

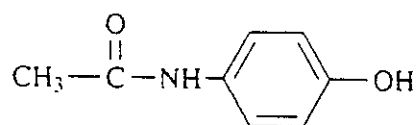
## アセトアミノフェン（パラセタモール）の分析法

### 目次

1. アセトアミノフェンの定性及び定量試験用試料溶液の調製法
2. 塩化第二鉄反によるアセトアミノフェンの定性試験
3. 薄層クロマトグラフ法によるアセトアミノフェンの定性試験
4. 液体クロマトグラフ法によるアセトアミノフェンの定量試験

### 参考資料

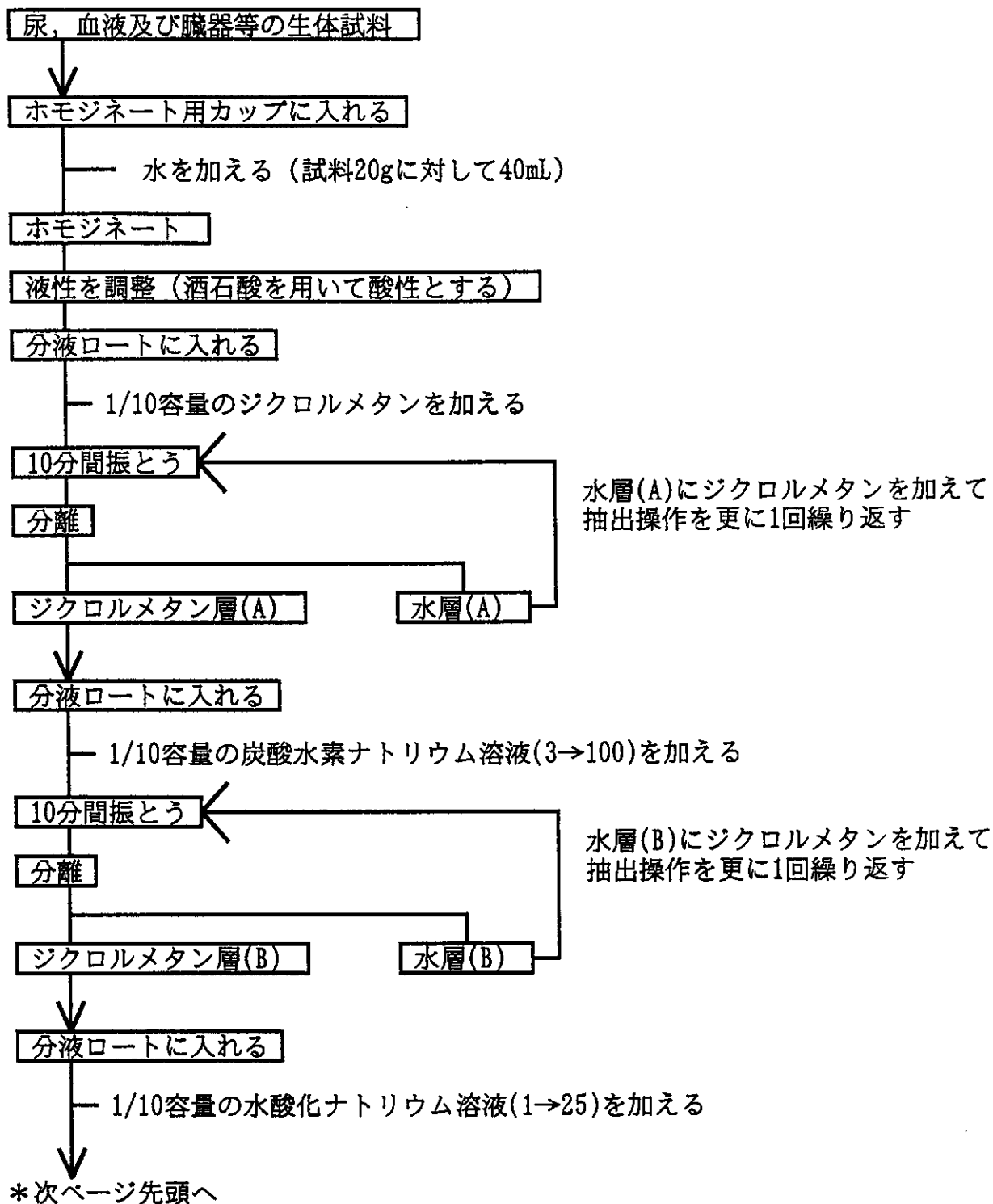
毒性データ：アセトアミノフェン；人最小致死量（MLD）約15g（経口），  
ラットLD<sub>50</sub>3.7g/kg（経口），マウスLD<sub>50</sub>338mg/kg（経口）

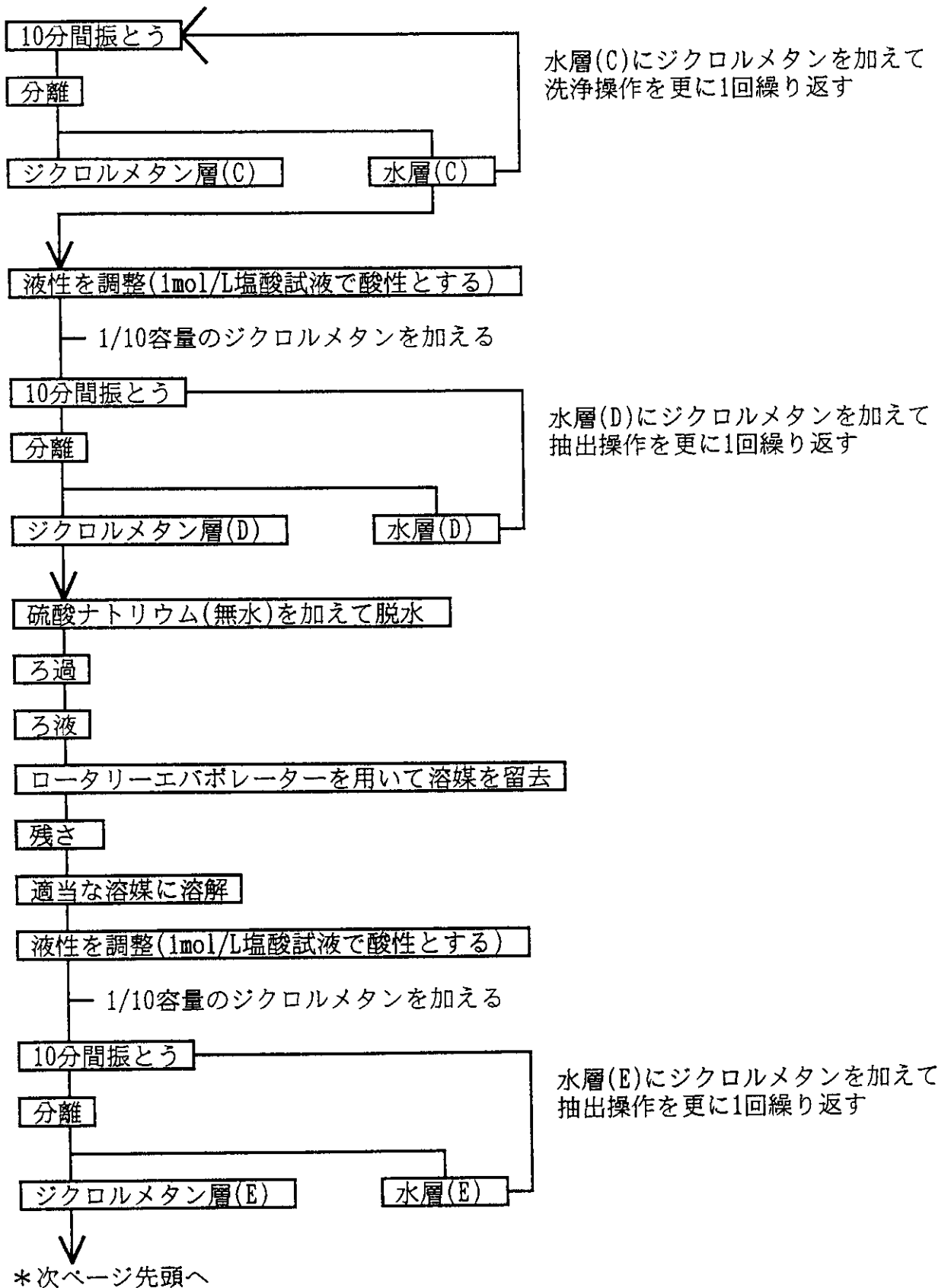


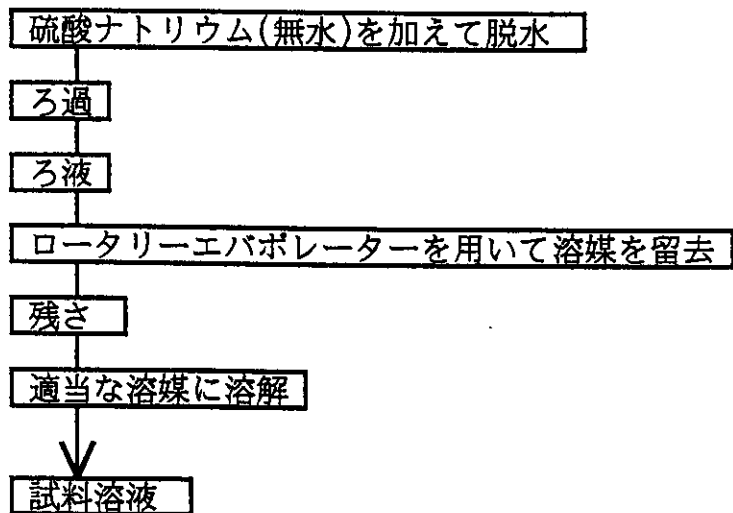
アセトアミノフェン

Acetaminophen

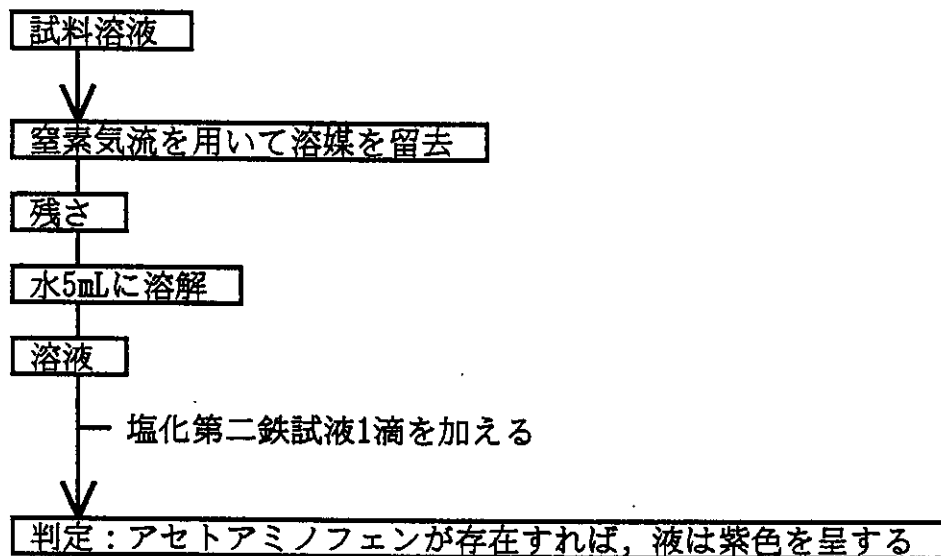
# 1. アセトアミノフェンの定性及び定量試験用試料溶液の調製法







## 2. 塩化第二鉄反によるアセトアミノフェンの定性試験



## 3. 薄層クロマトグラフ法によるアセトアミノフェンの定性試験

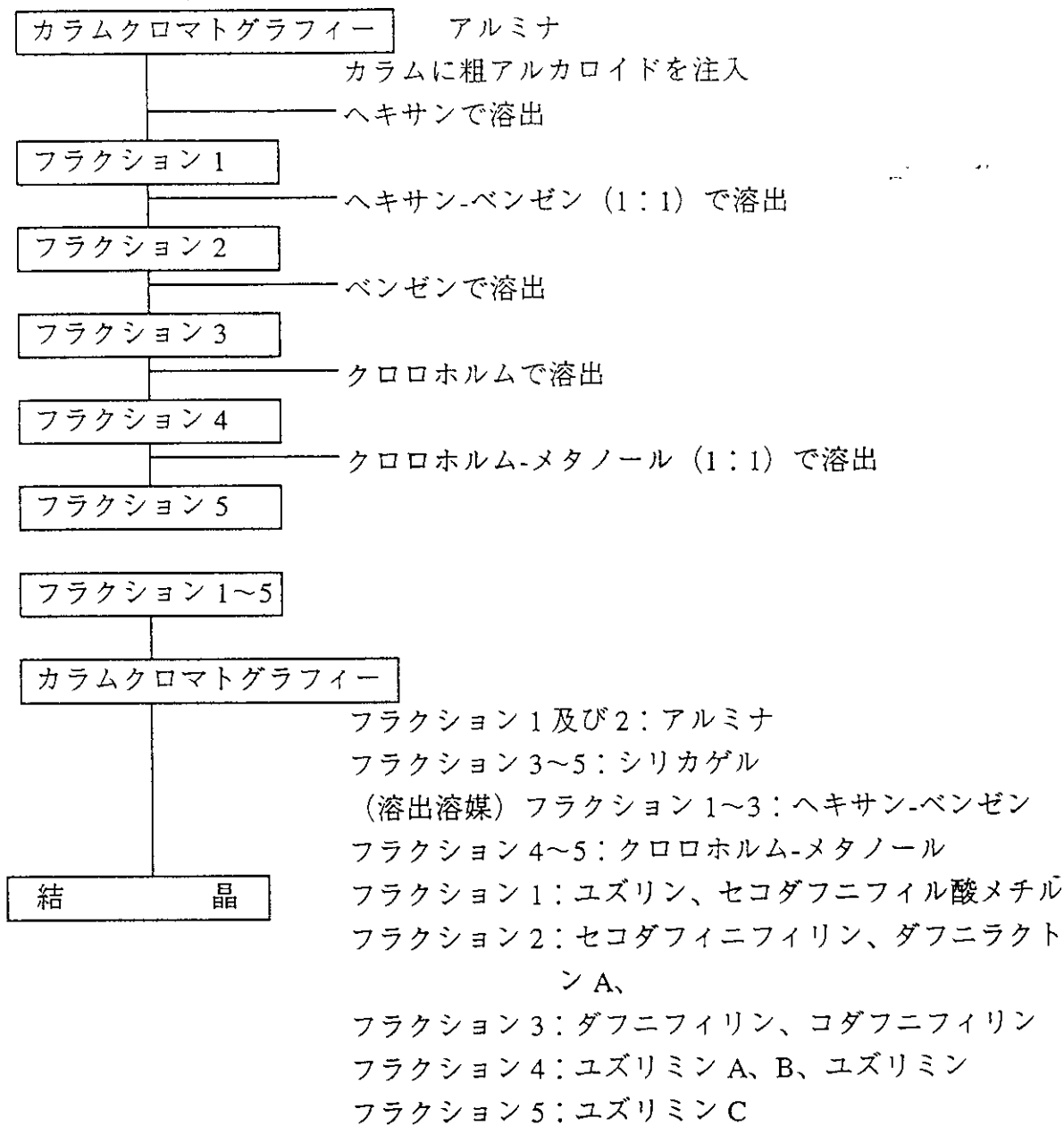
1. アセトアミノフェンの定性及び定量試験用試料溶液の調製法の試料溶液を用いて定性試験を行うことが望ましい。早急に行うには、生体試料に適当量の水を加え、超音波等にて抽出し、抽出液を試料溶液とする（ただし、夾雑物等の影響があり、誤判定となる恐れがあるので、注意が必要である）。

展開溶媒：ベンゼン/アセトン(9:1)混液  
 薄層板：蛍光剤入りシリカゲルプレート  
 検出：(a)紫外線(254nm)を照射する  
 (b)塩化第二鉄溶液(9→100)を噴霧する

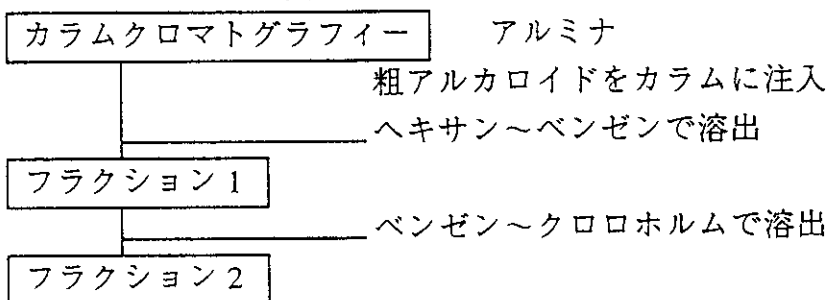
### 参考

上記条件でのアセトアミノフェンのRf値は約0.2

<ユズリハ葉、枝の場合>



<ヒメユズリハの実の場合>



フラクション 1

結 晶

母 液

結 晶

フラクション 2

結 晶

ベンゼン-ヘキサンで再結晶  
ダフニラクトン B

カラムクロマトグラフィー (アルミナ)  
ヘキサン、ヘキサン-ベンゼン (1:1) で溶出  
ダフニラクトン B、ユズリミン、ユズリミン B

カラムクロマトグラフィー (アルミナ)  
ベンゼン-クロロホルム (1:1) で溶出  
ダフニラクトン B、ユズリミン、ユズリミン B

農薬等

研究協力者 豊田正武

# 有機リン系農薬試験法

## 目次

- 1. 迅速検出法—DTNB法によるコリンエステラーゼ活性阻害試験
- 2. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法

### 1. 迅速検出法—DTNB法によるコリンエステラーゼ活性阻害試験

胃内容物、血清を試料とする。

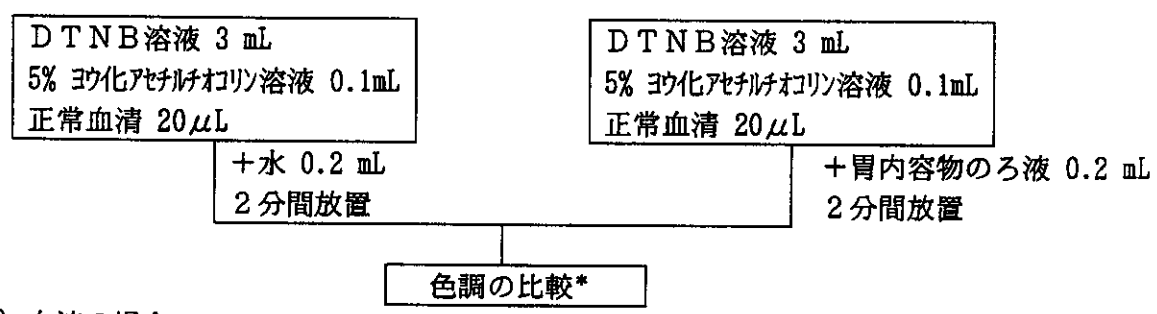
#### [試薬]

DTNB溶液：5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 10 mgを 100 mLのリン酸緩衝液 (pH7.4) 100 mLに溶かす。

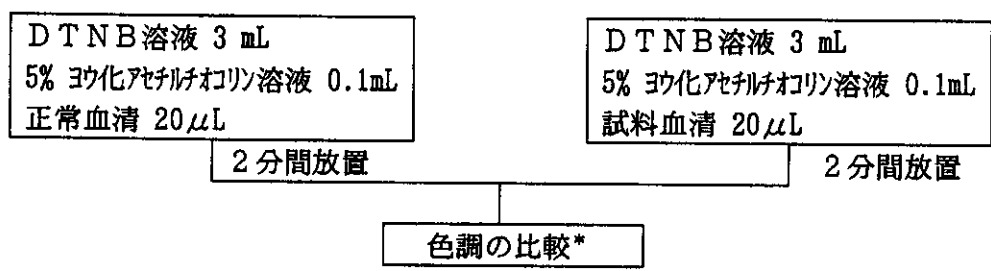
リン酸緩衝液 (pH7.4)：リン酸二水素カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)9.09 gを水に溶かして1000 mLとした液2容とリン酸水素ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O) 23.86 gを水に溶かして1000 mLとした液8容とを混和する。

#### [試験法]

#### 1) 胃内容物の場合



#### 2) 血液の場合



\*：色調に差があれば、有機リン系化合物またはカルバメート系農薬等のコリンエステラーゼ活性阻害物質が存在する。

### 2. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法

有機リン系農薬は、ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法で測定可能である。ガスクロマトグラフの検出器としては、リン特異性の高い蛍光光度型検出器または、高感度窒素・リン検出器またはアルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフが使用できる。各種のキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーにおける保持時間を参考として表1に示した。



【装置】

ガスクロマトグラフ：炎光光度型検出器付きまたは高感度窒素・リン検出器またはアルカリ熱イオン化検出器付きのもの

ガスクロマトグラフ/質量分析計

【GC条件】

カラム，カラム温度について，表1の脚注を参照のこと。

【GC/MS操作条件】

カラム：DB-5 長さ30 m，内径0.25 mm

カラム温度：50°C(2min)-30°C/min-170°C(4min)-10°C/min-270°C(15min)

注入口温度：250°C

インターフェイス温度：280°C

イオン化電圧：70 eV

【試験溶液の調製】

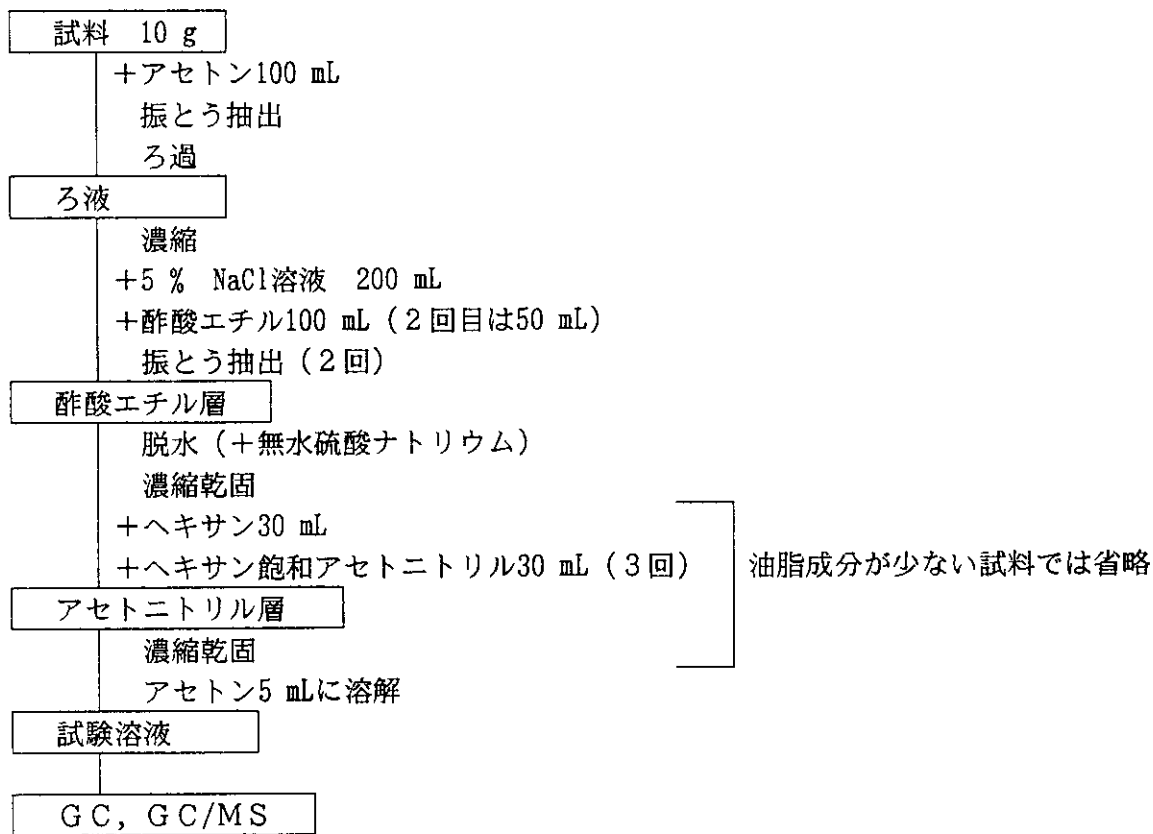


表1. 有機リン系農薬の相対保持時間

農薬名*	1)**	2)	3)	農薬名	1)	2)	3)
	DB-210	DB-5	DB-1		DB-210	DB-5	DB-1
ジクロロホス	0.38	0.26	0.50	パラチオンメチル	1.19	0.91	0.94
メタミドホス	0.45	0.23	-	ジメチルピリンホス	1.19	1.00	0.99
トリクロロホン	0.62	0.47	-	ホルモチオン	1.20	0.87	0.90
エトプロホス	0.73	0.66	0.78	クロルフェンピリンホス	1.22	1.06	1.03
チオメトン	0.75	0.73	0.84	フェニトロチオン	1.22	0.96	0.97
カスサホス	0.75	0.71	0.82	クロルフェンピリンホス	1.26	1.08	1.05
ダイアジノン	0.77	0.83	0.89	パラチオン	1.27	1.00	1.00
テルブホス	0.78	0.80	0.88	プロフェノホス	1.28	1.16	1.10
ナレド	0.78	0.68	0.80	メチダチオン	1.31	1.10	1.06
アセフェート	0.80	0.44	-	スルプロホス	1.32	1.27	1.17
シオキサベンゾホス	0.81	0.68	0.80	プロバホス	1.34	1.11	1.06
エトリムホス	0.83	0.86	0.91	ブタミホス	1.35	1.14	1.09
ジスルホトン	0.85	0.83	0.90	エチオン	1.35	1.25	1.15
ジクロフェンチオン	0.90	0.89	0.94	ホスチアセート	1.36	1.03	1.01
クロルピリホスメチル	0.93	0.91	0.95	テトラクロルピリンホス	1.36	1.12	1.07
ピリミホスメチル	0.97	0.97	0.97	イソキサチオン	1.42	1.20	1.12
イプロベンホス	0.98	0.86	0.92	エディフェンホス	1.46	1.29	1.18
トルクロホスメチル	0.98	0.91	0.95	レプトホス	1.48	1.46	-
クロルピリホス	1.00	1.00	1.00	ハミドチオン	1.57	1.12	-
フェンチオン	1.05	1.00	0.99	シアノフェンホス	1.65	1.29	1.18
ジメトエート	1.05	0.75	0.83	フェンスルホチオン	1.74	1.23	1.14
シアノホス	1.09	0.80	0.87	EPN	1.75	1.39	1.26
モノクロホス	1.14	0.71	0.79	メスルフェンホス	1.79	1.23	1.13
プロモホスエチル	1.15	1.11	1.07	ホスメット	1.79	1.38	1.24
プロチオホス	1.15	1.15	1.10	ピリダフェンチオン	1.86	1.38	1.24
キナルホス	1.16	1.08	1.05	ホザロン	1.93	1.46	1.31
イソフェンホス	1.19	1.08	1.05	アジンホスメチル	1.97	-	-
フェントエート	1.19	1.08	1.05	ピラゾホス	2.00	1.54	-
マラチオン	1.19	0.99	0.98	ピラクロホス	2.01	1.55	-

\* : 農薬名はDB-210での相対保持時間の順に配列した。

但し、保持時間が接近している農薬の厳密な順番の確認は行っていない。

\*\* : 1) DB-210, 0.53mm x 15m, 1.0 $\mu$ m 100°C(1min)-8°C/min-220°C(10min)

2) DB-5, 0.53mm x 15m, 1.5 $\mu$ m 100°C(1min)-8°C/min-250°C(5min)

3) DB-1, 0.25mm x 30m, 0.25 $\mu$ m 80°C(1min)-12°C/min-290°C(10min)

## カルバメート系農薬試験法

### 目次

1. はじめに
2. DTNB法によるコリンエステラーゼ活性阻害試験
3. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法
4. 高速液体クロマトグラフィー

### 1. はじめに

わが国で殺虫剤または殺菌剤として使用されている主なカルバメート系農薬は表1に示した通りである。本試験法ではこれらの農薬を分析対象とする。

表1. わが国で使用されている主なカルバメート系農薬

分類	一般名	登録名		LD50(rat)
殺虫剤	Carbaryl	NAC	劇物	800 mg/kg
	Metolcarb	MTMC	劇物	580
	Isoproc carb	MIPC	劇物	403
	Fenobucarb	BPMC	劇物	623-657
	Propoxur	PHC	劇物	90-128
	—	XMC	劇物	542
	Ethiofencarb	エチオフェンカルブ	劇物	328
	Bendiocarb	ベンダイカルブ	毒物	40-156
	Pirimicarb	ピリミカルブ	劇物	148
	Carbosulfan	カルボスルファン	劇物	101
	Benfuracarb	ベンフラカルブ	劇物	138
	Methomyl	メソミル	劇物	17-24
	Oxamyl	オキサミル	毒物	6.2
	Thiodicarb	チオジカルブ	劇物	66
	Alanycarb	アラニカルブ	劇物	330
	除草剤	Chlorpropham	IPC	普通物
Phenmedipham		フェンメディファム	普通物	>8000
Terbucarb		MBPMC	普通物	>346000
Thiobencarb		ベンチオカルブ	普通物	1300
Orbencarb		オルベンソカルブ	普通物	800
Esprocarb		エスプロカルブ	普通物	3700
Molinate		モリネート	普通物	369
Dimepiperate		ジメピペレート	普通物	946-959
Pyributicarb		ピリブチカルブ	普通物	>5000

## 2. DTNB法によるコリンエステラーゼ活性阻害試験（文献1）

胃内容物，血清を試料とする。

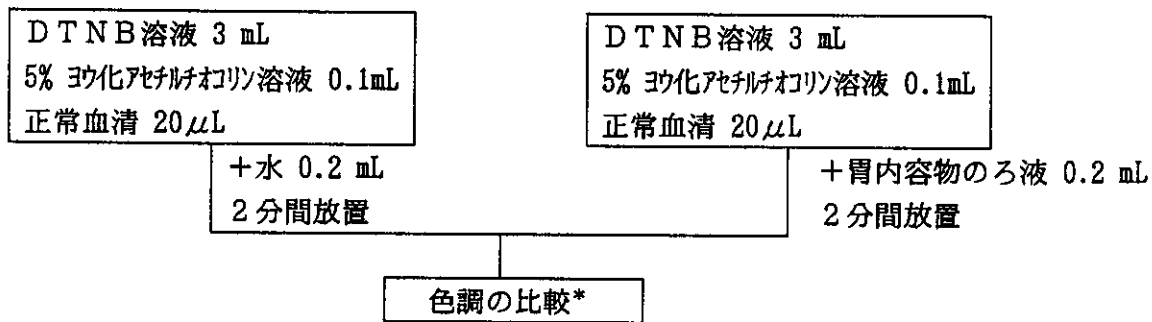
### 【試薬】

DTNB溶液：5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 10 mgを 100 mLのリン酸緩衝液（pH7.4）100 mLに溶かす。

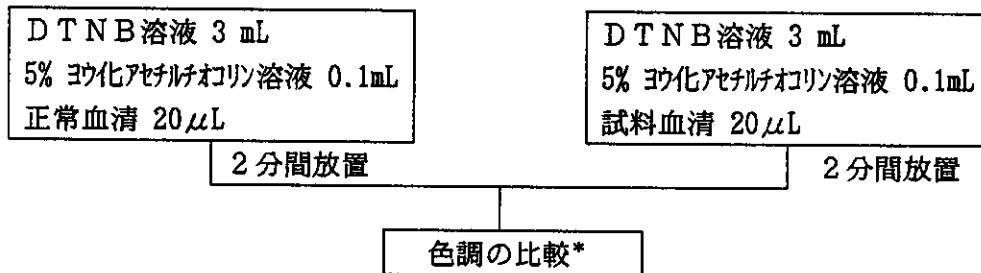
リン酸緩衝液（pH7.4）：リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )9.09 gを水に溶かして1000 mLとした液2容とリン酸水素ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 23.86 gを水に溶かして1000 mLとした液8容とを混和する。

### 【試験法】

#### ① 胃内容物の場合



#### ② 血液の場合



\*：色調に差があれば，有機リン系化合物またはカルバメート系農薬等のコリンエステラーゼ活性阻害物質が存在する。

## 3. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法

カルバメートは熱に対して比較的不安定であるため，一部のカルバメートはガスクロマトグラフで分析する際にカラム内で分解する．熱に対して安定な誘導体として分析する方法もあるが，本試験法の目的は比較的高濃度のカルバメートを含有する試料を迅速に測定することにあるので，誘導体化せずに直接ガスクロマトグラフィーを行う方法を紹介します．表2には各農薬についてガスクロマトグラフによる分析例を示した。

### 【装置】

ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器付きまたは高感度窒素・リン検出器またはアルカリ熱イオン化検出器付きのもの

ガスクロマトグラフ/質量分析計

【GC/MS操作条件】（文献2）

カラム：DB-5 長さ30m, 内径0.25mm

カラム温度：50°C(2min)-30°C/min-170°C(4min)-10°C/min-270°C(15min)

注入口温度：250°C

インターフェイス温度：280°C

イオン化電圧：70eV

【試験溶液の調製】（文献3を改変）

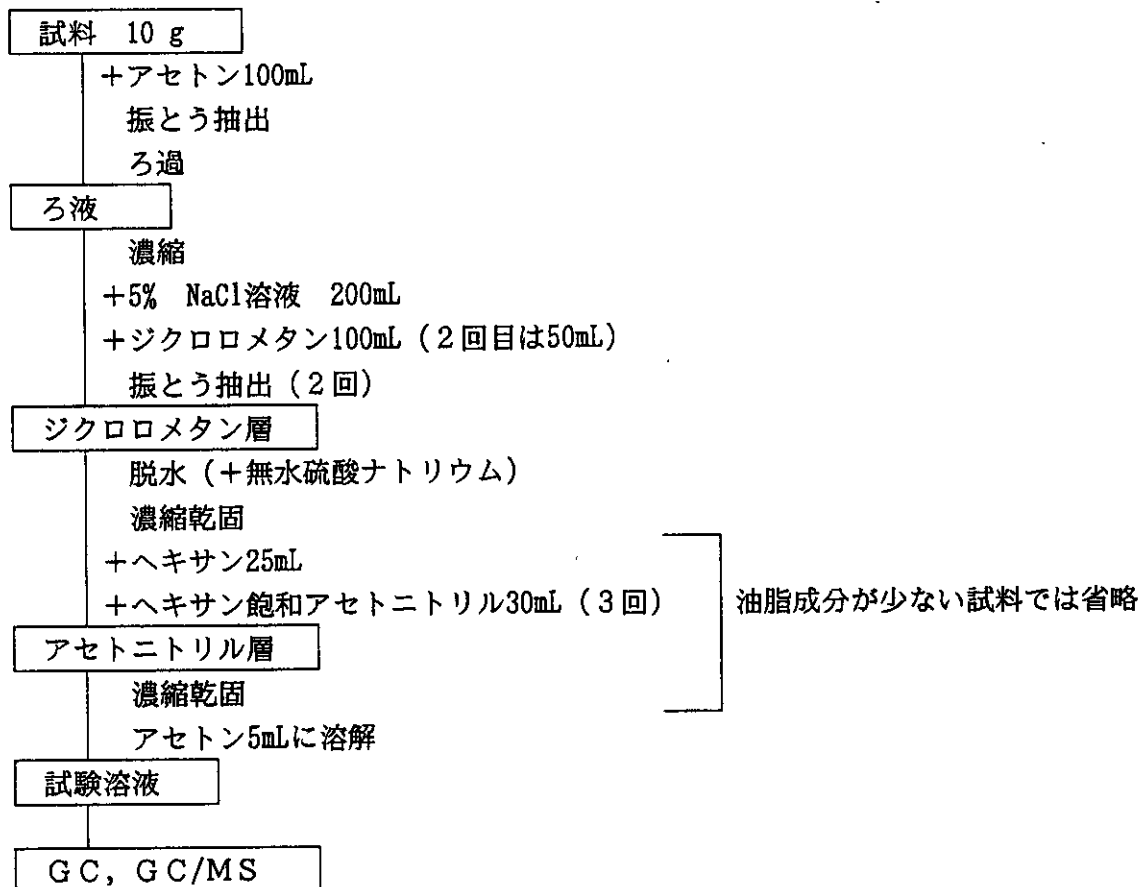


表2 GC及びGC/MSによる分析例

分類	一般名	登録名	保持時間* (min)	報告例**	
				GC/MS	GC
殺虫剤	Carbaryl	NAC	11.10	○	—
	Metolcarb	MTMC	6.58	○	—
	Isoprocarb	MIPC	7.05	○	○
	Fenobucarb	BPMC	7.54	○	○
	Propoxur	PHC	7.58	○	○
	XMC	XMC	—	○	○
	Ethiofencarb		10.34	○	○
	Bendiocarb		8.09	○	○
	Pirimicarb		10.14	—	○
	Carbosulfan		8.79	—	○
	Benfuracarb		—	—	○
	Methomyl		7.24	○	—
	Oxamyl ***		3.40	—	—
	Thiodicarb		—	—	—
	Alanycarb		—	—	—
除草剤	Chlorpropham	IPC	7.95	—	○
	Phenmedipham		—	—	—
	Terbucarb	MBPMC	—	○	—
	Thiobencarb	ベンチオカーブ	12.12	—	○
	Orbencarb	オルソベンソカーブ	—	—	—
	Esprocarb	エスプロカルブ	11.89	—	○
	Molinate	モリネート	—	—	○
	Dimepiperate	ジメピペレート	—	—	○
	Pyributicarb	ピリブチカルブ	—	—	○
			文献1	文献4	—

\* : DB-5 長さ30m, 内径0.25mm

カラム温度は, 50°C(2min)-30°C/min-170°C(4min)-10°C/min-270°C(15min)

\*\* : ○は, GCまたはGC/MS分析の報告がある農薬. —は, 報告がない農薬.

\*\*\* : 分解物を検出する.

#### 4. 高速液体クロマトグラフィー

カルバメートは紫外吸収検出器付き高速液体クロマトグラフまたはポストカラム蛍光化反応検出器付き高速液体クロマトグラフで分析することができる。ここでは汎用機である紫外吸収検出器付き高速液体クロマトグラフでの分析例を示した(表3)。

【装置】

高速液体クロマトグラフ : UV検出器付き

【高速液体クロマトグラフィー条件】（文献1）

カラム：オクタデシルシラン結合シリカゲル（内径4.6mm，長さ250mm）

カラム温度：40°C

移動相：メタノール・水（65：35）

流速：1.0 mL/min

検出器の波長：254 nm

【試験溶液の調製】

2. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法の【試験溶液の調製】に同じ。  
但し最終試験溶液をメタノール溶液とする。

表3 高速液体クロマトグラフィーによる分析例

一般名	登録名	保持時間(min)		移動相	流速 ml/min	波長 nm	文献
		カラム1	カラム2				
Carbaryl	NAC	6.28	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Metolcarb	MTMC	5.37	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Isoproc carb	MIPC	6.91	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Fenobucarb	BPMC	8.60	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Propoxur	PHC	5.54	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
XMC	XMC	6.75	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Ethiofencarb		6.39	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Bendiocarb		-	3.91	AN-W(50:50)	1.4	230	
Pirimicarb		-	-				
Carbosulfan		-	-				
Benfuracarb		-	-				
Methomyl		3.96	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Oxamyl		-	3.00	AN-W-PA (25:75:0:04)	1.0	235	
Thiodicarb		-	5.45	AN-W(40:60)	1.4	234	
Alanycarb		-	-				
Chlorpropham	IPC	-	-				
Phenmedipham		-	-				
Terbucarb	MBPMC	23.04	-	M-W(65:35)	1.0	254	文献(1)
Thiobencarb	ベンチオカーブ	-	-				
Orbencarb	オルソベンチオカーブ	-	9.95	AN-W(60:40)	1.4	210	
Esprocarb	エスプロカルブ	-	-				
Molinate	モリネート	-	-				
Dimepiperate	ジメピペレート	-	-				
Pyributicarb	ピリブチカルブ	-	-				

AN:acetonitrile, W:water, M:methanol, PA:phosphoric acid

カラム1： Finapak SIL C18（内径4.6mm，長さ250mm）

カラム2： ODS Hypersil（内径4.6mm，長さ250mm）

#### 参考文献

- 1) 日本薬学会編：「薬毒物化学試験法と注解」p361～371，南山堂（1992）
- 2) 秋山由美，矢野美穂，三橋隆夫，武田信幸，辻 正彦：「固相抽出法を用いた農産物中残留農薬のGC/MSによる多成分一斉分析」，食衛誌，37，351-362，1996  
秋山由美，吉岡直樹，矢野美穂，辻 正彦：日米残留農薬ワークショップ・プロシーディング，38-42，1997
- 3) 「今月の農業」編集室編：「農薬登録保留基準ハンドブック」p54～57，化学工業日報社(1998)
- 4) 角田紀子，岸 徹：「農薬の質量スペクトル」，科学警察研究所報告法科学編，41，85～91，1988



## パラコート及びジクワット試験法（文献1）

### 目 次

1. はじめに
2. 試料の色調観察
3. 水系試料の迅速検出法（ハイドロサルファイトによる呈色反応）
4. 水系試料の定性及び定量法
  - 4-1. 薄層クロマトグラフィー
  - 4-2. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法
5. 血液及び尿試料からの定量
  - 5-1. ガスクロマトグラフィー/質量分析法
  - 5-2. 吸光度法
  - 5-3. 高速液体クロマトグラフィー

### 1. はじめに

パラコート及びジクワットは、非ホルモン系非選択性接触型除草剤であり、パラコートは医薬用外毒物に、ジクワットは同劇物に指定されている。パラコートのヒトに対する致死量は成人の場合、その製剤原液約 10~15 mL（ジクワットの場合には原液約 70~100 mL）と推定されており、その中毒の特徴は肺機能障害で致死率は高い。

パラコート及びジクワットの試験法は分析対象試料及び含有量によって選択する。

尿や胃内容物などの水系試料には迅速試験法としてハイドロサルファイトによる呈色反応（2）が使用できる。同じく水系試料の定性及び定量試験法としては、試料を直接または還元処理後に TLC（3-1）または GC/MS（3-2）で試験する方法がある。

血液、食品等については、血液は除蛋白処理をし、尿、ジュース、コーラ、コーヒー、牛乳及びアルコール飲料はそのままの試料から、パラコート及びジクワットをライネック錯体として析出させ、還元後、GC/MSで分析する方法（4-1）や上記の試料から C<sub>18</sub> カートリッジで固相抽出してハイドロサルファイトと反応させて吸光度を測定する方法（4-2）、固相抽出後、HPLCで分析する方法（4-3）がある。また、固相抽出と TLC または GC/MS による分析を組み合わせることも可能である。

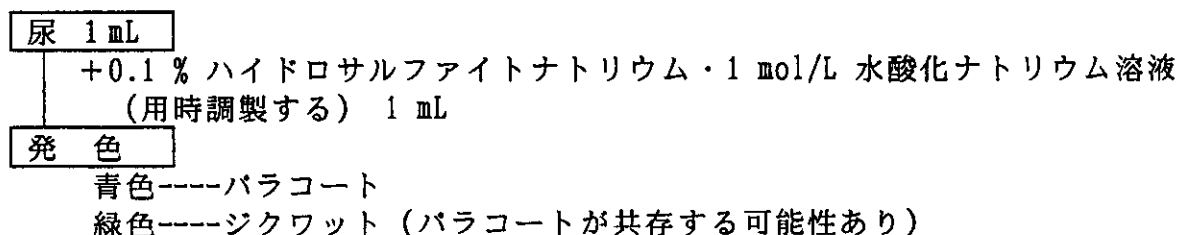
### 2. 試料の色調観察

昭和54年以降、パラコート製剤には着色（青色）、着臭、催吐剤及び苦味剤の添加がされているので、まず、試料の色を観察する。昭和61年以降、毒性軽減のためにパラコートとジクワットの混合製剤（それぞれ5%及び7%含有、青色着色、催吐剤含有）が登場した。ジクワット製剤には催吐剤は添加されていない。

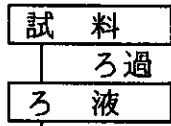
### 3. 水系試料の迅速検出法（ハイドロサルファイトによる呈色反応）

#### 【試験操作】

#### ①尿の場合



## ②胃内容物の場合



以下は，尿に同じ

## 4. 水系試料の定性及び定量法

### 4-1. 薄層クロマトグラフィー

#### [試薬]

##### ①薄層板

- a. アルミナプレート<sup>1)</sup>
- b. シリカゲルプレート (蛍光剤入り)<sup>2)</sup>

##### ② 10 % 水酸化ホウ素ナトリウム溶液：用時調製する

##### ③展開溶媒

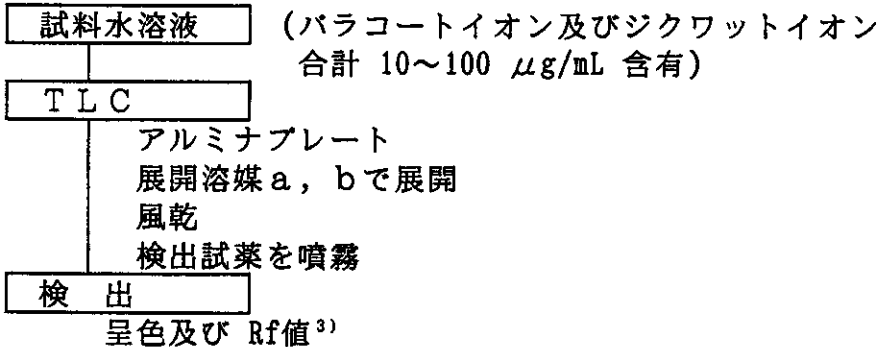
- a. n-プロパノール - 13 % 酢酸アンモニウム溶液 (85:15v/v)
- b. n-プロパノール - n-ブタノール - 20 % 酢酸アンモニウム溶液 (70:20:10v/v)
- c. クロロホルム-メタノール - 28 % アンモニア水 (9:1:0.1v/v/v)
- d. ベンゼン-メタノール - 28 % アンモニア水 (8:2:0.1v/v/v)

##### ④検出試薬

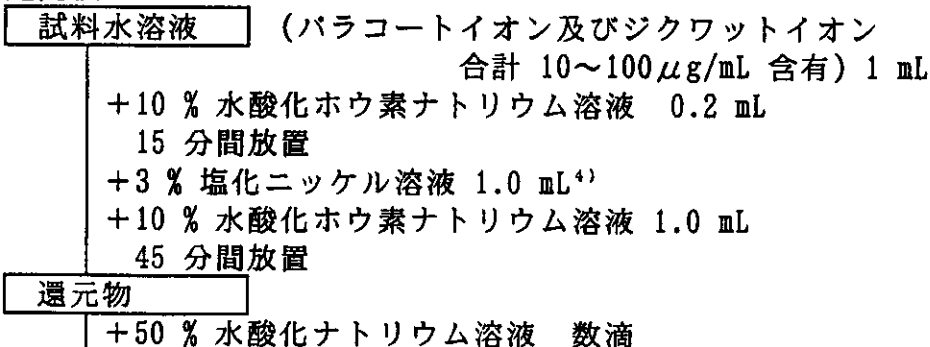
- a. ドラージェンドルフ試液：次硝酸ピスマス 0.85 gに水 40 mLと酢酸 10 mLを加えて溶解した溶液，及びヨウ化カリウム 8 gを水 20 mLに溶解した溶液を作り，それぞれの溶液を混合する。
- b. ヨウ素蒸気

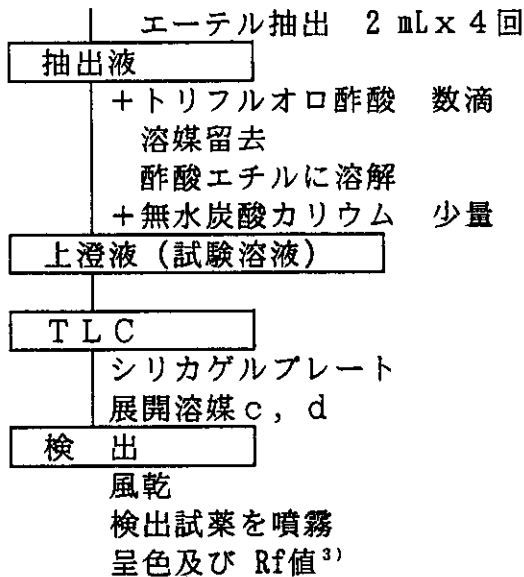
#### [試験操作]

##### ①直接法



##### ②還元法<sup>4)</sup>





注解

- 1) Aluminium oxide 60 F<sub>254</sub> neutral (type E) (Merck)が適している。
- 2) Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck)が適している。
- 3) 直接法及び還元法によるジクワットとバラコートのRf値並びに呈色の関係を表1及び表2に示す。

表1. ジクワットとバラコートのR値

農薬名	直接法		還元法	
	a*	b	c	d
ジクワット (Br塩)	0.16	0.13	0.58	0.40
バラコート (Cl塩, CH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> 塩)	0.18	0.15	0.08	0.07

\*展開溶媒

表2. ジクワットとバラコートの呈色

農薬名	検出試薬	
	a	b
ジクワット (Br塩)	橙色	褐色
バラコート (Cl塩, CH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> 塩)	橙色→灰黒色	褐色

- 4) NaBH<sub>4</sub>還元後にNiCl<sub>2</sub>を添加することにより完全還元物質のスポットをほとんど一つ (trans体) とすることができる。バラコートとジクワットの混合製剤では, 完全還元物質のスポットはそれぞれ一つずつの二つとなる。完全還元物質の構造を図1に示す。
- 5) このとき, 直ちに黒色の沈殿 (ホウ化ニッケル) を生じ盛んに水素を発生する。

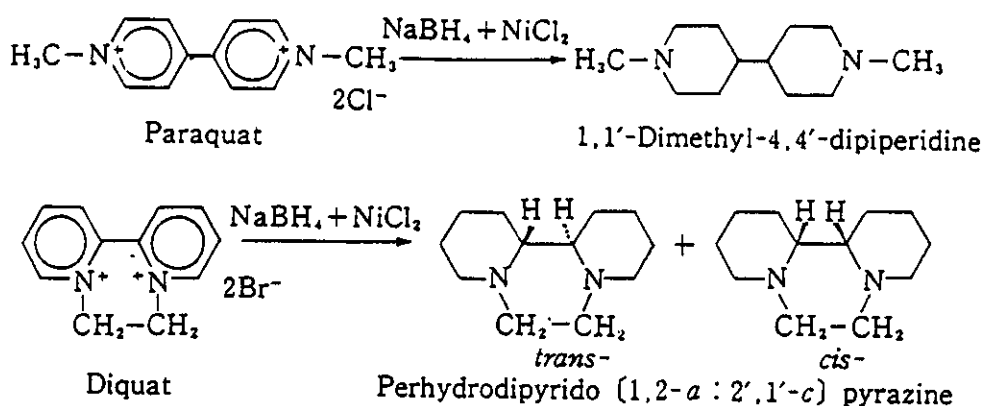


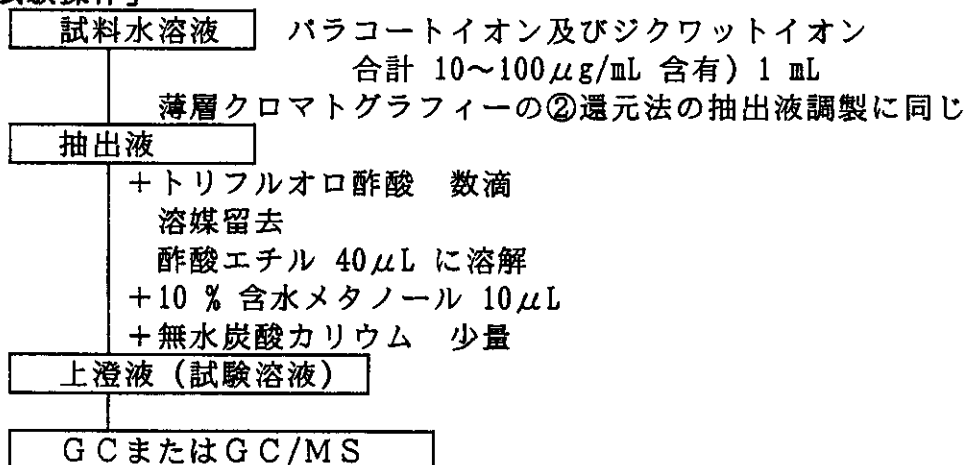
図1. パラコートとジクワットの還元反応

#### 4-2. ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法

##### [装置]

- ①ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器付き
- ②ガスクロマトグラフ/質量分析計

##### [試験操作]



試験溶液 1~2  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフまたはガスクロマトグラフ/質量分析計に注入する。

##### [GC/MS操作条件] (文献2)

- カラム：DB-17 (J & W社製) 長さ30 m, 内径0.25 mm, 膜厚0.25 $\mu\text{m}$
- カラム温度：100  $^{\circ}\text{C}$  - 40  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  - 200  $^{\circ}\text{C}$
- 注入口温度：230  $^{\circ}\text{C}$
- トランスファーライン温度：250  $^{\circ}\text{C}$
- キャリアガス：ヘリウム, 1 mL/min (11psi)
- 注入口モード：スプリットレス
- イオン化法：EI
- イオン化エネルギー：70 eV
- 質量範囲：m/z 40~400
- スキャン速度：1.2 s/scan
- 取り込み開始時間：3 min