった¹⁷⁷⁾。

有機塩素系農薬と有機りん系農薬は熱安定性が比較的良好であったため、逸早くGCによる分析が行なわれた。しかし、カーバメイト系殺虫剤はC、H、O、Nにより構成されているためハロゲンやりんのような特異的な検出方法がなく、さらに熱安定性が悪く、微量分析においてGCによる分析が困難であった。

我国では昭和34年 carbaryl (NAC)¹⁷⁷⁾がカーバメイト系殺虫剤第1号として登録されて以来、新しいカーバメイト系殺虫剤が次々開発され、水稻のウンカ、ヨコバイ類の防除用として広く使用されるようになった。このため、これらの農薬の残留性の確認のため高感度の残留分析法の開発が急務であった。

本研究においてはカーバメイト系殺虫剤の高感度分析法、蛍光光度法、ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーについて検討し、さらに残留分析レベルでの定性分析法を検討した。

第 1 節 カ ー バ メ イ ト 系 殺 虫 剤 の ジ ア ゾ カ ッ プ リ ン グ 反 応 お よ び 薄 層 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー を 用 いた 分 光 光 度 分 析 法 の 開 発 ¹⁷⁸⁾

カーバメイト系殺虫剤の分光光度法による残留分析法について検討した。カーバメイト系殺虫剤はそのままでは吸光度が低く、また加水分解して生じるフェノール化合物にしても200~220nmの波長領域を使用する必要がある。しかし、紫外部の測定は試料由来の妨害を受け易い。このため、カーバメイト系殺虫剤の加水分解で生じるフェノール化合物を発色させて吸光度の測定を、妨害を受けにくい可視部^{28-31, 178-181)}で行なうことにより感度の向上を図った。しかし、残留分析の対象となる試料はほとんどの場合フェノール性化合物を含み、カーバメイト系殺虫剤の残留分析の妨害となった¹⁸¹⁾。これらの天然のフェノール性化合物との分離方法についてCPMC (2-chlorophenyl methylcarbamate) 剤を散布した作物を用いて検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

ジクロロメタン、エチルエーテル、メタノール、アセトン：試薬特級品を蒸留した。

アンモニア、水酸化カリウム、塩酸、*o*-chlorophenol (OCP)：試薬特級

緩衝液：M/10ペロナルナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 8.0)

発色試薬：0.04% *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレート・メタノール溶液

TLC用アルミナ：クロマトグラフィー用アルミナ (300 mesh) を130°Cで一晩加熱活性化し、放冷後、(1+4)アンモニア水を重量比で8%相当量を添加してよく混合した。このアルミナを用いて厚さ1mm、20cm×20cmの薄層板を乾式で作成した。

CPMC標準品：CPMC工業用原体を*n*-ヘキサン-アセトン (19+1) で再結晶を繰り返した。工業用原体が着色している場合は予め活性炭で脱色した後に再結晶を行なった。m.p. 90-91。さらに、シリカゲルTLCで単一成分であることを確認した。

1.2 器具および装置

TLC用ガラス板 (20cm×20cm)、ガラスフィルター (25G3)、水蒸気蒸留装置、ナス型フラスコ、分液漏斗、コーヒーミル、分光光度計 (日立自記分光光度計)

1.3 分析操作

コーヒーミルで20~80メッシュに粉碎した米100gを500ml容の共栓付き三角フラスコにとり、ジクロロメタン250

mlを加え、2時間振とう抽出した。抽出液を25G3ガラスフィルターで濾過し、残留物を80mlのジクロロメタンで洗った。濾液と洗液を合わせて、500ml容ナス型フラスコに移し、40℃以下で約10mlに減圧濃縮した。これにN水酸化カリウムメタノール溶液10mlを加え、還流冷却器を付けて60~70℃の水浴中に90分間浸し、CPMCを加水分解してOCPとした。加水分解液を室温にまで冷却し、りん酸(1+4)3~4mlを加えてpHを3~4に調節し、水を20mlを加えて減圧下で残留物が乾固するまで蒸留し、流出液を予め0.1N水酸化カリウム溶液10mlを入れた受器を用いて捕集した。この流出液を分液ロートに移し、塩酸(1+9)でpHを3~4に調節し、30mlずつのエチルエーテルで3回抽出した。エーテル層を集め、無水硫酸ナトリウムで脱水した後0.1N水酸化カリウムメタノール溶液2mlを加えて減圧下で窒素を流しながらエチルエーテルを留去した。残留液を塩酸(1+9)で中和し緩衝液1ml、発色溶液1mlを加えて発色させ、40分間放置した後、発色液を10mlのメスフラスコに移し、アセトンで10mlに定容とした。

アンモニアを添加した活性アルミナを用いて、20cm×20cm、厚さ1mmの薄層板を乾式で作成し、発色した溶液2mlをホールピペットで取り、薄層板の下端から約3cmの所に帯状に添付した。1回の測定ごとに3枚のTLC板を用いて合計6mlを添付した。アセトン-ジクロロメタン-エチルエーテル(5+4+1)を展開溶媒として10ml展開し、3枚のTLC板のCPMCに相当する部分(赤紫色Rf=0.25)を集め、まず、アセトン3ml、次いで、アセトン-水(4+1)6mlで抽出し、緩衝液1mlを加えて10mlに定容とし、この液の吸光度をアセトンを対照にして測定した。

2. 結果および考察

2.1 色素の安定性

OCPのアセトン溶液(10~20μg/ml)1mlを10mlのメスフラスコに取り、緩衝液1mlおよび発色試薬1mlを加えて反応させた。40分後アセトンを用いて10mlに定容とする。その後、180分後まで510nmに於ける吸光度を測定したが、吸光度に変化なく安定であった。

2.2 無散布米の分析

CPMCを散布していない玄米と白米をアルミナTLCを使用しないで分析したところ試料100g当りCPMC換算でそれぞれ12.8μg、7.4μgに相当する分析値を得た。無散布区試料の発色液の吸収スペクトルはCPMCと類似していた。このため、妨害物質を除去するためにアルミナ乾式TLCが必要であることが判明した(Table 6.1)。

2.3 アルミナTLC

OCPのシアゾカップリング反応物はアルカリ性溶液中で赤色を呈し、酸性溶液中では淡黄色となる。TLCでRf値の確認が容易に行なえるように、アルミナに稀アンモニア水を含ませて形成した色素の赤色を維持した。展開溶媒はアセトン-ジクロロメタン-エチルエーテル(5+4+1)を用いた。このときOCP由来の色素はRf=0.25であった。同様に、CPMC無散布区の玄米および白米について発色した色素をTLCで分離したところRf=0.4の位置に赤色の色素を分離した。この色素を抽出して吸収スペクトルを測定したところこの色素の極大吸収は520~530nmにあり、OCPの発色色素の極大吸収は510nmにあった(Fig. 6.2)。アルミナTLCから色素を抽出するときの回収率は平均90%であった(Table 6.2)。

Table 6.1 Recovery of CPMC obtained from blank and fortified samples (100 g each) without TLC cleanup.

Sample	CPMC added (μg)	CPMC found (μg)	Recovery (%)
Polished rice	0	6.2	—
	0	8.6	—
	10.2	16.5	162
	10.2	17.2	169
Unpolished rice	0	12.8	—
	10.2	26.2	257
	10.2	28.7	281

2.4 添加回収試験

C P M C無散布区玄米と市販白米を用いてC P M Cの添加回収試験を行なった (Table 6.3)。試料100 gに10~20 μgのC P M Cを添加した場合の平均回収率は80%以上であった。

Table 6.2 Recovery of the colour from TLC plates.

OCP expected (μg)	OCP found (μg)	Recovery (%)
9.1	8.5	86.8
9.1	8.9	91.2
9.1	8.5	86.8
9.1	8.3	84.6
18.2	17.2	91.2
18.2	18.1	96.2

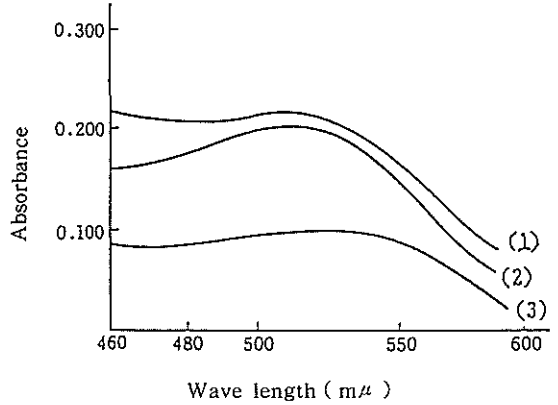


Fig. 6.1 Visible absorption spectra of colours.
 (1): 18.2 μg of o-chlorophenol.
 (2): cleaned up the colour of (1) by TLC.
 Rf=0.25.
 (3): interfering colours separated by TLC.
 Rf=0.40.

Table 6.3 Recovery of CPMC obtained from fortified samples with a TLC cleanup procedure.

Sample	CPMC added (μg)	CPMC found (μg)	Recovery (%)
Polished rice	0	1.2	—
	10.2	10.3	101
	10.2	9.0	88
	10.2	8.6	84
	20.4	17.3	85
	20.4	18.3	90
Unpolished rice	0	1.1	—
	10.2	10.5	103
	10.2	9.4	92
	10.2	8.7	85

Sample weight : 100 g

2.5 C P M Cを散布した米の分析

C P M Cの散布区の玄米を分析した。C P M CはアルミナT L Cを用いた場合は検出されなかったが、T L Cを用いないとC P M C0.2ppmに相当する量が検出された (Table 6.4)。

2.6 考 察

ジアゾカップリング反応を応用した比色法は比較的操

が簡単であるためカーバメイト系農薬の残留分析および製剤分析に広く応用されている^{28-31,178-181}。残留分析では精製したアゾ色素の安定性と試料由来の妨害物の影響を考慮することが肝要である。ジアゾカップリング試薬として用いるジアゾ化した芳香族アミンとして *p*-ニトロベンゼンジアゾニュームフルオロボレートは試薬として市販されており、試薬の長期保存が可能であるこ

Table 6.4 Analytical results of rice samples sprayed with a CPMC formulation.

Rice sample	Analytical result of CPMC (ppm)	
	(1)	(2)
Unpolished rice grown in Ishikawa	0.194	0.014
Polished rice grown in Saitama	0.223	0.013

(1): without TLC cleanup. (2): with TLC cleanup.

とから使用した。

ジアゾカップリング反応はフェノール化合物に共通しているのでフェノール化合物の分別の点で選択性がない。植物体中にはアルカリ処理によってフェノール化合物を生成する物質が多く存在するためこれらの物質を除く必要があった。妨害物質の除去の方法として、AOAC法²⁸⁾ではcarbarylの残留分析で凝集法を採用しているが、この方法は妨害物の除去が十分ではなく試料によっては着色物質の除去が不十分であった。石川らはCPMCを加水分解して生じるOCPを水蒸気蒸留によって分離し、発色試薬を加えて比色した。色素、油脂類はよく分離しているが、試料由来のフェノール化合物による妨害があり、玄米中のCPMの分析値は試料が古くなるほど高くなることを報告した¹⁸¹⁾。

このため、著者はジアゾカップリング反応で精製したアゾ色素をTLCで分離することを試みた。このアゾ色素はアルカリ製で赤色を呈し、酸性側で淡黄色となるためTLCの吸着剤をアルカリ性とする必要があった。TLC板として、作業が容易でかつ多量の試料が添付できることでアルミナ乾式TLCを用いた。その結果、CPMCの無散布区の玄米抽出液に発色試薬に陽性を示す物質があることが判明した。アルミナTLCではCPMCの由来の色素はRf=0.25、妨害物質はRf=0.40であった。カラムクロマトグラフィーではこの差を利用して両者を分別することは不可能であったが、TLCでは容易に肉眼で検出し、分離して抽出することができた。また、この方法を茶のCPMCの分析に応用した。茶はポリフェノール化合物を多量に含み、クロマトグラフィーを応用しない場合多量の妨害物質が生成したが、アルミナTLCによりこれらの妨害物質を除去することができた。なお、CPMCの茶からの回収率は0.1ppm添加で70%であった。

以上の結果、本法はCPMCの残留分析をはじめ安定なアゾ色素を形成するカーバメイト系殺虫剤に応用することができる。検出限界は試料100gを用いた場合0.03

ppm以下であった。

3. 要 約

CPMCの残留分析法としてCPMCを加水分解して生じるOCPを水蒸気蒸留により分離した後、*p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートと反応させて生じるアゾ色素をアルミナ乾式TLCで精製して試料由来の妨害物を除去する方法を開発した。ジアゾカップリング反応によりOCPから生じるアゾ色素は本実験条件ではアルミナTLC上でRf=0.25、510nmに極大吸収があった。一方、玄米や茶に由来する妨害物質由来の色素はRf=0.40で極大吸収は520~530nmにあった。検出限界は0.03ppm、回収率は0.1~0.2ppm添加で80±10%であった。

第2節 カーバメイト系殺虫剤の蛍光光度法による分析法の開発¹⁸²⁾

分光光度法は測定に要する時間が短く、単一の測定成分を数多く分析する場合は熱安定性を改善するために誘導体を形成しなければならぬGCに優っている。しかし、採取できる試料量が少ない場合には検出感度が十分でない場合がある。このため、分光光度法でより感度の優っている蛍光光度法¹⁸³⁻¹⁸⁵⁾について検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試 薬

n-ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、メタノール、アセトニトリル：試薬特級品を蒸留した。

無水硫酸ナトリウム、1-ナフトール：試薬特級

Carbaryl標準品：carbaryl工業用原体をアセトンから繰り返し再結晶させた。m.p. 139-140°C。

シリカゲルTLC板：メルクHF₂₅₄、20cm×20cm、厚さ0.5mm

1.2 器具および装置

紫外線照射器：波長254nm

蛍光光度計：日立203型分光蛍光光度計

1.3 分析操作

試料10g（鯉の稚魚を用いた）に細切した濾紙を少量とジクロロメタン50mlを加え、ホモジナイザーで1分間高速で攪拌抽出した。抽出液を濾過し、濾紙上の残留物を再びジクロロメタンで抽出し、この操作をさらに2回繰り返した。濾過したジクロロメタン抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、40℃以下で減圧濃縮し、送風して乾固させた。フラスコ内の残留物をヘキサン10mlに溶かして小型の分液漏斗に移し、この分液漏斗にアセトニトリル10mlを加えて振とう抽出した。この操作をさらに2回繰り返して、アセトニトリル層を合わせて、40℃以下で減圧下で約2mlまで濃縮した。濃縮液をTLC板に帯状に添付し、ヘキサン-酢酸エチル（3：2）混液を展開溶媒として12cm展開した。Carbarylの位置（ $R_f=0.4$ ）の検出は波長254nmの紫外線を照射して行ない、メタノールで抽出した後20mlに定容とした。

その4mlずつを2本の試験管に分取し、一方の試験管にはメタノール1mlを（A）、他方にはcarbarylメタノール溶液（1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加え（B）、十分攪拌後、励起波長265nm、蛍光波長333nmでメタノールを対照としてcarbaryl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メタノール溶液を蛍光強度100として各々の試料の蛍光強度を測定し、次式によって試料中のcarbarylの量を算出した。

$$\text{Carbaryl}(\text{ppm}) = 5(A) / \{(B) - (A)\} \cdot W$$

なお、ここでは（A）は測定試料（A）の蛍光強度を、（B）は測定試料（B）の測定試料の蛍光強度を、Wは採取した試料重量（g）を表わしている。

2. 結果および考察

Carbarylの検量線をFig. 6.2に示す。Carbarylの0～1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で直線が得られた。試料（この場合は鯉）10gを用いて消光係数を求めたところTLCによる精製を試みたにもかかわらず試料由来の妨害を受け、蛍光強度が80.3%に減衰した。

このため、検量線の全範囲に渡って消光係数を測定したところ検量線の範囲では消光係数は一定であり、検量線はcarbarylの0～1 μg の範囲で直線が得られた。このため、分析値は消光係数の補正を行なった。

試料に1ppmのcarbarylを添加して回収率を求めたところ96.8%の良好な結果を得た。

Carbarylメタノール溶液のUVスペクトルから極大吸収は280nmにあり、この外270nmおよび290nmに極大吸収がある。Carbarylの励起波長としては280nmが最適であるが、使用した光源が中圧水銀灯であったためこの波長に最も近い265nmの輝線を使用した。

Carbarylを加水分解すると1-ナフトールを生成するが、遊離の1-ナフトールのメタノール溶液での極大吸

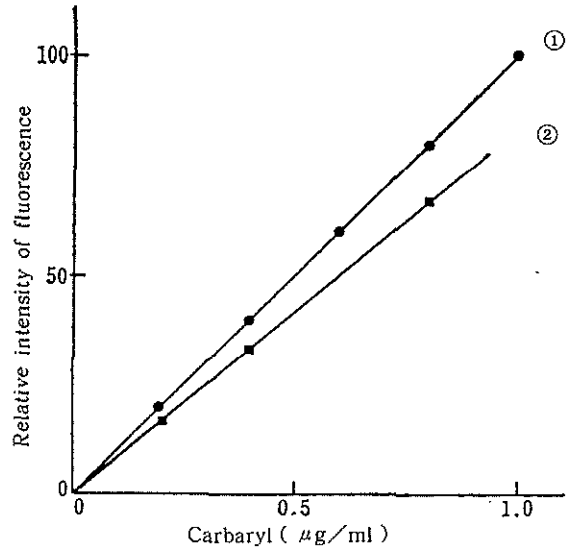


Fig. 6.2 Calibration curve of carbaryl.

Excitation wavelength: 265nm.

Emission wavelength: 333nm

①: Standard calibration curve.

②: Calibration curve compensated for the quenching factor.

収は297nmにあるがcarbarylと同じ条件で測定してもcarbarylよりも8倍感度が向上した。

光源としてキセノンランプなどの連続スペクトルを持つ光源を使用すれば最適の励起波長を選択することができる。水銀ランプの輝線スペクトルは極めて強い光源となり、多少最適波長からずれてもその分を補う程の強さがあり、文献^{185, 186}上の感度と比較してもcarbaryl 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とほぼ同じ濃度域であり、分析感度に遜色無かった。また、精製法としてシリカゲルTLCを用いることによってcarbarylと分解物である1-ナフトールを完全に分離することができた。

3. 要約

Carbarylの残留分析法として蛍光光度法を応用し、比色法と比較して10倍感度が向上した。最小検出量は最終測定溶液中のcarbaryl濃度として0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。試料に1ppm相当のcarbarylを添加した場合の回収率は96.8%であった。TLCによる精製を行なったが、蛍光の消光現象が観察されたので測定値はそれを補正した。

第3節 カーバメイト系殺虫剤のモノクロマトグラフィーによる分析法の開発^{33, 186-188)}

農薬による環境汚染に対する社会の関心が高まる中でカーバメイト系殺虫剤について有機りん系農薬や有機塩素系農薬と同程度の高感度の分析法の開発が必要となった。しかし、ppbオーダーの高感度の分析を行なうためには分光法では限界があるため、GCの応用を検討した。

カーバメイト系農薬を直接GCで測定する場合、それらの化合物の熱安定性が問題となり、測定の成功、不成功は分離カラムの性能により異なった結果を示した¹⁸⁹⁻¹⁹¹⁾。このため、カーバメイト系農薬を熱安定性がよく、しかも感度のよい誘導体に変換してGCで測定する方法が検討された¹⁹¹⁻¹⁹⁸⁾。

誘導体形成で問題となる事柄は測定対象物質と試薬との反応率、反応操作の難易度、反応精製物の安定性、反応副生成物や過剰の未反応試薬の除去の難易度、試薬の純度、試薬の入手の難易性などを挙げることができる。比較的高純度の試薬が得易く、反応試薬の精製が容易で反応操作が容易な無水モノクロロ酢酸法についてcarbarylを用いて残留分析への応用性について検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

π -ヘキサン、ジクロロメタン、ベンゼン、アセトン、メタノール：残留農薬分析用溶媒

水酸化ナトリウム、塩化アンモニウム、りん酸、硫酸セリウム、硫酸、ジエチレングリコール、1-ナフトール：試薬特級

無水モノクロロ酢酸：約50°Cに加熱したベンゼン200mlに無水モノクロロ酢酸100gを溶かし、 π -ヘキサン200~250mlを加えてよく混和した後、冷却して5°Cに保ち、無水モノクロロ酢酸の結晶を析出させた。析出した結晶をガラスフィルターで濾別し、減圧デシケーター中で溶媒を除いた。精製した試薬はデシケーター中に保存した。

反応試薬：4%無水モノクロロ酢酸ベンゼン溶液（用事調製した。）

凝固剤：塩化アンモニウム10gと85%磷酸25gを水に溶かして11とした。

酸化剤：硫酸セリウム20mgを4N硫酸20mlに溶かした（用事調製した）¹⁹⁹⁾。

発色試薬：0.05% π -ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートメタノール溶液（用事調製した。）

フロリジル：フロリジルPR（60~100メッシュ）を

130°Cで一晩以上加熱活性化した。

カラムクロマトグラフィー：内径20mm、長さ300mmのクロマトグラフィー管に活性化フロリジル10gをヘキサンを用いて湿式充填し、フロリジルの上に無水硫酸ナトリウムを1~2cmの厚さに乗せた。溶出溶媒として π -ヘキサン/ジクロロメタン（1+1, v/v）を用いた。

Carbaryl標準品：carbaryl工業用原体をアセトンに溶かし、少量の活性炭と加えて攪拌し、活性炭は濾過して除いた後、濃縮してアセトンから再結晶させた。この再結晶操作を2回以上繰り返して精製し、精製したcarbarylをシリカゲルTLCで単一スポットであることを確認し、標準品とした。m. p. 142°C

1.2 器具および装置

カラムクロマトグラフィー用ガラスカラム（内径15mm、長さ300mm）、桐山漏斗（内径95mm）、コーヒーミル、ミキサー、ホモジナイザー、分液漏斗振とう機、ロータリーエバポレーター、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ（日本電子製JGC-1100）

1.3 分析操作

GCの操作条件：カラム、3%シリコンOV-225/ガスクロームQ（80~100メッシュ）内径3mm、長さ2mガラスカラム；温度、注入口240°C、カラム恒温槽185°C、検出器275°C；キャリアーガス、N₂ 60ml/分；検出器；ECD（⁶³Ni, 15mCi）

検量線の作成：carbarylの1ppmメタノール溶液を調製し、その1, 2, 3, 4mlを100ml用のナス型フラスコに取り、各々にN/10水酸化ナトリウムメタノール溶液2mlを加え、よく混和して室温で10分間放置した。次に、ロータリーエバポレータによりメタノールを留去し、フラスコ内の残留物をN/4水酸化ナトリウム溶液25mlを加えて溶解させ、その20mlを50ml用の分液漏斗に取った。次に、反応試薬10ml加え、正確に1分間振とうした。分液後、ベンゼン層を水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。この液の一定量をマイクロシリンジで取りガスクロマトグラフに注入して得られたピークの面積を測定し、検量線を作成した。

分析操作：均質化した試料50gを500mlのトールピーカーに取り、メタノール200mlを加えてホモジナイザーを用い5分間高速で攪拌抽出した。抽出液を桐山漏斗を用いて濾過し、濾紙上の残留物を集め、元のピーカーに戻し、メタノール200mlを加えて上記の操作を繰り返した。濾紙上の残留物を少量のメタノールで洗浄し、濾液と洗液を合わせて40°C以下で減圧濃縮してメタノールを留去した。

（油脂含有量の多い試料の場合は次の操作を行なった。

フラスコ内の残留物を20mlのヘキサンを用いて50mlの分液漏斗に移し、アセトニトリル20mlを加えて1分間振とうした。分液後アセトニトリル層を分取した。この操作をさらに2回繰り返して、アセトニトリル層を分取し、アセトニトリル層を40℃で減圧下で約5mlまで濃縮し、さらに空気流中でアセトニトリルを留去した。以下、凝固操作を行なった。なお、この操作で使用したヘキサンとアセトニトリルは予め互いに飽和させた。）

予め、10%塩化アンモニウム溶液100mlの入っている300mlの分液漏斗に少量のメタノールを用いて濃縮液を移した。次に、50mlのジクロロメタンを分液漏斗に移し、3分間振とうした。ジクロロメタン層を200mlのナス型フラスコに移し、さらに2回、50mlずつのジクロロメタンで抽出し、ジクロロメタン抽出液を合わせて40℃以下で5～10mlに濃縮した後、空気気流中で乾固させた。フラスコ内の残留物を10mlのアセトンに溶解させ、さらに凝固剤100mlを加え、よく混和した後、室温で30分間放置した。この混合物を濾過し、濾紙上の残留物を少量の10%のアセトン水溶液で洗浄した。

(なお、1-ナフトールを除去する必要がある場合には凝固操作の後上記の濾液に酸化剤20mlを加えてよく混和し、室温で15分間放置後、濾過した。フラスコ内および濾紙上の残留物を少量の10%アセトン水溶液で洗浄した。)

濾液と洗液を合わせてジクロロメタン50mlを加えて3分間振とう抽出した。さらに、2回抽出操作を繰り返して、ジクロロメタン抽出液を集めた。ジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ジクロロメタン溶液を40℃以下で5～10mlまで濃縮し、空気気流中で乾固させた。フラスコ内の残留物をクロマトグラフィー用溶媒に溶解させカラムクロマトグラフィーを行なった。溶出液の最初の80mlを捨て、次の120mlを採取して40℃以下で5～10mlまで濃縮して空気気流中で乾固させた後、フラスコ内の残留物を5mlのメタノールに溶かし、N/10水酸化ナトリウム・メタノール溶液2mlを加え、室温で10分間放置した。以下検量線作成と同様の操作を行なった。

2. 結果および考察

2.1 モノクロロ酢酸の精製

Fig. 6.3にモノクロロアセチル化の試薬空試験のガスクロマトグラムを示した。市販の試薬ではcarbarylの位置に妨害ピークがあるので必ず反応試薬を精製しなければならなかった。

2.2 モノクロロアセチル化の条件

Carbarylの加水分解物である1-ナフトールのモノアセチル化反応に対する無水モノクロロ酢酸と水酸化ナトリウムの濃度の影響を検討した。無水モノクロロ酢酸ベ

ンゼン溶液10ml、水酸化ナトリウム溶液20ml、振とう時間1分間で実験を行なった。その結果をFig. 6.4に示した。

水酸化ナトリウム溶液の濃度がN/8、N/4区では無水モノクロロ酢酸ベンゼン溶液の濃度がそれぞれ2%、4%の時ピーク面積が最大となった。この時の水酸化ナトリウムの量と無水モノクロロ酢酸の量がほぼ等量であった。

振とう時間のピーク面積に及ぼす影響について検討した。水酸化ナトリウムの濃度をN/4、モノクロロ酢酸の濃度を4%とし、振とう時間は30秒から16分間の間のピーク面積を測定した。その結果をFig. 6.5に示した。振とう時間は短いほどピーク面積は広い結果を得た。

2.3 ガスクロマトグラフィーの操作条件

シリコンOV-1、OV-17、OV-210、OV-225、シリコンSE-30を3～5%の割合にクロモソルブWAWまたはガスクロームQに塗布したカラムを用いて液相の検討した。概して、極性のカラムの方がピーク形状が良好であった。ガスクロマトグラフィーの操作条件はそれぞれのクロマトグラムの脚注に記載した。

2.4 抽出溶媒の検討

圃場でcarbarylを散布して栽培したレタス、キュウリ、トマトを用いて抽出溶媒の検討を行なった。その結果をTable 6.5に示した。抽出溶媒としてはメタノール、アセトン、アセトニトリルおよびジクロロメタンについて検討した。抽出効率はメタノールが最も優れていたが抽出溶媒間に大差はなかった。ただし、ジクロロメタンを用いると濾過に長時間を要した。

2.5 精製操作

分析操作を短縮するために凝固法による精製のみで分析を行なったところモノクロロアセチル化反応が著しく妨害された。このため、凝固法の後にはジクロロメタン転溶と稀アルカリ溶液による洗浄を行なったところ回収率が改善された(Table 6.6)。しかし、試料によっては必ずしもエステル化反応が安定しないこと(回収率が70%以下であったことおよび繰り返し実験の回収率の幅が20%以上あったこと)があったのでカラムクロマトグラフィーによる精製法を採用した。

しかし、フロリジルカラムクロマトグラフィーでは試料から抽出された1-ナフトールを除去できない(アルカリ洗浄操作を採用すれば除去は可能)の硫酸セリウムによってフェノール類を酸化し、1-ナフトールの量を千分の一以下に減少させることができた。その様子をFig. 6.6 A および B に示した。

2.6 回収率試験

分析操作の過程で稀アルカリ洗浄を行なった場合とフロ

リジルカラムクロマトグラフィーを応用した場合の回収率試験の結果を Table 6.7 に示した。いずれの方法も良好な結果を得た。Fig. 6.7 に添加回収率試験に用いた無処理区の試料のクロマトグラムを示した。

2.7 洗浄の効果

約千倍に希釈した中性洗剤を用いてトマトとキュウリを洗浄し、洗浄による carbaryl の除去の効果を試験した。その結果を Table 6.8 に示した。

2.8 GC と比色法の比較

GC と比色法とによる分析結果を Table 6.9 に示した。同一の精製法を行ない、最終のメタノール溶液を分割して両方の分析に供した。GC は本法を、比色法は *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートを用いてアルカリ溶液中で発色させ、波長580nm で比色定量した。比色法の方がやや高い分析値を示した。

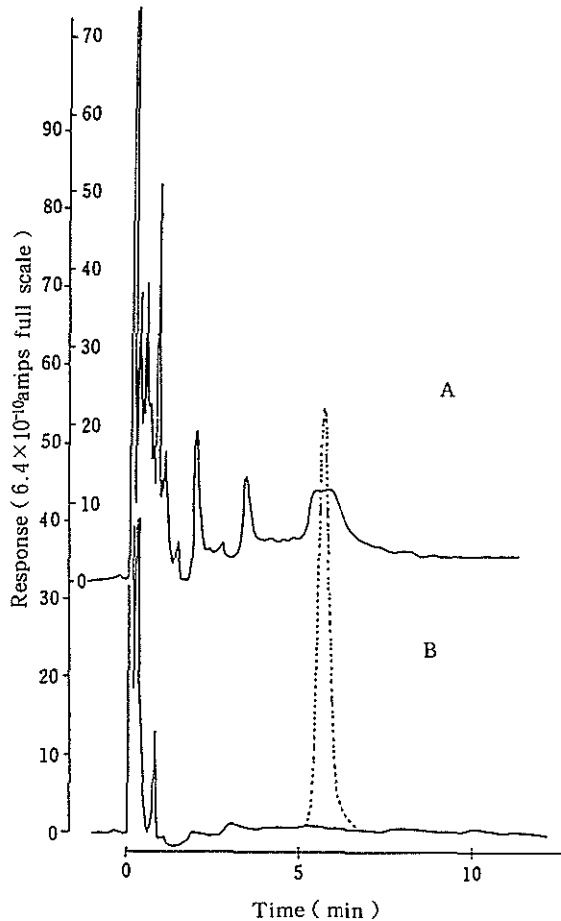


Fig. 6.3 Gas chromatograms of reagent blanks

A : Un-purified chloroacetic anhydride.

B : Purified chloroacetyl anhydride by recrystallization.

The peak of the derivatives from 2.3ng carbaryl (broken lines) is superimposed on the chromatogram of the purified and un-purified reagent blanks.

Operating conditions : column, 5% silicon OV-210/Chromosorb W AW (60-80mesh), 4 ml.D. × 2 m; temperature, injection 230°C, column 180°C, detector 270°C; carrier gas, N₂, 60ml/min; detector, ECD (⁶³Ni, 15mCi)

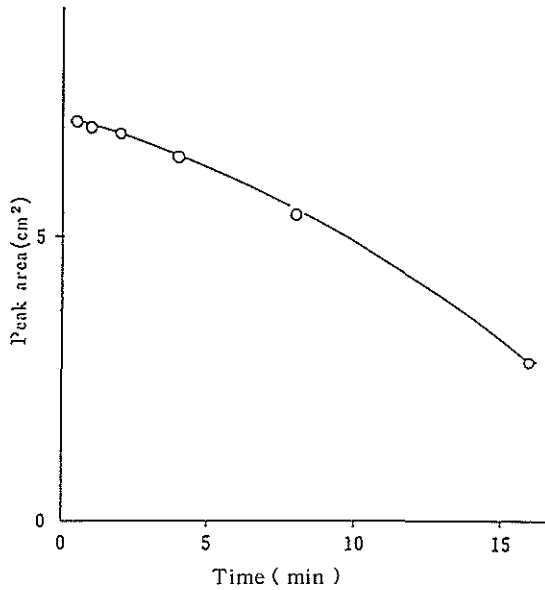


Fig. 6.4 Effect of the mixing time on the formation of chloroacetyl derivatives

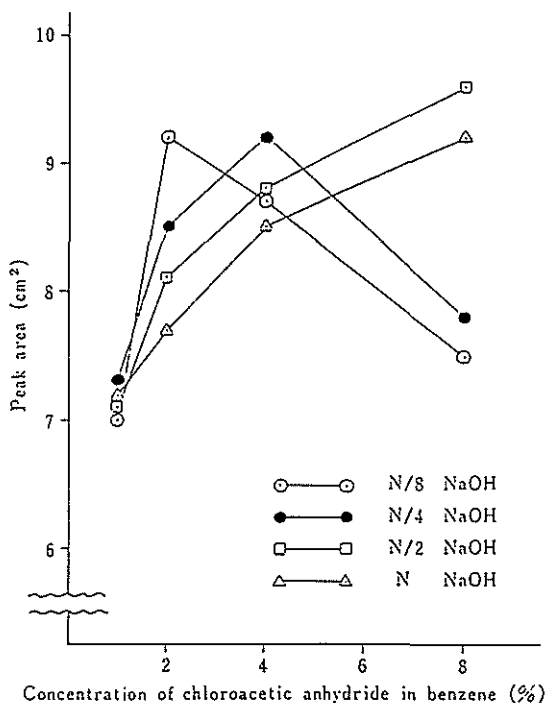


Fig. 6.5 Effect of normality of NaOH solution and concentration of monochloroacetic anhydride on the chloroacetylation reaction

2.9 考 察

(1) 誘導化法の選択

カーバメイト系農薬は一般に熱安定性が良くないためガスクロマトグラフィーで分析するためにはガスクロマトグラフの分離カラムなどの活性点を無くするように慎重にカラムを作成するか、または適切な誘導体に変えて測定する必要がある。

カーバメイトの誘導化法には①カーバメイトになんらかの化学基を付加する方法および②カーバメイトを加水分解して生じるフェノール化合物またはアミンを誘導体化する方法がある。誘導化を行なうにあたっては試薬の安定性、純度、取扱の容易さ、安価であること、反応条件が簡易なこと、反応が安定していること、未反応試薬や副反応物の除去が容易であること、誘導体が安定であること、ガスクロマトグラフィーの感度が改善され、誘導体のガスクロマトグラム上の保持時間が短すぎたり、長すぎたりしないこと、試料由来の妨害物と重ならないことなどを考慮しなければならない。

モノクロロアセチル化法は試薬の入手が容易であり、貯蔵性がよく、精製が容易であり、反応の直線性が優れており、検量線は carbaryl 0.5~300 μg の範囲で直線が得られ、感度も向上した（最小検出量は carbaryl として 10pg）。

反応は carbaryl をアルカリで加水分解して生じた 1-ナフトール塩の水溶液と無水モノクロロ酢酸のベンゼン溶液と 1 分間振とうするだけで反応し、目的の誘導体はベンゼン層へ、過剰の試薬は分解されて水層へ移行するため反応生成物をカラムクロマトグラフィーなどで精製する必要はなかった。誘導体の保持時間はシリコン OV-210 または OV-225 の 2 m のカラムで約 6 分間であった。

トリフルオロアセチル化法では無水トリフルオロ酢酸の毒性を考慮して反応操作はドラフト中でゴム手袋を着用する必要がある。一方、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンを用いる方法は試薬中の混在物の妨害を受け易いなどの問題がある。ECD-GC の感度はいずれもほとんど同じで最小検出量は 10pg であった¹⁹³⁻¹⁹⁸。カラム温度はトリアセチル化法では 100℃ から 130℃^{193, 194}、2, 4-ジニトロベンゼン誘導体法は 230℃ から 250℃^{197, 198} であり、本法では 150℃ から 190℃ の範囲で操作することができた。

誘導化反応条件について水酸化ナトリウムと無水モノクロロ酢酸の濃度の関係を調査し、両者が等量の時誘導体の生成量は最大となった。無水モノクロロ酢酸の量はカーバメイト系農薬から生じたフェノール化合物に対して大過剰であるので未反応の無水モノクロロ酢酸や反応

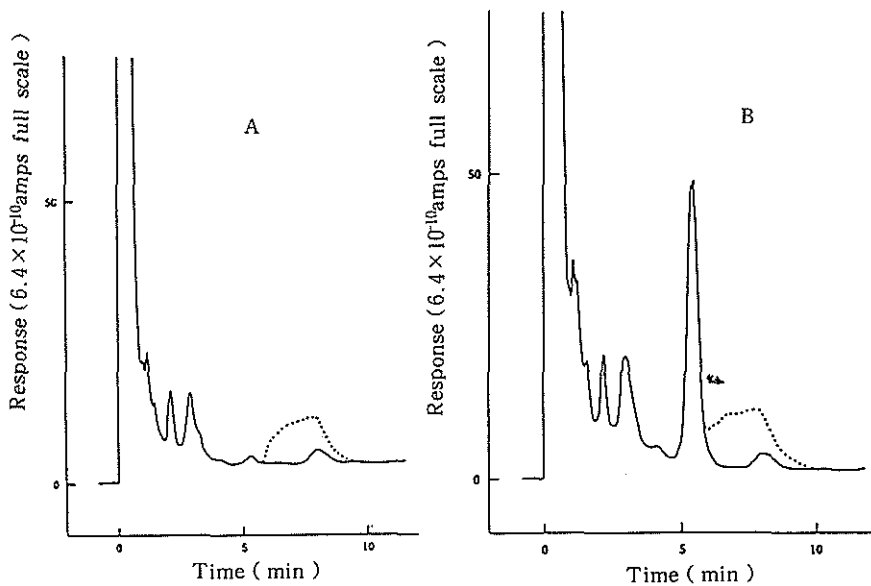


Fig. 6.6 Gas chromatograms obtained from cucumber samples (50 g each) fortified with 500 μ g of 1-naphthol (A) and with 5 μ g of carbaryl and 500 μ g of 1-naphthol (B)

Interfering peaks (broken lines) were given by the oxidizing products from 1-naphthol with ceric sulfate. They disappeared after removal of the oxidized products by filtration.

Operating conditions: column, 3% silicon OV-225/Gas Chrom Q (80-100 mesh), 3mm I.D. \times 2 m; temperature, injection 240°C, column 180°C, detector 275°C; carrier gas, N_2 , 60 ml/min; detector, ECD (^{63}Ni , 15mCi)

物のモノクロロ酢酸がベンゼン中に残存するとガスクロマトグラムの障害物となるので、実用的にはアルカリの量が酸無水物の等量よりわずかに過剰とする法がよい結果が得られた。しかし、アルカリがわずかに過剰であるので振とう時間が長くなるといった副生成したエステルが再び分解されるので好ましくなかった。

(2) 抽出溶媒の検討

残留農薬を測定するにあたって、いかに高感度の分析方法も最初の試料からの農薬の抽出効率が不良であれば意味が無い。試料から抽出溶媒への残留農薬の転溶が最大でなければならず、精製工程における損失を最小限にし、さらに再現性のあるものでなければならない。通常、抽出方法は振とうまたはホモジナイザーによる方法がよく用いられる。ソックスレー法は熱を加えること、長時

間を要することから残留分析では最近では使用されなくなった。

抽出効率は放射性同位元素で標識した農薬を圃場で実際に散布して得た試料を用いると便利ではあるが、我国では野外での放射性同位元素の使用は法律上困難である。

従って、次善の方法として通常の農薬を散布した試料を用いて、種々の溶媒を用いて一定の方法で抽出効率を求めた。現在ではほとんど全ての農薬について極性の溶媒が無極性の溶媒よりも抽出効率がよいことが判明しているが、残留分析が開始された初期の頃は農薬の溶媒への溶解度のみを考慮していたため、*n*-ヘキサンやベンゼン等が使用された^{26,27}。カーバメイト系殺虫剤では、我国の carbaryl の公定分析法がそうであるようにジクロロメタンが多用された²⁶。著者は carbaryl の残留分析

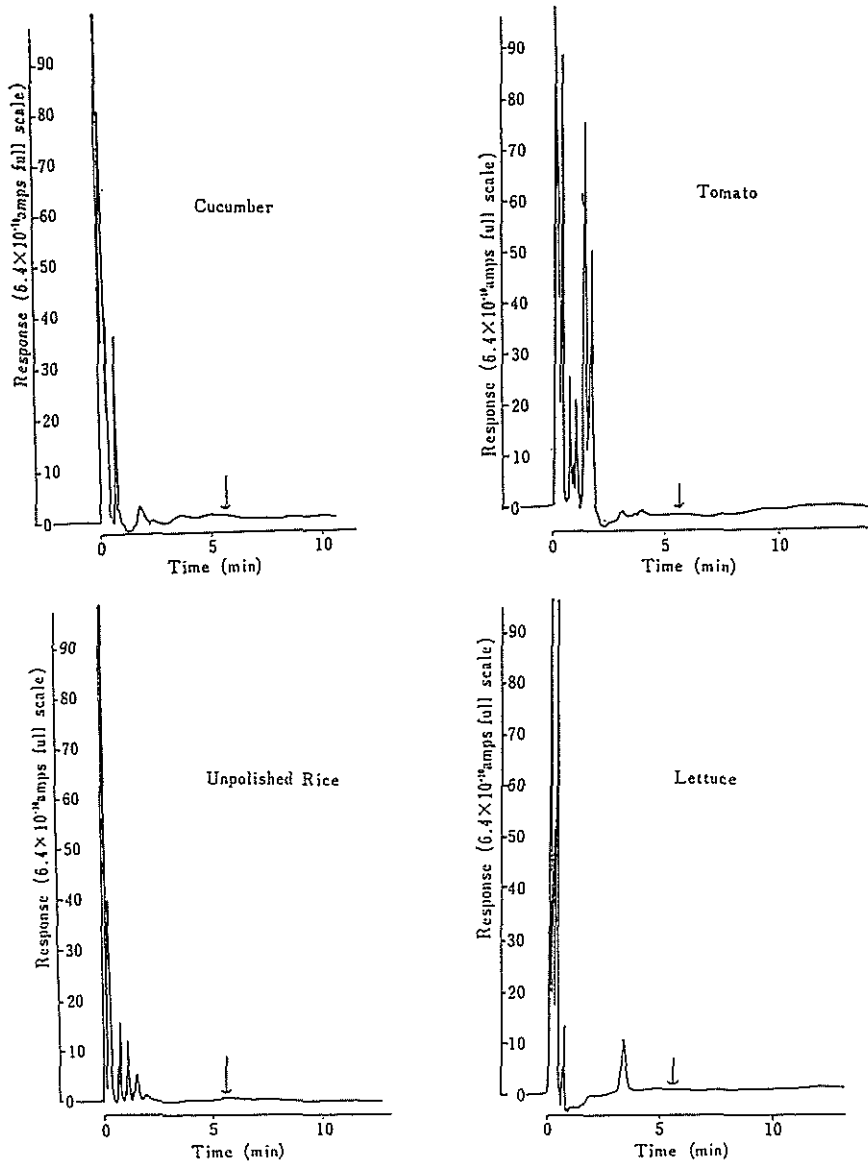


Fig. 6.7 Gas chromatograms obtained from blank samples. The arrows show the points at which the peak of the chloroactyl derivative from carbaryl will appear. Extract from 50 g of samples contained no interfering substances in the determination of carbaryl. Operating conditions were same as Fig. 6.3.

法の検討するに当たり抽出溶媒としてメタノール、アセトン、アセトニトリル、ジクロロメタンについて抽出効率を測定した。その結果、4 溶媒とも抽出効率に大きな差はみられなかったが、加藤らは玄米中の carbaryl 抽出効率を測定し、振とう抽出では含水アセトン>アセトン>ジクロロメタンの順であったが、ソックスレー抽出では三者がほぼ同じ値を示したことを報告した¹⁵⁾。

本節では著者はホモジナイゼーを用いて5分間高速で攪拌抽出により4 溶媒の抽出効率の比較を行なったが、4 者間に差はみられなかった。ジクロロメタンは水と混和しないので抽出後の濾過操作が困難であった。アセトンは葉緑素などの色素類をよく溶解させることから抽出溶媒としては都合が悪い。このため、メタノールまたはアセトニトリルが適しているが、溶媒の価格の面でははるかにメタノールが安価であるのでメタノールを採用した。

(3) 精製法の検討

精製法を簡略化するために凝固法を用いたが、凝固法は色素の除去は優れていたが、アセチル化反応の収率が十分でなかった。このため、アルカリ洗浄とフロリジルカラムクロマトグラフィーを検討した。いずれの方法も十分な精製効果があったが、フロリジルカラムクロマトグラフィーの方が回収率が安定していたので精製法として凝固法-フロリジルカラムクロマトグラフィーを採用した。

なお、硫酸セリウムによる遊離のナフトールの除去は高い効果があったが、carbaryl の植物中における代謝^{20)・20)}では遊離のナフトールはほとんど生成しないため

ニタリング調査ではこの操作は不要であると考えられる。

以上の結果から、carbaryl の残留分析法としてはメタノール抽出-ジクロロメタン転溶-(脱脂操作)-凝固操作-フロリジルカラムクロマトグラフィー-アルカリ加水分解-モノクロアセチル化反応-GC の操作手順が最も良好な結果を得られるものと考えられる。

3. 要 約

Carbaryl の残留分析法についてキュウリ、トマト、レタスおよび玄米を用いて抽出溶媒、精製法、モノクロアセチル誘導化の反応条件およびガスクロマトグラフィーの操作条件について検討した。

抽出溶媒としてはメタノールが最も抽出効率が優れていた。精製法としては液-液分配、凝固法、酸化法およびフロリジルカラムクロマトグラフィーを併用することで優れた精製効果を得ることができた。ガスクロマトグラフィーのカラム充填剤として3%シリコンOV-225が最もピーク形状が優れていた。

添加回収試験の結果は次の通りであった。キュウリは0.1ppm添加で84.5%、トマトは0.06および0.1ppm添加でそれぞれ84.7%、84.0%、レタスは0.1および0.2ppm添加でそれぞれ76.0%、88.5%、玄米は0.1および0.2ppm添加でそれぞれ76.0%、83%であった。

中性洗剤を用いた洗浄による carbaryl の残留減少効果はキュウリで10~20%、またトマトで60~80%であった。

比色法とガスクロマトグラフィーの分析値を比較した結果、比色法が約10%高い値を示した。

Table 6.5 Selection of the solvent for extraction.

(ppm)

Crop \ Solvent	Methanol	Acetone	Aceto-nitrile	Dichloro methane
Lettuce	20.9	22.7	21.0	24.3
Cucumber - 1	0.088	0.076	0.071	0.077
- 2	0.663	0.624	0.576	0.602
Tomato	0.471	0.303	0.413	0.314

Table 6.6 Effect of interfering materials in sample (=cucumber) on the chloroacetyl derivatization of 1-naphthol.

	Sample weight (g)	Carbaryl added (μ g)	Carbaryl found (μ g)	Recovery (%)
A	100	21.0	9.2	44
	100	21.0	10.0	48
B	100	21.0	18.2	87
	100	21.0	21.4	102

A : not cleaned up with alkali washing.

B : cleaned up with alkali washing.

Table 6.7 Recovery of carbaryl obtained from fortified samples.

Crop	Sample weight (g)	Carbaryl added (μ g)	Carbaryl found (μ g)	Recovery (%)
Tomato	100	6.0	4.3	72
		10.5	9.6	91
		12.0	9.0	74
Column chromatography	50	3.0	2.6	87
		5.0	4.2	84
Cucumber	100	10.5	7.3	70
		21.0	19.8	94
Column chromatography	100	10.0	8.4	84
Lettuce	100	5.2	4.4	81
		10.5	8.5	81
		21.0	19.4	92
Column chromatography	100	10.0	7.6	76
		20.0	17.7	88
Unpolished rice	100	10.5	8.0	77
		21.0	17.4	83
Rinsings	800 ml	50.0	44.7	89
Column chromatography		50.0	46.4	93

Table 6.9 Comparison of the analytical results of GC and colorimetry.

Crop	Gas chromatography	Colorimetry ^{28-31,180)}
Lettuce	21.0ppm average 20.7ppm	20.9ppm 23.8ppm average 22.8ppm

Table 6.8 Removal tests of carbaryl by washing samples with a diluted detergent.

Crop	Application time	Days after the last application	Sample for washing		Amount of carbaryl (μg)			Removal of carbaryl(%)= [(B) / { (A) + (B) }] $\times 100$
			Sample weight (g)	Number of samples	Found in sample after washing(A)	Found in rinsings (B)	(A) + (B)	
Cucumber	1	1	960	8	2630	705	3335	21.2
		3	980	9	457	305	762	40.0
		7	930	7	54	9	63	13.7
	3	1	1260	12	3503	652	4155	15.7
		3	1060	10	1166	111	1277	8.7
		7	1010	7	114	13	127	10.3
Tomato	1	1	1760	7	459	738	1197	61.6
		5	1929	7	328	707	1035	68.3
	3	1	1720	7	812	1381	2193	63.0
		5	1830	6	292	1095	1387	78.9

第4節 カーバメイト系殺虫剤の高速液体クロマトグラフィーによる分析法の開発^{202,203)}

カーバメイト系農薬の相互の分離手段としてはシリカゲル TLC²⁰⁴⁻²⁰⁶⁾およびフロリジル¹⁰⁴⁾あるいはアルミナ¹⁹²⁾吸着クロマトグラフィーなどが広く用いられてきた。しかし、我国で使用されているカーバメイト殺虫剤は phenyl methylcarbamate が多く、化学構造が類似しているために相互の分離が困難であった。最新の高性能液体クロマトグラフィーはカラム充填剤の粒度分布が狭く再現性の良好なカラム充填剤が開発された。開発の初期は30~40 μm の充填剤が中心であったが、最近では粒径が5 μm の充填剤が使用可能となった。このことにより、従前は分離が不可能であった類縁化合物の分離性能は格段に向上した。本節では液体クロマトグラフィーの新しい技術の農薬の分析への応用について、熱安定性が悪くGCでの直接分析が困難であり、従前分光光度法が利用されてきたカーバメイト系殺虫剤の高速液体クロマ

トグラフィーによる分析法を検討した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

カーバメイト殺虫剤: CPMC, MIPC, MPMC, MTMC, PHC, XMC (各農薬の化学式はAPPENDIXに記載した。)

n -ヘキサン, ジクロロメタン, クロロホルム, アセトン, メタノール: 残留農薬分析用溶媒

無水硫酸ナトリウム, 塩化ナトリウム: 試薬特級

分析用カラム: Micropak CH および NH₂ (内径 2.2 mm, 長さ250mm)

1.2 器具および装置

分光光度計 (島津 UV-200), 高速液体クロマトグラフ (Varian Model 4200, 8500 および Shimadzu-DuPont Model 830), 検出器 (UV, 254nm)

1.3 実験方法

カーバメイトをメタノールおよびジクロロメタンに溶かしてその5~10 μl を注入し、高速液体クロマトグラフィーの操作条件を検討した。

2. 結果および考察

カーバメイト系殺虫剤のUV検出器に対する感度を検討するために、メタノール溶液中におけるUV吸収スペクトルを観察した (Fig. 6.8 A~G)。カーバメイト系殺虫剤は200~220nmの短波長域に強い吸収を持つ。一方、260~280nmにもやや弱い極大吸収を示した。

カーバメイト系殺虫剤の短波長領域におけるモル吸光係数は数千に達する (MPMC $\lambda_{max}=210\text{nm}$ $\epsilon=8200$, MTMC $\lambda_{max}=210\text{nm}$ $\epsilon=7300$, MIPC $\lambda_{max}=218\text{nm}$ $\epsilon=1900$)。一方、260~280nmにおけるモル吸光係数は数百である。

高速液体クロマトグラフィーの分離カラムとして通常の分配クロマトグラフィー用と逆相分配クロマトグラフィー用の2種のカラムを用いた。

カーバメイトは極めて類似した化学構造を持つため相互分離は従前困難であった (唯一、ポリアミド TLCのみが可能であった²⁰⁷) が、Micropak CH カラムを用いて6種のカーバメイト系殺虫剤のピークが認められる程度の分離を行なうことができた (Fig. 6, 9 A, B)。MTMCとXMC (またはMPMC) は3-methyl-と3, 5-dimethyl- (または3, 4-dimethyl-) は良好な分離を示した。さらに、PHCとMIPCは側鎖が2-isopropoxy-と2-isopropyl-との相違であるが分離することができた。しかし、XMCとMPMCは3, 5-dimethyl-と3, 4-dimethyl-の相違は分離することはできなかった。

一方、Micropak NH₂ カラムは逆相カラムと異なった分離を示した (Fig. 6.10 A, B)。MIPC (2-isopropyl-) とXMC (3, 5-dimethyl-) およびMPMC (3, 4-dimethyl-) とMTMC (3-methyl-) は分離することができなかったが、MPMCとXMC (3, 4-dimethyl-と3, 5-dimethyl) は完全に分離した。

逆相カラムは固定相のC₁₈ (octadecyl基) と移動相の水-メタノール混液との間の液-液間の分配率の差が分離状況を支配していると考えられており、NH₂カラムの場合は単なる移動相と固定相間の分配率だけではなく、固定相のpropylamineとカーバメイト系殺虫剤のカルバモイル基の酸素原子との間の水素結合がクロマトグラムに影響を与えているものと考えられる。この現象は、ポリアミド TLCを用いてカーバメイト系殺虫剤を分離した結果と類似していた²⁰⁷)。

カーバメイト系殺虫剤の検出感度について検討した。260~280nmの領域では254nmよりは高い感度を得られるものの、波長可変型の検出器はキセノンランプまたは重水素放電管を用いているので発光スペクトルは連続で

あるが各波長における光量は水銀ランプの輝線に比べてはるかに少ないためノイズが発生し易く、感度を上げることが難しい。

Fig. 6.11にXMCを用いた254nmにおける検出例を示した。検出感度は0.01AUFSで300ngのXMCはフルスケールの40%のピークを得た。XMCは $\lambda_{max}=262$, $\epsilon=220$ の吸光度を有し、 $\lambda=254\text{nm}$ における $\epsilon=170$ とカーバメイト系殺虫剤の中では最も感度の低い化合物である。製剤分析では十分な検出感度ではあるが残留分析ではこの10倍程度の感度の向上が必要である。この点について第1章第1節においてcarbarylを用いた検討結果を述べた。Carbarylは強い紫外吸収を示し ($\lambda_{max}=223\text{nm}$ $\epsilon=78000$, $\lambda_{max}=281\text{nm}$ $\epsilon=6300$)、他のカーバメイト系殺虫剤より高感度分析が可能であった。しかし、200~220nmの波長領域を残留分析のために利用するためには高度の精製が必要であった。

2.2 考察

カーバメイト系殺虫剤は化学構造が類似しているため、そのUV吸収スペクトルは類似しており、200~220nm付近に強い吸収帯が、260~280nmに弱い吸収帯がある。高速液体クロマトグラフィーでの感度の向上のためには

- (1) 高感度のUV検出器の利用: 0.001 AUFS程度の感度
- (2) 200~220nmの測定波長の利用-精製法の工夫
- (3) カーバメイト系殺虫剤に適当な化学処理を行なう-蛍光標識

などの工夫が必要である。

(1)については現在水銀ランプの輝線を利用した254nmの波長固定の検出器以外では困難である。(2)については第1章第1節で述べたようにcarbarylの残留分析に高速液体クロマトグラフィーを応用し、精製法を工夫することによって200~220nmの測定波長を使用することができた。(3)についてはpre-column法とpost-column法がある。pre-column法は測定の前に蛍光誘導体を形成させるため、誘導体化反応に伴ういろいろな制約がある。反応率、形成した誘導体の安定性、過剰の反応試薬や副反応物の妨害の有無などに配慮しなければならない。post-column法は特別な反応装置を必要とするもののカラムから流出の頃に反応が行なわれるので得られるクロマトグラムは試料の特性を反映している。しかし、post-column法はアルカリ加水分解を伴うために移動相は水系に制限される。カーバメイト系殺虫剤のような化学構造が類似した化合物群の場合の分離は逆相分配クロマトグラフィーのみでは不十分であるなど検討すべき課題が多い。

一方、カーバメイト系殺虫剤の残留分析では、我国で

は現在のところ親化合物のみが測定対象とされているが、動植物における代謝の研究が進み、代謝物をも含めて測定対象とする方向に残留農薬の規制が進みつつある。代謝物は親化合物に比べて一般に極性が強いためにそのままではGCでの分析が困難な場合が多い。このような場合、HPLCは強力な分析手段となる。また、代謝物一つひとつの誘導化試薬との反応率や誘導体の安定性の問題を避けるためにもできるだけ化学修飾をしないで測定する方が都合が好ましい。このため、200~220nmの短波長域を利用できる分析法の開発が必要である(このことについては第1章第1節で述べた)。

3. 要 約

熱安定性の悪いカーバメイト系殺虫剤の分離分析に高速液体クロマトグラフィーを応用した。カーバメイト系殺虫剤の相互分離はODS系カラムとNH₂カラムを用いることで達成できた。本法の検出感度はUV254nmでは10ng程度であったので感度の向上のためには検出器の測定波長として200~220nmの領域を使用できるように工夫する必要があった。なお、製剤分析のためには十分な感度であった。

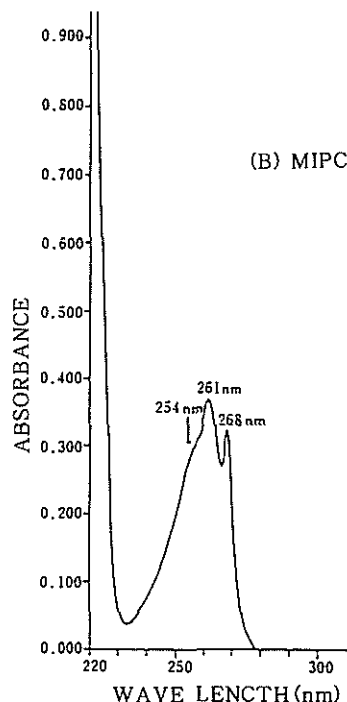
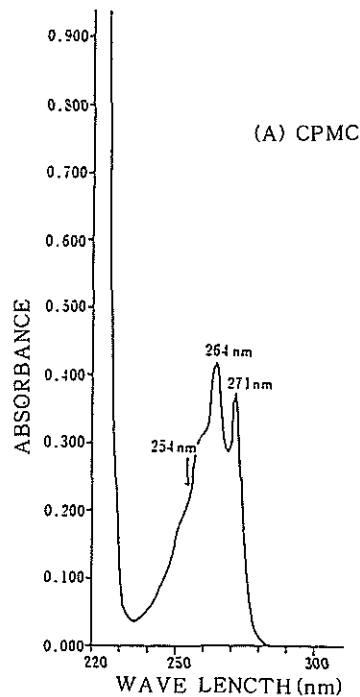
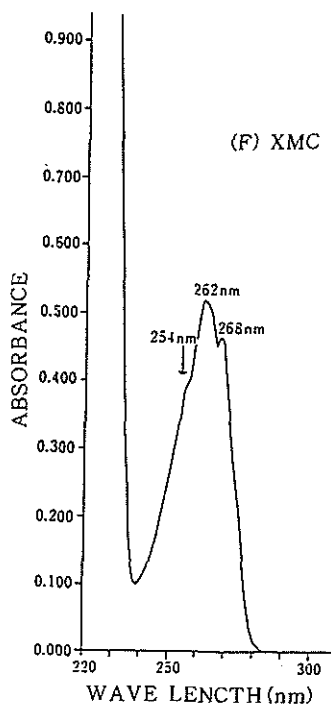
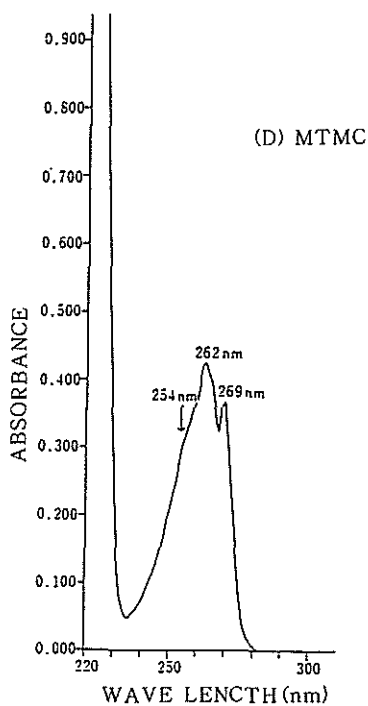
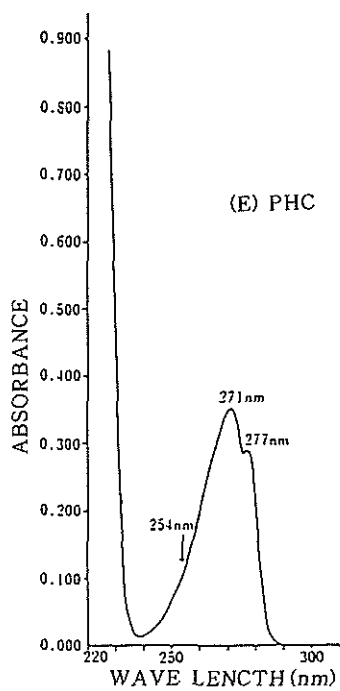
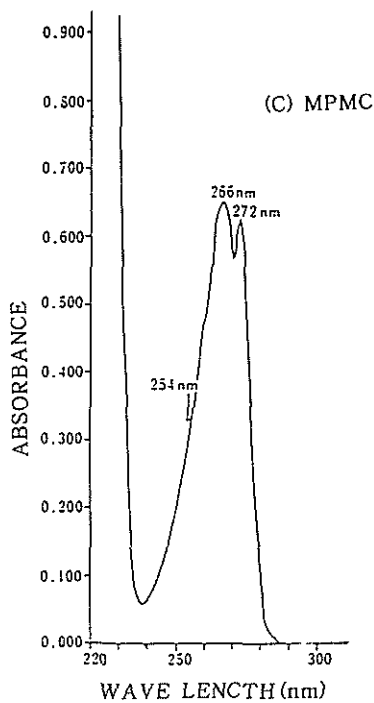


Fig. 6.8 Ultra violet spectra of six carbamate insecticides in methanol

- (A): CPMC 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- (B): MIPC 206 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- (C): MPMC 208 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- (D): MTMC 206 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- (E): PHC 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- (F): XMC 408 $\mu\text{g}/\text{ml}$



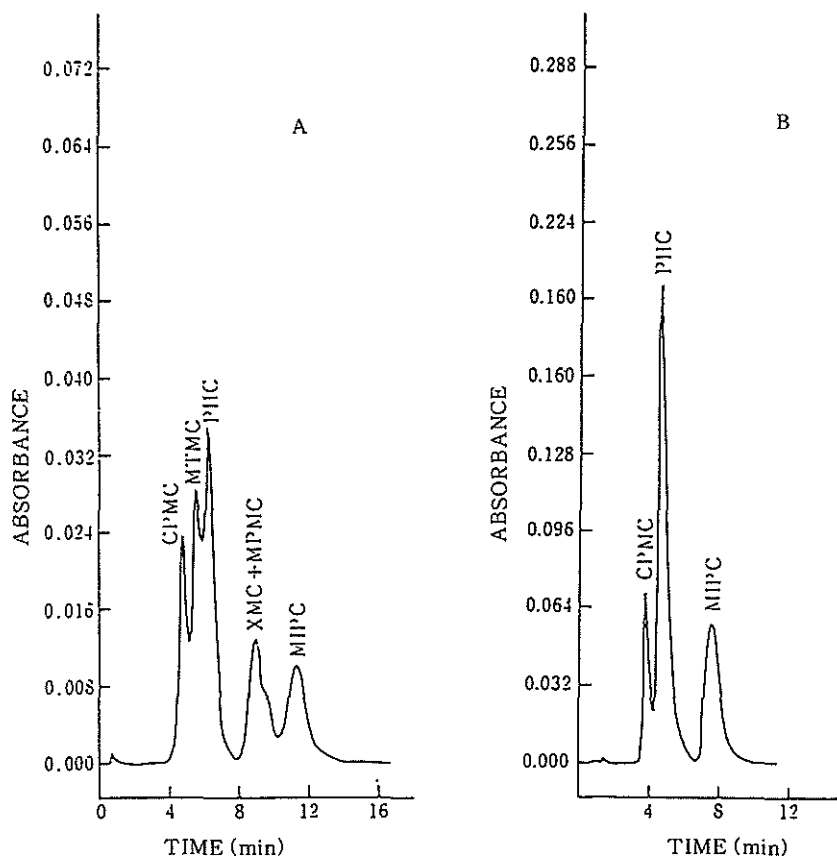


Fig. 6. 9 Chromatograms of a mixture of carbamate insecticides.
 Column : Micropak CH (10 μ m), 2.2mm I. D. \times 25cm, Flow rate : 30ml/hr.
 Temperature : ambient. Detector : UV 254nm
 A : mobile phase, water/methanol=52/48.
 B : mobile phase, water/methanol=44/56 ;

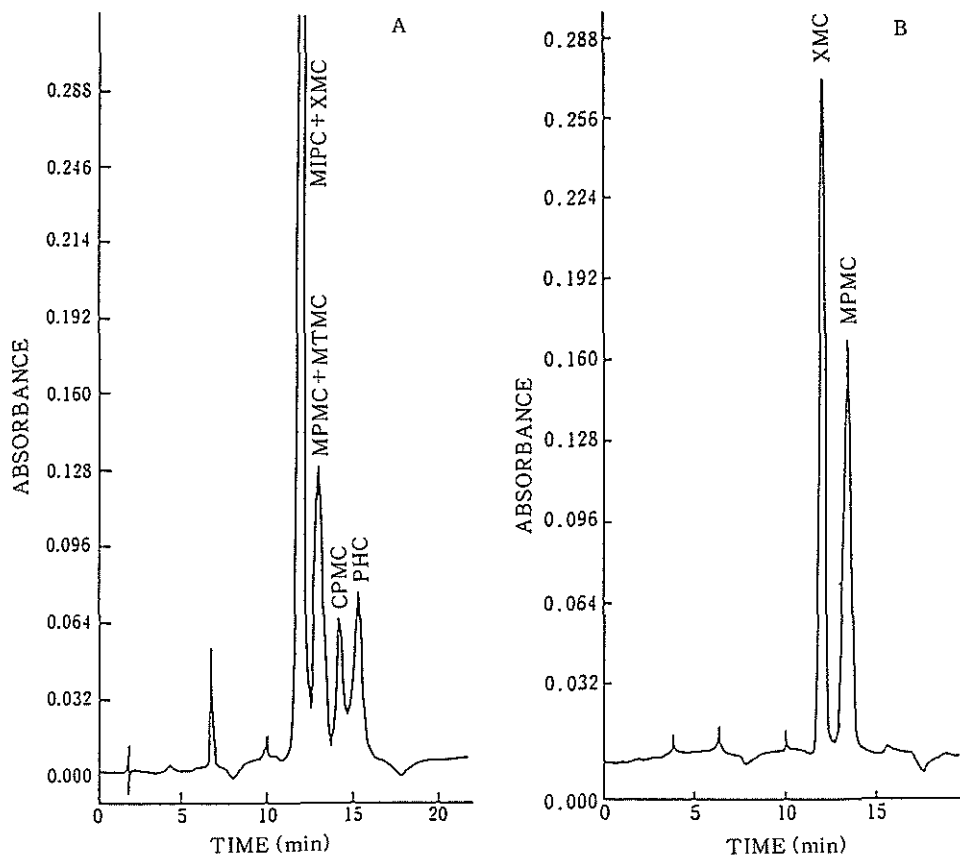


Fig. 6.10 Chromatograms of a mixture of carbamate insecticides.
 Column : Micropak NH_2 ($10\mu\text{m}$), $2.2\text{mm I.D.} \times 25\text{cm}$. Mobile phase :
 linear gradient, initial, *n*-hexane/dichloromethane=95/5, slope,
 1%/min. Flow rate : 30ml/min . Temperature : ambient. Detector : UV
 254nm

A : mixture of MIPC, XMC, MPMC, MTMC, CPMC and PHC

B : mixture of XMC and MPMC

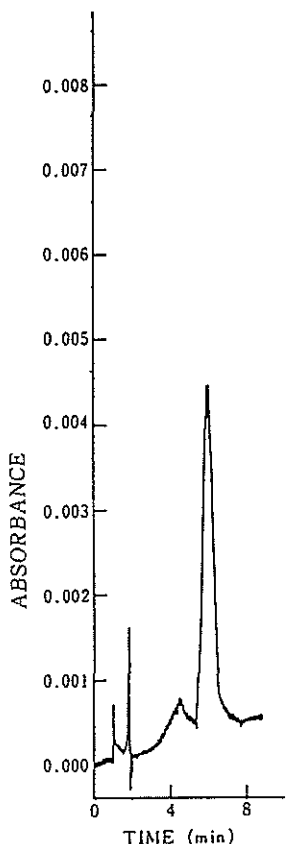


Fig. 6. 11 Chromatogram of 300ng of MPMC.
Detector sensitivity: 0.01 AUFS at 254nm.
Other conditions are same as Fig. 6. 8 B.

第5節 カーバメイト系殺虫剤のポリアミド薄層クロマトグラフィーによる定性分析法²⁰⁷⁾

前節までに述べたようにカーバメイト系殺虫剤の残留分析法としてはシリカゲルTLCあるいはフロリジルカムクロマトグラフィー(CC)を用いて精製し、比色法、蛍光光度法等の分光光度法、ガスクロマトグラフィー(GC)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)など種々の測定法を検討してきた。

今日、GCやHPLCが分析の主流となり、定性分析もGCやHPLCの保持時間で行なわれるようになった。さらに、残留分析の感度が向上するにつれて、簡易な定性分析がますます困難となった。

残留分析が微量となるにつれて、測定しているものが確実に目的としたものであるかどうかの確認が困難とな

り、思わぬ錯誤を犯すことがあり得る。我国で使用されているカーバメイト殺虫剤はフェノール残基を持つ化合物が多いことおよびポリアミドがフェノール化合物をよく分離すること²⁰⁸⁾からポリアミドTLCを用いて簡易でかつ感度のよい定性分析法を開発した。

1. 実験材料および方法

1.1 試薬

カーバメイト系農薬: carbaryl, CPMC, MTMC, PHC, XMC, MIPC, BPMC (各農薬の化学式はAPPENDIXに記載した。)

フェノール化合物: 1-naphthol, *o*-chlorophenol, *m*-tolol, *o*-isopropylphenol, 3, 5-xyleneol, *o*-isopropoxyphenol, *o*-sec-butylphenol

TLC用ポリアミド: 和光純薬製(B-0)

発色試薬: 0.05% *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレート・アセトン溶液

加水分解用アルカリ: 0.5N 水酸化カリウムメタノール溶液

溶媒: 石油エーテル, *n*-ヘキサン, 四塩化炭素, クロロフォルム, 酢酸エチル, ジオキサン, エチルエーテル, アセトン, エタノール, メタノール, 酢酸

1.2 実験方法

TLC用ポリアミド12gを共栓付き三角フラスコに取り、メタノール60mlを加え、よく混和し、ガラス板に広げて厚さ0.25mm、20cm×20cmの薄層板5枚を調製し、風乾した後80°Cで10分間加熱乾燥させた。

TLC板にカーバメイト系殺虫剤およびフェノール化合物のジクロロメタン溶液をマイクロシリンジで添付し、12cm展開した。風乾後、0.5N水酸化カリウムメタノール溶液を噴霧し、室温で30分間放置後発色試薬を噴霧して発色させた。

2. 結果

2.1 カーバメイト系殺虫剤とその構成フェノール化合物の分離

7種のカーバメイト系殺虫剤とその構成フェノール化合物について、各種の展開溶媒を用いてその分離状況を観察した(Table 6. 11)。

各展開溶媒とも酢酸またはエタノールを一定量以上含まないとカーバメイト系殺虫剤およびフェノール化合物ともにバンドのまとまりが悪くなり、テーリングを引き起こした。

強極性溶媒として、酢酸を用いた展開溶媒ではカーバメイト系殺虫剤とフェノール化合物の分離が不十分であったが、エタノールを用いた展開溶媒ではカーバメイトとフェノールの分離が改善された。PHCのみは他の6種と異なった挙動を示し、むしろ酢酸を用いた方がフェ

ノール化合物との分離が改善された。

2.2 カーバメイト系殺虫剤の色調と検出限界

7種のカーバメイト系殺虫剤のポリアミドTLC板上の色調と肉眼による検出限界を求めた (Table 6.12)。色調だけでは定性は不可能であるが、Rf値と組み合わせることで定性が可能であった。

CPMCは最も鋭敏で鮮紅色を呈し、検出限界は50ng/スポットであった。XMCは最も検出感度が鈍く最小検出量は800ng/スポットであった。

ポリアミドTLCの二次元展開を行なうことでカーバメイト相互を分離でき、Rf値と色調と組み合わせると十分に定性分析が可能であった (Fig. 6.12)。

さらに、トマト、キュウリ、レタスおよび玄米について carbaryl の定性試験を行なった。

試料100gに0.25、0.5および1.0ppmの濃度に carbaryl

を添加し、ジクロロメタンで抽出し、凝固法によって精製し、ジクロロメタンへ転溶し、稀アルカリ水溶液で洗浄した後、ジクロロメタン溶液を1mlまで濃縮し、その10~40 μ lをポリアミドTLC板に添付し、展開後、発色操作を行なった。

0.25ppm添加区で10 μ lの添加で carbaryl の青色を確認することができた。

2.3 考 察

カーバメイト系殺虫剤は有機りん系殺虫剤と並んで広く使用されるようになり、残留基準は0.2~1ppmの範囲で設定されている。散布歴が不明な試料を分析するに当たっては分析の能率と正確さを向上させるため予め分析対象化合物について見当をつける必要がある。さらに、定量分析における測定結果の確認のため化合物の同定を行なうことが必要である。

Table 6.11 Rf values of carbamate insecticides and their corresponding phenols on polyamide TLC plates using different solvent systems.

Upper line/lower line = carbamate/phenol.

A : carbaryl / 1-naphthol. B : CPMC / *o*-chlorophenol.

C : MTMC / *m*-toluol. D : PHC / *o*-isopropoxyphenol.

E : XMC / 3,5-xyleneol. F : MIPC / *o*-isopropylphenol.

G : BPMC / *o*-*sec*-butylphenol.

Solvent		Rf value						
		A	B	C	D	E	F	G
<i>n</i> -Hexane	85	0.36	0.44	0.42	0.48	0.67	0.55	0.87
Ethanol	7	0.35	0.44	0.36	0.93	0.50	0.52	0.83
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	85	0.23	0.28	0.40	0.45	0.49	0.52	—
Ethanol	5	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	10							
<i>n</i> -Hexane	80	0.54	0.65	0.76	0.80	0.88	0.93	—
Ethanol	10	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	10							
<i>n</i> -Hexane	85	0.48	0.51	0.57	0.61	0.68	0.68	0.84
Ethyl ether	7	0.48	0.56	0.47	0.96	0.58	0.72	0.86
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	88	0.42	0.46	0.55	0.58	0.65	0.78	0.78
Dioxane	4	0.40	0.52	0.55	0.58	0.65	0.78	0.78
Acetic acid	8							

<i>n</i> -Hexane	96	★	★	★	★	★	★	★
Dioxane	2	★	★	★	★	★	★	★
Acetic acid	2							
<i>n</i> -Hexane	82	0.64	0.87	0.92	0.92	0.87	0.95	—
Dioxane	8	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	10							
<i>n</i> -Hexane	82	0.79	0.74	0.94	0.98	0.97	0.98	1.00
Chloroform	10	0.38	0.67	0.60	0.98	0.66	0.91	0.95
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	80	0.46	0.65	0.83	0.90	0.85	0.90	—
Chloroform	15	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	5							
<i>n</i> -Hexane	86	0.83	0.88	0.92	0.96	0.97	0.98	0.99
Chloroform	6	0.62	0.84	0.76	1.00	0.86	0.92	0.92
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	90	0.73	0.84	0.93	0.96	0.97	0.98	0.98
Chloroform	2	0.60	0.85	0.79	0.98	0.86	0.97	0.98
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	90	0.50	0.52	0.62	0.72	0.74	0.78	0.92
Ethyl acetate	2	0.39	0.58	0.48	0.97	0.53	0.86	0.80
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	88	0.66	0.67	0.78	0.89	0.80	0.83	0.94
Ethyl acetate	4	0.55	0.70	0.65	0.98	0.69	0.88	0.96
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	85	0.52	0.58	0.63	0.78	0.68	0.70	0.91
Acetone	7	0.48	0.63	0.52	0.78	0.60	0.70	0.96
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	86	0.53	0.58	0.64	0.78	0.67	0.69	0.91
Acetone	6	0.48	0.63	0.52	0.98	0.60	0.69	0.96
Acetic acid	8							
<i>n</i> -Hexane	92	0.25	0.32	0.43	0.47	0.57	0.65	0.77
Acetic acid	8	—	—	—	—	—	—	—

<i>n</i> -Hexane	90	0.28	0.38	0.50	0.54	0.58	0.67	—
Acetic acid	10	0.32	0.70	0.44	0.98	0.62	0.79	0.88
Carbon tetra- chloride	97	★	★	★	★	★	★	★
Ethyl acetate	3	★	★	★	★	★	★	★
Carbon tetra- chloride	97	0.80	0.87	0.92	0.95	0.95	0.96	0.96
Ethanol	3	0.27	0.55	0.38	0.98	0.55	0.75	0.83
Carbon tetra- chloride	95	0.88	0.92	0.94	0.98	0.98	0.97	0.98
Ethanol	5	0.48	0.65	0.61	0.98	0.75	0.88	0.94
Carbon tetra- chloride	50	0.96	0.38	0.88	0.92	0.92	0.92	0.97
<i>n</i> -Hexane	10	0.23	0.55	0.34	0.98	0.49	0.72	0.81
Ethanol	2							
Carbon tetra- chloride	50	0.73	0.83	0.88	0.93	0.92	0.92	0.97
<i>n</i> -Hexane	15	0.25	0.52	0.34	0.98	0.49	0.72	0.82
Ethanol	2							
Carbon tetra- chloride	50	0.78	0.87	0.93	0.97	0.97	0.97	0.98
<i>n</i> -Hexane	20	0.31	0.61	0.42	0.98	0.58	0.84	0.91
Ethanol	2							
Carbon tetra- chloride	10	0.63	0.77	0.88	0.92	0.94	0.94	0.96
<i>n</i> -Hexane	50	0.48	0.66	0.67	0.98	0.82	0.92	0.96
Ethanol	5							
Carbon tetra- chloride	40	※	※	※	※	※	※	※
<i>n</i> -Hexane	20	※	※	※	※	※	※	※
Acetic acid	4							
Carbon tetra- chloride	50	※	※	※	※	※	※	※
<i>n</i> -Hexane	15	※	※	※	※	※	※	※
Acetone	2							

Carbon tetra- chloride	50	※	※	※	※	※	※	※
n- Hexane	15	※	※	※	※	※	※	※
Dioxane	2							
Petroleum								
ether	40	0.41	0.54	0.65	0.65	0.63	0.67	—
Ethyl acetate	1	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	3							

★ : Tailing. ※ : Rf=1.00

Table 6. 12 Spot colors and detection limits of carbamate insecticides on a polyamide TLC plate.

Carbamte	Colour	Detection limit (ng)
Carbaryl	blue	100
C P M C	scarlet	50
M T M C	red brown	400
P H C	purple	—
X M C	red purple	800
M I P C	purple	400
B P M C	purple	—

カーバメイト系殺虫剤は定量分析で広く使用されているシリカゲルTLCあるいはフロリジルCCでは相互の分離はほとんど不可能である。また、測定を分光光度法で行うと、吸収スペクトルは類似しているので分別することは不可能である。GC法で定性するためには定量法と同程度の精製を必要とする。

このため、できるだけ簡易な方法としてポリアミドTLC-アルカリ加水分解-ジアゾカップリング反応を応用した。ポリアミドはフェノール化合物とその誘導体に対して特異的に作用する。このクロマトグラフィーはフェノール化合物の水酸基の水素原子とポリアミドのカルボニル基の酸素原子との間の水素結合によるものである。カーバメイト系殺虫剤はカルバモイル基の水素原子とポ

リアミドのカルボニル基の酸素原子が吸着に関与しているものと思われる。ポリアミドはフェノール化合物を相当するカーバメイト系殺虫剤よりも強く吸着するために、一般に、カーバメイト系殺虫剤の方が相当するフェノール化合物よりも大きいRf値を示した。

3. 要 約

ポリアミドTLCを用いて7種のカーバメイト系殺虫剤およびその構成フェノール化合物の相互分離を検討し、カーバメイト系殺虫剤をアルカリで加水分解した後ジアゾカップリング反応により呈色させて検出する方法を確立した。定性試験の最小検出量はスポット当たりC P M C 50ng, carbaryl 100ng, M T M CおよびM I P C 400ng, X M C 800ngであった。

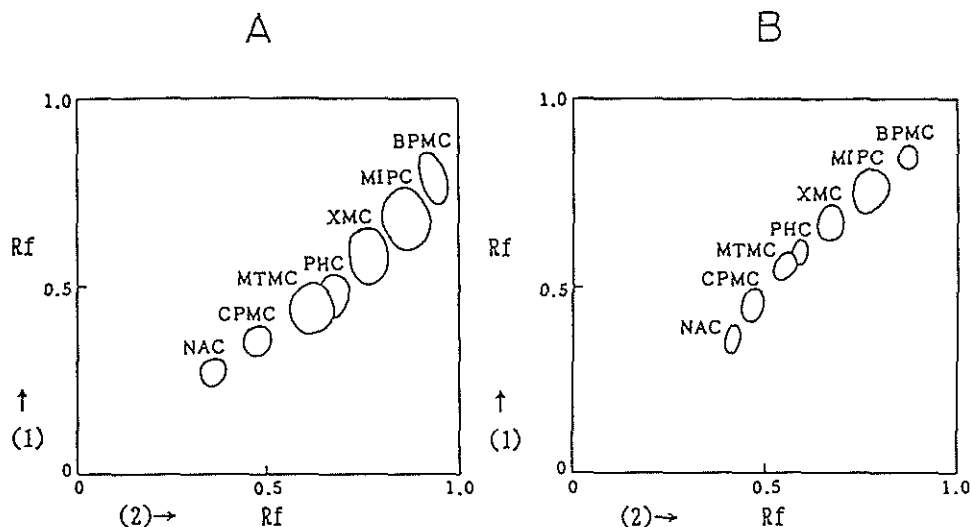


Fig. 6.12 Two-dimensional chromatograms of seven carbamate insecticides on a polyamide TLC plate.

Chromatogram A was obtained by developing with (1) hexane-acetic acid (86 : 6 : 8) followed by (2) hexane-ethyl acetate-acetic acid (90 : 2 : 8) at right angles. Chromatogram B was obtained by developing with (1) hexane-dioxane-acetic acid (88 : 4 : 8) followed by (2) hexane-ethanol-ethanol-acetic acid (85 : 7 : 8) at right angles. Carbamate insecticides were detected by spraying with 0.5N KOH followed by standing for 30 min and spraying with 0.05% *p*-nitrobenzene-diazonium fluoroborate acetone solution to produce red-purple color spots on a polyamide TLC plate.

第6節 摘要

我国では昭和34年 carbaryl がカーバメイト系殺虫剤として初めて登録されて以来昭和39年 PHC, 40年 CPMC と次々に新しいカーバメイト系殺虫剤が実用化されてきた。

当時、残効性の長い有機塩素系農薬が広範に使用され、それらの農薬の環境への影響について社会の関心が高まる中で代替農薬の実用化が急がれた。そのため、有機りん系農薬とカーバメイト系農薬の重要性が増し、使用量が増加するにつれて両農薬の農作物や環境への影響が懸念された。

有機りん系農薬は逸早く GC による微量分析が開発され、感度および操作性ともに他の測定法に比べても優れていた。有機塩素系農薬および有機りん系農薬は代謝物を含めて、GC によってほとんどの場合分離カラムの中で変化することなく溶出し、その化学的性質は農薬相互に異なり、また試料由来のきょう雑物とも異なることから GC の条件を選択することで数多くの農薬とそれらの

代謝物を分離分析することができた。

しかし、カーバメイト系殺虫剤は従来使用してきた GC の条件下では熱分解を起して分析に支障があった。抽出効率が優れていても精製法が優れていてもカーバメイト系殺虫剤は GC 内で分解することから安定した分析法の検討が必要であった。さらに、有機塩素剤の ECD、有機りん系農薬の FPD のような高感度または特異的な検出器がないために種々の分析法の開発を検討した。

まず、比色法は、操作は簡便であり、感度は $\mu\text{g}/10\text{ml}$ 検液のオーダーではあるが残留基準値の大きさ (0.2~1 ppm) からみて十分な感度である。しかし、発色試薬の *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートに陽性を示す物質が試料中に含まれているためにこれらの妨害物質をアルミナ TLC を用いて分離する必要があった。さらに、カーバメイト系殺虫剤の構成フェノールに由来するアゾ色素の吸光スペクトルは極めて類似しており、アルカリ性溶液中ではおおむね 510~520nm (carbaryl のみは 580~590nm) に極大吸収を持つ。このため、精製操作によってカーバメイト系殺虫剤を相互に分離する

必要があるため生成したアゾ色素をアルミナTLCによって精製する手法を開発し、カーバメイト系殺虫剤を散布した米および茶についてこの分析法を適用した。

比色法では試料量が100g程度を必要とするので少量の試料を分析するにはさらに感度を向上させる必要があった。このため、TLCで精製して蛍光光度法で測定する分析法を検討した。蛍光光度法は最終測定溶液中の carbaryl 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を検出可能であった。淡水魚(鯉)体内の carbarylの残留分析をこの方法で行なった。試料量を10gまで少なくすることができた。本法の場合、試料由来の妨害物により蛍光の消光現象が起こることがあるためTLCなどによる精製操作が不可欠である。また、直接強い蛍光を発生する農薬は carbarylのみであり、他のカーバメイト系殺虫剤は感度の向上のため蛍光標識を必要とする。

農作物中の残留農薬のみならず環境中の河川水あるいは土壌などの試料を分析するためにはさらに高感度の分析法の開発が必要となりモノクロロアセチル化誘導体法によるGC分析法を開発した。本法の検出感度は carbarylで0.01ng、誘導化反応の直線性は 10^3 の幅があり、反応時間はわずかに1分で完了し、同種の他の誘導化法に比べて感度、操作性ともに優れている。本法についてレタ

ス、トマト、キュウリおよび米について本法によって分析した。本法の検出限界は試料100g、最終液量10mlの場合0.002ppmとなった。現在、この感度を上回る分析法はまだ開発されていない。

高速液体クロマトグラフィーは誘導体の形成を必要とせず直接カーバメイト系殺虫剤を測定することができる。カーバメイト系殺虫剤は200~220nmに $10^3 \sim 10^4$ のオーダー、260~280nmに 10^2 のオーダーの吸光度を持つ。254nmにおける吸光度は 10^2 のオーダーと弱く、製剤分析への応用は可能であるが、第1章第1節で述べたように、残留分析では200~220nmの領域を用いる必要があり、その場合高度の精製操作が必要である。さらに、carbaryl(最小検出量 5ng以下)以外のカーバメイト系殺虫剤(最小検出量 約30ng)感度を向上させるためには蛍光標識が必要である。

これらの4つの分析法の性能の比較をTable 6.13に示した。総合的な評価は、装置の普及度を含めてGC法が最も優れていると思われる。

カーバメイト系殺虫剤の試料からの抽出溶媒について検討したところ抽出効率はメタノールが最も良好であった。精製法として液-液分配、凝固法、水蒸気蒸留、TLC並びに吸着、ゲルおよび分配クロマトグラフィーを

Table 6.13 Comparison of the four analytical methods for carbamate insecticide residues in efficiency.

	Colorimetry	Fluorometry	GC	HPLC
Sensitivity ^a	○ (0.03ppm)	◎ (0.005ppm)	◎ (0.002ppm)	× (0.1ppm)
Accuracy	○	○	○	○
Separation ^b	○	○	◎	◎
Rapidity ^c	△	◎	○	◎
Cost	◎	◎	◎	◎
Adaptability	◎	△	◎	◎

◎: Excellent. ○: Good. △: Moderate. ×: Poor.

a: Based on a 100-g sample in 10ml of final solution.

b: Mutual separation of carbamate insecticides by each method.

c: Time taken for analysis of one sample.

組み合わせて測定法に見合った精製法を検討した。広い範囲の試料に適用できる精製法としては次のような方法が推奨できる。

(1) 野菜および果物などの油脂の含有量が少ない試料の場合：メタノール抽出-ジクロロメタン転溶-凝固法-フロリジルカラムクロマトグラフィー

(2) 玄米および大豆などの油脂の含有量が多い試料の場合：試料に等量の水を加える-メタノール抽出-ジクロロメタン転溶-n-ヘキサン・アセトニトリル分配-凝固法-フロリジルカラムクロマトグラフィー

(3) 全ての試料に適用できる方法：メタノール抽出-ジクロロメタン転溶-ゲルクロマトグラフィー（ECDを使用する場合はフロリジルカラムクロマトグラフィーが必要）

以上の定量分析法の他にカーバメイト系殺虫剤の定性分析法としてポリアミドTLC-アルカリ加水分解-p-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートによる発色による方法を開発した。検出限界は最も感度の良いCPMCで50ng, 最も鈍感なXMCで800ngであった。

総合考察および汎用多成分分析法の提案

近代農業にとって農薬は重要な生産資材である。農薬がなくして農業の生産性の安定を図ることは難しい。しかし、農薬は農作物の生育に悪影響をもたらす病害虫や雑草を防除するために用いる生理活性物質であるためその使用に当たり人畜および環境に対する危害の発生を未然に防止する対策を講ずる必要がある。我国の農薬に関する規制は昭和23年の農薬取締法の制定にさかのぼることができる。この制度は幾多の改正を経て昭和46年の改正により現在の残留農薬の安全性の評価体制ができあがった。

今日、我が国では新たに農薬が登録される場合慢性毒性試験成績など多くの毒性試験成績に基づきその農薬の一日許容摂取量（Acceptable Daily Intake, ADI, mg/kg body weight）が算出される。その農薬が使用される農作物について農薬の使用方法に従って農薬を使用した場合の農薬の残留性を調査し、各作物の食品としての一日当りの摂取量と残留実態からその農薬の一日当りの摂取量を算出し、その値がAD Iに人の体重を乗じた値を超えないように残留基準が設定される。

農薬の残留基準の設定とともに残留分析法が定められているので現在我が国内で食用作物に登録されている農薬については全て残留農薬の調査を行なうことができる。残留農薬の調査のための分析法にはその精度などに一定の目安があり、検出感度は0.05ppm以下、添加回収試験の回収率は70%以上、測定結果の変動係数は10%以内でなければならないなどとされている²⁰⁾。

1990年4月現在、農薬の残留基準は農薬取締法に基づき229農薬が、食品衛生法に基づき26農薬について定められている。

ある作物を栽培する場合その作物に発生する病害虫は複数あり、通常それらを防除する為にはそれぞれ適した農薬が登録されている²¹⁾。また、同一の病害虫に対しては複数の農薬が登録されているためどの農薬を使用するかは栽培者の選択に任されている。各農薬にはそれぞれ使用方法が定められているためその使用方法を遵守する限り収穫物の残留農薬が残留基準を超過することはない。しかし、今日食品中の残留農薬に対する消費者の関心は極めて高く、残留農薬に対し不安を抱いている消費者も多い。市場に出荷された農産物は、見ただけでは残留農薬について何等の情報を得ることはできない。残留農薬に対する不安を払拭するためには、食品中の残留農薬のモニタリングを行ない、消費者に食品中の残留農薬のレベルに不安がないことを保障することが重要である。

残留農薬のモニタリングは農薬の使用歴の不明な多種類の農作物を対象にしなければならない。しかし、現在設定されている残留分析法はこのような多様な条件に対応できない。このため、本論文では残留農薬のモニタリングの為の分析法の開発を目指した。

第1章では残留農薬の分析で最も重要な部分である精製過程の汎用化を目指して分取液体クロマトグラフィーの導入を検討した。残留分析法を組み立てる場合、測定対象の農薬の物理化学性を考慮してまず測定方法を決定する。現在、測定方法はガスクロマトグラフィー（GC）または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の利用が一般的である。これらの測定器が利用できるように精製法を工夫し、最後に抽出方法を検討した後、各過程の成績をフィードバックして各過程を修正して分析法を組み立てる。最後に添加回収試験により分析法全体を評価する。従来の分析法ではシリカゲル、アルミナあるいはフロリジルなどの無機の吸着剤を用いたカラムクロマトグラフィーが用いられてきたが、これらの吸着剤はロット間や製造会社間の活性の変動が大きく、記載された分析条件を使用しようとする吸着剤ごとに検討しなければならない。さらに、1回の分析ごとに吸着剤を更新しなければならず、複数の農薬を同時に精製するためには溶出溶媒の選択に高度の技術的知識と経験が必要とした。また、多くの試料の処理にはかなりの時間を要した。このことが残留農薬のモニタリングの実施の障害になっており、精製操作から名人芸的な技術を排除することが必要である。このため、残留分析で最も重要な過程である精製操作に繰り返し使用が可能な2種類の分取液体クロマトグラフィーの導入を検討した。その一つがゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）である。GPCのゲルはポリスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂および酢酸ビニル樹脂を用いた。GPCはゲル粒子が損傷を受けない限り安定したクロマトグラムを得ることができた。さらに、GPCは分子ふるい効果により化合物を分離するために試料由来の脂肪分や葉緑素あるいはタンニンなどの比較的大きな分子を効率よく分離することができた。しかし、GPCは比較的小分子の妨害物の除去ができないために有機りん系農薬やカーバメイト系農薬をFTD-GCで測定する場合はアブラナ科野菜類の一部でGPCのみでは精製が十分ではない場合があった。この場合、有機りん系農薬はFPD-GCを用いるかまたはGPC溶出物をアセトンに溶かして含水フロリジルを用いて濾過すればFTD-GCでの測定が十分に可能であった。

一方、有機塩素系農薬は従来ECD-GCでなければ測定できなかった。この場合はフロリジルやシリカゲルなどの吸着クロマトグラフィーを用い、溶出溶媒の極性を調節して精製を行なったが、妨害物の除去は必ずしも十分でなかった。本論文では有機塩素系農薬をECD-GCで測定する場合はGPCの後に分配クロマトグラフィー(LPC)を使用した。また、Hall型電気伝導度検出器(HECD)を用いればGPCのみで従来のECDに匹敵する分析感度を得ることができた。

さらに、GCで測定ができない農薬には近年UVD-HPLCが適用されるようになり、この場合はGPCとLPCの2段の分取液体クロマトグラフィーにより200~220nmの短波長領域の測定を可能にする十分な精製効果を得ることができた。

GPCを自動運転が可能のように工夫した装置を用いれば24時間の連続運転が可能であり、1試料の処理時間が1時間で終了し、1日当たり20試料以上を処理することができた。従来のカラムクロマトグラフィーを用いれば1日当たりの処理数は4~6試料が限度であったことと比較すれば数倍の能率の向上を図ることができた。

第2章は従来のカラムクロマトグラフィー用の充填剤を使用して簡便かつ安価でしかも特別の器具を必要としない汎用分析法を報告した。この方法は濃縮操作を全く行わないために1試料の精製に要する時間は2時間以内であり、従来法の半分以下の時間で精製が可能であった。さらに、本法は少量の吸着剤(従来法の1/10)で十分精製できることと抽出溶媒に比較的安価なメタノールを用いているために分析経費は従来法よりも経済的であった。ミニカラムを用いる精製法は有機塩素系、有機りん系、カーバメイト系および合成ピレスロイド系などの広い範囲の農薬に適用することができた。さらに、最近のGCではカラムの出口で試料ガスを二等分して2種類の検出器(例えば、FPDとHECD)に導入すれば同時に有機りん系および有機塩素系農薬を分析することができる。ただ、本分析法はジメトエートのような水溶性の高い化合物には適用できない欠点があった。しかし、この分析法はその他の大半の農薬に適用できるため既に数県の残留分析担当者の方々による追試が実施されており、簡便性、経済性および再現性において良好な結果を得た。

第3章は農薬の重要な構成分子であるフェノール化合物およびアニリン化合物について電気化学検出器の特異性を利用してナノグラムのレベルの分析法を開発した。農薬およびその分解代謝物には加水分解によりフェノール化合物またはアニリン化合物を生成するものが多く、それらを水蒸気蒸留により固形物と分離した後、ポリスチレン樹脂または溶媒抽出により濃縮し、LCECD-HPLC

で測定した。従来法ではフェノール化合物やアニリン化合物はエステルあるいは酸アミドなどの熱安定性の良好な誘導体に変えてECD-GCで測定されたが、ECDを用いるために高度の精製操作が必要であった。LCECD-HPLCでは誘導体の形成を必要としないため分析操作が極めて簡便であった。ただし、加水分解条件が農薬により異なるため一つひとつの農薬の加水分解条件を検討する必要があった。しかし、この条件さえ検討すれば本法は加水分解によりフェノール化合物またはアニリン化合物を生じる農薬の残留分析に応用することができることを示した。さらに、本法を用いれば農薬の代謝物の抱合体をも含む微量分析が可能であると考えられる。

第4章はベンズイミダゾール系殺菌剤の新しい残留分析法を開発した。ペノミルの抗菌力はMBCによると考えられており、当初の残留分析法はペノミルの加水分解物である2ABを蛍光光度法で測定する方法^{18,141)}が採用されていた。この方法は試料由来の妨害物の影響を受け易くより安定した方法が望まれていた。このため、ペノミルの加水分解をMBCまでとし、MBCをTLCで分離するとともにそのままの状態では蛍光強度を測定する方法を開発した。一方、チオファネートメチル(TM)の場合は酢酸銅と共に加熱してMBCに変換し、そのMBCを紫外吸光光度法またはHPLCにより測定されてきた。しかし、著者はTMの光分解生成物中にMBC以外にTMの硫黄原子が酸素に置き代わった酸素置換体が2種類生成することを明らかにした。このため、これらの分解物の残留実態を調査するべくこれらの分解物を含めたTMの新たな残留分析法を開発した。さらに、開発した分析法を用いてTMを散布した試料中の酸素置換体を含むTMの残留分析を行なった。圃場においてチオファネートメチル水和剤を散布したピーマンからはTMおよびMBCの残留が認められたが、酸素置換体は検出限界以下であった。このことから、現行のチオファネートメチルの残留分析法を変更する必要はないと考える。

第5章は世界的に広く使用されているピピリジウム系除草剤のHPLCによる残留分析法を開発した。これらの除草剤は、従来珪ジチオン酸ナトリウムを用いて還元し、吸光光度法で測定されてきたが、微量の場合は試料由来の妨害物の影響を受けて正確な測定が困難で測定限界は0.03~0.05ppmであった¹⁸⁾。パラコート剤は残留基準が0.05ppmであるために検出限界が分光光度法では十分でなかった。HPLCを用いた本分析法は0.0005ppmの検出限界を持ち、従来法では測定が不可能であったレベルの分析が可能となった。市販の試料について分析したが残留基準を超えるような試料はなく安全性上の問題はなかった。また、土壌が試料の場合の簡易抽出法を開発

した。この方法は従来の硫酸で煮沸することに比べ、塩化アンモニウム溶液を用いて振とうするだけでパラコート効率よく抽出することができて極めて簡便であった。さらに、本抽出法を用いて土壌中のパラコートの垂直分布を調査した。パラコートは土壌粒子に強く吸着されるために下部への浸透はないと考えられていたが、パラコートの残留は耕作土層に広く分布していた。しかし、耕作土層下の粘土層にはパラコートの浸透はみられなかったことからこの分布は主として耕起によるものと考えられる。なお、本法と公定分析法について同一試料を用いて分析値の比較を行なったところ良好な一致が得られた。

第6章はカーバメイト系殺虫剤の残留分析について分光光度法、蛍光光度法、GCおよびHPLCを用いて検討した。さらに、農薬残留基準値程度の残留レベルであれば容易に検出できる定性分析法を開発した。

従来、カーバメイト系殺虫剤の残留分析の常法であったジアゾカップリング反応を利用した比色法は試料抽出物のなかのジアゾニウム試薬に陽性の物質の影響を受けてプラス方向に偏った分析値を示すことが多かった。このため、乾式アルミナTLCを利用して陽性物質を除去する方法を開発した。検出限界はCPMCで0.03ppm/100g試料量であり、カーバメイト系殺虫剤の分析感度としては十分であったが、採取できる試料の量が少ない場合は比色法では十分な感度が得られないので蛍光光度法を検討し、比色法に比べて10倍程度感度の向上を図ることができた。

しかし、蛍光光度法は全てのカーバメイト剤に適用できるわけではないのでより汎用性の高く、環境試料などの残留量が低い試料に対しても適用できる高感度分析法を開発した。カーバメイト系殺虫剤の中で最も熱安定性の不良である carbaryl を用い、加水分解して生じる1-ナフトールをモノクロロアセチル誘導体とし、ECD-GCにより測定した。本法の最小検出量は carbaryl として0.01ngであった。現在カーバメイト系農薬の測定は分離カラムの改善によりFTD-GCが用いられるようになったが、最小検出量は carbaryl の場合0.1ngが限度であり、本法ほどの感度は得られていない。

HPLCはECD-GCまたはFTD-GCに比べて感度は劣るものの誘導化を必要としない。ただし、現在利用可能な汎用検出器はUVDのみであるため精製は十分に行なう必要があった。200-220nmの波長領域で測定すればナノグラムオーダーの検出は可能であった。しかし、そのためには第1章第1節で述べた程度の精製が必要であった。通常よく利用される254nmでは感度は数分の1となり残留分析では感度が不十分であるが、製剤分析では十分に利用可能であると考えられる。

また、ポリアミドTLC上でのカーバメイト剤の加水分解・ジアゾカップリング反応により0.05~0.8μg/スポットの量で検出が可能であり、さらに色調が異なることも定性の参考となった。

以上、現在我が国で使用されている主要な農薬をできるだけ同一の手法で測定する方法を開発するとともに分析感度の向上、操作性の改善を図った。

我が国で使用されている農薬は大きく分けてGCまたはHPLCによって測定される。残留農薬のモニタリングでは測定機器の検出感度はGC用のものがHPLC用をはるかにしのいでいることおよび測定機器の普及の程度から採用される測定法はGCを主とし、HPLCを副として取り扱うことが妥当と考える。

現在、我が国で使用されている農薬の残留分析法を見ると殺虫剤では有機塩素系、有機りん系、カーバメイト系および合成ピレスロイド系のほとんど全てがGC(ECD, FPD, FTD, HECD)で測定されている。殺ダニ剤の化学形態は多様であり、測定法もGC, HPLC, 比色法および原子吸光法と多様である。キチン合成阻害剤は尿素誘導体の化学構造を持ちGCおよびHPLCが用いられている¹⁵⁻²⁵⁾。

殺菌剤では有機塩素系、有機りん系、カルボキサミド系、アシララニン系、エルゴステロール合成阻害剤およびその他のいもち病防除用の殺菌剤はGCによる分析が主である。ベンズイミダゾール系殺菌剤は吸光光度法またはHPLCで測定される。ジチオカーバメイト系殺菌剤は比色法、GCまたはHPLCが採用されている¹⁵⁻²⁵⁾。

除草剤ではフェノキシ系、ジフェニルエーテル系、カーバメイト系、酸アミド系、尿素系、スルホニル尿素系、トリアジン系、ダイアゾール系およびジニトロアニリン系などの多様な化学形態の化合物が使用されており、分析法はほとんど全てがGCによっている¹⁵⁻²⁵⁾。使用量が多く重要な除草剤としてピピリジリウム系と有機りん系除草剤がある。これらの化合物は水溶性が高くGCによる分析にははん雑な操作を伴い、困難であるので現在のところHPLCが最も進んだ分析法であると考えられる^{162, 163, 171-173, 211-216)}。

検出器の選択は精製法と密接な関係があるが、りんや硫黄を含む農薬はFPDを、窒素を含む農薬はFTDを、塩素を含む農薬はHECDを選択することで妨害物質の影響を最小限にとどめることができる。りんを含む農薬の場合はFTDを用いればFPDに比較して感度の向上を図ることができるが、妨害物質の影響が大きくなる。

精製法として多くの農薬がフロリジルカラムクロマトグラフィーで精製可能であるために公定分析法で応用さ

れることが多い。単一の農薬のみを対象とする場合は問題はないが極性の異なる多成分の農薬を溶出させる場合は、最終的に強極性農薬を溶出させるために強極性溶媒を必要とし、妨害物質もともに溶出するので精製効果が上がらない。妨害物質のうち油脂類、葉緑素およびポリフェノール類のような比較的分子量の大きい物質はGPCによる除去が効果的である。しかし、一部の黄色色素やアブラナ科野菜類に含まれる硫黄を含む比較的分子量が小さい化合物はGPCのみでは除去できない。しかし、黄色色素の完全な除去は難しいが、少量であれば測定妨害にはならない。また、アブラナ科野菜類に由来する比較的小分子の含硫化合物のような極性の妨害物の除去はフロリジルカラムクロマトグラフィーが効果的である。一方、活性炭は色素類の除去に優れており、残留分析では多用されてきたが、その溶出溶媒の選択基準はフロリジルのそれと異なり活性炭ではアセトンよりベンゼンやトルエンの方が溶出力が強い。

抽出法として振とう、高速攪拌あるいはソックスレイ抽出法があるが、作業の効率からは振とうまたは高速攪拌がよい。抽出溶媒としてはアセトン、メタノールまたはアセトニトリルが最も多用され抽出効率がよいために多くの残留分析法ではこれらの強極性溶媒が使用されている。野菜および果実などの水分の多い試料はそのまま抽出操作を行なうが米、麦あるいは豆類などの水分の少ない試料の場合は等量から2倍量の水を加えて室温で1時間以上放置して試料を十分に湿らせる必要がある。

以上のことを考慮して汎用多成分分析法として下記の手順をとることが妥当であると考えられる。

分析操作-1 (野菜、果物などの水分の多い試料)

- ① 均質化した試料50gを共栓付三角フラスコにとる。
- ② アセトン100mlを加えた後、30分間振とう抽出する。(注-1)
- ③ アセトン抽出液を吸引濾過し、漏斗上の残留物を50~100mlのアセトンで洗浄する。
- ④ 抽出液と洗液を合わせ、減圧濃縮し、アセトンを除く。
- ⑤ 濃縮液を分液漏斗に移し、飽和塩化ナトリウム溶液30mlを加え、さらにジクロロメタン50mlを分液漏斗に加える。
- ⑥ この分液漏斗を1分間振とうし、静置後ジクロロメタン層を分離して三角フラスコへ移す。ジクロロメタンによる抽出操作をさらに2回繰り返す、ジクロロメタン層を分取する。
- ⑦ ジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムを用いて脱水する。

- ⑧ ジクロロメタン抽出液を減圧濃縮する。(注-2)
 - ⑨ フラスコ内の残留物をGPC用溶媒10mlを加えて溶解させ、自動GPC装置により精製する(注-3)。
 - ⑩ GPCカラムからの溶出液の最初の100mlを捨て、次の140mlを分取する(注-4)。
 - ⑪ 分取した溶出区分を濃縮乾固した後、残留物を測定装置に適した溶媒に溶解させる(注-5, 注-6)。
- 分析操作-1の2(米、麦・雑穀、豆類などの乾燥試料)
- ① 均質化した試料50gを共栓付三角フラスコにとる。
 - ② 水100mlを試料に加え、全体をよく湿らせ、1時間室温で放置する。
 - ③ アセトン150mlを加えた後、30分間振とう抽出する。以下、分析操作-1と同様に操作する。
- 上記の分析手法の概略をFig. 7. 1に示した。

注-1: 抽出溶媒はメタノールおよびアセトニトリルも使用可能である。

注-2: 必要に応じてキーパー(ジエチレングリコールなど)を用いること。

注-3: 自動GPC装置は高価であるのでポンプ(吐出圧5kg/cm²以下で充分)、カラム(ガラス製、内径25mm、長さが変更可能なものがよい。ゲル部分の長さは600mmを標準とする。)、充填剤(合成樹脂系ゲルがよい。現在入手可能なゲルはポリスチレンジビニルベンゼン共重合体のみである。)、六方バルブおよび配管用のテフロンチューブ(5mlの容量の試料注入用のループには外径1/8インチ、送液用には外径1/16インチがよい。)を購入して組み立てる。移動相溶媒はシクロヘキサン/ジクロロメタン(1/1, v/v)を使用するが、他に酢酸エチル、クロロホルムなどが使用できる。

注-4: ほとんど全ての農薬は100~240mlの中に入る。単一の農薬を分析する場合は分取する画分をより狭くすることにより精製効果が向上する。

注-5: FPD-GC, FTD-GCで測定する場合はアセトンを、HECD-GCを用いる場合にはヘキサンを用いる。

注-6: アブラナ科野菜類が試料である場合、FTD-GCでの測定で妨害がある場合は5%含水フロリジル1.5gを脚部にガラスウールを詰めた小型漏斗(直径30mm)を乗せ、アセトン溶液をその層に注ぎ、流出してくるアセトン溶液を集めて検液とする。

(なお、抽出効率をやや犠牲にするならば、ジクロロメタンを用いて抽出操作を行なうことでGPCの前段の処理を短縮できる。)²¹⁷⁾

分析操作-2 (簡易分析法, 野菜, 果物などの水分の多い試料)

- ① 均質化した試料100gを共栓付三角フラスコにとる。
- ② メタノール100mlを加えた後, 30分間振とう抽出する。
- ③ メタノール抽出液を吸引濾過し, 漏斗上の残留物をメタノール50mlを用いて洗浄する。
- ④ 抽出液と洗浄液を合わせて全容量を測定する。
- ⑤ 全抽出液からその20mlを100mlの分液漏斗に取り, 飽和塩化ナトリウム溶液30ml, トルエン10mlを加えて5分間振とう抽出する。
- ⑥ トルエン層を分離し, その5mlをピペットを用いてミニカラムに注ぐ(注-7)。
- ⑦ トルエン層の上端がカラム充填剤の上端に達した時に, 新たなトルエン5mlを注ぎ, 流出するトルエンを目盛り付試験管に集め, 10mlに定容とする。

分析操作-2の2 (簡易分析法, 米, 麦・雑穀などの乾燥試料)

- ① 均質化した試料50gを共栓付三角フラスコに取る。
- ② 水50mlを試料に加え, 試料を十分に湿らせ, 室温で1時間放置する。
- ③ メタノール100mlを加えた後, 30分間振とう抽出する。

以下分析操作-2と同様に操作する。

上記の分析手法の概略をFig. 7.2に示した。

注-7: ガラスカラム(内径, 8mm)の下端にガラスウールを詰め, 垂直に保ち, 下から順に4%含水フロリジル0.5g, 活性炭/結晶セルロース(1+4, w/w)混合粉末0.2gおよび無水硫酸ナトリウム1.5gを乾式充填する。

以上の精製操作は現在使用されている大半の農薬に適用可能であり, また分光光度法, GCおよびHPLCいずれの測定機器にも応用が可能である。ただ, GCにより測定する場合のカラムは従来のパックドカラムよりは多成分の農薬に適応できるように無極性から中極性のメガボアカラムで長さ15~30mのものを用いる方が好結果を得られる。メガボアカラムは1~2 μ lの試料を注入できるため通常のキャピラリーカラムより扱い易い。さらに, GCの温度条件は初期温度100 $^{\circ}$ Cから280 $^{\circ}$ Cまで1 $^{\circ}$ C/分の割合で昇温させる条件がよい。さらに, FPD, FTD, HECDは昇温分析に伴うベースラインのドリフトがないために好都合である。なお, カーバメイト系農薬の高感度分析では, 上記の精製の後, モノクロロアセチル化法によりECD-GCによる測定が可能である。

また, HPLCで測定する場合はUVDでなければ測定できない場合を除き, 蛍光光度検出器またはLCECDのような特異的検出器を利用すべきである。LCECDを用いる場合は上記の精製法の後直接または必要ならば加水分解を行えば第3章で述べた場合よりは妨害がより少ないと思われる。

以上述べた汎用分析法について著者の属する農薬検査所では1000回以上の経験を重ねてきた。本法は有機錫剤, パラコートやジクワットあるいはボルドー液などの無機化合物のようなイオン性の農薬, ジチオカーバメイト剤のような有機溶媒に不溶の農薬は本法を適用できなかったが, 現在食用作物に使用されている農薬の80%以上が本法を用いて分析可能である。残る問題としてはHPLCで分析されている農薬の汎用分析法である。現在, HPLCで測定されている農薬は約20種(食用作物に使用される農薬の10%以下)ある。このうち, ベノミル, カルベンダジム(MBC), チオファネートメチルは第4章の方法で分析が可能であるが, GPCによる精製も可能であった。さらに, 酢酸エチルまたはジクロロメタンを抽出溶媒として用いた場合は, 色素類などが多量に抽出されるため, それらの除去のためGPCによる精製が効果的であった。ベノミルおよびチオファネートメチルは散布されると急速にMBCに分解されるので多成分同時分析のために正確さを多少犠牲にしてMBCのみを蛍光検出器を用いて測定することが可能である。すなわち, GPCの溶出液を稀塩酸で抽出すればMBCは塩酸層へ移行するので水溶液を中和し, ジクロロメタンまたは酢酸エチルで再抽出し, HPLCで測定できる。また, パラコートおよびジクワットは水溶性で有機溶媒には溶けないためイオン交換クロマトグラフィー以外の精製法は困難である。一般に, 水にしか溶けない有機化合物の高感度分析は困難であり, これらの農薬は他の多くの有機溶媒に可溶性農薬と同時に分析することは不可能である。従って, 現在のところHPLCでなければ測定できない農薬は数が少ないため個別に測定するしかないと考える。著者らは現在HPLCにより分析されている農薬の多成分同時分析法を検討中である。すなわち, ジクロロメタン抽出し, EXTRELUT(Merck社製)カラムによりジクロロメタン層を分離した後GPCで精製し, HPLC(UV254nm)で測定する方法について検討して十分な回収率を得たが, 一部の農薬の精製が十分でない場合があり検討中である²¹⁷⁾。

実際に市販されている農作物の残留農薬の調査をする場合は多くの場合作物の種類および栽培地域などの情報があるために分析対象となる農薬の種類を絞ることができるので, 個別の分析法を適用しなければならない農薬

の種類は限られる。

以上に述べた分析法は従来の残留分析法の汎用化を図り、多成分の農薬の同時分析を可能にするとともに従来

法の感度の向上および新しい分析手法の導入を図ることにより特異的な分析法の開発を図った。

本研究は今後の農薬残留分析のモニタリングのために利用されることが期待される。

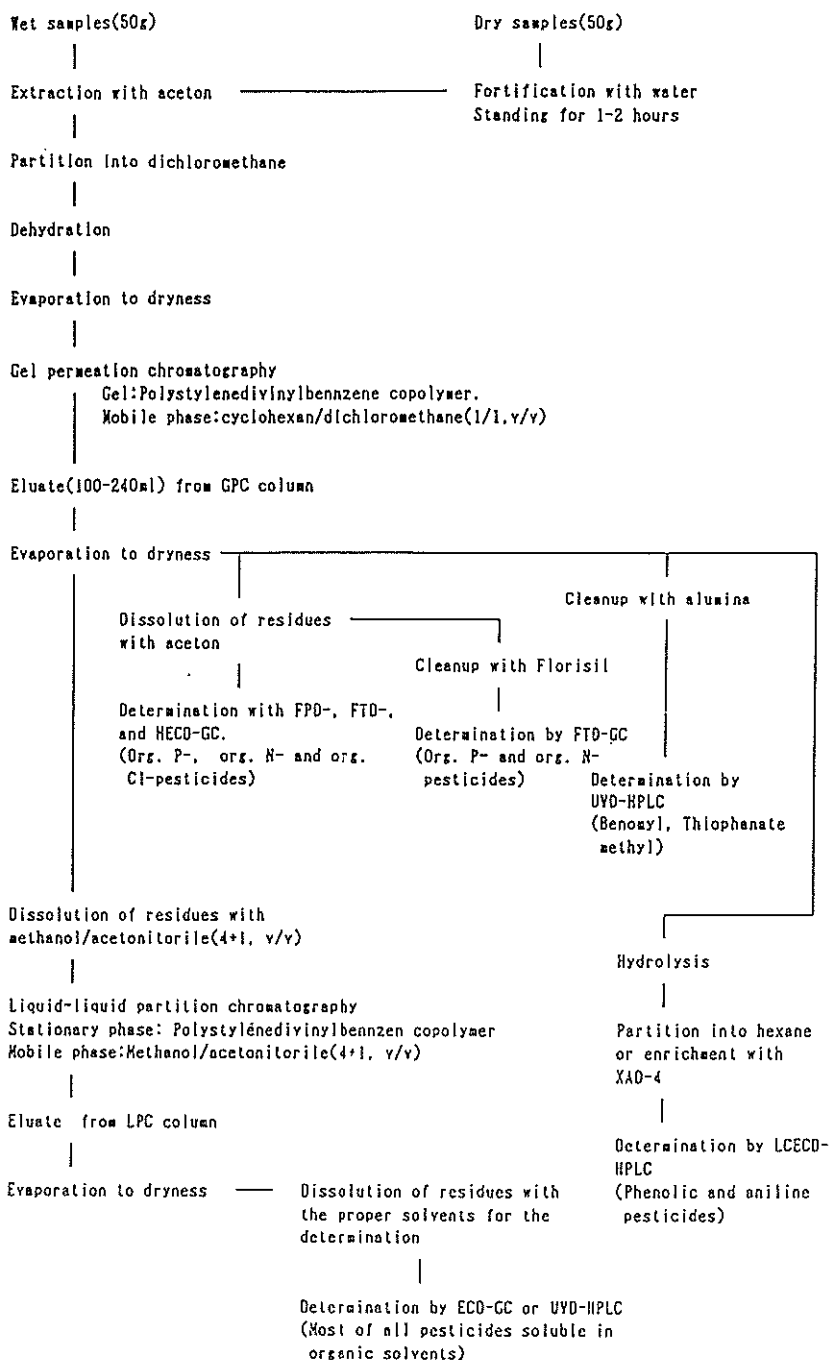


Fig. 7.1 Outline of the general cleanup procedure for the determination of pesticide residues in agricultural commodities.

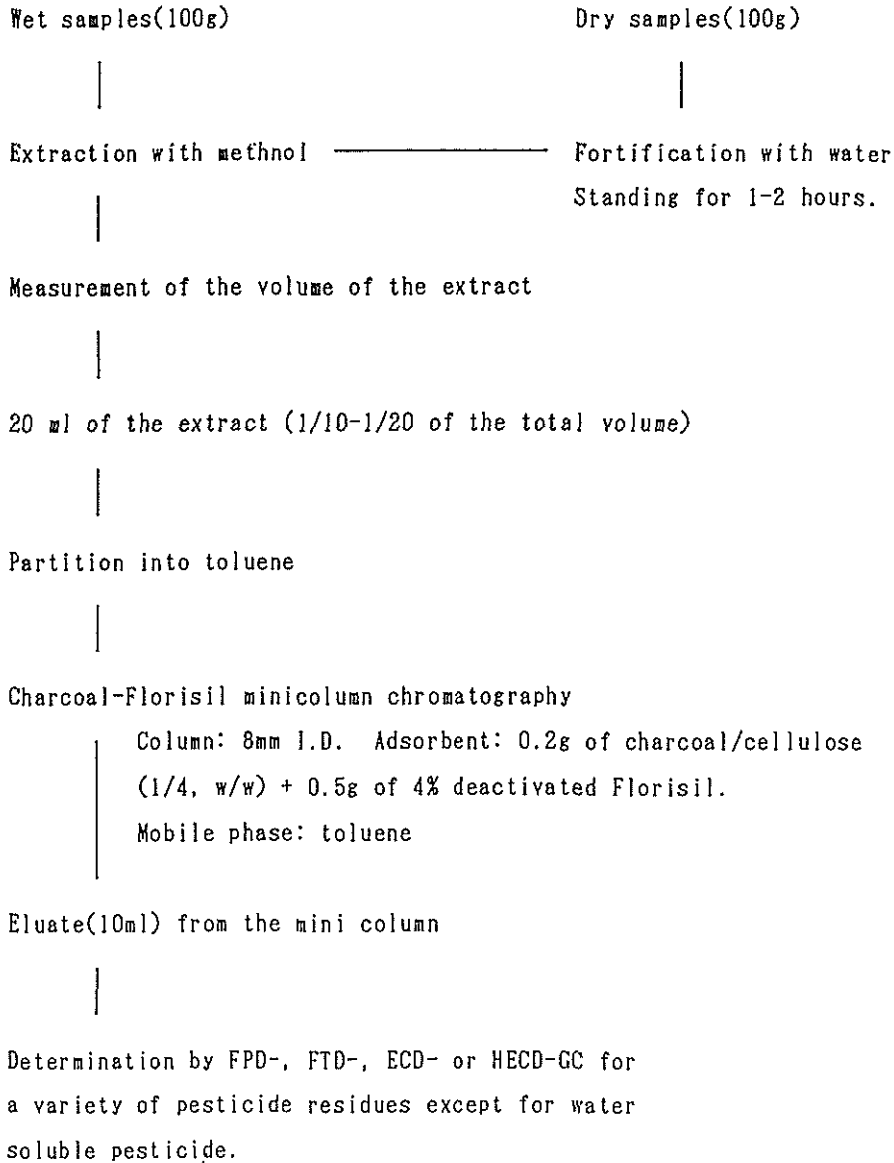


Fig. 7.2 Outline of the rapid cleanure procedure for the determination of pesticide residues in agricultural commodities.

結 論

農業生産の安定のため農薬の使用は不可欠であるが、農薬の使用に伴って生じる農産物（食物）中の残留農薬の安全性は消費者の大きな関心事である。我が国では農産物中の残留農薬量を規制するために農薬取締法の規定に基づき個々の農薬について残留基準、適用範囲、使用方法および残留分析法が設定されている。このため、個々の農薬の残留実態の調査は容易であるが農薬数が増加するにつれてそれらの農薬を一つひとつ分析することは多大な時間と手間を必要とするようになった。さらに、市販の農産物は農薬の使用歴が不明であるのでこの場合一つひとつの農薬を分析していたのでは経済的にも物理的にも調査が不可能となり非現実的である。このため、農産物（食品）中の残留農薬のモニタリングを行なうためには同時に複数の農薬を分析できる方法を開発する必要がある。理想的にはその分析法は親化合物のほか毒性学的に意味のある変化生成物を同時に分析できる方法でありたい。しかし、そのような理想的な分析法の確立は容易でないが、ここでは多くの新しい分析技術を応用して可能な限り数多くの残留農薬の実態調査に適用できる分析法の開発を試みた。

第一に残留分析の死命を制する精製手段の汎用化と簡便化を目指して分取液体クロマトグラフィー（特に、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）および活性炭・フロリジルミニカラムの応用の可能性について検討した。前者は繰り返し使用することが可能であり、再現性がよくキャピラリーカラムを用いたGCの高分離能と特異的な検出器（FPD, FTD, HECD）による測定と組み合わせることにより現在登録されている農薬の80%以上に適用が可能であった。さらに、HPLCを用いることにより90%の登録農薬の測定が可能であった。また、採取できる試料量が少ない場合あるいは残留量は少ないが毒性が強い農薬（換言すればADIの小さい農薬）の場合など高感度検出器による測定が必要な場合には少量の不活性化フロリジルを用いた濾過またはポリステレンジビニルベンゼン共重合体樹脂による分配クロマトグラフィーによる精製を併用することにより精製効果をさらに高めることができた。後者は従来農薬の残留分析の精製手段として最も多用されてきた活性炭とフロリジルを少量ずつ積層併用し、トルエンを用いて溶出することにより一部の強極性農薬（例えば、acephate, dimethoate, oxadixyl などおよびイオン性の農薬）を除く大半の登録農薬の残留分析に応用が可能であることを証明した。

さらに、前者は装置の自動化を図ることにより単位操作から名人芸を排除し、終夜運転を可能にすることでモ

ニタリング調査の能率の向上を図った。また、後者は濃縮操作を省くことにより抽出から測定までの操作に要する時間を約2時間に短縮し、しかも吸着剤の使用量は従来の1/10に減らすことができ、極めて経済的であった。さらに、後者の精製法はECD-GCによる測定にも耐える程度の高度の精製が可能であった。

以上の精製法は有機塩素系、有機りん系、カーバメイト系、合成ピレスロイド系など幅広い農薬に適用可能であった。また、従来ECD-GCでなければ測定できなかった有機塩素系農薬の残留分析のためHall型電気導度検出器付ガスクロマトグラフの有用性を示した。本検出器の高いハロゲン特異性のため試料由来の共抽出物の影響を受け難くモニタリング分析には適した検出器であり、今後の普及が期待できる。

第二にHPLCの残留分析への応用を検討した。現在使用されている農薬にはフェノールあるいはアニリンの誘導体である化合物が多く、これらの農薬の残留分析法として親化合物と変化生成物を加水分解して生じるフェノール化合物あるいはアニリン化合物を誘導体化しないでLCECDを用いて測定する方法を開発した。従来、加水分解して生じたフェノール化合物またはアニリン化合物は熱安定性のよい誘導体に変えてECD-GCで測定されてきたが、ECDを用いるために精製操作がはん雑であった。しかし、LCECD-HPLCを用いて測定する場合は水蒸気蒸留と液・液分配または樹脂による捕集の簡便な精製法のみでナノグラムのレベルのフェノール化合物やアニリン化合物を測定することができた。この分析法はフェノールまたはアニリン誘導体である農薬の残留分析に比較的簡単な精製操作により応用可能であることを示した。

さらに、HPLCによりチオファネートメチル（TM）の光分解生成物からTMの酸素置換体を2種類分離し、合わせて変化生成物を含むTMの残留分析法を開発した。従来のTMの残留分析法ではこれらの酸素置換体は測定できなかったが、本法によりそれらの化合物を含むTMの残留分析が可能となり、露地栽培のピーマンを用いて変化生成物の残留実態を調査した。その結果、TMを散布した作物体には酸素置換体はほとんど残留していないことが判明した。この結果、現在のTMの残留分析法である全MBCを測定する方法を変える必要はないと思われる。さらに、MBCの高感度分析法として薄層蛍光デンシトメトリーを開発した。本法は1枚のTLC板で9試料の精製と測定を同時に行えるため経済的であった。

次に、従来分光光度法で測定されていたピロリジウム系除草剤のHPLCによる高感度分析法を開発した。本法は従来法の100倍の感度を有し、さらに従来法では同時測定ができなかったパラコート剤とジクワット剤の分

別定量を可能にした。本法を用いて市販の野菜類を分析し、従来法では測定できなかった低いレベルのパラコート剤の残留を見いだしたが、その量は残留基準を下回り安全性上の問題はなかった。このほか、土壤中のパラコート剤の簡易抽出法を開発し、従来1昼夜を要した抽出操作を30分に短縮した。パラコート剤の簡易抽出法とHPLCによる測定法は現在多くの研究者により利用されている。

第三に高感度分析法の開発が比較的困難であったカーバメイト系殺虫剤について分光光度法、蛍光光度法、モノクロロアセチル化法によるGCおよび直接測定するHPLCを利用した各種の残留分析法を開発した。現在の残留分析法はほとんどGCによる方法であるが多数の試料の測定には測定時間の面で分光法が優れており、残留基準が比較的大きいカーバメイト系殺虫剤の残留分析では今なお十分有用である。しかし、試料量が少ない場合や残留基準値が0.05ppmより低い場合は誘導体化してECD-GCで測定する必要がある。本論文で述べたモノクロロアセチル化法によるcarbarylの最小検出量は0.01ngであり、現在これ以上の感度を有する分析法は得られていない。

また、HPLCによるカーバメイト剤の直接定量ではcarbaryl以外のカーバメイト剤はそのままでは吸光度が低く十分な感度が得られなかったが、carbarylのみは強い紫外部の吸収を示し、誘導体化せずにUVD-HPLCで測定が可能であった。なお、本法はその他のカーバメイト剤の製剤レベルの分析には十分な感度を有していた。

さらに、ポリアミドTLCを用いたカーバメイト系殺虫剤の残留レベルの定性分析法を開発した。最小検出量は化合物により異なったが0.05~0.8 μ g/スポットであった。

以上に述べてきた各分析法は極めて実用性が高く、精製法としてのGPCおよびLPCの再現性、活性炭-フロリジルミニカラムの簡便性は他に比肩するものがなく、多くの作物-農薬の組合せに適用できた。測定法としては、従来使用されてきたFPD-GC、FTD-GCのほか、我が国で初めてHECD-GCを使用し、キャピラリーカラムの高い分離能の組み合わせた分析法を開発し、本法が残留農薬のモニタリングに有用であることを示した。さらに、HPLCはベンズイミダゾール系殺菌剤やピピリジリウム系除草剤のような不揮発性の農薬の分析のほか、従来GCを用いて分析されていた農薬についても上述の精製法を利用し、LCECD-HPLCとの組合せによりその適用範囲がより広がることを示した。

ここに述べた抽出、精製、測定各単位操作はそれぞれは完成された操作法であり、それぞれの組合せを工夫することにより我が国で現在使用されている農薬の大半が

分析可能であり、これらの分析法は今後の残留農薬のモニタリングへの利用が期待される。

謝 辞

本論文を草するに当たり、懇切なご指導をいただきかつご校閲を賜った神戸大学農学部教授 松中昭一博士、同 桜井節也博士、同 王子善清博士に謹んで感謝の意を表する。

本研究の取りまとめに当たり数々のご支援、ご鞭撻を賜った農林水産省農薬検査所長 上垣隆夫氏、同 前所長松本安生氏、同 元所長中村廣明氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりご指導いただいた農林省農薬検査所 後藤真康博士（現 財団法人残留農薬研究所理事・化学部長）、同 柏 司博士、同 川原哲城氏（現 石原産業株式会社）に深く感謝の意を表する。

本研究の遂行に当たり終始協力を惜みず実験の一部を分担していただいた農林水産省農薬検査所 阪本剛氏、同 山下幸夫氏、同 朝倉健司氏（現 農林水産省農畜園芸局植物防疫課）、同 谷内純一氏、同 足立教好氏（現 食糧庁検査課）、同 横山 亨氏（現 農林水産省名古屋植物防疫所）、同 奎 雅雄氏（現 農林水産省横浜植物防疫所）、同元職員 馬場洋子氏、同元職員 藤本雄一氏、同元臨時職員 拓植真菜子氏（旧姓 河野真菜子氏）の各氏に衷心より謝意を表する。また、測定装置の操作法などで協力いただいた日電バリアン株式会社 大竹俊樹博士（現 山梨学院短期大学食物栄養学科教授）に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究に必要な諸試料を提供いただいた各農薬製造会社の関係諸氏に深謝する。

引用文献

- 1) 財団法人 日本経済教育センター：日本の農業，1989.
- 2) 杉本 良雄：農薬誌 2, 358 (1977)
- 3) 森田 利夫：植物防疫 36, 2 (1982)
- 4) 見里 朝正：物産保護の新分野，日本植物防疫協会，pp. 1-7, 1983
- 5) 農薬問題特別研究グループ：農薬からの証言，ライフサイエンス通信，1976
- 6) 環境庁：環境庁告示（昭和48年7月24日付，環境庁告示第46号，最終改正；平成2年4月10日付環境庁告示第35号），1990
- 7) F. C. Lu：Residue Reviews, 45, 81 (1972)
- 8) Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization："EVALUATION OF THE TOXICITY OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD", 1965
- 9) The Netherlands："Guide to Codex Maximum Limits for Pesticide Residues", 1988
- 10) J. G. Cummings：Residue Reviews, 16, 30 (1966)
- 11) R. D. Johnson, D. D. Manske, D. H. New & D. S. Podrebarac：J. Assoc. off. Anal. Chem., 67, 145 (1984)
- 12) R. D. Johnson, D. D. Manske, D. H. New & D. S. Podrebarac：J. Assoc. off. Anal. chem., 67, 154 (1984)
- 13) D. S. Podrebarac：J. Assoc. off. Anal. Chem., 67, 166 (1984)
- 14) D. S. Podrebarac：J. Assoc. off. Anal. Chem., 67, 176 (1984)
- 15) 後藤 真康・加藤 誠哉：残留農薬分析法，ソフトサイエンス社，1980
- 16) 後藤 真康・加藤 誠哉：増補残留農薬分析法，ソフトサイエンス社，1987
- 17) 後藤真康：農薬誌 3, 169 (1978)
- 18) 後藤真康：農薬誌 3, 315 (1978)
- 19) 後藤真康：農薬誌 4, 219 (1979)
- 20) 加藤正夫・岩永恵夫：農薬誌 5, 271 (1980)
- 21) 阪本 剛・大井明大：農薬誌 9, 159 (1984)
- 22) 岸部和美・田中 稔・田引勢郎：農薬誌 10, 569 (1985)
- 23) 岸部和美・田中 稔・田引勢郎：農薬誌 10, 745 (1985)
- 24) 田中 稔・立川裕隆・小泉和夫：農薬誌 13, 313 (1988)
- 25) 立川裕隆・田中 稔・小泉和夫：農薬誌 13, 505 (1988)
- 26) 厚生省食品化学課：食品衛生研究 20, 827 (1970)
- 27) 武田明治・関田 寛・大槻久美子：食品衛生研究 21, 712 (1971)
- 28) "Change in Official Methods of Analysis Made at the Seventy-Seventh Annual Meeting, October 14, 15, 16 and 17, 1963"：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 47, 190 (1964)
- 29) D. P. Johnson：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 47, 283 (1964)
- 30) M. Chiba & H. V. Morley：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 47, 667 (1964)
- 31) W. R. Benson & J. M. Finocchiaro：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 48, 676 (1965)
- 32) E. R. Holden：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 56, 713 (1973)
- 33) 石井康雄・拓植真菜子・中村広明：農薬検査所報告 第14号，25 (1974)
- 34) 藪崎 隆・加藤政明・池谷紀代子・小松一裕・加藤誠哉：第8回農薬残留分析研究会要旨集 p. 13, 1984
- 35) K. Sasaki, T. Suzuki & Y. Saito：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 46 (1987)
- 36) B. G. Luke, J. C. Richard & E. F. Dawes：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 295 (1984)
- 37) B. G. Luke & J. C. Richard：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 902 (1984)
- 38) K. Adachi, N. Ohokuni & T. Mituhashi：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 798 (1984)
- 39) A. M. Gillespie & S. M. Walters：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 290 (1984)
- 40) P. A. Mill, J. H. Onley, & R. A. Gaither：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46, 186 (1963)
- 41) R. W. Storherr, P. Otto, & R. R. Watts：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54, 513 (1971)
- 42) M. A. Luke, J. E. Froberg, & H. T. Masumoto：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 1020 (1975)
- 43) 鈴木 啓介：農薬検査所報告 第18号，25 (1978)
- 44) A. Ambus, E. Hargital, G. Karoly, A. Fulop & J. Lantos：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 743 (1981)
- 45) Y. Kawamura, M. Takeda, & M. Uchiyama：J. Food Hyg. Soc. Jpn., 19, 518 (1978)
- 46) 岩田好博・杉谷 哲・山田不二造：食餌誌 22,

- 484 (1981)
- 47) L.J. Carson : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 714 (1981)
- 48) M. A. Luke, J. E. Ferberg, G. M. Doose & H. T. Masumoto : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1187 (1981)
- 49) P. T. Holland, & T. K. Mcghie : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1003 (1983)
- 50) 山上富貴子・今泉則子・前川吉明・加藤誠哉 : 第9回農薬残留分析研究会要旨集, p.25 (1985)
- 51) L. R. Snyder & J. J. Kirkland : "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley & Sons, New York, 1974
- 52) 石井康雄 : 日本農薬学会第4回大会, No.305, 1979
- 53) 石井康雄 : 農薬検査所報告 第28号, 18, 1988
- 54) M. R. Verzele & E. Geeraert : *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 559 (1980)
- 55) D. J. Pietzyk & J. D. Stodola : *Anal. Chem.*, **53**, 1822 (1981)
- 56) R. E. Majors : *Anal. Chem.*, **44**, 1722 (1972)
- 57) R. E. Majors : *Anal. Chem.*, **45**, 755 (1973)
- 58) 足立教好・阪本 剛・石井康雄 : 日本農薬学会第13回大会講演要旨集, p.150, 1988
- 59) 石井康雄・足立教好・谷内純一・阪本 剛 : 農薬誌 **15**, 225 (1990)
- 60) D. L. Stalling, R. C. Tindle & J. L. Johnson : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**, 32 (1972)
- 61) R. C. Tindle & D. L. Stalling : *Anal. Chem.*, **44**, 1768 (1972)
- 62) J. A. Ault, C. M. Schofield, L. D. Johnson & R. H. Waltz : *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 825 (1979)
- 63) M. L. Hopper : *J. Agric. Off. Anal. Chem.*, **64**, 720 (1981)
- 64) R. A. Guinivan, N. P. Thompson & P. Bardalaye : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1201 (1981)
- 65) B. Buttler, & W. D. Hormann : *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 257 (1981)
- 66) R. A. Guinivan, N. P. Thompson & P. C. Bardalaye : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 210 (1982)
- 67) S. J. V. Young & L. R. Kamps : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 916 (1982)
- 68) M. L. Hopper : *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1038 (1982)
- 69) S. Young, M. Clower, Jr., & J. A. G. Roach : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 95 (1984)
- 70) J. A. Ault & T. E. Spurgeon : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 284 (1984)
- 71) J. J. Blaha & P. J. Jackson : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1095 (1985)
- 72) M. L. Hopper & K. R. Griffitt : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 724 (1987)
- 73) 谷内純一・阪本 剛・石井康雄 : 日本農薬学会第14回大会講演要旨集, p.108, 1989
- 74) 石井康雄・谷内純一・阪本 剛 : 農薬誌 **15**, 231 (1990)
- 75) M. A. Luke, J. E. Froberg, G. M. Doose & H. T. Masumoto : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1187 (1981)
- 76) T. L. Ramus & L. C. Thomas : *J. Chromatogr.*, **328**, 342 (1985)
- 77) T. L. Ramus, S. J. Hein & L. C. Thomas : *J. Chromatogr.*, **314**, 243 (1984)
- 78) C. P. Nulton, C. L. Haile & D. P. Redford : *Anal. Chem.*, **56**, 598 (1984)
- 79) 石井康雄・阪本 剛・朝倉健司・足立教好・谷内純一 : 農薬誌 **15**, 205 (1990)
- 80) British Crop Protection Council : *The Pesticide Manual* (8th ed.) pp.10, 269, 298, 618, 1987
- 81) L. R. Snyder : "Principles of Adsorption Chromatography", Marcel Dekker, Inc., New York, pp.185-240, 1968
- 82) J. Miyamoto, N. Mikami, K. Mihara, Y. Takimoto, H. Kouda & H. Suzuki : *J. Pesticide Sci.*, **3**, 35 (1978)
- 83) J. J. Freal & R. W. Chadwick : *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 424 (1973)
- 84) M. A. Sattar & J. Passivirta : *Anal. Chem.*, **51**, 598 (1979)
- 85) D. W. Bristol, L. W. Cook, M. T. Koterba & D. C. Nelson : *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 137 (1982)
- 86) 後藤真康 : 第8回農薬残留分析研究会, p.55, 1984
- 87) H. W. Dorrough & O. G. Wiggins : *J. Econ. Entomol.* **62**, 49 (1969)
- 88) T. C. Marshall & H. W. Drorrough : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1003 (1977)
- 89) A. Haque, I. Schuphan & W. Ebing : *Pestic. Sci.*, **13**, 219 (1982)
- 90) S. U. Khan : *Residue Reviews*, **84**, 1 (1982)
- 91) M. F. Kovacs, Jr. : *Residue Reviews*, **97**, 1 (1986)
- 92) A. K. Burnham, G. V. Calder, J. S. Fritz, G. A.

- Junk, H. J. Svec & R. Willis : *Anal. Chem.*, **44**, 139 (1972)
- 93) T. M. Shafik, H. C. Sullivan & H. R. Enos : *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 295 (1973)
- 94) L. L. Lamparski & T. J. Nestruck : *J. Chromatogr.*, **156**, 143 (1978)
- 95) T. R. Edgerton & R. F. Moseman : *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 197 (1979)
- 96) T. R. Edgerton, R. F. Moseman, E. M. Lores & L. H. Wright : *Anal. Chem.*, **52**, 1774 (1980)
- 97) D. E. Bradway & T. Shafik : *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 322 (1977)
- 98) W. H. Newsome, P. Collins & D. Lewis : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 591 (1986)
- 99) L. J. Felice & P. T. Kissinger : *J. Chromatogr. Sci.*, **48**, 794 (1976)
- 100) P. H. Zoutendam, C. S. Bruntlett & P. Kissinger : *J. Chromatogr. Sci.*, **48**, 2200 (1976)
- 101) R. J. Fenn, S. Siggia & D. J. Curran : *J. Chromatogr. Sci.*, **50**, 1067 (1978)
- 102) 五十嵐悦子・斎藤行生・内山 充 : 衛生試験所報告 第101号, 38 (1983)
- 103) R. S. Schwartz & K. O. David : *Anal. Chem.*, **57**, 1362 (1985)
- 104) C. L. Blank : *J. Chromatogr.*, **117**, 35 (1976)
- 105) C. Bollet, P. Oliva & M. Caude : *J. Chromatogr.*, **149**, 625 (1977)
- 106) D. N. Armentrout, J. D. Mclean & M. W. Long : *Anal. Chem.*, **51**, 1039 (1979)
- 107) 朝倉健司・阪本 剛・石井康雄 : 日本農薬学会第12回大会講演要旨集, p.158, 1987
- 108) 石井康雄・朝倉健司・阪本 剛 : 農薬誌第15巻第3号 (平成2年8月) 掲載予定 (1990)
- 109) K. Bhatia : *Anal. Chem.*, **45**, 1344 (1973)
- 110) A. W. Wolkoff & R. H. Larose : *J. Chromatogr.*, **99**, 731 (1974)
- 111) K. Organ & E. Katz : *Anal. Chem.*, **53**, 160 (1981)
- 112) J. F. Lawrence : *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 147 (1979)
- 113) M. Ahel & W. Giger : *J. Chromatogr. Sci.*, **57**, 1577 (1985)
- 114) E. M. Lores, T. R. Edgerton & R. F. Moseman : *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 466 (1981)
- 115) P. R. Musty & G. Nickless : *J. Chromatogr.*, **89**, 185 (1974)
- 116) G. A. Junk, J. J. Richard, M. D. Gieser, D. Witiak, J. L. Witiak, M. D. Aguello, R. Vick, H. J. Svec, J. S. Fritz & G. V. Calder : *J. Chromatogr.*, **99**, 745 (1974)
- 117) T. Katagi, N. Mikami & T. Matsuda : *J. Pesticide Sci.*, **14**, 79 (1989)
- 118) 石井康雄・朝倉健司・阪本 剛 : 農薬誌第15巻第3号 (平成2年8月) 掲載予定 (1990)
- 119) E. M. Lores, D. W. Bristol & R. F. Moseman : *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 358 (1978)
- 120) R. J. Fenn, S. Siggia & D. J. Curran : *Anal. Chem.*, **50**, 1067 (1978)
- 121) E. M. Lores, F. C. Meeking & R. F. Moseman : *J. Chromatogr.*, **188**, 412 (1980)
- 122) R. Bielorai & E. Alumot : *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 623 (1966)
- 123) 穴戸 孝・腰岡政二・山田忠雄・行本峰子 : 農薬ハンドブック, 1989
- 124) G. P. Clemons & H. D. Sister : *Phytopathology*, **59**, 705 (1969)
- 125) J. J. Sims, H. Mee & D. C. Erwin : *Phytopathology*, **59**, 1775 (1969)
- 126) J. W. Vonk and A. K. Sijpesteijn : *Pest. Sci.*, **2**, 160 (1971)
- 127) J. R. Fleeker, H. M. Lacy I. R. Schultz and E. C. Houkom : *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 592 (1974)
- 128) K. M. Al-Adil, E. R. White, M. M. McChesney & W. W. Kilgore : *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 242 (1974)
- 129) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 817 (1972)
- 130) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 931 (1972)
- 131) H. L. Pease & J. A. Gardiner : *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 267 (1969)
- 132) 石井康雄・馬場洋子・中村広明 : 農薬検査所報告 第16号, 30 (1976)
- 133) A. L. Homass and A. J. Fuchs : *J. Chromatogr.*, **51**, 327 (1970)
- 134) A. Balinova : *J. Chromatogr.*, **111**, 197 (1975)
- 135) 石井康雄 : 日本農薬学会第2回大会講演要旨集, No.106, 1977
- 136) 石井康雄・横山 亨 : 農薬検査所報告 第29号, 27 (1990)
- 137) 石井康雄・柰 雅雄 : 日本農薬学会第3回大会講演要旨集, No.204, 1978

- 138) 石井康雄：農薬誌 15, 211 (1990)
- 139) 小坂章吾・遠山典宏・杉岡克己・田中多恵：第13回農薬研究会試料(農薬生産技術 第22号補) No. 9, 1970
- 140) 小野成男・長谷川治郎・柳瀬利一郎・杉岡克己・遠山典宏：分析化学 24, 750 (1975)
- 141) 川原哲城・石井康雄・渡辺孝弘・藤本雄一・中村広明：農薬検査所報告 第11号, 951 (1971)
- 142) H. Suzuki, Y. Tonogai, Y. Ito & M. Iwaida : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 549 (1982)
- 143) J. D. MacNell and M. Hikichi : *J. Chromatogr.*, 101, 33 (1974)
- 144) J. Sherma : *J. Chromatogr.*, 104, 476 (1975)
- 145) 李 雅雄・石井康雄：日本農薬学会第2回大会講演要旨集, No.130, 1977
- 146) 李 雅雄・石井康雄・中村広明：農薬検査所報告 第17号, 34 (1977)
- 147) J. P. Rouchaud & J. R. Decallonne : *J. Agric. Food Chem.*, 22, 259 (1974)
- 148) 伊藤登志男・豊田正武・慶田雅洋：食衛誌 18, 26 (1977)
- 149) G. H. Tjan & J. T. A. Jansen : *J. Assoc. Off. Chem.*, 62, 769 (1979)
- 150) S. Cline, A. Felsot & L. Wei : *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1087 (1981)
- 151) J. J. Kirkland : *J. Agric. Food Chem.*, 21, 171 (1973)
- 152) J. J. Kirkland, R. F. Holt & H. L. Pease : *J. Agric. Food Chem.*, 21, 368 (1973)
- 153) M. Maeda & A. Tsuji : *J. Chromatogr.*, 120, 449 (1976)
- 154) 志賀直史・俣野修身・後藤真康：農薬誌 2, 27 (1977)
- 155) M. Chiba & D. F. Veres : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 1291 (1980)
- 156) C. F. Aten, J. B. Bourke & R. A. Marafioti : *J. Agric. Food Chem.*, 30, 610 (1982)
- 157) G. Zweig & R. Gao : *Anal. Chem.*, 55, 1448 (1983)
- 158) M. Chiba & R. P. Singh : *J. Agric. Food Chem.*, 34, 108 (1986)
- 159) 小野成男・遠山典宏：農薬誌 7, 363 (1982)
- 160) "Pesticides residues in food: 1977 evaluations", FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, ROME, p. 455, 1978
- 161) "Pesticide residues in food - 1983. The monographs", FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, ROME, p. 9 and p. 89, 1985
- 162) 藤本雄一・石井康雄：日本農薬学会第4回大会講演要旨集, No. 304, 1979
- 163) 石井康雄・藤本雄一：農薬検査所報告 第27号, 28 (1987)
- 164) A. Calderbank, C. B. Morgan & S. H. Yuen : *Analyst*, 86, 569 (1961)
- 165) A. Calderbank & S. H. Yuen : *Analyst*, 90, 99 (1965)
- 166) P. F. Lott & J. W. Lott : *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 390 (1978)
- 167) C. J. Soderquist & D. G. Crosby : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 8, 363 (1972)
- 168) S. U. Kham : *J. Agric. Food Chem.*, 22, 863 (1974)
- 169) S. U. Kham : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 14, 745 (1975)
- 170) A. J. Canard & W. J. Criddle : *Analyst*, 100, 848 (1975)
- 171) A. Pryde : *J. Chromatogr.*, 115, 107 (1975)
- 172) D. C. Paschal, L. L. Neebham, Z. J. Rollen & J. A. Liddle : *J. Chromatogr.*, 177, 85 (1979)
- 173) L. Needham, D. Paschal, Z. J. Rollen, J. Liddle & D. Bayse : *J. Chromatogr. Sci.*, 17, 87 (1979)
- 174) 中村幸二・大谷 卓・安藤一宏・丸 論・能勢和夫・塚本伸也：第10回農薬残留分析研究会資料, p. 1, 1986
- 175) 安藤一宏・中村幸二・丸 論・宮原克祐・大谷卓・和田健夫・塚本伸也・能勢和夫：第11回農薬残留分析研究会資料, p. 55, 1987
- 176) 宮原克祐・中村幸二・丸 論・安藤一宏・高橋暁子・和田健夫・楢田重雄・山田忠雄：第12回農薬残留分析研究会資料, p. 50, 1988
- 177) 農薬研究グループ：“農薬からの証言”，ライフサイエンス通信, 1976
- 178) 石井康雄・川原哲城・後藤真康・柏 司：農薬生産技術 第20号, 19 (1969)
- 179) 農薬検査所：農薬生産技術 第9号, 38 (1963)
- 180) G. Zweig : "Analytical Method for Pesticides, Plant Growth Regulators and Food Additives, Volume II", Academic Press, New York, pp. 437 - 450, 1964
- 181) 石川莞爾・安達亨一・赤柴健夫：第9回農薬研究

- 会講演要旨集（農薬生産技術）第19号，33（1968）
- 182) 石井康雄：農薬検査所報告 第10号，51（1970）
- 183) D. Macdougall： *Residue Reviews*, 1, 24（1962）
- 184) M. C. Bowman & M. Beroza： *Residue Reviews*, 17, 23（1967）
- 185) R. J. Argauer, H. Shimanuki & C. C. Alvarez： *J. Agric. Food Chem.*, 18, 688（1970）
- 186) 石井康雄・山下幸夫・河野真菜子：第15回農薬研究会講演要旨集（農薬生産技術）第28号，17（1972）
- 187) 石井康雄・山下幸夫：農薬検査所報告 第12号，63（1972）
- 188) 石井康雄・河野真菜子・中村広明：昭和50年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p.15, 1975
- 189) 川原哲城・柏 司：第9回農薬研究会講演要旨集（農薬生産技術）第19号，34（1968）
- 190) I. H. Williams： *Residue Reviews*, 38, 1（1971）
- 191) E. D. Magallona： *Residue Reviews*, 56, 1（1975）
- 192) S. C. Lan & R. L. Marxmiller： *J. Agric. Food Chem.*, 18, 413（1970）
- 193) 上路雅子・金沢 純：分析化学 22, 16（1973）
- 194) R. J. Argauer： *Anal. Chem.*, 40, 122（1968）
- 195) L. I. Butler & L. M. McDonouch： *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 53, 495（1970）
- 196) E. R. Holden, W. M. Jones & M. Beroza： *J. Agric. Food Chem.*, 17, 56（1969）
- 197) 高瀬 巖・大須賀重喜：農薬生産技術 第30号，22（1973）
- 198) M. C. Bowman & M. Beroza： *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 50, 926（1967）
- 199) I. C. Cohen, J. Norcup, J. H. A. Ruzicka & B. B. Wheals： *J. Chromatogr.*, 49, 215（1970）
- 200) H. W. Dorough & J. E. Casida： *J. Agric. Food Chem.*, 12, 294（1964）
- 201) J. Kuhr & J. E. Casida： *J. Agric. Food Chem.*, 15, 814（1967）
- 202) 石井康雄・大竹俊樹：農薬検査所報告 第13号，32（1973）
- 203) 石井康雄：昭和50年度日本農芸化学会講演要旨集，p.14, 1975
- 204) D. O. Eberle & F. A. Gunther： *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 48, 927（1965）
- 205) J. M. Finocchiaro & W. R. Benson： *J. Assoc. Off. Chem.*, 50, 888（1967）
- 206) M. Ranasamy： *Analyst*, 94, 1075（1969）
- 207) 石井康雄・山下幸夫：農薬生産技術 第27号，21（1972）
- 208) 井上博之・戸倉一也・荒木百合子：薬学雑誌 87, 88（1967）
- 209) 農林省農薬検査所：農薬検査所報告 第13号，52（1972）
- 210) 植物防疫協会：“農薬適用一覧表，平成元年9月30日現在（平成元農薬年度）”，1989
- 211) H. A. Moye, C. J. Miles & S. J. Scherer： *J. Agric. Food Chem.*, 31, 69（1983）
- 212) R. L. Glass： *J. Agric. Food Chem.*, 31, 280（1983）
- 213) T. E. Archer & J. D. Stokes： *J. Agric. Food Chem.*, 32, 586（1984）
- 214) L. N. Lundgren： *J. Agric. Food Chem.*, 34, 535（1986）
- 215) J. E. Cowell, J. L. Kunstman, P. J. Nord, J. R. Steinmetz & G. R. Wilson： *J. Agric. Food Chem.*, 34, 955（1986）
- 216) C. J. Miles, L. R. Wallace & A. Moye： *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 458（1986）
- 217) 伊藤和男・谷内純一・野中 学・阪本 剛・石井康雄：日本農薬学会第15回大会講演要旨集，No. B213, 1990

STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF EFFICIENT ANALYTICAL METHODS FOR PESTICIDE RESIDUES IN AGRICULTURAL COMMODITIES

Yasuo ISHII

The Agricultural Chemicals Inspection Station,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
2-772 Suzuki-cho, Kodaira-shi, Tokyo, 187, Japan

SUMMARY

Along with the increasing world population, there has been a growing demand for more food. To increase the production of food, it is unavoidable that a variety of pesticides is used to control pests through the various stages of agricultural production. While the need of pesticide for agriculture production should be generally recognized today, there has been some concern about their safety to the consumers. Governments have taken the appropriate actions to safeguard the consumers.

Since enactment of the Pesticide Residues Amendment to the Pesticide Regulation Law of 1971, in Japan, tolerances for 229 pesticides have been established on agricultural commodities as of April 10, 1990. The analytical methods adequate for the detection of appropriate amount of the pesticide in agricultural commodities have also been established at time the tolerances have been established. Such methods are useful when it is necessary to analyze only the specific pesticide residue in agricultural commodities. With increase of the kind of pesticides used in agricultural production, however, it has become impossible to monitor the level of pesticide residues in general food effectively and meaningfully by these individual methods. Since the spray history of a given commodity is generally unknown, it is economically and physically impractical to apply a large number of individual methods for all the significant chemical residues that may be present. The only reasonable approach to monitor the pesticide residues in food is to simplify analyses by developing methods which measure more than one pesticide at a time.

To design, improve and extend methods by which a number of pesticide residues are measured, the author has made the following examinations.

(1) The evaluation of preparative chromatographic systems, especially gel permeation chromatography (GPC) was undertaken as the cleanup technique for determining pesticide residues. Samples were extracted with acetone and partitioned into dichloromethane. The extracts were evaporated to dryness. The residues were cleaned up with GPC system, in which Bio-Beads SX-3 or Merckogel OR PVA-2000 was as a GPC gel. Pesticides were determined by FPD-, FTD- and HECD-GC. Supplemental Florisil or Hitachi gel 3019 was used in case further cleanup was necessary to facilitate the determination by ECD-GC or UVD-HPLC. Recovery data were presented for more than sixty pesticides (organophosphorous, carbamate, synthetic pyrethroids, organochlorine pesticides and so on) in 19 crops. Average recoveries ranged from 70 to 120% at 0.1-10ppm fortification levels. The detection limits by the method were 0.005-0.05ppm.

This method is very useful for simultaneous quantitative analysis of various pesticide residues.

(2) A simple and efficient cleanup procedure for gas chromatographic determination of pesticide

residues was examined by using a charcoal-Florisil minicolumn. The pesticide residues were extracted with methanol, partitioned into toluene, cleaned up with the minicolumn and determined by ECD-GC and FTD-GC. Recovery data were obtained from 15 crops fortified with 25 pesticides at the tolerance level of each pesticide. Recoveries of 23 pesticides were higher than 90%, but dimethoate and oxadixyl resulted in a poor recovery which seemed to be due to their stronger polarities with an inefficient partitioning into toluene and a strong adsorption with Florisil in the elution system. The detection limits by the method were 0.01-0.02ppm for organophosphorous pesticides, 0.05ppm for carbamate and synthetic pyrethroid pesticides and 0.005ppm for organochlorine pesticides. The method was simple and applicable to the routine surveillance of various pesticide residues in many kind of crops.

(3) A number of substituted phenols and anilines are produced as the result of metabolism of various pesticides. Therefore, a sensitive general method for the analysis of phenols and anilines could be a useful tool for the determination of a number of pesticide residues. The author has developed the determination method of phenols and anilines derived from pesticides using a high performance liquid chromatograph with an electrochemical detector. The phenols and anilines were isolated from the hydrolysates by steam distillation/XAD-4 resin adsorption or solvent extraction, and determined by reversed-phase HPLC without derivatization. Subnanogram quantities of phenols and anilines were detected. Recoveries of 4-chlorophenol, 4-chloro-2-methylphenol and 2,4-dichlorophenol from eggplant samples fortified at 1ppm ranged from 78 to 102%, while those of 4-nitrophenol and 3-methyl-4-nitrophenol were poor. In case of aniline pesticides, recoveries of fluoroimido, anilazine, linuron, alachlor and iprodione from eggplant samples fortified at 0.4ppm were 100, 85, 68, 27 and 89%, respectively.

(4) A procedure for the determination of thiophanate methyl (TM), benomyl and their degradation products/metabolites in some crops was studied. At first, the separation and identification of the photodegradation products of thiophanate methyl (TM) were done by high performance liquid chromatography. The major degradation product of TM was MBC in both of an aqueous solution and a dry phase. The significant oxidation of TM occurred in the dry phase to form oxygen analogues of TM (OA-1 and OA-2).

Based on the facts mentioned above, the author examined the analytical method of TM and its degradation products by using high performance liquid chromatography (HPLC). TM and its degradation products were extracted with methanol, partitioned into ethyl acetate and cleaned up by alumina column chromatography prior to the determination by HPLC. Residues of TM, MBC and two oxygen analogues of TM (OA-1 and OA-2) were simultaneously determined by HPLC. Two types of normal phase columns (Nucleosil MH₂ and Partisil-10 PAC) were used with mobile phase consisting of hexane, dichloromethane and ethanol. The minimum detectable amount with a UV detector at 254 nm was ca.5 ng for TM, MBC, OA-1 and OA-2.

Recovery data were obtained from tomatoes, green peppers, grapes and strawberries fortified with TM, MBC, OA-1 and OA-2 at 0.5ppm levels. Average recoveries for TM, MBC, OA-1 and OA-2 were 75, 104, 70 and 75%, respectively.

And a rapid method for the quantitative analysis of MBC was also examined by using *in-situ* fluorescence spectroscopy on a TLC plate. The limit of sensitivity for this method was 0.005ppm based on 100g sample as MBC. The recovery was 114% at 0.2ppm fortification level.

(5) A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of

paraquat and diquat in crops and soils. The residues were extracted by boiling with diluted sulfuric acid, cleaned up by ion exchange column chromatography and determined by HPLC with an UV detector (254nm). The separation of paraquat and diquat was done on Partisil 10 SCX, using a mixture (85+15) or 2M ammonium phosphate buffer (pH 3.5)-acetonitrile as the mobile phase. This method was highly sensitive and its minimum detectable amount was 0.5 ng of paraquat. Paraquat and diquat did not interfere each other in the analysis. The analytical result of this method was in good agreement with that of the official colorimetric method.

The author analyzed paraquat in some agricultural commodities by this method and got no sample which exceeded the tolerance. And a simple extraction method for paraquat in soils was also developed.

(6) The quantitative determination methods of carbamate insecticides by colorimetry, fluorometry, gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and the qualitative analytical method of carbamate insecticides were developed.

In colorimetry, CPMC was extracted with dichloromethane and hydrolyzed to corresponding phenol, which was separated by steam distillation and then coupled with *p*-nitrobenzenediazonium ion to produce colored compound. It was cleaned up by alumina loose layer chromatography and determined by colorimetry. The detection limit was 0.03ppm based on 100g sample.

In fluorometry, carbaryl was cleaned up by TLC and determined by fluorometry (EX=265nm, EM=333nm). The detection limit was 0.05ppm based on 10g sample.

In gas chromatography, carbaryl was extracted with methanol, partitioned into dichloromethane and cleaned up by distribution between hexane and acetonitrile, coagulation and Florisil column chromatography. Carbaryl was hydrolyzed to 1-naphthol, which was then treated with monochloroacetic anhydride in benzene to prepare a stable phenol derivative sensitive to electron-capture detection. The minimum detectable amount was 0.01ng for carbaryl.

The HPLC method was examined for the determination of carbamate insecticides. It was not so sensitive as the GC, but useful for the formulation analysis.

The method consisted of polyamide TLC and diazo-coupling reaction was developed for the qualitative analysis of carbamate insecticides. The minimum detectable amounts ranged from 0.05 μ /spot for CPMC to 0.8 μ g/spot for XMC.

As mentioned above, the author established simple and effective cleanup procedures for the determination of multi pesticide residues by gas chromatography and high performance liquid chromatography, utilizing a preparative liquid chromatographic technique. Furthermore, using high performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection, the author improved the former analytical methods and developed new more sensitive analytical methods by which significant alteration products of pesticides were determined. The author hopes these methods are used for residue analysis of a variety of pesticides in agricultural products and/or environmental samples.

付表 本論文中で用いた略号

略号	
AUFS	Absorbance Unit Full Scale
BM	ベノミル
CC	カラムクロマトグラフィー
E_0	ゼロ電流電位
$E_{1/2}$	半波電位
E_L	限界電流電位
ECD-GC	電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー
FTD-GC	蛍光光度検出器付ガスクロマトグラフィー
GPC	ゲル浸透クロマトグラフィー
H	理論段数
HECD-GC	Hall 型電気伝導度検出器付ガスクロマトグラフィー
k'	保持比
k_1, k_2	近接した2つのピークの保持比
LCECD-HPLC	電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー
LPC	液・液分配クロマトグラフィー
MBC	カルベンダシム
N-P FID	FTD に同じ
OA-1	チオファネートメチルの酸素置換体 (構造式は p 64 を参照)
OA-2	チオファネートメチルの酸素置換体 (構造式は p 64 を参照)
OCF	o-クロロフェノール
R_s	分離能
R_t	保持時間
t	分析時間
t_0	保持されない化合物の保持時間
t_R	保持される化合物の保持時間
TRC	薄層クロマトグラフィー
TM	チオファネートメチル
u	移動相の流速
UVD-HPLC	紫外吸光光度検出器付高速液体クロマトグラフィー
α	分離度 k_2/k_1
ϵ	モル吸収係数
λ_{max}	極大吸収波長

APPENDIX Chemical names of pesticides mentioned by common name in the text.

Common name	Chemical name
Acephate	<i>O</i> , <i>S</i> -dimethyl <i>N</i> -acetylphosphoramidothioate
Alachlor	2-chloro-2', 6'-diethyl- <i>N</i> -(methoxymethyl) acetanilide
Aldrin	1, 2, 3, 4, 10, 10-hexachloro-1, 4, 4a, 8, 8a-hexahydro- <i>endo</i> -1, 4- <i>exo</i> -5, 8-dimethanonaphthalene
Allethrin	(<i>RS</i>)-3-allyl-2-methyl-4-oxo-2-cyclopentenyl (1 <i>RS</i>)- <i>cis</i> , <i>trans</i> -chrysanthenate
Anilazine (triazine)	2, 4-dichloro-6-(<i>o</i> -chloroanilino)-1, 3, 5-triazine
Benomyl	methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbamate
BHC	1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane
Bifenoxy	methyl 5-(2, 4-dichlorophenoxy)-2-nitrobenzoate
Blasticidin S	(<i>S</i>)-4-[[3-amino-5-(aminoiminomethyl) methylamino]-1-oxopentyl] amino]-1-(4-amino-2-oxo-(2 <i>H</i>)-pyrimidinyl)-1, 2, 3, 4-tetraoxy- β -D-erythro-hex-2-enopyranuronic acid
bromacil	5-bromo-3- <i>sec</i> -butyl-6-methyluracil
Captafol	<i>N</i> -(1, 1, 2, 2, -tetrachloroethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide
Captan	<i>N</i> -(trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide
Carbaryl (NAC)	1-naphthyl methylcarbamate
Carbendazim	2-(methoxycarbonylamino) benzimidazole
Carbofuran	2, 3-dihydro-2, 2-dimethyl benzofuran-7-yl methylcarbamate
Chlorobenzilate	ethyl 4, 4' -dichlorobenzilate
Chlorfenson (CPVBS)	2-chlorophenyl 2-chlorobenzenesulfonate
Chlorfenvinphos (CVP)	2-chloro-1-(2, 4-dichlorophenyl) vinyl diethylphosphate
Chlornitrofen (CNP)	<i>P</i> -nitrophenyl 2, 4, 6-trichlorophenyl ether
Chlorothalonil (TPN)	tetrachloroisophthalonitrile
Chlorpyrifos	<i>O</i> , <i>O</i> '-diethyl <i>O</i> -3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
CPMC	2-chlorophenyl methylcarbamate
Cycloprothrin	(<i>RS</i>)-2-cyano-3-phenoxybenzyl (<i>RS</i>)-2, 2-dichloro-1-(4-ethoxyphenyl)-cyclopropanecarboxylate
Cyfluthrin	(<i>RS</i>)- α -cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-(1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Cyhalothrin	(<i>RS</i>)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (<i>Z</i>)-(1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-3-(2-chloro-3, 3, 3-trifluoropropenyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Cypermethrin	(<i>RS</i>)-2-cyano-3-phenoxybenzyl (1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-(1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate

Common name	Chemical name
DDT	1, 1, 1-trichloro-2, 2'-bis (p-chlorophenyl) ethane
Diazinon	<i>O, O</i> -diethyl <i>O</i> -2-isopropyl-6-methyl pyrimidin-4-yl phosphorothioate
Dichlofenthion (ESP)	<i>O</i> -(2, 4-dichlorophenyl) <i>O, O'</i> -diethyl phosphorothioate
Dichlofluanid	<i>N</i> -(dichlorofluoromethylthio)- <i>N' N'</i> -dimethyl- <i>N</i> -phenyl-sulfamide
Dichlorvos (DDVP)	2, 2-dichlorovinyl dimethyl phosphate
Dicloran (CNA)	2, 6-dichloro-4-nitroaniline
Dieldrin	1, 2, 3, 4, 10, 10-hexachloro-6, 7-epoxy-1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-endo-1, 4- <i>exo</i> -5, 8-dimethanonaphthalene
Diquate	1, 1'-ethylene-2, 2'-dipyridylium dibromide
Dimethoate	<i>O, O</i> -dimethyl <i>S</i> -methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate
Disulfoton	<i>O, O</i> -diethyl <i>S</i> -2-ethylthioethyl phosphorothiolothionate
Edifenphos (EDDP)	<i>O</i> -ethyl <i>S, S</i> -diphenyl phosphorodithioate
Endosulfan	6, 7, 8, 9, 10, 10-hexachloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahydro-6, 9-methano-2, 4, 3-benzodioxathiepin 3-oxide
Endrin	1, 2, 3, 4, 10, 10-hexachloro-6, 7-epoxy-1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-endo-1, 4- <i>endo</i> -5, 8-dimethanonaphthalene
EPN	<i>O</i> -ethyl <i>O</i> -4-nitrophenyl phenylphosphonothioate
Etridiazol (eachlomezol)	5-ethoxy-3-trichloromethyl-1, 2, 4-triadiazole
Fenarimol	2, 4'-dichloro- α -(pyrimidin-5-yl) benzhydryl alcohol
Fenitrothion (MEP)	<i>O, O</i> -dimethyl <i>O</i> -4-nitro- <i>m</i> -tolyl phosphorothioate
Fenobucarb (BPMC)	2- <i>sec</i> -butylphenyl methylcarbamate
Fenvalerate	(<i>RS</i>)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (<i>RS</i>)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutanoate
Flucythrinate	(<i>RS</i>)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (<i>S</i>)-2-(4-difluoromethoxyphenyl)-3-methylbutylate
Fluoroimide	2, 3-dichloro- <i>N</i> -4-fluorophenyl maleimide
Flutolanil	α, α, α -trifluoro-3'-isopropoxy- <i>O</i> -toluanilide
Fluvalinate	(<i>RS</i>)- α -cyano-3-phenoxybenzyl <i>N</i> -(2-chloro- α, α, α -trifluoro- <i>p</i> -tolyl)- <i>D</i> -valinate
Fthalide	4, 5, 6, 7-tetrachlorophthalide
Glyphosate	<i>N</i> -(phosphonomethyl)glycine
Heptachlor	1, 4, 5, 6, 7, 8, 8-heptachloro-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-4, 7-methano indene
Iprobennfos (IBP)	<i>S</i> -benzyl <i>O, O</i> -diisopropyl phosphorothioate
Iprodione	3-(3, 5-dichlorophenyl)- <i>N</i> -isopropyl-2, 4-dioximidazolone-carboxamide

Common name	Chemical name
Isoprocarb (MIPC)	<i>o</i> -cumenyl methylcarbamate
Isoxathion	diethyl 5-phenyl-3-isoxazolyl phosphorothioate
Kasugamycin	[5-amino-2-methyl-6-(2, 3, 4, 5, 6-pentahydroxy-cyclohexyloxy) tetrahydropyran-3-yl] amino- α -iminoacetic acid
Kelthane	2, 2, 2-trichloro-1, 1'-bis (4-chlorophenyl) ethanol
Linuron	3-(3, 4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea
Malathion	<i>S</i> -1, 2-bis (ethoxycarbonyl) ethyl <i>O, O</i> -dimethyl phosphorodithioate
Maneb	manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric)
MCPA (MCP)	4-chloro- <i>o</i> -tolylxyacetic acid
Metalaxyl	methyl <i>N</i> -(2-methoxyacetyl)- <i>N</i> -(2, 6-xylyl)-DL-alaninate
Methidathion (DMTP)	<i>S</i> -2, 3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1, 3, 4-triazol-3-yl-methyl <i>O, O</i> -dimethyl phosphorodithioate
Metolachlor	2-chloro-6'-ethyl- <i>N</i> -(2-methoxy-1-methylethyl) aceto- <i>o</i> -toluidide
Metolcarb (MTMC)	<i>m</i> -tolyl methylcarbamate
Nitrophen (NIP)	2, 4-dichlorophenyl <i>p</i> -nitrophenyl ether
Oxadiazon	<i>S</i> - <i>tert</i> -butyl-3-(2, 4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1, 3, 4-oxadiazolin-2-one
Oxadixyl	2-methoxy- <i>N</i> -(2-oxo-1, 3-oxazolidin-3-yl)-aceto-2', 6'-xylylidide
Oxycarboxin	5, 6-dihydro-2-methyl-1, 4-oxathin-3-carboxanilide 4, 4-dioxide
Paraquat	1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridylium dichloride
Parathion	<i>O, O</i> -diethyl <i>O</i> -4-nitrophenyl phosphorothioate
Parathion-methyl	<i>O, O</i> -dimethyl <i>O</i> -4-nitrophenyl phosphorothioate
PCP	pentachlorophenol
Permethrin	3-phenoxybenzyl (1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-(1 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i>)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Phenísobromolate	isopropyl <i>p, p</i> '-dibromobenzilate
Phenthoate (PAP)	<i>S</i> - α -(ethoxycarbonyl) benzyl dimethyl phosphorodithioate
Phosalone	<i>S</i> -(6-chloro-2-oxo-3-benzoxazoliny) methyl <i>O, O</i> -diethyl phosphorodithioate
Pirimicarb	2-dimethylamino-5, 6-dimethylpyrimidin-4-yl dimethylcarbamate
PMA	phenylmercury acetate

Common name	Chemical name
Pretilachlor	2-chloro-2', 6'-diethyl-N-(2-propoxyethyl)acetanilide
Procymidone	N-(3, 5-dichlorophenyl)-1, 2-dimethylcyclopropane-1, 2-dicarboximide
Profenofos	O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate
Propanil (DCPA)	3', 4'-dichloropropionanilide
Propoxur (PHC)	2-isopropoxyphenyl methylcarbamate
Propyzamide	3, 5-dichloro-N-(1, 1-dimethyl-2-propynyl)benzamide
Prothiofos	O-2, 4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate
Pyrazoxyfen	2-[4-(2, 4-dichlorobenzoyl)-1, 3-dimethylpyrazol-5-yloxy] acetophenone
Quintozone	pentachloronitrobenzene
Swep (MCC)	methyl 3, 4-dichlorocarbamate
TEPP	tetraethyl pyrophosphate
Tetradifon	4-chlorophenyl 2, 4, 5-trichlorophenyl sulfone
Thiophanate methyl	dimethyl 4, 4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate)
Tolclofos-methyl	O-2, 6-dichloro-p-tolyl O, O-dimethyl phosphorothioate
Tralomethrin	(S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R, 3S)-2, 2-dimethyl-3-[(RS)-1, 2, 2-tetrabromomethyl] cyclopropanecarboxylate
Triadimefon	1-(4-chlorophenoxy)-3, 3-dimethyl-1-(1H-1, 2, 4-triazol-1-yl)butanone
Trichlorfon (DEP)	dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate
Vinclozolin	(RS)-3-(3, 5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-1, 3-oxazolidine-2, 4-dione
XMC	3, 5-xylyl methylcarbamate
Xylylcarb (MPMC)	3, 4-xylyl methylcarbamate
Zineb	zinc ethylene-bis(dithiocarbamate)(polymeric)
2, 4-D	(2, 4-dichlorophenoxy)acetic acid

農薬製剤の補助成分に関する迅速多重検査法の検討

第2報 乳剤中の補助成分の検査法

西澤幸夫・廣瀬欣也・鈴木 修

農薬製剤は、有効成分のほか、作物体への付着性や製剤の散布性能の向上などのために添加された有機溶剤や界面活性剤などの補助成分とから成っている。近年、農薬をより効率的に施用するための製剤の改良研究が進み、従来の乳剤や水和剤のほかにも有効成分を懸濁状態で製剤化したもの、あるいは有効成分を高分子膜で包んだマイクロカプセル剤などが実用化された。製剤型が多様化するにつれて、それらに使用される補助成分の種類が多くなってきた。

これらの補助成分は、工業用薬品の中からその物理化学性や価格などを考慮して選択される。できあがった製剤は人、家畜あるいは作物などに対する安全性について予め試験を行ない、通常的使用方法で使用して、問題がないことを確認されなければならない。農薬の安全性を検討する場合、有効成分の品質のほか、補助成分の種類や品質が重要な要素である。

しかし、これらの補助成分は近縁化合物の混合物であることが多く、従来のクロマトグラフィー技術では成分の同定が容易ではない。

核磁気共鳴装置(NMR)は、測定物質が混合物であっても、それに含まれる成分について多くの情報をもたらすことから、我々はNMRを用いた農薬製剤中の補助成分の検査方法を検討している。本報では、乳剤中補助成分の同定を簡便迅速に行なう方法について、界面活性剤を中心に検討した。

材料及び方法

1. 試薬

測定用溶媒： 重水素化クロロホルム(重水素化率99.8%) CDCl_3

内部標準物質： テトラメチルシラン $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$
(以下「TMS」と記す)

測定物質：

界面活性剤標準試料：

ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテル

ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル

ポリオキシエチレンひまし油エーテル

ジオクチルスルホサクシネート

(プロピレングリコール溶液)

溶剤等；

p-キシレン(試薬特級)

キシロール(工業用キシレン)

エチルセロソルブ(試薬特級)

3-メチル-3-メトキシブタノール(工業用)

農薬製剤；

製剤A, B, C： ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテルを含有する乳剤

製剤D： ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテルを含有する乳剤

2. 器具および装置

NMR装置： JNM-GSX-400(日本電子製)

プローブ： NM-G40/T10(内径10mm多核用)

観測中心： 399.7MHz(^1H), 100.5MHz(^{13}C)

3. 標準溶液および試料溶液の調整

界面活性剤標準試料等約200mgを別々の内径10mmの試料管(以下「10mm試料管」と記す)に採り、0.03% TMS入り CDCl_3 を加えて溶解させ、3.5mlの測定溶液とした。

また、乳剤200mg~2gを10mm試料管に採り、以下標準物質と同様に溶解させて測定溶液とした。

測定条件の検討及び結果

1. ^{13}C -NMRの操作条件の検討

(1) データーポイント： データーポイントを多くすることにより ^{13}C -NMRシグナルが明確になり、シグナル/ノイズ(S/N)比も改善された。前報¹⁾では、 ^{13}C -NMRのデーターポイントを32,768に設定したが、この点数ではシグナルの明確さがなお不十分であったので、本試験ではデーターポイントを65,536に設定した。

(2) パルス間隔： 測定時間を一定にした場合、界面活性剤(ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテル等)をパルス間隔1.5秒で測定するより、0.75秒とし積算回数を2倍にした方がS/N比が向上した。一方、TMSや溶媒などの低分子化合物では、反対にS/N比が悪化するシグナルの方が多かった。ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテルの例をFig. 1-1, 2に示す。

(3) フリップ角： フリップ角を増加させるとシグナル強度も増加し、界面活性剤では60°で最高に達するシグナルピークが多かった。しかし、4級炭素のシグナルは、60°ではかえって強度が減少した。また、低分子化合物では、一般に45°の方がS/N比が良好であった (Fig.1-3)。

上記の検討の結果、¹³C-NMRの操作条件を以下、条件A (低分子化合物の感度も考慮した条件)及び条件B (界面活性剤の非四級炭素を重視した条件)とした。

	条件A	条件B
観測領域	30,120Hz	同左
フィルター幅	15,050Hz	同左
データポイント	65,536	同左
フリップ角	45°	60°
パルス間隔	1.5秒	0.75秒
積算回数	1,024回	2,048回
¹ H核のデカップリング	完全デカップリング	同左

2. 界面活性剤標準試料を用いた測定

4種類の界面活性剤 (ポリオキシエチレンアルキルアールエーテル, ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテル, ポリオキシエチレンひまし油エーテル, ジオクチルスルホサクシネート) を3種類の溶剤 (キシレン, エチルセロソルブ, 3-メチル-3-メトキシブタノール) に溶解させて、界面活性剤の各溶剤中の濃度が1~10%の溶液 (模擬製剤) を調製し、この溶液200mg~2gを試料管に採取し、上記の条件により測定した。

この濃度及び採取量の範囲においては、試料管内の界面活性剤量が同じであれば、界面活性剤由来の¹³C-NMRシグナルのS/N比は、ほぼ一定であった。

一方、界面活性剤由来のシグナルの δ 値 (TMSシグナルとの共鳴周波数の差を共鳴周波数で割った値。単位ppm。)は、試料管内の界面活性剤量が同じであっても、試料管への模擬製剤採取量 (=溶剤量) に応じて変化した。

ジオクチルスルホサクシネートの1%キシレン溶液の採取量の変化に伴う¹³C-NMRスペクトルの変化をFig.2に示す。採取量の増加につれてシグナル強度は強くなるが、シグナルの δ 値の変化も拡大した。試料管中1gでは0.1~0.2ppm程度の、2gでは0.2~0.4ppm程度の変動が見られた (また、試料管中2gでは1本のシグナルが2本に分かれることもあった)。

シグナルの δ 値が ± 0.1 ppm以内の変動であれば、補助成分同定に支障ないので、界面活性剤の大半のシグナルがこの範囲に始まる最大量400mgを標準的な乳剤調

定条件とした。

模擬製剤400mgを採取し、条件A (フリップ角45°, パルス間隔1.5秒, 積算回数1,024回)により測定した場合、各界面活性剤の¹³C-NMR特異シグナルの最小検出濃度は界面活性剤の種類によりやや差がみられ、模擬製剤中の含有率で1~3% (試料400mg中4~12mg)であった。

3. 市販製剤中の界面活性剤の同定

代表的界面活性剤であるポリオキシエチレンステリルフェニルエーテルを含有している3種類の市販乳剤について、その確認を試みた。

本品を10%程度含有している乳剤Aでは、ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテルに特徴的にみられる37.3ppm, 44.5ppm付近のシグナル (Fig.3-1)を、条件Aで容易に確認できた (Fig.3-2)。3%程度これら含有している乳剤Bでは、当該シグナルと思われるシグナルを条件Aで得られるものの、S/N比が低いためピークトップの δ 値の読み取りがやや困難であった (Fig.3-3)が、条件B (60°-0.75秒-2,048回積算)で測定することにより明確に確認できた (Fig.3-4)。含有量が2%程度と低い乳剤Cでも、条件Bにより、ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテル特有のシグナルを明らかに認めることができた (Fig.3-5)。

また、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテルを6%程度含有している製剤Dにおいても、ポリオキシエチレン鎖のオルト位のベンゼン環炭素に由来すると考えられる113.7ppm付近のシグナルを容易に確認することができた。

4. 低分子化合物の添加試験

乳剤Aへのエチルセロソルブ添加試験の結果をFig.4に示す。前報¹⁾の条件では積算時間を延長しない限り2%添加条件が検出限界であったが、本報の条件ではS/N比が改善されているため、1%添加でも十分にシグナルとして認められた。反面、測定溶液中の乳剤濃度を2倍としたことに伴い、シグナルの δ 値の変動も0.1ppm程度から0.2ppm程度に拡大した。ただし、この例でもエチルセロソルブの71.5, 61.9ppmのシグナル以外は、本報の条件でも概ね0.1ppm以内の変動であった。このように、特に変動しやすいシグナルについては、別途、変動範囲を把握しておく必要があると考えられる。

考 察

¹H-NMRは、¹³C-NMRの100倍以上の感度を有するものの、混合物の分析では、互いに他の成分のシグナルと重なりやすく、これだけでは成分を同定することが困難な場合が多い。

一方、 ^{13}C -NMRの測定では、20~50mgの試料を用いて測定されることが多いが、分子量が大きな試料の場合は一般に更に感度が低下するため、測定に時間をかける必要がある。このことは ^{13}C -NMRの短所であるが、 ^1H 核完全デカップリング条件のシグナルは鋭く、出現範囲も広いため、混合物中でも共存成分のシグナルと重なりにくい長所があり、構造の類似した化合物間の識別にも有利である。

しかし、 ^1H -NMRが不要と言うわけではなく、 ^{13}C -NMRの結果と ^1H -NMRの結果が整合して、初めて意味のあることは当然である。

^{13}C -NMRの感度を補うため、試料管中の測定物質を多くすると、シグナルの δ 値が変化して、同定が困難になる。このため、前報¹⁾では、共存成分の有無によるシグナル出現位置の再現性を重視して40mgを標準的に使用されている5mm試料管内に採取した。ただし、前報¹⁾では、製剤中に10%程度含まれている界面活性剤の検出も困難であった。

本報告では、5倍の容量のある10mm試料管を使用し、乳剤の測定に当たっては、 CDCl_3 に対する試料濃度も前報¹⁾の2倍を増やして400mgを採取した。

測定溶液の全試料に対する濃度が同じ場合、10mm試料管使用時は5mm試料管使用時に比べ、S/N比が約2倍改善された。また、シグナルの δ 値もほぼ同じであった。

なお、模擬製剤測定にあたり、 ^{13}C -NMR同様、 ^1H -NMR（前報¹⁾の条件で測定）についても模擬製剤採取量の増加に伴いシグナルの δ 値が変化したが、S/N比については大きな改善は見られなかった。 ^1H -NMRでは、非主要シグナルのS/N比がA/Dコンバータの分解能（12ビット）に制約されているためと考えられる。

今回の検討の結果、乳剤中に3%（試料管中12mg）以上含有されている界面活性剤成分について、1時間程度の測定で成分を確認することができた。この条件により、半分以上の乳剤について、主要界面活性剤を確認

できると推定される。

なお、試料管への採取量をさらに増やして測定することは、シグナルの δ 値が変動し同定が不確実になるものの、シグナルの存在が明確になるので、スクリーニング試験として、十分に意義があると考えられる。

今後、農薬の品質管理に資するために更に農薬製剤中の補助成分データ等を蓄積して、その効率的活用を図りたい。

要 旨

我々は、製剤の品質管理上の観点から、乳剤中の補助成分をNMRを用いて簡便に確認する方法を開発した。

直径10mmのNMR試料管に、乳剤約400mgを重クロロホルムに溶解させ、 ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRの測定を行った。

^{13}C -NMR測定条件は以下の通りである。

< ^{13}C -NMR測定条件>	条件A	条件B
観測中心	100.5MHz	同左
観測領域	30,120.5 Hz	同左
フィルター幅	15,050 Hz	同左
データポイント	65,536	同左
フリップ角	45°	60°
パルス間隔	1.5秒	0.75秒
積算回数	1,024	2,048
^1H 核のデカップリング	完全デカップリング	同左

条件A：低分子化合物の感度も考慮した条件

条件B：界面活性剤の非四級炭素を重視した条件

本検討における界面活性剤の検出限界は、製剤中に1~3%であった。

引用文献

- (1) 西澤幸夫, 小倉一雄, 百 弘: 農薬検査所報告 29, 17 (1989)

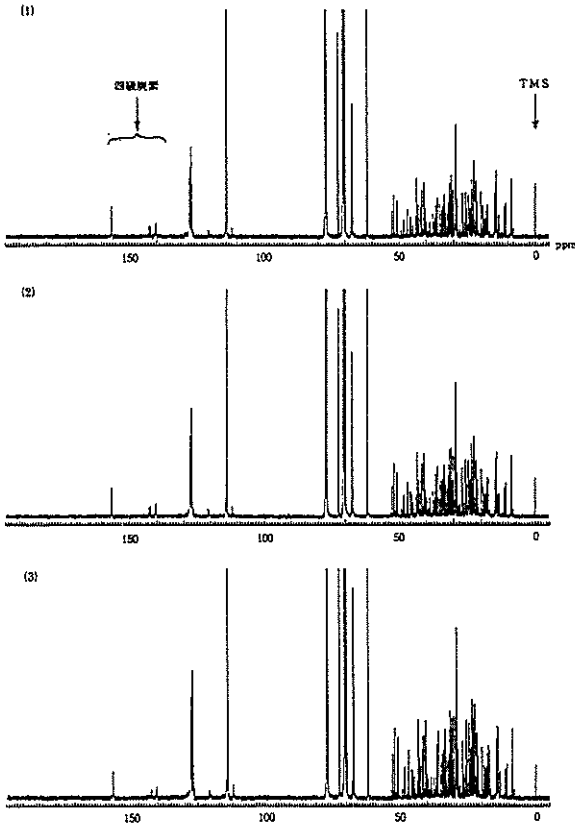


Fig 1

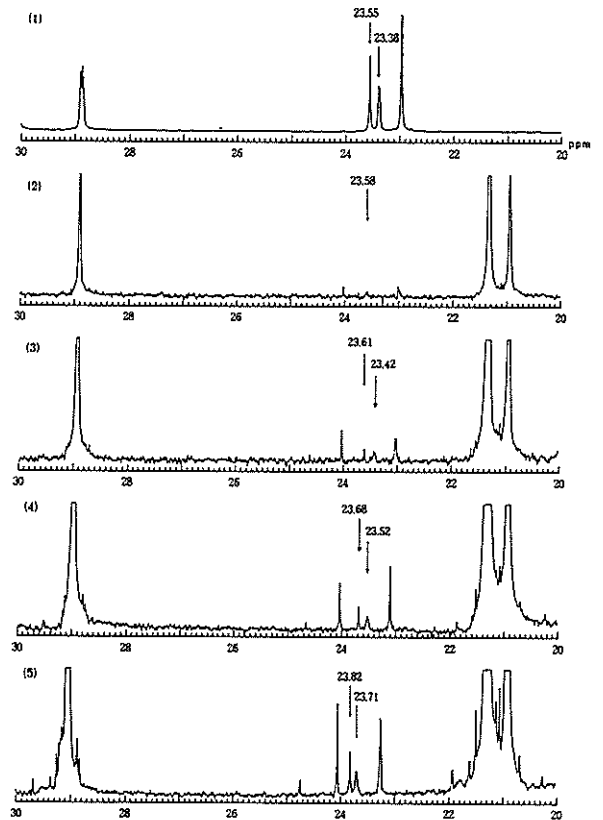


Fig 2

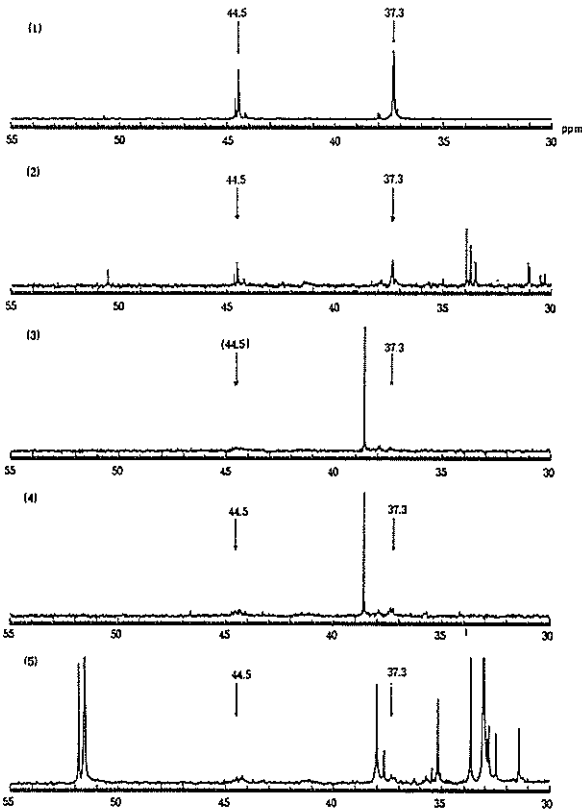


Fig 3

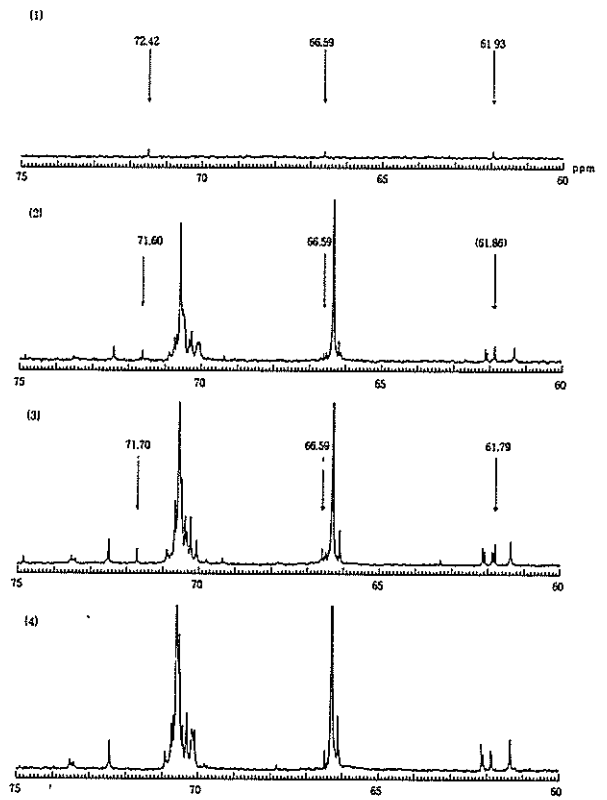


Fig 4

Fig.1 フリップ角とパルス間隔の各々の条件における¹³C-NMRスペクトルFig.1 ¹³C-NMR spectra under the several conditions of flip angle and pulse repetition time

- (1) flip angle = 45°, pulse repetition time = 1.5 sec., accumulation times = 1024
- (2) flip angle = 45°, pulse repetition time = 0.75 sec., accumulation times = 2048
- (3) flip angle = 60°, pulse repetition time = 0.75 sec., accumulation times = 2048

Fig.2 ジオクチルスルホサクシネート及びその1%キシロール溶液の¹³C-NMRスペクトルFig.2 ¹³C-NMR spectra of dioctylsulfosuccinate and 1% xylo solution of this agent

- (1) dioctylsulfosuccinate 200mg/tube
- (2) 1% solution 200mg/tube
- (3) 1% solution 400mg/tube
- (4) 1% solution 1g/tube
- (5) 1% solution 2g/tube

Fig.3 ポリオキシエチレンステリルフェニルエーテルを含む乳剤の¹³C-NMRスペクトルFig.3 ¹³C-NMR spectra of emulsifiable concentrate containing polyoxyethylenestyrylphenylether

- (1) polyoxyethylenestyrylphenylether 200mg/tube condition A
- (2) emulsifiable concentrate A 200mg/tube condition A
- (3) emulsifiable concentrate B 400mg/tube condition A
- (4) emulsifiable concentrate B 400mg/tube condition B
- (5) emulsifiable concentrate C 400mg/tube condition B

condition A & B was as follows :

A : flip angle = 45°, pulse repetition time = 1.5 sec., accumulation times = 1024

B : flip angle = 60°, pulse repetition time = 0.75sec., accumulation times = 2048

Fig.4 エチルセロソルブ、乳剤A及びその混合物の¹³C-NMRスペクトルFig.4 ¹³C-NMR spectra of ethylcellosolve, emulsifiable concentration A and their mixtures

- (1) ethylcellosolve 2mg/tube
- (2) emulsifiable concentration A + 1% ethylcellosolve 200mg/tube
- (3) emulsifiable concentration A + 1% ethylcellosolve 400mg/tube
- (4) emulsifiable concentration A 400mg/tube

Summary

Establishment of quick multiple analytical method
for inert ingredients of pesticide formulation
(Part 2) Analytical method for inert ingredients of emulsifiable concentrate

Yukio Nishizawa, Kinya Hirose and Osamu Suzuki

We developed the easier method to confirm inert ingredients, such as surfactant, in emulsifiable concentrate, by *nuclear magnetic resonance (NMR)*.

In a 10-mm O.D. sample tube, were placed 400 mg of emulsifiable concentrate, dissolved in CDCl_3 and determined with $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$.

The operating conditions for $^{13}\text{C-NMR}$ were as follows:

	$^{13}\text{C-NMR}$	
	condition-A	condition-B
observed center	100.5 MHz	100.5 MHz
observed region	30,120.5 Hz	30,120.5 Hz
filter range	15,050 Hz	15,050 Hz
data points	65,536	65,536
flip angle	45°	60°
pulse repetition time	1.5 Sec	0.75 Sec
accumulation times	1,024	2,048
irradiant of ^1H -region	complete	complete

Condition-A was suitable to the determination of low molecular compounds

Condition-B was suitable to the determination of non quarternary carbon atoms of surfactants

In this study, the four surfactants was determined at the lowest levels of 3% in emulsifiable concentrates.

活性炭による水中からの農薬の除去と 魚毒性低減化^{*})

西内 康浩

化学物質の魚類に対する毒性低減化については、アスコルビン酸がコイ(山本義和ら1977)¹⁾、ニジマス(山本義和ら1981)²⁾で銅の毒性を緩和する作用があることや、除草剤モリネートによるコイの貧血症がビタミンK₂誘導体によって防止できる(Kawatsu *et al.* 1989)³⁾、(末田 昇ら1990)⁴⁾という報告がある。しかし、これらの方法は限られた農薬にのみ有効である。

活性炭は無機化合物から有機化合物に至る広い範囲の化合物を水中から除去するために用いられてきた。著者は近年のゴルフ場周辺への農薬流出問題の発生等から農薬が水系に流出した際、農薬の魚介類への影響を迅速に低減させる方法として活性炭の利用を考え、活性炭による各種農薬の水中からの除去効果を、魚類を供して調査したのでここに報告する。

材料及び方法

供試生物はヒメダカ *Oryzias latipes* (平均全長3.2cm, 平均体重0.31g) で、供試個体数は5尾宛、2連区とした。供試農薬は殺虫剤90, 殺菌剤47, 除草剤26, 植物成長調整剤12, その他2, 合計177検体である。試験は、25℃の所定濃度に調整した1 lの薬液中に粉末活性炭(和光特級037-02115, Charcoal, Activated, Powder)を0, 0.01及び0.1%添加・攪拌した後、直ちに供試生物を収容した試験区と、これを24時間静置した後に供試生物を収容した試験区を設定し、それぞれ48時間後のLC-50値(以下、単にLC-50値と記すこととする)を算出した。LC-50値の算出方法はダートロフの方法⁵⁾によった。なお、採用した濃度段階は既知のヒメダカに対する各農薬のLC-50値をもとにして公比4/3倍で所定濃度を設定し、試験を行った。

結果及び考察

本試験に先立ち、活性炭の種類による魚類への毒性低減の差異を知るため、顆粒状と粉末とを用い調べたところ、後者で顕著な効果を示すことがわかった。このことから、本試験においては全て後者を使用することとした。なお、活性炭のヒメダカへの毒性は、10%添加区におい

てもとくに異常を認めないことを確認している。

本試験の概要は第1表に示した通りである。この表から、ヒメダカに対する農薬のLC-50値と活性炭による毒性低減の相対比を調べてみると、第2表のようになり、LC-50値が小さくなるにつれて、毒性低減の相対比が顕著に高くなることがわかった。たとえば、殺虫剤ベンゾエピン乳剤では活性炭添加率0%(A), 0.01%(B), 0.1%(C)区でLC-50値がそれぞれ0.0056, 6.4, 35ppm, としてB/A及びC/Aが, 1,143及び6,250となり、除草剤エチジムロン水和剤では活性炭添加率0%(A), 0.01%(B), 0.1%(C)区でLC-50値がそれぞれ2,100, 2,700, 3,600ppmで、B/A及びC/Aがわずかに1.29及び1.71にとどまった。つまり、魚類への毒性が高くなっていくということは、低濃度になるにつれてその薬液中に存在する農薬量が少ないということであり、一定量の活性炭を添加したときにそれが吸着し得る薬量の相対比がそれだけ高くなるためと考えられる。

次に、所定濃度調整薬液に活性炭添加後直ちに供試生物を放した区と、24時間後に放した区における毒性低減比を調べたが、両者間にはそれほど顕著な差が見られず、2倍以内である例が多かった。このことから、活性炭による農薬の吸着は処理後速やかに起こるものと考えられる。

文 献

- 1) 山本義和・石井知幾・佐藤 守・池田静徳：日本水産学会誌, 43, 989~993 (1977)。
- 2) 山本義和・早山高彦・池田静徳：日本水産学会誌, 47, 1,085-1,089 (1981)。
- 3) Kawatsu, H・K. Kondo and K.Kubono: Japan, Soc. Sci., 55, 779~783 (1989)。
- 4) 末田 昇・佐塚直孝・川津浩嗣：平成2年度日本水産学会春季大会(東京), 講演要旨, 522, p.153 (1990)。
- 5) Doudoroff, P. *et al.* 1951: Bioassay method for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sewage and Industrial Wastes, 23(11), 1380~1397。

*) 要旨は、日本農薬学会第16回大会(1991・名古屋)において発表した。

第1表 活性炭の添加率と農薬のヒメダカに対する毒性(25°C, LC-50値, 48hr; ppm)
 Table 1. Decreasing effect of dust activated charcoal on the toxicity of pesticides
 to *Oryzias latipes* (25°C, LC-50 values, 48hr; ppm)

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal (%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
《 Insecticide 》 benfuracarb	TP	0	0.055	12	64	218	5.33	1,164
		24	0.058	23	180	397	7.83	3,103
benfuracarb	G	0	2.3	360	3,300	157	9.17	1,435
		24	14	640	4,300	45.7	6.72	307
benzomate	TP	0	3.4	>100	>100	>29.4	-	>29.4
		24	5.3	>200	>200	>37.7	-	>37.7
carbosulfan	TP	0	0.10	12	33	120	2.75	330
		24	0.18	13	76	72.2	5.85	422
carbosulfan	G	0	2.8	120	1,400	42.9	11.7	500
		24	2.8	170	1,600	60.7	9.41	571
cartap	TP	0	0.33	18	76	54.5	4.22	230
		24	0.35	18	76	51.4	4.22	217
cartap + flucythrinate	〔 WP 〕	0	0.43	23	180	53.5	7.83	419
		24	0.45	23	430	51.1	18.7	956
chlorfenvinphos (CVP)	TP	0	0.23	43	>100	187	>2.33	>435
		24	0.25	75	>200	300	>2.67	>800
chlorfluazuron	〔 EC 〕	0	14	190	1,800	13.6	9.47	129
		24	25	480	2,100	19.2	4.38	84.0
chloropicrin	TP	0	0.33	7.3	21	22.1	2.88	63.6
		24	18	75	120	4.17	1.60	6.67
chlorpyrifos	TP	0	0.68	>100	>100	>147	-	>147
		24	1.0	>200	>200	>200	-	>200
cyanophos (CYAP)	EC	0	17	140	360	8.24	2.57	21.2
		24	21	230	950	11.0	4.13	45.2
cycloprothrin	G	0	100	160	220	1.60	1.38	2.20
		24	150	180	250	1.20	1.39	1.67
cycloprothrin	D	0	130	180	240	1.38	1.33	1.85
		24	180	210	280	1.17	1.33	1.56
cyfluthrin	TP	0	0.024	15	22	625	1.47	917
		24	0.090	25	78	278	3.12	867
cyfluthrin	EC	0	0.050	20	200	400	10.0	4,000
		24	0.86	76	210	88.4	2.76	244
cyfluthrin	EC(EW)	0	0.056	7.3	86	130	11.8	1,536
		24	0.064	7.5	88	117	11.7	1,375
cyfluthrin	SL	0	0.075	13	>100	173	>7.69	>1,333
		24	0.080	13	>100	163	>7.69	>1,250
cyhalothrin	TP	0	0.033	9.5	38	288	4.00	1,152
		24	0.064	33	140	516	4.24	2,188

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	additive rate of activated charcoal (%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
cyhalothrin	EC	0	0.030	3.5	12	117	3.43	400
		24	0.073	2.2	24	30.1	10.9	329
cyhalothrin	WP	0	0.033	7.8	35	236	4.49	1,061
		24	0.12	11	38	91.7	3.45	317
cypermethrin	TP	0	0.033	23	53	697	2.30	1,606
		24	0.086	120	>200	1,395	>1.67	>2,326
cypermethrin	EC	0	0.065	7.8	40	120	5.13	615
		24	0.065	28	73	431	2.61	1,123
cypermethrin	WP	0	0.053	7.3	100	138	13.7	1,887
		24	0.10	13	110	130	8.46	1,100
diazinon	WP	0	10	170	1,200	17.0	7.06	120
		24	12	170	1,300	14.2	7.65	108
dicofol	EC	0	2.1	84	530	40.0	6.31	252
		24	2.3	110	580	47.8	5.27	252
endosulfan	TP	0	0.014	3.6	36	257	10.0	2,571
		24	0.13	7.6	90	58.5	11.8	692
endosulfan	EC	0	0.0056	6.4	35	1,143	5.47	6,250
		24	0.043	10	75	233	7.50	1,744
endosulfan	WP	0	0.021	2.1	86	100	50.0	4,095
		24	0.035	10	170	256	17.0	4,857
E P N	TP	0	1.5	75	>100	50.0	>1.33	>66.7
		24	2.1	>200	>200	>95.2	-	>95.2
E P N	EC	0	1.0	43	360	43.0	8.37	360
		24	1.3	45	380	34.6	8.44	292
ethiofencarb	EC	0	4.3	28	380	6.51	13.6	88.4
		24	11	43	760	3.91	17.7	69.1
ethofenprox	EC	0	0.25	13	170	52.0	13.1	680
		24	3.3	180	210	54.5	1.17	63.6
ethofenprox	WP	0	4.6	230	370	50.0	1.61	80.4
		24	5.5	250	410	45.5	1.64	74.5
etrimfos	EC	0	12	75	1,100	6.25	14.7	91.7
		24	14	150	1,200	10.7	8.00	85.7
fenbutatin oxide	TP	0	0.30	7.6	27	25.3	3.55	90.0
		24	0.38	14	38	36.8	2.71	100
fenbutatin oxide	EC	0	0.15	7.3	20	48.7	2.74	133
		24	0.43	7.5	35	17.4	4.67	81.4
fenbutatin oxide	WP	0	1.8	36	1,200	20.0	33.3	667
		24	2.5	50	2,100	20.0	42.0	840
fenobucarb (BPMC)	TP	0	1.0	23	180	23.0	7.83	180
		24	1.7	55	>200	32.4	>3.64	>118

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal(%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
fenothiocarb	TP	0	1.5	30	>100	20.0	>3.33	>66.7
		24	1.8	73	>200	40.6	>2.74	>111
fenothiocarb	EC	0	0.68	24	>100	35.3	>4.17	>147
		24	0.73	78	>200	107	>2.56	>274
fenoxycarb	TP	0	1.4	>100	>100	>71.4	-	>71.4
		24	3.2	>200	>200	>62.5	-	>62.5
fenoxycarb	WP	0	2.3	180	750	78.3	4.17	326
		24	2.5	380	1,400	152	3.68	560
fenpropathrin	TP	0	0.012	9.5	23	792	2.42	1,917
		24	0.055	25	>200	455	>8.00	>3,636
fenpropathrin	EC	0	0.025	2.8	7.3	112	2.61	292
		24	0.025	3.5	13	140	3.71	520
fenpropathrin	WP	0	0.028	5.0	38	179	7.60	1,357
		24	0.028	11	78	393	7.09	2,786
fenpropathrin	SP	0	0.75	170	480	227	2.82	640
		24	4.3	310	680	72.1	2.19	158
fenpyroximate	TP	0	0.018	2.1	18	117	8.57	1,000
		24	0.020	5.0	53	250	10.6	2,650
fenpyroximate	WP	0	0.018	1.8	21	100	11.7	1,167
		24	0.026	3.3	210	127	63.6	8,077
fenvalerate	TP	0	0.0058	14	68	2,414	8.86	11,724
		24	0.075	15	70	200	4.67	933
fenvalerate + malathion	(WP)	0	0.11	36	480	327	13.3	4,364
		24	0.33	110	840	333	7.64	2,545
fluvalinate	TP	0	0.093	14	70	151	5.00	753
		24	0.093	38	>200	409	>5.26	>2,151
flucythrinate	EC	0	0.015	3.5	18	233	5.14	1,200
		24	0.020	3.7	18	185	4.86	900
flucythrinate	WP	0	0.015	0.76	17	50.7	22.4	1,133
		24	0.038	7.3	25	192	3.42	658
flucythrinate	G. WP	0	0.43	11	68	25.6	6.18	158
		24	0.45	16	100	35.6	6.25	222
flucythrinate	SL	0	0.018	3.5	33	194	9.43	1,833
		24	0.020	3.7	35	185	9.46	1,750
flucythrinate	TP	0	0.013	7.2	23	554	3.19	1,769
		24	0.036	14	73	389	5.21	2,028
fluvalinate	WP	0	0.056	110	230	1,964	2.09	4,107
		24	0.70	130	280	186	0.15	400
fluvalinate	SP	0	220	330	1,600	1.50	4.85	7.27
		24	610	1,100	1,800	1.80	1.64	2.95

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal(%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
methidathion (DMTP)	EC	0	0.040	8.6	110	215	12.8	2,750
		24	0.048	12	180	250	15.0	3,750
methomyl	WP	0	0.86	7.5	50	8.72	6.67	58.1
		24	1.0	11	73	11.0	6.64	73.0
milbemectin	TP	0	0.056	13	75	232	5.77	1,339
		24	0.13	36	140	277	3.89	1,077
milbemectin	EC	0	0.068	1.0	4.3	14.7	4.30	63.2
		24	0.10	3.6	10	36.0	2.78	100
permethrin	TP	0	0.021	8.6	83	410	9.65	3,952
		24	0.056	12	>200	214	>16.7	>3,671
permethrin	EC	0	0.033	3.3	100	100	30.3	3,030
		24	0.035	6.2	110	177	17.7	3,143
permethrin	WP	0	0.065	7.0	120	108	17.1	1,846
		24	0.10	18	130	180	7.22	1,300
phenthoate (PAP)	TP	0	0.17	23	180	135	7.83	1,059
		24	0.17	23	180	135	7.83	1,059
polynactins	TP	0	0.033	7.3	21	221	2.88	636
		24	0.073	13	75	178	5.77	1,027
profenofos	TP	0	0.48	>100	>100	>208	-	>208
		24	1.2	110	>200	91.7	>1.82	>167
profenofos	EC	0	0.86	73	380	84.9	5.21	442
		24	2.3	110	540	47.8	4.91	235
propargite (BPPS)	TP	0	5.0	53	>100	10.6	>1.89	>20.0
		24	5.2	75	180	62.5	2.40	15.0
pyraclofos	TP	0	1.0	>100	>100	>100	-	>100
		24	1.3	120	>200	92.3	>1.67	>154
pyraclofos	WP	0	2.1	33	1,300	15.7	39.4	619
		24	2.2	160	2,800	72.7	17.5	1,273
pyraclofos	G	0	2.7	280	2,200	104	7.86	815
		24	10	680	3,600	68.0	5.29	360
pyridaben	TP	0	0.056	3.8	15	67.9	3.95	268
		24	0.11	5.7	76	51.8	13.3	691
pyridaben	WP	0	0.33	35	330	106	9.43	1,000
		24	0.35	38	360	1.9	9.47	1,029
pyridaben	WP(fl.)	0	0.20	77	220	385	2.86	1,100
		24	0.22	110	280	500	2.55	1,273
pyridaphenthion	EC	0	7.1	48	530	6.76	11.0	74.6
		24	8.5	150	640	17.6	4.27	75.3
resmethrin	TP	0	0.056	46	>100	821	>2.17	>1,786
		24	0.12	50	>200	417	4.00	>1,667

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal(%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
rotenone	TP	0	0.023	12	46	522	3.83	2,000
		24	0.023	13	76	565	5.85	3,304
sulprofos	EC	0	11	120	360	10.9	3.00	32.7
		24	12	130	410	10.8	3.15	34.2
teflubenzuron	EC	0	25	76	180	3.04	2.37	7.20
		24	25	78	200	3.12	2.56	8.00
thiocyclam	TP	0	0.25	15	33	60.0	2.20	132
		24	0.25	15	73	60.0	4.87	292
thiocyclam	WP	0	0.35	10	130	28.6	13.0	371
		24	0.43	13	150	30.2	11.5	349
thiodicarb	WP	0	0.22	14	38	63.6	2.71	173
		24	0.72	33	230	45.8	6.97	319
thiodicarb	G(beit)	0	4.1	48	420	11.7	8.75	102
		24	18	120	850	6.67	7.08	47.2
thiodicarb	D	0	8.0	86	670	10.8	7.79	83.8
		24	25	310	2,400	12.4	7.74	96.0
tralomethrin	TP	0	0.043	15	43	349	2.87	1,000
		24	0.075	23	120	307	5.22	1,600
tralomethrin	EC	0	0.073	3.5	13	47.9	3.71	178
		24	0.080	3.8	21	47.5	5.53	263
tralomethrin	WP	0	0.36	110	180	306	1.64	500
		24	3.4	130	530	38.2	4.08	156
《 Fungicide 》 amobam	SL	0	10	36	140	3.60	3.89	14.0
		24	14	140	360	10.0	2.57	25.7
anilazine	TP	0	0.18	>100	>100	>556	-	>556
		24	0.23	130	>200	565	>1.54	>870
benthiazole	TP	0	0.25	20	53	87.0	2.65	212
		24	0.25	33	110	132	3.33	440
binapacryl	TP	0	0.18	55	>100	306	>1.82	>556
		24	0.18	70	>200	389	>2.86	>1,111
binapacryl	WP	0	0.12	73	640	608	8.77	5,333
		24	0.43	140	780	326	5.57	1,814
calcium hypochlorite	WS	0	1.0	21	310	21.0	14.8	310
		24	2.6	100	1,200	38.5	12.0	462
captan	TP	0	0.65	14	68	21.5	4.86	105
		24	13	73	>200	5.62	>2.74	>15.4
captan	WP	0	2.0	23	95	11.5	4.13	47.5
		24	2.3	28	220	12.2	7.86	95.7
captan + fosetyl	〔 WP 〕	0	3.3	76	540	23.0	7.11	164
		24	7.3	80	760	11.0	9.50	104

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal (%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
chlorothalonil	TP	0	0.073	14	38	192	2.71	521
		24	0.13	14	>200	108	>14.3	>1,538
chlorothalonil (TPN)	TP	0	0.088	20	36	227	1.80	409
		24	0.53	35	80	66.0	2.29	151
copper hydroxy nonylbenzenesulfonate	EC	0	13	86	380	6.62	4.42	29.2
		24	17	140	540	8.24	3.86	31.8
cupper sulfate	TP	0	0.68	11	53	16.2	4.82	77.9
		24	25	40	75	1.6	1.88	3.00
copper terephthalate	WP	0	3.0	13	68	4.33	5.23	22.7
		24	18	380	630	21.1	1.66	35.0
cupro-ammonium complex salt	SL	0	4.5	28	32	6.22	1.14	7.11
		24	4.8	86	120	26.7	1.40	25.0
DBEDC	EC	0	18	68	780	3.78	11.5	43.3
		24	23	140	840	6.09	6.00	36.5
dichlofluanid	TP	0	0.33	75	>100	227	>1.33	>303
		24	1.7	75	>200	44.1	>2.67	>118
dichlomezine	WP	0	230	1,200	5,300	5.22	4.42	23.0
		24	240	2,300	7,800	9.58	3.39	32.5
diethofencarb	WP	0	22	210	860	9.55	4.10	39.1
		24	23	220	880	9.57	4.00	38.3
dinocap (DPC)	TP	0	0.16	10	38	62.5	3.80	238
		24	0.16	13	70	81.3	5.38	438
fenarimol	WP	0	5.3	140	1,100	26.4	7.86	208
		24	6.2	180	1,400	29.0	7.78	226
ferimzone	TP	0	36	>100	>100	>2.78	-	>2.78
		24	>40	>200	200	-	-	-
ferimzone	WP	0	33	130	860	3.94	6.62	26.1
		24	33	180	1,200	5.45	6.67	36.4
fluazinam	TP	0	0.13	3.5	23	26.9	6.57	177
		24	0.13	40	130	308	3.25	1,000
fluazinam	WP	0	2.3	65	4,800	28.3	73.8	2,087
		24	2.6	80	5,400	30.8	67.5	2,077
fluazinam	D	0	4.2	75	4,900	17.9	65.3	1,167
		24	4.5	100	5,800	22.2	58.0	1,289
hexaconazole	TP	0	3.2	>100	>100	>31.3	-	>31.3
		24	4.2	>200	>200	>47.6	-	>47.6
hexaconazole	WP	0	2.2	85	860	38.6	10.1	391
		24	2.5	120	960	48.0	8.00	384
myclobutanil	TP	0	8.6	>100	>100	>11.6	-	>11.6
		24	9.0	>200	>200	>22.2	-	>22.2

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal(%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
myclobutanil	EC	0	4.3	78	680	18.1	8.72	158
		24	6.7	80	850	11.9	10.6	127
myclobutanil	WP	0	4.3	76	360	17.7	4.74	83.7
		24	4.3	85	1,200	19.8	14.1	279
oxine-copper	TP	0	0.073	30	110	411	3.67	1,507
		24	0.075	38	180	507	4.74	2,400
oxine-copper	WP	0	0.075	17	86	227	5.06	1,147
		24	0.075	33	140	440	4.24	1,867
pefurazoate	TP	0	23	>100	>100	>4.35	-	>4.35
		24	25	>200	>200	>8.00	-	>8.00
pefurazoate	WP	0	18	230	1,800	12.8	7.83	100
		24	18	260	2,500	14.4	9.62	139
prochloraz	TP	0	2.8	>100	>100	>35.7	-	>35.7
		24	3.0	>200	>200	>66.7	-	>66.7
prochloraz	EC	0	2.2	43	270	19.5	6.28	123
		24	3.4	100	730	29.4	7.30	215
propamocarb hydrochloride	SL	0	1,200	7,300	8,100	6.08	1.11	6.75
		24	3,100	7,500	21,000	2.42	2.80	6.77
propiconazole	TP	0	6.6	>100	>100	>15.2	-	>15.2
		24	6.6	>200	>200	>30.3	-	>30.3
propiconazole	EC	0	4.2	46	210	11.0	4.57	50.0
		24	4.2	78	620	18.6	7.95	148
pyrifenox	TP	0	6.2	68	>100	11.0	>1.47	>16.1
		24	6.2	130	>200	21.0	>1.54	>32.3
pyrifenox	WP	0	4.5	110	1,200	24.4	10.9	267
		24	4.5	240	1,500	53.3	6.25	333
quinomethionate	WP	0	3.3	120	460	36.4	3.83	139
		24	12	170	480	14.2	2.82	40.0
tecloftalam	WP	0	90	430	1,300	4.78	3.02	14.4
		24	180	460	1,400	2.56	3.04	7.78
thiram	TP	0	0.10	40	>100	400	>2.50	>1,000
		24	0.90	75	>200	83.3	>2.67	>222
thiram + benomyl	(WP)	0	7.3	60	860	8.22	14.3	118
		24	7.5	110	2,800	14.7	25.5	373
ziram	TP	0	0.086	5.0	7.5	55.1	1.50	87.2
		24	4.3	7.5	8.6	1.74	1.15	2.00
《 Herbicide 》 ACN	TP	0	0.84	55	120	65.5	2.18	143
		24	0.90	110	150	122	1.36	167
butamifos	EC	0	1.8	120	460	66.7	3.83	256
		24	3.1	120	480	38.7	4.00	155

Pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal (%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
dithiopyl	EC	0	2.6	36	220	13.8	6.11	84.6
		24	3.3	76	280	23.0	3.68	84.8
ethidimuron	WP	0	2,100	2,700	3,600	1.29	1.33	1.71
		24	3,300	3,800	4,300	1.15	1.13	1.30
fenoxaprop-ethyl	EC	0	3.2	16	180	5.00	11.3	56.6
		24	7.2	25	270	3.42	10.8	37.5
flazasulfuron	WP	0	110	1,200	8,600	10.9	9.17	78.2
		24	110	1,500	10,000	13.6	6.67	90.9
fluzazifop	EC	0	5.3	36	270	6.79	7.50	50.9
		24	5.3	76	380	14.3	5.00	71.7
hexazinone	WP	0	210	730	860	3.48	1.18	4.10
		24	230	1,100	2,200	4.78	2.00	9.57
hexazinone	G	0	260	450	1,800	1.73	4.00	6.92
		24	280	830	3,500	2.96	4.22	12.5
imazapyl	SL	0	12	210	1,400	17.5	6.67	117
		24	23	370	2,200	16.1	5.95	95.7
imazaquin ammonium salt	SL	0	4,300	6,700	7,100	1.56	1.06	1.65
		24	4,500	6,900	8,800	1.53	1.28	1.96
ioxynil octanoate	TP	0	0.23	10	70	43.5	7.00	304
		24	0.76	18	>200	23.7	>11.1	>263
ioxynil octanoate	EC	0	0.18	11	100	61.1	9.09	556
		24	1.0	23	78	23.0	3.39	78.0
mefenacet	G	0	110	760	1,800	6.91	2.37	16.4
		24	210	1,300	3,200	6.19	2.46	15.2
oxadiazon	EC	0	7.3	28	83	3.84	2.96	11.4
		24	13	35	130	2.69	3.71	10.0
pyrazosulfuron-ethyl	WP	0	120	1,200	3,800	10.0	3.17	31.7
		24	120	1,400	4,100	11.7	2.93	34.2
quinclorac	WP	0	730	850	1,500	1.16	1.76	2.05
		24	730	910	1,600	1.25	1.76	2.19
quizalofop ethyl	TP	0	2.7	64	140	23.7	2.19	51.9
		24	2.7	70	>200	25.9	>2.86	>74.1
quizalofop ethyl	WP	0	7.0	110	560	15.7	5.09	80.0
		24	12	140	730	11.7	5.21	60.8
sulfosate	SL	0	270	1,800	7,800	6.67	4.33	65.9
		24	680	2,100	8,600	3.09	4.10	12.6
tebuthiuron	WP	0	170	320	1,200	1.88	3.75	7.06
		24	260	370	1,600	1.42	4.32	6.15
tebuthiuron	G	0	140	330	1,300	2.36	3.94	9.29
		24	280	480	1,800	1.71	3.75	6.43

pesticide	Formulation	Time after treatment (hr)	Additive rate of activated charcoal(%)			B/A	C/B	C/A
			0(A)	0.01(B)	0.1(C)			
thiazafluron	WP	0	230	760	3,400	3.30	4.47	14.8
		24	240	770	3,600	3.21	4.68	15.0
thiazafluron	G	0	240	830	3,500	3.46	4.22	14.6
		24	530	1,100	5,100	2.08	4.64	9.62
trifluralin	TP	0	0.43	30	84	69.8	2.80	195
		24	0.75	36	120	48.0	3.33	160
trifluralin	EC	0	0.53	25	170	47.2	6.80	321
		24	1.4	73	250	52.1	3.42	179
《 Plant growth regulators 》 cholin chloride	SL (2%)	0	140	3,800	7,800	27.1	2.05	55.7
		24	230	7,500	13,000	32.6	1.73	56.5
cholin chloride	SL (30%)	0	110	3,600	7,200	32.7	2.00	65.5
		24	200	7,100	12,000	35.5	1.69	60.0
flurprimidor	TP	0	20	>100	>100	>5.00	-	>5.00
		24	20	>200	>200	>10.0	-	>10.0
flurprimidor	WP	0	15	1,300	1,800	86.7	1.38	120
		24	18	1,400	2,300	77.8	1.64	128
flurprimidor	G	0	38	>200	>200	>5.26	-	>5.26
		24	38	>200	>200	>5.26	-	>5.26
forchlorfenuron	SL	0	0.35	7.3	>20	20.9	>2.74	>57.1
		24	0.67	>10	>20	>15.9	—	>29.9
inabenfide	WP	0	360	3,700	7,500	10.3	2.03	20.8
		24	380	3,900	8,600	10.3	2.21	22.6
inabenfide	G	0	240	2,700	6,800	11.3	2.52	28.3
		24	250	3,600	7,800	14.4	2.17	31.7
paclobutrazol	TP	0	20	>100	>100	>5.00	-	>5.00
		24	36	>200	>200	>5.56	-	>5.56
paclobutrazol	WP	0	360	>5,000	>10,000	>13.9	-	>27.8
		24	380	>10,000	>20,000	>26.3	—	>52.6
uniconazole P	TP	0	11	>100	>100	>9.09	-	>9.09
		24	11	>200	>200	>18.2	-	>18.2
uniconazole P	G	0	1.4	>10	>20	>7.14	-	>14.3
		24	1.4	>10	>20	>7.14	-	>14.3
《 The others 》 scilliroside	TP	0	0.12	15	>100	125	>6.67	>883
		24	0.12	46	>200	383	>4.35	>1,667
sodium pentachloro- phenoxide	WS	0	0.35	20	210	57.1	10.5	600
		24	0.35	35	330	100	9.43	943

Note : LC-50 values were expressed as active ingredient, but mark () in the formulation's column were expressed as formulation it's concentration.

EC : emulsifiable concentrate, D : dust, TP : technical product, WP : wettable powder, WS : water soluble chemical, SL : spray liquid, SP : smoking pesticide, G : granule.

第2表 ヒメダカに対する各種農薬のLC-50値, 48hrと活性炭による毒性低減の相対比

Table 2. The relativity rate of decreasing effect of dust activated charcoal on the toxicity, LC-50 values, 48hr of pesticides to *Oryzias latipes*.

Range of LC-50 values, 48hr ; ppm	Relativity rate of decreasing effect	
	B/A	C/A
10,000—1,000 (n=6)	2.3	3.4
1,000—100 (n=40)	8.6	24.1
100—10 (n=50)	12.2	48.8
10—1 (n=96)	34.6	248.1
1—0.1 (n=83)	135.2	605.5
0.1—0.01 (n=76)	295.6	1,729
0.01—0.001 (n=2)	1,779	8,987

Note : Values in the table are average values from table 1.

A ; LC-50 values, 48hr ; ppm, additive rate of dust activated charcoal 0%

B ; LC-50 values, 48hr ; ppm, additive rate of dust activated charcoal 0.01%

C ; LC-50 values, 48hr ; ppm, additive rate of dust activated charcoal 0.1%

Summary

Decreasing effect of activated charcoal on fish-toxicity of pesticides

Yasuhiro Nishiuchi

Decreasing effect of activated charcoal on fish-toxicity of pesticides was experimentally examined, using *Himedaka*, *Oryzias latipes*.

Results were as follows :

1. The effect is higher on pesticides of smaller 48 hour LC-50 values.
2. The effect was found to appear immediately after addition to water.

平成3年8月31日 印刷
平成3年8月31日 発行

農薬検査所報告 第31号

農林水産省農薬検査所
〒187 東京都小平市鈴木町2-772
電話 0423-83-2151(代)

印刷所 有限会社アトミ印刷
有田昌城
〒187 東京都小平市小川東町5-13-22
電話 0423-45-1155(代)

農薬検査所報告第31号 正誤表

訂正箇所	誤	正
10頁 左 12行目	エーテ <u>ン</u>	エーテ <u>ル</u>
11頁 右 16行目	伊藤和 <u>夫</u>	伊藤和 <u>男</u>
12頁 右 16行目	ゲル <u>液体</u> クロマトグラフ	ゲル <u>浸透</u> クロマトグラフ
16頁 16行目	行挿入	技 石嶋直之 企画調整課 2.11.26～2.12.7 平成2年度一般行政研修（第1班） 農林水産研修所（八王子市）
110頁 6行目	-ethanol- <u>ethanol</u> -	-ethanol-