

MAIN TOPIC 8

RESIDUES

残留農薬研究所 小田中芳次

Residues をテーマとした本セッションでは177題の研究発表があり、それらは内容別に五つ(A~E)に分類されていた。内訳は以下のとおりである。

- 8A) Trial Design, Sampling, Modeling on Crops, QA in Field and Laboratory (25 題)
- 8B) Residue Analytical Methodology (59 題)
- 8C) Advances in Instrumentation (31 題)
- 8D) Residue Results—Monitoring and Other Studies (40 題)
- 8E) Biochemical Methods for Residue Analysis (22 題)

本来、これら全ての発表内容を詳しく紹介するのが筋であるが、発表件数が多く、紙面の枚数にも制限があるので、本誌では見出し(各発表の標題)をできるだけ多く紹介することに心掛けた。索引として利用いただければ幸いである。なお、一部発表内容の詳しい紹介については、小林裕子氏(当研究所)提供の資料を引用させていただいた。

8 A Trial Design, Sampling, Modeling on Crops, QA in Field and Laboratory

1. Quality assurance/control, GLP (8 題)

ここでは、GLP に対する各国の基本的な考え方、要求事項や関連基準、残留試験において実施した際の問題点などが発表された。内容としては、U.S. EPA の登録用ガイドライン [8A-6] や FIFRA-GLPS [8A-7] における具体的な基準の提示、機器分析や標準溶液の管理にコンピュータを活用する方法など分析操作の標準化に関する提言 [8A-2, 5, 9] などが見られた。このほか、目隠し試料の分析結果から分析機関(60箇所)をランク付けした発表 [8A-3] や、U.S. EPA による農薬標準品の供給システムについての発表 [8A-8] も見られた。

2. Ground water trial design (4 題)

土壌や地下水における農薬の移動や分解を研究するための試験法として、地下水を採取するための用具の開発 [8A-11], atrazine のリーチングに及ぼす水管理の影響

[8A-12], aldicarb の地下水層における挙動 [8A-10], 流亡とリーチングを検討するためのモデル試験法の考案 [8A-21] などの発表が見られた。

3. Sampling, air (3 題)

大気中の農薬の採取方法 [8A-13], 1,3-dichloropropene (D-D) や methyl isothiocyanate の捕集剤の考案 [8A-14], pyrethroid 化合物の室内-dust と室内-air における分布 [8A-15] についての発表が見られた。

4. Trial design and residue modeling, crops (4 題)

作物に残留する農薬の減衰モデルと残留濃度の予測に関する研究が発表された。作物表面に付着した農薬成分の動態に及ぼす要因(表面での光分解、揮散、降雨による洗浄、植物組織内への移行と代謝分解、肥大成長による希釈)を盛り込んだ数式モデルを作成し、散布後の残留濃度をコンピュータで予測する方式を考案したもので、実際の残留データとの相関も良好であった [8A-16, 17, 23]。

コンピュータを用いて収穫時における農薬の残留量を予測した Holland ら ([8A-17]: Ministry of Agriculture and Fisheries) の報告を紹介する。コンピューターモデルには、散布と収穫間の残留レベルの変化を測定するために、三つの key function [1. フルーツの表面積と施用量から求めた初濃度; 2. 各農薬の野外試験データから得た農薬の減衰の割合; 3. フルーツの生長曲線(直径 vs 時間)から求めたフルーツの大きさ]を組み込んだ。このコンピューターモデルを使って、リンゴとキウイフルーツの残留レベルを予測した。リンゴでは20農薬、キウイフルーツでは10農薬について実験し、コンピューターによる予測と実際の分析結果を比較したところ両者とも良く一致した。したがって、このコンピューターによる方法を用いると収穫時における農薬の残留濃度を正確に予測することができると結論している。

5. Sample preparation and storage (5 題)

残留分析に必要な試料量を検討した発表 [8A-18] があり、所定の方法で均一化されていれば、必要最小限の試料量は植物試料で2g、土壌試料で4gで十分である

ことが示された。ただし、数十g 必要であると主張する発表 [8A-25] もあり、この点に関する一致は見られなかった。そのほか、分析値に影響を及ぼす要因として試料量と分析回数について検討した発表 [8A-24] も見られた。

Ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) の変化生成物である ethylenethiourea (ETU) の保存作物における安定性を検討した発表 [8A-19] では、cysteine-HCl の添加により EBDC や ETU の分解が抑制されることが示された。

8 B Residue Analytical Methodology

1. Multi-residue methods, crops/food, soil/environment, water (32 題)

マルチ残留分析法では、より多くの農薬成分をいかに早く、正確に、そして安い経費で分析できるかが課題になっており、そのための精製方法として GPC [8B-5, 6, 13, 20, 21] や固相抽出カラム [8B-1, 7, 9, 17, 18, 22, 23, 24, 26, 27, 54] を利用する発表が多く見られた。GPC を利用する方法は西独などでは既に公定法として取り入れられている手法であるが、固相抽出カラムについては、これまで環境水のように比較的単純なマトリックスの共存する試料の分析に利用される例が多く、多量の夾雑物を含む作物試料の分析に応用される例は少なかった。今回紹介された方法 [8B-1, 7, 9, 17, 18] は作物・土壌残留分析における液-液分配の代替として使用され、簡便な精製効果もあることから、今後その利用性は高まるものと思われる。

固相抽出法の一例を紹介する。Bolygo ら ([8B-24]: ICI Agrochemicals) は、水中のトリアゾール系ピリジン系およびジアリールエーテル系農薬 12 種について、C₁₈-固相抽出後、メタノールあるいはアセトニトリルで溶出し、HPLC および GC で測定した。本法を用いると従来の液-液分配（ジクロロメタン、トルエン）より回収率、検出限界とも向上した。回収率は 0.05~100 ppm 添加で 80~107% であり、検出限界は 0.003~0.1 ppm であった。

マルチ残留分析に対処する分析機器として、複数の（キャピラリー）カラムと検出器（NPD/FPD/ECD/MSD）を連結させた GC [8B-5, 21] や多波長同時検出器（ダイオードアレー）付き HPLC [8B-22, 26] を利用する方法が発表され注目された。前者（GC）の特徴としては、一次カラムで分離された特定の画分だけをカラムスイッチング（ハートカット方式）により二次カラムに導入

し、再分離したのち各分析成分に適した検出器で測定する方式であり、マルチ分析に限らず夾雑成分の多い個別農薬の残留分析においても有益な装置と考えられる。

2. Methods for carbamates (5 題)

カーバメート系農薬の分析法として、ポストカラム（加水分解）によるメチルアミンへの変換と（OPA+MERC による）蛍光誘導体化後、HPLC で測定する方法が知られているが、今回の発表ではオンラインによる自動化 [8B-29, 30, 33]、分解法（光; [8B-29, 30]）、感度 [8B-31]、前処理法 [8B-32] などの点で改良が見られた。分析対象化合物としては、N-methylcarbamate ばかりでなく N-methylcarbamoyloxime, dithiocarbamates, amides, phenylureas の各化合物にも拡大され [8B-30, 31]、また、多くの作物における分析例 [8B-29] も示された。

ポストカラムによる HPLC 法をマルチ残留分析に応用した発表が 4 題あった。そのなかから代謝物を含むカーバメート系 24 農薬を 26 種の作物あるいは土壌の分析に応用した Blaß ([8B-29]: Bayer AG) の発表を紹介する。分析法としては、試料をジクロロメタン-水混液あるいはアセトニトリルで抽出後、Florisil あるいは Extrelut® カラムでクリーンアップした後、OPA/2-ME (o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol) を用いたポストカラム法で相当するけい光物質 [(1-hydroxy-ethylthio) isoindole 誘導体] にし HPLC で測定する。この方法によるリンゴ、レタス等の 0.04 ppm および 1.0 ppm 添加回収率はそれぞれ総平均で 70% および 100% であった。また、検出限界は 0.04~0.08 ppm であった。

3. Methods for herbicides: Ureas (9 題)

ウレア系除草剤は一般に熱に不安定なので、直接 HPLC [8B-34, 39] で測定するか、誘導体化（HFBA, EtI/NaI/Me₂SO, 無水酢酸）したのち GC [8B-36, 37, 38, 40] で測定するか、報告は二つに大別されるが、metobromuron, chlorbromuron, linuron のように直接 GC で測定した例 [8B-35] も見られた。HPLC で測定する幾つかの方法については、同系統あるいは異系統の複数カラムをカラムスイッチングにより組み合わせて使用する方法 [8B-34, 39] が紹介されており、妨害成分を効果的に除去する方法として注目された。

カラムスイッチング法によるウレア系農薬の HPLC 法について紹介する。Kühne ら ([8B-34]: Ciba-Geigy Ltd) は chlorotoluron と isoproturon のフェニルウレア系除草剤を水酸化ナトリウムで 6 時間加水分解し、生成したアニリンを蒸留法でヘキサンに抽出した。このアニリンを 2 カラムスイッチング法で分離し、ECD 付

HPLC で定量した。測定波長は 280 nm, カラムとしては第一カラムに Nucleosil 5A, 第二カラムに Nucleosil C₁₈ を用い, 移動相にはメタノール/リン酸緩衝液 (pH 7) を用いた。回収率は 80~100% で, 検出限界は 0.02 ppm であった。

誘導体化して GC に供する方法は, Stan らによって 2 題発表されていた。いずれもアシル化する分析法であり, そのうち一報 ([8B-36]: Technical Univ. of Berlin) は isoproturon 等の 8 農薬を heptafluorobutyric anhydride (HFBA) を用い, 室温で 2 時間反応し, HFB 化して GC (ECD/NPD) に供する方法である。結果は, 誘導体化しない場合には ECD および NPD とともに dinuron しか検出しないのに対し, 誘導体化した場合には 8 農薬とも検出し, ピークの形状, 分離および感度とも良好であった。このように, HFBA はアミノ基や水酸基の酸性プロトンとすみやかに反応して揮発性の誘導体を形成するのでウレア系農薬にとってすぐれたアシル化試薬と思われる。

4. Methods for herbicides: Others (5 題)

その他の除草剤の分析法として, アニライド系化合物をアニリンに分解, Br 誘導化したのち GC (ECD) で測定する方法 [8B-41] や, 新規化合物 fenchlorazole-ethyl や mepiquat chloride をカラムスイッチング方式の HPLC で測定する方法 [8B-43, 44] についての発表が見られた。

5. Methods for fungicides (2 題)

殺菌剤の分析法として, triadimefon, triadimenol-a, -b の GC による高感度分析 [8B-45] や, トリアゾール基を有する化合物 MBAMT の HPLC による測定例 [8B-46] についての発表が見られた。

6. Methods for insecticides (6 題)

殺虫剤の分析法として, endosulfan を二酸化イオウに分解したのち比色定量する簡便法 [8B-47], 新規化合物 imidacloprid (イミダゾール基を有す) の HPLC による測定法 [8B-48], clofentezine と関連 tetrazine 化合物を 2-chlorobenzoic acid に加水分解したのちメチル誘導化し, GC/MSD で測定する方法 [8B-49], olaquinox (quinoxaline 系化合物) をメチル誘導化したのち GC による測定法 [8B-50], bentazone の UV 測定法 [8B-51], dodecen-acetate 化合物の GC/MSD による測定法 [8B-59] についての発表が見られた。

動物組織中の残留農薬をとりあげた発表は 4 題あった。その中の 1 題を紹介する。殺ダニ剤 clofentezine は, リンゴに施用した場合, ジュースをとった後の pomace 中に残留する。Manley ら ([8B-49]: Schering

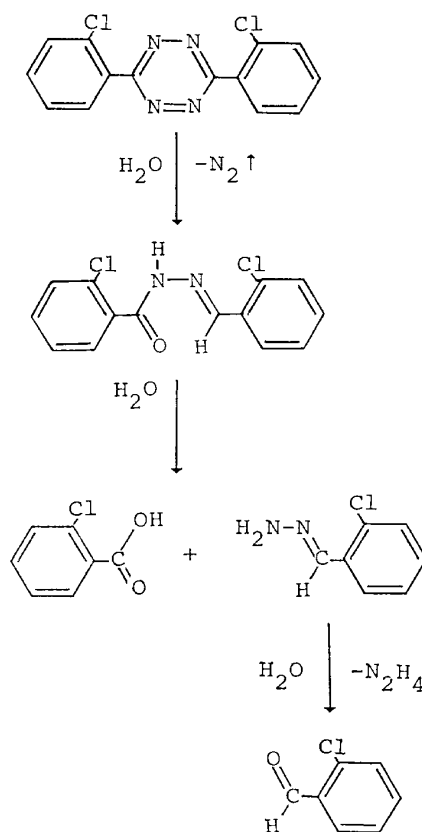
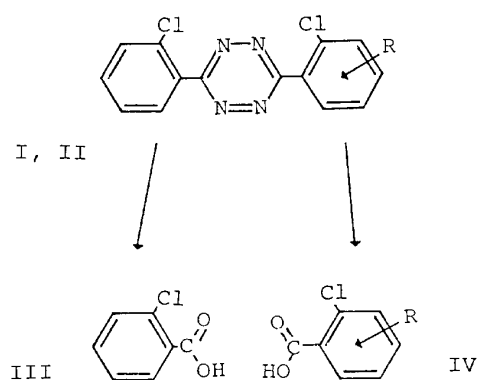


図 8-1



- I. R=H : Clofentezine
 II. R=OH : Hydroxy clofentezine
 III. 2-Chlorobenzoic acid (2-CBA)
 IV. R=H : 2-CBA
 R=OH : 2-Chloro-n-hydroxy benzoic acid

図 8-2

Agrochemicals Ltd) は, この pomace が牛の飼料に用いられるので, 牛の組織中の残留量を全て測定できる分析法およびその基礎となる加水分解について研究した。clofentezine を加水分解すると理論的には 2 モルの 2-chlorobenzoic acid (2-CBA) を生じる。しかしながら実際は 2-CBA を 1 モルしか生じなかった。これは最初の加水分解のアタックでテトラジン環が開裂し, 対称性を

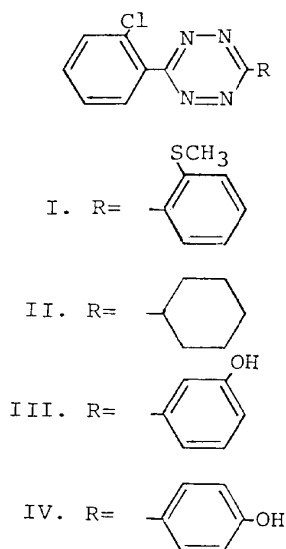


図 8-3

失い、2-chlorophenyl 環の 1 個が 2-CBA になると推定した(図 8-1)。一方、clofentezine の動物組織およびミルク中の代謝物であるヒドロキシ体は水酸基の影響で非対称であり、2-chlorophenyl 環を 1 個だけ有している。それ故、1 モルの hydroxy-clofentezine は理論的には、2 個の異なった酸 (III(2-CBA) と IV) のどちらか一方か混合物になるので、0~1 モルの 2-CBA を生成するはずである(図 8-2)。そこで非対称な 4 個のテトラジン化合物(図 8-3)の酸加水分解を行なった。その結果、2-CBA/反応物質のモル比は化合物 II の 0.5 を除いて全てほぼ 1 であった。このように動物組織中で抱合体として残留する hydroxy-clofentezine は clofentezine 同様に 1 モルから事実上、1 モルの 2-CBA を生じることが明らかになった。そこで分析法としては、均一化した動物組織を臭化水素で 2 時間加熱還流した後、エーテル/0.1 M 炭酸水素ナトリウム混液で抽出し、得られた 2-CBA をメチル化して GC で定量した。この方法を牛の肝臓と腎臓の分析に応用した結果、6 回の平均回収率が肝臓で 85.7%、腎臓で 82.7% と良好で、再現性もよかった。

8 C Advances in Instrumentation

1. SFE/SFC (5 題)

SFE (超臨界流体抽出) は土壌 [8C-1, 3, 4, 5], 植物 [8C-3], 捕集剤 [8C-2] などに含まれる農薬成分を抽出する目的で使用され、とくに、通常の方法では抽出されにくい土壌中の bound-residues の研究に有効な方法であることが改めて示された。SFE は抽出時間が短く溶

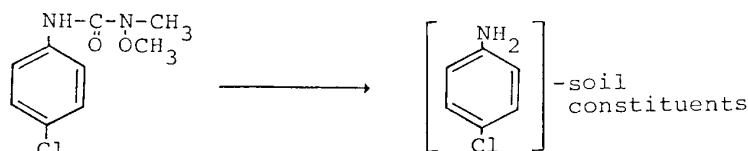


図 8-4 Degradation of monolinuron to soil bound residues.

媒使用量も少なくすむという利点があり、しかも、抽出効率が高く夾雑物の少ない抽出液が得られやすいという特徴があることから、将来、作物残留分析における通常の抽出手段としても有効な方法であると考えられる。

SFC (超臨界流体クロマトグラフィー) については、SFE とオンラインで結び、さらに GC (FID, NPD, FPD), HPLC (UV), MS (MS/MS) などの検出器と連結した装置を用いて各種農薬をマルチに分析する発表 [8C-4, 5] が見られた。

SFE/SFC を使用した分析法は 5 題発表されていた。そのうちフェニルウレア系農薬の例を紹介する。Scheunert ら ([8C-01]: GSF-Institut für Bodenökologie) はフェニルウレア系除草剤 ^{14}C -monolinuron および ^{14}C -buturon を土壌に処理して、1, 2, 16 年後にメタノールで抽出し、可溶分と土壌吸着部分を定量した。分析法は、ソックスレー抽出器を用いて土壌をメタノールで 48 時間抽出し、残渣をさらにメタノールで SFE を行なうという方法であった。SFE の条件は圧力: 150 atm, 温度: 250°C, 時間: 2 h であった。抽出物中のフェニルウレア系農薬は、カラムクロマトグラフィーや TLC でクリーンアップした後 TLC および GC/MC で同定定量した。その結果、monolinuron および buturon 処理 16 年後には土壌から SFE によって放射活性の約 50% が抽出され、4-chloroaniline をそれぞれ 11.4% および 15.1% 生じた。このように、フェニルウレア系農薬は土壌中でゆっくりと分解し、4-chloroaniline を生じ、この 4-chloroaniline は、直ちに土壌成分とコンプレックス (図 8-4) をつくり不溶性になると結論している。

2. Robotics (5 題)

ロボットに関する発表では、いずれも市販のロボットシステム (Zymate) を用いて抽出、分離、液-液分配、濃縮、精製 [主に固相抽出 (SPE) による] 等の分析操作を実施し、労力の削減と分析精度の向上を図ったものであり、中には GC や HPLC の測定機器とオンラインで結び、全自動分析を試みた発表 [8C-9] も見られた。分析時間は 1/2~1/4 [8C-7] に、分析精度はマニュアル操作と比較して同程度またはそれ以上の結果 [8C-6] を示していた。なお、システムの試料量をあまり増やせない

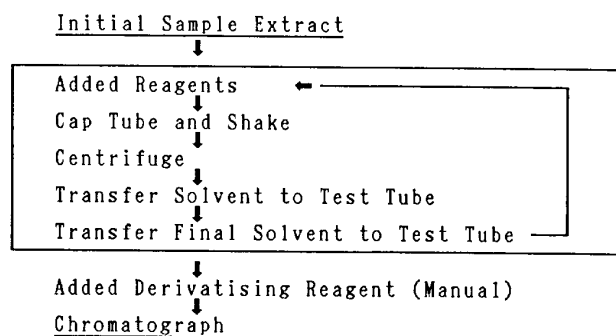


図 8-5 Sample preparation using robot.

(10 g 程度)ので、化合物によっては検出感度が問題となる場合が指摘された。

最近種々の分野で活躍している laboratory robotic を用いた発表が 6 題あったのでその一部を紹介する。Osborne ら ([8C-06]: Dow Chemical Company Ltd) は、chloropyrifos の主代謝物である 3,5,6-trichloro-pyridin-2-ol (DOWCO-463) の定量にこの方法を用いている。その操作を図 8-5 に示す。このようにして得た結果をマニュアル法と比較してみると、トマトにおける 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ppm 添加の総平均回収率はマニュアル法: 89.9%, ロボット法: 79.5% であり、同様に胡椒では 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ppm 添加の総平均回収率はマニュアル法: 75.7%, ロボット法: 81.8% であり、ロボット法が十分残留分析法に適していることを明らかにした。

3. Chromatography (10 題)

クロマトグラフィーそのものをテーマとした発表では、これまで一般に使用されていた GPC カラムよりも内径で 1/10 程度に縮小したミニ GPC カラムの使用により、GC とのオンライン化を図ったもの [8C-11, 12], HPLC と TLC (AMD) もしくは HPLC と GC との組み合わせた装置を考案し、数多くの農薬成分の分離測定したもの [8C-31, 33] など新しい試みが見られた。また、カラムスイッチングを装備した GC や HPLC の利用に関する発表 [8C-13, 15, 29] も幾つかあり、とくに多量の夾雑物と共存する農薬の (多成分) 分析に効果的な装置であることが示された。

Stan ら ([8C-13]: Technical Univ. of Berlin) による二次元キャピラリー GC を用いた例を紹介する。使用した GC は Siemens-SiCHROMAT 2 (オートサンプラー付) である。注入口 1 個に分析成分に対応するように検出器は ECD, FPD, NPD の 3 個が平行に付いていて、コンピュータと接続している。この GC を用いて 300 以上の農薬を分離同定している。この GC 法は多成分の農薬の定量分析に効果的である。

4. Atomic emission detection (3 題)

原子発光検出器 (AED) を装備した GC 装置を実際の作物 [8C-17] や環境水 [8C-16, 18] の分析に応用した報告が見られた。現在、AED で測定可能な元素は C, H, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Si, Sn, Hg, Pb など 23 種あり、GC にかかる全ての化合物を (選択的に) 定量することができる。また、各元素の検出感度は分析成分の化学構造に無関係であることから分析成分の構成元素と数についての情報も得ることができる。ただし、今回の発表では測定の安定性や再現性についての詳しい提示は見られなかった。

5. MS/NMR (7 題)

GC/MS については、より高感度に測定するための条件検討に関する報告が多く見られ、ピレスロイドやトリアジン化合物 (いずれもハロゲンを有する) などはアンモニウム CI-Neg モードが最適であることが指摘された [8C-23, 24]。

LC/MS については、土壌、作物、水に残留する (スルホニル) ウレア系化合物やカーバメート系化合物のマルチ分析に関する報告 [8C-19, 20, 22] が見られた。導入系は direct probe introduction (SIMS, FAB) とサーモスプレーの 2 方式であり、DPI 導入法では高分解能 SIM が有効であった [8C-20]。LC/MS は熱不安定化合物の同定手段としては有力であるが、これまでは検出感度や (実試料への) 応用性などの点で疑問視する向きもあった。今回の発表では種々の試料分析において比較的高感度 (検出限界: 0.01~0.25 ppm) に測定されている [8C-19, 20] ことから、かなり実用的な装置に近づいたように思われる。

そのほか、ライブラリーに関する発表 [8C-25] (現在、直接 GC の加熱方式により測定可能である 300 成分、ワールドオンカラム GC により測定できる 30 成分、熱不安定化合物や酸性化合物は誘導体化したのち測定した 70 成分の、計 400 成分の農薬化合物を収録) と NMR を利用した農薬成分の同定定量に関する発表 [8C-26] が見られた。

Krolski ら ([8C-26]: Mobay Corporation) は、sulprofos とその酸化体、スルホン、スルホキシドの定量に NMR を用いた。土壌 (sandy loam) 100 g に sulprofos 7.4 ppm を添加し、1, 30, 90 日後の親化合物と代謝物の量を ^{31}P -NMR で定量し、HPLC で定量した値と比較した。表 8-1 に示すように NMR 法と HPLC 法で得られた 3 成分の濃度は良く一致し NMR による分析法が十分残留分析に応用できることを証明した。

表 8-1 Percent composition of soil extracts.

Sample		Sulprofos	Sul-SO ₂	Sul-SO ₂
1 day	NMR	88	11	0
	HPLC	86	10	0
30 days	NMR	61	28	0
	HPLC	58	24	5
90 day	NMR	0	64	36
	HPLC	0	52	39

6. Field meter (1 題)

フィールドメーターについては、(燻蒸に使用された) phosphine gas の簡易測定器に関する発表が1題 [8C-27] だけ見られた。

8D Residue Results—Monitoring and Other Studies

1. Monitoring: food (7 題)

市場食品に残留する農薬を5年間にわたって調査した発表 (Sweden: [8D-1]) では、輸入や国産の果物・野菜から検体数の約 2% で基準値を上回る農薬が検出され、主な化合物は methamidophos, dithiocarbamates, diphenylamine, omethoate, thiabendazole であった。牛乳 (Portugal: [8D-3], Tunisia: [8D-34]) からは有機塩素系殺虫剤が比較的高濃度に検出され、過去 (Portugal) あるいは現在 (Tunisia) 使用されている農薬との因果関係が指摘された。食品とともに摂取される農薬量を試算した発表 (Finland: [8D-33]) では、年間1人当たり1化合物として数 mg~10 数 mg と試算されたが、この値は調理加工による減少を考慮していないことから実際はもっと低い値になるものと予想された。そのほか、リンゴに残留する daminozide (植物調節剤: 発癌性の疑いあり: Netherlands, Sweden) に関する発表 [8D-4, 5] や非農耕地に散布された有機塩素系農薬の減衰を検討した発表 (India: [8D-2]) などが見られた。

2. Monitoring: others, incl. environment (13 題)

飲用として使用する河川水からは atrazine や simazine のトリアジン系除草剤が頻繁にしかも比較的高濃度 (0.1 ppb 以上) に検出される例が多く発表 [8D-9, 10, 11, 12, 36] されており、移動性が大きく分解の遅い化合物の取り扱いが問題となっていた。MCPA や dichlorprop などのフェノキシ系化合物も検出頻度が高く、施用時期との相関が指摘された [8D-36]。また、地下水中を移動するトリアジン系農薬の挙動に関する発表 [8D-39] では、atrazine よりも水溶性の低い terbutylazine のほうが移

動速度が速いという予想外の結果が得られた。そのほか、母乳から有機リン剤と PCB が検出された発表 [8D-6] や、ペンギンの血液や脂肪組織から有機塩素系農薬が検出された発表 [8D-7] などが見られた。

1989年に西ドイツにおいて飲料水中の除草剤の最大許容濃度は 0.1 ppb と設定されたが、飲料水用の多くの井戸に除草剤、たとえば atrazine が許容量以上検出された。トリアジン系農薬の一つ terbutylazine は土壌吸着が大きいために土壌中の移動が少ないと思われるので、atrazine 代用農薬として奨励された。しかしながら、terbutylazine も実際にはいくつかの井戸で検出された。そこで Symader ら ([8D-39]: Universität Trier) は実験用 aquifer を用いて、atrazine, terbutylazine およびトレーサーとして uranine を用いてトレーサー実験を行なった。Aquifer (帯水層) は、組成: 石灰質の砂礫、有効多孔度: 0.3、水の伝導率: 0.04 m/sec、地下水の深さ: 2 m、傾斜: 0.05% である。Uranine を 500 mg, atrazine 2 g, terbutylazine 2 g を 300 l の水に溶かし、井戸に注入し、そこから 6.25, 12.5 および 25 m の距離にモニタリング用の井戸を設置した。薬剤処理後 6 時間で triazine 等は最初のモニタリング用井戸に達し、30 時間後には 25 m 地点の井戸に到達した。6.25 m 地点の atrazine と terbutylazine の減衰曲線のパターンは類似している。1 日後の井戸水中の terbutylazine, atrazine および uranine の濃度はそれぞれ約 390, 250, 20 ppb であり、その後 5 日まで急速に減少し 30 ppb 以下になった。Atrazine, terbutylazine および uranine の見かけの流速はそれぞれ 3.56, 3.70 および 6.38 m/day であり、atrazine と terbutylazine はほとんど同じであるが、23.5 日後には予想に反して、atrazine 48%, terbutylazine 71% および uranine 53% が回収された。Aquifer 中の急速な流出については、terbutylazine の分散が非常に小さく、脱離行程が期待したより少なかったためと思われる。それ故、terbutylazine は atrazine の代用にはならないと結論している。

3. Residue studies: herbicides (5 題)

アニリン化合物やフェノール性化合物の植物組織における bound residues に関する研究 [8D-14] では、薬物の bound 成分は細胞壁の starch, protein, lignin, pectin-*fr.* に分布すること、また、bound residues の後作への影響もほとんど無視できることが示された。スルホニルウレア系化合物 [8D-13] やトリアゾール系化合物 [8D-15, 16] の植物や土壌における残留を検討した研究では、これらの化合物は散布直後の植物体では検出されるが、種子などの作物部位では検出されなかった。

4. Residue studies: insecticides (10 題)

殺虫剤の残留研究としては、農薬の作物・土壌残留に及ぼす要因解析や植物組織別残留分布に関する発表 [8D-18, 19, 20, 23, 25, 27] が多く見られた。作物残留に及ぼす要因解析として、剤形 (wetable powder と emulsifiable liquid), 散布濃度, 作物の種類, 関連農薬成分 (5 種類の pyrethroid), 等について検討され、一方、土壌残留に及ぼす要因解析として、土壌中での代謝分解やリーチングについて検討された。そのほか、類似作物のグルーピングによる (残留) データの評価が可能かどうかを検討した発表 [8D-24], insect pollinators (ミツバチなどの昆虫) に対する農薬 (pyrethroids と有機リン剤を比較) の影響を見たもの [8D-21], ポストハーベストに関連して保存作物 (大豆) に散布した農薬 (carbofuran) の経時的減衰と毒性的影響を検討した発表 [8D-26] などが見られた。

5. Residue studies: fungicides (5 題)

殺菌剤残留研究として、ポストハーベスト、散布後の経過日数や剤形の違いによる残留濃度の関係、散布薬物の作物および加工食品への移行、についての発表が見られた。ポストハーベストに関連した発表 [8D-28] では、薬物施用の方法 (浸漬, 散布, 燻蒸) を比較し、労力、作業に対する安全、薬剤使用量、そして、残余の薬剤の後始末などの点で燻蒸法が有効であることが示された。剤形の違いと残留濃度に関連した発表 [8D-32] では、果実に散布した薬剤 (chlorotalonil) で比較すると、粒剤はフロアブルよりも残留しやすく、これは付着量の差によるものではなく分解速度の差によるものと推定された。加工食品への移行をみた研究 [8D-31] では、 ^{14}C -dichlofluanid のワインへの移行量は (^{14}C として) 30% であるが、親化合物のままでは移行しないことが示された。そのほか、prochloraz の分析法として、分析操作に伴う artifact 形成の防止法についての発表 [8D-30] が見られた。

ライシメーターを用いた発表と実験用の aquifer (帯水層) を用いてトリアジン系農薬のトレーサー実験を行なった発表を紹介する。Kubiak ら ([8D-31]: Landes-Lehrund Forschungsanstalt) は、dichlofluanid 施用後のぶどうとワイン中の残留濃度を調べるために4本のぶどうの木を用い、野外条件下のライシメーター内で ^{14}C -dichlofluanid を1年に5回ずつ散布し、3年間育成した。散布した dichlofluanid のほとんどは葉に残留し、散布後35日には使用した放射活性の0.3~3.0%を検出した。このうち0.0~40.0%は dichlofluanid であり、これは有効成分の残留濃度としては0.0~38.1 ppm に相

当した。ぶどうには使用した放射活性の0.1~0.8%を検出した。このうち12.0~59.2%は dichlofluanid であり、有効成分の残留濃度としては0.1~2.4 ppm であった。さらに実験の2年目と3年目に、4本のぶどうの木から採取した合計6kgのぶどうからワインを製造し、農薬の移行を調べた。両年とも、ぶどう中の放射活性の約70%が marc (ぶどうのしぼりかす) 中に残留し、ワイン中には約30%を検出した。ワイン中の放射性活性はほとんどが dichlofluanid ではなく、その主代謝物である dimethyl amino sulfuanilide (DMSA) と極性化合物であった。DMSA は2年目に0.5 ppm, 3年目には0.8 ppm が検出された。

8 E Biochemical Methods for Residue Analysis

1. Enzyme immunoassays (17 題)

Enzyme immunoassay が農薬の残留分析に応用されはじめたのは、1975年 Milstein と Kohler (1984年ノーベル医学賞) によってモノクローナル抗体の合成法が紹介されてからであり、それ以前は抗体の作成が難しく非常に高価なものであった。最近では幾つかの農薬について分析用キットが市販されており、環境試料中の農薬の微量測定に応用される例が多くなってきている。今回、8E で発表された演題数だけでも17題、他のセッションでの発表を含めると20題以上になり、Enzyme-immunoassay に対する関心の高さを示していた。

内容的に最も多かったのは抗体の開発に関するもので、これには新たな農薬化合物に対する開発と、既に開発されている化合物に対してさらに選択性を高めるための研究に関するものとがある。対象化合物としては s-triazines (atrazine, terbutryne, prometryne, aziprottryne: M, C; atrazine, propazine, simazine: P, C; hydroxyatrazine, deethylatrazine については検討中) [8E-1, 2, 9, 10, 13], methabenzthiazuron (P and M, C) [8E-4], chloroquinoline and its metabolites (P, I) [8E-5, 12], cyclo-dienes (endosulfan and its metabolites, other chlorocyclopentadienes and cyclo-dienes: P, C and I) [8E-6], metazachlor (OH-metazachlor: P, C) [8E-7], pyrethroids (P, C) [8E-8], picloram (P, C) [8E-20], metalaxyl and metolachlor (P, C) [8E-20] などであった。[注: P (ポリクローナル), M (モノクローナル), C (competitive-type), I (inhibition-type)]。

測定方法としては、polyclonal antibodies や monoclonal antibodies を利用した competitive-type あるいは in-

hibition-type の ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法であり, 安定した力価の得られやすい monoclonal-antibodies の開発とその高感度化が課題となっていた. なお, inhibition-type の測定法は competitive-type に比較して, 感度的に差はないがサンプルマトリックスの影響を受けにくい特徴が指摘された [8E-6].

分析対象試料としては圧倒的に環境水が多く, 作物, 土壌, 大気, 動物組織, plasma, 尿などの複雑な試料への応用例もみられるが, sample matrix の影響 [8E-5, 6, 11, 20, 21] により分析値が大きく変動する点が問題となっていた. 測定結果は機器分析の結果と比較して, 単純な試料では比較的良く一致する ($\pm 20\%$ 以内: [8E-12]) 結果が得られている. また, 実験誤差を少なくするために分析操作の自動化が図られている [8E-3, 18]. Enzyme-immunoassay は定量性など幾つかの問題はあるが, 一度に多数の検体を迅速かつ簡単に処理でき, 感度や選択性も高く, しかも特殊な分析装置が不要なためサンプリング現場でも測定可能であるなどの利点を備えていることから, EPA [8E-19] などでは環境試料のモニタリングに積極的に取り入れる姿勢を示しており, 近い将来, 残留分析の分野でも必要不可欠な方法になるものと考えられる.

なお, 既に, 市販されている対象化合物としては s-triazines (atrazine), pyrethroids, cyclodienes (heptachlor), organophosphates, sulfonylureas (chlorsulfuron), carbamates (aldicarb, carbofuran), alachlor, metalaxyl, benomyl, thiocarbamates, glyphosate, triazoles, bentazon, paraquat, diclofop, 2,4-D などがある.

イムノアッセイの一例として羊の抗アトラジン抗体を開発し, atrazine 除草剤の定量分析に利用した発表について紹介する. Wüst ら ([8E-10]: Lehrstuhl für Botanik der TU München) は, 飲料水と河川水について, 前処理なしで ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による定量分析を行なった. エンザイムイムノアッセイの方法は, ① coating (抗体を polystyrene surface に吸着する, 4°C , 16 時間), ② washing (非結合物質を除く), ③ immunoreaction (hapten と抗体を 1 時間インキュベートする), ④ washing (非結合物質を除く), ⑤ enzyme reaction (20 分間), ⑥ stopping of the reaction (H_2SO_4 を加える), ⑦ measurin (450 nm に設定した SLT EIA reader を使用) である. なお, 今回用いた抗体の atrazine 類に対する cross-reactivity (交叉反応性) は atrazine を 100 とすると表 8-2 のようである. Propazine だけは atrazine より低レベルで検出できるが, propazine はヨーロッパのほとんどの国々において使用されてない

表 8-2 Cross-reactivities.

Substance	% cross-reactivity
Atrazine	100.0
Propazine	433.3
Deethylatrazine	32.5
Prometryn	9.1
Simazine	1.6
Terbutylazine	0.6
Simetryn	0.4
Terbutryn	0.2
Ametryn	0.2

ので, 羊の抗アトラジン抗体を今回の研究に使用しても問題はなかった. 得られた結果は GC/MS と比較したところ良く一致し, スクリーニングに十分使用できることを明らかにした. 水に対する検出限界は 30 ppt であった.

次に, FLISA 法の妨害となる試料中 (水中) の成分の影響について Ruppert ら ([8E-21]: Technischen Universität) が発表している. 金属イオン, とくにほとんどの重金属は tracer (labelled atrazine)-enzyme 反応を妨害し, また, ある種の重金属 (Al^{3+} , Fe^{3+}) は hapten-antibody の相互作用を妨げる. また有機溶媒も最大吸収 ($\lambda=450$ nm) に影響を及ぼす. その他, 腐食酸やグリニン-硫酸塩は 1 ppm で最大吸収に影響がでて吸収が弱まる. しかしながら, これらの影響のいくつかは錯化剤試薬や洗浄剤を加えることによって削減できると報告している.

2. Cholinesterase and others (5 題)

コリンエステラーゼに対する (有機リン剤やカーバメート系) 農薬の阻害反応を利用した薬物の定量法として, EIMER (exchangeable immobilized magnetic enzyme reactor) 法や ticket test 法が発表された. 前者の方法 [8E-15, 16] は, 特殊な担体に保持された酵素 (acetylcholinesterase + choline oxidase) に基質と農薬を加えて反応させ, (農薬の量に応じて cholinesterase が阻害され) 最終的に生成される過酸化水素 ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$) の減少量を電気的に測定する方法である. 感度は $10^{-6} \sim 10^{-8}$ M 程度, センサー (酵素) の寿命は 4°C で保存すれば 1 年以上安定であるなどの特徴が示された. 後者の方法 [8E-22] は, 酵素と基質を含ませた 2 枚のディスクから構成されており, 酵素を含むディスクを試料溶液で処理したのち基質を含むディスクと合せて発色させ, 比色測定するという簡単な方法である. そのほか, aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性阻害を利用した EBDC の測定法に関する発表 [8E-17] も見られた.