環境水、飲料及び人尿中のジクロロボス、トリクロロホン及びその代謝物の分析について

片木宗弘,^a 土橋 均,^a 花田佐代里,^b

神森博恵,^b 大槻一夫^b

大阪府警科学捜査研究所,^a 近畿大学薬学部^b

Determination of Dichlorvos, Trichlorfon and Their Metabolites and Degradation Products in Environmental Water, Drinks and Human Urine

MUNEHIRO KATAGI,^a HITOSHI TSUCHIHASHI,^a SAYORI HANADA,^b

HIROE JINMORI^b and KAZUO OTSUKI^b

Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters,^a 1-3-18, Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^b 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka 577, Japan

(Received March 22, 1993)

A systematic analytical procedure for dichlorvos (DDVP) and trichlorfon (DEP), organophosphorus pesticides, and furthermore for desmethyl dichlorvos (DM-DDVP), desmethyl trichlorfon (DM-DEP), dimethyl phosphate (DMP) and monomethyl phosphate (MMP), their metabolites and degradation products, was investigated.

From the environmental water, drinks and human urine, after salting-out, only DDVP was first extracted with *n*-hexane and then the others were extracted with acetonitrile-diethylether (1:1, v/v) at about 1 N by HCl.

TLC was performed on silica-gel plate using acetonitrile-water (85:15, v/v) and *iso*-propanol-water-28% ammonium hydroxide (75:24:1, v/v) as development systems. By colorations with 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP) and *o*-tolidine, they were relatively well detected.

It was possible to determine DEP, DM-DDVP, DM-DEP, DMP and MMP by FID-GC and GC-MS after trimethylsilyl derivatization of them with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). The detection limits of their aqueous solution were 0.1–3 µg/ml by FID-GC and 0.2–10 µg/ml by scanning mode GC-MS. The coefficients of variation for their spiked urine sample by GC analysis in this way were 2.7–7.6% at 50 µg/ml, respectively.

Keywords — DDVP; DEP; metabolites degradation products; trimethylsilyl derivatization; TLC; GC

緒 言

有機リン系農薬ジクロロボス (DDVP) 及びトリクロロホン (DEP) は、防疫用及び家庭用殺虫剤として多く用いられ、入手が比較的容易であることから、これらを用いた毒物混入事件、中毒事故は多く、いずれも裁判化学の毒物の中でも重要なものの一つとされている。¹⁾

DDVP 及び DEP は、いずれも 5 価のリン原子を中心に持った有機リン酸エステル類であり、アルカリ性においては非常に加水分解され易く、^{2,3)} 酸性や中性領域でも不安定であるほか、光あるいは熱によっても比較的分解され易く、いずれの場合も, desmethyltrichlorfon (DM-DEP), desmethyldichlorvos (DM-DDVP), dimethylphosphate (DMP), monomethylphosphate (MMP) 等に分解される。^{4,5)}

また動物体内においても Fig. 1 に示すように、フォスファターゼ等の酵素により速やかに DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP 等に代謝され、糞尿中へ排泄される。⁵⁻⁸⁾ そのため、これら農薬の使用が疑われる場合でも未変化体が検出されない場合がしばしばある。また DEP は、体内又はアルカリ性下で容易に脱塩酸して DDVP に変化する。⁸⁻¹⁰⁾ したがって、DDVP 及び DEP の分析においてはそれぞれの代謝、分解も考慮した分析が必要とされる。さらに、これらの代謝、分解物である尿中アルキルリン酸 (DMP 及び MMP) は、有機リン化合物の暴露がないヒトには検出されないため、¹¹⁾ 尿中アルキルリン酸の分析^{12,13)} は、もとの農薬原体の特定には至らない場合においても、有機リン系農薬摂取の大きな手掛かりとなり得る。

通常有機リン系農薬の分析は、試料から有機溶媒抽出^{2,3,14)} あるいは固相抽出^{15,16)} 等により抽出後、薄層クロマトグラフィー (TLC)、^{3,17)} ガスクロマトグラフィー (GC)、^{3,18-20)} 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、^{21,22)} ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS)^{23,24)} 等により未変化体を検出する方法がとられ、DDVP 及び DEP についても多数の報告が見られるが、^{25,26)} 特に DEP は、GC 中で分解あるいはカラムへ吸着されるため¹⁸⁾ 分析の困難なものとされ

ている。さらに、これらの代謝、分解物も含めた分析は、主として農作物、畜産物などの残留農薬分析法としていくつか報告されているが、^{27,28)} 環境水、飲料あるいは尿等の試料について、DEP 及び DDVP の両者を合わせた、代謝、分解物の裁判化学分野における系統的分析法の報告は少ない。^{29,30)}

そこで今回、代謝、分解物からの DEP 及び DDVP の使用証明を目的とし、DEP、DDVP の主代謝、分解物のうち、DM-DEP、DM-DDVP、DMP、MMP について、DEP 及び DDVP も含めて、2 段階の抽出法を用いた系統的分析法を検討した。

実験材料と方法

1. 試薬 MMP 及び DMP (純度 94%) は東京化成製、DEP (純度 99% 以上)、DM-DEP、DM-DDVP はいずれも日本バイエルアグロケムより供与されたもの、DDVP (純度 99% 以上) は日本化学工業より供与されたものを用いた。N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) は和光純薬製、pentafluorobenzylbromide (PFBBBr) は東京化成製、N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) はジーエルサイエンス社製、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

2. 試料の調製 DEP、DM-DEP、DDVP、

Fig. 1. Main Metabolic Pathways of DEP and DDVP in Mammals

Chart 1. Analytical Procedure for DEP, DDVP and Their Metabolites and Degradation Products

DM-DDVP, MMP, DMP はいずれも 100 mg/ml のアセトン溶液を用時作成し、蒸留水、自宅の池の水、ジュース等の飲料、健康人の尿等に添加し調製した。

3. 内部標準溶液の調製 *n*-decane (C_{10}) を *n*-ヘキサンに溶解し、10 mg/ml の濃度となるように調製し、DDVP 測定用の内部標準溶液とした。また、*n*-undecane (C_{11}) 及び *n*-tetradecane (C_{14}) をアセトニトリルに溶解し、10 mg/ml の濃度となるように調製し、trimethylsilyl (TMS) 誘導体測定用の内部標準溶液とした。

4. 装置及び測定条件 TLC 薄層板：Merck 社製 Silica gel 60 F 254 (0.25 mm 厚)，展開溶媒：1) *n*-ヘキサン-アセトン (3:1, v/v)，2) アセトニトリル-水 (85:15, v/v)，3) イソプロパノール-水-28%アンモニア水 (75:24:1, v/v)，検出法：a) 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine-tetraethylenepentamine (NBP) 試薬，¹⁷⁾ b) *o*-tolidine。³⁾

GC 装置：島津 GC-14 A 型 (検出器：FID)，注入口温度：220°C，検出器温度：220°C，カラム：DB-1 (J & W 社製)，0.32 mm i.d.×30 m，膜厚 0.25 µm，カラム温度：60°C—75°C (昇温速度 3°C/min) —200°C (昇温速度 5°C/min)，線速度：50 cm/sec，スプリット比：25 対 1，キャリアーガス：ヘリウム。

GC-MS 装置：島津 GCMS QP-1100 EX，イオン化電圧：70 eV，イオン源温度：270°C，注入口温度：220°C，カラム：DB-1 (J & W 社製)，0.32 mm i.d.×30 m，膜厚 0.25 µm，カラム温度：60°C—75°C (昇温速度 3°C/min) —200°C (昇温速度 5°C/min)，線速度：50 cm/s，スプリット比：25 対 1，キャリ

アーガス：ヘリウム

5. 分析法 試料 1 ml に塩化ナトリウム 300 mg を添加し、*n*-ヘキサン 1 ml を加えて DDVP を抽出、*n*-ヘキサン層を分取し、TLC あるいは内部標準溶液 (C_{10}) 2 µl を加えて GC、GC-MS の試料とした。さらに、DDVP 以外のもの (DEP, DM-DDVP, DM-DEP, MMP, DMP) については、残った水層を 5 N 塩酸で約 1 N とした後、アセトニトリル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) 1 ml で二度抽出し、有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後バイアル瓶に取り、窒素気流下蒸発乾固し、TLC あるいは TMS 化の試料とした。TMS 誘導体化は、蒸発残渣に BSTFA を 100 µl 加えて 40°C で 30 分加熱し、反応終了後内部標準溶液 (C_{11} 及び C_{14}) 2 µl を加えて GC、GC-MS の試料とした。(Chart 1 参照)

結果及び考察

1. DEP, DDVP 及びその代謝、分解物の TLC

DEP, DDVP, DM-DDVP, DM-DEP, MMP, DMP について、シリカゲル薄層板を使用した TLC の検討を行った。DDVP, DEP 及びその代謝、分解物はほとんど UV 吸収を有しないため、検出には、有機リン系農薬に対して感度の良い NBP 試薬¹⁷⁾ 及び含塩素化合物に対して高感度の *o*-tolidine³⁾ を用い、3 種類の展開溶媒を用いて検討した。Table I に示すように、DEP 及び DDVP のような未変化体の分析には、通常農薬検査に用いられる *n*-ヘキサン-アセトン系¹⁷⁾ は比較的分離も良く利用可能であるが、分解物も含めた分析においてはアセトニトリル

-水あるいはイソプロパノール-水-28%アンモニア水系が比較的分離も良く、代謝、分解物も同時に分析出来るという点ですぐれていた。

検出限界は、NBP 試薬を用いた場合、DEP が 0.05 μg , DDVP が 0.02 μg , DM-DEP が 10 μg , DM-DDVP が 5 μg , MMP が 50 μg , DMP が 10 μg , *o*-tolidine を用いた場合 DEP が 0.5 μg , DDVP が 1 μg , DM-DEP が 2 μg , DM-DDVP が 5 μg と比較的良好であった。なお、MMP, DMP は塩素原子を有しないため、*o*-tolidine では呈色しなかった。

2. 直接溶媒抽出法-GC による分析

DDVP, DM-DDVP, DEP, DM-DEP, MMP, DMP について各水溶液からの抽出法を検討した。これらのうち DDVP は、特に沸点が低く蒸気圧が高いため、抽出後の溶媒留去により溶媒とともに一部蒸散、散逸することが考えられる。そこで 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DDVP 水溶液 1 ml を *n*-ヘキサン 1 ml で抽出後、窒素気流下で蒸発乾固したものと 30°C で減圧留去したものについて、その散逸量を調べたところ、前者の場合で約 30% が、後者の場合で約 40% が揮散した。そこで、残留農薬分析法等に記載のとおり、ジエチレングリコールをキーパーとして添加し³⁴⁾ 散逸量を測定したが、いずれもほとんど改善されなかった。そこで、*n*-ヘキサンを抽出溶媒として用いれば DDVP 以外のもの (DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP) が抽出されないことを利用し、DDVP のみ *n*-ヘキサンで先に抽出し、TLC に利用する場合等必要以外濃縮はさし控えることとした。

DDVP 以外のもの (DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP) については各試料を水に添加して 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液とし、この水溶液について各種抽出条

件を検討した。

1) 抽出溶媒の検討 抽出溶媒として *n*-ヘキサン, ジクロロメタン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, アセトニトリル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を用い、試料水溶液を 5 N 塩酸で約 1 N に調整し、塩化ナトリウムを飽和量加えて抽出後、本法に従い TMS 誘導体化し、GC により抽出率を求め抽出溶媒の検討を行った。DMP, MMP は水溶性が非常に高いため、いずれの溶媒を用いても抽出率は低いものの、抽出溶媒として、アセトニトリル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を用いる場合が最も良好な抽出が得られ、DMP (60%), MMP (28%) 以外はいずれも 93% 以上の高い抽出率が得られた。

2) 抽出 pH の検討 試料水溶液を約 1 N (5 N 塩酸で調整), pH 2, 4, 6 (10 mM リン酸緩衝液で調整) とし、塩化ナトリウムを飽和量加え、抽出溶媒としてアセトニトリル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を用いて抽出し、同様にして回収率を調べたところ、Fig. 2 に示すように 5 N 塩酸で約 1 N に調整し抽出した場合に最も良好に抽出された。

3) 塩化ナトリウムによる塩析効果 試料水溶液を 5 N 塩酸で約 1 N に調整し、塩化ナトリウムを飽和量添加したものと及び添加しないものについて、抽出溶媒としてアセトニトリル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を用いて抽出し同様にして回収率を調べたところ、塩化ナトリウムを添加した場合、塩析効果により、いずれの化合物も、無添加の場合と比べて、約 30% 前後回収率が高くなった。

3. TMS 誘導体化-GC による分析

1) 誘導体化試薬の検討 DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP 各 50 μg に各種誘導体化試薬を加え、これらの反応性について、GC により検

TABLE I. Thin Layer Chromatography of DEP, DDVP and Their Metabolites and Degradation Products on Merck Silica Gel 60 F-254 Plates

Compound	Color with chromogen		Detection limits (μg)		R _f values ($\times 100$) for development systems ^{a)}		
	NBP ^{a)}	<i>o</i> -Tolidine ^{b)}	NBP	<i>o</i> -Tolidine	1	2	3
DEP	Blue	Greenish brown	0.05	0.5	6	82	76
DM-DEP	Blue	Greenish brown	10	2	0	41	61
DDVP	Blue	Greenish brown	0.02	1	33	90	77
DM-DDVP	Blue	Greenish brown	5	5	0	56	70
DMP	Blue	None	10	n.d.	0	18	48
MMP	Blue	None	50	n.d.	0	13	10

a) A: 2% 4-*p*-nitrobenzylpyridine in acetone, B: 10% tetraethylenepentamine in acetone; spray with A and heat plate for 15 min at 110°C, and then spray with B.

b) 0.5% *o*-tolidine in ethanol; spray and irradiate with UV.

c) 1=*n*-hexane-acetone (3:1); 2=acetonitrile-water (85:15); 3=*iso*-propanol-water-28%ammonium hydroxide (75:24:1).

Fig. 2. Effect of pH on Extraction

—○—; DEP, —□—; DM-DEP, —■—; DM-DDVP, —●—; DMP, —▲—; MMP.

討を行った。今回分析対象とした試料は、その構造中にリン酸基あるいは水酸基由来の—OH基を持つため、誘導体化試薬としてジアゾメタン、PFBBBr, BSTFA, MTBSTFAを用いてこれら—OH基を誘導体化することを検討した。これらの誘導体化には一般的にジアゾメタンが良く利用されるが、^{27,31)}その場合、デスメチル体がメチル化されて、もとの未変化体に戻ってしまうほか、試薬の量あるいは反応時間によっては副反応が起こる³¹⁾ため不適当と考えられた。またPFBBBr^{12,30)}は、本条件下(40°C, 30 min)では反応がほとんど進まなかった。そこでBSTFAとMTBSTFAを用いて誘導体化試薬の検討を行った。BSTFAを用いた場合、いずれも反応が速やかに進行した。一方、MTBSTFAを用いた場合MMP, DMP, DM-DDVPでは感度がBSTFAより優れていたが、DEP及びDM-DEPでは立体障害のためか反応が進行し難かった。そこで、迅速性、簡便性という意味からも、誘導体化試薬としては、いずれも反応が速やかに進行するBSTFAが最も良好と考えられ、BSTFAでTMS化することとした。

2) TMS化条件の検討 DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP各50 µgに誘導体化試薬としてBSTFAを加え、種々の反応条件についてGCにより検討した。

① 反応温度の検討 — 各試料にBSTFAを100 µl加えて30, 40, 50, 60°Cの各反応温度で30分間誘導体化後、内部標準溶液(C₁₁及びC₁₄)を加え、各反応温度における各々のTMS誘導体の内部標準

物質に対するピーク面積比(MMP及びDMPはC₁₁に対する、DM-DDVP, DEP及びDM-DEPはC₁₄に対する面積比)より、各誘導体生成量を比較した。その結果、いずれの温度でも生成量にほとんど差はなく、反応温度は操作性の良い40°Cとした。

② 反応時間の検討 — 各試料にBSTFAを100 µl加えて40°Cで誘導体化を行い、10, 20, 30, 60, 90, 120分後のTMS誘導体の生成量を同様に比較したところ、いずれの試料も反応時間の経過と共に徐々に生成量が増加し、約30分以後生成量に差異はほとんど認められなくなった。そこで反応時間は30分とした。

③ BSTFAの添加量の検討 — 各試料にBSTFAをそれぞれ10, 20, 50, 100 µlを加えて40°Cで30分間誘導体化を行い、TMS誘導体の生成量を同様に比較したところ、BSTFAの添加量の増加と共に生成量も増加し、BSTFA添加量が約50 µl以上で各誘導体の生成量に差異はほとんど認められなくなった。そこでBSTFA添加量は100 µlとした。

④ 反応促進剤の添加について — TMS誘導体化反応には、ピリジン、ジメチルホルムアミド、トリメチルクロロシラン(TMCS)等が触媒として用いられることが多い。^{32,33)}そこで今回、100 µlのBSTFAにこれらを触媒としてそれぞれ1, 10, 50, 100 µl添加し、各誘導体生成量をBSTFAのみ添加

Fig. 3. Total Ion Chromatogram (TIC) and Mass Chromatograms of TMS Derivatives of DMP, MMP, DM-DDVP, DEP and DM-DEP

1; DMP, 2; MMP, 3; DM-DDVP, 4; DEP, 5; DM-DEP.

Fig. 4. Mass Spectra of TMS Derivatives of DMP, MMP, DM-DDVP, DEP and DM-DEP

したものと比較した。しかし、いずれの場合も触媒添加による生成量の増加は認められず、むしろピリジンを $10 \mu\text{l}$ 以上加えた場合には、ピリジンの塩基性のためか、反応中に DEP の脱塩酸によると推定される DDVP の生成が認められた。そこで、反応には BSTFA のみ加えることとした。

4. TMS 誘導体化-GC-MS による分析

DDVP を除く $100 \mu\text{g/ml}$ 濃度の各標準試料水溶液について、本法に従い抽出後 TMS 誘導体化し、GC-MS を行った。通常 TMS 誘導体のマススペクトルは、分子からメチル基が脱離した (M-15) のフラグメントイオンピークがベースピークあるいはそれに匹敵する強度のピークとなることが多い。³⁵⁾ 今回の場合も、いずれの TMS 誘導体も、分子イオンピーク (M^+) は DM-DDVP, DMP, MMP で僅かに観察される程度であり、比較的弱い強度であるが、TMS 誘導体の特徴である (M-15) のピークがいずれも良好に観察された。このピークを各誘導体の選定イオン (DMP は m/z 183, MMP は m/z 241,

DM-DDVP は m/z 263, DEP は m/z 313, DM-DEP は m/z 371) としたマスプロットグラムを Fig. 3 に、各誘導体のマススペクトルを Fig. 4 に示す。

なお、DDVP は誘導体化せずに分析できるため、示さなかった。

5. 定量性の検討

池の水に DDVP 以外の各試料を添加し、本法に従い TMS 誘導体とし GC により分析を行い定量性について検討を行ったところ、Fig. 5 に示すように DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP のいずれも $5\text{--}100 \mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性が得られた。また各試料濃度が $50 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した尿試料を用いた本法による 5 回分析の繰り返し精度は、いずれも変動係数が $2.7\text{--}7.6\%$ と比較的良好であった。

なお、DDVP についても本法に従い分析を行ったが、定量性、再現性共に良好であった。

6. 検出限界

各試料水溶液について、段階的に低濃度のものを

Fig. 5. Calibration Curves for TMS Derivatives of DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP and MMP

—○—; DEP, —□—; DM-DEP, —■—; DM-DDVP, —●—; DMP, —▲—; MMP.

TABLE II. Detection Limits of DEP, DDVP and Their Metabolites and Degradation Products by FID-GC and GC-MS

	Detection limits (μg/ml)	
	GC-MS	FID-GC
DEP	1	0.1
DM-DEP	10	1
DDVP	0.5	1
DM-DDVP	3	0.5
DMP	0.2	1
MMP	0.5	3

作成し、本法により GC 及び GC-MS により分析を行い、その検出感度を検討した。GC においては、各 TMS 誘導体及び DDVP のピークが確認できる最少量 ($S/N=3$) を、また GC-MS においては各 TMS 誘導体及び DDVP のマススペクトルが得られる最少量 ($S/N=3$) をスキャンモードにおける検出限界とした。本法における各試料水溶液の検出限界は、

Fig. 6. Gas Chromatograms of TMS Derivatives of Extracts from Various Samples

A; Spiked Water, B; Unspiked Urine, C; Unspiked Water of a Pond. 1; DMP, 2; I.S. (C_{11}), 3; MMP, 4; DM-DDVP, 5; I.S. (C_{14}), 6; DEP, 7; DM-DEP.

Table II に示すように、GC で $0.1\text{--}3\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、GC-MS のスキャンモードで $0.2\text{--}10\text{ }\mu\text{g/ml}$ であり、GC-MS の場合、各 TMS 誘導体は、DMP 及び MMP 以外は (M-15) のピーク強度が比較的弱いいため、FID-GC に比較して検出感度は低いものとなった。

7. 尿等実際試料への添加回収実験

池あるいは河川への投棄、飲料への混入、自殺目的等による摂取を想定し、池の水、アップルジュース、健康人の尿に各試料を濃度が $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、本法に従い分析を行った。

n -ヘキサン抽出液については、クロマトグラム上で DDVP の妨害となるようなピークは認められなかった。また、TMS 誘導体化後の反応液についても、Fig. 6 に一部示すようにいずれの場合においてもクロマトグラム上で妨害となるピークは認められなかった。

TABLE III. Recoveries from Various Spiked Samples

	Added (μg/ml)	Percentage of recoveries (%)		
		Apple juice	Water of a pond	Urine
DEP	50	94.2 ± 2.93	99.8 ± 2.82	88.2 ± 2.98
DM-DEP	50	91.3 ± 3.35	92.3 ± 3.01	35.6 ± 2.57
DDVP	50	92.3 ± 2.75	94.1 ± 2.88	92.1 ± 3.08
DM-DDVP	50	92.9 ± 3.24	90.1 ± 3.05	90.0 ± 3.91
DMP	50	60.3 ± 3.75	58.5 ± 3.28	58.7 ± 3.33
MMP	50	27.3 ± 1.61	26.6 ± 1.62	27.9 ± 1.65

($n=3$)

さらに、各試料を濃度が $50 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し本法に従い分析を行い、GC により回収率を測定したところ、Table III に示すように、水溶性の非常に高い DMP, MMP 及び尿試料での DM-DEP については、尿の常成分との副反応のためか、やや低い回収率であったが、それ以外はいずれも 90% 前後の良好な回収率が得られた。

8. 水中 DEP 及び DDVP の分解物測定への本法の適用

DEP 及び DDVP は水中においても分解し易く、環境水、プールの水、飲料に混入された場合でも、未変化体が検出されない場合がしばしばあり、水中での安定性、分解性を検討、考慮する必要がある。そこで今回、pH 2.0 塩酸水溶液、pH 6.9 リン酸緩衝液、pH 9.1 ホウ酸緩衝液に、DDVP, DEP を各 1 mg/ml の濃度になるように添加し、 30°C の恒温層で静置し、これらの試料溶液を日数の経過と共に採取し本法に従い、DEP 及び DDVP の経時変化を検討した。Fig. 7 に示すように、DEP, DDVP いずれも中性及びアルカリ性では分解が速く、中性では約

7 日間、アルカリ性では約 4 日間でいずれも完全に分解し、DMP 及び少量の MMP 及び DM-DDVP となった。DEP は酸に対して比較的安定であり、35 日後でも若干分解する程度であるが、DDVP は pH 2 では約 35 日で完全に分解し、DM-DDVP, DMP, MMP となり、特に DM-DDVP の増加は顕著なものであった。

また、DEP は、pH 2 ではほとんど DDVP に分解しないが、中性及びアルカリ性では、宮本らの報告⁹⁾に見られるように容易に DDVP に分解した。これらの結果からも、特に DDVP が池の水やプールの水あるいは飲料に混入された場合、あるいは自殺等の目的で摂取した場合には、経過日数によっては DDVP がすべて分解し、未変化体が検出されないということが考えられ、そのような場合には、DM-DDVP, DMP, MMP 等の代謝、分解物の分析が必要と考えられる。さらに、DEP は、飲料等の中でも脱塩酸して DDVP に分解するため、DDVP が検出された場合でも、DEP の分解による生成を十分に考慮に入れて判定する必要があると思われる。また今回は、pH

Fig. 7. Time-Course of DDVP, DEP and Their Degradation Products at Various pH
 $\triangle$ —; DDVP, $\circ$ —; DEP, $\blacksquare$ —; DM-DDVP, $\bullet$ —; DMP, $\blacktriangle$ —; MMP.

の影響のため一度生成した DM-DEP がさらに分解するためか、DM-DEP は検出されなかったが、特に尿等の生体試料あるいは弱酸性条件下では、DM-DEP が検出されることが考えられるため、試料から DDVP が検出され DEP が検出されない場合でも、本法により DM-DEP を検出することで、DDVP が DEP 由来のものであることが証明可能と思われる。

結 語

有機リン系農薬 DDVP, DEP について、その代謝、分解物も含めた分析法を検討した。TLC においては、シリカゲル薄層板を用い、展開溶媒としてアセトニトリル-水 (85:15, v/v) 及びイソプロパノール-水-28%アンモニア (75:24:1, v/v) を、また検出試薬として NBP 試薬及び *o*-tolidine を用いることにより、分解物も含めて比較的良好な分離及び検出感度が得られた。

さらに BSTFA を誘導体化試薬として用い、40°C で 30 分間反応させ、DEP, DM-DEP, DM-DDVP, DMP, MMP を TMS 誘導体とすることで GC, GC-

MS により、確認、同定することが可能であった。DEP, DDVP は分解され易く、環境水あるいは胃内容物、尿、血液等の生体試料では、未変化体が検出されない場合があり、さらに DEP は、池の水等の中でも脱塩酸して DDVP に分解するため、DDVP が検出された場合でも、DEP の分解による生成を十分に考慮に入れて判定する必要がある。そのような試料の場合でも、本法により DM-DEP を検出することにより DEP の使用証明が、また DM-DEP が検出されない場合でも DM-DDVP を検出することで、DEP あるいは DDVP のいずれか又は両方の使用の可能性が示唆される。さらに、分解が進んで、DMP 及び MMP しか検出されない場合でも、有機リン系農薬の使用証明あるいは推定が十分可能と考えられる。

謝辞 本研究を行うに当たり、DEP, DM-DEP, DM-DDVP を供与下さった日本バイエルアグロケム株式会社及び DDVP を供与下さった日本化学工業株式会社に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) 科学警察研究所編, “薬物による中毒事故等の発生状況,” 第 1 報—第 33 報, 科学警察研究所, 東京, 1952—1991.
- 2) 後藤真康, 加藤誠哉, “残留農薬分析法,” ソフトサイエンス社, 東京, 1980, pp.75—108.
- 3) 日本薬学会編, “薬毒物化学試験法と注解,” 南山堂, 東京, 1992, pp.331—348.
- 4) V. Drevenkar, K. Fink, M. Stipcevic, B. Tkalcevic, *Arh. Hig. Rada*, **27**, 297 (1976).
- 5) W. Dedek, W. Georgi, R. Grahl, *Biochem. Physiol. Pfl.*, **174**, 707 (1979).
- 6) S.M.A.D. Zayed, A. Hassan, I.Y. Mostafa, *Isotopenpraxis*, **3**, 417 (1967).
- 7) E. Hodgson, J.E. Casida, *J. Agric. Food Chem.*, **10**, 208 (1962).
- 8) D.L. Bull, R.L. Ridgway, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 837 (1969).
- 9) 宮本純之, 防虫科学, **24**, 130 (1959).
- 10) I. Nordgren, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 234 (1981).
- 11) 須永匡彦, 吉田宗弘, 上田照子, 高坂祐夫, 円藤陽子, 安井一清, 林真矢, 吉川日出男, 橋本美知子, 原一郎, 日衛誌, **44**, 763 (1989).
- 12) S.J. Reid, R.R. Watts, *J. Anal. Toxicol.*, **5**, 126 (1981).
- 13) 斎藤勲, 久永直見, 竹内康浩, 小野雄一郎, 岩田全充, 舛田和比古, 五藤雅博, 松本忠雄, 深谷幸生, 奥谷博俊, 関知次郎, 古池保雄, 産業医学, **26**, 15 (1984).
- 14) 渡辺壮一, 科警研報告, **19**, 88 (1966); *idem, ibid.*, **20**, 57 (1967); *idem, ibid.*, **20**, 59 (1967); *idem, ibid.*, **21**, 70 (1968); *idem, ibid.*, **21**, 71 (1968).
- 15) 角田紀子, 衛生化学, **29**, 206 (1983).
- 16) J. Liu, O. Suzuki, T. Kumazawa, H. Seno, *Forensic Sci. Inter.*, **41**, 67 (1989).
- 17) 角田紀子, 衛生化学, **32**, 447 (1986).
- 18) 角田紀子, 衛生化学, **32**, 91 (1986).
- 19) J.M. Vinuesa, J.C.M. Cortes, C.I. Canas, G.F. Perez, *J. Chromatogr.*, **472**, 365 (1989).
- 20) M. Wolf, R. Deleu, A. Copin, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **4**, 346 (1981).
- 21) 角田紀子, 科警研報告, **39**, 16 (1986).
- 22) X.-D. Ding, I.S. Krull, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 622 (1984).

- 23) 角田紀子, 岸 徹, 科警研報告, **39**, 99 (1986); *idem, ibid*, **39**, 239 (1986); *idem, ibid*, **41**, 81 (1988).
- 24) A.K. Singh, D.W. Hewetson, K.C. Jordon, M. Ashraf, *J. Chromatogr.* **369**, 83 (1986).
- 25) 屋敷幹雄, 近末文彦, 宮崎哲次, 小嶋 亨, 大谷美奈子, 日法医誌, **42**, 94 (1988).
- 26) R.A. Hoodless, F.J. Jackson, K.R. Tarrant, B.E. Griffith, *Pestic. Sci.*, **5**, 555 (1974).
- 27) 高瀬 巖, 中原武良, 吉本佳文, 中村秀子, 防虫科学, **37**, 142 (1972).
- 28) D.G. Rowlands, *J. Stored Prod. Res.* **6**, 19 (1970).
- 29) 土橋 均, 辰野道昭, 衛生化学, **34**, 371 (1988).
- 30) 三木昭宏, 土橋 均, 上田謙介, 山下正和, 衛生化学, **38**, 168 (1992).
- 31) M.H. Akhtar, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1048 (1982).
- 32) M. Znbo, W.R. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2105 (1970).
- 33) R.J. Early, J.R. Thompson, G.W. Sedgwick, J.M. Kelly, R.J. Christopherson, *J. Chromatogr.*, **416**, 15 (1987).
- 34) 後藤真康, 加藤誠哉, “増補残留農薬分析法,” ソフトサイエンス社, 東京, 1987, pp.113—115.
- 35) 中川有造, 池田正澄, “有機化合物のマススペクトル,” 丸善, 東京, 1973, pp.475—482.