食品中の残留農薬分析に関する研究 (第 10 報)

農作物中のカルバリルの残留分析法

(昭和 47 年 11 月 17 日受理)

武田 明治* 関 田 寛* 大槻久美子*
高松千賀子* 田 辺 弘 也*

Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (X) Analytical Method of Residues of Carbaryl in Agricultural Products

Mitsuharu TAKEDA*, Hiroshi SEKITA*, Kumiko OTSUKI*, Chigako TAKAMATSU*
and Hiroya TANABE

(* National Institute of Hygienic Sciences: 18-1 Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

The analytical method of 1-naphthyl-*N*-methylcarbamate (NAC) residues in agricultural products was investigated.

It was found that the color formed by coloring reaction in basic medium is much more stable than that in acidic one, however, some carbamates may prevent the determination of NAC in basic medium.

In clean-up of NAC by coagulating solution, removal of colored materials was uncomplete when the samples contain abundantly colored materials. In these cases, further purification procedures were required. Therefore, when there are many samples in the routine work, the column chromatographic purifications are convenient rather than the coagulation procedure.

The recoveries of NAC added into vegetables were examined by the proposed method, and it was shown that recoveries are between 91% and 96.5%.

(Received November 17, 1972)

昭和 46 年 12 月 20 日厚生省告示第 404 号¹⁾をもって「食品、添加物等の規格基準」の一部が改正され、食品中の農薬の残留基準が新たに 11 品目 3 農薬に対して追加設定され、その中でカーバメート農薬として Carbaryl (1-naphthyl *N*-methylcarbamate, NAC) の残留基準が 8 品目に対して設定された。

今回著者らは種々の農作物中の NAC の残留分析法を確立する目的で、AOAC 法²⁾ならびに“昭和 46 年度農薬残留対策調査事業に関する検討資料”³⁾として配布された方法（農林省法と仮称）を参考にして検討を加え、ほぼ満足すべき分析法を確立したので報告する。

* 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1 丁目 18-1

実験方法

1. 試料、試薬ならびに装置

試料：玄米、コマツナ、シュンギクおよびカリフラワーは市販品を購入して用いた。なお玄米は製粉機で粉碎し、他はミキサーでホモジナイズした。

有機溶媒：使用した有機溶媒類はすべてすり合わせ蒸留装置を用いて市販一級品を蒸留した。

活性アルミナ：Merck 社製中性アルミナ（活性度 I）

活性炭：白鷺印活性炭

セライト-545：Johns-Manville 社製

ポリエチレングリコール溶液：ポリエチレングリコール 200 1 ml をジクロルメタンに溶解して全量を 100 ml

としたもの。

カーバメート農薬：工業用原体を再結晶したものを用いた。

NAC 標準溶液 A：アセトン溶液 1 ml 中に NAC 50 μ g を含有する。

NAC 標準溶液 B：メタノール溶液 1 ml 中に NAC 50 μ g を含有する。

NAC 標準溶液 C：*n*-ヘキサン溶液 1 ml 中に NAC 50 μ g を含有する。

その他の試薬類はすべて市販の試薬特級品を用いた。

分光光度計：島津製 Multiconvertible Spectrophotometer Double-40 型

2. 実験操作

2-1. NAC の定量

a. アルカリ性下の反応：NAC 標準溶液 B 1 ml を共栓試験管に採り、0.5 N メタノール性水酸化カリウム溶液 1 ml を加え、栓を施して 45° の水浴上で 10 分間加温したのち、ただちに流水中で室温まで急冷し、さらに室温で 20 分間放置した。最後にメタノール 7.5 ml および 0.03% *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレート溶液 0.5 ml を加え、580 $m\mu$ における吸光度を測定した。

b. 酢酸酸性下の反応：NAC 標準溶液 B 1 ml を共栓試験管にとり、0.2 N メタノール性水酸化カリウム溶液 1 ml を加え、室温で 5 分間放置後、酢酸 7 ml を加え、よく振り混ぜたのち、0.1% *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレート、酢酸溶液 1 ml を加え、475 $m\mu$ における吸光度を測定した。

2-2. クリーンアップ

5% 含水アルミナ 15 g をクロマト管 (1.5 cm $\times$ 30 cm) に常法に従って湿式法で充填し、試料を注入後、*n*-ヘキ

サン-アセトン (9:1) 混液で溶出した。初留 30 ml は捨て、次の 60 ml を採取し、ポリエチレングリコール溶液 1 ml を加え、クデルナ・ダニッシュ濃縮器で減圧下約 1 ml まで濃縮した。この濃縮液をあらかじめ活性炭・セライト (1:10) の混合物 2 g を湿式法で充填したカラムに注入し、アセトン 150 ml で溶出した。溶出液はクデルナ・ダニッシュ濃縮器で減圧下約 1 ml まで濃縮し、さらに空気気流中で溶媒を完全に留去した。

2-3. NAC の抽出

前処理された試料 100 g を 500 ml の共栓三角フラスコに採り、これにジクロルメタン 200 ml を加え、30 分間ときどき振りまぜながら放置したのち、無水硫酸ナトリウム 150 g を加えて 20 分間ときどき振りまぜながら放置した。抽出液をろ過し、ろ液 100 ml を採り、ポリエチレングリコール溶液 1 ml を加え、クデルナ・ダニッシュ濃縮器で減圧下約 1 ml まで濃縮したのち、空気気流中で溶媒を完全に留去し、残留物を *n*-ヘキサン-アセトン (9:1) の混液 1 ml に溶解し、クリーンアップ供試液とした。

実験結果

1. 呈色液の安定性

NAC 50 μ g を用いてアルカリ性あるいは酢酸酸性下における *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートとの反応生成物の安定性について両者を比較した。

Fig. 1 より明らかなようにアルカリ性溶液中では反応生成物は反応後 4 時間経過しても 580 $m\mu$ における吸光度の変化は認められなかった。一方、酢酸酸性溶液中においては、呈色直後から 20 分までは 475 $m\mu$ における吸光度にほとんど変化は認められなかったが、その後時間の経過と共に吸光度が徐々に減少することが観察された。

Fig. 1. Stability of coloring solution produced from NAC
MAF: Method of Ministry of Agriculture and Forestry, AOAC: AOAC Method

Fig. 2. Visible absorption spectra of some carbamate pesticides in AOAC method

50 μg of each pesticides were used.

BPMC: 2-*sec*-butylphenyl *N*-methylcarbamate

CPMC: 2-chlorophenyl *N*-methylcarbamate

MPMC: 3, 4-dimethylphenyl *N*-methylcarbamate

MTMC: 3-methylphenyl *N*-methylcarbamate

PHC: 2-isopropoxyphenyl *N*-methylcarbamate

APC: 4-(diallylamino)-3, 5-dimethyl *N*-methylcarbamate

EMPC: 4-ethylthiophenyl *N*-methylcarbamate

NAC: 1-naphthyl *N*-methylcarbamate

Fig. 3. Visible absorption spectra of some carbamate pesticides in Method of Ministry of Agriculture and Forestry

50 μg of each pesticides were used.

2. カーバメート農薬の影響

現在わが国で登録されているカーバメート農薬による NAC 分析に対する妨害の有無を検討する目的で、各種カーバメート農薬 50 μ g を加水分解後、アルカリ性あるいは酢酸酸性において *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、可視部吸収スペクトルを測定した。

Fig. 2 は酢酸酸性下において反応させた場合の可視部吸収スペクトルであるが、NAC の測定波長である 475 $m\mu$ に極大吸収を示すものではなく、本条件下においては他のカーバメート農薬は NAC 分析をほとんど妨害しないと考えられた。しかしながらアルカリ性のものでは、Fig. 3 に示されるように、NAC の測定波長である 580 $m\mu$ において吸収極大を示すものはなかったが、PHC および MPMC の吸収が認められ、これら農薬が共存する場合、NAC の定量を妨害することが考えられた。

は、Fig. 3 に示されるように、NAC の測定波長である 580 $m\mu$ において吸収極大を示すものはなかったが、PHC および MPMC の吸収が認められ、これら農薬が共存する場合、NAC の定量を妨害することが考えられた。

3. 加水分解条件

NAC の加水分解条件を検討する目的で、NAC 50 μ g, 0.2 N メタノール性水酸化カリウム溶液 1 ml を用いた場合の吸光度に及ぼす影響について検討し、Fig. 4 に示す結果を得た。

NAC の加水分解は 20°, 30° および 40° においても吸光度にほとんど差がなく、また反応時間が 3 分から 45

Fig. 4. Effects of time and temperature of hydrolysis of NAC on optical density

Fig. 5. Effect of concentration of acetic acid on optical density

分の間でも大差ないことが見出された。

4. 酢酸の濃度

NAC の加水分解後に添加する酢酸の濃度について、100, 75, 50, 25 および 10% 酢酸を用いて検討した結果を Fig. 5 に示した。

酢酸濃度が減少するにつれ吸光度が減少する傾向があり、反応生成物の安定性も低下することが認められた。今回検討した条件のうちでは氷酢酸を用いた場合の吸光度が最も高く、かつ安定であり、発色 20 分後においても吸光度が約 3% の減少にとどまった。

5. 呈色試薬の濃度

NAC の加水分解生成物をジアゾ化する試薬の濃度を検討するために、*p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオ

ロボレートの 0.1, 0.05 および 0.025% 酢酸溶液を用いて、475 m μ における吸光度を測定した結果、これらの間には大差は認められなかったが、濃度が低くなるにつれ、吸光度が若干減少する傾向が観察された。

6. 検量線

NAC の直線性を検討する目的で、NAC 10 μ g から 50 μ g の範囲内の検液を調製し、酢酸酸性下、*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検量線を作成した。

Fig. 6 から明らかなように検量線は 50 μ g まで原点を通る直線が得られ、本法が十分 NAC の残留分析に供し得ることが示唆された。

Fig. 6. Calibration curve of NAC

Fig. 7. Recovery of NAC from on activated charcoal-celite 545 (1:10) column

Table 1. Recovery of Added NAC by the Modified Method

Samples	Recovery (%)			Average (%)
Rice (Unpolished)	96.0	92.8	100.8	96.5
Komatsuna (<i>Brassica Rapa</i> var. <i>Komatsuna</i>)	97.6	96.8	95.2	96.5
Shungiku (<i>Chrysanthemum cornarium</i>)	91.2	92.0	91.5	91.6
Cauliflower	85.0	96.8	90.8	90.9

One ml of NAC methanol solution (25 ppm) was added to each homogenized sample.

7. 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭-セライト (1:10) 混合物 1g, 2g および 3g を用いて作製したカラムに NAC 標準溶液 C 1ml を添加し, 各カラムからの回収率を各フラクション 50 ml ずつ分取して検討した (Fig. 7).

各カラムからの NAC の溶出パターンは幾分異なるけれども, いずれにおいても NAC を定量的に回収するためには溶出液 150 ml が必要であることが示された.

8. 添加回収実験

前処理された試料 100 g に NAC 標準溶液 A 1ml を添加し, 各試料からの添加回収率を求め, その結果を Table 1 に示した.

Table 1 に示すように玄米およびコマツナでそれぞれ 96.5%, シュンギクで 91.6%, カリフラワーで 90.9% とほぼ満足すべき結果が得られた.

なお本法における NAC の最小検出量は $0.5 \mu\text{g}$ で, 試料 100 g を使用した場合の検出限界は 0.01 ppm である.

考 察

NAC の生鮮食品中の残留基準の設定に当り, 本農薬の残留分析法について検討した.

分析法としてはアルカリ性あるいは酢酸酸性のもとにおけるジアゾ化反応による比色法, ポーラログラフィー⁴⁾ および酵素阻害法⁵⁾ が知られているが, 食品衛生分野の現状を考慮するとき, 比色法が最も適切と考えられたので, 主にこれについて検討した.

NAC のアルカリ加水分解物である α -ナフトールと p -ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートとの反応は, アルカリ性のもとでは波長 $580 \text{ m}\mu$ に吸収極大を, また酢酸酸性のもとでは $475 \text{ m}\mu$ に吸収極大を示す. 後者は吸収極大波長において他のカーバメート農薬に対する特異性にすぐれ (Fig. 2, Fig. 3), 既登録カーバメート農薬が圃場で併用あるいは何らかの原因でこれら農薬によって汚染された試料を分析する場合, 試料中に存在するこれら農薬による妨害がほとんどないと推定された. しかしながら呈色液の安定性では前者がはるかにすぐれているが, 後者においても反応20分間は吸光度がほぼ一定であり, 十分実用に供し得る安定性があると考え

られた (Fig. 1).

以上の諸結果を考慮して, NAC の呈色は酢酸酸性のもとに行ない, 吸光度の測定も呈色5分後に行なうこととした.

NAC の加水分解条件は AOAC 法および農林省法とで大きく異なっているので, いずれがすぐれているか検討する目的で行なった. 0.2 N メタノール性水酸化カリウム溶液を用いて 20° , 30° および 40° で反応させたものについて吸光度を測定したが, これらの吸光度間に大きな差異は認められず, いずれの場合でも十分加水分解されていることが示されたので, 反応の容易さを考慮して室温で5分間放置する方法を採用した (Fig. 4).

酢酸量としては, AOAC 法では 17 ml が採用されているが, 最終液量を少なくすることが可能ならば, 最小検出量を小さくすることが出来る. しかし残留農薬分析が試験業務として行なわれる実状から, 最終液量を極端に少なくすることは分析法の手技を複雑にして好ましくない. 一応 10 ml が適量と考えられたので, 全量 10 ml とし, これに最も影響の大きいと考えられる酢酸濃度を種々変えて, 酢酸濃度の呈色におよぼす影響につき検討したところ, 氷酢酸を用いた場合が吸光度も高く, 呈色も安定であることが見出された (Fig. 5).

本法による検量線は $50 \mu\text{g}$ まで原点を通る直線が得られた (Fig. 6).

比色法の場合, 試料に由来する着色物により強く呈色が影響されるため, 着色物の除去が分析法の良否の重要なファクターとなる.

クリーンアップ法として AOAC 法²⁾ は凝集液による着色物の凝集除去法が採用されているが, 検討された食品がリンゴ²⁾, レタス²⁾ およびハチミツ⁶⁾ に限られているため, 着色の著しいコマツナにつき AOAC 法を追試したところ, 着色物の除去は完全ではなく, 分析結果に大きく影響することが見出され, これに代るクリーンアップ法の確立が必須となった. 残留農薬分析の分野でクリーンアップ法としてしばしば用いられているアルミナ, フロリジルおよび活性炭カラムの応用について検討した. フロリジルはわずかながらアルカリ性を示すことが予想されるため, 中性アルミナにつき検討したところ, 図示し

なかったが、5% 含水アルミナカラムから *n*-ヘキサン-アセトン (9:1) 混液で定量的に回収されることが見出された。しかしながらアルミナカラムのみでは着色物の多い試料は完全には着色物を除去できず、活性炭カラムによるクリーンアップが必要であった。活性炭カラムからの NAC の溶出は Fig. 7 に示されるように、今回検討された3つの条件ともに NAC を定量的にカラムから溶出させるには溶出液 150 ml が必要であることが観察された。着色物の除去を考慮して活性炭-セライト混合物を 2g 用いることとした。

試料中の着色物のみの除去を目的とするのならば、活性炭カラムによるクリーンアップで十分であるが、活性炭カラムは油脂類の除去効果が弱いため、これらによって比色操作を妨害することが予想される。そこでクリーンアップ法としてアルミナおよび活性炭カラムクロマトグラフィーを併用することとした。

以上の諸結果を勘案して考えられた分析法の妥当性を検討するために、穀類として玄米、野菜類としてコマツナ、シュンギク、カリフラワーなど、残留分析で抽出あるいは着色物などで問題となる4種に対する NAC の添加回収実験を行ない、91~96.5% の回収率が得られ、ほぼ満足すべき結果が得られた (Table 1)。なお本法による検出限界は試料 100 g を使用した場合 0.01 ppm で、今回決定された残留基準を考慮するとき、十分に実用に供し得る分析法と考えられた。

まとめ

昭和46年12月20日付の厚生省告示により、「食品、添加物等の規格基準」の一部改正が行なわれ、NAC の残留基準が8品目に対し追加された。著者らは農作物中の NAC の残留分析法を確立する目的で、すでに知られている AOAC 法ならびに農林省法を参考として、現在のわが国での農薬使用の実態を考慮しつつ NAC の分析法を検討した。

既登録8種のカーバメート農薬は酢酸酸性のもとにおける *p*-ニトロベンゼンジアゾニウムフルオロボレートとの反応ではほとんど NAC の比色を妨害しないことが

見出されたが、アルカリ性下の反応と比較して安定性において劣るが、前者は反応20分以内では十分安定であり、また他のカーバメート農薬による妨害の可能性なども考慮して、酢酸酸性下の反応を採用した。

クリーンアップ法は AOAC 法について検討したところ、多量の色素を含有する試料では色素の除去が不十分で、さらに活性炭カラムによる処理が必要であった。アルミナおよび活性炭カラム法は試料中の油脂類および着色物の除去ともにすぐれており、カラムクロマトグラフィーを二度行なうため、一見繁雑のように見受けられるが、多数の試料を処理する場合にはむしろ簡便であると思われた。

以上の諸結果を勘案して考えられた分析法における添加回収実験で、91~96.5% の範囲の回収率が得られ、ほぼ満足すべき結果が得られた。なお本法による検出限界は試料 100 g を使用した場合 0.01 ppm である。

終りに本研究に当り、カーバメート農薬の原体を提供下された農薬工業会に深謝します。

本報の一部は日本食品衛生学会第23回学術講演会(昭和47年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) 厚生省告示第404号(昭和46年12月20日)。
- 2) Official Methods of Analysis of the Assoc. Offic. Anal. Chem. 11th ed. p. 493 (1970). Johnson, D. P.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 46, 234 (1964); *ibid.*, 47, 283 (1964).
- 3) 農林省農政局植物防疫課: “昭和46年度農薬残留対策調査事業に関する検討会資料” p. 54.
- 4) Gajan, R. J., Benson, W. R. and Finocchiaro, J. M.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 48, 958 (1965).
- 5) Wales, P. J., McLeod, H. A. and McKinley, W. P.: *ibid.*, 51, 1239 (1968).
- 6) Johnson, D. P. and Stansbury, H. A.: *ibid.*, 48, 771 (1965).