報 文

殺ダニ剤ヘキシチアゾクスの作物残留分析

時 枝 正 則, 立 花 輝 雄, 小 林 茂
五 明 健, 小 野 成 男

日本曹達株式会社安全性研究所
(昭和62年4月20日受理)

Residue Analysis of Acaricide Hexythiazox in Crops

Masanori TOKIEDA, Teruo TACHIBANA, Shigeru KOBAYASHI,
Takeshi GOMYO and Shigeo ONO

*Environmental Toxicology Laboratory, Nippon Soda Co., Ltd.,
Takada, Odawara 250-02, Japan*

Two analytical methods of determining the residual amounts of hexythiazox [*trans*-5-(4-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide; HTZ] and its metabolites, PT-1-2, PT-cy-OH PT-cy-O in crops were investigated. One is the HTZ analytical method for HTZ only and the other the total method for HTZ and its metabolites. By the HTZ method, HTZ was extracted with methanol and purified through liquid-liquid separation and column chromatography, followed by HPLC determination. By the total method, HTZ and its metabolites were extracted with methanol and converted to a decyclohexylamino-carbonyl derivative (PT-1-3) through alkali hydrolysis, followed by column chromatography and HPLC determination. The detection limit by both methods was 0.01 ppm and the fortified recovery was more than 80%. Residue analyses of nine crops (12 matrices) suggested that there was no difference in residual amount between both methods. HTZ made up most of the residue in crops and its metabolites were negligible in amount. The results showed that the HTZ analytical method, which is simple and quick, is more suitable. GC was also effective in determining the residual amount of HTZ and its metabolites.

緒 言

リンゴ, ナシ, 柑橘類等の殺ダニ剤として使用されているニッソラン®の有効成分であるヘキシチアゾクス [*trans*-5-(4-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide, 以下 HTZ と記す] の安全性評価の一環として, 作物中での残留を把握することが必要であった。植物代謝研究の結果¹⁾より, 作物中で HTZ はほとんど移行せず, 比較的安定で大部分 HTZ として残留しており, 少量の代謝物として脱シクロヘキシル体 (以下 PT-1-2 と記す), シクロヘキサン環の水酸化体 (以下 PT-cy-OH と記す) およびシクロヘキサン環の酸化体 (以下 PT-cy-O と記す) が認められた。そこで, HTZ 分

析法と上記代謝物をも対象にし, これらを脱シクロヘキシルアミノカルボニル体 (PT-1-3 と記す) に統一する全分析法を高速液体クロマトグラフを用いて作成し, 種類の作物について残留実態を検討した。

分 析 法

1. HTZ 分析法

1) 試薬および機器

試薬類は特級品をそのまま使用した。

HTZ 精製品: 融点 108.0~108.5°C, 白色結晶, 無臭
カラムクロマトグラフィー充填剤: 和光フロリジル

PR を 5% 含水させたもの

高速液体クロマトグラフ (HPLC): 島津 LC-3A

同検出器： 島津 SPD-2A

ホモジナイザー： キネマチカ社（スイス）ポリトロン®

2) HPLC 条件

分離管： 内径 4.6 mm, 長さ 25 cm のステンレス製

充填剤： Zorbax ODS

移動相： アセトニトリル-水 (7:3, V)

混液

流量： 1.0~1.5 ml/min

カラム温度： 40°C

検出条件： 紫外線検出器, 波長 225 nm, 感度 0.04 AUFS

フローセル容量： 8.0 μ l

記録紙速度： 5 mm/min

3) 検量線の作成

100 ppm の HTZ アセトニトリル溶液を調製し, これをアセトニトリルで希釈して 1.0, 2.5, 5.0 および 7.5 ppm の溶液を調製する。各溶液 20 μ l を HPLC に注入する。HTZ の重量とピーク高さより検量線を作成する。

4) 分析操作〔果実・野菜の場合〕

① 抽出： 試料約 500 g を約 1 cm 角に細断し, その 50 g (ただし, ミカンおよびナツミカンの果皮は 25 g) を秤取し, メタノール 100 ml を加えホモジナイザーで 3 分間磨砕抽出する。スラリーを吸引濾過後, 容器および残渣をメタノール 50 ml で洗い, 同様に濾過して濾液を合わせる。

② 液液分配： この濾液に水 100 ml, 塩化ナトリウム 5 g を加え, ヘキサン 100 ml で 2 回, それぞれ 5 分間振とう抽出する。ヘキサン層を 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml で 2 分間振とう洗浄し, 水酸化ナトリウム層は捨てる。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム 5 g を敷いた液相分離濾紙で脱水濾過する。このヘキサン溶液にアセトニトリル 100 ml を加え 5 分間振とう抽出する。この操作をもう一度繰り返す。アセトニトリル層を合わせて濃縮乾固する。

③ カラムクロマトグラフィー： 上記濃縮残留物をヘキサン 5 ml に溶解し, あらかじめ 5% 含水フロリジル PR 10 g をヘキサンを用いて充填した内径 1.2 cm のクロマト管中に加える。さらに, ヘキサン 5 ml で容器を洗い, クロマト管中に加える。溶出液は捨てる。ヘキサン 90 ml, 次いで 1% アセトン/ヘキサン 100 ml を流し, 溶出液は捨てる。さらに, 同混合液 150 ml を流下し溶出液を集め, 溶出液を濃縮乾固する。その残留物をア

trans-5-(4-Chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide (HTZ)

trans-5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide (PT-1-2)

trans-5-(4-Chlorophenyl)-4-methylthiazolidine-2-one (PT-1-3)

trans-5-(4-Chlorophenyl)-*N*-hydroxycyclohexyl-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide (PT-cy-OH)

trans-5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-2-oxo-*N*-oxocyclohexyl-3-thiazolidinecarboxamide (PT-cy-O)

Fig. 1 Structures and abbreviated names of authentic standards.

セトニトリルで定容したのち, 20 μ l を前記条件の HPLC に注入しピーク高さを測定し, あらかじめ作成してある検量線より HTZ の残留量を求める。

〔茶の場合〕

① 抽出： 試料約 500 g をブレンダーでドライアイスとともに粉砕後, その 10 g を秤取し, 70% アセトン溶液 100 ml を加えホモジナイザーで 3 分間磨砕抽出したのち, 30 分間振とう抽出する。スラリーを吸引濾過後, 容器および残渣を 70% アセトン溶液 100 ml で洗い, 同様に濾過して濾液を合わせる。以下の操作は果実・野菜の場合と同じである。

Fig. 2 に分析法の概要を示す。

2. 全分析法

1) 試薬および機器

試薬類はすべて特級品をそのまま使用した。ただし, カラムクロマトグラフィーに使用したジクロロメタンにはメタノールを 0.5% 添加した。

PT-1-3 精製品： 融点 146°C, 白色結晶, 無臭

カラムクロマトグラフィーの充填剤： アルミナ（メルク 1077 中性, 活性度 1）に 10% 含水させたもの

バックドカラム： 日本ウォーターズ社 セッパック C₁₈

HPLC および検出器： HTZ 法に同じである。

2) HPLC 条件

移動相： アセトニトリル-水 (4:6, V) 混液

Fig. 2 Flow diagram of an analytical method for HTZ residues in crops (HTZ method).

Operating conditions of HPLC and GC. *Column: Zorbax ODS ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm, detector: UV (225 nm), mobile phase: 70% acetonitrile, flow rate: 1.0~1.5 ml/min, temp.: 40°C. **Column: 5% PEG-HT/Uniport HP (60~80 mesh) ϕ 3 mm $\times$ 500 mm, detector: FTD, gas: carrier gas (He) 50 ml/min, H₂ 4.0 ml/min, air 200 ml/min, temp.: inject, detector 250°C, column 240°C.

流量: 1.5 ml/min

他条件: HTZ 法に同じである。

3) 検量線の作成

100 ppm の PT-1-3 アセトニトリル溶液を調製し、この溶液をアセトニトリルで希釈し、1.0, 2.5 および 5.0 ppm 溶液を調製する。各溶液 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する。PT-1-3 の重量とピーク高さより検量線を作成する。

4) 分析操作〔果実・野菜の場合〕

① 抽出: 試料約 500 g を約 1 cm 角に細断し、その 50 g を秤取したのち、メタノール 100 ml を加えホモジナイザーで 3 分間磨砕抽出する。スラリーを吸引濾過後、容器および残渣をメタノール 50 ml で洗い同様に濾過して濾液を合わせる。

② 液液分配: この濾液に水 100 ml, 塩化ナトリウム 10 g を加え、塩酸で pH 3 に調整したのち、ジクロロ

メタン 100 ml で 2 回、それぞれ 5 分間振とう抽出する。ジクロロメタンを合わせ、水 100 ml を加え 2 分間振とうして洗浄する。ジクロロメタン層を一旦、別の容器に移したのち、水層に新しいジクロロメタン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出し、ジクロロメタン層は先に分取したジクロロメタン層に合わせ、無水硫酸ナトリウム 5 g を敷いた液相分離濾紙で脱水後、濃縮乾固する。

③ 液液分配: 濃縮乾固物をヘキサン 100 ml で分液漏斗に移し、アセトニトリル 100 ml で 2 回、それぞれ 5 分間振とう抽出する。アセトニトリル層を合わせて濃縮乾固する。

④ 加水分解: 乾固物にメタノール 5 ml を加えて溶解し 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液 50 ml を加え、還流冷却管を付けマントルヒーターを用いて、20 分間加熱還流する。反応後、室温まで冷却し、冷却管内部をメタノール 50 ml で洗い反応液に合わせる。この内容物を 300 ml の分液漏斗中に移し、塩化ナトリウム 5 g を溶解したのち、ヘキサン 100 ml を加え 2 分間振とう洗浄する。50% メタノール溶液を一旦、別の容器に移し、ヘキサン層に新しい 50% メタノール溶液 100 ml を加え、5 分間振とうし、逆抽出する。この 50% メタノール溶液を先に分取した 50% メタノール溶液に合わせる。ヘキサン層は捨てる。合わせた 50% メタノール溶液をジクロロメタン 100 ml で 2 回それぞれ 5 分間振とう抽出する。50% メタノール溶液は捨てる。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム 5 g を敷いた液相分離濾紙で脱水濾過し濃縮乾固する。

⑤ カラムクロマトグラフィー: 濃縮物を 10% ジクロロメタン/ヘキサン 5 ml で溶解し、その中へカラムクロマトグラフィー用充填剤 1 g を加え軽く攪拌し、10 分間静置する。あらかじめ上記充填剤 4 g をヘキサンを用いて充填した内径 1.2 cm のクロマト管に上記混合物を流し入れ、流出液は捨てる。同混合液 5 ml で容器を洗いクロマト管中に加え、続いて同混合液 90 ml を流下し、さらに 20% 塩化メチレン/ヘキサン 100 ml を流下して、流出液は捨てる。次に同混合溶液 100 ml で PT-1-3 を溶出させ、溶出液を減圧下で濃縮乾固する。残留物をアセトニトリルで定容したのち、20 μ l を前記条件の HPLC に注入し、ピーク高さを測定し、あらかじめ作成してある検量線より PT-1-3 の量を求め、HTZ としての残留量に換算する。

〔ミカンおよびナツミカン果皮の場合: 試料秤取量 25 g〕

上記⑤で最終的に得られた乾固物を 10% メタノール溶液 10 ml で溶解し、あらかじめメタノール 5 ml, 水

10 ml で洗浄したバックドカラムに加え、流出液は捨てる。続いて 50% メタノール溶液 12 ml で PT-1-3 を溶出させ、溶出液を濃縮乾固し、アセトニトリルで定容後、HPLC に注入する。あらかじめ作成してある検量線から PT-1-3 の量を求め、HTZ としての残留量に換算する。

〔茶の場合：試料秤取量 5g〕

① 抽出：HTZ 法の抽出と同じである。

② 液液分配：濾液に水 100 ml、塩化ナトリウム 10 g を加え、塩酸で pH 3 に調整したのち、ジクロロメタン 100 ml で 2 回、それぞれ 5 分間振とう抽出する。ジクロロメタン層を合わせ、0.01 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml を加え 1 分間振とうし洗浄する。ジクロロメタン層を一旦別の容器に移したのち、アルカリ層に新しいジクロロメタン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出し、先のジクロロメタンに合わせる。無水硫酸ナトリウム 5 g を敷いた液相分離濾紙で脱水後、濃縮乾固する。

③ 加水分解：果実・野菜の場合と同じである。ただし加水分解には、0.02 N 水酸化ナトリウム溶液 50 ml を用いる。

④ 液液分配は 4)③と同じである。

⑤ カラムクロマトグラフィー：濃縮乾固物を水 10 ml に溶解し、あらかじめメタノール 5 ml および水 10 ml で洗浄したバックドカラムに通し、流出液は捨てる。さらに、水 10 ml で容器を洗い、続いて 10% メタノール溶液 10 ml で容器を洗浄して、それぞれバックドカラムに流し流出液は捨てる。続いて 50% メタノール溶液 10 ml で容器を洗浄後、バックドカラムに流し PT-1-3 を溶出させる。溶出液を捕集し、50% メタノール溶液 40 ml を加え 50 ml のジクロロメタンで 2 回、それぞれ 5 分間振とう抽出する。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムを敷いた液相分離濾紙で濾過したのち、濃縮乾固する。濃縮物を 10% ジクロロメタン/ヘキサン 5 ml で溶解し、その中へカラムクロマトグラフィー用充填剤 1 g を加え軽く攪拌し、10 分間静置する。あらかじめヘキサンで上記充填剤 4 g をつめたクロマト管に上記混合物を流し入れ、溶出液は捨てる。同混合液 5 ml で容器を洗い、クロマト管中に加え、続いて同混合液 90 ml を流し、さらに、20% ジクロロメタン/ヘキサン 100 ml を流下して流出液は捨てる。次に同混合液 100 ml で PT-1-3 を溶出させ、溶出液を減圧下で濃縮乾固する。残留物をアセトニトリルで定容後、20 μ l を前記条件の HPLC に注入しピーク高さを測定し、あらかじめ作成してある検量線より PT-1-3 の量を求め、HTZ としての残留量に換算する。

Fig. 3 に分析法の概要を示す。

Fig. 3 Flow diagram of an analytical method for HTZ and its metabolites in crops (Total method).

*Contains 0.5% MeOH. Operating conditions of HPLC and GC. **Mobile phase: 40% acetonitrile, flow rate: 1.5 ml/min, other conditions: much the same as HTZ method. ***Much the same as HTZ method.

実験

1. HTZ 法の検討

1) 抽出溶媒の検討

作物からの抽出溶媒としてメタノールを使用した。メ

タノールの代わりにアセトンについても検討したが、とくにすぐれた利点はなく、むしろアセトンのほうが作物成分を多量に抽出し、クリンアップが煩雑になる場合があった。しかし、茶からの抽出については、メタノール、アセトン、含水アセトン、含水メタノールについて比較した結果、含水アセトン溶液を用いた場合、最も HTZ の抽出率がよかったので採用した。また、溶媒抽出前の製茶の均質化にはドライアイスを用いると良好であった。

2) クリンアップの検討

液液分配とカラムクロマトグラフィーによるクリンアップを検討した。HTZ を 50% メタノール溶液とヘキサンまたはジクロロメタンで分配した場合、HTZ はいずれの溶媒にも分配されることがわかったが、ジクロロメタンを用いた場合、妨害物をより多く抽出するため HTZ の抽出にはヘキサンを採用した。ヘキサン中の HTZ は希水酸化ナトリウム溶液 (0.1, 0.01 N) には移行しないことからアルカリ洗浄をクリンアップ操作に入れた。また、ヘキサンとアセトニトリルの分配では HTZ がアセトニトリルに分配されることがわかったので、ヘキサン中の HTZ の抽出にアセトニトリルを用いた。

カラムクロマトグラフィーの検討は、フロリジル (和光, 60~100 メッシュ)、フロリジル PR、中性アルミナ (メルク 1077, 活性度 1) の 3 種類の充填剤と、4 種類の溶媒系、1% および 3% アセトン/ヘキサン、1% および 10% ジクロロメタン (0.5% メタノール含有)/ヘキサンの組合せで行なった。その結果、いずれの組合せでも HTZ は溶出したが、妨害物との分離において前記分析操作中に示した条件が最もよかった。

3) HPLC の条件検討

HTZ はアセトニトリル溶液中で極大吸収波長は短波長領域の 225 nm 付近にあるが、分子吸光係数は約 2×10^4 であり、紫外線検出器付 HPLC での定量が可能であった。充填剤として吸着型の Zorbax SIL を用いた場合は、作物によってはその由来成分と HTZ の分離が良好でない場合もあった。他方、Zorbax ODS を用いる場合は、移動相としてアセトニトリル・水、アセトニトリル・緩衝液、メタノール・水、メタノール・緩衝液の溶媒系について検討した。緩衝液は pH 5 (酢酸ナトリウム-酢

酸系) と pH 7 (リン酸二水素カリウム-リン酸水素ナトリウム系) の 2 種類を用いた。その結果、いずれの移動相でも作物由来の成分と HTZ が良好に分離した。ピーク形状はいずれも定量には十分であったが、アセトニトリル系のほうが若干メタノール系より良好であった。また、カラム保守の点から緩衝液より水を混合させたほうが便利であった。このため、充填剤として Zorbax ODS、移動相としてアセトニトリル・水系を採用した。

4) 検出限界および添加回収試験

HTZ 5 ng を注入した時、約 5 mm の明瞭なピークが認められたので、これを最小検出量とした。試料称取量を 50 g、最終液量を 2 ml、注入量 20 μ l とした場合、検出限界は 0.01 ppm となる。各種作物に HTZ を添加して前記分析法に従い分析 ($n=2$) し、回収率を求めた結果 (Table 1) 平均回収率は 89.2% であった。リンゴに 0.05 ppm 濃度で HTZ を添加し、5 回の繰り返し分析を行ない、変動係数 (c.v.) を算出した結果 (Table 2)、3.0% であった。これらの値から本分析法が十分に実用

Table 1 Recoveries of HTZ in crops by HTZ method (HPLC).

Crops	Sample weight (g)	HTZ added (μ g)	Recovery (%) ^{a)}
Grape	50	2.5	82.8
Satsuma mandarin			
(pulp)	50	2.5	88.6
(peel)	25	1.25	95.7
Cucumber	50	2.5	89.3
Summer orange			
(pulp)	50	2.5	90.4
(peel)	25	1.25	93.8
Green pepper	50	2.5	87.1
Peach			
(pulp)	50	2.5	88.9
(peel)	25	1.25	90.2
Green tea	10	1.25	84.4
Strawberry	50	2.5	89.8

^{a)} Figures are the average of duplicates.

Table 2 Coefficient of variation by HTZ method (HPLC).

Crop	Sample weight (g)	HTZ added (μ g)	Recovery (%)	Average (%)	c.v. (%)
Apple	50	2.5	89.3, 89.7, 91.8 92.8, 96.2	92.0	3.0

性のあることがわかった。

2. 全分析法の検討

1) 統一条件の検討

HTZ および代謝物を一つの化合物に統一して定量することを検討した。加水分解実験の結果より、HTZ は中性、酸性溶液中では安定であるが、アルカリ溶液中では比較的分解が速く、主生成物は PT-1-3 であったので、HTZ および代謝物を PT-1-3 に定量的に変換する条件を検討した。3 濃度の水酸化ナトリウム溶液中に各化合物を別々に添加し、20 分間加熱還流した。その結果、pH 12 では HTZ および代謝物は定量的に PT-1-3 に変換され、PT-1-3 は安定に残存することがわかったので、本条件を採用した。pH 13 では生成した PT-1-3 の安定性が悪く、また、pH 11 では加水分解が不十分で HTZ 等が残存していた。

2) 抽出条件の検討

HTZ 法に同じである。

3) クリンアップの検討

液液分配およびカラムクロマトグラフィーによるクリンアップを検討した。PT-1-2, PT-1-3, PT-cy-OH, PT-cy-O 等を 50% メタノール溶液とヘキサンまたはジクロロメタンで分配した場合、これらの化合物はヘキサンに十分分配されなかったが (20% 以下)、ジクロロメタンには定量的に分配された。PT-cy-OH の抱合体は 50% メタノール溶液を酸性にすることによりジクロロメタンに定量的に分配されたので、50% メタノール抽出溶液を pH 3 に調整し、転溶溶媒にはジクロロメタンを用いた。茶の場合は、このジクロロメタン層にタンニン類が多く抽出されたが、0.01 N 水酸化ナトリウム溶液で洗浄すると除去効果が認められた。HTZ, PT-1-2, PT-1-3, PT-cy-OH, PT-cy-O のアルカリ溶液への移行はほとんど認められなかった。さらに、ヘキサンとアセトニトリルの分配において HTZ および上記代謝物はアセトニトリルに分配されることがわかったので、ヘキサンからの抽出にアセトニトリルを用いた。

カラムクロマトグラフィーの検討には充填剤としてフロリジル (和光 60~100 メッシュ) および中性アルミナを用い、移動相としてフロリジルにはアセトン・ヘキサン系、アルミナにはジクロロメタン・ヘキサン系を用いた。その結果、妨害物との分離においてアルミナのほうがすぐれており、前記分析法に示した条件を採用した。

柑橘類の果皮や茶等、妨害物の多い作物は液液分配と通常のカラムクリンアップのみでは精製が不十分であった。そのため、逆相系のバックドカラムを用いて、さらにクリンアップの検討をした。茶の場合、タンニン類の

除去が不十分であると、カラムクロマトグラフィーによる精製時にカラム表面の目づまりや PT-1-3 溶出分画がずれる現象がみられたが、カラムクロマトグラフィーを行なう前にバックドカラムを用いることにより、タンニン類と PT-1-3 の分離が良好であった。柑橘果皮由来の妨害成分の除去も、液液分配とカラムクロマトグラフィーでは不十分であったので、さらに逆相系バックドカラムによるクリンアップを検討した。その結果、妨害成分はバックドカラムに残存し PT-1-3 が溶出したため良好なクリンアップができた。

4) HPLC 条件の検討

PT-1-3 は HTZ と同様にアセトニトリル中で極大吸収波長は短波長領域の 225 nm 付近にあるが、分子吸光係数は約 2×10^4 であり、紫外線検出器付 HPLC での定量が可能であった。そこで、HTZ と同様に検討を行ない、前記分析法中に記載した条件を採用した。

5) 検出限界および添加回収試験

PT-1-3 を 3 ng 注入した時 (HTZ 換算で 5 ng)、高さ約 4 mm の明瞭なピークが認められたので、これを最小検出量とした。試料秤取量を 50 g、最終液量を 2 ml、注入量を 20 μ l とした場合、検出限界は HTZ 換算で 0.01 ppm となる。各種作物に HTZ および代謝物を添加して分析 ($n=2$) し、回収率を求めた結果 (Table 3)、平均回収率は 83.5% であった。リンゴに 0.05 ppm 濃度で HTZ を添加し、5 回の繰り返し分析を行ない、変動係数 (c.v.) を算出した結果 (Table 4)、2.3% であった。これらの値から、本分析法が十分に実用性のあることがわかった。

3. ガスクロマトグラフィーの検討

HTZ は、アルカリ加水分解あるいは GC 中で PT-1-3 に変換されることがわかった。このため HTZ 法および全分析法ともに GC で分析を行なう場合は、PT-1-3 として定量することになる。PT-1-3 は硫黄原子や窒素原子を有しているため、電子捕獲検出器 (ECD) のほかに、熱イオン検出器 (FTD)、炎光光度検出器 (FPD) を用いて種々の充填剤との組合せで検出条件の検討を行なった。HTZ 法の場合、ピーク形状と最小検出量より、検出器としては FTD が、充填剤としては PEG-HT/Unipor HP が最良であった。PEG-HT 系では、HTZ がほぼ定量的に PT-1-3 に変換され、GC 定量に何ら問題はなかった。OV-17/Chromosorb W は最小検出量が PEG-HT 系より劣り、検出限界が HPLC に比べて不十分であった。他方、全分析法の場合は PT-1-3 に変換後、GC に注入するので、GC 中で HTZ および代謝物が PT-1-3 に定量的に変換される必要はないので、上記 2 種類の充填剤のほかに DC-200, SE-30 等についても検討したが、

Table 3 Recoveries of each fortified compound in crops by total method (HPLC).

Crops	Sample weight (g)	Amount added (μ g)	Recovery (%) ^{a)}				
			HTZ	PT-1-2	PT-1-3	PT-cy-OH ^{b)}	PT-cy-O ^{b)}
Apple	50	2.5	90.0	81.8	84.2	86.2	82.8
Grape	50	2.5	90.4	88.4	83.8	88.4	85.8
Satsuma mandarin							
(pulp)	50	2.5	83.7	83.7	83.0	78.8	83.6
(peel)	25	1.25	81.3	74.4	82.0	77.9	82.0
Cucumber	50	2.5	93.0	85.8	91.8	86.0	85.8
Summer orange							
(pulp)	50	2.5	84.0	86.8	88.2	81.8	83.7
(peel)	25	1.25	83.6	80.7	88.9	81.0	81.8
Strawberry	50	2.5	84.0	83.0	88.0	82.8	83.6
Green tea	5	1.25	75.2	77.2	81.8	76.4	76.4

^{a)} Figures are the average of duplicates.

^{b)} 4-OH and 4-oxo compounds in Fig. 1 were used as representatives.

Table 4 Coefficient of variation by total method (HPLC).

Crop	Sample weight (g)	Compound added		Recovery (%)	Average (%)	c.v. (%)
		Name	Amount (μ g)			
Apple	50	HTZ	2.5	85.7, 88.3, 89.8 90.2, 90.8	89.0	2.3

Fig. 4 Examples of HPLC chromatograms for control apples.

Dotted lines show the position of HTZ (100 ng) and PT-1-3 (100 ng).

十分な最小検出量が得られず、HTZ法と同様にPEG-HT系を使用する必要があった。そこで検出器はFTD、充填剤はPEG-HT/Uniport HPの組合せでHTZ法および全分析法で0.05 ppmの添加回収試験をリンゴ、ナツ

ミカン果皮を用いて行なった結果、回収率は80~90%と良好であった。しかし全分析法で茶の分析を行なう時は、HPLC法よりさらに長い精製工程が必要であった。

4. 残留分析

各地の農業試験場等でニッソラン水和剤（ヘキシチアゾクス10%含有）を散布した。リンゴ、キュウリ、イチゴ、ナツミカン、ミカン、ブドウ、モモ、およびニッソランV乳剤（ヘキシチアゾクス5%含有）を散布したビーマンおよび茶をHPLCを用いてHTZ法と全分析法で分析した（Table 5）。この結果、残留量は柑橘の果皮では0.16~1.21 ppm、果肉では検出限界以下、リンゴ、イチゴでは0.5 ppm以下であった。また、茶の場合、7日後では約10 ppm程度の残留が認められたが、経時的に減少していった。

考 察

ニッソラン水和剤を圃場で散布し、収穫した作物中の残留実態を確認するため、親化合物のほか、代謝物についての残留分析法も検討した。HTZの植物代謝研究の結果から、作物中でHTZは比較的安定で大部分がHTZで残留しており、少量の代謝物としてPT-1-2, PT-cy-OH, PT-cy-O等が認められた¹⁾。ミカン果皮中ではPT-

Table 5 Crop application history and residue amount of HTZ and its metabolites by HTZ method and total method (HPLC).

Crop	Location	Dosage (L/10a)	Number of application	Days after last application	Residues (ppm) ^{a)}	
					HTZ	Total ^{b)}
Apple	Toyama	10% WP	1	7	0.22	0.25
		×2000	1	14	0.13	0.12
		600 L	1	30	0.04	0.05
Cucumber	Kochi	10% WP	2	1	0.05	0.08
		×2000	2	3	0.03	0.06
		220+350 L	2	7	<0.01	0.02
Strawberry	Nara	10% WP	2	1	0.37	0.40
		×2000	2	3	0.44	0.41
		150+150 L	2	6	0.25	0.27
Green pepper	Ibaraki	5% EC	2	1	0.38	0.40
		×1000	2	3	0.32	0.32
		300+300 L	2	7	0.07	0.09
Grape	Nara	10% WP	1	1	0.34	0.34
		×2000	1	7	0.36	0.40
		300 L	1	14	0.24	0.27
Satsuma mandarin						
(peel)	Aichi	10% WP ×2000 500 L	1	7	1.21	1.06
			1	14	0.82	0.78
			1	30	0.64	0.69
(pulp)	Aichi	500 L	1	7	<0.01	<0.01
			1	14	<0.01	<0.01
			1	30	<0.01	<0.01
Summer orange						
(peel)	Kumamoto	10% WP ×2000 500 L	1	7	0.36	0.40
			1	14	0.18	0.18
			1	30	0.16	0.16
(pulp)	Kumamoto	500 L	1	7	<0.01	<0.01
			1	14	<0.01	<0.01
			1	30	<0.01	<0.01
Peach						
(peel)	Yamagata	10% WP ×2000 300 L	1	7	0.94	0.94
			1	14	0.30	0.28
			1	7	<0.01	<0.01
(pulp)	Yamagata	300 L	1	14	<0.01	<0.01
			1	14	<0.01	<0.01
Green tea	Kochi	5% EC	1	7	11.2	10.4
		×1000	1	14	4.2	4.4
		400 L	1	21	0.68	0.76

a) Average of duplicate analyses.

b) Expressed as HTZ.

cy-OH の抱合体も少量検出された²⁾。PT-cy-OH はシクロヘキサン環の2または3, 4位の水酸化体であり, 2位, 3位のものはそれぞれ4個の立体異性体を, 4位のものは2個の立体異性体を有し, 合計10個の異性体が存在することになる。また, PT-cy-O にも合計5個の異性体が存在する。これらすべての代謝物を個別に定量するのは, きわめて困難と考えられたので, HTZ および代謝物を一つの化合物に統一する全分析法について検討した結果, アルカリ溶液中での加水分解により PT-1-3 に統一できることがわかったので, この方法を採用した。

植物代謝実験や加水分解実験の結果から, PT-1-3 よりもさらに分解が進んだ代謝物はきわめて少ないことが十分に予想されたので, それらは残留分析の対象には入れなかった。

定量法として紫外吸光光度法, 高速液体クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法の3法が考えられた。紫外吸収スペクトル法や微分スペクトル法は簡便であるが, 極大吸収波長は HTZ および PT-1-3 はともにアセトニトリル溶液中で短波長領域 (225 nm 付近) にあり, 生体成分の妨害を受けやすかったので採用しなかった。

しかし紫外線検出器付 HPLC を用いることにより、HTZ 分析法および全分析法を作成することができた。GC で HPLC と同程度の検出限界を維持して HTZ 定量をするためには、PEG-HT/Uniport HP を充填剤として用いる必要があった。全分析法の場合は、PT-1-3 に変換後、ガスクロマトグラフに注入するので、上記の充填剤のほかに DC-200/Uniport HP, SE-30/Chromosorb W 等の使用も可能であったが、HPLC 法と同等に検出下限を 0.01 ppm にするためには、現在のところ FTD と PEG-HT/Uniport HP の組合せのみが有効であった。さらに、GC で全分析法により分析を行なうと、作物によっては HPLC を用いる時よりも分析操作が長くなった。これらの結果より、現時点では HPLC による分析が最良と考えられた。

クリンアップとして HTZ 法の場合は、アセトニトリル-ヘキサンの分配と通常のプロリジルカラムクロマトグラフィーで十分であったが、全分析法ではメタノール抽出液あるいはアセトン抽出液からジクロロメタンに HTZ および代謝物を転溶しているので、転溶溶媒としてヘキサンを用いる HTZ 分析法より作物由来の妨害成分が多く抽出された。茶中のタンニン類の除去や、柑橘類果皮由来の妨害成分は液液分配や通常のカラムクロマトグラフィーのみのクリンアップでは不十分であった。これら妨害成分除去のために酢酸鉛や水酸化カルシウムによる凝固法を検討したが、除去効果が不十分であったり HTZ が吸着されて良好な結果が得られなかった。そこで、逆相系のバックドカラムによりクリンアップを試みた結果、非常に有効であった。作物によっては順相系(吸着型)バックドカラムも有効に用いることができた。ミカン果皮を全分析法で分析する場合、順相系のバックドカラムを用いることにより前記分析法中に示したカラムクロマトグラフィーおよび逆相系のバックドカラムを用いる必要もなく、HPLC による定量が可能であった。しかし、ナツミカン、茶、キュウリ等ではクリンアップ効果が十分でなかったので最終的には採用しなかった。加水分解の最適条件はメタノール 5 ml で残留物をよく溶解し、0.01 N 水酸化ナトリウム 50 ml を加え 20 分間、加熱還流することであった。この条件で HTZ および代謝物は定量的に PT-1-3 に変換し、生成した PT-1-3 はまったく安定であった。しかし、茶のように妨害物が多量に含まれる場合は、この条件では PT-1-3 への変換が不十分であったため、0.02 N 水酸化ナトリウムを用いることにより、満足できる変換率を得た。しかし、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いると生成した PT-1-3 の安定性が悪くなった。

HTZ 法と全分析法で、リンゴ、キュウリ、イチゴ、ミカン、ナツミカン、モモ、ピーマン、ブドウ、および茶について残留分析を行なった結果、両分析法による分析値にほとんど差は認められなかった。また、両分析法による添加回収率にも大きな差はなかった。これらのことより、圃場でニッソラン水和剤や乳剤を散布し収穫した作物中における残留物はほとんどが HTZ と考えられ、PT-1-2, PT-cy-OH, PT-cy-O や PT-cy-OH の抱合体は、たとえ存在しても、きわめてわずかであることがわかり、植物代謝研究の結果とよく一致した。以上より安全性評価を目的とした残留分析を実施する場合、HTZ 法は迅速、簡便であり、しかも現在の国内基準である分析精度 (10% 以内)、回収率 (70% 以上)、検出限界 (0.05 ppm 以下) とも満足しているので、最適の方法であると考えられる。

また、作物中の HTZ は、作物を有姿状態のままでも -30°C で保存すれば、少なくとも 1 年間は安定であった。

要 約

HTZ 分析法と代謝物をも対象とした全分析法を検討し、それぞれ十分実用性のある HPLC 法を作成することができた。HTZ 法はメタノール抽出液を液液分配、カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLC で定量した。全分析法は HTZ 法と同様にメタノール抽出液を液液分配後、HTZ および代謝物を加水分解して PT-1-3 に変換し、カラムクロマトグラフィー等で精製後、HPLC で定量する方法を作成した。両分析法ともに試料秤取量が 50 g の時、検出限界は 0.01 ppm、回収率 80% 以上、変動係数 2~3% であった。HPLC を用いて HTZ 法および全分析法で 9 作物 (12 作物部位) の分析を行なった結果、残留値にほとんど差は認められなかった。このことから HTZ を処理した作物に残留している化合物は大部分 HTZ であることがわかったので、作物残留実態を調べるには迅速、簡便な HTZ 分析法が最適であると考えられた。

本研究に協力していただいた日本曹達株式会社二本木工場の川上 肇氏および当研究所の添田吉則博士および杉岡克己氏他残留分析担当者の方々に深く感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 橋本恭明・石原莞爾・杉本茂二・添田吉則: 日本農薬学会第 11 回大会講演要旨集, p. 100, 1986
- 2) 中島信一・橋本恭明・添田吉則: 日本農薬学会第 12 回大会講演要旨集, p. 134, 1987