

## Summary

An adsorption chromatography of HEOD with *p*-methoxy-azobenzene as indicator was investigated. The indicator makes it possible to trace the movement of HEOD during the procedure, and HEOD is recovered quantitatively.

By this method, the HEOD content in a Technical Dieldrin was determined to be 89-90%, and also, HEOD was separated successfully from its mixtures with each of *p,p'*-DDT,  $\gamma$ -BHC, and aldrin.

## Acknowledgement

The author is greatly indebted to Dr. M. Nakajima, college of Agriculture, Kyoto University, for facilities provided kindly for IR-analysis, and also to Dr. K. Matsui, Technical Faculty of Gumma University, for helpful advice and encouragement. The author is grateful to Mrs. S. Matsui for the assistance in the experimental part of this work.

## References

1) A. Stepanow: Ber., 39, 4056 (1906).

- 2) E. J. Agazzi, E. D. Peters, and F. R. Brooks: Anal. Chem., 25, 237 (1953).
- 3) H. F. Beckmann, E. R. Ibert, B. B. Adams, and D. O. Skovlin: J. Agr. and Food Chem., 6, 104 (1958).
- 4) W. F. Phillips and M. E. DeBenedictis: J. Agr. Food Chem., 2, 1226 (1954).
- 5) M. D. Gachart, F. J. Witmer, and Y. A. Tajima: Anal. Chem., 24, 851 (1952).
- 6) G. E. Pollard, W. M. Saltman, Peter Yin: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 38, 478 (1955).
- 7) A. E. O'Donnell, H. W. Johnson, jr. and F. T. Weiss: J. Agr. Food Chem., 3, 757 (1955).
- 8) W. R. Erwin, Dora Schiller, and W. M. Hoskins: J. Agr. Food Chem., 3, 676 (1955).
- 9) H. F. Beckmann: Anal. Chem., 26, 922 (1954).
- 10) J. B. McDevitt, Jr.: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 39, 383 (1956).
- 11) H. Brockmann and Hella Schodder: Ber, 74, 73 (1941).

**Parathion Residue in Rice Grains.** Chemical Studies on Organophosphorous Insecticides. I. Sinko Goro, Itiro Mura, Rokuro Sato (Agricultural Chemicals Inspection Station, Ministry of Agriculture and Forestry Kodaira-mati, Tokyo.). Received Jan. 27, 1959. *Botyu-Kagaku*, 24, 20, 1959 (with English résumé, 34).

6. 玄米中の Parathion 残留量 有機燐殺虫剤の化学的研究 (第1報) 後藤真康・牟田一郎・佐藤六郎 (農林省農薬検査所) 34. 1. 27 受理

Parathion の微量化学分析法の Averell-Norris 法を玄米中の parathion の定量に適するように改変した。本法の回収率は 100%, 誤差 4%, 検出限界は 100g の試料に対し 0.04 p.p.m. である。本法を用いて parathion 撒布歴の明かな 32 年度産米について分析した所, parathion は検出されなかった。又玄米中での parathion の経時変化について研究した。

Parathion は我が国において水稻のめい虫防除をはじめ, 果樹・そ菜等に最も多量に使われている農薬であるが, その毒性がかなり大きいため, 海外においては早くから作物体中の残留量が問題とされ, 多くの定量が行われている<sup>1,2)</sup>。我が国においても, 果実・茶・煙草等については既に若干の定量が行われているが<sup>3,4)</sup> 米については, 稲体上の残留量・浸透移行量等の研究は行われたが<sup>5)</sup> 玄米については, 撒布時期が大体出穂以前であり, 稲体上での消滅もかなり速かであり, 浸透移行量もあまり大でないで, 玄米中に parath-

ion が残存する危険については従来ほとんど考えられず, 定量も行われなかった。しかるに 32 年 7 月, 石川県において, 同県産の玄米・糠等よりかなり多量の parathion が検出された事が新聞紙上に報道され, 一般のつよい関心をよんだ。我々は直ちに同県において検出試験を行った試料の分与をうけ, 追試を行ったが, その結果は既報の如く<sup>6)</sup> parathion は検出されなかった。その後更に分析法に検討を加え, 又農林省植物

昭和 33 年 3 月, 日本農芸化学会関東支部講演会にて講演。

防疫課・各地農業試験場等の御助力により、parathion 撒布歴の明かな32年度産米を入手し、分析を行うと共に、玄米中での parathion の経時変化についても若干の研究を行ったので、その結果を報告する。

分析法の検討

Parathion の微量化学分析法には、Averell-Norris 法<sup>7)</sup>、*p*-nitrophenol 法<sup>8)</sup>、紫外線吸収法<sup>9)</sup> 等があるが、検討の結果 Averell-Norris 法が最も簡便で精度が高いので、この方法を玄米の分析に適するように改変して実施した。

Averell-Norris 法は parathion を還元し、diazo 化し、 $\alpha$ -naphthylethylenediamine dihydrochloride と coupling せしめ、生ずる赤紫色を比色するものであるが、nitrobenzene, aniline, methylanthlanilate, nitrotoluene など多くの芳香族 nitro, amino 化合物が parathion と同様の発色を示す<sup>10)</sup>。これらの parathion と誤認される恐れのある物質は天然物中に広範囲に含まれている。従って Averell-Norris 法の分析値は、そのみでは単に試料中にはその値以上の parathion が存在しない事を示すにとどまり、それだけの量の parathion が存在する事を示すものではない。真の parathion 含量を知るためには、同一品種・同一地方・同一鮮度の、parathion を含まない試料について blank を測定するか、又は blank を生ずる物質を除去して parathion を単離する方法を構ずると共に、他の化学分析法・生物検定法を並用して結果を補正しなければならない。

分析法

試料を粉碎し、その 300g を容量 1l の共栓フラスコに入れ、*n*-hexane 600cc を加え、時々ふりまぜながら一夜放置し、乾いた濾紙でこしわけ、濾液を分析する。濾液 200cc を容量 300cc の三角フラスコにとり、塩酸 (1:9) 10cc、亜鉛末 0.5g を加え、湯浴上で *n*-hexane を留去する。残液に ethanol 10cc, paraffin 1g を加え、湯浴上で 5 分間還流煮沸する。放冷したのち少量の脱脂綿で容量 100cc のメスフラスコ中にこしわけ、約 7cc の水で 3 回洗い濾液に合する。濃塩酸 1cc、0.25% 亜硝酸ソーダ溶液 1cc を加えてよくまぜる。10分後 5% スルファミン酸アンモン溶液 1cc を加えてよくまぜる。更に 10分後 1%  $\alpha$ -naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶液 2cc を加えてよくまぜ、10分後 ethanol 50cc を加え水で 100cc にみたく。10~20分後 555m $\mu$  の吸光度を蒸留水に対して測定する。液が濁っている時は乾いた濾紙でこしわけ、濾液を測定する。*n*-hexane 200cc

を同様に処理して試薬 blank を求め、測定値より減ずる。*n*-hexane 200cc に parathion 10~200 $\gamma$  を含む標準溶液を同様に処理して作製した検量線より parathion の量を求める。

分析精度

玄米の抽出液に parathion を加え、本法により分析した結果は第1表の通りである。検量線は  $Y = 0.00148X$   $S = 4r$  である。又この結果を Youden 法<sup>11)</sup> により検討した結果は、回帰式  $y = 0.9916x - 0.01$   $s = 3.2r$   $Sa = 1.6r$   $Sb = 0.013$  勾配の 95% 信頼限界  $0.9916 \pm 0.0303$  である。即ち本法の回収率は 100% と考えてよく、誤差 4 $r$ 、検出限界は 100g の試料に対し 0.04p.p.m. である。

分析法の問題点

i) 抽出溶媒: 抽出溶媒を選ぶために、市販の糠 10g を 100cc の溶媒で 1 時間ふりまぜて抽出し、抽出液 50cc 中の全抽出物と試料 blank を測定した結

Table 1. Recovery of parathion from rice grains.

Added (r)	Found (r)	Recovery (%)
5.1	4.5	80
10.3	9.2	90
∥	9.9	97
51.3	51.7	101
∥	49.0	95
102.6	102	99
∥	106	102
153.9	150	97
∥	160	104
205.2	199	97
∥	203	99

Table 2. Total extracts and blank values of rice bran with various solvents.

Solvent	Total extract (%)	Blank value. (p.p.m. as parathion)
<i>n</i> -hexane	16	0.7
	14	0.9
benzene	16	1.0
	16	1.0
ethanol	20	4.7
	24	3.7
acetone	18	1.7
	14	1.4

果は第2表の通りである。即ち、抽出能力はいずれも大差ないが、acetone, ethanol等の極性溶媒は試料 blank を抽出しやすい。又試薬 blank については、benzene は市販の製品によっては数 p.p.m. の値を示し、濃硫酸洗浄、蒸留等により充分精製してもこれを完全にのぞききれないものがある。又冬は固結する等取扱いが不便である。一方 *n*-hexane は試薬 blank もほとんどなく、取扱いも容易である。これらの理由により溶媒には *n*-hexane を用いた。

ii) 抽出液の前処理: Averell-Norris は抽出液中の色素を除くため、Clay の Column を通し、Gunther は amine 類を除くため塩酸で洗っている。しかし玄米の *n*-hexane 抽出液は極性色素や芳香族

amine 類をほとんど含まないので、これらの処理を必要としなかった。

iii) 油脂の除去: 玄米中には約2%の油が存在し、parathion の還元、発色を妨害する。油脂を除く方法には Jones<sup>13)</sup> Erwin<sup>14)</sup> 等の報告があるがいずれも煩雑である。Wilson<sup>15)</sup> は還元の際 paraffin を加えた。これによって油脂に対する parathion の溶解度を減じて還元を助け、また固化する時 paraffin と油脂がまざりあって固化するので容易にしわけられる。この方法は簡便で効果的である。

iv) 発色の条件: 濁液は蛋白質・脂肪酸等で濁っているが、ethanol 50cc を加えれば透明となる。ただし ethanol は、diazo 化の速度を低下させるので

Table 3. Parathion residue in rice grains.

Sample	Field	Variety	Formulation	Date of spray	Amount of spray	Result (p.p.m. as Parathion)
1	Hyōgo	Tōzan36	Emulsion	5/8	1/2000 110L/10a	0.04 0.04
2	〃	〃	〃	26/8	1/1000 180L/10a	0.01 0.02
3	〃	〃	〃	26/8 30/8	1/1000 180L/10a	0.02 0.03
4	〃	〃	Dust	5/8	3kg/10a	0.02 0.03
5	〃	〃	〃	26/8	4gk/10a	0 0
6	〃	〃	〃	26/8 30/8	4kg/10a	0.02 0.02
7	〃	〃	not sprayed			0.03 0.03
8	Kagawa	Nō'in 1.	Emulsion	4/7 16/7	1/1000 110L/10a 1/1000 180L/10a	0.04 0.03
9	〃	〃	not sprayed			0.04 0.04
10	Mie	Tōkai 7	Emulsion	1/8 22/8	1/2000 72L/10a 1/1000 180L/10a	0.03 0.03
11	〃	〃	〃	22/8	1/1000 180L/10a	0.02 0.02
12	〃	〃	〃	30/8	1/1000 180L/10a	0.02 0.02
13	〃	〃	〃	22/8 30/8	1/1000 144L/10a	0.04 0.04
14	〃	〃	Dust	1/8 22/8	3kg/10a 4kg/10a	0.02 0.03
15	〃	〃	〃	22/8	4kg/10a	0.02 0.02
16	〃	〃	〃	30/8	4kg/10a	0.02 0.02
17	〃	〃	〃	22/8 30/8	4kg/10a	0.03 0.03
18	〃	〃	not sprayed			0.02 0.02
19	Hukuoka	Asakaze	Emulsion	3/9	1/1000 180L/10a	0.02 0.02

発色が完了したのち加える。スルファミン酸アンモン溶液は原法の2.5%では過剰の亜硝酸ソーダを除去するのに不十分な場合があるので5%液を用いた。parathionの発色は10~20分で最高となり、一昼夜以上安定であるが、blankは時間と共に大となるので、なるべく早く測定する。

32年度産米の分析結果

Parathion 撒布歴の明かな32年度産玄米を上記の方法により分析した結果は、第3表の通りである。即ち、分析値は最高0.04p.p.m.であり、いずれも検出限界以下の値で、parathion無撒布の試料にも同じ程度の発色がみられる。従って、この分析結果からは試料中にparathionが含まれているとは認められない。又、アカイエカ幼虫を使用した生物検定によっても、parathionは検出されなかった。

玄米中での parathion の経時変化

上記のように試料中には parathion は検出されなかったが、これは収穫後分析を行うまでの約2ヶ月間に玄米中で分解したためとも考えられるので、玄米中での parathion の経時変化を検討した。parathion は玄米中に存在するとすれば主として糠中に多くあると考えられるので、試料には市販の糠及び糠油を用いた。

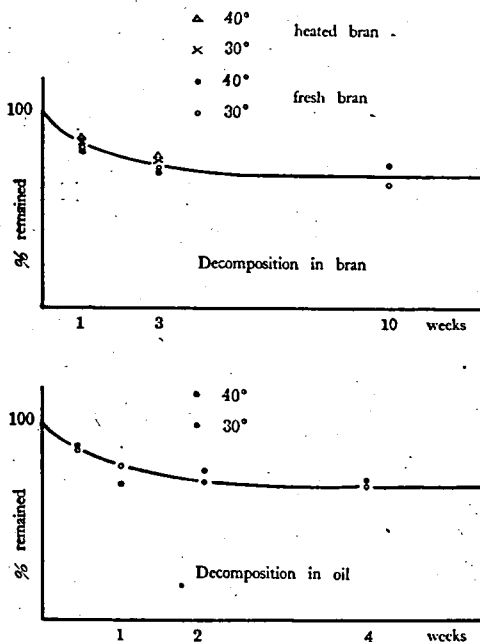


Fig. 1. Decomposition of parathion in rice bran and rice oil.

即ち新鮮な糠10gにparathion 100 $\gamma$ を5ccのn-hexane溶液として加え、よく混ぜ、密栓して30°及び40°に保存した。1, 3, 10週後にn-hexane 50ccで4回抽出し、抽出液を分析した。又糠の酵素を破壊するため、80°で3時間熱処理した糠について同様の実験を行った。又粗製糠油の固体分を遠心分離し、残液にparathion 75p.p.m.相当量を加え、30°及び40°に保存し、3日、1, 2, 4週後にその2gをとって分析した。その結果は第1図の通りである。即ちすべての試料・保存温度を通じてparathionの減少状態には大差なく、最初の1~2週間で70~80%に減少するが、以後の分解はゆるやかで、10週後においても70%以上が残存する。従って、一度玄米中に入ったparathionは比較的安定なものと思われる。

総括

玄米中のparathionの微量分析法について検討し、Averell-Norris法を改良して回収率100%、誤差4%で分析できた。この方法によりparathion撒布歴の明かな32年度産米を分析したがparathionは検出されなかった。

又糠及び糠油中でのparathionの経時変化を検討したが、parathionの分解は比較的ゆるやかで、2ヶ月後も70%以上が残留する事がわかった。

これらの結果から分析に用いた試料玄米中には、parathionは収穫時に既に存在しなかったと結論してもよいと思う。アメリカにおけるparathionの穀物中の許容量は1p.p.m.であるから、現在の撒布条件の下では、玄米中に人体に危険な量のparathionが存在する可能性はないと考えられる。

文献

- 1) M. M. Barnes et al: *Advances in Chemistry, Series 1*, 112 (1950).
- 2) R. E. Waites et al: *J. Econ. Entomol.* **48**, 590 (1955).
- 3) 田村光章: *植物防疫* **10**, (9), 371 (1956).
- 4) 後藤真康: *農薬検査所報告* **4**, 5 (1953).
- 5) 上島俊治: *応用昆虫* **9** (4), 157 (1954).
- 6) 佐藤六郎: *植物防疫* **11** (9), 1 (1957).
- 7) P. R. Averell, et al.: *Anal. Chem.* **20**, 753 (1948).
- 8) R. Buckley: *Analyst* **79**, 285 (1954).
- 9) A. I. Biggs: *Analyst* **80**, 279 (1955).
- 10) F. I. Edward: *Anal. Chem.* **21**, 1415 (1949).
- 11) Youden: *Anal. Chem.* **19**, 946 (1947).
- 12) F. Gunther et al.: *Advances in Chemistry*,

Series 1, 72 (1950).

- 13) L. R. Jones: Anal. Chem. 24, 569-71 (1952).  
 14) W. R. Erwin: J. Agr. Food Chem. 3, 676 (1955).  
 15) C. W. Wilson et al.: Anal. Chem. 23, 1487 (1951).

### Résumé

1. The amounts of parathion residue in rice grains were determined by an improved Averell-Norris method. The recovery of the method was 100% and the precision was 4%. The

minimum limit of detection was 0.04 p.p.m. for 100 g of sample.

2. Sixteen samples on which parathion had been sprayed or dusted at various time and intervals and three untreated samples were analysed. In all samples, parathion was not detected.

3. The rate of decomposition of parathion in rice bran and rice oil was studied. 20-30% of parathion in bran and oil was decomposed in 1-2 weeks, but 70% or more of parathion remained after 10 weeks storage at 30°C and 40°C.

**Microdetection of Parathion in Plant or Food Materials.** Chemical Studies on Organophosphorous Insecticides. II. Sinko Goto, Itiro Mura, Rokuro Sato, (Agricultural Chemicals Inspection Station, Ministry of Agriculture and Forestry, Kodaira-mati, Tokyo.) Received Jan. 27, 1959. *Botyu-Kagaku* 24, 34, 1959 (with English résumé, 35).

### 7. Parathion の簡易微量検出法 有機燐殺虫剤の化学的研究 (第2報) 後藤真康・牟田一郎・佐藤六郎 (農林省農薬検査所) 34. 1. 27 受理

作物や食物中に含まれる微量の parathion をペーパークロマトグラフで半定量的に検出する方法を考察した。本分析法の原理は parathion を加水分解し、生ずる *p*-nitrophenol を油脂などより分離してペーパークロマトグラフにより検出確認するものである。

作物・食品・河海水等の中の微量の parathion を定量する事は農薬の使用法、生理作用の研究のためにも、又、公衆衛生上からも必要であり、既に数種の分析法が発表されている。

Averell-Norris 法<sup>1)</sup> は最も簡便で精度も高いが、多くの芳香族 nitro, amino 化合物が parathion と同様の発色反応を示し、これらの物質は天然物中に広く分布している。

Buckley<sup>2)</sup> は parathion を分解して生ずる *p*-nitrophenol を比色し、Biggs<sup>3)</sup> は parathion の紫外外部吸収により定量している。しかし、これらの方法も parathion と同様の反応を示す物質が試料中に存在する事が多いので、parathion を含まない事が明かな試料について blank を測定するか、数種の分析法や生物検定を並用して結果を補正しなければならない。クロマトグラフ等により parathion を単離する方法も研究されているが、煩雑であり、又、油脂等の多い試料では実施が困難な場合がある。赤外線吸収法<sup>4)</sup> は特殊な設備と多量の試料を要する。

われわれはなるべく特殊な試薬や器具を用いずに、0.1 p.p.m. 程度の parathion を半定量的に検出確認する事を目的とし、下記のような分析法を考察し、満足すべき結果をえたので報告する。

### 実 験

本分析法の原理は、parathion を加水分解し、生ずる *p*-nitrophenol を油脂等より分離し、ペーパークロマトグラフにより検出確認するものである。

クロマトグラフ供試液の調製： 試料を *n*-hexane で抽出し、抽出液中の *p*-nitrophenol 及び極性色素の一部を除くため、60% ethanol 性 1/100 N NaOH 液で数回洗う。60% ethanol を用いれば油脂の多い試料でも分離は良好であるが、もし乳化して分液が困難な時は飽和食塩水若干を加えて乳化を破壊する。抽出液 200 cc を NaOH 液 25 cc で 3 回洗えば、100 r の *p*-nitrophenol が存在しても完全に除かれ、parathion の損失はない。洗液は合し、*n*-hexane 50 cc で洗い、*n*-hexane 回は抽出液と合する。湯浴上で溶媒を留去し、溶媒がほとんどなくなった時 2N KOH 液 10 cc, paraffin 1 g を加え溶媒を完全に留去する。残液に ethanol 10 cc を加え、還流冷却器をつけて 30 分間煮沸し、parathion を加水分解する。その間に 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 cc を冷却器の先端より滴加して色素を破壊する。分解終了後濃塩酸 1 cc, 水 10 cc を加え放

昭和33年3月、日本農芸化学会関東支部会にて講演。