

# 水産生物の斃死現象に関する研究 — 1

除草剤 P C P の検出方法、主にサフラニーン  
O 法に対する検討

箕 田 冠 一

## I ま え が き

近次各種産業の発展に伴って水産生物の異常斃死事故が頻発する様になった。就中昭和35年以降例年の如く6・7月頃に発生する一連の異常斃死事故は、その規模の大きさ、発生回数の多さ等従来では想像もつかない異常事態とも云うべきもので大きな社会問題を惹起した。当场では35年以降本斃死問題の解明に尽力して来たが、本報はその最も有力な原因と見做されるに到った農業用除草剤 P C P に対する研究の一環として取上げたものである。

本来本 P C P 剤は優れた防黴殺菌効果の故に主に工業用防腐剤として使用され、又地方病の中間寄生たるミヤイリ貝などの撲滅等にも使用されて来たもので、各試験研究機関の報告によっても、水産生物等に軽視し難い毒性をもつことが明らかなものである。

これが農業用除草剤として登場するや、その普及ぶりは目ざましいものがあり、本県においても35年の使用面積2934haから36年20517ha37年34064ha(37年7月現在)と急激な普及をみた。

一方水産方面では早くから本 P C P の大量使用が水産業に及ぼす影響について関係者間で憂慮されていたが35年以降の事態は、その懸念を実証する様な形に発展して来るに至った。

しかし乍らこの種問題を科学的に解明する段になると各種の技術的な隘路があつて、明確に、誰でも納得出来る結論に達することは極めて困難なことである。

特に本問題においても、水中に微量に溶存する問題の P C P を確実に検出する技術が確立されて居らず、又、斃死事故は際々起るにもかゝらず、筆者らが現場に到着するのは、生物が原因となる悪水塊に接してから致死。発見、通報の経過のあとになるので少くとも数時間経過後となり、悪水塊を捕え得ない等の事情もあつて、原因の化学的立証を一層困難にしている。

この様な状態の中で、P C P の分析方法自体が、今後の各種の試験研究の上からも、実際的な現場調査の必要上からも一つの大きな課題となり、各種の検討を重ねた結果、37年度はサフラニーン

—0法<sup>1)</sup>を変更した改良法を採用するに到った。現在サフラニン—0法自体にもとかくの批判の余地<sup>1)</sup>があるとされているので、當場での検討結果を報告して、参考に供する次第である。

## II 結果及考察

PCPが原因となり天然状態で魚貝類が斃死する場合を想定すると大まかに短時間で斃死が起る場合1 ppm 前後、長時間の場合には0.1~0.5 ppm と云う様な濃度が考えられる。分析方法としては従って0.1 ppm 位までを簡単且つ正確に分析出来ることが望まれた。

従来発表され且つ行われて来た分析方法には主に以下の如きものがある。

- a) メチレンブルー法<sup>1)</sup>
- b) サフラニン—0法<sup>1)</sup>
- c) 銅法<sup>2)</sup>
- d) 4—アミノアンチピリン法<sup>3)</sup>
- e) オーラミン法<sup>4)</sup>
- f) ペーパークロマトグラフ法<sup>5)</sup>
- g) UV法
- h) 生物学的定量法
- i) PH法
- j) その他

これらのa) b) c) d) e)等について予備的に実験した所では、a) は簡便で鋭敏だが不正確、b) 原法では簡便で鋭敏だがやゝ不正確、変法で信憑性を高めることが出来る。d) 前処理に時間がかゝり分析方法も複雑で簡便でない。感度はそれ程高くないが、特異性、再現性に優れている。e) 感度低く低濃度の分析には不適當等の結論を得た。

當場では従来もサフラニン—0法を用いたので、更にこれに検討を加えて使用することゝした。

### 1) サフラニン—0法(原法)

これはW・T・HasKinsが発表したものでHasKinsの方法とも呼ばれ、サフラニン—0が4及び5塩化フェノールとクロロホルム可溶の化合物を作ることを利用したものである。

### 試薬

サフラニン—0水溶液(0.02%)

クロロホルム

重炭酸ソーダ飽和水溶液

### 方法

試料水5ccをとり5ccのクロロホルムと0.5cc重炭酸ナトリウム液を加え、更に0.5ccのサフラニン—0液を加える。15秒間強く振盪してから静置して、水とクロロホルム層の分離をまち、クロロホルム層の赤色着色を520~550mμの波長で光度計で測定定量する。

従来普通に行われていたのは水を50cc、クロロホルムを10ccとし試薬をこれに応じて増量

する変法である。

2) 原法の欠点

我々が原法及び前述の変法で分析して著しく不満を感じたのは次の2点であった。

- (a) 原因不明のバラツキが生じて再現性が悪い。特に供試水の性質が異なる場合にはげしい。
- (b) 正体不明の妨害物があって発色を著しく増大させるらしいこと。

この2点に対して主に検討を加え改良しようとしたのであるが、(a)の点については何しろ加える試薬はサフラニン-OとクロロホルムとNaHCO<sub>3</sub>しかないで、こんな簡単な反応がそうてたために起るはずもなく、当然緩衝剤としてのNaHCO<sub>3</sub>に問題があると見なされた。

そこで各種のPH緩衝剤を用いて広範囲のPH域に於て0 ppm 及び1.0 ppm の試水50ccとクロロホルム10ccで実験した所、第1表の結果が得られた。

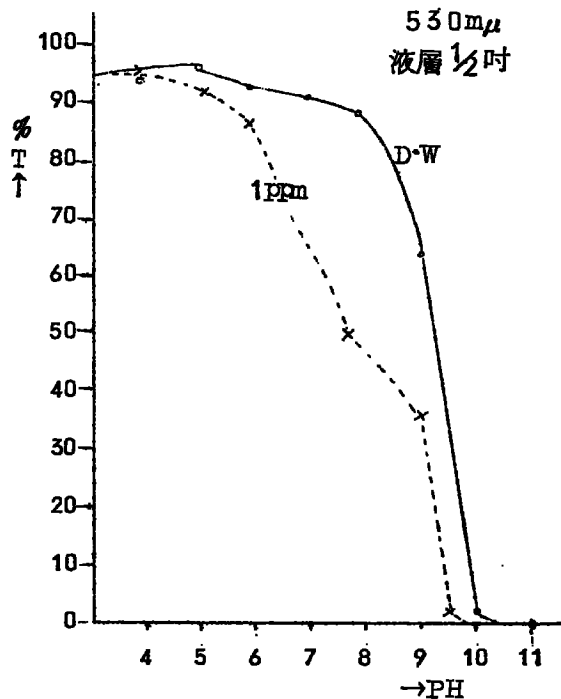
第1表 D.W

№	PH	Buffer Sol	530mμ %T
1	395	酒石酸	94.0
2	504	酒石酸+酢酸ソーダ	95.5
3	604	全上	93.0
4	702	酒石酸+第2リン酸ソーダ	91.5
5	805	酒石酸+酢酸ソーダ	87.5
6	870	重炭酸ソーダ	62.5
7	1007	苛性ソーダ+酢酸ソーダ	1.0
8	1100	全上	0.0

1.0PPm

№	PH	Buffer Sol	530mμ %T
1	407	酒石酸	95.0
2	525	酒石酸+酢酸ソーダ	92.0
3	600	酒石酸+酢酸ソーダ	86.5
4	700	全上	48.0
5	780	全上	35.5
6	895	重炭酸ソーダ	23.0
7	955	苛性ソーダ+酢酸ソーダ	3.0

PHはガラス電極で測定し乍ら調整



第1図 PHとクロロホルム移行色素

これを図上に示せば第1図の通りである。これは明らかにPCPの存在の有無に拘わりなくサフラニン-OはPHの値によってクロロホルム層に移行する事を物語って居り、且つPHの或る範囲即ちサフラニンのクロロホルム層への移行がそれ程多くない範囲では、PCPの存在がサフラニンの移行に大きく作

用していることを示している。

そこで原法では  $\text{NaHCO}_3$  の飽和水溶液を水 50cc に対して 5cc 加えるがこれは極めて大量の  $\text{HCO}_3^-$  の添加であるから PH はかなり高い所 (8 以上) へ行くだろう。そのために Blank にかなり強い着色が出、又試水の差によって僅かに PH が異っても著しく発色に影響することになると考えられる。

ちなみに天然の淡水中で PH の決定に与る因子の最も大きなものは  $\text{CO}_2$  物質及びその解離平衡だとされている。

この結果を検討して PH は 7~8 の間のどこか一点に定めて定量すれば、かりに多少 PH が動いても、発色の誤差は少なく済むと考え、PH を 7.5 に PH メーターと緩衝液で正確に調整して分析する方法をとることとした。

(b) の妨害物についてはこれらの実験を繰り返す内に実験器具の洗滌等に用いている洗剤が著しい妨害物であることが判明した。原法には妨害物としては鉄及びテトラクロロフェノールについてしか記載していないが、洗剤の外、各種の多価脂肪酸等によっても、妨害の起ることが判明して来た。

又この間に PCCP 自体についても、PH が酸性の状態では水から容易に有機溶媒に移行すること、PH を高くすることにより、この逆も簡単に出来ること、又酸性に於ては速やかに水蒸気で蒸溜が可能なことなども判った。

これらの諸点を考慮して原法に変更を加えたがその結果はおおむね、満足すべきものであった。

### 3) サフラニン O 法の変法

#### 試 薬

サフラニン O 0.1% 水溶液

サフラニン O 0.1g を蒸留水にとかし 100cc とする。これに PH 緩衝液を加え PH メーターで 8.5 に調整して、クロロホルム 20cc を加え強く振盪 (50 回位) し、クロロホルムに抽出される色素を除く。この操作を数回繰返すと、実験時の PH 7.50 で Blank に着色するのが少くなる。

クロロホルム ( $\text{CHCl}_3$ )

PH 緩衝液 6)

(a) 第 2 リン酸ソーダ 10% 水溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

(b) クエン酸 1% 水溶液 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

#### 方 法

検水 50cc をビーカーにとりサフラニン O 液 1cc を加え、PH メーターで測定し乍ら PH 緩衝剤で 7.50 に調整する。これを分液ロトに移してクロロホルム 10cc を加え、30 回強く振盪してクロロホルム層に移った赤色を比色する。光度計を使用する場合波長は 520~550m $\mu$  が良い。

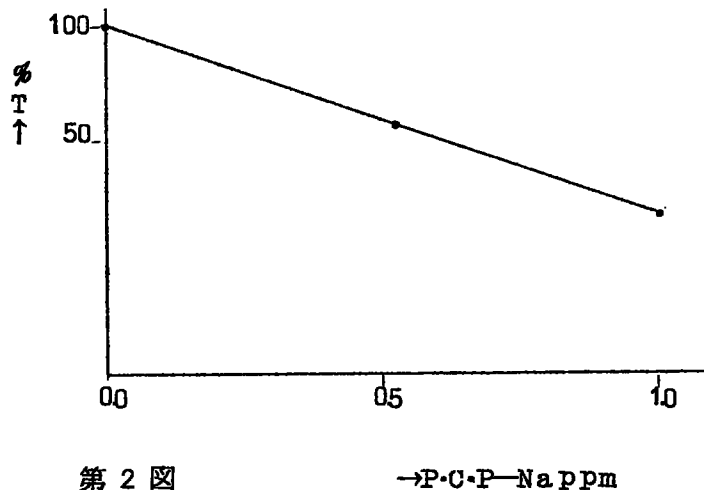
試水中の濃度が非常に稀薄な時は、クロロホルムで濃縮する。これには試水 250cc~500cc をとり 1:1 HCl 2cc とクロロホルム 20cc を加えて強く振盪し(約 50 回)後上水層はすて、20cc のクロロホルムに 0.1% NaOH 20cc を加えて再び強く振盪する。クロロホルム層をすて 0.1% NaOH 層を蒸留水で 50cc にうすめて供試する。あとは前述の方法通りに行えば良い。この方法で最初の試水中の PCP のは 90% 以上は 50cc の水に濃縮回収されている。

#### 4) 変法での実験結果

上記の方法で実験した結果第 2 表の如き結果が得られた。

第 2 表

No.	PCP-Na 濃度		
	0.0 ppm	0.5	3.0
1	92.0%	54.5	34.0
2	91.5	56.0	33.5
3	91.0	53.5	32.0
4	92.0	54.5	32.5
5		53.5	32.0
6			32.0
7			32.5
8			33.0
9			32.5
10			33.0
11			32.0
最大	92.0	56.0	34.0
最小	91.0	53.5	32.0
平均	91.6	54.4	32.6



第 2 図

→P·C·P-Na ppm

これを対数グラフ上に記入すると第 2 図の通りとなる。この場合、濃度は PCP-Na としての濃度である。PCP は保土ヶ谷化学製 93.6% の供試品である。

又、0.05 ppm・0.1 ppm・0.2 ppm の極微量の場合についてさきの濃縮法で回収率をみたが平均して 91%~100% の良好な結果を得た。

### III ま と め

農業用除草剤 PCP に関する研究の一環としてその分析方法特にサフラニン-O 法について研究検討を行い以下の知見を得た。この実験は主に 1962 年 4 月から 5 月にかけて行ったものである。

1) 従来のサフラニン-O 法での欠点の内、再現性の悪い点は PH 緩衝剤として NaHCO<sub>3</sub> を使用する点にあると思料された。

- 2) サフラニン-O法ではクロロホルム層の着色はPHに支配される。
- 3) PCPを含まない試水に於てもPHが8以上になるとPHの増加に伴ってクロロホルム層の着色は著しく増大する。
- 4) PCP定量のためにはPH7~8の間で分析するのが適当と思われる。
- 5) 洗剤その他原法に何等記載のない妨害物が多く見出された。
- 6) PCPはフェノール類の一種としてPHに応じて水中での状態が変わり、この性質を利用し水中から有機溶媒へ、或は逆に移行させることは容易である。
- 7) 又酸性に於て水蒸気蒸溜で容易に溜取出来る。
- 8) これらの諸点を考慮した変法でPCPは0.02 ppm 程度以上の濃度があれば再現性よく検出することが可能である。
- 9) 分析の際妨害物特に著しい影響を及ぼす洗剤等に対する考慮が必要である。

#### IV 文 献

- 1) W, T. Has Kins : Colorimetric Determination of Microgram Quantities of Sodium and Copper Pentachlorophenates. Anal. Chem. Vol 23. No11. Nov 1951. 1672—1674.
- 2) Guy. R. Wallin, High Point, N. C' : Colorimetric Determination of Sadium Pentachlorophenate. Anal, Chem., Vol 22. No9. Sept 1950, 1208—1209.
- 3) 沼田 一 : 衛生化学4, 94, 1956.
- 4) 保土谷化学研究所試験分析課 : オーラミンによるPCPの微量新比色定量法・プリント 1962.
- 5) 沼田 一 : 山梨県立医学研究所報. 第1報. 56—57. 1957
- 6) 藤田秋治 : PH測定の理論と実際, 2版, 南江堂, 京都. 1—176. 1953