

直線の方程式は、相互に平行性をしめし、産下卵のふ化を半数阻害する、最もたしからしい葉量と、有意水準0.05におけるその信頼限界は、それぞれ  $150.51\mu\text{g}/\delta$  ( $72.33\sim 313.26\mu\text{g}/\delta$ )、 $24.71\mu\text{g}/\eta$  ( $14.04\sim 43.48\mu\text{g}/\eta$ )、および  $13.10\mu\text{g}/\eta$ 、 $\delta$  ( $7.33\sim 23.42\mu\text{g}/\eta$ 、 $\delta$ ) であった。

3. 雄の雌に対する相対感受性は0.1642で、有意水準0.05におけるその信頼限界は、0.0607～0.4443となり、HEMPAはアズキゾウムシに対して、この場合、雌性不妊剤であると言うことが可能である。

#### 引用文献

- 1) Chang, S. C., P. H. Terry, and A. B. Borkovec: *Science*, 144, 57～8 (1964).
- 2) Finney, D. J.: *Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid dose response curve*. Cambridge Univ. Press. 318 pp. (1952).
- 3) Finney, D. J.: *Biometrika*, 36, 239～256 (1949).
- 4) 長沢純夫・篠原 寛・柴 三千代 防虫科学 30, 91～95 (1965).
- 5) Wadley, F. M.: *Ann. Appl. Biol.* 36, 196～202 (1949).

#### Summary

Physiological effect of HEMPA (hexamethyl-

phosphoramidate) on the hatchability of the eggs deposited by treated male azuki bean weevil  $\times$  normal female, normal male  $\times$  treated female, and treated male  $\times$  treated female combinations were examined by the topical application method with a micropipet. The data obtained were analysed statistically by Wadley and Finney's estimation method of parameters of tolerance distributions based upon the probit transformations. The data could be satisfactorily fitted by the three parallel probit regression lines shown as equations  $Y=2.351+1.2166x$ ,  $Y=3.305+1.2166x$  and  $Y=3.641+1.2166x$  for each combinations, and the most probable median hatchability inhibiting dosages with 5% fiducial limits were estimated as  $150.51\mu\text{g}/\delta$  ( $72.33\sim 313.26\mu\text{g}/\delta$ ),  $24.71\mu\text{g}/\eta$  ( $14.04\sim 43.48\mu\text{g}/\eta$ ), and  $13.10\mu\text{g}/\eta$ ,  $\delta$  ( $7.33\sim 23.42\mu\text{g}/\eta$ ,  $\delta$ ) respectively. Male was estimated to be 16.4% (5% fiducial limits were 6.07～44.43%) less susceptible than female to the sterilizing effect of HEMPA. Hence, as far as the present experimental data concerned, it could be concluded that HEMPA is a female chemosterilant for the azuki bean weevil.

**Determination Method of Malathion Residues on and in Vegetables and Fruits.** Masao YAMAUCHI (Agricultural Chemicals Inspection Station, Ministry of Agriculture and Forestry, Kodairashi, Tokyo) Received May 6, 1966. *Botyu-Kagaku* 31, 113, 1966. (with English Summary, 119)

16. 野菜・果実類におけるマラソンの残留分析方法について 山内 正雄 (農林省農薬検査所 小平市, 東京) 41. 5. 6 受理

稲、白菜におけるマラソンの残留分析方法を一般野菜、果実類に適用するため、分析条件、クリーナップ法、メタノールによる残留マラソンの抽出能力等について検討し、操作簡易な残留分析法を得た。この方法による代表的な野菜、果実よりの回収率は77～98%であった。

#### 1. 緒 言

稲および白菜におけるマラソンの残留分析方法については先きに報告したが<sup>1)</sup>、マラソンは広く一般野菜、果実類に使用されており、残留および消失を究明するために、これらの野菜、果実類について検討する必要がある。野菜、果実類におけるマラソンの残留分析法については、Norris *et al*<sup>2)</sup>、H. W. Conroy<sup>3)</sup> および P. Koivistoinen<sup>4)</sup> らの報告があるが、これらのうち Norris *et al*、H. W. Conroy らの方法が一般的なものと考えられる。前報においては、H. W. Conroy の抽出法にならい、ただしエタノールによる磨砕抽出にメ

タノールを用い、メタノール抽出液あるいは四塩化炭素抽出液のいずれかについて塩酸処理アルミナによるクロマトグラフィー<sup>5)</sup>を行ない、四塩化炭素抽出液中のマラソンをN/2水酸化カリウムエタノール溶液<sup>6)</sup>で分解し、以下 Norris らとほぼ同様な操作により、稲、白菜におけるマラソンの残留量を定量し、ほぼ満足すべき結果が得られた。しかし、この方法を一般野菜、果実類におけるマラソン残留量の定量に適用するために、代表的野菜、果実よりマラソンの回収率を求めると、クリーナップ法が不十分のため試料によっては分析不可能の場合が少なくなかった。またこの方法に

においては四塩化炭素抽出液の濃縮、クリーナップ等の操作に時間を要し繁雑である等の欠点が見出された。このため、これらの諸点およびメタノールによる残留マラソンの抽出能力等について検討し、一般野菜、果実類に適用してほぼ満足し得るマラソンの残留分析法を得たので報告する。

## 2. 試薬および装置

### 2.1 試 薬

- (1) エタノール：生石灰で脱水し、蒸留して用いる。
- (2) メタノール：蒸留して用いる。
- (3) 四塩化炭素：濃硫酸、1% 水酸化ナトリウム溶液で順次洗い、ロ紙を用いてロ過し、蒸留して用いる。
- (4) N/2 水酸化カリウムエタノール溶液
- (5) 1N 塩酸
- (6) 10%塩化第二鉄溶液
- (7) 5% 硫酸銅溶液
- (8) 2% 硫酸ソーダ溶液
- (9) 塩酸処理アルミナ・ハイフろスーパーセル混合物：アルミナ、ハイフろスーパーセル (Johns-Manville 製) を前報と同様に処理し、アルミナ 30g に等容積のハイフろスーパーセル約 5g を混ぜて用いる。

#### 00 標準マラソン溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

註記のない試薬は前報と同様にして調製する。

### 2.2 器具および装置

- (1) ホモゲナイザー：日立スーパーミキサーを用いた。
- (2) クロマト用グラスフィルター：グラスフィルター (17G-3) を用いる。
- (3) ベックマン分光光度計 DU 型：10mm セルを用いる。

## 3. 分析条件の検討

前報において、N/2 水酸化カリウムエタノール溶液を四塩化炭素量に比例して用いることにより、四塩化炭素 100~300ml 中のマラソンを濃縮せずに、ほぼ同一条件でアルカリ分解し得ることを示した。しかし、さらに多量の四塩化炭素を用いるときには、水酸化カリウムエタノール溶液を多量に用いることになり、エタノールの影響を無視し得なくなる。このためさらにアルカリ分解条件を検討し、四塩化炭素量、エタノール量に影響されないアルカリ分解条件を求めた。また前報に用いた塩酸処理アルミナによるクロマトグラフィーは抽出液が多量になると時間を要し、繁雑となるため、アルミナに等容積のハイフろスーパーセルを混ぜてグラスフィルターにつめ、ロ過と同様な操作によりクリーナップを行ない、一般野菜、果実に適用し得

るクリーナップ法を求めた。

### 3.1 四塩化炭素量とアルカリ濃度

四塩化炭素 50~400ml 中のマラソンをアルカリ分解するに要する N/2 水酸化カリウムエタノール溶液の量を求めた。マラソン 110.5  $\mu\text{g}$  を含む四塩化炭素 50~400ml をそれぞれメタノール・2% 硫酸ソーダ溶液 (1:3) の混液 50, 75, 100ml で洗い、N/2 水酸化カリウムエタノール溶液 2.5, 5, 7.5 および 10ml をそれぞれの四塩化炭素区に加えてアルカリ分解し、以下前報の検量線の場合と同様に操作して吸光度を測定した。結果は第 1 表に示す如く、上記の水酸化カリウムエタノール溶液、四塩化炭素量の範囲内では、両試薬の量に関係なくほぼ一定の値が得られた。したがって N/2 水酸化カリウムエタノール溶液 5ml を用いれば四塩化炭素 50~400ml 中のマラソンをアルカリ分解できることがわかる。

Table 1. Amount of N/2 ethanolic potassium hydroxide solution necessary to hydrolyse malathion in carbontetrachloride.

| N/2KOH<br>ml | Absorbance |                           |       |
|--------------|------------|---------------------------|-------|
|              | 50ml       | CCl <sub>4</sub><br>200ml | 400ml |
| 2.5          | 0.288      | 0.298                     | 0.277 |
| 5.0          | 0.295      | 0.282                     | 0.295 |
| 7.5          | 0.286      | 0.307                     | 0.285 |
| 10.0         | 0.288      | 0.290                     | 0.281 |

Malathion : 100  $\mu\text{g}$

### 3.2 四塩化炭素溶液の洗滌とマラソンの損失

検量線作成時のマラソンの四塩化炭素溶液や植物体よりの四塩化炭素抽出液をメタノール性硫酸ソーダ溶液や蒸留水で洗滌することが行なわれるが、定量妨害物質の除去には有効な手段と考えられるので、予じめ洗滌によるマラソンの損失について検討した。洗滌液にはメタノール・2% 硫酸ソーダ溶液 (1:3) の混液を用い、マラソン 110.5  $\mu\text{g}$  を含む四塩化炭素溶液 50, 200, 400ml を、それぞれ上記洗滌液 50, 200, 400ml で洗い、N/2 水酸化カリウムエタノール溶液 5ml を加えてアルカリ分解し、以下 3.1 と同様に操作して吸光度を測定した。結果は第 2 表に示す如く、四塩化炭素量に対して洗滌液を多量に用いた場合には吸光度が減少する傾向がみられるが、等量の洗滌液を用いた場合には余り差はみられず、分析回数 1 度の分散分析を行なった結果では四塩化炭素量、洗滌液量による有意差は認められなかった。ゆえに洗滌による損失は実験

Table 2. Loss of malathion from its carbon-tetrachloride solution by washing with mixture of 1:3 methanol—2% sodium sulfate solution.

| CCl <sub>4</sub><br>ml | Absorbance |       |       |
|------------------------|------------|-------|-------|
|                        | 50ml       | 200ml | 400ml |
| 50                     | 0.303      | 0.298 | 0.277 |
| 200                    | 0.293      | 0.292 | 0.286 |
| 400                    | 0.286      | 0.267 | 0.289 |

Malathion: 100 $\mu$ g

Analysis of variance for Table 2.

| Factor           | S. S.    | d. f. | M. S.    | F <sub>0</sub> |
|------------------|----------|-------|----------|----------------|
| Washing          | 0.000172 | 2     | 0.000086 | 0.66           |
| CCl <sub>4</sub> | 0.000243 | 2     | 0.000122 | 0.93           |
| Error            | 0.000522 | 4     | 0.000131 |                |
| Total            | 0.000937 | 8     |          |                |

$$F_{0.05}\left\{\frac{2}{4}\right\}=6.94$$

誤差の範囲内にあるものと考えられる。

## 3.3 検量線

前報においてはアルカリ分解に用いる四塩化炭素量を 100ml に限定したが, 3.1, 3.2 の結果よりアルカリ分解に用いる四塩化炭素量を 50~400ml/用いても, ほぼ一定の値が得られることがわかったので, 四塩化炭素 50~400ml/用いた場合の検量線を作成し比較検討した。結果は第3表に示す如く, 各検量線間には有意差が認められないと考えられるので, 四塩化炭素 50ml/を用いた検量線を残留分析に適用した。

## 3.3 クリーナップ

以上の実験結果より, 植物体よりのマラソンの四塩化炭素抽出液は 400ml/まで濃縮せずに分析可能なることが予想されるので, 以上のアルカリ分解条件を野菜, 果実よりのマラソンの四塩化炭素抽出液に適用し, 回収試験を行なった。試料約 100~250g に 2 倍量のメタノールを加え, マラソン 55.3~110.5 $\mu$ g を添加して磨砕し, グラスフィルター (25G-2) でろ過したのを, 2 倍量の蒸留水と約 10~20g の無水硫酸ソーダを加え, 四塩化炭素 200, 100ml/で 2 回抽出する。四塩化炭素抽出液をひだ付口紙を用いて 300~500ml/の分液ロートにろ過し, N/2 水酸化カリウムエタノール溶液 5ml/を加えて激しく振り混ぜ, 以下前報の表面残留量の定量法と同様に操作して回収率を求めた。その結果, 以上の分析操作によっては, 多くの野菜, 果実類よりの回収率は非常に低く, バラッキも大きかった。この原因を追究するため, 代表的野菜, 果実について, クリーナップ法を逐次定め, 野菜, 果実類一般に適用できるクリーナップ法を求めた。

(1) 白菜, ホーレン草: 白菜を上記分析方法により回収率を求めると, マラソンを 1ppm 添加した場合には 76% の値が得られた。これは前報における回収率を下まわるので, メタノール抽出液を塩酸処理アルミナ・ハイフろスーパーセル混合物約 35g をメタノールによりつめたグラスフィルター (17G-2) を用いて吸引ろ過し, 妨害物質を除いた。この操作により, メタノール抽出液の水希釈液よりの四塩化炭素による抽出が, 乳化等の妨害を受けず, 円滑に行なわれ, またアルカリ分解後, 四塩化炭素層と水層間における乳化状態も改善され 86.4% の回収率がえられた。次にホーレン草について白菜と同様な操作により回収率を求めると約

Table 3. Inspection of calibration curves prepared by using 50~400ml/ of carbon tetrachloride on the alkaline hydrolysis of malathion.

| CCl <sub>4</sub><br>ml | Slope of<br>regression<br>line<br>b | Intersecting<br>point on Y axis<br>and regression line<br>a | Sum of squares<br>from regression<br>line<br>S | Standard<br>deviation of<br>intersecting point<br>s <sub>a</sub> | Standard<br>deviation of<br>slope<br>s <sub>b</sub> |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 50                     | 2.954                               | -0.0033                                                     | 0.000032                                       | 0.0049                                                           | 0.036                                               |
| 200                    | 2.996                               | -0.0065                                                     | 0.000068                                       | 0.0071                                                           | 0.052                                               |
| 400                    | 2.900                               | -0.0085                                                     | 0.000081                                       | 0.0078                                                           | 0.057                                               |

## “t” Check-testing

| CCl <sub>4</sub><br>ml | $t = \frac{a}{s_a}$ | $t = \frac{ b_{50} - b_i }{\sqrt{s_d}}$ |
|------------------------|---------------------|-----------------------------------------|
| 50                     | 0.673               |                                         |
| 200                    | 0.914               | 2.00                                    |
| 400                    | 1.088               | 2.25                                    |

$$n=4, t(n=3; 0.05)=3.182$$

$$n=8, t(n=6; 0.05)=2.447$$

b<sub>50</sub>; slope of 50ml/ CCl<sub>4</sub> scale.b<sub>i</sub>; slope of 200~400ml/ CCl<sub>4</sub> scale.

60%以下の低い値が得られた。この原因を調べるため、ホーレン草のメタノール磨砕抽出液および残渣のメタノール抽出液について上記と同様なクリーナップを行なった後、四塩化炭素で植物体成分を抽出し、この四塩化炭素抽出液にマラソンを添加して回収率を求めると、四塩化炭素抽出液の量が 50ml の場合には良い回収率が得られたが、四塩化炭素抽出液を 300ml 用いた場合には、磨砕抽出液よりの四塩化炭素抽出液よりは 95.3%、後者の場合よりは 75.1%の回収率が得られ、残渣の洗滌に純メタノールを用いる事は好ましくない事がわかった。磨砕抽出液中のメタノール含量は約 77%であるので、残渣の洗滌に 80%メタノールを用いることとし、これを適用して 91.8%の回収率を得た。

(2) みかん、りんご：以上の含水メタノールによる妨害物質の抽出制限と塩酸処理アルミナ混合物によるクリーナップをみかんに適用して回収率を求めると、四塩化炭素抽出液のアルカリ分解後四塩化炭素層と水層が乳化し、分析不可能の状態になった。このため四塩化炭素抽出液を蒸留水で、両層がすみやかに分離するまで洗滌し、アルカリ分解を行なうと、アルカリ分

解後における乳化現象が起らず、83%の回収率を得た。次にりんごについて上記と同様に四塩化炭素抽出液の洗滌を行なうと、洗滌により乳化をおこし両層の分離に長時間を要した。短時間に洗滌によりこれらの妨害物質を除くために、乳化した部分をすてるたので、20～30%のマラソンを損失した。このため四塩化炭素抽出液を前報の定量法 2 における如く、塩酸処理アルミナ混合物約 35g を四塩化炭素によってつめたグラスフィルター (17G-3) 中を吸引口過し、流出液を蒸留水で洗うと乳化現象は起らず、93%の回収率を得た。以上の操作をキャベツ、トマト、キウリ、ポテト、なし、苺に適用して 86.2～98.3% の回収率が得られた。

3.3 人參、ねぎ：以上の操作を人參、ねぎに適用して回収試験を行なうと、乳化現象等の物理的妨害現象はみられないが、いつれの試料においても低いバラツキ値が得られた。このため種々検討した結果、メタノール抽出液の水希釈液に 1N 塩酸 5ml を加えて塩酸性とし、四塩化炭素で抽出し以下同様に操作すると良い回収率を得られることがわかり、ねぎよりは 77.2～94.2%、人參では 77.2～92.6%の値が得られた。し

Table 4. Recovery of malathion from vegetables and fruits.

| Material         | Sample taken<br>for analysis<br>g | Malathion     |               | Recovery<br>% |
|------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                  |                                   | Added $\mu$ g | Found $\mu$ g |               |
| Chinese cabbage  | 200                               | 110.5         | 95.6          | 86.4          |
| Cabbage          | 200                               | 55.3          | 51.6          | 93.2          |
|                  | 100                               | 110.5         | 107.7         | 97.3          |
| Spinach          | 150                               | 110.5         | 104.5         | 94.5          |
|                  | 100                               | 110.5         | 99.7          | 90.2          |
|                  | 100                               | 221.0         | 190.6         | 86.2          |
| Potato           | 100                               | 110.5         | 95.9          | 86.7          |
|                  | 100                               | 110.5         | 107.7         | 97.3          |
| Cucumber         | 100                               | 110.5         | 105.2         | 95.2          |
|                  | 100                               | 110.5         | 109.0         | 98.7          |
| Tomato           | 100                               | 110.5         | 108.0         | 97.7          |
|                  | 250                               | 110.5         | 105.2         | 95.2          |
| Stone leek*      | 50                                | 110.5         | 104.2         | 94.2          |
|                  | 100                               | 110.5         | 85.3          | 77.2          |
| Carrot*          | 100                               | 110.5         | 102.6         | 92.8          |
|                  | 100                               | 110.5         | 85.3          | 77.2          |
| Pear             | 127                               | 110.5         | 103.1         | 93.3          |
|                  | 120                               | 110.5         | 106.7         | 96.4          |
| Apple            | 200                               | 110.5         | 92.2          | 83.4          |
|                  | 170                               | 110.5         | 98.8          | 89.3          |
|                  | 100                               | 110.5         | 109.0         | 98.7          |
| Mandarine orange | 100                               | 110.5         | 91.3          | 82.5          |
|                  | 100                               | 110.5         | 87.7          | 79.3          |
|                  | 100                               | 110.5         | 106.0         | 96.0          |
| Strawberry       | 100                               | 55.3          | 53.2          | 96.2          |
|                  | 100                               | 110.5         | 99.5          | 90.0          |

\* 5ml of 1N HCl was added in methanol eluate for extraction of malathion by  $\text{CCl}_4$ .

かし、メタノール抽出液を酸性にして四塩化炭素で抽出すると、馬拉ソンの部分的加水分解物モノエステル誘導体も少量抽出するので、厳密な馬拉ソンの残留量を求める場合には、モノエステル誘導体を分離する操作を併用しなければならない。以上の回収試験の結果および3.2の操作を全試料に適用して得た回収率を第4表に示す。

#### 3.4 メタノールの残留馬拉ソンに対する抽出能力

H. W. Conroy は野菜、果実よりの馬拉ソンの全残留量の抽出にエタノールを用いているが、メタノールはエタノールに比して、Cutin, Wax 等に対する溶解能力が小さいため、馬拉ソンが表皮等に吸収された場合における抽出能力について検討した。試料として、キャベツ、みかんを用い、50% マラソン乳剤の250倍液に5分間浸漬し、3~4日後に、まず試料50~100gを上記と同様に磨砕抽出する。抽出時間は3分と5分とにわけた。次に抽出残渣を80%メタノール100mlで磨砕抽出し、最後に残渣を四塩化炭素100mlで磨砕抽出して、それぞれの抽出液を上記と同様に分析し抽出能力をしらべた。結果は第5表に示す如く、3分の磨砕抽出1回では2~3%の馬拉ソンの抽出もれがあるが、5分行なえば1回で99%抽出された。したがって植物体に吸収された場合においても、磨砕抽出に充分な時間をかけることにより、メタノールを用いても馬拉ソンは完全に抽出されることがわかる。以上の実験結果より4の全残留量の定量法が得られる。

Table 5. Extraction ability of methanol for malathion residues on and in vegetables and fruits treated with 0.2% malathion emulsion.

| Material         | Time of maceration<br>min. | Extraction rate to total malathion |                             |                                 |
|------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
|                  |                            | 1st extr. with 80% methanol        | 2nd extr. with 80% methanol | 3rd extr. with CCl <sub>4</sub> |
| Cabbage          | 3                          | 96.5%                              | 3.2%                        | 0.3%                            |
|                  | 5                          | 98.7                               | 1.0                         | 0.3                             |
| Mandarine orange | 3                          | 98.3                               | 1.6                         | 0.1                             |
|                  | 5                          | 99.2                               | 0.5                         | 0.3                             |

Sample : 50~100g

### 4. 全残留量の定量法

#### 4.1 検量線

標準溶液0, 2.5, 5, 7.5および10mlをそれぞれ四塩化炭素50mlを入れた200mlの分液ロートにとり、メタノールを加えてメタノールの全量を10mlとする。これをかるく振りまぜたのち、10°C以下に冷却した2%硫酸ソーダ溶液30mlを加え1分間振とうする。静置後四塩化炭素層をひだ付口紙を用いて200mlの分液

ロートに水層の入らぬように口過する。これにN/2水酸化カリウムエタノール溶液5mlを加えて1分間激しく振りまぜ、10°C以下に冷却した2%硫酸ソーダ溶液30mlを加え1分間激しく振とうする。静置後四塩化炭素層を分液し、四塩化炭素20mlを加えて30秒間振とうし、静置後四塩化炭素層を分液する。これに1N塩酸3.5mlを加えてかるく振りまぜたのち、四塩化炭素20mlを加え30秒間振とうする。静置後四塩化炭素層を分液し、10%塩化第二鉄溶液1ml、四塩化炭素20mlを加えて30秒間振とうする。静置後四塩化炭素層をできるだけ完全に分液し、四塩化炭素5mlをホールピペットを用いて加え、氷室で5~10°Cに冷却する。冷後5%硫酸銅溶液2mlを加えて激しく30秒間振とうし、分液ロートの脚にかかる脱脂綿をつめ、ただちに四塩化炭素層をセルに移し入れ、5分以内に四塩化炭素を対照として波長418m $\mu$ における吸光度を測定し、検量線を作成する。

#### 4.2 全残留量の定量法

試料約100~250gをできるだけ細かく切り、ホモゲナイザーの容器に移し、2倍量のメタノールを加えて5分間磨砕抽出する。磨砕液をグラスフィルター(25G-3)に移して吸引口過し、残渣を80%メタノール50mlで洗う。ロ液の液量を計り、馬拉ソン50~200 $\mu$ gを含む量を取り、塩酸処理アルミナ・ハイフろスーパーセル混合物35gをメタノールでつめたグラスフィルター(17G-3)に移し、1分間20mlの流速で吸引流出せしめる。グラスフィルターを80%メタノール50mlで洗い、流出液を1~3lの分液ロートに移す。これに2倍量の蒸留水を加えてかるく振りまぜたのち、四塩化炭素100~200ml、無水硫酸ソーダ\*約10gを加えて激しく3分間振りまぜる。静置後四塩化炭素層を、塩酸処理アルミナ・ハイフろスーパーセル混合物約35gを四塩化炭素でつめたグラスフィルター(17G-2)に移し、1分間20~30mlの流速で、必要あれば吸引して流出せしめる。さらに四塩化炭素50~100mlを分液ロートに加え、2分間振りまぜ、静置後四塩化炭素層をグラスフィルターに移して流出せしめる。四塩化炭素流出液を1lの分液ロートに移し、蒸留水約100mlを加えて激しく1分間振とうし、四塩化炭素層と水層がすみやかに分離するまで蒸留水による洗滌を繰返す。四塩化炭素層をひだ付口紙を用いて水層の入らぬように分液ロート(300~500ml)に口過し、N/2水酸化カリウムエタノール溶液5mlを加えて激しく1分間振りまぜる。これに10°C以下に冷却した2%硫酸ソーダ溶液30mlを加えて激しく1分間振とうし、静置後四塩化

\* 備考：人参、ねぎの場合には無水硫酸ソーダのかわりに1N塩酸5mlを加える。

炭素層を分液する。四塩化炭素 20ml を水層に加えて 30 秒間振とうし、静置後四塩化炭素層を分液する。水層に 1N 塩酸 3.5ml を加えかるく振り混ぜたのち、四塩化炭素 20ml を加え 30 秒間振とうし、静置後四塩化炭素層を分液する。さらに四塩化炭素 20ml を加えて振とうし、四塩化炭素層がほとんど無色になるまで四塩化炭素による洗滌を繰返す。次に 10% 塩化第二鉄溶液 1ml を加えてかるく振り混ぜたのち、四塩化炭素 20ml を加えて振とうし、四塩化炭素層の波長 418m $\mu$  における吸光度を測定し、ブランクの吸光度程度になるまで洗滌を繰返す。四塩化炭素層をできるだけ完全に分液し、四塩化炭素 5ml をホールピペットを用いて加え、氷室で 5~10°C に冷却する。以下検量線の場合と同様に操作して吸光度を測定する。別に植物体成分によるブランクを同様な操作により求め、上記吸光度より差引き検量線よりマラソンの  $\mu\text{g}$  を求め、試料中の ppm を算出する。

## 5. 考 察

稲、白菜におけるマラソン残留量の分析法においては、メタノール抽出液あるいは四塩化炭素抽出液のいずれかについてアルミナによるクロマトグラフィーを行えば良い回収率が得られたが、その他の野菜、果実類では妨害物質が多く、アルミナによるクリーナップを両抽出液について行なう必要があった。稲における妨害物質は eugenol 様物質<sup>7)</sup>であったが、野菜、果実類における妨害物質の主なものとは四塩化炭素抽出液を乳化あるいは懸濁させるものであった。りんごの四塩化炭素抽出液の懸濁部分を取り、室温乾燥すると白色の物質が得られた。このものは水、1N 塩酸、10% 水酸化カリウム溶液にほとんど溶けず、アセトンには約  $\frac{1}{2}$  量が溶解した。これらの混合物は Biuret 反応陰性で、Liebermann-Burchard 反応で赤紫色を呈し、アセトン可溶部、不溶部をシリカゲル—ギブス上ベンゼン—酢酸エチル (7:3) で展開し、10% 硫酸により 130°C で発色せしめると<sup>8)</sup>、可溶部では  $R_f$  0.0~0.3 の間に、原点灰色スポットその上部に 4~5 の赤紫色スポットにわかれ<sup>8,9)</sup>、不溶部では原点に灰色のスポットがみられた。以上の定性試験、TLC による検出は物質の混合の程度、物質群の分類をみた程度であるが、これによりほぼ、乳化、懸濁をおこさせる物質は種々な脂質、テルペノイド等の混合物の如く考えられる。

今回はクリーナップに塩酸処理アルミナ・ハイフロスーパーセル混合物を用いたが、ハイフロスーパーセルは製品により塩基性の度合、吸着能等がことなるので、アルミナと同様な処理をして用いた。ただし塩酸処理の後、メタノールで洗い室温で乾燥して用いた。

アルミナも処理後室温乾燥により使用することができる。また一度使用したアルミナ・ハイフロスーパーセル混合物は、1N 塩酸、メタノールおよびクロロホルムで順次洗う操作を 2 回繰返し、メタノール洗滌後室温乾燥することにより再び使用することができる。室温乾燥した塩酸処理アルミナ・ハイフロスーパーセル混合物の Brockmann Activity は 5 以下で、マラソンに対する吸着能は、溶媒にメタノールを用いた場合には約 3%、四塩化炭素を用いた場合には約 4% で前回における塩酸処理アルミナによる損失よりも少なかった。なお四塩化炭素は水分を含むことにより、マラソンのアルミナによる吸着を防ぐことが考えられるので、今回は四塩化炭素を脱水せずに蒸留して用いた。

以上前報およびこのたびのマラソン残留量の分析法の抽出・クリーナップ法は Law & Webley の野菜における有機燐殺虫剤についての抽出・クリーナップ法<sup>10)</sup>で、塩化メチレンによる磨砕抽出する操作を省略したものに類似しているため、マラソン以外の有機燐殺虫剤およびその他の殺虫剤等の中にもメタノール磨砕抽出法により、適当なクリーナップ法を組合わせることにより残留分析が可能なのがあると考えられる。

前報において表面残留量の抽出に Norris *et al* の方法を検討せずに用いたが、四塩化炭素は脂質を容易にとかすため、表皮中に吸収されたマラソンも溶出し、真の表面残留量を求めることは困難のように考えられる。以上の実験に用いた 80% メタノールのマラソンに対する溶解度は約 70mg/ml (20°C) で、残留マラソンを溶出するためには充分な溶解能力と考えられる。しかしこのような含水メタノールは脂質に対する溶解速度が四塩化炭素に比して遅いことが考えられ、より真の表面残留量を得られることが予期されるので、両溶媒による表面残留量の抽出について比較検討した。試料として、キャベツ、キュウリ、みかんおよびりんごを用い、これらを 50% マラソン乳剤の 250 倍液に 5 分間浸漬し、3~4 日後に、キャベツでは 50~100g、キュウリからりんごでは 1 個を 200 ml の四塩化炭素および 90% メタノールにつけ、2.5 分、5 分、10 分、30 分、1 時間、4 時間後における抽出液 20~25 ml をとり、アルミナ混合物によるクリーナップを行わず、上記と同様の操作により分析した。結果は 90% メタノールを用いた場合には、30 分以内における抽出量はほぼ一定で台地をなし、30 分より 1 時間の間に抽出量は急激に増加し、それ以後は割合になだかな抽出曲線をえがく。四塩化炭素を用いた場合には、1 時間まで抽出量は急激に増加し、以後は平坦な抽出曲線をえがくがキュウリの如く 2.5 分以内に全マラソンを抽出する場合もある。このような両溶媒による抽出曲線の相違は両溶媒の脂質に対する溶解能力の相違の他に表皮の構造

および表皮上の蠟物質等にもよるものと考えられる<sup>11)</sup>。四塩化炭素は脂質易溶性のため短時間に、表皮等における構造に影響されることなく Wax、表皮層等に吸収されたマラソンも溶出するが、90%メタノールは著しく表皮等における構造に影響され、30分以内ではほぼ表皮上および表皮上層に吸着されたマラソンを抽出し、以後は表皮に吸収されたマラソンを溶出する如く考えられる。したがって90%メタノールによる抽出により、より真の表面残留量を定量することができると考えられる。定量法としては上記の如く、試料約 100~250g を 90% エタノール 200~300ml 中に 5~10 分間浸漬したのち、マラソン 50~200 $\mu$ g を含む抽出液を全残留量と同様に操作して求めることができる。また両溶媒中に試料を約 2~4 時間浸漬することにより、全マラソンの約 90% 以上を抽出することができるので、緻密な残留量の定量を必要としない場合には、磨砕抽出の操作を省略し得ることがわかった。なおこの分析法における精度は、検量線の回帰よりの標準偏差は、四塩化炭素 50, 200, 400ml 用いた場合にそれぞれ 0.0040, 0.0058, 0.0064 でほぼ硝酸ビスマス法<sup>9)</sup>における検量線の場合にほぼ匹敵し、白菜における添加試験で、マラソン 25~100 $\mu$ g を含む四塩化炭素抽出液 50, 100, 150, 200 および 300ml について分析し、平均回収率を求めると 90.0% となり、変動係数は 5.7% であった。ゆえに他の野菜、果実類においても、特別の場合をのぞきほぼこの範囲内で定量できる場合が多いものと考えられる。

## 6. 摘 要

稲および白菜におけるマラソンの残留分析法のアルカリ分解条件、クリーナップ法をさらに検討し、一般野菜、果実類に適用し得る如く改良した。

(1) アルカリ分解条件は四塩化炭素 50~400ml 中のマラソン 50~200 $\mu$ g を N/2 水酸化カリウムエタノール溶液 5ml で、四塩化炭素量に影響されずにアルカリ分解できた。

(2) 検量線はマラソンのアルカリ分解に四塩化炭素 50~400ml を用いた場合にも四塩化炭素量による有意差はみられず、四塩化炭素 50ml を用いた検量線により、四塩化炭素抽出液 350ml 中のマラソンを濃縮せずに定量できた。

(3) 抽出溶媒には前報と同様にメタノールを用いたが、残渣の洗滌には 80% メタノールを用いて分析上好ましくない植物体成分の溶出を制限した。

(4) 前報の塩酸処理アルミナによるクロマトグラフィーを、塩酸処理アルミナに等容のハイフロスーパーセルを混ぜてグラスフィルターにつめ、ろ過と同様な操作により、メタノール抽出液、四塩化炭素抽出液の

両抽出液についてクリーナップを行ない、人参、ねぎ等の例外の場合をのぞき、妨害物質を完全にのぞくことができた。

(5) ねぎ、人参のメタノール抽出液の水希釈液を塩酸酸性にして四塩化炭素抽出を行なうと良い回収率が得られた。

(6) 以上の残留分析法を代表的な野菜、果実類に適用して、77~98% の回収率が得られた。

(7) 表面残留量の抽出には四塩化炭素を用いるよりも、90% メタノールを用いることにより、より真の表面残留量を求めることができる。

## 文 献

- 1) 山内正雄：防虫科学 31, 67 (1966).
- 2) Norris, M. V., Vail, W. A., and Averell, P. R.: *J. Agr. Food Chem.*, 2, 570 (1954).
- 3) Conroy, H. W.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 40, 230 (1957).
- 4) Koivistoinen, P.: *Annales Academiae Scientiarum Fennicae Series A. IV Biologica*, 51 (1961).
- 5) Bates, A. N., Rowlands, D. G., and Harris, A. H.: *Analyst*, 87, 643 (1962).
- 6) 山内正雄, 田中文隆：防虫科学 30, 18 (1965).
- 7) Rowlands, D. G.: *Analyst*, 89, 498 (1964).
- 8) “薄層クロマトグラフィー” 第 2 集, 化学の領域増刊, 第 64 号, p. 123, 31 (1964).
- 9) “薄層クロマトグラフィー” 第 1 集, 化学の領域増刊, 第 59 号, p. 31, 73 (1964).
- 10) Laws, E. Q., and Webley, D. J.: *Analyst*, 86, 249 (1961).
- 11) Bennett, S. H., and Thomas, W. D. E.: *Ann. appl. Biol.*, 41, 484 (1954).

## Summary

Some modifications were made in order to simplify the analytical method for malathion residue described in the previous paper by the author. The modified method is applicable for the determination of malathion residue in vegetables and fruits, and is able to recover 77 to 98 per cent of malathion from plant materials.

Analytical procedure is as follows:

About 100~250g of plant samples to be analysed are macerated with twice its volume of methanol by a homogenizer for 5 minutes. The homogenate is filtered through a glass-filter (25G-3) by suction, and the residue on the filter is rinsed with 50ml

of 80% methanol. The filtrate, containing malathion 50~200 $\mu$ g, is passed through a glass-filter (17G-3), packed with a mixture of acid-washed alumina 30g and about equal volume of hyflosupercel (Kiesel-guhr) 5g by methanol, at the flow rate of 20ml per minute by suction. The filter is rinsed with 50ml of 80% methanol. The eluate is transferred to a 1~3l separatory funnel, and diluted with twice its volume of distilled water. To the diluent, 100~200ml  $\text{CCl}_4$  and 20g of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  are added, and malathion is extracted by shaking for 3 minutes. The  $\text{CCl}_4$  extract is transferred to a glass-filter (17G-3), packed with a mixture of acid-washed alumina 30g and about equal volume of hyflosupercel 5g by  $\text{CCl}_4$ , and passed at the flow rate of 20~30ml per minute, if necessary by suction. Another 50~100ml  $\text{CCl}_4$  is added to the separatory funnel, and malathion is extracted by shaking for 2 minutes. The extract is passed through the glass-filter. The  $\text{CCl}_4$  extract remained in the alumina mixture is eluted by gradually increasing moderate suction. The eluate is transferred to a 1l separatory funnel, and washed with 100ml of distilled water by shaking for 2 minutes.

If the mixture is emulsified, the washing should be repeated until the emulsion disappears.

The  $\text{CCl}_4$  layer is transferred to a 300~500ml separatory funnel through a fluted filter paper, 5ml of N/2 ethanolic KOH is added and shaken vigorously for just 1 minute. To the separatory

funnel, 30ml of 2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  chilled below 10°C is added, the mixture is shaken vigorously for 1 minute, and allow to separate. The  $\text{CCl}_4$  layer is discarded, and 20ml  $\text{CCl}_4$  is added, and then shaken for 1 minute. After separation, 3.5ml of 1N HCl is added to the aqueous layer, and mixed well. To the aqueous layer, 20ml  $\text{CCl}_4$  is added, shaken for 1 minute. The  $\text{CCl}_4$  layer is discarded. The washing with  $\text{CCl}_4$  is repeated until  $\text{CCl}_4$  layer is almost colorless. Then, 1ml of 10%  $\text{FeCl}_3$  is added, mixed well, and the washing with  $\text{CCl}_4$  is repeated until the absorbance of  $\text{CCl}_4$  layer at 418m $\mu$  is negligible. The  $\text{CCl}_4$  layer is discarded as possible as completely, and 5ml  $\text{CCl}_4$  is pipetted into the separatory funnel, and transferred to a refrigerator. After chilling at 5~10°C, 2ml of 5%  $\text{CuSO}_4$  is added, and shaken vigorously for 30 seconds. Immediately after separation, the  $\text{CCl}_4$  layer is filtered into 1cm cell through a small plug of cotton placed loosely in the funnel stem. The absorbance at 418m $\mu$  is measured against reagent grade  $\text{CCl}_4$  within 5 minutes. The absorbance is corrected by subtracting the crop blank, and ppm malathion in the samples is calculated from the calibration curve. The cooling before color development of Cu-complex is dispensable, if the standard curve is prepared every time for the determination of malathion.

This method is able to determine 0.25 ppm malathion in 250g of sample.

#### On the Dynamic Control with Helicopter Aerial Spraying to the Pine Tree Boring Insects.

Seiroku SAKAI, Masayoshi GOHDA, (Institute for Agricultural Chemicals, Yashima Chemical Industry Co., Ltd. Nagano-Tomitake, Nagano) Katsumi KAWABATA (Kagoshima Prefecture Forest Experiment Station, Gamo, Kagoshima) and Hyōzō YONEBAYASHI (Chiba Prefecture Forest Experiment Station, Sanbu, Chiba). Received June 1, 1966. *Botyu-Kagaku*, 31, 120, 1966 (with English Summary, 129)

#### 17. 空中散布を含む松くい虫の動的防除<sup>1)</sup> 酒井清六・合田昌義 (八洲化学工業株式会社 研究所) 川畑克己 (鹿児島県林業試験場) 米林俊三 (千葉県林業試験場) 41. 6. 1. 受理

鹿児島、千葉両県の松くい虫多発地で、空中散布の防除効果を試験した。海岸林、山岳林に対し、10%  $\gamma$ -BHC, 5% EDB, 30% ODB 混合乳剤 $\times$ 12, 10%  $\gamma$ -BHC 乳剤 $\times$ 10, 60~120 l/ha を、鹿児島県阿久根大島、川内、串木野は昭和40年5月10~12日に、千葉県和田、富津、大佐和は7月6日と9月13, 20日にそれぞれベル47-G2型ヘリコプターで空中散布し、落下液剤粒子の number median diameter (N. M. D.), 散布高度と N. M. D. との関係、散布幅、林のうつ閉度および散布葉量・風速

<sup>1)</sup> 本報告の概要は昭和41年4月1日、日本応用動物昆虫学会1966年度大会(京都)で講演発表した。