

農作物中の2,4-D, 2,4,5-Tの分析方法の検討

大沢昌一郎・酒井 洋・富永 泰子・白井 文雄

Method for analyzing residues of 2,4-D and 2,4,5-T in agricultural products

Shoichiro Osawa, Hiroshi Sakai, Yasuko Tominaga and Fumio Shirai

A method for analyzing residues of 2,4-D and 2,4,5-T in agricultural products was developed. The compounds could be analyzed by gas chromatography with ECD after butylation of the sample extract with BF₃ and 1-butanol. Butylation was suitable for microanalysis of 2,4-D and 2,4,5-T. Kato's method was improved by extraction with ethyl acetate before hydrolysis, and could remove interfering substances effectively and easily. By this improved method, good recovery of 2,4-D and 2,4,5-T added to 11 agricultural products was possible. The minimum detectable residues of 2,4-D and 2,4,5-T by this method were 0.02 $\mu\text{g/g}$ and 0.003 $\mu\text{g/g}$, respectively.

1 はじめに

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) は、広葉雑草に選択的な殺草効果を示すフェノキシ系除草剤に属する農薬であり、主にエステル体または塩の形で使用されている¹⁾。わが国では農薬取締法により2,4,5-Tの使用は認められていないが、2,4-Dは水田、畑地等の除草剤としての使用が許可されており、米に0.2 ppmの登録残留基準が設定されている。また、米国で2,4-Dがレモン等の品質保持のためのポストハーベスト農薬として使用されるなど、現在でも諸外国ではこれらの農薬が多用途に使用されている。そのため、これらの農薬の農作物中残留量の監視の必要性が高まってきており、それに対応する分析法の確立が求められている。

2,4-D, 2,4,5-Tの一般的な分析法として、「残留農薬分析法」²⁾で加藤が示している方法(以下、「加藤法」という。)が知られている。これは、2,4-D, 2,4,5-Tのエステルや塩を加水分解することにより遊離酸に変えた後、ブチルエステル誘導体とし、ECD付きガスクロマトグラフ(以下、「ECD-GC」という。)で分析する方法である。しかし、この方法で農作物を分析すると、み

かん、キャベツ等のように農作物の種類によっては、農作物成分由来の妨害物質のためガスクロマトグラフ上に多数の夾雑ピークが現れ、測定不能となることがある。そこで、これらの妨害物質の除去法について検討した。また、併せてブチルエステル化による残留分析の有効性も確認したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

酢酸エチル, *n*-ヘキサン, メタノール, ジエチルエーテル, ジクロロメタン, アセトニトリル, アセトン: 和光純薬工業製, 残留農薬試験用

三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体: 和光純薬工業製, 一級

無水硫酸ナトリウム, 塩化ナトリウム, 1-ブタノール, 水酸化ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム: 和光純薬工業製, 特級

塩酸: 和光純薬工業製, 精密分析用

カラムクロマトグラフィー用フロリジル: Floridin社製フロリジルPR (60~100メッシュ) を130℃で14時間以上活性化したものを用いた。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル: MERCK社

製, Silicagel 60 extrapure (70~200メッシュ) ASTM カラムクロマト用を 130℃で14時間以上活性化したものを用いた。

水: イオン交換水を分液ロートで 1/5 量の *n*-ヘキサンで洗浄したものを用いた。

ブチルエステル化剤: 三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 10 g を 1-ブタノール 25 g に溶かしたものを用いた。

2.2 標準品, 標準溶液

2,4-D: 和光純薬工業製 (純度 99%)

2,4,5-T: ジーエルサイエンス製 (純度 98%)

2,4-D, 2,4,5-T 標準溶液: 2,4-D, 2,4,5-T の標準品 0.1 g をそれぞれアセトン 100 ml に溶解して 1,000 µg/ml の標準溶液とし, これを単独または混合し, アセトンで希釈して使用した。

2.3 装置

ウルトラホモジナイザー: Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Werk Staufen 社製, T25-S2 型

ロータリーエバポレーター: ヤマト科学製, RE-47 型

遠心機: 久保田商事製, 7800

ガスクロマトグラフ: 島津製作所製, GC-6AM 型^(*) Ni-ECD 付)

高速液体クロマトグラフ: 日本分光製, LC-800 シリーズ (紫外分光光度計付)

ブレンダー: 東芝, クッキングカッター CQM-62 型

フラクションコレクター: 東洋濾紙製, SF-160 型

2.4 実験操作

1) 試料の種類及び前処理

試料は大豆, 米, 粟, もも, みかん, ばれいしょ, アスパラガス, ぶどう, たまねぎ, にんじん, キャベツの 11 作物とした。

作物を約 500 g 採取し, 全体をブレンダーで微細均質化したものを分析試料とした。

2) 試験溶液の調製

脂質の多いもの (大豆, 米, 粟) 及び脂質の少ないもの (もも, みかん, ばれいしょ, アスパラガス, ぶどう, たまねぎ, にんじん, キャベツ) のそれぞれについて Fig. 1 に示したフローシートに従って試験溶液を調製した。

3) ガスクロマトグラフィー

Table 1 に示した測定条件で行った。

3 結果および考察

3.1 ブチルエステル化の検討

2,4-D, 2,4,5-T の分析でのブチルエステル化の定量性と最小検出量を, 次の実験により検討した。

2,4-D, 2,4,5-T 各 1.0 µg/ml の混合標準溶液を添加量がそれぞれ 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 µg となるように分取して, 窒素気流中でアセトンを完全に揮散させた。これにブチルエステル化剤 1 ml を加え, 90℃で30分間反応させた後, 5%塩化ナトリウム溶液 50 ml を加え, *n*-ヘキサン 50 ml で 2 回抽出した。次いで, *n*-ヘキサン層を脱水, 濃縮して, *n*-ヘキサンで 10 ml に定容したものを ECD-GC により測定し, 検量線を作成した。クロマトグラム例を Fig. 2 に示すとともに, 検量線を Fig. 3 に示す。

検量線はほぼ原点を通り, しかも高い直線性を示した。また, クロマトグラムから, 2,4-D と 2,4,5-T の最小検出量 (遊離酸として) を SN 比 5 で試算したところ, 2,4-D が 0.06 ng, 2,4,5-T が 0.01 ng であった。以上のことから, ブチルエステル化は微量分析にも有効であり, 定量性の高い反応であることが確認できた。

なお, 2,4-D, 2,4,5-T をクロロエチルエステル化⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾あるいはペンタフルオロベンジル化⁽⁶⁾を行い, ECD-GC での感度を上げる分析法も報告されている。しかし, こうした方法はブチルエステル化より高感度の分析が行えるものの, それに伴って妨害物質の感度も上げてしまう危険性を持っている。このことを考えると, ブチルエステル化の方が 2,4-D, 2,4,5-T の分析には適していると思われる。

3.2 抽出溶媒の検討

加藤法では, 2,4-D, 2,4,5-T の遊離酸の抽出溶媒にジエチルエーテルを用いているが, より適当な抽出溶媒がないか, ジエチルエーテルといくつかの溶媒の抽出効率を比較して検討した。なお, 測定装置は, 最小検出量が 2,4-D で 0.5 ng, 2,4,5-T で 0.1 ng と ECD-GC に比べて感度が低いが誘導体化の必要がない高速液体クロマトグラフ (以下, 「HPLC」という.) を用いた。分析条件を Table 2 に示す。

2,4-D, 2,4,5-T の各 20 µg/ml 混合標準アセトン溶液 1 ml を 5%塩化ナトリウム水溶液 50 ml に添加し, 4 N 塩酸 5 ml を加えた後, *n*-ヘキサン, ジエチルエーテル, ジクロロメタン, 酢酸エチルの各溶媒を 50 ml 加えてそれ

Table 1 Condition for conducting ECD-GC

Apparatus	Shimadzu GC-6AM
Liquid phase	5% OV-17
Support	simalite W (AW DMCS) 80/100 mesh
Column	2 m, 3 mm φ
Column temp.	210℃
Injection temp.	240℃
Detector temp.	240℃
Carrier gas	N ₂ 40 ml/min
Pulse	10 kHz
Sensitivity	100 MΩ
Range	×8
Sample size	2 µl

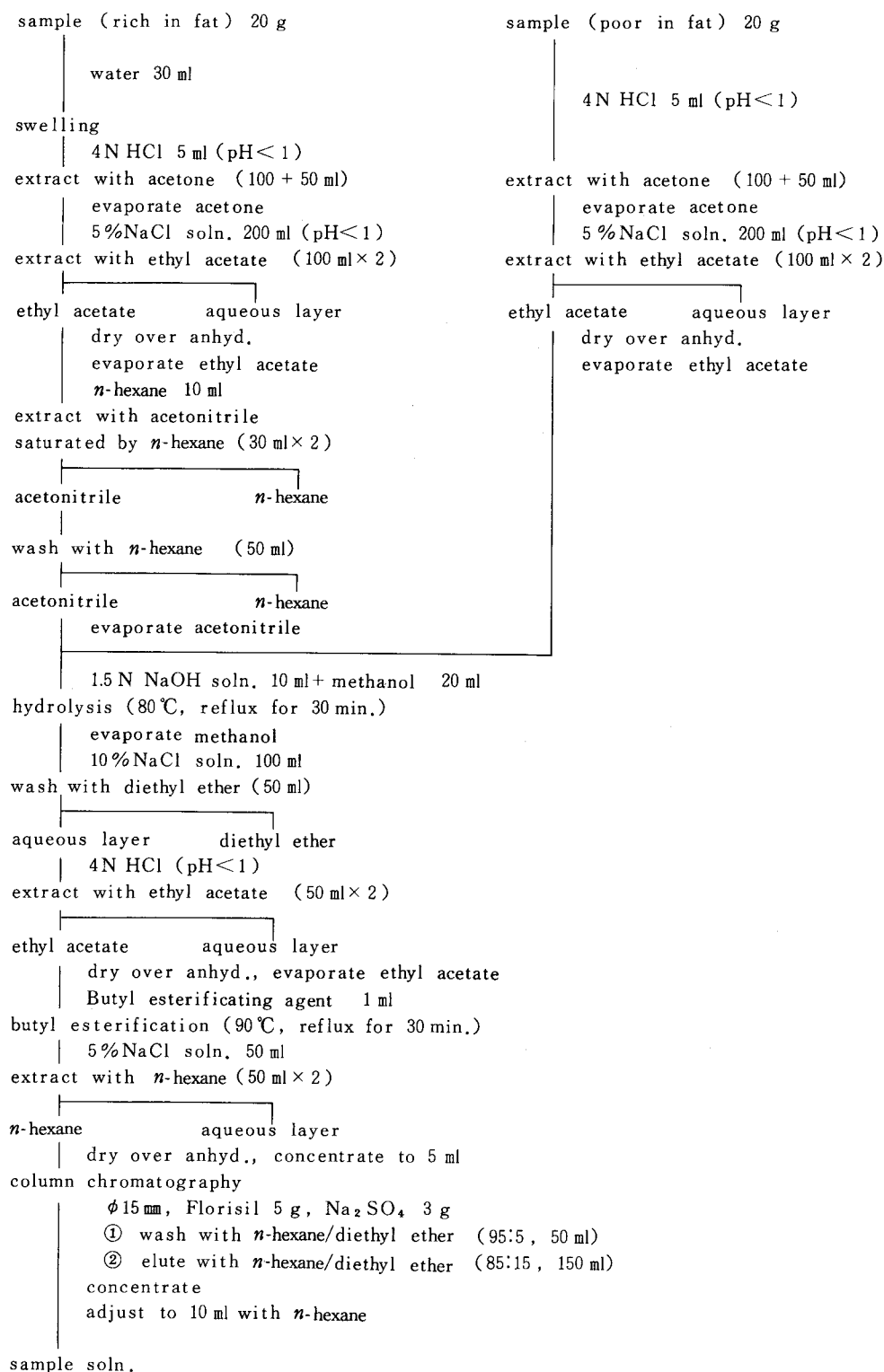


Fig.1 Analyzing method for residues of 2,4-D and 2,4,5-T in agricultural products (improved method)

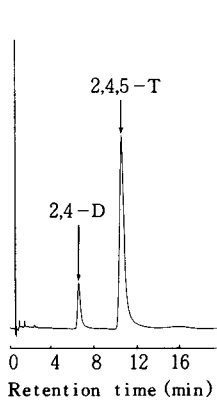


Fig.2 Gas chromatogram of butyl esters of 2,4-D and 2,4,5-T (0.8 ng as 2,4-D or 2,4,5-T)

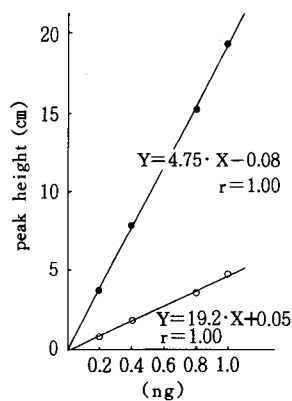


Fig.3 Calibration curves of 2,4-D and 2,4,5-T
○: 2,4-D ●: 2,4,5-T

それぞれ抽出し、溶媒を完全に揮散させた後、残渣をメタノールに溶解し、HPLCにより測定して、各抽出溶媒の抽出効率を比較した。結果をTable 3に示した。

その結果、酢酸エチルの抽出効率が2,4-Dで90.0%, 2,4,5-Tで91.3%といずれもジエチルエーテルより十分高く、変動も少なかった。このことから、抽出溶媒とし

Table 2 Condition for conducting HPLC

Apparatus	Nihonbunkou LC-800 series
Column	inertsil ODS-2 4.6 mm ϕ , 150 mm
Column temp.	40 $^{\circ}$ C
Mobile phase	0.3 M H_2NaPO_4 solution/ methanol: (40/60)
Flow rate	0.5 ml/min
Wave length	240 nm
Range	0.02
Sample size	10 μ l
Detector	UV Nihonbunkou 870-UV

てジエチルエーテルに替えて酢酸エチルを用いることとした。

3.3 精製方法の検討

加藤法で、ガスクロマトグラム上に出現する妨害物質について、その除去法を検討した。

1) フロリジルカラムクロマトグラフィー

加藤法では、ブチルエステル化の後に、フロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行っているが、ここでの妨害物質の除去が可能であることをみかん及びキャベツを用いて検討した。

Table 3 Recovery of 2,4-D and 2,4,5-T by extraction

Solvent	Number of samples	2,4-D		2,4,5-T	
		Mean recovery (%)	C.V. (%)	Mean recovery (%)	C.V. (%)
n-hexane	3	0.0	—	0.0	—
diethyl ether	3	73.6	18.8	71.7	19.1
dichloromethane	3	70.2	29.9	74.5	21.8
ethyl acetate	3	90.0	2.2	91.3	1.9

Table 4 Recovery of 2,4-D and 2,4,5-T from spiked samples

Sample	Number of samples	2,4-D		2,4,5-T	
		Mean recovery (%)	C.V. (%)	Mean recovery (%)	C.V. (%)
Soy bean	3	76.6	6.0	78.3	3.7
Rice	3	74.6	16.1	73.3	9.4
Chest nut	3	86.4	1.9	82.3	1.3
Peach	3	98.2	1.2	82.8	1.0
Orange	3	92.1	4.8	85.5	5.2
White potato	3	87.7	2.9	79.9	4.6
Asparagus	3	83.8	3.7	76.2	2.4
Grape	3	82.2	12.6	80.4	6.3
Onion	3	81.5	4.5	82.3	1.6
Carrot	2	87.8	0.7	76.1	7.4
Cabbage	3	83.7	3.6	83.3	5.0
Tea	3	75.1	4.7	72.2	3.6

みかん、キャベツを加藤法と同様に処理した試料について、フロリジルカラムクロマトグラフィーで留出液をフラクションコレクターで10 mlずつ分画し、この各分画をECD-GCで分析し、妨害物質の留出パターンを調べた。しかし、妨害物質は2,4-Dブチル、2,4,5-Tブチルとはほぼ同一の分画に留出し、フロリジルカラムクロマトグラフィーでは妨害物質の除去が極めて困難であることが分かった。

2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

ブチルエステル化の前段階でのクリーンアップとして、加水分解後にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行う方法について検討した。

みかん、キャベツを加藤法と同様に処理し、ブチルエステル化する前の試料を脱水、乾固し、アセトン5 mlで、シリカゲル2 g、硫酸ナトリウム1 gを入れた内径10 mmのカラム管に注入した。その後、メタノール1%含有アセトン300 mlで留出させ、フラクションコレクターを用いて10 mlずつ分画し、各分画ごとにブチルエステル化を行い、*n*-ヘキサン抽出、フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製してECD-GCで分析した。その結果、妨害物質は2,4-D、2,4,5-Tとはほぼ同一の分画に留出し、ブチルエステル化の前にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作を行っても殆ど効果がないことが分かった。

3) 溶媒抽出による精製

加水分解の前に酢酸エチル抽出を行い、水溶性夾雑物質の除去を試みた。

みかん、キャベツをそれぞれアセトン抽出し、アセトン留去後の試料に5%塩化ナトリウム溶液200 mlを加え、3.2で抽出効率の良かった酢酸エチル100 mlで2回抽出し、以後は加藤法で処理を行った。その結果、妨害物質が大幅に除去された。

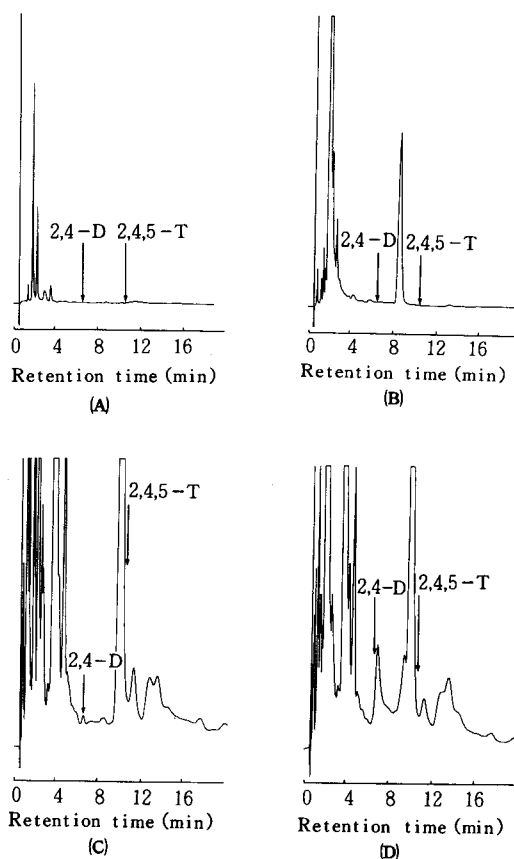
しかし、この方法では抽出操作を繰り返すために、操作が煩雑になってしまう。そこでFig.1のように、加水分解後に行った炭酸水素ナトリウムによる弱アルカリ性溶液での逆抽出による精製操作に替え、加水分解終了時のアルカリ性状態のままジエチルエーテルによる洗浄操作を行った（以下、「改良法」という。）。

この方法で、みかんとキャベツについて処理してみたところ、加藤法の加水分解前に酢酸エチル抽出を加えた方法と同程度に妨害物質を除去できた。

加藤法と改良法で、みかんとキャベツをそれぞれ処理し、ECD-GCで分析したクロマトグラムをFig.4に示す。精製の効果に明らかな違いが認められ、改良法の精製操作が非常に有効であることが分かった。

3.4 添加回収試験

改良法が、種々の農作物中の残留分析法として適用可能かどうかを判断するため、農産物11品目について添加



A: orange (improved method) B: cabbage (improved method)
C: orange (Kato's method) D: cabbage (Kato's method)

Fig.4 Gas chromatograms of samples

回収試験を行った。

微細均質化した試料20 gに2,4-D、2,4,5-Tがそれぞれ0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように2 $\mu\text{g/ml}$ の混合標準溶液を2 ml添加し、室温で30分間放置後2.4に従って抽出分離して回収率を求めた結果をTable 4に示す。いずれも回収率70%以上の良好な結果が得られ、実際の作物の分析に適用可能であることが確認できた。

3.5 定量限界

試料量20 g、試験溶液量10 mlとして、3.1で示したガスクロマトグラフィーの最小検出量から本法の定量限界を求めたところ、2,4-Dが0.02 $\mu\text{g/g}$ 、2,4,5-Tが0.003 $\mu\text{g/g}$ であった。

4 ま と め

農作物中の2,4-D、2,4,5-Tの分析法である加藤法で除去できない妨害物質の精製方法について検討した。その結果、加水分解の前に酢酸エチル抽出を行うことにより、妨害物質の影響を受けにくい分析法を作成できた。

また、ブチルエステル化は、2,4-D, 2,4,5-Tの微量分析に有効な方法であることが確認できた。本法における定量限界は2,4-Dが0.02 $\mu\text{g/g}$, 2,4,5-Tが0.003 $\mu\text{g/g}$ であった。

参 考 文 献

- 1) 農薬ハンドブック編集委員会編：農薬ハンドブック 1989年版, p.270 (1989), (日本植物防疫協会)。
- 2) 後藤真康, 加藤誠哉：残留農薬分析法, p.206 (1980), (ソフトサイエンス社)。
- 3) Agemian H. and Chau A.S.Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **60**, 1070 (1977)。
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課編：残留農薬分析法 (Draft), p.66 (1985), (日本食品衛生協会)。
- 5) Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs, Rijswijk-Netherlands: Analytical Methods for Residues of Pesticides, 5th edition, p.71 (1988)。
- 6) Chau A.S.Y. and Terry K.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 1294 (1975)。