FPD ガスクロマトグラフィーによる畜産食品中のトリクロロホン (ディブテレックス) の分析

(昭和 56 年 3 月 7 日受理)

今中雅章* 松永和義* 石田立夫*

Gas-Liquid Chromatographic Determination of Trichlorfon (Dipterex) in Livestock Products using a Flame Photometric Detector

Masaaki IMANAKA, Kazuyoshi MATSUNAGA and Tatsuo ISHIDA

(Okayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health: 739-1, Uchio, Okayama)

A gas-liquid chromatographic procedure using FPD, which makes use of Trichlorfon (Dipterex, DEP) itself as the indicator peak on the FPD gaschromatogram, has been developed for the determination of DEP in livestock products.

A column of Thermon 3000 on Shimalite TPA with a length shorter than 0.5 m was used; DEP gave a very symmetrical peak with a retention time different from those of well-known degradation products such as dimethylphosphite (DMP) and dichlorvos (DDVP). The shape of this peak did not change even when the injection quantity ranged from 0.5 to 4000 ng. The peak height were not lowered by co-existing substances in the sample solution. Furthermore, the peak was confirmed to be that of DEP itself by gas chromatography-mass spectrometry. These results enabled us to use the peak as an index for residue analysis.

The recoveries of DEP added to various kinds of livestock products at the level of 0.4 ppm ranged from 90.4% (chicken egg) to 102% (cow milk). The detection limit was 2 ppb (whole basis).

(Received March 7, 1981)

Key words: ガスクロマトグラフィー (FPD) gaschromatography (FPD); トリクロロホン trichlorfon; ディブテレックス dipterex; サーモン 3000 thermon 3000; シマライト TPA shimalite TPA; ジメチルホスファイト dimethylphosphite; ジクロロボス dichlorvos; マススペクトル mass spectrum; 畜産食品 livestock products

1. 緒 言

トリクロロホン (Trichlorfon, ディブテレックス, DEP と略す) は, 通常使用される GC 充てん剤との相互作用によって容易に分解するために, GC による分析が極めて困難であることが知られている。事実, DEP 自体を指標ピークとする定量法の報告例は見当たらない。

高瀬ら^{1)~3)}, 後藤ら⁴⁾, Ferreira⁵⁾ らは, DEP の代表的分解物であるジメチルホスファイト (DMP) を指標とする方法を提案している。しかし DMP の生成率は, 後藤ら⁴⁾ の指摘にもあるように, GC の機器の種類ばかりでなく, 溶液中の共存物質の影響をも受けて著しく変

動する。一方, アルカリ分解によって DEP をジクロロボス (DDVP) に分解後定量する方法^{6), 7)}, DEP をトリメチルシリル化後分析する方法⁸⁾ も報告されているが, 両者ともに余計な時間や試薬を必要とする。

今回, 著者らは FPD・GC での DEP の分解挙動を調べる過程でいくつかの興味ある知見を得るとともに, DEP を定量限界 0.5 ng で, 分解物ではなく直接のピークとして得ることができる GC 条件を見いだしたので報告する。さらに畜産食品への応用例についても述べる。

2. 実 験

2.1. 試 薬

n-ヘキサン, アセトニトリル, クロロホルム, ジクロ

* 岡山県環境保健センター: 岡山市内尾 739-1

ルメタン、アセトンおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用、塩化ナトリウムは特級試薬を使用した。2% 塩化ナトリウム溶液および 5% 塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 5.8)⁹⁾ は、少量の *n*-ヘキサンで2回洗浄後使用した。ジメチルホスファイト (DMP)、トリメチルホスフェート (TMP) は東京化成 (株) 一級品を使用した。

標準物質: ディブテレックス (DEP), エチルチオメトン (ETH), フェンチオン (MPP), ジクロロボス (DDVP), サリチオン (SAL) は和光純薬 (株) 残留農薬標準品を、トリ-*n*-ブチルホスフェート (TBP) は和光純薬工業 (株) 特級品を、トリス (2-クロロエチル) ホスフェート (TCEP) は東京化成 (株) 一級品を、トリ-*n*-アミルホスフェート (TNAP) は関東化学 (株) 一級品を使用した。

標準液: 各標準物質ともにアセトンで 100 ppm 濃度になるように溶解し、これを保存用原液とした。使用に際しては、さらにアセトンによって目的の濃度まで希釈した。

2.2. 器具および装置

ガスクロマトグラフ: (株) 島津製作所製 GC-4BM・PF 型, 4CM・PF 型 (P フィルター)

ガスクロマトグラフ-質量分析計: (株) 島津製作所製 LKB-9000 型

濃縮器: ロータリー・エバポレーター (ヤマト科学 (株) 製)

ミンチ: Bonny Mincer (Mickey MFG 社製)

2.3. 実験操作

2.3.1. ガスクロマトグラフ条件

検出器: FPD (P フィルター)

充てん剤: 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA, 60~80 mesh

カラム管: 3 mmφ×0.3 m ガラス製

カラム温度: 120~170°, 12°/min

注入口温度: 210°

検出器温度: 330°

キャリアーガス: N₂ (99.999%) 60 ml/min

空気流量: 60 ml/min

水素流量: 120 ml/min

2.3.2. ガスクロマトグラフ-質量分析計条件

充てん剤: 5% Thermon 3000 on Chromosorb W (AW-DMCS) 80~100 mesh; 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA 60~80 mesh

カラム管 (ガラス製): 3 mmφ×1.0 m; 3 mmφ×0.3 m

カラム温度: 120~210° 12°/min; 120~170° 12°/min

注入口温度: 220°, 210°

セパレーター温度: 250°, 220°

イオン源温度: 290°

イオン化エネルギー: 70 eV

トラップ電流: 60 μA

キャリアーガス: He 20 ml/min

2.3.3. 試料溶液の調製

高瀬らの方法²⁾に若干の変更を加えた。鶏肉および鶏の肝臓は、約 1 kg をミンチで細碎・混合の後 50 g を採取する。鶏卵は殻を除く全卵 (約 50 g) を、牛乳は 50 ml を重量測定後使用する。各試料に対しアセトニトリル (100 ml×1 回, 50 ml×2 回) を用いて振とう抽出を行い、全抽出液を合わせた後 5% 塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 5.8) 50 ml を加える。

含水アセトニトリル層に対しクロロホルム抽出 (100 ml×1 回, 50 ml×2 回) を行い、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下, 40° 以下で溶媒を留去し脂肪を得る。

脂肪を *n*-ヘキサン 20 ml に溶解, 定法に従ってアセトニトリル分配 (30 ml×2 回) の後両抽出液を合わせ, 10 ml 以下に濃縮, これに 2% 塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液 50 ml を加える。水層を *n*-ヘキサン洗浄 (50 ml×3) 後, ジクロロメタン抽出 (50 ml×4) する。抽出液を合わせ脱水の後溶媒を留去, 残渣をアセトン 1~5 ml に溶解, 5 μl を FPD・GC に注入する。

3. 実験結果および考察

3.1. GC カラムの液相および担体の種類の検討

3.1.1 “Thermon 1000+H₃PO₄” カラム

DMP は DEP の最も代表的な分解生成物であり、これを指標ピークとして DEP を分析することがしばしば行われる。DMP は“リン酸を含有する強極性の GC カラム”でテーリングの非常に少ないピークが得られ (Fig. 1-A), さらに最少検出量も小さく (0.5 ng), DEP の微量分析が可能である。しかし DMP の生成率は、溶液中の共存物質の影響を受けやすく、したがって検体の種類や精製の程度に依存して著しく変動するために、DEP 定量分析の指標ピークとしては不十分である (Table 1)。

3.1.2. “PEG-20 M” カラム

PEG-20 M は多くの水酸基を持つ強極性の液相であり、分子内水酸基を有する DEP の分析に適していると推察される。事実これをコーティングした充てん剤の使用時には、DMP, DDVP のピーク以外に、後者の保持時間直後にやや幅の広いピークが得られる (Fig. 1-B)。しかしこのピークの形態は、注入量が 1000 ng を越えると大きく変化してしまうために、残留分析の指標ピークとしては不適當である。

3.1.3. “Thermon 3000 (担体; Chromosorb W (AW-DMCS))” カラム

Thermon 3000 は“DEGS+H₃PO₄”に匹敵する極性を持ちながらテーリング防止剤を含有せず、最高使用温度も高い (280°) ために、FPD・GC による有機リン化

Fig. 1. FPD gaschromatograms of DEP by using 4 kinds of GC columns

- A: Column, 10% Thermon 1000+1% H_3PO_4 (3 mm $\times$ 1.0 m); support, Chromosorb W (AW-DMCS), 80~100 mesh; column temp., 120°C; inj. temp., 280°C; detector temp., 330°C; N_2 , 60 ml/min; air, 60 ml/min; H_2 , 120 ml/min
- B: Column, 10% PEG-20M (3 mm $\times$ 0.5 m); support, Chromosorb W (AW-DMCS), 80~100 mesh; column temp., 120~180°C, 6°C/min; inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C
- C: Column, 5% Thermon 3000 (3 mm $\times$ 1.0 m); support, Chromosorb W (AW-DMCS), 80~100 mesh; column temp., 120~210°C, 12°C/min; inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C
- D: Column, 3% Thermon 3000 (3 mm $\times$ 0.3 m); support, Shimalite TPA, 60~80 mesh; column temp., 120~170°C, 12°C/min; inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C

化合物の分析には応用範囲が広いと考えられる。

Fig. 1-C は、12°/min の昇温条件下での DEP の FPD ガスクロマトグラムであるが、DEP の分解物として知られる DMP と DDVP のピークに加え、さらに、非常にブロードであるが占有面積の大きい新たなピークの出現が認められる。このピークは、GC への注入量を 1~5000 ng の範囲で変動させてもその形態にまったく変化を生じないことから、残留分析の指標とすることも可能である。また、試料溶液中の共存物質によるピーク高の減少が見られないことも、このピークの持つ特徴である。

3.1.4. Thermon 3000 (担体: Shimalite TPA) カラム

担体 Chromosorb W (AW-DMCS) に Thermon 3000 をコーティングしたカラムの使用時に得られる broad peak (Fig. 1-C) は、DEP の定性分析にはまことに都合が良いが、しかし一般的な観点からいえば、やはり対称性の良いピークを指標とすることが望ましい。そこで著者は、Chromosorb W などと比較して表面活性が弱く、したがって DEP に対する分解作用が弱いと予想されるテレフタル酸 (TPA) を担体として、これに Thermon 3000 をコーティングした充てん剤の使用を試みた。この充てん剤では、DMP と DDVP は各

々その生成率が 1% 以下、5% 以下と極めて低いうえに、しかもそれらのピークとはかなり異なる保持時間に、DEP そのものと推定される対称性の良好なピークの出現を認めることができる (Fig. 1-D) ので、残留分析の指標とすべくさらに検討を加えた。

3.2. Shimalite TPA カラムでの分析条件の検討

3.2.1. エージング条件

TPA は最高使用温度が低い (185°) ために、エージングおよびカラム温度の設定に際しては特別の配慮が要求される。すなわち、通常 conditions に従い最高使用温度付近 (180~185°) で約 12 時間エージング後分析に使用した場合には、昇温 (120~180° 12°/min) に伴うベースラインの上昇が著しく、DEP の微量分析を妨害する。この現象はエージング時間を延長する (12 時間→24 時間) ほど顕著になるのに対し、逆に温度を低下させた処理条件 (175° 12 時間) では安定したベースラインが得られるようになる (Fig. 2)。一方、担体 (Shimalite TPA) のみを充てんしたカラム (3 mm $\times$ 0.5 m) では、最高使用温度 (185°) でのエージング後であっても、180° までの昇温に伴うベースラインの上昇はまったく生じない。Thermon 3000 は本来耐熱性の液相であるが、TPA にコーティングされた状態では、使用温度が 180° 以上になると、TPA の揮散とともに 528 nm 付近

Fig. 2. The effect of "Column again temperature and time" on the base line of FPD gaschromatogram (P filter)

Column; 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA (60~80 mesh), 3 mm×0.5 m, column temp., 120~174°C, 12°C/min; inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C; N₂, 60 ml/min, air, 60 ml/min, H₂, 120 ml/min.

Acetone (5 μl) is injected into FPD·GC. Sens., 10×8

に発光を持つ液相成分が溶出するのであろう。

3.2.2. 昇温条件

DEP は GC 充てん剤との相互作用によってさえ、容易に分解する傾向がある。したがって、カラム温度をで

きるだけ上昇させ、可能な限り接触時間を短縮して分析する必要がある。しかし、カラム温度 174° の定温分析では、アセトン (5 μl) 注入直後に液相成分の溶出によると推定される大きな妨害ピークが現れる。そのために、GC 充てん剤への影響が少ないカラム温度 (120°) で試料溶液を注入の後、170~174° まで急激に (12~20°/min) 昇温させる条件を考案した。

3.2.3. GC カラムの長さ

Fig. 3-A, B, C から明らかなように DEP の FPD ガスクロマトグラムは、カラムの長さに依存して著しく変化する。

通常の packed column は、一般に 1.0 m 以上で使用される。しかし DEP の分析では、担体 TPA の使用時でさえカラムの長さが 1.0 m になると、分解物の占める比重が対称性の良いピークのそれよりも著しく増大する (Fig. 3-C)。0.5 m 以下に押さえることによって、初めて良好な FPD ガスクロマトグラムを得ることが可能になる。特に 0.3 m のカラムでは、170° までの昇温で良好な FPD ガスクロマトグラムが得られるので、ベースラインの上昇も少なく非常に好都合である (Fig. 3-A)。

3.3. マススペクトルによる未知ピークの同定

担体 Chromosorb W (AW-DMCS) に Thermon 3000 をコーティングしたカラムで見られる、DEP の非常に特徴あるピーク群の性状を明らかにするために、GC-Mass による検討を行った。Fig. 1-C の a, b, c の 3 点で測定したマススペクトルはいずれも DDVP のそれと完全に一致し (Fig. 4-A), DEP 固有のフラグメントイオンである $m/e=221$, 223 (これらは DDVP の場

Fig. 3. The effect of "GC column length" for Shimalite TPA column
Column; 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA (60~80 mesh)
The column lengths are as follows.

A: 0.3 m B: 0.5 m C: 1.0 m

Fig. 4-A. EI mass spectrum of DEP at three points (a, b, c) of Fig. 1-C
 Conditions for GC-Mass: Column, 3 mm×1.0 m glass column packed with 5% Thermon 3000 on Chromosorb W (AW-DMCS), 80~100 mesh; column temp., 120~210°C, 12°C/min; inj. temp., 220°C; separator temp., 250°C; ion source temp., 290°C; He, 20 ml/min; ionizing energy, 70 eV

Fig. 4-B. EI mass spectrum of DEP
 Conditions for GC-Mass: Column, 3 mm×0.3 m glass column packed with 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA, 60~80 mesh; column temp., 120~170°C, 12°C/min; inj. temp., 210°C; separator temp., 220°C; ion source temp., 290°C; He, 20 ml/min; ionizing energy, 70 eV

合には見られない)にはまったくピークが認められなかった。以上の結果および 3.1.3 での検討結果は、DEP は注入口部での分解に引き続き、担体などとの相互作用によって、徐々にではあるが定量的にしかも共存物質の影響を受けることなく、DDVP に変換されることを示している。

これに対し Shimalite TPA を担体とする Thermon 3000 カラムの使用時には、Chromosorb W (AW-DMCS) の場合とは異なって、非常に対称性の良いピークが認められ (Fig. 1-D), しかもそのマススペクトルは、 $m/e=79$ にベースピーク、 $m/e=109$ に主要ピークを与えるとともに $m/e=221, 223$ に $(M-Cl)^+$ に相

するフラグメントイオンの存在を明らかに示しており (Fig. 4-B), 板垣ら¹⁰⁾の直接導入法による測定結果とよく一致した。以上の知見より、担体 TPA 使用時にのみ得ることができる対称性の良いピークは、DEP 自体によるものであると同定した。

3.4. 類似化合物の影響

0.3 m のように非常に短い GC カラムでは、環境中に存在が予想される他の有機リン化合物が DEP の分析を妨害することが懸念される。Fig. 5 は、DEP に類似する保持時間を持つと推定される有機リン農薬¹¹⁾およびリン酸トリエステル類¹²⁾を同時注入したガスクロマトグラムであるが、それらの妨害なく定量可能なことを示し

Fig. 5. FPD gaschromatogram of organophosphorus compounds, which have the retention times similar to that of DEP, on "3% Thermon 3000" column (Support; Shimalite TPA)

Column length, 3 mm×0.3 m; column temp., 120~170°C, 12°C/min. inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C; N₂, 60 ml/min; air, 60 ml/min; H₂, 120 ml/min

Injected quantity: DDVP (Dichlorvos) = TBP (Tri-*n*-butyl phosphate) = ETH (Ethylthiometon) = TNAP (Tri-*n*-amyl phosphate) = MPP (Fenthion) = TCEP (Tris (2-chloroethyl) phosphate) = 1.0 ng DEP (Trichlorfon) = 10 ng

ている。なおサリチオンは、この GC 条件で DEP と同一保持時間を有する有機リン農薬であるが*、これは、2.3.3 の *n*-ヘキサン洗浄操作 (50 ml×3 回) によって除去できるので、DEP の定量を妨害しない。

3.5. 検量線の作製

GC-Mass によって DEP であることが確認された Fig. 1-D のピークの形態は、その注入量を 0.5~4000 ng の範囲で変動させてもまったく変化が見られず、さらに検量線も良い直線性を示す (Fig. 6) ことは、このピークが残留分析の非常に有力な指標ピークとなり得ることを示している。

3.6. 添加回収実験

市販の鶏肉、鶏の肝臓、鶏卵各 50 g および牛乳 50 ml を用いて DEP の添加回収実験を行った。すなわち、アセトン溶液で 20 μg の DEP を添加後、2.3.3 に従って分析し回収率を求めた。その際特に、“分解物である DMP を指標ピークとする従来法”と“DEP そのものを指標とする本法”との回収率の差異に着目して検討を加えた。Table 1 に示されているように、同一の添加回収実験の結果得られた溶液を使用して GC 分析を行っているにもかかわらず、両者間に明りょうな回収率の違い

Fig. 6. Calibration curve of DEP

Column; 3% Thermon 3000 on Shimalite TPA (60~80 mesh), 3 mm×0.3 m, column temp., 120~170°C, 12°C/min; inj. temp., 210°C; detector temp., 330°C; N₂, 60 ml/min; air, 60 ml/min; H₂, 120 ml/min

The injected volume is 5 μl. Sens. = 10×8

Table 1. Recoveries of Trichlorfon from Live-stock Products

Foods	Method A ^{a)}	Method B ^{b)} (mean±sd, %)
Milk	102±1.96	82.4±4.08
Chicken meat	101±2.04	87.8±4.10
Chicken liver	95.7±2.13	73.4±5.38
Chicken egg	90.4±2.17	71.0±5.47

^{a)} Indication peak is DEP itself.

^{b)} Indication peak is DMP.

Each sample was spiked with 0.4 ppm of Trichlorfon.

These values were averages of three experiments.

が認められ、“DEP そのもののピーク”の方が指標としてより優れていることが明らかになった。なお従来法では、特に、成分組成が複雑である鶏卵や肝臓などでの回収率の低下が著しい。この原因としては、DEP → DMP への分解が試料溶液中の共存物質によって抑制されるために、見掛け上回収率の低下を引き起こすことが確かめられた。最少検出量は、試料あたり 0.002 ppm である。

3.7. 市販畜産食品の実態調査

鶏の飼育規模の拡大に伴い、多量の殺虫剤が鶏舎などに使用されている。そこで、市販 (岡山県内) の鶏肉、

* 今中雅章: 未発表

鶏の肝臓、鶏卵各10検体に対し、本法を適用して DEP の分析を行ったがいずれも不検出 (<0.002 ppm) であり、同時に調査した DDVP についても同様であった。

4. 結 論

DEP は担体との相互作用などによって容易に分解するために、GC 分析の際にはその分解物を指標にすることが一般的であるが、問題点も多い。そこで著者らは、DEP そのもののピークを指標にすることを目標にして、その FPD・GC 条件に種々の検討を加えた。

1. FPD・GC による DEP 分析の際 DMP を指標に用いると、特に畜産食品を分析対象とする場合、試料溶液中の共存物質の阻害作用を受けてその生成率 (DEP→DMP) が減少するために、見掛け上 DEP の回収率が低下する結果となる。

2. Chromosorb W (AW-DMCS) に Thermon 3000 をコーティングしたカラムでは、DEP は、DMP、DDVP の他にブロードであるがその高さが共存物質の影響を受けないピークを与える。マススペクトルによる検討の結果、担体との相互作用によって徐々にではあるが定量的に、DEP→DDVP への分解が進行していることが明らかになった。

3. Shimalite TPA に Thermon 3000 をコーティングしたカラムでは、特にその長さが 0.5 m 以下のとき、分解物ではなく DEP そのものの対称性の良いピークが得られる。これは最少検出量も小さく (0.5 ng)、さらに他の有機リン化合物との分離も良好なために、DEP 残留分析の指標ピークとして使用することができる。

終りに本調査研究を行うに当たり、御助言を賜わりま

した高知県衛生研究所 上田雅彦部長、田植 栄氏、相模女子大学 田辺弘也教授に厚く御礼申し上げます。なお、本研究は厚生省乳肉衛生課委託費で行ったものであり関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) 高瀬 巖, 吉本佳文, 津田秀子, 中原武良: 農薬生産技術, **25**, 22~23 (1971).
- 2) 高瀬 巖, 中原武良, 吉本佳文, 中村秀子: 防虫科学, **37**, 142~148 (1972).
- 3) 中原武良, 高瀬 巖, 川越郁男, 窪田拓男, 斎藤哲雄: 同上, **37**, 149~154 (1972).
- 4) 後藤真康, 加藤誠哉: “残留農薬分析法” p. 100~101 (1980) ソフトサイエンス.
- 5) Ferreira, J. R., Silva Fernand, A. M. S.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **63**, 517~522 (1980).
- 6) 鈴木照麿: “農薬公定検査法註解” p. 91~93 (1972) 南江堂.
- 7) 永吉秀光, 斉藤直子, 鈴木啓介: 日本農薬学会誌, **4**, 209~213 (1979).
- 8) Zitko, V., Sergeant, D. B: Tech. Rep.-Fish. Mar. Serv. (Can.) **714**, 1~14 (1977).
- 9) 神津 公, 駒沢重光, 高沼重義, 和田健夫: 衛生化学, **22**, 91~93 (1976).
- 10) 板垣又丕: 日本農薬学会誌, **3**, 511~521 (1978).
- 11) Kawamura, Y., Takeda, M., Uchiyama, M.: J. Food Hyg. Soc. Japan, **19**, 511~517 (1978).
- 12) 剣持堅志, 松永和義, 石田立夫: 食衛誌, **21**, 18~31 (1980).