多種類の有機リン系農薬の同時分析の一方法について

(昭和 58 年 12 月 21 日受理)

松 本 正 義^{*1}

Simultaneous Determination of Organophosphorus Pesticides Residues

Masayoshi MATSUMOTO

(Kyoto City Institute of Public Health: 1-2, Mibu Higashitakada-cho, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan)

The determination of multicomponent residues of organophosphorus pesticides was performed by using a combination of gradient silica gel dry column chromatography (SDC) with gas chromatography (GC). Two kinds of solvent systems were used for the SDC: system I, *n*-hexane, benzene and acetone; system II, benzene and acetone.

Elution patterns in SDC and relative retention times in GC were examined for 40 kinds of organophosphorus pesticides. Several organophosphorus pesticides which had the same or similar relative retention times in GC could be separated by SDC.

SDC is convenient because the activity of the silica gel is stable and a small amount of silica gel can be used repeatedly. Recoveries in the SDC step were in the ranges of 23-95% (system I) and 35-101% (system II).

(Received December 21, 1983)

Key words: 有機リン系農薬 organophosphorus pesticide; シリカゲルドライカラムクロマトグラフィー silica gel dry column chromatography; ガスクロマトグラフィー gas chromatography

緒 言

現在、我が国において登録されている有機リン系農薬(以下リン農薬)の有効成分別種類は50種近くあるが¹⁾食品衛生法に基づく食品・添加物等の規格基準ではそれらのうち12種について残留基準が設定されているにすぎない。近年、この12種以外のリン農薬も多量に使用されている²⁾現状から、それらについての残留基準の設定が望まれるところである。

残留農薬の分析のための公定法^{2),3)}や既存の方法^{4)~6)}のうち、定性試験は主にガスクロマトグラフィー(以下GC)のカラム充てん剤の種類を変えることにより行っているが、リン農薬の場合には上記のようにその種類が増え、茶葉や施設栽培作物のように何種類ものリン農薬が

残留していることがあるなど、GCによる定性だけでは不十分な場合も生じてくる。

桑島ら⁷⁾は、フロリジルカラムクロマトグラフィーにより農薬を5群に分ける方法を行い、西島⁷⁾は、キャピラリーカラムのGCを用いて分離能を高めることを試みている。一方、シリカゲルカラムを用いてのリン農薬の分離は、鈴木ら⁸⁾が19種のリン農薬を6区分する方法を検討しているが、使用例は極めて少ない。これは、リン農薬の一部のものが吸着などにより、十分な回収率が得られないためと思われる。しかし、シリカゲルの分離能は高く、密封状態ではその活性が安定なので、主に定性法としては活用しうるものと考えられる。Holdenら⁹⁾が有機塩素系農薬に適用したドライカラムクロマトグラフィーを参考に、著者は段階的濃度こう配法によるシリカゲルドライカラムクロマトグラフィー(以下SDC)をリン農薬40種類に適用し系統分析を試みたところ、良好な結果が得られたので報告する。

^{*1} 京都市衛生研究所: 京都市中京区壬生東高田町1-2

^{*2} 桑島順子, 前川吉明, 加藤誠哉: 第5回農薬残留分析研究会要旨集(日本農薬学会)昭和56年

Table 1. Operating Conditions for Silica Gel Dry Column Chromatography

Fraction No.	Eluting Solvent	
	System I	System II
1—10	<i>n</i> -hexane : benzene = 5 : 5	benzene
11—20	<i>n</i> -hexane : benzene = 4 : 6	benzene
21—30	<i>n</i> -hexane : benzene = 3 : 7	benzene : acetone = 19 : 1
31—40	<i>n</i> -hexane : benzene = 2 : 8	benzene : acetone = 9 : 1
41—50	<i>n</i> -hexane : benzene = 1 : 9	benzene : acetone = 8 : 2
51—60	benzene	benzene : acetone = 7 : 3
61—70	benzene : acetone = 19 : 1	
71—80	benzene : acetone = 9 : 1	
81—90	benzene : acetone = 8 : 2	
91—100	benzene : acetone = 7 : 3	

Column, 8 mm i.d. × 35 cm; Silica gel, 3.0 g; Sample size, 1 ml; Fraction size, 1 ml

実験方法

1. 試薬

n-ヘキサン, ベンゼン, アセトン: 残留農薬分析用試薬
無水硫酸ナトリウム: 試薬特級品を 700° で 5 時間加熱したもの。

シリカゲル: Merck 社製 Kieselgel 60, 70~230 mesh

リン農薬標準品: DDVP, メチルジメトン, サリチオン, ダイアジノン, エチルチオメトン, CYAP, ジメトエート, IBP, ECP, クロルピリホスメチル, メチルパラチオン, フォルモチオン, フェニトロチオン, クロルピリホス, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, α -CVP, β -CVP, フェントエート, メチダチオン, プロパホス, イソキサチオン, エチオン, CYP, EDDP, ピペロホス, EPN, PMP 及びホサロンは, (株)和光純薬工業製農薬標準品を用いた。標準品を手でできなかった下記の10種については, それぞれ () 内に示す市販のものを使用した。チオメトン (三共製薬, エカチン乳剤 25%), イソチオエート (日本農薬, ホスドン粒剤 4.0%), ピリミホスメチル (武田製薬, アクテリック乳剤 45%), ジメチルビンホス (三共製薬, ランガード粉剤 2.0%), メカルバム (武田製薬, ペスタン乳剤 25%), プロチオホス (BEYER, トクチオン乳剤 45%), CVMP (シェル化学, ガードサイド水和剤 50%), EPBP (日産化学工業, エスセブン粉剤 3.0%), ピリダフェンチオン (トモノ農薬, オフナック乳剤 40%), ジアリホール (兼商, ジアリホール乳剤 40%)

2. リン農薬標準溶液

市販標準品のあるものは, その 10 mg 前後を毛細管を用いて正確に秤量し, 100 ml のメスフラスコにベンゼン-*n*-ヘキサン (1 : 1) で溶解して標準原液を作成し, 用時同溶剤で必要な濃度に希釈して用いた。

標準品が入手できなかった10種については, 乳剤及び水和剤を上記と同様に溶解し, また粉剤及び粒剤の数グ

ラムを秤量し, ベンゼン-アセトン (1 : 1) を用いて抽出し, いずれも表示パーセントから濃度を算出して標準原液を作成し, 用時ベンゼン-*n*-ヘキサン (1:1) で希釈して用いた。

3. SDC 用シリカゲルの調製

シリカゲルに約 10% 量の蒸留水を加えて活性を低下させた後, 大型カラム (外径 50 mm, 長さ 50 cm) に約 500 g を湿式法で充てんし, ベンゼン-アセトン (7:3) 約 1.5 L を流して洗浄し, 窒素ガスを流して乾燥させた。次いでナスフラスコに移し, 沸騰水浴中減圧下で 5 時間, 有機溶媒及び水を蒸発させ活性化させた。このシリカゲルに *n*-ヘキサンで洗浄した水を 4% 量添加し, 透明すりの栓をして, 固まりがなくなるまで激しく振り, 以後時々振りまぜ 24 時間以上放置して均一化させた。このシリカゲルの 4. にあがる条件におけるブランクテスト及び各リン農薬の溶出範囲・回収率を調べた後, 約 100 g ずつ清浄なアンブルに溶封して保存した。

4. SDC の条件

SDC 用シリカゲル 3.0 g をあらかじめグラスウールをつめ洗浄・乾燥させたカラム (内径 8 mm, 長さ 35 cm, コックなし) に均一に充てんする。試料は, 原則として 1.0 ml, ベンゼン-*n*-ヘキサン溶液とし, シリカゲルの上端に直接静かに注ぐ (極性溶媒は溶出パターンを変化させることがある)。溶出には, Table 1 に示す 2 つの方法 (System I, System II) を用いた。

5. 装置

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製, GC-7 AG (FPD-P フィルター)

6. GC 分析条件

カラム管: 内径 3.0 mm, 長さ 2 m, ガラス製

カラム充てん剤: DC-200 2.5% + Epon 1009 0.25% / GasChrom Q (60~80 mesh) 及び QF-1 5% / GasChrom Q (60~80 mesh)

注入口及び検出器温度: 280°

Table 2. Relative Retention Times^{a)} of Organophosphorus Pesticides on Two Columns

Pesticides	DC-200+Epon ^{b)}			QF-1 ^{c)}	
	Program ^{d)}	220°C	180°C	Program ^{d)}	220°C
1 DDVP	0.13	0.22	0.09	0.17	0.15
2 Demeton-methyl	0.52	0.41	0.31	0.58	0.34
3 Salithion	0.54	0.48	0.34	0.58	0.35
4 Thiometon	0.56	0.56	0.35	0.60	0.29
5 Isothioate	0.61	0.55	0.40	0.49	0.31
6 Diazinone	0.67	0.53	0.45	0.70	0.26
7 Ethylthiometon	0.68	0.59	0.47	0.72	0.33
8 CYAP	0.71	0.60	0.50	0.74	0.63
9 Dimetoate	0.78	0.63	0.56	0.84	0.59
10 IBP	0.78	0.67	0.58	0.81	0.48
11 ECP	0.78	0.69	0.61	0.81	0.39
12 Chlorpyrifos-methyl	0.82	0.75	0.66	0.83	0.42
13 Parathion-methyl	0.88	0.80	0.76	0.90	0.81
14 Formothion	0.89	0.77	0.75	0.91	0.80
15 Pyrimiphos-methyl	0.90	0.81	0.79	0.91	0.43
16 Fenitrothion	0.95	0.90	0.88	0.95	0.87
17 Chlorpyrifos	0.95	0.93	0.89	0.96	0.49
18 Malathion	0.95	0.88	0.88	0.96	0.72
19 Fenthion	0.98	0.96	0.97	0.99	0.55
20 Parathion	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
21 Dimethylvinphos	1.05	1.03	1.11	1.06	0.78
22 α -CVP	1.10	1.14	1.25	1.10	0.85
23 Phenthoate	1.11	1.20	1.32	1.10	0.76
24 Mecarbam	1.12	1.19	1.34	1.11	1.00
25 β -CVP	1.14	1.24	1.39	1.14	0.93
26 Prothiophos	1.22	1.53	1.72	1.20	0.72
27 Methidathion	1.22	1.49	1.69	1.20	1.10
28 Propaphos	1.23	1.42	1.75	1.20	1.15
29 CVMP	1.25	1.51	1.83	1.06	0.78
30 Isoxathion	1.36	1.91	2.41	1.32	1.47
31 Ethion	1.39	2.05	2.62	1.36	1.24
32 EPBP	1.47	2.47	3.12	1.44	1.11
33 CYP	1.55	2.77	3.87	1.55	2.43
34 EDDP	1.56	2.87	3.94	1.22	1.67
35 Piperophos	1.76	3.92	5.98	1.83	3.40
36 EPN	1.80	4.04	6.07	1.84	3.23
37 Pyridaphenthion	1.84	4.16	—	1.92	3.74
38 PMP	1.93	4.65	—	2.06	3.38
39 Phosalone	2.00	5.17	—	2.12	4.17
40 Dialifor	2.27	6.47	—	2.45	4.55

a) Retention times relative to parathion

b) DC-200+Epon: DC-200 2.5%+Epon 1009 0.25%/Gas Chrom Q (60-80 mesh)

c) QF-1: QF-1 5%/Gas Chrom Q (60-80 mesh)

d) A column was equilibrated at 140°C, programmed upward at 4°C/min after injection, and held at 220°C until the last peak was emerged.

Temperatures of sample inlet and detector: 280°C

Gas flow: Carrier gas nitrogen, 60 ml/min; hydrogen, 50 ml/min; air, 60 ml/min

Column: 3 mm i.d.×2.1 m, glass column

キャリアガス: 窒素 60 ml/分

カラム温度: (1) 140°~220° (4°/分) の昇温

220° (20 分) 以後恒温

(2) 220° の恒温

(3) 180° の恒温

7. リン農薬の SDC における溶出特性及び回収率

各リン農薬標準溶液を用いて、上記の条件で SDC を行い、溶出液を内径 10 mm の細型目盛付試験管を用いて正確に 1 ml ずつ分取し、GC で定量して I 法及び II 法それぞれにおける各リン農薬の溶出特性を調べた。SDC における各リン農薬の回収率は、上で得た溶出範囲の溶出液を分画して求めた。

結果及び考察

1. リン農薬の GC における相対保持時間

各リン農薬の相対保持時間 (パラチオンを 1.00 としたときの) を GC 充てん剤の種類別及び昇温、恒温条件別に Table 2 に示した。いずれの条件でも相対保持時間が同じものや、近接したものがあり、GC だけでは定性定量が困難な場合のあることが分かる。

2. SDC 用シリカゲル

本法で用いたシリカゲルは、アンプルに溶封又は良質の透明すり付フラスコに保存するかがり、1 年半以上経過してもその活性度 (各リン農薬の溶出範囲) は変らなかった。しかし、同種のシリカゲルを用いて同様に操作し作成しても、同一の活性度を持つものを得られるとは限らないので、作成する度毎に各リン農薬の溶出範囲を調べるべきであろう。1 回に 1.5 kg 調製すれば、500 回近く使用できるため有利な方法であると思われる。また、同種のシリカゲルの活性度は、主にその水分含量に支配されるため、以前に調製したのと同様のシリカゲルを得たいときには、次の方法を取った。すなわち、洗浄・活性化したシリカゲルの一部を用いて 3.0 及び 5.0% の水分添加シリカゲルを調製し、それぞれの System I の条件におけるパラチオンの最大溶出フラクションナンバーを求め、比例式から最適水分添加量を求め調製した。このシリカゲルは、以前のものとほぼ同様の溶出パターンを示した。すなわち、このシリカゲルの System I 及び System II における各リン農薬の最大溶出フラクションナンバー及び 95% 溶出範囲 (溶出量の) は、以前に調製したシリカゲルのそれらと比較して、いずれの差も 1 フラクション (1 ml) 以内であった。また、このシリカゲルは清浄なので、ハロゲン化フェノールやニトロフェノールを酸性基に持つリン農薬の確認試験 (加水分解) や GC/MS の前処理等のためにも有用である。

3. リン農薬の SDC における回収率

System I 及び System II を用いた場合のリン農薬 (0.4~5.4 µg) のシリカゲルドライカラムからの回収率を Table 3 に示した。n-ヘキサン、ベンゼン及びアセト

Table 3. Recovery of Organophosphorus Pesticides in Silica Gel Dry Column Chromatographic Step

Pesticides	Added (µg)	Recovery(%)	
		I ^{a)}	II ^{a)}
1 DDVP	0.60	22.5	34.5
2 Demeton-methyl	1.0	33.4	73.8
3 Salithion	0.87	83.2	83.1
4 Thiometon	0.60	82.6	94.4
5 Isothioate	1.2	84.7	91.1
6 Diazinone	1.0	79.2	85.2
7 Ethylthiometon	0.61	81.1	96.6
8 CYAP	0.90	87.8	88.7
9 Dimetoate	2.0	88.3	98.4
10 IBP	1.3	87.9	87.4
11 ECP	0.80	87.3	87.1
12 Chlorpyrifos-methyl	0.60	77.4	95.2
13 Parathion-methyl	0.80	92.1	101.
14 Formothion	2.5	62.8	76.7
15 Pyrimiphos-methyl	0.70	85.5	88.2
16 Fenitrothion	0.87	73.5	92.4
17 Chlorpyrifos	1.0	87.2	92.5
18 Malathion	0.74	84.9	97.4
19 Fenthion	0.87	87.9	92.6
20 Parathion	0.82	78.1	97.5
21 Dimethylvinphos	1.6	84.5	84.7
22 α-CVP	1.0	78.9	92.0
23 Phenthoate	1.1	87.1	89.2
24 Mecarbam	0.40	76.4	97.1
25 β-CVP	1.0	78.7	92.2
26 Prothiophos	1.2	87.7	89.7
27 Methidathion	0.54	91.4	93.1
28 Propaphos	2.0	43.5	82.4
29 CVMP	1.4	84.4	87.1
30 Isoxathion	2.0	84.5	88.7
31 Ethion	0.54	73.2	88.2
32 EPBP	2.4	84.8	99.2
33 CYP	2.0	90.4	95.0
34 EDDP	2.2	69.0	78.6
35 Piperophos	1.8	49.2	87.1
36 EPN	2.2	71.5	98.6
37 Pyridaphenthion	2.3	79.8	82.9
38 PMP	5.4	48.0	67.8
39 Phosalone	2.1	95.0	95.2
40 Dialifor	4.7	87.1	96.5

^{a)} Conditions of silica gel dry column chromatography were given in Table 1. Each value is the average of three experiments.

ンを用いての10段階濃度こう配法であるSystem I は、主にリン農薬の中でも溶出の早いもの間での分離には適しているが、極性が高かったり溶解性が低いなどのた

Fig. 1. Elution percentages in silica gel dry column chromatography (System I) and relative retention times in gas chromatography (DC-200+Epon, program) of forty organophosphorus pesticides

- 1) Conditions of silica gel dry column chromatography were given in Table 1.
- 2) Conditions of gas chromatography were given in Table 2.

Fig. 2. Elution percentages in silica gel dry column chromatography (System II) and relative retention times in gas chromatography (DC-200+Epon, program) of forty organophosphorus pesticides

めに溶出が遅いもののいくつかは回収率の低いものがあった。System II はペンゼン、アセトンによる5段階濃度こう配法であって、低極性リン農薬間での分離の必要がない場合、すなわち、低極性リン農薬と比較的極性の高いリン農薬との分離及びより極性の高いリン農薬間での分離に適しており、System I より全般的に高い回収率を示した。リン農薬の添加量を $0.4 \mu\text{g}$ から $5.4 \mu\text{g}$ としたのは、個々のリン農薬の FPD-GC の感度から、回収実験のできる最少量近くを取ったためである。回収率の低かった DDVP, メチルジメトン, フォルモチオン, EDDP 及び PMP について10倍量の添加回収実験を行ったが、回収率の上昇はいずれも 5% 未満であった。回収率の低い原因としては、シリカゲル表面でのリン農薬の分解によるものと考えられる。一方、野菜などの実試料のクリーンアップされた試料溶液にリン農薬を添加して SDC を行った場合には、一部にここで示した回収率を上回る場合もあったが、どのような試料のときにどのくらい回収率が上昇するのかはまだよく判らない。

4. リン農薬分析パターン

GC における相対保持時間を横軸に、SDC におけるフラクションナンバーを縦軸に取り、各リン農薬の1フラクション (1 ml) 中の溶出率 (%) を記入した図を GC

及び SDC の条件別に作成した。それらのうち、SDC の System I と GC の DC-200+Epon 1009 (昇温法) との組合せを Fig. 1 に、また System II と DC-200+Epon 1009 (昇温法) との組合せを Fig. 2 に示した。これらの図において、各リン農薬が比較的よく分散していることから、複雑な GC パターンを示す試料も、SDC を用いて単純化した後 GC 充てん剤の種類や条件を変えることなどにより、定性がより確かなものになる。また、期待するフラクションに溶出してくると自体も、定性のための1つの根拠となろう。Fig. 1 及び Fig. 2 に示した溶出率 (%) は、各フラクション (1 ml) ごとに溶出してくるリン農薬の添加量に対する割合を示したものである。ここでの添加量は、検出感度の制約から回収実験の10倍量すなわち $4.0 \mu\text{g}$ ~ $54 \mu\text{g}$ で行った。なお、Fig. 1 及び Fig. 2 に示した溶出率 (%) は、実験毎に少しずつは変動することがあるが、各リン農薬の最大量溶出フラクションナンバー及び 95% 量溶出フラクションナンバー幅は、1 フラクション以上は変動しなかった。なお、SDC 分画を行っても定性定量が困難と考えられるのは、GC におけるリテンションタイム及び SDC における溶出範囲が共に近接しているリン農薬の1つまたはそれ以上が特に高濃度存在するときで、この

Fig. 3. Gas chromatograms of the extracts from mandarin orange peels.

(A): eluate from the charcoal column Chromatography

(B), (C), (D), (E), (F), (G): eluates from silica gel dry column chromatography (System I)

Conditions of gas chromatography were given in table 2.

場合には GC のピーク幅及び SDC のテーリングの増加などにより相対的に少量存在するリン農薬を見逃してしまう可能性がある (分画を行わないときにはさらにこの可能性は高いが)。また、標準試薬の項でものべたように、10 種類のリン農薬については純品を入手できなかったため、メーカー表示濃度を信頼して今回の実験を行ったが、メーカー側の弁によると、規格試験に通るかた原体を節約するという立場から、表示 % の 1% ほど多く含まれているのが普通であるという。また、界面活性剤、溶剤などによる溶出パターンへの影響は、1,000 倍～20,000 倍に希釈して用いているためほとんどないと考える。

今回取り上げた40種のリン農薬の他に、バミドチオン、BRP、ディブレックス、ESP、モノクロトホス及びアセフェートなど通常の条件での GC では分解性ピークしか得られず、今回の方法には入れることができなかったものもある。ただし、それらの分解性ピークの GC における感度は低いため、それらのリン農薬が通常の濃度、試料に存在していても他のリン農薬の分析の妨害とはならないと思われる。

5. 実試料への応用

野菜、果実、穀類及び茶葉類について公定法²⁾及び厚生省標準残留農薬分析法³⁾に準じて実態調査を行ったところ、野菜、みかんの皮及び茶葉のいくつかから複雑な GC チャートが得られた。これらの試料溶液の一部を SDC に供して、必要なフラクションを分取し、それぞれを異なった GC 条件で分析することにより、リン農薬を確認した。

Fig. 3 にみかんの皮の分析例を示した。抽出液を活性炭カラムクロマトグラフィー⁶⁾でクリーンアップし、昇温条件で GC に供した (A)。この GC クロマトグラムピークの相対保持時間から、ピーク①はサリチオン、ピーク②はフェニトロチオン、クロルピリホス及びマラチオン、ピーク③はプロチオホス、メチダチオン (DMTP) 及びプロバホスである可能性がある。そこで、この検液を SDC-I 法にかけ、それぞれのリン農薬の持つ溶出範囲を分取し、再び GC に供した結果、ピーク①はサリチオン、ピーク②はフェニトロチオン、ピーク③はメチダチオンであることを確認した (B) (C) (D) (E) (F) (G)。

要 約

40 種のリン農薬の GC における相対保持時間と SDC における溶出パターンとを組合せることにより、従来、GC のみでは定性が困難であったものを可能にすることができた。

SDC は、使用溶媒量が少なく、操作時間も短かく、分離剤の活性を一定に保つことが可能であるため、分析が急がれる場合などには、便利な方法である。

SDC の段階での各リン農薬の回収率は、低濃度領域でも溶出溶媒を選択することにより、DDVP の 34.5% を除けばすべて 68% 以上であった。

文 献

- 1) 農薬要覧編集委員会編：“農薬要覧” 日本植物防疫協会。
- 2) 厚生省告示第 332 号 (昭和 48 年 12 月 21 日)
- 3) 厚生省標準残留農薬分析法 (昭和 57 年 7 月)。
- 4) 後藤真康，加藤誠哉：“残留農薬分析法” ソフトサイエンス社。
- 5) Kawamura, Y., Takeda, M., Uchiyama, M.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 19, 511~517 (1978)。
- 6) Kawamura, Y., Takeda, M., Uchiyama, M.:

-
- ibid.*, **19**, 518~523 (1978).
7) 西島 修: 農林省農薬検査所報告, **22**, 36~40 (1982).
8) Suzuki, K., Nagayoshi, H.: J. Pesticide Sci.,
3, 385 (1978).
9) Holden, A. V., Marsden, K.: J. Chromatg.,
44, 481~492 (1969).