ノート

〔衛生化学〕
36 (4) EISEI KAGAKU 338-343 (1990)

—Notes—

生体試料中の8種有機リン殺虫剤の簡易定量法
——中毒実験利用を目的として——

白坂正良,^a 紺野信弘^b

福島県立医科大学付属病院薬剤部,^a 福島県立医科大学公衆衛生学教室^b

A Simple Determination for 8 Kinds of Organophosphorus Pesticides from Animal Tissues
——Application to Toxicological Experiments——

MASAYOSHI SHIRASAKA^a and NOBUHIRO KONNO^b

Pharmacy, Fukushima Medical College Hospital,^a 1, Hikariga-oka, Fukushima 960-12, Japan
and Department of Public Health, Fukushima Medical College,^b 1, Hikariga-oka,
Fukushima 960-12, Japan

(Received December 6, 1989)

A simple determination for eight kinds of organophosphorus pesticides (OPs) from animal tissues was newly developed.

OP was extracted from the sample with acetonitrile, added 2% NaCl solution, and re-extracted with *n*-hexane. The organic layer was loaded to a Sep-Pak silica cartridge and OP retained in the cartridge was eluted with ethyl acetate. The eluate was dried up under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in *n*-hexane and the OP was determined by use of gas chromatograph (GC) equipped with a flame photometric detector (FPD).

When nine OPs were separately added to four tissues (muscle, liver, adipose tissue and blood) of hen at the level of 5 µg per 0.5 g of tissue weight, recoveries of fenitrothion, malathion, fenthion, parathion, cyanofenphos, EPN and leptophos ranged from 79.8% to 96.9%. In the case of cyanophos, recoveries from muscle, liver and adipose tissue were from 83.1% to 91.9%, but recovery from blood was 60.1%. Recoveries of dichlorvos from muscle, liver, adipose tissue and blood were below 18.8%.

These results demonstrate that this simplified method is applicable to the determination of the above eight OPs except dichlorvos from animal tissues.

Keywords—— organophosphorus pesticide; Sep-Pak silica; FPD-GC; animal tissue

緒 言

有機塩素殺虫剤はその化学的安定性のため環境を汚染し、ヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性が指摘され、現在我が国では一部の有機塩素殺虫剤を除き使用禁止となっている。それに代わって近年低毒性で生体内での残留期間も短いと言われている有機リン殺虫剤が広く使用されるようになってきた。しかし dichlofenthion や leptophos などの脂溶性有機

リン殺虫剤は動物体内に比較的長期間残留することが知られている。^{1,2)} また最近、国内外で多用されている低毒性で、殺虫スペクトルの広い fenitrothion (MEP, Sumithion) にも体内残留性のあることが指摘されており、³⁾ このような事実は公衆衛生あるいは衛生化学上見逃せない問題を含んでいる。しかしながら、従来から有機リン殺虫剤は生体内での代謝・分解が速やかであり残留・蓄積性がほとんどないと考えられていたため、動物組織中の有機リン殺

虫剤の簡便な定量法についての報告は数少ない。⁴⁾ また実験動物の臓器や組織を調べる時は、採取できる試料の量が少ない場合が多い。

そこで、著者らは leptophos の定量に開発・考案した分析法⁵⁾を改良し、更に多くの有機リン殺虫剤の定量に利用可能な簡便な方法を考案した。

本法は中毒患者が摂取した農薬が明らかな場合や、実験動物に投与した場合などのように使用した農薬の種類が明確で、その未変化体殺虫剤の体内分布や動態の調査等には特に有用であろう。なお測定機器としては最近高速液体クロマトグラフ (HPLC) の利用も行われているが、⁶⁾今回はリン化合物の検出に特異性が高く、従来から繁用されている FPD 付ガスクロマトグラフを用いることとした。

実験方法

1. 試薬 各有機リン殺虫剤標準品：dichlorvos (DDVP), cyanophos (CYAP), fenitrothion (MEP), malathion, fenthion (MPP), parathion, cyanofenphos (CYP), EPN は和光純薬製の残留農薬試験用を用いた。Leptophos はかつて市販されていた日本農薬製 Phosvel 乳剤からメタノールによる再結晶を繰り返して得た精製品を用いた。なお parathion, CYP, leptophos は我が国では登録が抹消されているが、parathion は GC 保持時間の対照として、また CYP と leptophos は脂溶性を示す OP の代表として今回の実験に用いた。

その他の各種有機溶媒及び試薬：和光純薬製の残留農薬試験用試薬あるいは市販の特級試薬を用いた。

各有機リン殺虫剤標準原液：各有機リン殺虫剤標準品をヘキサン又はアセトンに溶解し 1.0 mg/ml とした。実際の使用時にはこの原液を実験目的及び GC 感度に応じて適宜希釈して用いた。

Sep-Pak silica：Waters 社製、使用前にヘキサン 7 ml を流して充填剤を湿潤させた。一度使用したカートリッジは酢酸エチル 2 ml、次にヘキサン 4 ml を流してから再使用した（ただし 20 回までを限度とした）。

2. 生体試料 無処置単冠白色 Leghorn 種の雌成鶏を屠殺し、取り出して細切した筋肉・肝臓・脂肪組織・血液（全血）は直ちに -20°C で凍結保存し、これを添加回収実験直前に室温に戻し使用した。

3. 機器 ホモジナイザー：日本精機製バイオミキサー BM-1、ガスクロマトグラフ：日立製作所

製 GC-163 型 FPD 検出器付。

4. GC 条件 カラム：5 %OV-1 [Chromosorb WAW 80/100], 3 mm i.d. × 1 m, カラム温度：170°C (250°C), 注入口温度：190°C (280°C), 検出器温度：250°C, ガス流量：窒素 0.6 kg/cm² (1.2 kg/cm²), 酸素 20 ml/min, 水素 140 ml/min.

分析時間及び感度の関係から CYP, EPN, leptophos の回収実験の分析条件は異なるため、その値をカッコ内に記載した。

5. 分析操作法 各組織（筋肉・肝臓・脂肪組織・血液）0.5 g を 10 ml 容試験管にとり、これに有機リン殺虫剤標準原液から調製した各有機リン殺虫剤 5 µg を添加し、攪拌した後、数分間静置した。なお、添加する有機リン殺虫剤の液量は 50 µl とした。つぎにアセトニトリル 2.5 ml を加えてホモジナイズした。ただし脂肪組織の場合にはスパーテルで充分すりつぶした。これを 2000 rpm 5 分間遠心分離し上澄液を得た。上澄液 1.0 ml（血液の場合は上澄液の全量）をキャップ付き試験管（15 ml）に移し、これに 2 %塩化ナトリウム溶液 5 ml、次にヘキサン 2.5 ml を加え試験管を横置きにしたまま振とう機で 10 分間激しく振とうした。これを 2000 rpm 5 分間遠心分離後、上澄液を Sep-Pak silica に通塔し、通過液は廃棄した。このカートリッジに直ちに酢酸エチル 2 ml を流し、溶出液をキャップ付きバイアルに受けた。これを窒素ガス気流下で蒸発乾固させた。残留物にヘキサン 200 µl（血液の場合は 500 µl）

Chart 1. Analytical Procedure for Organophosphorus Pesticide in Tissue Sample

TABLE I. Relative Retention Times and Relative Peak Heights of Investigated 9 Organophosphorus Pesticides on Gas Chromatography

Compound	Other name	Relative retention time		Relative peak height	
		I	II	I	II
DDVP	Dichlorvos, Vapona	0.08		2.64	
CYAP	Cyanophos, Cyanox	0.45		1.40	
MEP	Fenitrothion, Sumithion	0.84		0.78	
Malathion	Malathon	0.93		0.66	
MPP	Fenthion, Baycid	0.96		0.79	
Parathion		1.00	1.00	1.00	1.00
CYP	Cyanofenphos, Surecide	3.40	2.32	0.13	0.63
EPN		5.30	3.26	0.06	0.35
Leptophos	MBCP, Phosvel	6.74	4.03	0.04	0.28

Sample size: 25 ng of each pesticide.

Column: 5% OV-1 (3.0 mm i.d.×1.0 m).

I) Retention time of parathion is 9.80 min.

Peak height of parathion is 35.4% of full scale.

GC condition: temperature, column 170 °C, injection 190 °C, carrier gas flow rate, nitrogen 0.6 kg/cm².

II) Retention time of parathion is 0.38 min.

Peak height of parathion is 88.1% of full scale.

GC condition: temperature, column 250 °C, injection 280 °C, carrier gas flow rate, nitrogen 1.2 kg/cm².

を加えて溶解し、そのうち 5 μ l を用い FPD-GC に注入した。なお抽出・精製の手順を Chart 1 に簡潔にまとめた。

結果及び考察

1. GC 条件と定量性について

今回対象とした parathion を除く 8 種の有機リン殺虫剤は、いずれも我が国で使用量が多いもの、あるいはこれまで生体内残留性が報告されたものである。それらの一般名と商品名及び parathion に対する相対保持時間と相対ピーク高さを Table I に示した。なお CYP, EPN 及び leptophos の 3 種の有機リン殺虫剤の回収実験においては、分析時間短縮並びに分析感度をあげる目的で GC 測定条件を一部変更して行った。

定量範囲は MEP で 2.5—50 ng, その他の殺虫剤では 5.0—50 ng であり、検出限界は DDVP が 0.5 ng, CYAP, MEP 及び malathion が 0.4 ng, MPP 及び parathion が 0.3 ng, CYP が 0.7 ng, EPN が 1.4 ng, leptophos が 2.0 ng であった。

2. 添加回収率の算出法

本法では血液の場合を除き全抽出液の一部 (1.0 ml) を使用しているため最後に得られた値に抽出のため最初に添加したアセトニトリル量 (2.5 ml) の 2.5 を乗じて試料中の最終濃度を求めることとした。組織中の水分が溶媒へ移行すること、あるいは

TABLE II. Recoveries of Nine Organophosphorus Pesticides Added to 4 Tissues

No. Pesticide ^{a)}	Recovery (%) ^{b)}			
	Muscle	Liver	Adipose tissue	Blood
1 DDVP	7.6±4.8	18.8±3.8	11.4±2.8	5.3±2.1
2 CYAP	91.9±3.3	83.1±5.4	83.5±4.1	60.1±8.1
3 MEP	95.2±5.9	92.2±5.7	91.7±5.7	88.7±5.1
4 Malathion	87.0±5.6	83.8±3.9	85.1±4.1	79.8±3.8
5 MPP	82.4±6.8	81.0±3.0	84.7±4.7	80.6±7.3
6 Parathion	92.7±6.2	95.6±3.3	96.9±5.8	92.6±3.5
7 CYP	89.1±1.5	92.0±2.3	87.9±2.7	86.8±4.4
8 EPN	90.4±4.7	94.8±3.3	87.8±7.0	88.8±2.3
9 Leptophos	94.2±3.8	89.0±4.9	88.1±7.6	88.2±3.2

a) Five μ g of each pesticide was added to 0.5 g of chicken tissue.

b) Recovery (%); mean±S.D., n=5.

溶媒の組織への吸着等を考えると全抽出量を正確に定量することは必ずしも容易ではないが、本法では簡易さ、迅速さを旨としたので、あえて最初に加えたアセトニトリル量 2.5 ml を全抽出液量として用いることとした。

3. ニワトリの各組織での添加回収試験

各有機リン殺虫剤 5 μ g を単独でニワトリ各組織 0.5 g に添加し、回収した結果を Table II に示した。

CYAP, MEP, malathion, MPP, parathion, CYP, EPN 及び leptophos では筋肉・肝臓・脂肪組

組織からの回収率は81.0—96.9%と良好な値であった。特に MEP (91.7—95.2%) 及び parathion (92.7—96.9%) が高い値を示した。また血液からの回収率は MEP, malathion, MPP, parathion, CYP, EPN 及び leptophos では 79.8—92.6% と良好な値であった。

leptophos の肝臓及び全血からの回収率は山口の HPLC 分析データ,⁶⁾ 94.3% 及び 92.6% と比較すると若干低い、これは溶媒抽出を繰り返し行うか否かの差によると思われる。

一方、回収率が低かったのは CYAP の血液からの回収の場合 (60.1%) 並びに DDVP の筋肉・肝臓・脂肪組織・血液からの回収の場合 (5.3—18.8%) であった。CYAP の場合、他の組織に比べ血液からの

回収率が20%程度低いとその理由は不明である。DDVP の回収率は組織の種類にかかわらず 18.8% 以下と極端に低かった。後藤ら⁷⁾ は、DDVP が水溶性のため水層からの抽出には多量の食塩を使用し、そして蒸発し易いため溶媒留去の際にはキパーを添加することと述べている。したがって DDVP の分析には今回の簡易定量法は不適当と考えられる。

いずれの有機リン殺虫剤においても血液からの回収率がほかの組織 (筋肉・肝臓・脂肪組織) からの回収率に比べ若干低い値を示した。これはアセトニトリル抽出層のうち血液試料ではその水分量を考慮して全量を、そのほかの組織では 1.0 ml を取り出す操作上の違いに起因するとも考えられる。

なお組織からの実際のクロマトグラムとして Fig. 1 に MEP の例を示した。Fig. 1(A) が MEP の標準品、(B) が MEP 添加肝臓抽出物のクロマトグラムであり、メインピークのほかには不明のピークは一切検出されなかった。

更に今回検討した9種有機リン殺虫剤のクロマトグラムには、筋肉・肝臓・脂肪組織・血液のいずれの場合においても特に不明なピークは認められなかった。

4. 回収率に与える有機リン殺虫剤添加量及び組織量の影響

MEP は使用頻度が高く生体内残留性が指摘されていることから肝臓・脂肪組織・血液各組織に対する添加回収試験を行った。

最初に組織量 (0.5 g) 及び抽出用アセトニトリル量 (2.5 ml) を一定にし、MEP 添加量のみを変化させた時の回収率の成績を Table III の A) に示した。なお組織量/抽出用アセトニトリル量を 0.5 g/2.5 ml にしたのは以下の理由による。

抽出用アセトニトリルの量は転溶させるためのヘキサン量すなわち Sep-Pak silica に負荷されるヘキサン量に影響を与える。また、Sep-Pak silica に負荷するヘキサン量は leptophos に関する実験⁶⁾ などですでに報告されているが、2.5 ml が望ましく、それ以上では負荷した段階ですでに一部有機リン殺虫剤が溶出した。さらに、転溶するヘキサン量が限定されているため、ヘキサン量を 2.5 ml とし、それに対する抽出用アセトニトリルや2%塩化ナトリウム溶液の量を検討し、これらのことから抽出用アセトニトリルの量は 2.5 ml が望ましいと判断した。

試料とする組織量は、動物1個体として考える場合、湿重量で1g以下の臓器・組織は数多くあり、おのずと制約されることになる。また上記 leptophos

Fig. 1. Gas Chromatograms of MEP in Liver

A: standard (50 ng), B: 5 μ g/0.5 g added.

GC condition: column; 5% OV-1 (3 mm i.d. $\times$ 1 m), temperature; column 170 $^{\circ}$ C, injection 190 $^{\circ}$ C, carrier gas flow rate; nitrogen 0.6 kg/cm².

TABLE III. Recoveries of MEP Added to 3 Tissues

Test	Tissue	Tissue weight (g)	Added MEP (μ g)	Recovery (%)
A	Liver	0.5	0.25	94.1 $\pm$ 4.3
		0.5	0.50	86.9 $\pm$ 4.0
		0.5	1.00	94.6 $\pm$ 4.4
		0.5	5.00	92.2 $\pm$ 5.7
	Adipose tissue	0.5	0.25	89.2 $\pm$ 8.1
		0.5	0.50	85.1 $\pm$ 3.2
		0.5	1.00	88.3 $\pm$ 3.2
		0.5	5.00	91.7 $\pm$ 5.7
	Blood	0.5	0.25	82.4 $\pm$ 2.3
		0.5	0.50	82.5 $\pm$ 6.2
		0.5	1.00	89.4 $\pm$ 3.2
		0.5	5.00	88.7 $\pm$ 5.1
B	Liver	0.25	5.00	97.4 $\pm$ 9.0
		0.50	5.00	92.2 $\pm$ 5.7
		1.00	5.00	93.1 $\pm$ 9.2
		1.50	5.00	82.9 $\pm$ 5.0
	Adipose tissue	0.25	5.00	97.2 $\pm$ 6.6
		0.50	5.00	91.7 $\pm$ 5.7
		1.00	5.00	92.3 $\pm$ 5.4
		1.50	5.00	89.8 $\pm$ 3.4
	Blood	0.25	5.00	90.6 $\pm$ 4.6
		0.50	5.00	88.7 $\pm$ 5.1
		1.00	5.00	86.8 $\pm$ 2.0
		1.50	5.00	72.9 $\pm$ 1.6

TEST A: A change of amount of added MEP.

TEST B: A change of tissue weight.

Recovery (%); mean $\pm$ S.D., $n=5$.

Acetonitrile for extraction; 2.5 ml.

phos 実験⁵⁾でアセトニトリル 2.5 ml に対し組織量 0.5 g で良好な回収率が得られていたので、同様に組織量 0.5 g を用いることとした。

今回設定した添加量 0.25—5.00 μ g の範囲では肝臓 (86.9—94.6%), 脂肪組織 (85.1—91.7%), 血液 (82.4—89.4%) のいずれにおいても良好な回収率が得られたため、この範囲では添加量減少に伴う回収率の著しい低下はなかった。しかし、添加量にかかわらず血液試料からの回収率は肝臓及び脂肪組織からの回収率よりもやや低い値を示したが、これは MEP の血清蛋白に対する強い結合率 (bovine serum albumin に対する結合定数 5.6×10^4)⁸⁾ と関係があると考ええる。

つぎに MEP 添加量及び抽出溶媒量を一定にし、組織量を変化させた時の MEP の回収率の成績を Table III の B) に示した。本試験は組織量がどの程度まで増加した時回収率が低下するのを確認し、

實際上抽出用アセトニトリル 2.5 ml に対し組織量をどこまで増加させても本法が適用可能かを検討する目的で行った。

抽出用アセトニトリル 2.5 ml に対する組織重量が増加すると回収率は低下したが、特に組織重量が 1.0 g から 1.5 g に変化した時著しく回収率が変化することがわかった。また、肝臓では 93.1% から 82.9%, 血液では 86.8% から 72.9% へ回収率の低下が見られた。また組織重量が 1.5 g の場合には、試料が血液の場合はホモジネート時に泡が発生し易くなり、肝臓では均等に磨砕されにくくなるので実用的ではなかった。これらの結果から、抽出用アセトニトリル 2.5 ml に対する組織重量は最大でも 1.0 g 以内にとどめることとした。

ま と め

アセトニトリル抽出、2%塩化ナトリウム溶液で希釈後、ヘキサンによる再抽出、次いで Sep-Pak silica による精製と FPD-GC による定量を組み合わせたことにより、動物組織中有機リン殺虫剤を簡単に定量できることがわかった。

今回得られた知見をまとめると以下のごとくである。

1) CYAP, MEP, malathion, MPP, parathion, CYP, EPN 及び leptophos をそれぞれ単独でニワトリ組織 (筋肉・肝臓・脂肪組織) 0.5 g に 5 μ g ずつ添加したとき、81.0—96.9% と良好な回収率が得られた。また血液に添加した場合の回収率は CYAP を除き、79.8—92.6% であった。CYAP の血液からの回収率は 60.1% とやや低かった。一方、DDVP は他の有機リン殺虫剤と異なり、その添加回収率は筋肉・肝臓・脂肪組織及び血液いずれの場合においても 18.8% 以下と著しく低かった。

2) 有機リン殺虫剤添加量が回収率におよぼす影響をみるため MEP を 0.25—5.00 μ g の割合で一定量の肝臓・脂肪組織・血液に添加し、回収率を求めた結果、肝臓で 86.9—94.6%, 脂肪組織で 85.1—91.7%, 血液では 82.4—89.4% であった。

3) MEP 添加量及び抽出用アセトニトリル量を一定 (5.0 μ g, 2.5 ml) として組織重量 (肝臓・脂肪組織・血液) を変化させ、MEP の抽出効率にどのような影響を与えるかを検討した結果、組織重量が 1.5 g になると肝臓や血液では回収率が著しく低下した。抽出用アセトニトリル 2.5 ml に対しては組織重量を 1.0 g 以下にすると良好な回収率が得られた。

以上より、今回検討した簡易定量法は DDVP を除

き，上記8種の有機リン殺虫剤の生体試料からの抽出-定量を簡便・迅速に行える実用的な方法と考える。

謝辞 本稿を終えるにあたり，研究の機会を与えて戴いた福島県立医科大学公衆衛生学教室福島匡昭教授に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) J.E. Davies, A. Barquet, V.H. Freed, R. Haque, C. Morgade, R.E. Sonneborn, C. Vaclavek, *Arch. Environ. Health*, **30**, 608 (1975).
- 2) 紺野信弘，木根渕英雄，山内 徹，日本公衛誌，**24**，507 (1977).
- 3) 山中すみへ，西村正雄，島田悦子，吉田 稔，山村行夫，日衛誌，**42**，405 (1987)；山中すみへ，中毒研究，**1**，39 (1988).
- 4) A.F. Machin, M.P. Quick, *Analyst* (London), **94**, 221 (1969).
- 5) 紺野信弘，日衛誌，**34**，580 (1979)；N. Konno, K. Katoh, Y. Yamaguchi, T. Yamauchi, M. Fukushima, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 653 (1986).
- 6) 山口靖明，日衛誌，**43**，1159 (1989).
- 7) 後藤真康，加藤誠哉，“増補残留農薬分析法”，第1版，ソフトサイエンス社，東京，1987，pp.113—115.
- 8) V.H. Freed, R. Haque, D. Schmedding, R. Kohnert, *Environ. Health Perspect.*, **13**, 77 (1976).