

魚肉から有機塩素剤（農薬） の検出成功例について

化学室 大山峰吉

1969年9月にコザ保健所管内の比謝川で魚が大量に斃死し、その毒物検索の依頼を受けましたが、その方法により有機塩素剤（農薬アルドリン）を検出しましたので報告します。

〔一〕 検 体

1. 鯉、数尾
2. 水、20ℓ

〔二〕 試料の採取部位

魚毒としてよく知られる青酸塩、除草剤、有機燐剤等は水から検出し得なかつた為、鯉の背筋部分を試料として次の通りに有機塩素剤の検査に供した。

〔三〕 試薬、装置等

1. 試 薬

- A、ヘキサン；特級を再溜（BP、68～69℃）
- B、アセトニトリル；1級を再溜（BP、80～82℃）
- C、エチルエーテル；特級
- D、活性アルミナ；カラムクロマト用。
- E、硝酸銀含蓄のTLC-PLATE。

2. 器材装置等

- A、ガスクロマトグラフ（FID）装置
- B、TLC装置
- C、カラムクロマトグラフ装置
- D、石英ランプ又は紫外線照射装置

〔四〕 試験操作

1. 試 料（鯉肉）の前処理

採取又は送付された魚は速やかに冷凍した後、その筋肉部分（皮は除く）約100gを切り1cm³大に細切し再び凍結さす。

2. 抽 出

凍結した鯉肉100gにヘキサン200mlを入れホモにかける。ホモしたものはそのまま1分

間程水浴中で温め再度3分間程ホモにかける。ヘキサン層を傾斜してとり新たにヘキサン200mlで処理し、同様に計3回抽出する。ここで得たヘキサン抽出液は合して東洋濾紙#2で2回濾過してから水浴上で濃縮し約20mlとする。ここでは農薬のほか多量の脂肪質も抽出されて来るがこれを次の操作に移す。

3. Partition

上で得たヘキサン20mlを分液漏斗に移し、更に10mlのヘキサンで容器を洗い計30mlとする。これにヘキサン飽和のアセトニトリル(アセトニトリル100にヘキサン15の割合で加えるとよい)を30ml加えて充分に振盪すると脂肪分はヘキサンに留まり、農薬は下層のアセトニトリルに移って来る。このPartitionを3回くり返し、ここで得たアセトニトリル約90mlを水浴中に入れてdraft内でとばす。(アセトニトリル溜去にはKUDERNA-DANISH-EVAPO-RATORを使うと便利でありロスも少ない。)アセトニトリル液が約10mlになった時、水浴上に移し送風しながら揮散せしめ残渣を得る。この残渣にはたびたび少量の脂肪が混入して来ることもあるが、この際には脂肪(油滴)が完全に透明になるまで送風乾燥すればよい。ここで得られた残渣は再度ヘキサン10mlでとがして試験管にとり次のカラムクロマトに供する。

4. カラムクロマトグラフ

広口ビンに活性アルミナ50gを入れて水0.7mlを点滴して数分間強振すると活性度は減弱しその含水率は約1.4%となる。ガラスウールをつめたカラムにこのアルミナをつめヘキサン50mlを注ぎ予浸し、そのヘキサン層の上端にマジックで印をつける。次にヘキサンの流速を毎分3.5~4mlに調整しておく。ヘキサンを流去していきアルミナの上端が見えだす直前に達したならば検体のヘキサン溶液10mlを入れ、更に別のヘキサン10mlで試験管を洗い入れる。ヘキサン層をゆるやかに流し出しカラム層の上端に達した時に別に用意したElute液(ヘキサン9:エーテル1)を加えてマジック印のところまで満たす。次に100mlのコルベンを用意してこれにEluteした液50mlづつ順次分取してゆき5 Fractionsまでとる。この分取した液は次のG.C用に供す。

10ml + 10ml + 10ml

5. ガストロマトグラフ (FID)

上で得たFractionsは濃縮して2~3mlとし、その2~5μlをG.C (FID) に注入する。同時に各種農薬のStandardsを作り対照して見る。それらのPeakのRetention Time及びUniformから検体を同定する。検体のそれはアルドリンと一致した。試みにその時の条件は次の通りである。

Col. SE30, 1.5%

Carrier - Gas; 窒素ガス 40 ml/min

燃料ガス; 水素ガス 20 ml/min

Col. T; 160°C /

INJ. T; 175°C /

SENS. XATT₀ = 10¹⁰ × 1

INJ. VOL; 2μl

Chart - Speed; 1cm/min

R-Time ; 4.5分

6. TLC

a. PLATEの作成

200 ml の遠心管に5%石膏含有のアルミナ40gと0.03N-硝酸80mlを入れて充分振盪した後1200rpmで1~2分遠心し上澄液を棄て、更に蒸留水80mlで2回洗う。次に1%硝酸銀液10mlを加え全量が120gになるまで蒸留水を追加し振盪後に常法により、TLC-PLATEを作る。100°C、3.0分間活性化しデシケーター中に保存する。使用時には下端から13cm部に一線を画し又両側面部は0.5cm巾にアルミナを削去すると再現性の良好なものとなる。

b. 展開

Fraction 3 (GCでアルドリンのピークに一致する部)を濃縮し0.1cc程度とし、同時に他の農薬の標準品(1μg/1μl)を対照として1~5μlスポットする。(下端から3cmの部位)。又展開距離は10cmとする。割線を予め上述の通り入れておくところまでストップするから便利である。展開液としては1%エーテル含有のn-ヘキサンを用いる。展開槽内には槽に合わせてL字型の濾紙をはめ込みヘキサンの蒸気を均一に保つ様工夫する。

c. 顕色法

展開終了後は風乾し、これに水銀ランプを5分間程度あてると黒色のスポットを生じる。(水銀ランプの代わりに強い紫外線を10~15分あててもよいが水銀ランプの方がより効果的である。)検体のスポットはアルドリンのRfに一致した。

(五) まとめ

1. 今回の検査は水から有機塩素剤が検出し得ない場合でも魚肉を用いるならば充分可能である良い例と思う。文献によると魚肉中では水に比し約数十倍にも濃縮されて農薬は残留するという。本例はGC(FID)とTLCにより農薬のアルドリンを判明し得たが硝酸銀含有のPLATEを使う事により塩素化合物なる事も確認し得た。今迄この様な事例にたびたび出会ったが、抽出操作が思うように行かなかった。即ち抽出物には目的の農薬のほかに脂肪分が多量にはいり込みその分離で苦労をしたが、アセトニトリル法を用いてこの面は全部解決し得たように思われる。又私がアメリカ(オハイオ州シンシナティ、Robert A. Taft Center)で経験した事を併記するならば即ちGCのElectron-Captureを用いるならば0.1pg(10⁻¹³g)でも可能であり、従って魚肉も10g~20gで充分足りる。又、カラムクロマトのFRACTIONも濃縮せずにそのまま満足なピークが得られる。当研究所にはE.Cがないため鯉肉も100g以上とり、FRACTIONも濃縮して行ったものである。

2. Fraction 3で得られた農薬は本来ならば更に赤外分光器にかけねばならないが、当研究所にはないので参考までにオハイオで行った方法を概述するとTLC分離では硝酸銀処理をしない普通のアルミナPLATEを使って展開し、顕色剤には0.01% Rhodamine-B 95%アルコール溶液を全体が、微ピンクになるまで噴霧してから暗室でUV光線を当てると紫色のスポットが現われる。

この部分を削りとり、マイクロのカラムクロマト管（小さなガラス管で自製しうる）に入れヘキサン4とエーテル1の混液でEluteし、これを注意して濃縮し0.2 ml程度にする。これを臭化カリのマイクロ鏡となし1Rにかけるとよい。2 µg 以上で充分分析しうるという。

C、今回は赤外分光器がないため不本意ながらGCとTLC法による確認にとどめたが今後は赤外法も併試したいと思う。

又、定量や回収率の面については次の機会に行うつもりである。今回述べた方法は他の検体例えば牛乳、野菜、土砂、水その他の食品にも適用し得るものと思う。

参考文献

Analysis of Pesticides in aquatic environment . U . S . Department of the interior FWPCA .