〔山梨衛公研年報第28号 25〜29頁，1984〕

土壌・水稲中における殺貝剤ニクロサマイドの残留性について

沼田　一　　梶原徳昭

条虫駆除剤（Yomesan-Bayer）として，また，マンソン住血吸虫の中間宿主 *Biomphalaria glabratus* に対する殺貝剤等として，諸外国で使用されている 2′，5 dichloro-4′-nitrosalicylanilide（ニクロサマイド，以下 NA）は，日本住血吸中症の中間宿主宮入貝に対しても殺貝効果は極めて優れ，現在，一般に使用されている 2，5 dichloro-4-bromophenol（B-2）に代わり得る薬剤として検討が進められている[1,2]。

しかしながら，我が国での使用に際しては「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」いわゆる化審法の新規化学物質として，分解性，生物濃縮度試験等の審査が必要とされており，また，環境汚染防止の立場からも，薬剤撒布後の環境中における挙動に関しての調査が要求されているが，これらについての報告は極めて少ない。このことから，今回，環境試料中のNA分析法として heptafluorobutyryl 誘導体法[3]について検討すると共に，土壌残留性および稲作物残留性の調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試　　料

県農業試験場内にある1区画 6 m^2 の水稲薬害影響調査用試験田6区画の圃場土壌を対象とし，無撒布区，5 g/m^2 NA 撒布区および 10 g/m^2 NA 撒布区それぞれ2区画宛使用した，各区画3地点ずつ，内径 4.4 cm の塩化ビニールパイプを 5 cm の深さに差し込み採取後混合，更に 90〜100°C，2時間乾燥し風乾したものを16メッシュのふるいにかけて試験に供した。

また，稲はそれぞれの試験区ごとに収穫，通常の方法で乾燥・脱穀後，稲わらは最外部の枯れ葉を除去，約 2 cm に細切したもの約 100 g を，玄米は約 1 kg を採取，更にこの試料の一部を粉砕器を用いて細粉にした後試験に供した。

2. 試薬・試液

NA 標準品：日本特殊農薬製造（株）の提供による，

1，2，3，4，5，6ヘキサクロロシクロヘキサン(HCH)：和光(株)

ヘプタフルオロブチルイミダゾール（HFBI）：ピアス化学(株)，冷凍室中に保存

ワコーゲル C-100：和光(株)，130°C，3時間加熱活性後デシケータ中で1時間放冷

メタノール，酢酸エチル，エチルエーテル，ベンゼン，ヘキサン：残農用

NA 標準液：標準品 10 mg を秤取，メタノールを用いて溶解後，100 ml の定容とし，標準原液（100 μg/ml）を調製する。使用に際しメタノールを用いて希釈し，1 μg/ml の標準液を調製する。

HCH 内部標準液：HCH 10 mg を秤取，ヘキサンを用いて溶解後，100ml の定容とし，標準原液(100μg/ml)を調製する。更に，ヘキサンを用いて希釈，1 μg/ml の標準液を調製する。

3. 器　　具

ECDガスクロマトグラフ：日立 073 型

水平振とう器：ヤヨイ Model 8-1

分析粉砕器：日本理化学 R-8

リアクティー・サーモヒーター；サンプルコンセントレーター；シリ・サーモヒーター：ピアス化学(株)

ミニバイアル（テフロン・ラバーディスク付）

4. 試料の前処理

（1）**土壌試料**：乾燥試料 2 g を 50 ml 共栓三角フラスコ中に秤取，メタノール 25 ml を加え，水平振とう器を用いて60分間振とう後一夜放置した。この抽出液をろ過（ろ紙 No.5 A），残留物は温メタノール（約50°C）を用いて洗浄し洗液をろ液に合した後，ロータリーエバポレーターを用い溶媒を留去して抽出残留物を得た。

この残留物は塩化ナトリウム 5 g を入れた 100 ml 分液漏斗中に温水約 50 ml を用いて移し，これに20%塩酸 0.2 ml を加え弱酸性とした後，ヘキサン 30 ml を用いて抽出，更にヘキサン 30 ml および 20 ml で2回抽出を行った。ヘキサン抽出液を合し，水 20 ml で1回水洗後ヘキサン層を採取しヘキサンを加えて 100 ml の定容とした。

（2） **稲ワラ・玄米試料**：稲ワラ試料5 g，または玄米試料10 g を300 ml ナス型フラスコ中に秤取，メタノール150 ml を加えた後，還流冷却器を付し，沸騰水浴上で30分加温抽出を行った。冷後，この抽出液をろ過（ろ紙 No. 5 A），残留物はメタノール約100 ml を用いて洗浄し，洗液をろ液に合した後，ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した。残留物は塩化ナトリウム5 gを入れた100 ml 分液漏斗中に温水約50 ml を用いて移した後，以下土壌試料と同様な操作によりヘキサン抽出液を採取，ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し残留物を得た。

5. 稲作物抽出物のクリーンアップ

前項で得た抽出物を少量のヘキサンに溶解，シリカゲルカラム（10×300 mm，活性ワコーゲル C-100 2 g)上にのせヘキサン50 ml 次いでヘキサン・エーテル混液（1：9）50 ml を流し妨害物質を除去後，続いて溶出液としてヘキサン・エーテル混液(2：8)，(3：7)および（5：5）を50 ml 宛流した後，各画分の溶媒を留去し，残留物をメタノール2～3 ml に溶解して検液とした。

6. HFBI 誘導体の調製

土壌試料のヘキサン抽出検液2～4 ml（NAとして0.2～2 μg）または稲作物試料のヘキサン抽出検液をミニバイアル中に移し，サーモヒーターおよびコンセントレーターを用いて60°C 以下，窒素気流中で蒸発乾固した。これに HFBI 50 μl を加えて密栓，リアクティー・サーモヒーターを用いて100°C，2時間加熱反応させ，冷後，反応物に水1 ml およびヘキサン3 ml を加えて密栓して振とうし抽出を行った。上層のヘキサン層をピペットを用い10 ml 共栓遠心沈澱管中に移し，更に，ヘキサン3 ml 次いで2 ml を用い同様な操作により抽出を行った。

このヘキサン抽出液をシリカゲルカラム（ビタミンB_1測定用吸着管，ワコーゲル C-100，1 g）上にのせ，続いて，ベンゼン・ヘキサン混液（2：8）10ml を流した後，ベンゼン・ヘキサン混液（6.5：3.5）10 ml を流しこの溶出画分を採取，内部標準液 HCH（1 μg/ml）0.2 ml を加え GC 試験用検液とした。

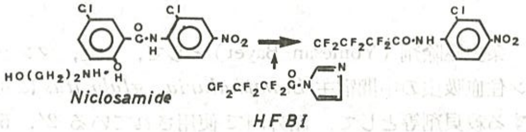

Fig. 1 The Reaction of Niclosamide with HFBI

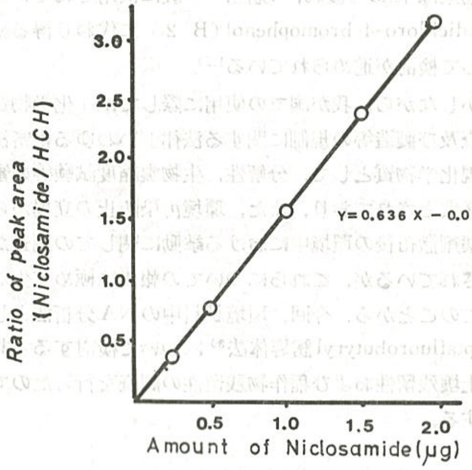

Fig. 2 Calibration Curve for Determination

Table 1 Effect of reagent amount and reaction time on the preparation of derivative

Niclosamide μg	HFBI μl	Heating time h	Heating temp °C	Fraction of eluate *	Peak area mm²	Ratio of peak area
20	50	2	100	I	nd	
				II	nd	
				III	248	1.00
				IV	nd	
20	50	1	100	III	238	0.96
20	25	2	100	III	198	0.80
20	25	1	100	III	191	0.70

* Fraction of eluate : I hexane : 5 ml
II benzene : hexane (20 : 80) 10 ml
III benzene : hexane (65 : 35) 10 ml
IV benzene : 10 ml

7. 測　　　定

前項で得たGC試験用検液およびNA標準液（1 μg/ml）0.25, 0.5, 1.0, 1.5および2.0 mlをミニバイアル中に採取, 同様な操作でHFBI誘導体として調整した検液2 μlをガスクロマトグラフに注入, NAおよびHCHのピーク面積比を求めて濃度を算出した。

GC測定条件

カラム：3％ Neopentylglycol succinate, Chromosorb W 80/100, 3 mmφx 2 m

温度：カラム190°C, 注入口230°C, 検出器230°C

窒素流量：50 ml/min, チャートスピード10 mm/min

実験結果および考察

1. HFBI誘導体生成条件の検討

Johnsonら[3]は, NA撒布地域におけるバナナ園の作物中における残留性をHFBI誘導体として, またMuirら[4]は河川水, 底質試料を用いヨウ化メチルによるメチル誘導体として, また, Luhningら[5]はアルカリ分解物として, 環境試料に対するNA分析法について報告している。今回は感度および特異性の点からHFBI誘導体法（**Fig. 1**）について検討, この結果反応条件についてはJohnsonらの報告と同様**Table 1**に示したようにHFBI 50 μl, 100°C, 2時間の反応条件ならびにシリカゲルカラム, 溶出剤ベンゼン・ヘキサン混液（6.5：3.5）を用いたクリーンアップ法の採用により良好な結果が得られた。本法はNA 0.2～2 μgの濃度範囲で明らかな直線性を示し, また, 明らかな妨害ピークの存在は認められなかった（**Fig. 2**, **Fig. 3**）。

2. 土壌試料抽出法の検討

底質試料からのNA抽出法として, Muirらはメタノール・水による抽出物をフロリジルカラムおよび溶出剤として酢酸エチル続いてメタノールを用いクリーンアップを行っている。しかしながら, 今回NA 5 μg/g添加試料についての追試した結果, その回収率は36～45％（n＝3, 平均43％）と低く, 一方, 今回の実験において撒布後の薬剤残存量が極めて高いことが認められたことから, 土壌試料2 gに標準物質100 μgを添加, メタノール抽出後, HFBI誘導体として直接測定した場合, その回収率は**Table 2**に示したように平均93.3％と良好な成績を得た。更に, この抽出物の水溶液を塩析剤として塩化ナトリウムを加え, 酸性条件下ヘキサン抽出後, 測定した結果はメタノール抽出による測定値の93.9％を示していた。このことから, 今回は代謝成分等の影響を考慮し, メタノール抽出後, 更に, ヘキサン抽出による操作法を加え, NAの測定を行った。この方法による検出限界値は0.2 μg/2 gである。

3. 稲ワラ・玄米試料抽出法の検討

今回, 稲作物抽出物に対するクリーンアップ法としてシリカゲルカラムを用い, ベンゼン, 酢酸エチル, 四塩化炭素, ヘキサンおよびエチルエーテル各溶媒に対して

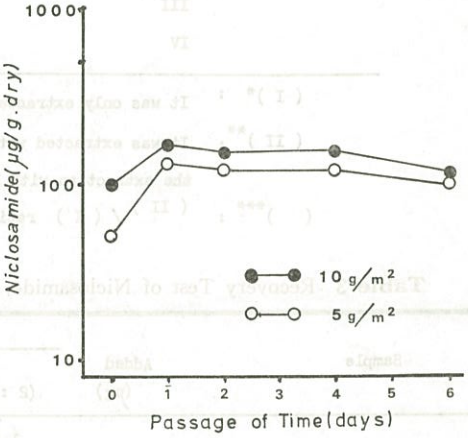

Fig. 4　Degradation of Niclosamide in the Field

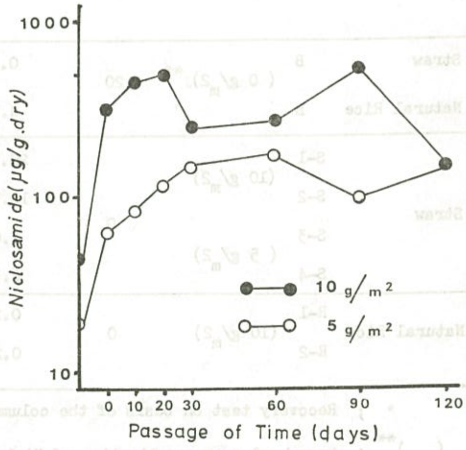

Fig. 5　Degradation of Niclosamide in the Field

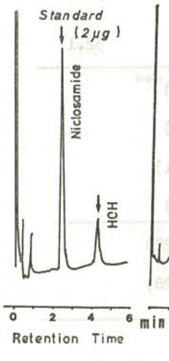

Fig. 3　Gaschromatogram of the HFBI-Derivative of Niclosamide

検討の結果，**Table 3** に示したように標準物質 100 μg を用いた場合エーテル・ヘキサン混液（5：5）の画分中に87%の溶出を認めた。しかしながら，実試料では稲ワラの場合，混合溶媒（3：7），玄米では（2：8）の溶出画分中に70%以上が検出され，また NA 20 μg 添加試料の回収率は約32%にとどまり，作物中の NA 測定法に関しては引続いた検討を認められた。

4.　土壌・稲作物中のＮＡ残留性

先に，久保田ら[6]はＢ２撒布後の水田土壌中における薬剤の半減期は19日～１カ月，110日後の残留量は0.08 ppm であり，また，稲ワラ中には平均0.84 ppm，玄米は検出限界（0.05 ppm）以下であったと報告している。

一方， Muir ら[7]は ^{14}C. NA を用い，池底質中における生分解性について検討の結果，その半減期は 1.1日

Table 2　Examination of Niclosamide Determination by the proposed Procedure

Sample of Soils		Added	Found (I)*	Found (II)**	Recovery	
		μg/g	μg/g	μg/g	%	X̄ %
Control	1	50	46.0		92.0	
	2	50	48.8		97.5	93.3
	3	50	45.3		90.5	
After Spray Applicatin of Niclosamide	I		40.5	43.0	(106.)***	
	II		178.	163.	(91.5)	
	III		230.	225.	(97.8)	(93.9)
	IV		92.5	74.2	(80.2)	

(I)* : It was only extracted with methanol.

(II)**: It was extracted with methanol, and then the extract was carried out the extraction with hexane

(　)*** : (II) / (I) ratio

Table 3　Recovery Test of Niclosamide, and Niclosamide Content of Straws and Natural Rice

Sample		Added	Found (μg) Fraction of eluate (Ethylether : Hexane) (2 : 8)	(3 : 7)	(5 : 5)	Total	Recovery
		(μg)					%
Standard of Niclosamide		100*	1.5			1.5	1.5
				5.0		5.0	5.0
					87.0	87.0	87.0
Straw	B (0 g/m2) **	20	0.47	5.85	0.16	6.48	32.4
Natural Rice	B		4.70	1.58	0.14	6.42	32.1
Straw	S-1 (10 g/m2)	0	20.5	76.0	2.70	99.2 (19.8)***	
	S-2		15.3	106.	2.65	124. (24.8)	
	S-3 (5 g/m2)		7.60	40.5	1.45	49.6 (9.91)	
	S-4		6.30	50.5	1.85	58.7 (11.7)	
Natural Rice	R-1 (10 g/m2)	0	0.21	0.07	0.00	0.28 (0.028)	
	R-2		0.24	0.04	0.00	0.28 (0.028)	

* ; Recovery test on basis of the column clean-up procedure

(　)** ; Amount of spray application of Niclosamide

(　)*** ; μg / g

〜2.9日と速やかに分解，その分解産物は還元体である2′, 5 dichloro 4′ amino-salcylanilideであると報告している。しかし今回の薬剤残留性の調査結果は，**Fig. 4**, **Fig. 5**に示したように撒布量に比例してNA濃度値は高かったものの120日経過後においても明らかな減少は認められず，その残留量は150 μg/gと撒布時の濃度を保っていた。また，今回の測定条件下においても稲ワラ中に9.91〜24.8 μg/g，玄米中に0.028 μg/gを検出し，明らかにNAは稲作物中に移行し残留することを観察した。

結　　語

1. 土壌・稲作物試料に対する殺貝剤ニクロサマイド分析法としてHFBI誘導体法について検討，土壌試料に対する回収試験では，メタノール抽出直接法で平均93.3%，ヘキサン抽出法との併用により87.6%（前者の93.9%）の回収率を示したが，稲作物の場合32.3%と低く，更に検討の必要性を認めた。

2. ニクロサマイドは，撒布土壌中における生分解性は極めて低く，難分解性物質であることが確認された。また，稲ワラ中に9.91〜24.8 μg/g，玄米中に0.028 μg/gの薬剤残留が観察された。

文　　献

1）梶原徳昭ら：山梨衛公研年報　**19**，49〜53（1975）

2）梶原徳昭：山梨衛公研年報　**28**，22〜24（1984）

3）Johnson J. S. and Pickering G. B. : Pestic Sci. **10**，531〜539（1979）

4）Muir D. C. G. and Grift N. P. : Intern. J. Environ. Anal. Chem. **8**，1〜14（1980）

5）Luhning C W. et al : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**，1141〜1145（1979）

6）久保田寿々代，有泉ひとみ，山本信一：山梨衛公研年報　**19**，54〜57（1975）

7）Muir D. C. G. and Yarechewski A. L. : J. Agri. Food Chem. **30**，1028〜1032（1982）