

へい死魚のエラに付着した農薬の分析法の検討

廣田敏郎¹・木下誠¹・廣中博見¹

Analysis of Agricultural Chemicals Extracted from Gills of Perished Fish

Toshiro HIROTA, Makoto KINOSHITA, and Hiromi HIRONAKA

要 旨

魚のへい死原因の一つとして農薬が考えられる。今回、魚のエラに着目し、エラに付着、吸着した農薬の分析について検討を行った。特にエラから農薬を抽出する溶媒の検討およびフロリジルカラムを用いたクリーンアップの検討を行った。その結果、抽出溶媒は、ヘキサンおよびジクロロメタンを用い、クリーンアップには Sep-Pak フロリジルカラムを用いることにより環境基準農薬およびゴルフ場農薬等 42 項目中、36 項目で 50 %以上の回収率が得られた。

Key Words : 魚 fish, エラ gill, へい死 perish, 農薬 agricultural chemicals
Sep-Pak フロリジルカラム Sep-Pak florisol column

はじめに

福岡市では、魚のへい死事故が毎年数多く発生している。魚のへい死原因の一つとして農薬が考えられるが、農薬が原因と特定できた事例は少ない。その理由の一つとして、河川水中の農薬を分析して原因究明しようとしても、へい死の通報後の採水となるため原因となる水は概に流れてしまい、河川水から農薬を検出できないことが多い。そこで、魚のエラに着目し、そのエラに付着、保持した農薬を測定することは魚へい死原因究明に役立つのではないかと考え、検討を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬

・ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン
ヘキサン、アセトン、ジクロロメタンは和光純薬工業社製残留農薬・PCB用ヘキサン2000、アセトン1000、ジクロロメタン1000を用いた。

1. 福岡市保健環境研究所 環境科学部門

・塩化ナトリウム

塩化ナトリウムは和光純薬工業社製残留農薬用を500で8時間以上加熱保冷したものをを用いた。

・農薬類の混合標準液

農薬類の混合標準液は、和光純薬工業製の13種農薬混合溶液および32種農薬混合標準液に、和光純薬工業製の標準品 CVP-、CVP-、Benzoepin-、Benzoepin-、Malathion、Etofenprox をそれぞれヘキサンの溶解させ調整した。

2. 測定項目、装置および測定条件等

・測定項目

表1に測定項目、モニターイオンおよび魚毒性を示した。

・ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

HP6890/Automass sun300

・測定カラム

J&W SCIENTIFIC 社製 DB-5MS (長さ 30m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μm)

・キャリアガス He, 16.4psi

表1 測定項目，モニターイオンおよび魚毒性

項目	モニターイオン	魚毒性	項目	モニターイオン	魚毒性
Metamidophos	141 94	-	Pendimethalin	252 281	B - s
Dichlorvos(DDVP)	109 185	B	CVP-	267 323	B
Etridiazole	211 183	A	Methyldymron	107 119	A
Acephate	136 94	A	Captan	79 149	C
Chloroneb	191 206	A	Isofenphos	121 185	B
Fenobucarb	121 150	B - s	CVP-	267 323	B
Pencycuron	125 180	B	Benzoepin-	339 277	C
Benfluralin	292 264	B	Napropamide	72 271	A
Simazine	201 186	A	Butamifos	286 200	B
Propyzamide	173 175	A	Flutolanil	173 281	B
Diazinon	179 304	B - s	Isoprothiolane	189 162	B
Chlorothalonil	266 264	C	Trichlopyr butxyethyl	212 210	B
Iprobenfos	91 204	B	Isoxathion	105 177	B
Terbucarb	205 220	A	Benzoepin-	339 277	C
Tolclofos-methyl	265 267	A	Mepronil	119 269	B
Metalaxyl	206 160	A	Chlornitrophen	317 289	A
Dityopyr	354 286	B	Pyributicarb	165 108	B
Fenitrothion	125 277	B	prodione	314 316	A
Thiobencarb	100 257	B	Pyridaphenthion	340 199	B
Malathion	127 173	B	EPN	157 185	B - s
Chlorpyrifos	197 314	C	Etofenprox	163 376	B

A 類：コイに対する 48 時間後の T L m が 10ppm 以上

B 類： " が 10 ~ 0.5ppm

B-s 類：B 類に属するもののうち，使用にあたって特に注意を要するもの

C 類：コイに対する 48 時間後の T L m が 0.5ppm 以下

・カラム温度

50 (0min)-30 /min-105 (3min)-6 /min-270 (2.5min)

・インジェクション

スプリットレス (1.5min) 温度 220

・インターフェイス温度 270

3 . Sep-Pak フロリジルカラムによる回収試験

ヘキサン 10mL でコンディショニングした Sep-Pak フロリジルカラム (Waters 社製：910mg) に 1ppm 混合標準溶液 0.5mL を負荷し，その後 20 %アセトン/ヘキサン溶液，アセトン溶液各 10mL で順に溶出させ，それぞれの溶出液に窒素を吹き付けて 0.5mL の検液とした．また，20 %アセトン/ヘキサン溶液は 5mL ,10mL ,15mL と量を変えて検討を行った．

4 . フロリジルカラムによる回収試験

活性化したフロリジル 3g(和光純薬社製：Florasil PR)

を内径 10mm のガラスカラムにつめ，30mL のヘキサンでコンディショニングした．1ppm 混合標準溶液 0.5mL をカラムに負荷し 20 %アセトン/ヘキサン溶液 30mL ，アセトン溶液 30mL で溶出させ，ロータリーエバポレーターで濃縮し，窒素吹き付けて 0.5mL の検液とした．

5 . アセトン溶液からヘキサン層への転溶試験

1ppm 混合標準溶液 2.5mL をアセトン 100mL に添加し，蒸留水 500mL を加え，ヘキサン 100mL で 10 分間振とう抽出後ヘキサン層を 300mL 三角フラスコに分取した．残ったアセトン水溶液についても，同様にヘキサン 100mL で抽出し，ヘキサン層を 300mL 三角フラスコに合わせた．次に，適量の無水硫酸ナトリウムを加え脱水し，ロータリーエバポレーターで 2mL まで濃縮し，窒素を吹き付けて 0.5mL の検液とした．

6 . アセトン溶液からヘキサン，ジクロロメタン層への転溶試験

2.5ppm 混合標準溶液 2mL をアセトン 10mL に添加し蒸留水 50mL, 塩化ナトリウム 1.25g を加え, ヘキサン 2.5mL で 10 分間振とう抽出を 2 回くり返しヘキサン層を 10mL 遠心沈澱管に合わせ無水硫酸ナトリウムを加え検液とした。

次に, アセトン水溶液にジクロロメタン 2.5mL を加え, 10 分間振とう抽出を 2 回くり返し, ジクロロメタン層を 10mL 遠心沈澱管に分取した。これに, 無水硫酸ナトリウムを適量加え検液とした。

7. 魚 (スズキ) のエラを使った農薬の回収試験

魚のエラ 15g に 2.5ppm 混合標準液 0.8mL を添加し 45 分間常温静置した。次に, アセトン 200mL を加え, 超音波で 10 分間抽出後, アセトン溶液を 1000mL の分液ロートに移し, 蒸留水 500mL, 塩化ナトリウム 12.5g を加えヘキサン 50mL で 10 分間振とう抽出を 2 回くり返しヘキサン層を 300mL 三角フラスコに合わせた。さらに, アセトン水溶液にジクロロメタン 50mL を加え, 10 分間振とう抽出を 2 回繰り返す。

300mL 三角グラスコに合わせた。無水硫酸ナトリウムで脱水後, ロータリーエバポレーターで 2mL まで濃縮後, 窒素を吹きつけ 2mL の検液とした。

その 0.5mL を 3 と同様 Sep-Pak フロリジルカラムに負荷し, 20 %アセトン/ヘキサン溶液 10ml, アセトン 10mL で, それぞれ遠沈管に溶出させ, 窒素を吹きつけて 0.5mL としそれぞれ検液とした。

結果と考察

1. Sep-Pak フロリジルカラムによる回収試験

表 2 に Sep-Pak フロリジルカラムを使った農薬標準溶液 (1 μg/1mL, ヘキサン溶液) の回収率結果を示す。20 %アセトン/ヘキサン溶液 5mL では回収率が 50 %を超えたのは 42 項目中 38 項目で, Benfluralin は 40 %, Benzoepin- は 48 %, Metamidophos 及び Acephate は回収できなかった。Metamidophos は 20 %アセトン/ヘキサン溶液では回収されなかったが, アセトン溶液では 54%の回収率が得られた。また, Metaraxyl, Frutolanil

表 2 Sep - Pak フロリジルカラムによる農薬の回収率 (%)

	A		B		A		B			A		B		A		B	
	5mL	10mL	10mL	10mL	15mL	10mL	5mL	10mL		10mL	10mL	15mL	10mL	15mL	10mL		
Metamidophos	<5	54	<5	33	<5	41	Pendimethalin	87	<5	91	<5	108	<5				
Dichlorvos(DDVP)	60	<5	54	<5	57	<5	CVP-	79	<5	84	<5	90	<5				
Etridiazole	111	<5	105	<5	117	<5	Methyldymron	113	<5	105	<5	132	<5				
Acephate	<5	<5	<5	<5	<5	<5	Captan	105	<5	110	<5	121	<5				
Chloroneb	80	<5	67	<5	69	<5	Isofenphos	86	<5	82	<5	91	<5				
Fenobucarb	86	<5	78	<5	81	<5	CVP-	75	<5	80	<5	86	<5				
Pencycuron	72	<5	70	<5	72	<5	Benzoepin-	48	<5	48	<5	65	<5				
Benfluralin	40	<5	43	<5	58	<5	Napropamide	75	<5	76	<5	89	<5				
Simazine	91	<5	93	<5	96	<5	Butamifos	90	<5	103	<5	135	<5				
Propyzamide	104	<5	99	<5	103	<5	Flutolanil	87	7	99	<5	121	<5				
Diazinon	112	<5	106	<5	113	<5	Isoprothiolane	96	<5	96	<5	110	<5				
Chlorothaonil	72	<5	72	<5	72	<5	Trichlopyrbutxyethyl	107	<5	110	<5	139	<5				
Iprobenfos	106	<5	106	<5	113	<5	Isoxathion	91	<5	99	<5	126	<5				
Terbucarb	95	<5	96	<5	99	<5	Benzoepin-	76	<5	73	<5	89	<5				
Tolclofos-methyl	70	<5	67	<5	68	<5	Mepronil	72	<5	75	<5	109	<5				
Metaxyl	54	13	80	<5	79	<5	Chlornitrophen	57	<5	59	<5	93	<5				
Dityopyr	77	<5	72	<5	78	<5	Pyributicarb	108	<5	112	<5	140	<5				
Fenitrothion	78	<5	80	<5	82	<5	Iprodione	90	<5	102	<5	123	<5				
Thiobencarb	76	<5	69	<5	71	<5	Pyridaphenthion	55	12	85	<5	109	<5				
Malathion	100	<5	99	<5	106	<5	EPN	80	<5	86	<5	110	<5				
Chlorpyrifos	104	<5	103	<5	106	<5	Etofenprox	115	<5	120	<5	104	<5				

A : 20% Acetone/Hexane Soln

B : 100% Acetone Soln

表3 フロリジルカラムによる回収率(%)

	A			B	
	30mL	30mL		30mL	30mL
Metamidophos	<5	<5	Pendimethalin	111	<5
Dichlorvos(DDVP)	<5	<5	CVP-	85	<5
Etoridiazole	142	<5	Methylidymron	118	<5
Acephate	<5	<5	Captan	117	<5
Chloroneb	100	<5	Isofenphos	93	<5
Fenobucarb	103	<5	CVP-	91	<5
Pencycuron	63	<5	Benzoepin-	92	<5
Benfluralin	114	<5	Napropamide	89	<5
Simazine	100	<5	Butamifos	132	<5
Propyzamide	102	<5	Flutolanil	109	<5
Diazinon	113	<5	Isoprothiolane	91	<5
Chlorothalonil	91	<5	Trichlopyr butxyethyl	114	<5
Iprobenfos	127	<5	soxathion	134	<5
Terbucarb	101	<5	Benzoepin-	98	<5
Tolclofos-methyl	89	<5	Mepronil	99	<5
Metalaxyl	<5	75	Chlornitrophen	85	<5
Dityopyr	97	<5	Pyributicarb	90	<5
Fenitrothion	100	<5	Iprodione	149	<5
Thiobencarb	72	<5	Pyridaphenthion	98	27
Malathion	125	<5	EPN	75	<5
Chlorpyrifos	97	<5			

A:20% Acetone/Hexane Soln

B:100% Acetone Soln

Pyridaphenthion は 20 %アセトン/ヘキサン溶液及びアセトン溶液の両液にまたがって溶出した。よって 5mL では不十分と考えられた。

そこで、20 %アセトン/ヘキサン溶液の溶出液量を 10mL,15mL と変えて検討した。その結果 Metaraxyl, Frutolanil, Pyridaphenthion は 20 %アセトン/ヘキサン溶液 10mL で、それぞれ 80%, 99%, 85%と高い回収率が得られ、アセトン溶液での溶出は見られなかった。よって Sep-Pak フロリジルカラムを用いた溶媒の溶出液量は、10mL が適当と考えられた。

2. フロリジルカラムによる回収試験

フロリジルカラムによる回収試験結果を表3に示す。Sep-Pak フロリジルカラムの回収試験と比較すると Metamidophos, Dichlorvos が回収されず、Metalaxyl が 20 %アセトン/ヘキサン溶液では溶出せず 100%アセトン溶液で溶出した。これはフロリジルを活性化しているため Sep-Pak フロリジルカラムより吸着活性が高いためと考えられた。また、Benfluralin および Benzoepin- はそれぞれ回収率が 114%, 92%と Sep-Pak フロリジルカ

表4 アセトン水溶液からヘキサン層への転溶試験(%)

	回収率		回収率
Metamidophos	<5	Pendimethalin	95
Dichlorvos(DDVP)	24	CVP-	90
Etoridiazole	102	Methylidymron	94
Acephate	<5	Captan	156
Chloroneb	79	Isofenphos	159
Fenobucarb	69	CVP-	84
Pencycuron	67	Benzoepin-	102
Benfluralin	94	Napropamide	81
Simazine	17	Butamifos	112
Propyzamide	85	Flutolanil	86
Diazinon	79	Isoprothiolane	79
Chlorothalonil	88	Trichlopyr butxyethyl	98
Iprobenfos	105	Isoxathion	139
Terbucarb	82	Benzoepin-	98
Tolclofos-methyl	80	Mepronil	82
Metalaxyl	15	Chlornitrophen	112
Dityopyr	79	Pyributicarb	96
Fenitrothion	99	Iprodione	89
Thiobencarb	78	Pyridaphenthion	96
Malathion	94	EPN	107
Chlorpyrifos	85	Etofenprox	134

ラムと比較すると高い回収率が得られた。以上の結果から、クリーンアップ法としては操作の簡便な Sep-Pak フロリジルカラムを用いることにした。

3. アセトン水溶液からヘキサン層への転溶試験

エラに付着した農薬をアセトンで抽出後、他の溶媒への転溶の条件を検討した。アセトン水溶液からヘキサン層への転溶試験結果を表4に示す。Metamidophos, Acephate は回収されず、Dichlorvos, Simazine および Metalaxyl はそれぞれ、回収率が 24%, 17%, 15%と低い値であった。他の 37 項目については、67 ~ 159%の回収率であった。

4. アセトン水溶液からヘキサン、ジクロロメタンへの転溶試験

実験3において5項目で回収率が低かったことから、NaCl 濃度が 2%になるように添加したアセトン水溶液からヘキサン層への転溶およびジクロロメタン層への転溶試験について検討した。その結果を表5に示す。ヘキサン層への回収率は表4の結果とほとんど差が見られなかった。また、ヘキサン層への転溶を行った後、アセトン水溶液をジクロロメタン層へ転溶した場合、Dichlorvos

表 5 アセトン溶液からヘキサン，ジクロロメタンへの転溶試験（％）

	ヘキサン層				ヘキサン層				ヘキサン層		
	ジクロロメタン層	ジクロロメタン層	Totale 回収率		ジクロロメタン層	ジクロロメタン層	Totale 回収率		ジクロロメタン層	ジクロロメタン層	Totale 回収率
Metamidophos	<5	<5	<5	Tolclofos-methyl	92	<5	92	Napropamide	97	<5	97
Dichlorvos(DDVP)	26	57	83	Metalaxyl	22	62	84	Butamifos	74	<5	74
Etridiazole	92	<5	92	Dityopyr	94	<5	94	Flutolanil	85	<5	85
Acephate	<5	<5	<5	Fenitrothion	72	<5	72	Isoprothiolane	96	<5	96
Chloroneb	103	<5	103	Thiobencarb	95	<5	95	Trichlopyrbutxyethyl	83	<5	83
Fenobucarb	88	8	96	Malathion	87	<5	87	Isoxathion	94	<5	94
Pencycuron	105	<5	105	Chlorpyrifos	92	<5	92	Benzoepin -	87	<5	87
Benfluralin	81	<5	81	Pendimethalin	75	<5	75	Mepronil	82	<5	82
Simazine	13	84	97	CVP -	83	<5	83	Chlornitrophen	69	<5	69
Propyzamide	89	<5	89	Methyldymron	118	<5	118	Pyributicarb	67	<5	67
Diazinon	100	<5	100	Captan	83	<5	83	Iprodione	79	<5	79
Chlorothalonil	87	<5	87	Isofenphos	96	<5	96	Pyridaphenthion	67	<5	67
Iprobenfos	85	<5	85	CVP -	86	<5	86	EPN	77	<5	77
Terbucarb	94	<5	94	Benzoepin -	87	<5	87	Etofenprox	104	<5	104

表 6 魚のエラからの農薬回収率（％）

	魚のエラ		アセトン水溶液			魚のエラ		アセトン水溶液	
	A	B	A	B		A	B	A	B
Metamidophos	<5	<5	<5	<5	Pendimethalin	94	<5	71	<5
Dichlorvos(DDVP)	31	<5	48	<5	CVP-	94	<5	67	<5
Etridiazole	86	<5	95	<5	Methyldymron	50	<5	80	<5
Acephate	<5	<5	<5	<5	Captan	40	<5	115	<5
Chloroneb	70	<5	91	<5	Isofenphos	100	<5	74	<5
Fenobucarb	94	<5	77	<5	CVP-	92	<5	66	<5
Pencycuron	53	<5	73	<5	Benzoepin-	81	<5	78	<5
Benfluralin	104	<5	72	<5	Napropamide	77	<5	71	<5
Simazine	75	<5	69	<5	Butamifos	87	<5	66	<5
Propyzamide	90	<5	71	<5	Flutolanil	84	<5	73	<5
Diazinon	86	<5	80	<5	Isoprothiolane	72	<5	74	<5
Chlorothalonil	<5	<5	68	<5	Trichlopyr butxyethyl	63	<5	71	<5
Iprobenfos	111	<5	72	<5	Isoxathion	67	<5	89	<5
Terbucarb	90	<5	76	<5	Benzoepin-	66	<5	64	<5
Tolclofos-methyl	96	<5	74	<5	Mepronil	72	<5	71	<5
Metalaxyl	81	<5	43	21	Chlornitrophen	52	<5	73	<5
Dityopyr	97	<5	74	<5	Pyributicarb	57	<5	75	<5
Fenitrothion	100	<5	68	<5	Iprodione	55	<5	60	<5
Thiobencarb	84	<5	77	<5	Pyridaphenthion	85	<5	56	<5
Malathion	88	<5	75	<5	EPN	112	<5	69	<5
Chlorpyrifos	95	<5	80	<5	Etofenprox	30	<5	70	<5

A : 20% Acetone/Hexane Soln . 10mL

B : 100% Acetone Soln . 10mL

は 57% , Simazine は 84% , Metalaxyl は 62% の回収率を得た . その結果 , 総回収率は 83% , 97% , 84% と高い値

となった . しかし , Metamidophos , Acephate はジクロロメタンでも回収できなかった . この 2 項目は水溶性が

高いので転溶が難しいと推測されるが、魚毒性は低く、へい死の原因となる可能性は低いと考えられる。また、NaCl を飽和状態での溶媒転溶条件の検討を行いたい。

5. 魚（スズキ）のエラを使った農薬の回収試験

魚のエラに添加した農薬の回収試験および同様の方法でアセトン水溶液に農薬標準液を添加回収した試験結果を表6に示す。エラからの回収率では42項目中36項目で50%以上の回収率が得られた。しかし、Metamidophos、Acephate、Chlorothalonil は回収できなかった。Chlorothalonil、Captan および Etofenprox は、エラに標準溶液を添加した場合とアセトン水溶液に標準液を添加した場合と回収率を比較すると回収率の低下が見られた。Chlorothalonil は5%未満、Captan は35%、Etofenprox は43%であった。Chlorothalonil、Captan の回収率が低かった原因として魚のエラおよびそのエラに付着した組織成分による分解等が推測される。これらの項目の回収率を上げるためには、分解を防ぐためにpHを3以下に下げると報告¹⁾があり、さらに検討も必要と考えられた。

今後は、魚を泳がせた水槽に市販農薬を添加し、エラに付着した農薬についての分析および代謝あるいは分解生成物についての解明等の検討を行いたい。

ま と め

魚のエラから添加した農薬（環境基準農薬、ゴルフ場農薬等42項目）を回収するための検討を行った。クリーンアップはSep-Pak フロリジルカラムを使用し、以下の結果が得た。

1. カラムクリーンアップについてはSep-Pak フロリジルカラムを用いることにより、魚毒性の低いAcephate、Metamidophos以外は50～120%の回収率が得られた。
2. アセトン水溶液からヘキサン層およびジクロロメタン層への転溶試験では、Metamidophos およびAcephateが回収できなかった。Dichlorvos、Simazine、Metaraxylはヘキサンでの回収率は低かったが、ジクロロメタンでは57～84%と高い回収率が得られた。
3. 魚のエラからの回収試験では42項目中36項目で50%以上の回収率が得られた。しかし、Metamidophos、Acephate、Chlorothalonil は回収できなかった。また、Captan は115%が40%、Etofenprox は70%が30%とアセトン溶液に標準溶液を添加した場合に比べ半分以下の回収率であった。

文 献

- 1) 農薬の残留分析法 農薬残留分析法研究班：中央法規出版，103，143，1995