

## こまつな中のフェントエート(PAP)不純物O,O,S-トリメチルホ スホロジチオエートの検出

|       |            |
|-------|------------|
| 誌名    | 食品衛生学雑誌    |
| ISSN  | 00156426   |
| 巻/号   | 423        |
| 掲載ページ | p. 206-209 |
| 発行年月  | 2001年6月    |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ノート

## こまつな中のフェントエート (PAP) 不純物 O,O,S-トリメチルホスホロジチオエートの検出

(平成 12 年 12 月 6 日受理)

田中康夫\*<sup>1,†</sup> 高橋京子\*<sup>1</sup> 笹尾忠由\*<sup>1</sup> 桐ヶ谷忠司\*<sup>1</sup>  
細井志郎\*<sup>1</sup> 白井進\*<sup>1</sup> 河村太郎\*<sup>2</sup> 中澤裕之\*<sup>3</sup>

### Detection of O,O,S-Trimethyl Phosphorodithioate, an Impurity in Phenthoate (PAP), in Komatsuna

Yasuo TANAKA\*<sup>1,†</sup>, Kyoko TAKAHASHI\*<sup>1</sup>, Tadayoshi SASAO\*<sup>1</sup>, Tadashi KIRIGAYA\*<sup>1</sup>,  
Shiro Hosoi\*<sup>1</sup>, Susumu USUI\*<sup>1</sup>, Taro KAWAMURA\*<sup>2</sup> and Hiroyuki NAKAZAWA\*<sup>3</sup>

(\*<sup>1</sup>Yokohama City Institute of Health: 1-2-17, Takigashira, Isogo-ku, Yokohama 235-0012, Japan;  
\*<sup>2</sup>Kamakura Woman's College: 1420, Iwase, Kamakura, Kanagawa 247-0051, Japan; \*<sup>3</sup>Hoshi  
University: 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-0063, Japan; † Corresponding author)

An unknown peak (peak A) was detected in a mass chromatogram of komatsuna extract containing a high concentration of phenthoate (PAP), and it was considered to be O,O,S-trimethyl phosphorodithioate (OOS). Although it is generally known that OOS exists as an impurity in technical malathion and PAP, it has not been reported that OOS is present in crops. Since an OOS standard is not commercially available, OOS was separated and purified from commercial emulsifiable malathion. Peak A was confirmed to be OOS by GC/MS using the purified OOS. The concentration of OOS was estimated to be 0.02  $\mu\text{g/g}$ . It is supposed that OOS was detected in crops because they contained a high concentration of PAP residue.

(Received December 6, 2000)

**Key words:** こまつな komatsuna; フェントエート phenthoate (PAP); O,O,S-トリメチルホスホロジチオエート O,O,S-trimethyl phosphorodithioate; 不純物 impurity; マラチオン malathion; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS; 農作物 crops

#### まえがき

炎光光度型検出器付きガスクロマトグラフィーでフェントエート (以下, PAP) が高濃度 (8  $\mu\text{g/g}$ ) に検出されたこまつなについて, ガスクロマトグラフ/質量分析計で測定したところ, PAPとは異なるピーク (以下, ピーク A) が得られた. このピーク A のマススペクトルをライブラリーで検索したところ, O,O,S-trimethyl phosphorodithioate (以下, OOS) と推定された (Fig. 1, Fig. 2). OOS はマラチオンや PAP などの原体中に不純物として存在していることが知られているが<sup>1)~3)</sup>, OOS が食品から検出された例はない. OOS 標準品の入手が困難であったことから, マラチオン乳剤から OOS を分離精製し, ピーク A の確認を試みた. 併せて定量も行ったので報告する.

#### 実験方法

##### 1. 試料

平成 6 年 8 月に横浜市中央卸売市場から搬入された, こまつな 1 件.

PAP 50% 含有エルサン乳剤 (500 mL, 日産化学工業 (株) 製) 及びマラチオン 50% 含有マラソン乳剤 (500 mL, 三共 (株) 製).

##### 2. 試薬及び標準品

*n*-ヘキサン, アセトン, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用.

フロリジル PR は和光純薬工業 (株) 製を 120°C で一夜加熱し, デシケーター中で放冷後使用.

水は蒸留水 1.5 L を *n*-ヘキサン 200 mL で洗浄した.

10% 塩化ナトリウム水溶液は塩化ナトリウム 100 g に水を加えて 1 L にした.

PAP 標準溶液は和光純薬工業 (株) 製を *n*-ヘキサンで 1,000  $\mu\text{g/mL}$  に調製し, 用時 *n*-ヘキサンで希釈した.

マラチオン乳剤試験溶液はマラチオン 50% 含有マラソ

† 連絡先

\*<sup>1</sup> 横浜市衛生研究所: 〒235-0012 横浜市磯子区滝頭 1-2-17

\*<sup>2</sup> 鎌倉女子大学: 〒247-0051 神奈川県鎌倉市岩瀬 1420

\*<sup>3</sup> 星薬科大学: 〒142-0063 東京都品川区荏原 2-4-41

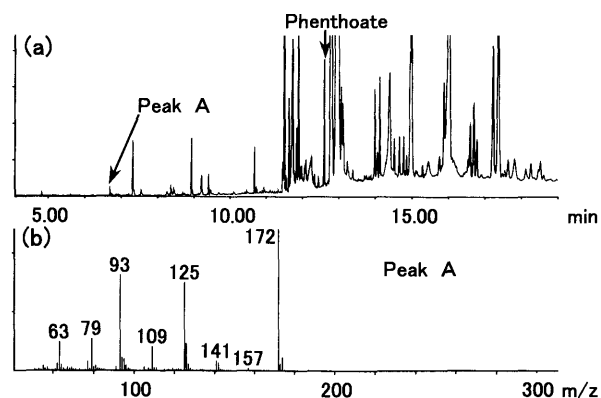


Fig. 1. Total ion chromatogram of komatsuna extract (a) and mass spectrum of peak A by GC/MS-SCAN (b)

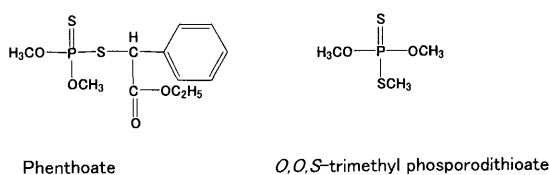


Fig. 2. Chemical structures of phenthoate and *O,O,S*-trimethyl phosphorodithioate

ン乳剤 (500 mL, 三共(株)製) 0.1 g を *n*-ヘキサンで 50 mL とし, 用時 *n*-ヘキサンで希釈した。

OOS 標準溶液は実験方法 4. マラチオン乳剤からの OOS の分離精製で得られた OOS を *n*-ヘキサンで 100  $\mu$ g/mL に調製し, 用時 *n*-ヘキサンで希釈した。

PAP 乳剤試験溶液は PAP 50% 含有エルサン乳剤 (500 mL, 日産化学工業(株)製) 0.1 g を *n*-ヘキサンで 50 mL とし, 用時 *n*-ヘキサンで希釈した。

### 3. 装置及び測定条件

フロリジルカラム: 内径 1.5 cm, 長さ 30 cm のコック付ガラス製カラムに *n*-ヘキサンを注ぎ, 脱脂綿を底部に詰め, フロリジル 20 g を *n*-ヘキサンで湿式充てんしたものを用いた。

ガスクロマトグラフ: Hewlett Packard 社製 HP 6890 Series, 炎光光度型検出器 (FPD) 付き, P モードを用いた。

GC/MS 装置: ガスクロマトグラフは Hewlett Packard 社製 HP 6890 Series, 質量分析計は Hewlett Packard 社製 5973 型を用いた。

GC-FPD 及び GC/MS の測定条件は下記のとおりである。

#### 3.1 GC-FPD 条件

カラム: DB-1 (J&W Scientific 社製), 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m; カラム温度: 50°C (2 min)-20°C/min-290°C (5 min); 注入口温度: 250°C; 検出器温度: 250°C, 注入量: 2  $\mu$ L (スプリットレス)

#### 3.2 GC/MS 条件

カラム: カラム, カラム温度及び注入口温度は

GC-FPD と同一条件; セパレータ温度: 280°C; イオン源温度: 230°C; イオン化電圧: 70 eV; イオン化モード: EI; 注入量: 2  $\mu$ L (スプリットレス)

### 4. マラチオン乳剤からの OOS の分離精製

#### (1) 抽出

1 L の分液漏斗にマラチオン 50% 含有マラソン乳剤 100 g を採り, 塩化ナトリウム 50 g, 水 500 mL, アセトン 100 mL 及び *n*-ヘキサン 200 mL を加え 15 分間振とう抽出した。 *n*-ヘキサン層を分取し 10% 塩化ナトリウム水溶液 300 mL で洗浄を 10 回行った後, *n*-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し, 不純物などが揮散しないように窒素気流下ですべての *n*-ヘキサンを完全に除き, 抽出物を得た。

#### (2) 分離・精製

(1) の抽出物 1 g を採り *n*-ヘキサン 5 mL で溶解し, フロリジルカラムに負荷した後, *n*-ヘキサン 5 mL でカラム内壁を洗い, 5% ジエチルエーテル含有 *n*-ヘキサンで溶出させ, 初めの 55 mL を捨て, 後の 20 mL を OOS の分画として採取した。

別に新しくフロリジルカラムを作成し, これに (1) の抽出物 1 g を負荷して上記と同様に OOS を分画した。この操作を 20 回繰り返して, (1) の抽出物 20 g を処理した。各溶出液を窒素気流下で約 2 mL にした。このうち 1 つの溶出液を 10 mL の試験管に *n*-ヘキサン 6 mL で洗い込みながら移し, 窒素気流下で約 1 mL にした。この試験管に順次溶出液を *n*-ヘキサン 6 mL で洗い込みながら移し, 窒素気流下で約 1 mL にする操作を溶出液が終わるまで繰り返して, 最後に溶媒を完全に除去し, OOS を得た。

### 5. 試験溶液の調製法

細切均一化したこまつな 20 g を採り, アセトン 30 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えて 15 分間振とう後, 遠心分離し *n*-ヘキサン層を 300 mL の分液漏斗に分取した。更に残さに *n*-ヘキサン 50 mL を加えて同様に操作し, *n*-ヘキサン層を合わせた。10% 塩化ナトリウム水溶液 100 mL を加え 5 分間振とう後, *n*-ヘキサン層を分取し, 無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを 200 mL のナス型フラスコに移し, 約 2 mL まで減圧濃縮し, 10 mL の試験管に *n*-ヘキサン 6 mL で洗い込みながら移した。窒素気流下で乾固し, 残留物を *n*-ヘキサンに溶解して 2 mL としたものを試験溶液とした。

### 6. OOS の定性及び定量

試験溶液を GC 装置に注入し, 得られたピークの保持時間及びピーク面積から, OOS の定性と定量を行った。また, GC/MS (SIM,  $m/z$ : 172, 125, 99) で得られたピークの保持時間より, OOS を定性し,  $m/z$  172 のピーク面積で定量した。更に, 試験溶液を濃縮した後, GC/MS-SCAN ( $m/z$  50~500) で OOS を確認した。

## 結果及び考察

### 1. GC/MSによるマラチオン乳剤試験溶液中のOOSの確認

マラチオン乳剤試験溶液をGC/MSで測定を行った結果、OOSのピークが検出され、OOSのマススペクトルも得られたので、マラチオン乳剤中にOOSが存在していることが確認された。

### 2. フロリジルカラムクロマトグラフィーによるマラチオン乳剤からのOOSの分離精製法の検討及び確認

実験方法4.(1)で、抽出物約40gが得られた。この抽出物1gを採り*n*-ヘキサン5mLで溶解し、フロリジルカラムに負荷した後、*n*-ヘキサン5mLでカラム内壁を洗い、5% ジエチルエーテル含有*n*-ヘキサンで溶出させ、10mLずつ10分画を採取した。各分画をGC/MSで測定し、ピークのスเปクトルからOOSの溶出を確認した。その結果、OOSは第1～第5分画では溶出されず、第6分画から溶出されはじめ、第10分画まで溶出された。第6～第8分画で類雑ピークは溶出されず、第9及び第10分画でマラチオン及び他の類雑ピークが溶出された。これらのことから初めの55mLを捨て、後の20mL(第6分画の後半5mL、第7分画10mL及び第8分画前半5mL)をOOSの分画とした。

実験方法4.(2)で残留物約20mgを得た。OOSの標準溶液を調製しGC/MSで確認を試みた。その結果、ピークのマススペクトルはライブラリーのマススペクトルと一致することから、OOSと確認した。また、マスキングクロマトグラム上にはOOS以外のピークは見られなかった(Fig. 3)。

なお、今回はこまつな中のピークAの確認が主目的であり、得られたOOSの純度試験などについては行わなかった。このOOSの標準溶液を用いて定量を試み、OOSの概算値を求めた。

### 3. GC/MSによるこまつな試験溶液中のピークAの確認試験

こまつな試験溶液中のOOSの確認を試みた。OOS標準溶液(10 $\mu$ g/mL)のピークとこまつな試験溶液中のピーク

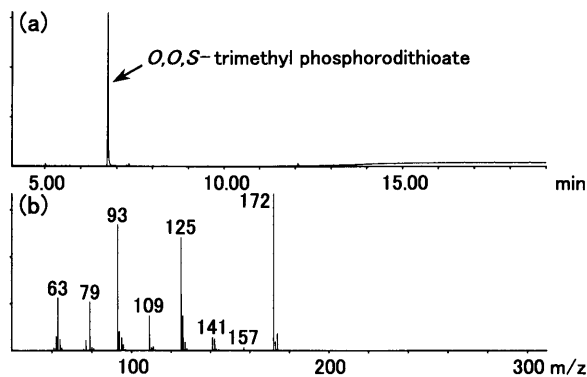


Fig. 3. Total ion chromatogram of purified *O,O,S*-trimethyl phosphorodithioate (a) and mass spectrum by GC/MS-SCAN (b)

Aの保持時間が一致し、更に、マススペクトルの親イオンの *m/z* 172 が一致しており、こまつな試験溶液のピークAをOOSと確認した。

### 4. GC/MSによるPAP乳剤試験溶液中のOOSの確認試験

こまつなからPAPが高濃度検出(8 $\mu$ g/g)されていることから、PAP乳剤中の不純物OOSを検出する目的で、PAP乳剤試験溶液をこまつな試験溶液のピークAの確認試験と同様に測定した結果、OOSの存在が確認された。PAP乳剤試験溶液10 $\mu$ g/mL中OOSは概算値で0.1 $\mu$ g検出された。

### 5. 添加回収試験

OOS及びPAPの残留が認められなかった細切均一化したこまつな20gに標準溶液OOSの2.0及び20.0 $\mu$ gを添加し、5.試験溶液の調製に従い、添加回収試験を行った。その結果(Table 1)、回収率は約84%以上と良好であった。

### 6. こまつな中のOOSの残留

OOS標準溶液をGC-FPD及びGC/MS(SIM, *m/z*:172)で測定しクロマトグラムのピーク面積より検量線を作成した。両検量線は0.01～1.0 $\mu$ g/gの範囲で良好な直線性が得られた。なお、検出限界はいずれも0.001 $\mu$ g/gであった。この検量線から、OOSが概算値で0.02 $\mu$ g/g(PAPが8.0 $\mu$ g/g)検出された(Table 2)。こまつな1.25g中にはPAPが10 $\mu$ g(8 $\mu$ g/g)、OOSは概算値0.03 $\mu$ g(0.02 $\mu$ g/g)残留していた計算になる。このOOSは乳剤試験溶液の含有量の約1/3以下と少ないが、こまつなに農薬として使用されたPAP乳剤中の不純物が残留したものと推定された。OOS標準溶液とこまつな試験溶液のガスクロマトグラムをFig. 4に示した。

Table 1. Recoveries of *O,O,S*-Trimethyl Phosphorodithioate from Komatsuna

| Sample    | Spiked ( $\mu$ g/g) | Recovery (%)   |                         |
|-----------|---------------------|----------------|-------------------------|
|           |                     | GC-FPD         | GC/MS ( <i>m/z</i> 172) |
| Komatsuna | 2.0                 | 94.0 $\pm$ 4.0 | 88.1 $\pm$ 1.8          |
|           | 20.0                | 86.5 $\pm$ 3.4 | 84.1 $\pm$ 3.0          |

Values are mean  $\pm$  S.D. (*n*=5)

Table 2. Contents of *O,O,S*-Trimethyl Phosphorodithioate and Phenthoate in Komatsuna

| Sample    | Concentration ( $\mu$ g/g)                 |                         |            |                         |
|-----------|--|-------------------------|------------|-------------------------|
|           | <i>O,O,S</i> -Trimethyl phosphorodithioate |                         | Phenthoate |                         |
|           | GC-FPD                                     | GC/MS ( <i>m/z</i> 172) | GC-FPD     | GC/MS ( <i>m/z</i> 274) |
| Komatsuna | 0.02*                                      | 0.02*                   | 7.7        | 8.0                     |

\*: Estimated

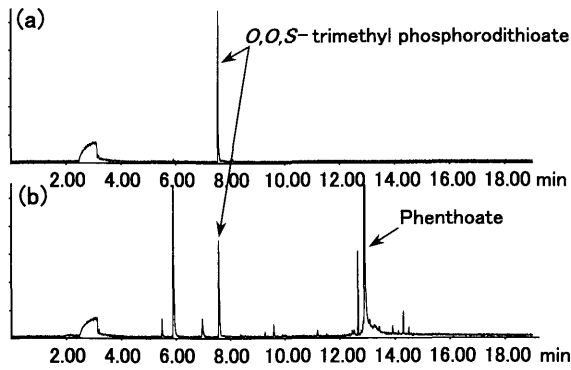


Fig. 4. Gas chromatograms of (a) purified *O,O,S*-trimethyl phosphorodithioate and (b) komatsuna extract by GC-FPD

### まとめ

PAP が高濃度 ( $8 \mu\text{g/g}$ ) 検出されたこまつなから、PAP 製剤の不純物 OOS と思われるピーク A が検出された。OOS の標準品は市販されていなかったが、馬拉チオン乳剤を *n*-ヘキサンで抽出し、抽出物をフロリジルカラムで分離精製し、OOS を得た。この OOS で標準溶液を調製し、GC/MS 及び GC-FPD で確認及び定量を行った。その結果、こまつなのピーク A は OOS であると確認された。また検出値は  $0.02 \mu\text{g/g}$  (概算値) であった。

食品衛生法にはこまつなに PAP の残留基準値は定められていないが、農薬取締法の作物残留に係る登録保留基準値は野菜 (かぼちゃを除く) に  $0.1 \mu\text{g/g}$  と定められてい

る<sup>4)~6)</sup>。こまつなから検出された PAP はこの基準値の約 80 倍と非常に高い値であり、こまつなには PAP の使用が認められていなかった<sup>4)~6)</sup>。今回、農薬製剤の希釈倍率が適正でなく、適用外の農作物に使用されたため、PAP が高濃度残留し、不純物の OOS が農作物から検出されたと考えられた。

### 文 献

- 1) Umetsu, N., Grose, F. H., Allahyari, R., Abu-El-Haj, S., Fukuto, T. R., Effect of impurities on the mammalian toxicity of technical malathion and acephate. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 946-953 (1977).
- 2) Hammondo, P. S., Badawy, S. M. A., March, R. B., Fukuto, T. R., Delayed acute toxicity of *O,O,S*-trimethyl phosphorodithioate and *O,O,S*-trimethyl phosphorotioate to the rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **18**, 90-100 (1982).
- 3) Pellegrini, G., Santi, R., Potentiation of toxicity of organophosphorus compounds containing carboxylic ester functions toward warm-blooded animals by organophosphorus impurities. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 944-950 (1972).
- 4) 農薬残留分析法研究班編“最新農薬の分析法”中央法規出版, 1995, p. 481. (ISBN4-8058-1321-0)
- 5) Sugayama, Y., “Sakumotsu Betsu Nouyaku Hyou”, Tokyo, Nouseon Gyoson Bunka Kyokai, 1990, p. 197. (ISBN4-540-89118-9)
- 6) 農林水産省農薬検査所監修“農薬適用一覧表”日本植物防疫協会, 1996, p. 196.