

Determination of Residues of Trichlorfon and its Metabolites in Plant, Milk, Chicken and Fish by Gas Chromatography Iwao TAKASE, Takeyoshi NAKAHARA, Yoshifumi YOSHIMOTO and Hideko NAKAMURA (Agricultural Chemicals Institute, Nihon Tokushu Noyaku Seizo Co., Ltd., Hino, Tokyo) Received August 9, 1972. *Botyu-Kagaku*, 37, 142, 1972. (with English Summary 148).

21. ガスクロマトグラフ法による植物、ミルク、ニワトリおよび魚におけるトリクロルフォンとその代謝物の残留分析法 高瀬 巖, 中原武良, 吉本佳文, 中村秀子 (日本特殊農薬製造株式会社・農薬研究所) 47. 8. 9 受理

trichlorfon (*O, O*-dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) とその代謝物の植物、ミルク、ニワトリおよび魚における残留分析法について研究し、熱アルカリイオン化型および電子捕獲型検出器を用いたガスクロマトグラフ法により定性、定量する方法を確立した。抽出溶媒は植物などではアセトニトリル、ミルクではアセトニトリル・メタノール (2:1) が良好な結果を示した。

0.1~0.5ppm 添加による植物、ミルク、ニワトリ、タマゴおよびウナギでの回収率は trichlorfon では90~100%, dichlorvos では83~100%, dimethyl phosphate, trichloroethanol では 70~80%であった。

この方法による検出限界は trichlorfon で植物などの場合 0.005 ppm, ミルクで 0.002 ppm, dichlorvos, trichloroethanol ではいずれも 0.005 ppm であった。本分析法を用いて牧草および飼料用トウモロコシ中での trichlorfon の残留量の調査を行なった。

緒 言

trichlorfon (*O, O*-dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) は鱗翅目を始め各種の害虫に殺虫スペクトルが広く、水稻、野菜、果樹の害虫ならびにニワトリ、ウシ、ウナギなどの家畜害虫の防除にも用いられている低毒性の有機リン剤である。微量定量法には熱分解法を用いた比色法¹⁾、クロム酸化を行ない酸化生成物を比色する方法^{2,3)}や、Karman ら⁴⁾により開発された熱アルカリイオン化型検出器 (Alkali Flame Thermionic Detector, 以下 FTD と略す) を用いたガスクロマトグラフ法があり、trichlorfon と dichlorvos (2, 2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) との分離定量法⁵⁾や電子捕獲型検出器 (Electron Capture Detector, 以下 ECD と略す) を用いたガスクロマトグラフ法⁶⁾などが報告されている。筆者ら⁷⁾はさきに trichlorfon の微量定量法を発表したが、さらに FTD, ECD および Brody⁸⁾により開発された炎光光度型検出器 (Flame Photometric Detector 以下 FPD と略す) を活用したガスクロマトグラフ法により、trichlorfon とその分解物と考えられる dichlorvos, dimethyl phosphate (DMP), trichloro ethanol (TCE) などとの分離定量法について、なし、ぶどうなどの果樹、大根、白菜などの野菜、牧草、玄米、ミルク、ニワトリ、およびコイやウナギなどの魚類について検討し、圃場において、trichlor-

fon を乳牛の飼料用の青刈トウモロコシや牧草に施用し、その消長を調べたので報告する。

実験材料および方法

1. 試薬および溶媒

溶媒：アセトニトリルは試薬1級を全ガラス製の蒸留装置を用いて蒸留精製し、アセトン、メタノール、クロロホルム、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタン、エチルエーテルは試薬特級を用いた。用いた溶媒はいずれもガスクロマトグラムに支障のあるピークを認めない。

薄層クロマトグラフ展開溶媒：イソプロパノール・*n*-ブタノール・水酸化アンモニウム (5:2:3)

試薬：ガスクロマトグラフ法の内標準物質 trimethyl phosphate (TMP), tri-*n*-butyl phosphite (TBPP) はいずれも和光純薬製特級品を用いた。

Hanes試薬⁹⁾；モリブデン酸アンモニウム (特級) 0.5g に 5ml の水と 1.5ml の濃塩酸および 2.5ml の過塩素酸を加えて溶解させ、放冷後、アセトンで 50ml とする。調製後、直ちに用いる。

メチル化試薬：常法により合成したニトロソメチル尿素に、冷却下、水酸化カリウムを加えて分解し発生するジアゾメタンをエチルエーテルに吸収させた後、密封して 0°C に保存する。

蒸散防止剤：1% 流動パラフィン・ベンゼン溶液 (w/v)

2. 供試化合物

ガスクロマトグラフ法や co-chromatography のための標準化合物として次の化合物を合成または精製して用いた。

trichlorfon; 工業用原体より、少量のベンゼンを含む *n*-ヘキサンを用いて再結した。

白色結晶、融点 $80\sim 81^{\circ}\text{C}$ 、純度 99.7%。

dichlorvos; 工業用原体を蒸留して $82\sim 84^{\circ}\text{C}/1\text{mm Hg}$ の留分を集めた。

無色透明液状、沸点 $84^{\circ}\text{C}/1\text{mm Hg}$

比重 1.41 (25°C) 屈折率 $n_{\text{D}}^{20}=1.45$

desmethyl trichlorfon (DM-DEP); trichlorfon をアセトンに溶かし、ヨウ化ナトリウムを加えて 50°C で $10\sim 20$ 時間分解した後、 5°C に冷却し油状物を採り、再結して DM-DEP のナトリウム塩として保存した。

DMP; trimethyl phosphate を 80% エタノール溶液中で等モルの水酸化ナトリウムを加えて分解し、ナトリウム塩として保存した。

TCE; 試薬特級を蒸留精製した。

融点 18°C 、沸点 $151\sim 153^{\circ}\text{C}$

3. ガスクロマトグラフ

trichlorfon をはじめリン化合物の場合 FTD 付きの島津製作所製 4A-PF 型ガスクロマトグラフを用い、TCE の場合は ^{63}Ni の ECD 付きの Micro Tek 220 型ガスクロマトグラフを用いた。充填剤は Gas Chrom Q ($80\sim 100$ メッシュ) に液相として 25% Carbowax 20M をコーティングしたものを内径 4mm、長さ 100 cm のガラス製カラムにつめたものを用い、カラム温度 150°C 、試料気化室温度 250°C 、検出器温度 250°C 、キャリアガス (窒素) $60\text{ml}/\text{分}$ で定量した。一部の化合物の確認および定量のため FPD 付きの Micro Tek 160 型ガスクロマトグラフ (526nm フィルター) を用い、充填剤は 10% Silicone DC200/Gas Chrom Q ($80\sim 100$ メッシュ) を用いた。

4. 分析操作

抽出

植物の場合; 試料 $500\sim 1000\text{g}$ を細切し、その $50\sim 100\text{g}$ を採りアセトニトリル 200ml を加えホモジナイズし、厚さ 3mm のセライト 545 層を通してろ過する。ろ過後残渣に再びアセトニトリルを加え抽出する。

肉、魚の場合; 試料を肉ひき器を用いて磨砕後アセトニトリル 200ml とセライト 545 50g を加えて抽出する。脂肪の場合は抽出溶媒として *n*-ヘキサンを用い、アセトニトリルへ転溶する。

ミルクの場合; 試料 200ml にアセトニトリル 200ml とメタノール 100ml を加え 5 分間ブレンドした後、 6000rpm で 5 分間遠心分離し上澄液を集める。残渣はアセトニトリル・メタノール (2:1) 混合液 100ml で再抽出する。

4-1. trichlorfon, TCE

アセトニトリル抽出液に水 50ml を加えた後クロホルム $200\sim 300\text{ml}$ を用いて 2 回振とう抽出を行ない、水層 (DMP, DM-DEP) と溶媒層 (trichlorfon, dichlorvos, TCE) にわけ、溶媒層は 2% 塩化ナトリウム液で洗浄し洗液は水層にあわせる。溶媒を濃縮し残渣に *n*-ヘキサン 100ml を加えアセトニトリル 50ml で 3 回振とう抽出する。アセトニトリル層に水 50ml を加え減圧下 ($\text{約 } 40^{\circ}\text{C}$) でアセトニトリルを留去する。残った水層に *n*-ヘプタン 50ml を加え 5 回振とう抽出し溶媒層は dichlorvos 分画として保存する。水層に飽和量の塩化ナトリウムを加えエチルエーテル 100ml を用いて 3 回振とう抽出する。溶媒層を減圧下で濃縮、乾固した後、内標準物質 TMP・アセトン溶液 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) の一定量を加えて FTD によるガスクロマトグラフ法により trichlorfon を定量し、同様にして ECD により TCE を定量する。

4-2. dichlorvos

前記の *n*-ヘプタン層に蒸散防止剤 2~3 滴を加え減圧下 (30°C 以下) で静かに濃縮後、FTD または FPD によるガスクロマトグラフ法により定量する。

4-3. DMP, DM-DEP

前記の水層を約 50ml まで濃縮しアセトン $300\sim 400\text{ml}$ とセライト 545 5g を加えブレンドした後ろ過する。残渣は 10% 含水アセトンで十分に洗浄し、ろ液をあわせ約 30ml まで濃縮後、5N 塩酸 2ml 、塩化ナトリウム 10g を加えてエチルエーテル・アセトニトリル・メタノール (17:2:1) 混合溶媒 200ml を用いて 3 回抽出し、抽出液を約 1ml まで濃縮しシリカプレート (厚さ 0.5mm , $20\times 20\text{cm}$) による薄層クロマト法¹⁰⁾により、展開溶媒 イソプロパノール・*n*-ブタノール・水酸化アンモニウム (5:2:3) を用いて、約 3 時間、 12cm まで展開し、風乾後両端に Hanes 試薬を噴霧して発色させ、 R_f 0.35 の DMP および R_f 0.42 の DM-DEP を含む R_f 0.3~0.5 の吸着層を削り取りメタノールで抽出し 0.5ml まで濃縮する。これに濃塩酸 1 滴と 5ml のジアゾメタン溶液を加え室温で 20 分間攪拌してメチル化を行ないそれぞれ trimethyl phosphate および *O*, *O*-dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-methoxyethyl phosphonate とした後ガスクロマトグラフ法により定量する。

4-4. 検量線

trichlorfon 純品 50ppm のアセトン溶液 0.5 , 1.0 , 1.5 および 2.0ml をそれぞれ 10ml のメスフラスコに採り、内標準物質 TMP の 20ppm アセトン溶液各 1ml を加えてアセトンで定容とし、 $3\mu\text{l}$ を注入してガスクロマトグラムのピーク高さを測定し、ピーク高さ比を縦軸に、重量比を横軸にとりて検量線を作成す

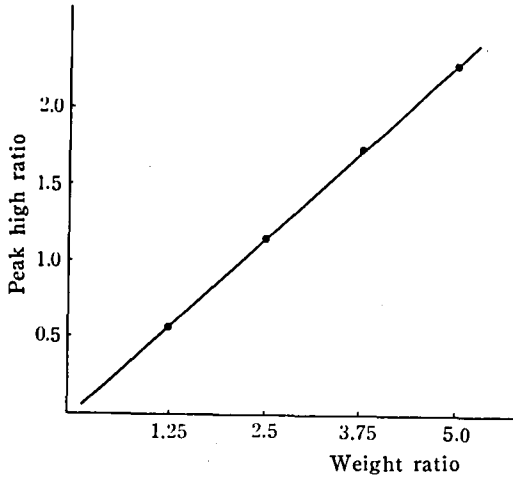


Fig. 1. Calibration curve of trichlorfon.

る (Fig. 1).

dichlorvos, TCE などは定量毎に標準品を入れる絶対法により定量した。

実験結果および考察

1. 抽出溶媒

白菜, 玄米, ミルク, ニワトリの卵, 肉, 脂肪, ウナギの細切した試料 50g に trichlorfon を 0.1ppm とするように添加し, メタノール, アセトニトリル, アセトンなどを用いて検討した結果, いずれの試料でもアセトニトリルが抽出率も良くガスクロマトグラム上の妨害ピークも少なかった。ミルクだけはアセトニトリル・メタノール (2:1) の混合溶媒が最も抽出率が良かった (Table 1)。

2. 回収試験

供試した trichlorfon を始め dichlorvos, DMP, および TCE を果樹, そ菜, 牧草, 玄米およびミルク, ニワトリのタマゴ, 肉, 脂肪, 肝臓, 血液, コイ, ウナギ等に 0.1~1.0ppm 相当量添加したのち前述の分析法に従って分析した。Table 2 および 3 にその回収率, Fig. 2 に各化合物のガスクロマトグラム, Fig. 3 に各試料のガスクロマトグラムを示した。

Table 1. Recoveries of trichlorfon from chinese cabbage, rice grains, milk, chicken, and eel by various extraction solvents.

Sample	Solvent				
	CH ₃ OH	CH ₃ CN	(CH ₃) ₂ CO	CH ₃ OH : CH ₃ CN 2 : 1	n-C ₆ H ₁₄
Chinese cabbage	83* ¹	100	85		
Rice grain	82	95	91	91	
Milk	82	94		96	
Chicken egg		101	88		
Chicken meat		108	94		
Chicken fat		93			72
Eel	86	93			

*¹ percentage of recoveries.

Table 2. Recoveries of trichlorfon and its metabolites from various plants and fresh milk.

Samples	Added* ¹ ppm	trichlorfon	Percentage of recoveries (%)		
			dichlorvos	DMP* ²	TCE* ³
Corn plant	0.1	95.3	93.2	72.4	81.5
Grass	0.1	98.7	99.9	69.8	77.2
Radish leaf	0.1	95.1			
Radish root	0.1	97.2	86.5		
Chinese cabbage	0.1	100.7	94.2		
Strawberries	0.1	90.5	87.9		
Grapes	0.1	96.7			
Pear	0.1	97.0	90.1		
Rice grains	0.1	94.9	88.3		
Tabacco	0.1	90.0			
Milk	0.1* ⁴	95.9	83.6	74.0	79.2

*¹ per 50gr plant *² dimethyl phosphate; 0.5ppm added

*³ trichloro ethanol; 0.5ppm added

*⁴ per 200ml

Table 3. Recoveries of trichlorfon and its metabolites from chicken tissues and fish.

Samples	Added* ¹ ppm	trichlorfon	Percentage of recoveries (%)		
			dichlorvos	DMP* ²	TCE* ²
Chicken egg	0.2	95.3	85.0	78.9	78.0
Chicken meat	0.2	100.1	91.8		
Chicken fat	0.2	72.2	79.9		
Chicken liver	0.2	95.0	92.0		
Chicken blood	0.2	96.9	97.5		
Eel	0.2	95.3	85.0	76.9	78.8
Carp	0.3	90.1	84.8		

*¹ per 50gr fish or chicken*² 0.5ppm added

各植物、ミルク、ニワトリおよび魚のいずれにおいても trichlorfon は90%以上の回収率を示しており、dichlorvos はミルクの83.6%を除いていずれも85%以上であった。しかし DMP、TCE の回収率は70~80%とやや低かった。

3. 検出限界

以上の方法による化合物の各種試料からの検出限界は trichlorfon で植物、ニワトリ、魚の場合0.005ppm であり、ミルクの場合 0.002ppm であった。なお dichlorvos、TCE では検出限界はいずれも 0.005 ppm であり、DMP、DM-DEP では0.01ppm であった。

4. 牧草での trichlorfon の消長

昭和45年牧野のダニ防除のため trichlorfon 40%微量散布液 1.5l/ha (有効成分 60g/10a) および 3%粉剤 30kg/ha (有効成分 90g/10a) を 大分県久住牧場および栃木県八郎ヶ原牧場で 航空 散布したが、その際の trichlorfon の牧草への付着量およびその残留性についての実験結果を Table 4 に示した。

大分県の場合微量散布区のみであったが、その付着量は牧草の採取地点によって 11.5 および 39.9ppm と約3倍の相違があった。しかし残留量は2ヶ所とも時間の経過にともない急激に減少して、10日後では0.05 ppm 以下となった。

一方栃木県の場合、微量散布区は7ヶ所から牧草を

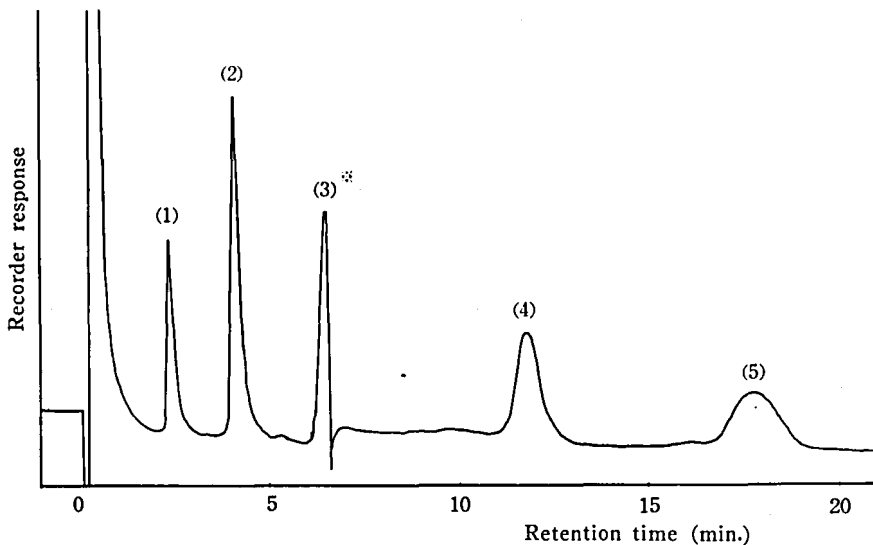


Fig. 2. Standard gaschromatogram of trichlorfon and its metabolites.

(1) trichlorfon (2) dimethyl phosphate (methylation) (3) trichloroethanol
(4) dichlorvos (5) desmethyl trichlorfon (methylation)

20ng of each compounds in 4 μ l acetone was injected. Apparatus; Shimadzu GC-4APF equipped with flame thermionic detector (FTD), (trichloroethanol* is electron capture detector). Column; glass 1.0m $\times$ 4mm i.d. 25% Carbowax 20M/Gas Chrom Q at 150°C. Detector, Inlet temperature; 250°C.

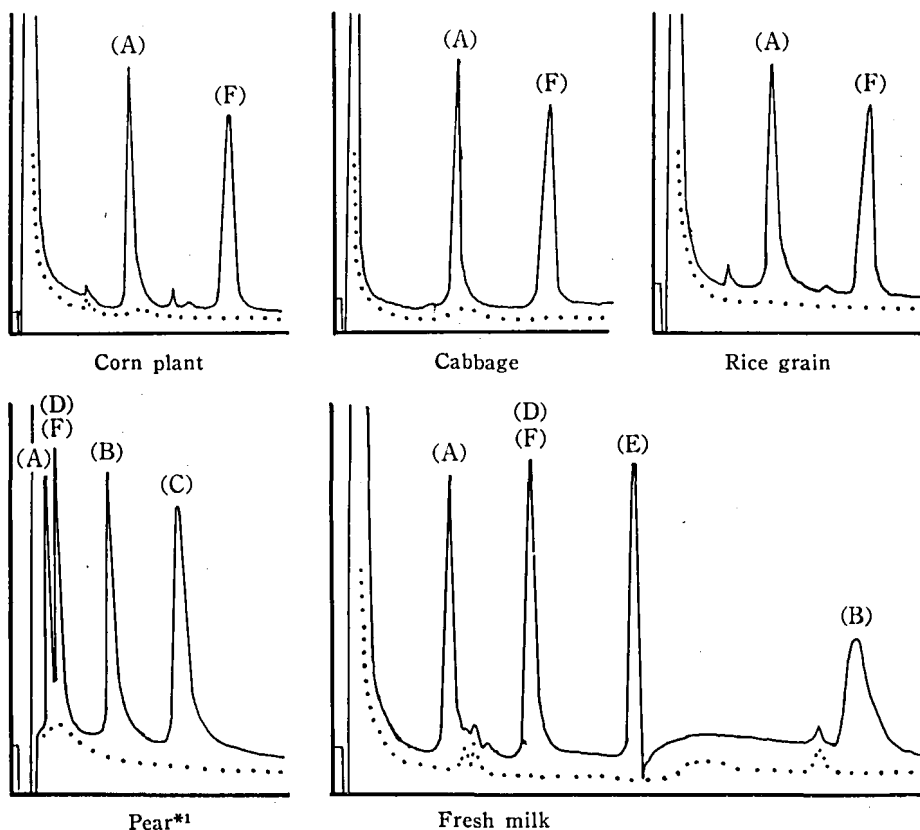


Fig. 3. Gas chromatogram of trichlorfon and its metabolites from Corn plant, and fresh milk.

— Control + 0.1 ppm added Control

(A) trichlorfon (B) dichlorvos (C) desmethyl trichlorfon (methylation)

(D) dimethyl phosphate (E) trichloroethanol (detector; ECD)

(F) trimethyl phosphate (internal standard)

*1 apparatus; Micro-Tek 160 equipped with flame photometric detector (FPD), Column; 10% DC200/Gas Chrom Q at 125°C. (glass 1.5m×4mm i.d.). Detector and Inlet temperature is 205°C, 230°C, respectively.

Table 4. Residues of trichlorfon in grass after field treatment in different formulations.

		analyzed as trichlorfon (ppm)					percentage of deposit (%) ^{*5}
		0	3	7	10	14	
Ohoita ^{*3}	L-1 ^{*1}	11.5	0.43	0.18	0.04	0.04	
	L-2	39.9	0.16	0.21	0.05		
Tochigi ^{*4}	L ^{*2}	24.0	0.72		0.20		62.7
	D	5.8	0.43		0.06		20.6

^{*1} Treated with 1.5l per hectare of Dipterex® 40% ultra low volume spray by aerial application.

^{*2} Treated with 30kg per hectare of Dipterex® 3% dust by aerial application.

^{*3} Average ppm of two spots at the pasture.

^{*4} Average ppm of seven spots at pasture.

^{*5} Average percent of deposit on the petri dish at seven spots.
(theoretical amount; $3.8\mu\text{g}/\text{cm}^2=100\%$)

採取し平均値で示したが、付着量は12.8から44.9ppmの間であり、同一地点でのシャーレを用いた落下量の測定結果などより理論落下量の63%が牧草へ落下し付着したと考えられる。粉剤区では散布葉量が1.5倍と多いにもかかわらず牧草への trichlorfon の付着量は微量散布区に比べ約1/3と少なく、落下量も約21%であった。付着量の多い地点の方が残留性も長く、残留量も多い傾向が見られた。

trichlorfon の牧草での残留性は散布直後の牧草への付着量や散布後の降雨、気候条件などに影響されるが、いずれの場合でも施用7~10日後には0.2から0.1 ppm 以下の残留量となった。

同時に定量を試みた dichlorvos はいずれの牧草からも検出されなかった。

5. 粒剤施用したトウモロコシ中での消長

名古屋大学農学部で農場において乳牛の飼料用として栽培されている青刈トウモロコシにアヲトウが大発生したため薬剤による防除を試みたところ、ディプテレックス® 5%粒剤の殺虫効果が顕著であった。そこで昭和46年8月、トウモロコシに同粒剤6kg/10aを散粒し、トウモロコシの葉部および茎部への trichlorfon の残留量を測定した結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。

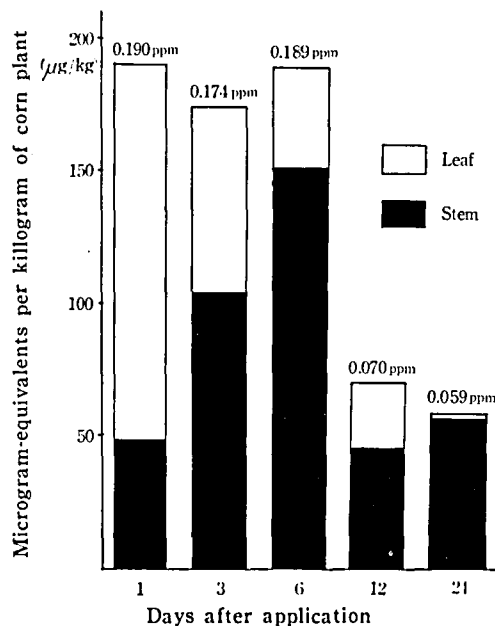


Fig. 4. Residues of trichlorfon in Corn plant. Treated with 6kg per ten are of Dipterex® 5% granule by soil application. Variety; Nagano No.1. Seed; 22, May, 1971 Application; 13, August, 1971

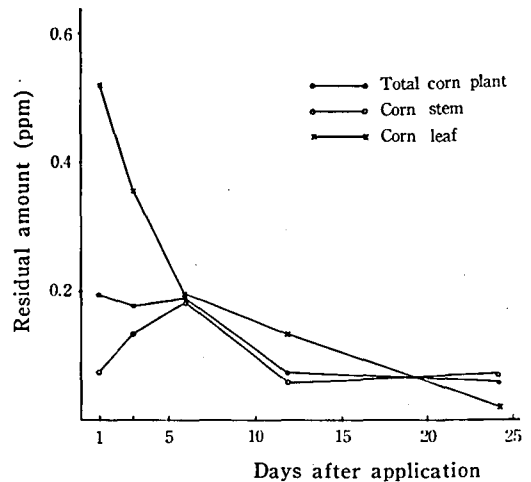


Fig. 5. Residues of trichlorfon in Corn plant. Treated with 6kg of Dipterex® 5% granule per ten are by soil application.

その結果、トウモロコシ全体の trichlorfon は散布1日後より6日後まで約0.19ppmとほぼ一定の残留量を示したが、その後日数の経過と共に減少し、12日後では0.07ppmとなった。葉部と茎部での消長および分布割合をみると、葉部では1日後で約0.5ppm検出されたが、徐々に減少して6日後で約0.2ppmとなった。一方茎部では散布1日後には0.07ppmしか検出されなかったが、日数の経過と共に増加して行き、6日後では最高値の約0.19ppmが検出され、その後は次第に減少した。

分析に供したトウモロコシの葉部と茎部との重量比は約2:8であり、特に茎部での残留量が問題となる。

次に分布割合は散布1日後では約75%が葉部にあったが、その後葉部の割合は急激に減少し、6日後では20%相当量となり80%以上は茎部に存在した。

以上の結果、処理直後よりトウモロコシの葉に trichlorfon が多く検出される事実は、土壤に施用された trichlorfon は植物体の根から吸収され浸透移行性が早いことを表わしている。同時に分析した dichlorvos, TCE, DMP などはいずれの試料からも検出されなかった。

6. その他の植物、動物、魚類への残留量の調査

本分析法を用いて、昭和45年より農業ディプテレックス®を施用した場合の水稲、ブドウ、ナシなどの果樹、白菜、ナス、大根などの野菜、タバコ、牧草などの消長および残留量の調査や動物薬としてニワトリ畜舎の害虫防除に使用した時のニワトリ体内および卵への残留量、水産薬として使用した時のウナギへの影響などについて試験を進めており、一部データも出て

いるが、別の機会にまとめて報告する。

摘 要

(1) trichlorfon の植物、ミルク、動物および魚類における残留分析法を検討し、熱アルカリイオン化型検出器によるガスクロマトグラフ法によって trichlorfon 0.005ppm まで検出可能な方法を確立した。

(2) trichlorfon の代謝物と想定される dichlorvos, DM-DEP, DMP および TCE も同じ抽出、精製操作により dichlorvos はそのまま、DM-DEP, DMP はメチル化して FTD または FPD により、TCE は ECD により 0.01ppm 以下まで定量することができた。

(3) 植物、ニワトリ、タマゴおよびウナギなどからの抽出溶媒としてアセトニトリルが良好であり、ミルクからはアセトニトリル・メタノール (2:1) 混合溶液が最適であった。

(4) 植物、ミルク、ニワトリおよび魚類に trichlorfon を 0.1ppm になるように添加した場合の回収率は全て90%以上であり、dichlorvos では83~101%, DMP, TCE では70~80%の回収率であった。

(5) 航空散布により牧草へ施用された trichlorfon や、トウモロコシ畑に粒剤施用した時の trichlorfon とその代謝物の消長を測定した結果、牧草への残留量は散布7日後で約0.2ppm、10日以降では0.05ppm以下となる。トウモロコシでは散粒6日後まで0.19ppm程度の残留量があったが、12日後では0.07ppmに減少した。

trichlorfon は家畜飼料である牧草などでの残留性は剤型にあまり差はなく比較的すみやかに分解され、代謝物の dichlorvos, TCE などはいずれも検出することができなかった。

本研究にあたり実験遂行上種々の御便宜を与えられた農林水産航空協会ならびに大分県、栃木県の畜産試験場の方々、および名古屋大学農学部窪田沢男技官、川越郁男教官ならびに御指導を頂いた名古屋大学農学部害虫学教室斎藤哲夫教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Giang, P. A., S. A. Hall and W. F. Barthel: *J. Agr. Food Chem.*, 2, 1281 (1954).
- Arthur, B. W. and J. E. Casida: *J. Agr. Food Chem.*, 5, 186 (1957).
- 平野吉夫・田中 博・田村悌一: 分析化学, 11, 1305 (1962).
- Karmen, A. and L. Giuffrida: *Nature*, 201, 1205 (1964).
- El-Refai, A. L. (Ali), and L. Giuffrida: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 48, 374 (1965).
- Anderson, R. J., C. A. Anderson, and T. J. Olson: *J. Agr. Food Chem.*, 14, 508 (1966).
- 高瀬 巖・吉本佳文・津田秀子・中原武良: 農業生産技術, 25(補), 25 (1971).
- Brody, S. S. and J. E. Chanery: *J. Gas Chromatog.*, 4, 42 (1966).
- Jungemickel, F.: *J. Chromatog.*, 31, 617 (1967).
- Stenersen, J.: *J. Chromatog.*, 54, 77 (1971).

Summary

A sensitive residue analytical method was developed for the determination of residues of trichlorfon (*O*, *O*-dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphate) and its possible metabolites, dichlorvos, dimethyl phosphate, desmethyl trichlorfon and trichloroethanol in plants, milk, chicken and fish by gaschromatography, this method. Trichlorfon and its metabolites were extracted from plant materials, chicken and fish with acetonitrile, and the residues from milk were extracted with acetonitrile methanol (2:1) mixture. In all cases, detection and measurement of the compounds were accomplished by alkali flame thermionic or electron capture detector gas chromatography.

Recoveries of trichlorfon (at the 0.1ppm level were 90-101%) from plants, rice grains, chicken, fish and milk Recoveries of dichlorvos, dimethyl phosphate and trichloroethanol at the 0.2 or 0.5ppm were 83-103%, 70-74% and 78-81%, respectively.

This method will make possible the detection of 0.005ppm trichlorfon in plants, chicken and fish, and 0.002ppm in milk.