

学会賞受賞論文

(業績賞)

動植物および環境中の農薬残留分析法の研究

小林 裕子

残留農薬研究所化学部

A Study on Analytical Methods for Determination of Pesticide Residue in Animals, Plants, and the Environment

Hiroko KOBAYASHI

*Mitsukaido Laboratory, The Institute of Environmental Toxicology,
Uchimoriya-cho, Mitsukaido 303, Japan*

Gas chromatograph-mass spectrometric (GC-MS), high-performance liquid chromatographic (HPLC) and derivatization methods for the pesticide residue analyses have been developed. GC-MS method was applied to multi-residue analyses of organophosphorus pesticides in crops to tentatively identify the pesticide with common fragment ions which provides information on the elemental content and to determine by characteristic fragment ions of each pesticide. The GC-MS method was also applied to determination of various pesticides in river water. HPLC method was used for simultaneous analysis of thioureas in rat plasma, which are toxic to man. This method was based on cleanup by an Extrelut column and determination with wavelength at 240 nm, and applied to the analysis of ETU which is a degradation product of fungicide ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC). ETU in crops was able to be determined without extensive cleanup procedure. In addition, the stability of ETU in stored samples before analysis was studied. ETU in certain crops decreased with storage time. When L-cysteine hydrochloride (Cys-HCl) was used as an amendment, the degradation rate of ETU decreased. Cys-HCl also prevented degradation of EBDC to ETU during storage and analysis. For the determination of a guanidino fungicide, guazatine triacetate, a derivatization method was developed. Guazatine triacetate was reacted with hexafluoroacetylacetone (HFAA) to form the bis(trifluoromethyl)pyrimidine derivative. However, very low recoveries were obtained in the analysis of samples such as apple and grape. The phenomenon was due to that guazatine triacetate was strongly bound to fructose which is a constituent in apple and grape. To release the bound, guanidine-HCl was found to be the best reagent. Using these method described above, pesticide residues in crops could be detected at ppb or ppt levels.

はじめに

近年、農薬はその開発が進み、農作物の品質および生産高を著しく向上させ、収穫を安定化させ、食糧の確保に大いに貢献している。その反面、薬効が強く、蓄積性の高い農薬の大量使用は、散布従事者に対して、急性あるいは慢性毒性を引き起こし、また、散布農薬の大気中への飛散または河川への流出による動物、植物および環

境中での汚染を引き起こした。

このように農作物および水質、土壌中に残留した農薬が引き起こす食品や環境の汚染による人畜への影響が懸念され、農薬の安全性の上から1971年、農薬の安全使用基準等が設定され、適正な使用方法で農薬を使用することが義務づけられた。そのためには、その使用に伴う農作物や土壌中における農薬の動態を把握することが必要である。またこのためには、農作物、土壌および環境

試料中の農薬の残留量を正確に精度よく同定し、定量できる分析法が必要である。

農薬の残留分析は、生体や環境物質中の農薬の残留量が超微量であるため、高感度の検出法が要求され、かつ、これを正確に同定・定量する精度の高い、しかも、天然試料中に存在する夾雑物の影響を受けない選択的な微量分析法が要求されている。分析の対象となる試料についても作物、土壌、環境物質等と広範囲にわたり、また、農薬の種類や性質も種々雑多である。

本研究は、従来の分析法においては、検出感度が低かったり、煩雑なクリーンアップを必要とした化合物や、熱に不安定で分析困難なため残留分析法が確立していなかった化合物、また、親化合物のままでの残留分析が困難な農薬について、動物・植物・土壌・環境中に残留する農薬をガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS)¹⁻⁴⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁵⁻⁸⁾ あるいは誘導体化法^{9,10)} によって同定・定量する簡便で精度の高い分析法を確立することを目的としたものである。このうち本稿では、GC-MS に関しては有機リン系農薬の多成分分析法ならびに河川水中の農薬の同時分析法について、HPLC に関しては thiourea 化合物、とくに ETU の分析法について、また誘導体化法に関しては guazatine の分析法について試料中での挙動も含めてその概要を説明する。

GC-MS による残留分析法

1. GC-MS による有機リン系農薬の多成分残留分析法

食品や環境試料中には多種類の農薬が残留していることがあり、しかも残留している農薬の種類が不明の場合が多いので残留農薬の分析法としては、多成分の農薬を

同時に定量できる方法であることが望ましい。そのような分析法が望まれている農薬の一つに、有機リン系農薬がある。そこで、GC-MS を用いる同定・定量の手法であり、同時に多数のフラグメントイオンを用いて定量できる SIM (selected ion monitoring) 法によって有機リン系農薬の多成分分析法を検討しこれを確立した²⁾。

有機リン系農薬をその構造の基本型 phosphorothioates[(RO)₂P(S)OZ], phosphrodithioates[(RO)₂P(S)SZ], phosphonothioates[C₆H₅(RO)P(S)OZ] に分類し、おのおののスペクトルをとり、フラグメントイオンをグループごとに共通したイオン群 (common fragment ions と仮称) と各化合物に固有の特徴あるイオン群 (characteristic fragment ions と仮称) とに分画した。まず最初に、グループに共通したフラグメントイオン群によって試料中に残留する目的とする農薬がどのグループに属するものであるかを推定した。一例として phosphorothioate 化合物の共通イオンの開裂様式を Fig. 1 に示す。この化合物の開裂パターンは、メチル体では *m/z* 125, 109, 93, 79, 63 のイオン強度が強く、エチル体では *m/z* 153, 125, 109, 97, 93, 65 のイオンが共通して強かった。Phosphorodithioate 化合物および phosphonothioate 化合物でもそれぞれに共通した開裂様式が見出された。次に、各化合物に固有の特徴イオン群および保持時間から化合物の同定・定量を行なった。Table 1 に phosphorothioate 化合物である fenthion, cyanophos, fenitrothion, diazinon, chlorpyrifos, dichlo-

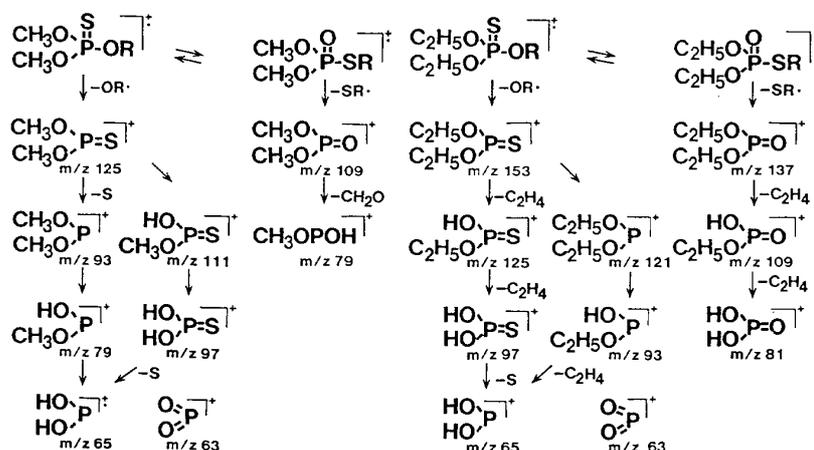
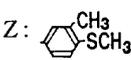
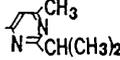


Fig. 1 Common fragmentation pathways of phosphorothioate.

Table 1 Chemical structures, relative intensities of common fragment ions and characteristic fragment ions, and retention times of phosphorothioates.

$\begin{array}{c} \text{RO} \quad \text{S} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{P}=\text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{RO} \quad \text{O}-\text{Z} \end{array}$	Fenthion	Cyanophos	Fenitrothion	Diazinon	Chlorpyrifos	Dichlofenthion
	R: CH ₃	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
Z:						
Common ions (<i>m/z</i>)	Relative intensity, percent					
153	—	—	—	52.3	5.8	3.2
125	36.4	57.0	100.0	30.1	28.8	31.1
109	29.8	100.0	89.9	6.2	17.7	42.9
97	1.0	0.3	1.0	36.6	97.7	100.0
93	13.8	11.0	26.7	46.2	6.0	7.4
79	11.0	23.3	38.1	—	—	—
65	—	—	—	19.0	20.1	15.9
63	6.5	8.9	17.0	2.1	6.3	5.9
Characteristic ions (<i>m/z</i>)						
281	—	—	—	—	—	32.1
279	—	—	—	—	—	85.8
251	—	—	—	—	—	40.4
225	—	—	—	—	—	32.0
223	—	—	—	—	—	82.2
201	—	—	—	—	25.9	—
199	—	—	—	—	93.9	—
197	—	—	—	—	100.0	—
179	—	—	—	85.1	—	—
169	21.3	—	—	—	—	—
162	—	—	—	14.2	—	52.0
152	—	—	—	91.7	—	—
138	—	—	7.5	—	—	—
137	—	—	—	100.0	—	—
M ⁺	278 (100.0)	243 (41.2)	277 (28.2)	304 (48.9)	349 (5.7)	314 (2.2)
RT ^{a)} (min)	5.0	2.2	4.4	2.7	5.2	3.4

^{a)} Retention time at 150°C.

fenthion では *m/z* 153, 125, 109, 97, 93, 65 のイオンの相対強度が大きかった。Fenthion と chlorpyrifos の GC の保持時間はそれぞれ 5.0 分と 5.2 分で GC では区別しづらいが、GC-MS ではメチル体とエチル体の目安となるイオンであるメチル体の *m/z* 79[CH₃OPOH]⁺ およびエチル体の *m/z* 97[(OH)₂P=S]⁺ と 153[(C₂H₅-O)₂P=S]⁺ の有無によって両者を識別し分類した。Fenthion は *m/z* 169[3-methyl-4-methylthio-1-thiophenyl イオン] と *m/z* 278 [M⁺] が同じ保持時間を有し、chlorpyrifos はハロゲン原子に起因するフラグメントイオンとして水素イオン転位で生じた *m/z* 197 と 199 が同じ保持時間を有することから両者を確認することができた。

Table 2 に任意に選定したフラグメントイオンによるスイカおよびトマトからの回収率を示す。Diazinon や cyanophos のように 2~3 個のフラグメントイオンを用いて測定した場合でも、フラグメントイオンによる回収率の差はほとんど見られなかった。また回収率の良かった理由としては、特定のフラグメントイオンを設定して測定したのでクリーンアップを行なわなくても妨害物質の影響を受けることがなく、選択的であったことがあげられる。

以上、従来の多成分分析法のように単に、各農薬を同時に分析するだけでなく、その構成成分をも考慮し、基本骨格に共通のフラグメントイオンを用いて系統的に分析することができた。このような系統的な分析のほか

Table 2 Recovery of phosphorothioates from watermelon and tomato.

Pesticide	Fortified level (ppm)	m/z	Recovery ^{a)} (%)	
			Water-melon	Tomato
Fenthion	0.5	278	93.3	96.6
Cyanophos	0.5	109	84.9	90.8
		125	87.4	92.2
		125	91.1	101.7
Diazinon	0.5	137	89.9	90.1
		152	91.5	93.5
		179	92.9	89.5
Chlorpyrifos	0.5	197	102.8	96.9
Dichlofenthion	0.5	279	93.0	90.0

^{a)} Values are the mean of duplicate experiments.

に、水田から河川へ流出した多種多様の農薬の同時分析に GC-MS-SIM 法を応用した。

2. 河川水中の農薬の同時分析法

同時期に使用されることの多い6種の水稻除草剤 (butachlor, pretilachlor, oxadiazon, CNP, simetryn, thiobencarb) の河川水中の濃度を測定するため河川水を Sep pak C₁₈ カートリッジに吸引し、カートリッジに吸着した農薬をメタノールで溶出し、GC-MS に供した。モニタリングイオンとしては生体成分の影響を受けづらく、感度もよく測定できるイオンである m/z が大きく、イオン強度が大きいフラグメントイオンを選択した。すなわち, butachlor, pretilachlor, oxadiazon, CNP, simetryn, thiobencarb に用いたイオンはそれぞれ m/z 176, 238, 175, 319 および 317, 213, 257 である。この方法によると特定の m/z を設定するので、妨害との分離も容易に目的物質を同時同定・定量することができた⁴⁾。

Fig. 2 は GC-MS-SIM によって得られた標準品 (上段) と河川水試料 (下段) のクロマトグラムである。設定した m/z にそれぞれピークが検出された。Pretilachlor と CNP はフラグメントイオンも出現している。特定の m/z を設定することにより、妨害との分離や pretilachlor と oxadiazon のように保持時間の接近したのも容易に同時同定・定量することができた。添加回収試験については CNP と thiobencarb が 70% と少し悪いが他は 90% 以上と良好であった。また、検出限界も 0.01~0.06 ppb と低かった。このように超微量の環境試料の分析には、同定・定量の手段として優れている GC-MS 法を用いることが適している。

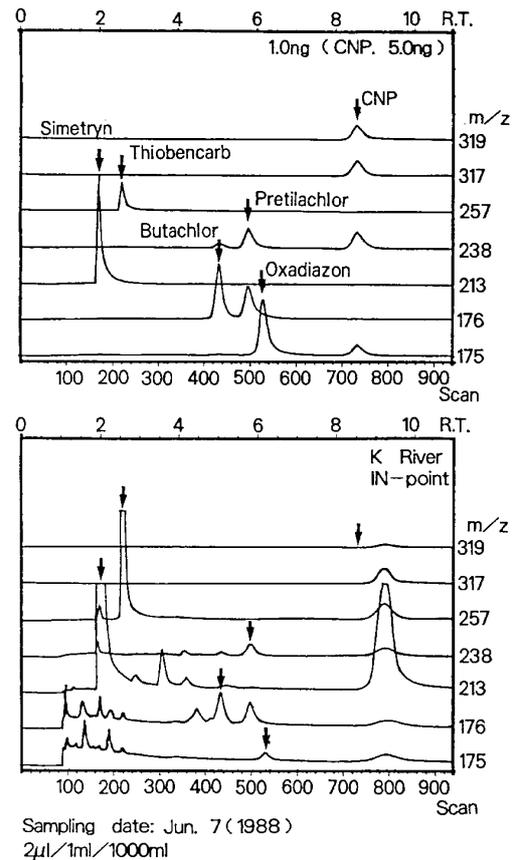


Fig. 2 Mass chromatograms of simetryn, thiobencarb, butachlor, pretilachlor, oxadiazon and CNP in river water.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法

極性が高く、難揮発性の化合物や熱に不安定な化合物は GC や GC-MS 分析が困難である。一般に農薬の高感度な分析法としてはおもに GC が使用されているが、熱に不安定な化合物や蒸気圧が低い化合物などは GC による分析が困難である。このような化合物の微量分析に対して HPLC による分析法を検討した。HPLC による分析法の一例として、ethylenethiourea (ETU) およびチオウレア化合物の分析法を確立し、とくに殺菌剤 ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) の分解生成物である ETU については作物試料中における安定性についても究明した。

1. ラットのプラズマ中の ETU の分析法およびチオウレア化合物の多成分分析法

ETU は EBDC 施用後の作物¹¹⁻¹⁵⁾、マウス¹⁶⁾ および水溶液中¹⁷⁾ や加熱^{18,19)} による分解あるいは代謝生成物であり、ラットあるいはマウスに発癌性²⁰⁾ あるいは催奇形性^{21,22)} があるので人への害が懸念されている化

Table 3 Recovery of thioureas from rat plasma.

Fortified level (ppm)	Recovery ^{a)} (%)						
	TU	MeTU	ETU	EtTU	1,3-DMTU	1,1-DMTU	1,3-DETU
100	83.6	92.0	80.7	74.4	100.3	83.6	82.2
25	87.7	89.0	90.3	88.3	89.8	84.6	95.6
10	75.5	70.1	78.7	84.1	90.2	71.1	77.5
5	93.2	94.3	78.3	89.4	98.8	79.6	85.9
2.5	92.5	93.3	79.2	85.6	97.4	74.1	91.9
1	90.8	75.8	84.1	73.4	88.9	76.6	78.1
Mean	87.2	85.7	82.0	82.5	94.2	78.3	85.2

^{a)} Values are the mean of duplicate experiments.

化合物である。また、ETU 以外のある種のチオウレア化合物すなわち thiourea (TU) や tetramethylthiourea (TMTU) も発癌性^{23,24)} が、methylthiourea (MeTU) および ethylthiourea (EtTU) は催奇形性が報告されている²⁵⁾。また 1,3-dimethylthiourea(1,3-DMTU) も作業従事者に害を及ぼした²⁶⁾。これら毒作用がある化合物の分析法の確立を目的とした。

ETU の分析法としては S 原子をブチル化およびベンジル化し、N 原子をトリフルオロアセチル化、ペンタフルオロベンゾイル化あるいはジクロロアセチル化して分析する方法が知られている²⁷⁻³⁰⁾。しかしながら、これらの誘導体化して分析する方法は妨害物質の除去のためのクリーンアップが煩雑であった。また、ETU 以外のチオウレア化合物 (TU, MeTU, EtTU, 1,1-DMTU, 1,3-DMTU, 1,3-DETU) についても優れた微量分析法がなかった。ETU を含むチオウレア化合物は紫外吸収極大波長が約 240 nm であるので HPLC による分析が可能である。

そこで、ラットのプラズマ (1~2 ml) にエタノールを加え、振とう抽出し、3000 回転で 20 分間遠心分離した後、上清をシリカゲルカラムに供した。10% メタノール・クロロホルム画分に TU, MeTU, EtTU が溶出し、他のチオウレア化合物は 3% メタノール・クロロホルム画分に溶出した。ラットの対照区のプラズマに 7 種のチオウレア化合物を 1 ppm から 100 ppm (6 段階) の濃度になるように添加し回収率を求めた。1,1-DMTU の 78% から 1,3-DMTU の 94% までの高い回収率が得られた (Table 3)。本法による検出限界は 1,3-DETU の 0.05 ppm を除くとすべて 0.02 ppm と高感度であった。このように、ETU およびチオウレア化合物を GC に供する場合のように誘導体化することなく親化合物のままに選択的に定量することが可能となった⁶⁾。

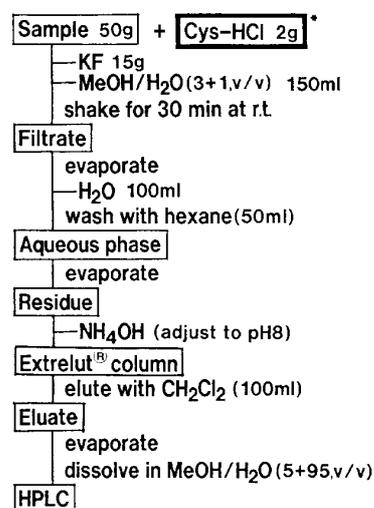


Fig. 3 Analytical procedure for ETU residue in crops.

* Cys-HCl was added to the samples immediately before storage.

2. ETU の作物残留分析

ETU は EBDC 処理した作物の調理加工中の熱分解物としても知られている³¹⁻³³⁾。それゆえ、EBDC 施用後の ETU の残留濃度を正確に把握する必要がある。従来の誘導体化法では煩雑なクリーンアップを必要とするので、ETU の分析にチオウレア化合物の方法⁶⁾ およびエクストレルートカラム抽出の方法³⁴⁾ を用い、誘導体化することなく HPLC に供する方法を確立した。分析法を Fig. 3 に示す。エクストレルートカラムに供する試料抽出液は NH₄OH で pH 8 に調整することにより良好な結果が得られた。また塩を除去するために添加するフッ化カリウム (KF) はカラムに供する直前よりは溶媒抽出時に加えるほうが効果があり回収率も向上した。キュウリの場合には、ETU の添加回収率はカラム直前に KF を加えたときの約 2 倍で約 90% であった⁶⁾。し

かしながら, ETU は作物によっては保存中における安定性が悪く, 真の残留量を把握することが困難であった. そこで, 保存試料中における ETU の安定性³⁵⁾ について検討した.

3. 保存試料中の ETU の安定性

ホモジナイズしたキュウリおよびナシ 50 g に ETU 0.4 ppm を添加し -20°C で 105~196 日間保存したとき, ETU は初濃度の 3~8% に減少した. Webster と Reimer³⁶⁾ はある種の試料中の農薬は -20°C に保存しても分解すると報告している. この現象は他の農薬でもみられた³⁷⁾. 残留分析に供する試料はサンプリング後すぐには分析できないことが多く, ほとんどの場合, 分析するまで凍結保存しておく. それゆえ, 保存中の農薬の安定性が重要な問題になっている. 一般に農薬の分解反応としては光分解, 加水分解, 酸化反応が考えられるが, 保存中の分解に関しては通常, サンプルを -20°C の暗所に保存しているので光分解は考えにくい. 加水分解や酸化が安定性に関与していると思われる. とくにチオカルボニル基を有する ETU については酸化が安定性に関与する要因の一つと考えられる. そこで, 保存中における ETU の安定性に及ぼす要因および保存安定剤について検討した.

1) ETU の安定性に及ぼす pH の影響

使用した pH は作物中の pH を考慮して 7 以下で試験した. 作物中においては, pH が酸性 (pH 3.4 以下) の方が ETU は安定と思われるが pH 0.74~7 の水溶液中では 120°C で 30 日間還流しても ETU は定量的に回収された. すなわち ETU は pH に依存しなかった. Ankumah と Marshall も pH だけが ETU 分解の主要因ではないと報告している³⁸⁾.

2) ETU の保存安定性に及ぼす添加剤の効果

添加剤として検討したものは, 酸化防止剤であるアスコルビン酸ナトリウムおよびシステイン塩酸塩 (Cys-HCl) である. Cys-HCl およびアスコルビン酸ナトリウムの有無における保存ナシ中の ETU の挙動について Fig. 4 に示す. 試料に添加剤を加えず -20°C に 100 日間保存した場合は ETU は 1.1% に激減した. 一方, Cys-HCl およびアスコルビン酸ナトリウムを加えた試料ではそれぞれ 81.5% および 44.3% 残存していた. このように, Cys-HCl は ETU の保存安定剤としてアスコルビン酸ナトリウムより効果があることがわかった. また回収率への影響も無く, Cys-HCl を加えるとむしろ回収率は向上した. そこで添加剤としては Cys-HCl を用いることとした.

Fig. 5 にキュウリとナシの回収率のクロマトグラム

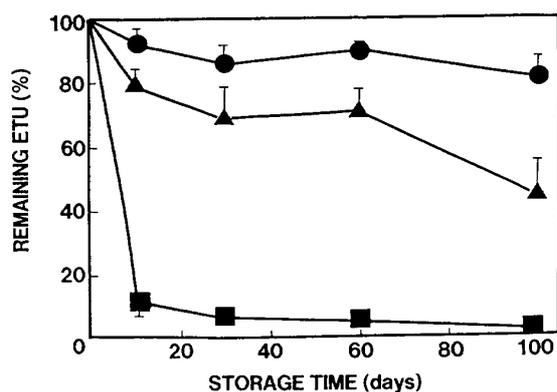


Fig. 4 Effect of amendment on storage stability of ETU in Japanese pear.

●, Cys-HCl; ▲, sodium ascorbate; ■, none.

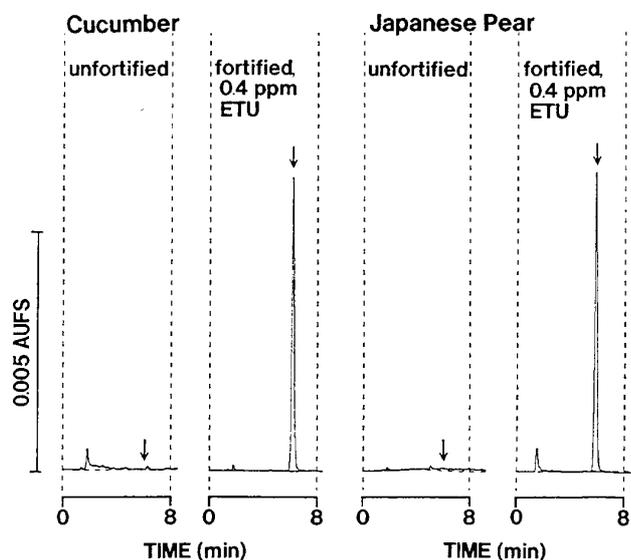


Fig. 5 HPLC chromatograms of ETU-fortified and -unfortified cucumber and Japanese pear with Cys-HCl as an amendment.

を示す. Cys-HCl を加えても妨害もなく良好な結果を得た.

ETU の保存安定性に及ぼす Cys-HCl の効果を種々の作物について確認した (Fig. 6). ナツミカン (果肉) 以外の全試料は, Cys-HCl 添加によって安定になった. たとえばパレイショおよびナシにおける 30 日後の ETU の残存率はそれぞれ 13.8% および 22.4% であり, 少量の ethyleneurea (EU) が生成した. しかしながら, Cys-HCl を添加したときは ETU は 90% 以上回収され, EU はもはや検出されなかった. また, ETU の保存および分析中の安定性に及ぼす Cys-HCl の効果は Cys-HCl の添加の段階に依存した. 100 日間保存したナ

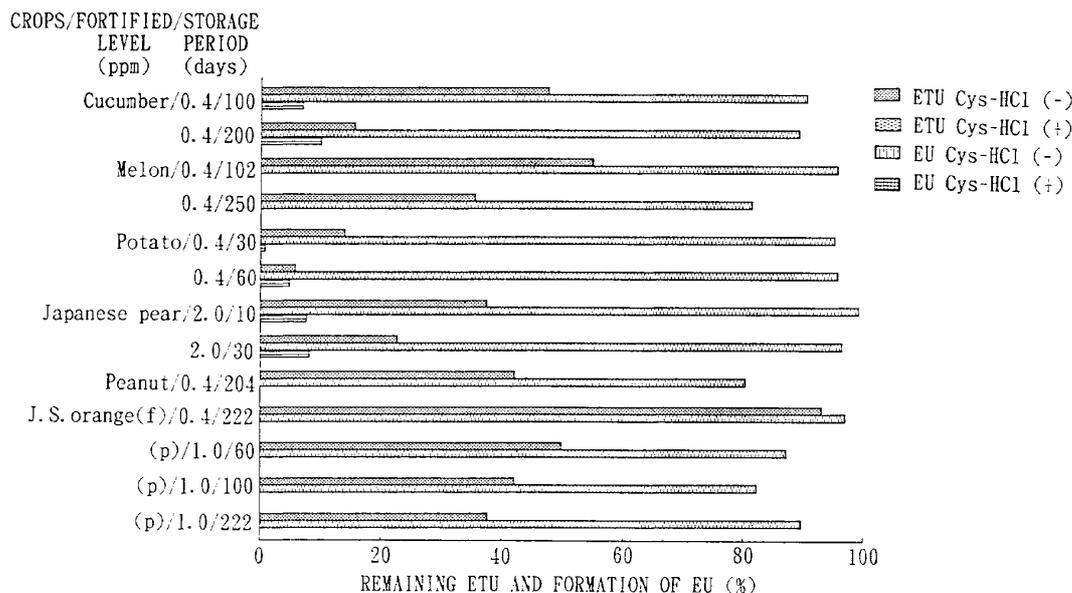


Fig. 6 Cys-HCl effect on storage stability of ETU in crops.

J.S. orange (f), (p): Japanese Summer Orange (flesh), (peel).

ツミカン(果皮)について Cys-HCl の添加時点に関して 2 通り検討した。凍結保存した試料に分析直前に Cys-HCl を添加した場合には、ETU の回収率は Cys-HCl 無添加時の 42.0% より 6~8% 高かっただけである。一方、試料保存前に Cys-HCl を添加したときは、ETU は 81.9% 回収された。これらの結果から ETU に関しては、Cys-HCl は分析操作中における ETU の分解を抑制するというよりはむしろ保存中における分解を抑制するということが明白である。また、ETU の安定性は作物間で異なるが品種には依存しないことも確認した。次に ETU の親化合物である EBDC 剤の一つ mancozeb について Cys-HCl の効果を検討した。

3) Mancozeb の ETU 変換に及ぼす Cys-HCl の効果

Mancozeb 処理した作物中における ETU の定量については作物中に残留する mancozeb が分析中に ETU に変換するかどうか問題である。このことを明らかにするために Cys-HCl の存在下あるいは非存在下で ETU の分析法と同条件 (50°C 減圧乾固) 下およびこの条件を常圧に換算して 120°C の条件下の 2 通りで反応した。Fig. 7 に示すように Cys-HCl なしでは、mancozeb は急速に ETU に分解した。一方、Cys-HCl 存在下ではこの分解は 1% 以下に抑えられた。同様の結果が mancozeb 添加の落花生およびナツミカン(果皮)においても得られた。それゆえ Cys-HCl の存在しないとき、検出された ETU は保存中よりむしろ分析中に生成

した ETU であることが明白である。実際、EBDC 処理した作物中の ETU は加熱すると増加することが報告されている^{18,19,39}。これらの結果は mancozeb を含む試料の分析には保存前に Cys-HCl を添加すべきであることを示唆している。さらに、残留分析用試料を採取後直ちに分析に供しても分析中における mancozeb の分解を防止するために Cys-HCl を加えたほうがよいことが判明した。Lesage¹⁹ は EBDC の熱分解による ETU の生成および水溶液中の CS₂ の発生は銅イオンを添加することで抑えられると報告している。Cys-HCl もまた分析中あるいは保存中における ETU の分解や mancozeb から ETU への生成を防止していることが示唆される。

4) ETU の安定性に及ぼす Cys-HCl の役割

ETU は植物および動物中において EU や他の代謝物を生成する^{18,40}。また、室温保管中のトマトソースやペースト中においても EU に分解した³⁹。それゆえ保存試料中においても ETU は EU 等に変換すると思われる。実際、Fig. 6 に示したように、キュウリ、ナシおよびパレイシヨ中において 0.6~9.8% の ETU が保存中に EU に変換した。このように、酸化は保存中の ETU の分解要因の一つである。しかしながら、顕著な ETU の分解にもかかわらず EU は少量しか検出されなかった。このことは ETU は加水分解および植物成分によって EU 以外の化合物に変換するか、生成した EU が本実験に使用した植物組織中では急速に分解することが推

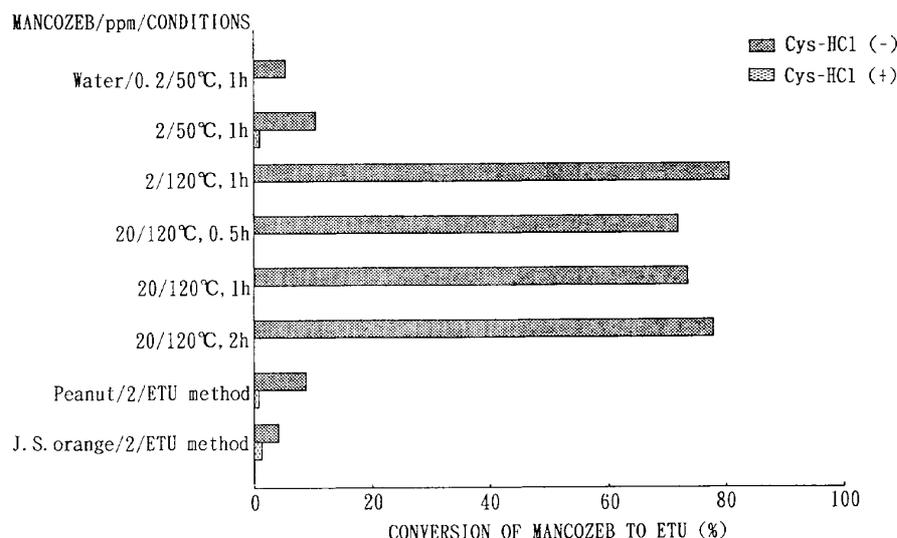


Fig. 7 Cys-HCl effect on mancozeb conversion to ETU.

Conditions: 50°C: evaporation at 50°C under vacuum (similar to conditions of ETU analysis); 120°C: reacted at 120°C at atmospheric pressure; ETU method: analytical method of ETU.

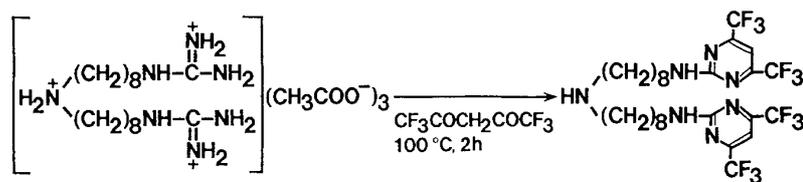


Fig. 8 Derivatization of guazatine triacetate into 8,8'-bis[4,6-bis(trifluoromethyl)pyrimidinyl-2-amino]dioctylamine with hexafluoroacetylacetone.

察される。このような現象を Cys-HCl は阻止する。

誘導体化法による残留分析法

難揮発性の化合物でしかも紫外吸収や蛍光もないため GC や HPLC による残留分析が困難な化合物もある。このような化合物の分析法としては、化学反応によって熱に安定で揮発性の高い誘導体に導いた後、GC に供する方法がある。そのような化合物の例として、グアニジン系殺菌剤 guazatine triacetate (guazatine と称す) の分析法を検討しこれを確立した。

1. Guazatine のピリミジン誘導体化

グアニジン化合物の分析法としては、呈色反応による坂口反応およびニンヒドリン法、あるいは蛍光反応による 9,10-フェナントラキノン法やベンゾイン法があるが、いずれの方法も感度が悪く、残留分析法としては不適當である。また、グアニジン化合物を加水分解して生じるアミノ化合物をトリフルオロアセチル化して GC によって定量する方法もある⁴¹⁾。Guazatine もまた高圧下に 130°C で 30 分間反応した後、生じるアミノ化合物

をトリフルオロアセチル化して GC で分析していた (大日本インキ化学工業株式会社: 私信)。しかし、この方法では親化合物を分析していないので、試料中で代謝生成物が生じた場合には、親化合物との区別ができず、親化合物自体の真の残留量を把握することが困難であった。そこで、グアニジン基がアセチルアセトンと反応してピリミジン誘導体を生成することに着目し、GC での感度を高めるためにヘキサフルオロアセチルアセトン (HFAA) を用いて guazatine を相応するピリミジン誘導体として GC に供する微量分析法を確立した (Fig. 8)⁹⁾。HFAA は最近、医薬品 Debrisoquin の誘導体化^{42,43)} に用いられ好結果を得た誘導体化試薬である。合成した guazatine のピリミジン誘導体は mp 105~106°C の白色結晶であり、高分解能質量分析, NMR, IR でその構造を 8,8'-bis[4,6-bis(trifluoromethyl)pyrimidinyl-2-amino]dioctylamine と確認した。また、この反応のマイクロレベルでの最適条件は pH 8, HFAA の量 0.5 ml, 反応時間 2 時間, 反応温度 100°C であった。

2. Guazatine の残留分析における塩酸グアニジン添加の効果

Guazatine をピリミジン誘導体にして GC で分析する方法を土壌および作物からの guazatine の残留分析法に応用した。Fig. 9 にその分析操作を示す。この分析法で塩酸グアニジン無添加のときは Fig. 10 に示すように、試料の種類によって回収率に差があった。土壌では guazatine の回収率は 57% であったが、リンゴおよびブドウではそれぞれ 1.3% および 0.3% であった。この低回収率の原因を究明するために ^{14}C -guazatine を用いたリンゴ試料の実験を行ない、分析操作のどの行程

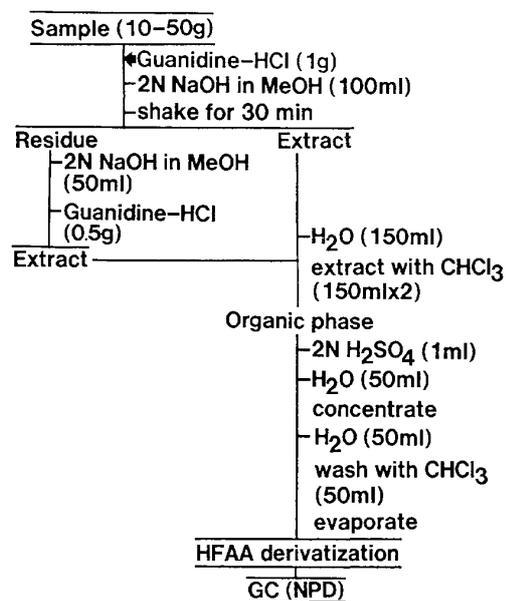


Fig. 9 Analytical procedure for guazatine triacetate residue in crops.

が問題であるか検討した。その結果、リンゴ試料中の guazatine はアルカリ性メタノール溶液には定量的に抽出されるが、クロロホルムへの転溶は 24% にすぎず、62% もの guazatine が水溶性物質と結合して、水層に残留していることが明らかになった。これは guazatine を試料から抽出する際、アルカリ性メタノールを使用しているため、酢酸がとれ遊離した guazatine がグアニジノ基の特性であるプロトン親和性のために試料中の極性の高い成分と結合し、回収率を低下する原因となっていると推察した。そこで、この結合を抑制あるいは切断し、回収率を向上する試薬の検討をした。Fig. 11 はリンゴ 50 g に guazatine 1000 μg を混合し、添加剤 1 g を用いて guazatine の回収率を求めた結果である。著

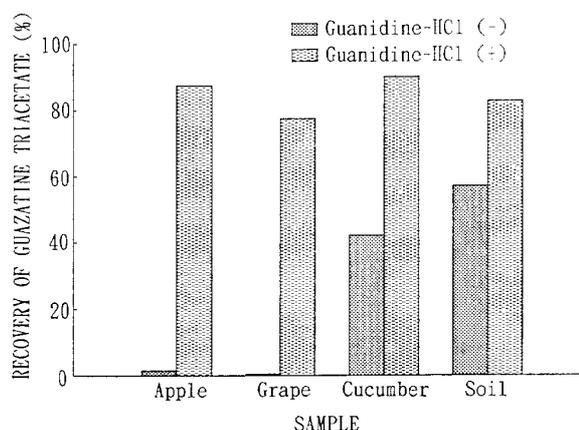


Fig. 10 Recovery of guazatine triacetate from samples added with or without guanidine hydrochloride.

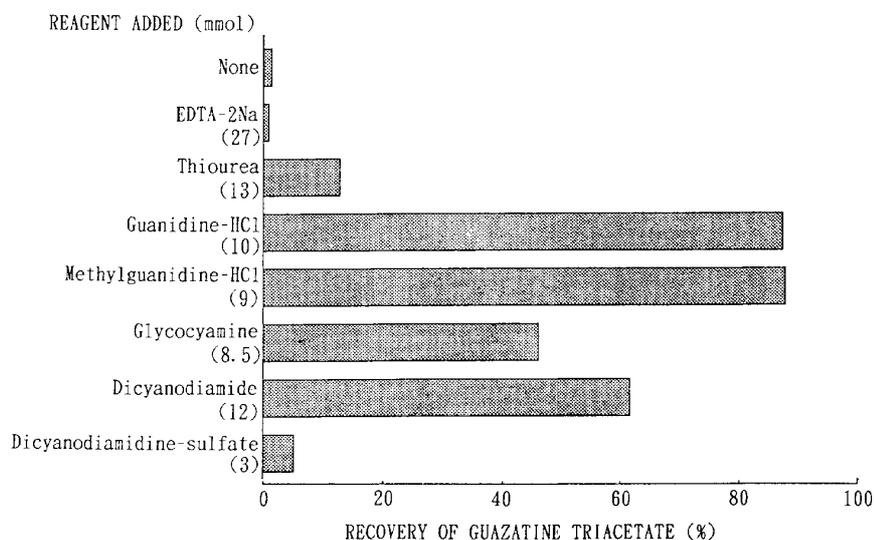


Fig. 11 Effect of releasing reagents on extraction of guazatine triacetate from apple sample.

しい効果があったのは、塩酸グアニジンと塩酸メチルグアニジンとともに約 88% の回収率があり、十分残留分析に応用できる結果が得られた⁴⁴⁾。そこで本研究には、塩酸グアニジンを添加剤として使用することにした。

分析操作のどの時点で塩酸グアニジンを添加するかに関しては、クロロホルム転溶直前よりアルカリ性メタノール抽出時に加えたほうがはるかに効果があった⁴⁵⁾。

Fig. 10 に示したように、塩酸グアニジン無添加では回収率の低かった土壌、リンゴ等の試料に塩酸グアニジンを添加するとすべて 80~90% と回収率が無添加のときの 1.5 (土壌)~260 倍 (ブドウ) に向上した。一般に、土壌においてはカチオンは粘度鉱物に強く吸着し、多量のカチオンの添加によってイオン交換的に脱離する。土壌からの guazatine の回収率が塩酸グアニジン無添加では 57% しか得られなかったのは、同様の現象が起き

ているためと推測される。塩酸グアニジン添加が効果があるのは、アルカリ性溶液中においてグアニジンのほうがアルキル側鎖の長い guazatine に比べて、よりプロトン親和性が強く、試料中の成分と結合しやすいため、結果として guazatine の回収率を高める原因となったと推定した。本法による検出限界は土壌は 0.04 ppm、他は 0.02 ppm であり十分残留分析に応用可能の結果が得られたので、リンゴ等に本法を応用した。Table 4 に示すように、青刈大麦の 78%、玄米の 81% 以外はすべて 90% 以上の好結果を得た。

3. Guazatine の回収率に及ぼす要因物質

作物および土壌中の guazatine の残留分析において、妨害となる要因物質を究明するために、回収率が著しく低かったリンゴとブドウの主要成分について、残留分析法に用いた分析操作を行ない、guazatine の回収率を検討した⁴⁵⁾。さらに、各成分について塩酸グアニジンの添加の効果も調べた。検討した成分を Fig. 12 に示す。有機酸やペクチンおよびサッカロースを添加しても guazatine は約 90% 回収された。単糖類であるアルドヘキソースとケトヘキソースでは回収率に著しい差があった。アルドヘキソースであるグルコースおよびガラクトースはともに約 78% の回収率が得られたが、ケトヘキソースであるフルクトースおよびソルボースは、それぞれ 31% および 18% と非常に低かった。このことから、ケトヘキソース、とくにリンゴおよびブドウ中に約 5~8% 含まれているフルクトース⁴⁶⁾ が回収率低下の主要因子であると推定した。これらの糖に塩酸グアニジンを添加するといずれの糖も 80% 以上の回収率が得られ、塩酸グアニジン添加の効果が顕著に現われた。ま

Table 4 Recovery of guazatine triacetate from guazatine triacetate-fortified samples.

Sample	Sample size (g)	Fortification (ppm)	Recovery ^{a)} (%)
Apple	50	0.4	90.8
Grape	50	0.4	89.0
Rice grain	20	1.0	81.0
Rice straw	10	1.0	93.7
Barley grain	10	2.0	89.7
Green barley	10	2.0	78.4
Soil	20	0.5	88.1
Soil	20	2.0	89.3

^{a)} Values are the mean of duplicate experiments.

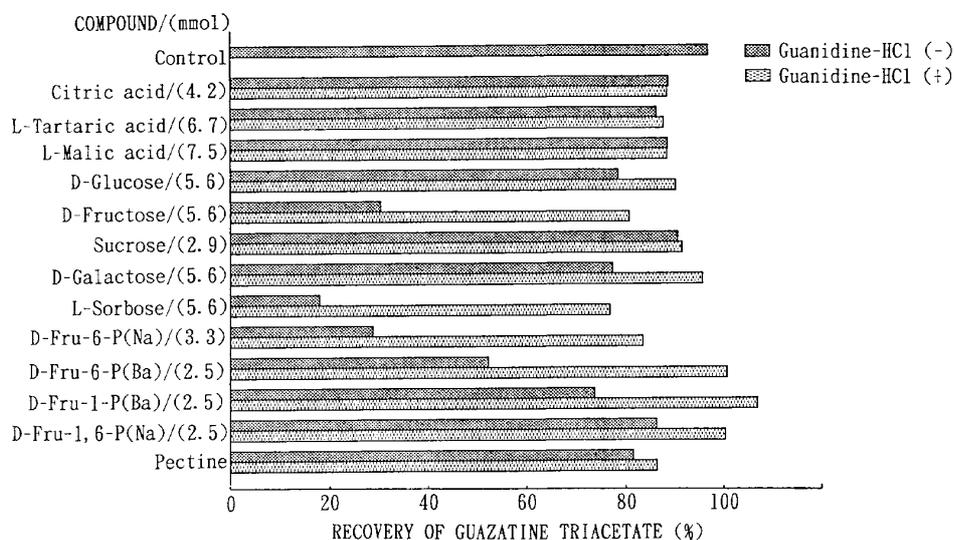


Fig. 12 Interaction between guazatine triacetate and constituents of apple.

た, guazatine との結合に関係しているフルクトースの反応部位について, フルクトースの C1-位および C6-位のリン酸エステルである D-フルクトース-6-リン酸 (D-Fru-6-P), D-フルクトース-1-リン酸 (D-Fru-1-P), D-フルクトース-1,6-ジリン酸 (D-Fru-1,6-P) を用いて検討した. その結果 D-Fru-6-P が guazatine に強く結合していることから, guazatine のグアニジノ基との反応に関与する部位はフルクトースの C6-位ではなく, C1-位の水酸基か C2-位のカルボニル基であると推論した.

一般にモノ置換グアニジノ化合物とベンゾインをアルカリ条件下で加熱するとイミダゾール誘導体を生じる⁴⁷⁾. それゆえ, guazatine とフルクトースとの反応は guazatine のグアニジノ基がフルクトースの C2-位のカルボニル基と反応し, 次いで C1-位の水酸基と反応して, イミダゾール化合物が形成されるものと推測される.

ま と め

最初に, 有機リン系農薬の一斉分析に GC-MS による方法を検討した. 各種の有機リン系農薬を共通のフラグメントイオンによって基本型に分類し, さらに, 各化合物の特徴イオンから同定・定量する方法を確立した. また, 河川水中の多種多様の農薬の同時分析に GC-MS-SIM 法を応用した.

次に, 殺菌剤 EBDC 系化合物の代謝物である ETU およびチオウレア化合物の HPLC による分析法を確立した. さらに, 残留分析に供する保存試料中における ETU の安定性には試料に Cys-HCl を添加することが効果があることを究明した. Cys-HCl は分析操作中における EBDC の ETU への分解をも抑制することが判明した.

最後に誘導体化法による分析法としては, guazatine を HFAA で相応するピリミジン誘導体にして GC 分析する方法を確立した. さらに, リンゴおよびブドウの残留分析において guazatine の回収率が低い原因は, これらの果実の主要成分であるフルクトースに起因していることを明らかにした. この guazatine とフルクトースの結合を抑制あるいは切断する試薬として, 塩酸グアニジンが効果があることも究明した. また, guazatine とフルクトースの反応は反応時間が長くなり, 反応温度が高くなると著しく進行した. したがって, guazatine の回収率を向上させるために添加する塩酸グアニジンは, 試料に直接添加するのが効果的であると結論した.

お わ り に

本研究では検出感度が低かったり, 熱で分解しやすかったり, 難揮発性のため, 従来の分析方法では ppm あるいは ppb オーダーの高感度の分析が困難な農薬およびその代謝生成物について, GC-MS, HPLC あるいは誘導体化法によって植物, 動物および環境中における微量残留分析法を化合物の生体試料中での挙動を含めて確立したものである. 農薬残留分析法の開発研究にあたっては化合物の物理化学的性質を生かし, また天然試料中に存在する夾雑物の特性や挙動を把握して選択的で精度よく簡便な分析法をめざしており, 今後は LC/MS, エンザイムイムノアッセイ等の利用も含めて検討していきたい.

本研究の遂行にあたって多大のご指導をいただきました残留農薬研究所・後藤真康博士, 俣野修身部長, 多くのご教示を賜りました名古屋大学・鍛塚昭三教授, 多くのご助言とご協力をいただきました残留農薬研究所・毒性部副部長寺本昭二博士, 化学部代謝研究室室長加藤保博博士, 化学部の同僚の皆様心から御礼申し上げます. また, 多大のご協力を賜りました東京有機化学工業株式会社ならびに大日本インキ化学工業株式会社をはじめ各農薬会社の関係各位に感謝いたします.

引 用 文 献

- 1) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **3**, 301 (1978)
- 2) H. Kobayashi, M. Kojima, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **4**, 463 (1979)
- 3) H. Kobayashi, K. Sato, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **8**, 105 (1983)
- 4) 小林裕子・大山和俊・神保裕子・俣野修身・後藤真康: 日本農薬学会第 15 回大会, p. 112 (1990)
- 5) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **5**, 89 (1980)
- 6) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Chromatogr.* **207**, 281 (1981)
- 7) H. Kobayashi, M. Kaneda & S. Teramoto: *Toxicol. Lett.* **12**, 109 (1982)
- 8) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **11**, 81 (1986)
- 9) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **2**, 427 (1977)
- 10) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Chromatogr.* **474**, 381 (1989)
- 11) R. C. Rhodes: *J. Agric. Food Chem.* **25**, 528 (1977)
- 12) B. D. Ripley & D. F. Cox: *J. Agric. Food*

- Chem.* **26**, 1137 (1978)
- 13) R. G. Nash: *J. Agric. Food Chem.* **24**, 596 (1976)
- 14) R. G. Nash & M. L. Beall, Jr.: *J. Agric. Food Chem.* **28**, 322 (1980)
- 15) W. H. Newsome, J. B. Shields & D. C. Ville-neuve: *J. Agric. Food Chem.* **23**, 756 (1975)
- 16) L. W. Jordan & R. A. Neal: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **22**, 271 (1979)
- 17) W. D. Marshall: *J. Agric. Food Chem.* **25**, 357 (1977)
- 18) W. H. Newsome: *J. Agric. Food Chem.* **24**, 999 (1976)
- 19) S. Lesage: *J. Agric. Food Chem.* **28**, 787 (1980)
- 20) J. P. Seiler: *Mutat. Res.* **26**, 189 (1974)
- 21) K. S. Khera: *Teratology* **7**, 243 (1973)
- 22) S. Teramoto, A. Shingu, M. Kaneda & R. Saito: *Congenital Anomalies* **18**, 11 (1987)
- 23) A. Rosin & H. Ungar: *Cancer Res.* **17**, 302 (1957)
- 24) E. F. Stula, H. Sherman & J. R. Barnes: *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**, 889 (1979)
- 25) S. Teramoto, M. Kaneda, H. Aoyama & Y. Shirasu: *Teratology* **23**, 335 (1981)
- 26) A. Dooms-Goossens, B. Boyden, A. Ceuterick & H. Degreef: *Contact Dermatitis.* **5**, 367 (1979)
- 27) J. H. Onley & G. Yip: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **54**, 165 (1971)
- 28) W. H. Newsome: *J. Agric. Food Chem.* **20**, 967 (1972)
- 29) R. G. Nash: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **57**, 1015 (1974)
- 30) R. R. King: *J. Agric. Food Chem.* **25**, 73 (1977)
- 31) B. D. Ripley, D. F. Cox, J. Wiebe & R. Frank: *J. Agric. Food Chem.* **26**, 134 (1978)
- 32) W. H. Newsome & G. W. Laver: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **10**, 151 (1973)
- 33) R. R. Watts, R. W. Storherr & J. H. Onley: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **12**, 224 (1974)
- 34) S. Nitz, P. Moza & F. Korte: *J. Agric. Food Chem.* **30**, 593 (1982)
- 35) H. Kobayashi, M. Nishida, O. Matano & S. Goto: *J. Agric. Food Chem.* **40**, 76 (1992)
- 36) G. R. B. Webster & G. J. Reimer: *Pestic. Sci.* **7**, 292 (1976)
- 37) H. Kobayashi, Y. Jimbo, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **16**, 405 (1991)
- 38) R. O. Ankumah & W. D. Marshall: *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1194 (1984)
- 39) J. H. Onley, L. Giuffrida, N. F. Ives, R. R. Watts & R. W. Storherr: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **60**, 1105 (1977)
- 40) R. E. Hoagland & D. S. Frear: *J. Agric. Food Chem.* **24**, 129 (1976)
- 41) J. H. Hengstmann, F. C. Falkner, J. T. Watson & J. Oates: *Anal. Chem.* **46**, 34 (1974)
- 42) P. Erdtmansky & T. J. Goehl: *Anal. Chem.* **47**, 750 (1975)
- 43) S. L. Malcolm & T. R. Marten: *Anal. Chem.* **48**, 807 (1976)
- 44) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **7**, 513 (1982)
- 45) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **9**, 449 (1984)
- 46) R. E. Wrolstad & R. S. Shallenberger: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **64**, 91 (1981)
- 47) Y. Ohkura & M. Kai: *Anal. Chem. Acta* **106**, 89 (1979)

略歴

小林裕子

生年月日: 1941年4月17日

最終学歴: 東京理科大学大学院薬学研究科修士課程

趣味: テニス, クラシック音楽