

固相抽出法を用いた 2, 4-D 残留分析法の簡便化

大崎佳徳*

A Simple Procedure of 2, 4-D Residue Analysis
by Solid Phase Extraction Method

Yoshinori OHSAKI

高知県農業技術センター研究報告 第3号 別刷 (1994. 2)

平成 6 年 2 月

Reprinted from BULLETIN OF THE
KOCHI AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
(NANKOKU, KOCHI, JAPAN)

固相抽出法を用いた 2, 4-D 残留分析法の簡便化

大崎佳徳*

A Simple Procedure of 2, 4-D Residue Analysis by Solid Phase Extraction Method

Yoshinori OHSAKI

要 約

固相抽出法を用いて、2, 4-D 残留分析法の簡便化について検討した。

1. 試料溶液の PH を 1 ~ 2 にすることで、従来の液々分配と同様に 2, 4-D を試料から抽出することが可能であった。また、固相からの溶出溶媒はエチルエーテル、酢酸エチルが有効であった。
2. 玄米の場合、試料量が 5 g 以内であれば酸性アセトン抽出液中の 2, 4-D を他の精製操作なしに C18 カラムに保持させることが可能であり、回収率はほぼ 90% 以上であった。
3. 酸性アセトン抽出液をアセトニトリル / n-ヘキサン分配で精製することにより、試料量が 10 g でも 2, 4-D を保持させることが可能であった。

キーワード : 2, 4-D, 分析法, 残留, 固相抽出法

は じ め に

2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (以下 2, 4-D と記す) は水稲および芝等の広葉雑草を対象とした除草剤として使用されている。筆者は玄米の 2, 4-D を分析する機会があり、既存の残留分析法にもとづいて分析を行った。その際、液々分配の操作が繁雑、分析時間が長い、回収率がばらつく等の理由により満足な分析結果が得られない場合があった。

2, 4-D の残留分析には、一般的に後藤、加藤の方法²⁾、環境庁告示法³⁾が用いられているが、両法とも酸性条件で有機溶媒により 2, 4-D を抽出し、液々分配による精製の後、ブチル化、フロリジルカラムによる精製を行って ECD-GC により定量する。これらの分析法では液々分配を繰り返すため、前述のような問題点がある。

近年、オクタデシル基等の官能基を結合した化学結合型シリカゲルや活性化したフロリジル®、シリカゲル等を充填した固相抽出カラムといわれるミニ

カラムが普及してきており、残留農薬の分析においても従来の液々分配やクロマト管でのクリンアップに代えて使用されている。今回、2, 4-D の分析にこれらの資材を使用することにより、分析法の簡便化を図ることができたのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 試 薬

有機溶媒はすべて残留農薬試験用を使用した。ただし、アセトン、n-ヘキサンは試薬特級を蒸留したもの、1-ブタノールは試薬特級を使用した。固相抽出カラムは VARIAN MEGA BOND ELUT® C18、充填量 1 g のもの (以下 C18 カラムと記す) および WATERS SepPAK® フロリジルを使用した。塩化ナトリウム、塩酸は試薬特級、三フッ化ホウ素エチルエーテル錯体は試薬 1 級、無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を使用した。水は水道水を逆浸透後、イオン交換樹脂をとおり、蒸留処理したもの

* 高知県農業技術センター 環境保全科

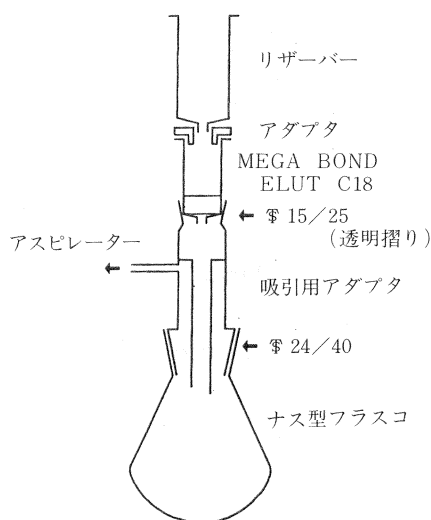
を使用した。ブチル化剤は三フッ化ホウ素エチルエーテル錯体と1-ブタノールを重量比で2:5に混合したものを使用した。2,4-D標準品は残留農薬試験用を使用した。

2. 供試試料

玄米は、無処理区として2,4-Dを使用していない圃場から収穫し、ガスクロマトグラフ上で2,4-D由来のピークがないことを確認したものを使用した。

3. 装 置

GCは島津GC-14A（クリーンECD）、ロータリーエバポレーターはN-2型、アスピレーターはA-2S型（いずれも東京理器器械社製）、超高速ホモジナイザーはBIOTRON SM4型、振とう機はイワキ社製V-DN型、ウォーターバスはヤマト科学製BS-69型、コーヒーマルは日立製CM-602型、PHメーターは東亜電波製HM-50S型、吸引用アダプタ（ガラス製）は第1図に示したものを使用した。



第1図 C18カラム流下装置

4. 分析法

玄米をコーヒーマルで粉碎し、300ml容のトールビーカーに5g精秤する。蒸留水10ml、6規定塩酸5ml、アセトン100mlを加えて超高速ホモジナイザーで1分間ホモジナイズする。それを桐山ロートを用いて吸引ろ過する。ビーカー内およびロート上の残

さをアセトン約50mlで洗浄する。ろ液を500ml容ナス型フラスコに集め、ロータリーエバポレーターで約15mlまで濃縮する。C18カラムおよびリザーバーを第1図のように取り付ける。アスピレーターで吸引しながらアセトン、メタノール、0.1規定塩酸の順に各5mlを流した後（以下コンディショニングと記す）C18カラムに濃縮液を注ぐ。ナス型フラスコ内をアセトニトリル/0.1規定塩酸（1:9）混液10mlで洗い、その液で固相を洗浄する。続いてn-ヘキサン20mlで固相を洗浄する。次に、エチルエーテル15mlを流して2,4-Dを溶出する。C18カラムを外し、アダプタ内をエチルエーテル10mlで洗浄する。溶出液を集め、アセトン30mlを加え、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去する。窒素気流で乾固後、ブチル化剤1mlを加え、湯浴上で90℃、30分加熱する。放冷後、200ml容分液ロートに5%食塩水50ml、n-ヘキサン50mlを用いて洗い込む。5分間振とうし、静置後、n-ヘキサン層を取る。さらにn-ヘキサン50mlを加え、同様の操作を繰り返す。無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を留去する。窒素気流で乾固後、n-ヘキサン5mlで定容とする。注射筒の先にSepPAKフロリジルカートリッジを着け、n-ヘキサン10mlでカートリッジを洗浄する。定容にした5mlの内4mlを、ホールピペットで注射筒に移す。プランジャを押して、試料溶液をカートリッジに保持させる。次に、エチルエーテル/n-ヘキサン（3:7）混液30mlで溶出する。溶出液を集め濃縮し、窒素気流で乾固させ、n-ヘキサン2mlで定容として、GC注入用試料とする。

なお、2,4-Dのエステル化合物については、後藤、加藤の方法²⁾、環境庁告示法³⁾とも酸の形に加水分解後、抽出しているため、今回は検討していない。

5. ガスクロマトグラフィー条件

装 置：島津GC-14A（クリーンECD）

カラム：DB-5（J&W社製）

内 径0.25mm×長さ30m×膜厚0.25μm

温 度：注入口250℃ 検出器280℃

カラム槽：50℃（1分）～20℃/分～170℃（0分）～5℃/分～190℃（0分）～20℃/分～230℃（20分）

キャリアガス：ヘリウム 1.5kg/cm²

メイクアップガス：窒素 0.25kg/cm²

パージガス：窒素 1kg/cm² 注入量：2μl

セル電流：0.5 n A 保持時間：13.3分

検出限界：最小検出量0.04n g, G C注入量2ul, 最終定容2 ml, 試料5 g, 途中で4 / 5分取するので検出限界は

$$0.04\text{ n g} \times 10^{-3} \times \frac{2\text{ ml}}{2\text{ ul} \times 10^{-3}} \times \frac{5\text{ ml}}{4\text{ ml}} \times \frac{1}{5\text{ g}} = 0.01\text{ ppm}$$

となる。

6. 検討事項

試験1. 試料溶液のpHとC18カラムからの回収率との関係

塩酸もしくは水酸化ナトリウム溶液でpH1～6まで1ごとに調整した蒸留水50mlに、2,4-Dをそれぞれ2.5ugずつ添加し、回収率を調べた。方法は前記の分析法のコンディショニング以降の操作に準じたが、溶出溶媒(エチルエーテル)は5 mlとし、クリンアップは行わず、最終定容は5 mlとした。なお、反復は2回行った。(以下、試験4まで同様。ただし、試験2のみ反復なし)

試験2. 溶出溶媒の種類とC18カラムからの回収率との関係

試験1と同様にpHを1に調整した蒸留水50mlに2,4-Dをそれぞれ2.5ugずつ添加し、溶出溶媒を変えて回収率を調べた。溶媒はアセトニトリル、酢酸エチル、エチルエーテル、ジクロロメタン、n-ヘキサンとした。なお、溶媒の量は5 mlずつ4回流したが、ブチル化は最初の5 mlとあとの15 mlとに分割した。(n-ヘキサンは除く)

試験3. 試料量(玄米)とC18カラムからの回収率との関係

玄米試料10 gを使用して添加回収試験を行ったところ、回収率が20～40%と低かった。そこで試料量

を1～5 gまで1 gおきに設定し、回収率を調べた。なお、添加量はそれぞれ1 ugとした。

試験4. アセトニトリル／n-ヘキサン分配による精製が回収率に与える影響

玄米試料の場合油脂等の物質が多く、固相の保持容量を越している可能性が考えられたので、C18カラム処理の前にアセトニトリル／n-ヘキサン分配による精製行程を入れた。玄米5 g, 10 gを用い、アセトン留去後の残液を300ml容分液ロートにn-ヘキサン60mlで洗い込み、アセトニトリル60mlと40 mlの2回抽出を行った。その後、アセトニトリルを約5 mlまで濃縮し、0.1規定塩酸50mlで希釈し、分析法に従い、回収率を調べた。添加量は試験3と同様とした。

結 果

試験1. 試料溶液のpHとC18カラムからの回収率との関係

pHが1～2では90%以上の回収率が得られたが、pH3以上ではpHが高くなるにつれて回収率は低下した(第1表)。

試験2. 溶出溶媒の種類とC18カラムからの回収率との関係

エチルエーテル、酢酸エチルでは回収率が90%以上と良好であり、溶出に必要な量も5 mlと少なかった。ジクロロメタンでは20ml流した場合、80%程度

第1表 試料溶液のpHの違いによるC18カラムの回収率

pH	1	2	3	4	5	6
回収率(%)	95.9	95.0	82.6	61.6	34.6	21.6

第2表 溶出溶媒の違いによるC18カラムからの回収率

溶出分画(ml)	アセトニトリル	エチルエーテル	酢酸エチル	ジクロロメタン	n-ヘキサン
0～5	57.8	90.6	95.6	67.8	—
5～20	0.0	0.0	0.0	14.4	—
合 計	57.8	90.6	95.6	82.2	0.0

注) n-ヘキサンは分割にせずに20mlのみ

溶出分画5～20mlは、5 ml×3回で溶出したものを合わせてブチル化

の回収率が得られたが、先の2種類の溶媒に比べると回収率は低く、溶媒使用量も多かった。アセトニトリルについては回収率は57.8%と低く、20ml流した場合でも回収率の変化はなかった。

n-ヘキサンは20ml流しても2,4-Dは溶出しなかった(第2表)。

試験3. 試料量(玄米)とC18カラムからの回収率との関係

1~5gの範囲では、3gの回収率が76.2%とやや低かったものの、その他は90%以上の回収率が得られた。玄米の場合、試料5gまでであれば2,4-DのC18カラムへの保持は可能であった(第3表)。3gの回収率が76.2%であった要因としては、溶媒留去時に一部揮散したか、ブチル化が充分でなかったかのいずれかと考えられる。残留分析の場合、回収率は最低70%が目安であり、ばらつきは大きかったが分析法としての精度は確保できているものと考えられる。

試験4 アセトニトリル/n-ヘキサン分配による精製が回収率に与える影響

玄米5gを供試した場合の回収率は102%、10gでは95.6%であり、アセトニトリル/n-ヘキサン分配による精製の効果が認められた。(第4表)

第3表 試料量(玄米)の違いによる回収率

試料量(g)	1	2	3	4	5
回収率(%)	92.1	91.2	76.2	105	97.7

注) 溶出溶媒はエチルエーテル15ml使用

第4表 玄米試料でのアセトニトリル/n-ヘキサン分配による精製後の回収率

試料量(g)	5	10
回収率(%)	102	95.6

注) 溶出溶媒はエチルエーテル15ml使用

考 察

今回液々分配の代わりに使用した固相抽出カラムは、オクタデシル基をシリカゲルに結合させたものであり、極性の低い有機物、すなわち油脂等の水に溶けにくい物質から、農薬では水溶解度25,000mg/l程度までの物質を保持することができる⁸⁾。2,4-

DはpKa2.94¹⁾という強酸性の物質であり、従来の分析法においても塩酸を加えて試料溶液をpH1程度にすることで、イオン化を抑制し有機溶媒層へ抽出を行っている。今回の分析法はこの性質を利用してC18カラムに保持させ、抽出を簡便化しようとするものである。

pHについては高くなるに従い回収率は低下し(試験1)、イオン性の物質としての性質が強くなっていることを示している。

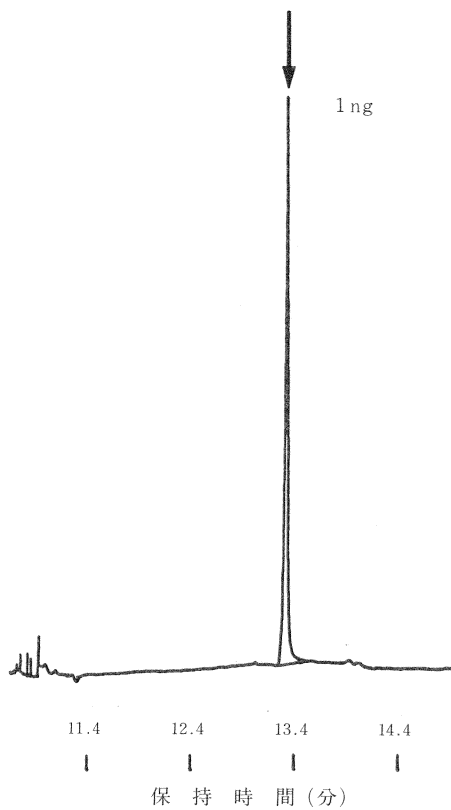
溶出溶媒についてはエチルエーテル、酢酸エチルのような中極性溶媒の回収率が高くなった(試験2)。築地⁷⁾によれば、液々分配ではpH3でも水層からの抽出率はエチルエーテルで94%程度、ジクロロメタンでは95%と十分な回収率が得られているが、振とう抽出のように分配が平衡に達するまで操作する場合と、今回のように固相との接触時間が限られるような場合とでは、抽出効率も変化することも考えられる。今回、カラムを通過させた有機溶媒の流速は50ml/分程度とかなり速かったため、溶出力の弱い溶媒では十分な回収率が得られなかったものと考えられる。

試料量と回収率の関係では、当初玄米試料10gを用いて添加回収試験を行ったところ、回収率が20~40%程度であった。その原因として、固相の保持容量の不足が考えられたので、保持容量と回収率の関係を試料量を変化させて調べた(試験3)。1g~5gの範囲では、ばらつきはあったものの回収率の大きな低下はなく、玄米試料の場合5gまでであれば分析可能であることがわかった。今回使用したオクタデシル基を結合したタイプでは、無極性の物質を非選択的に保持するため、油分を多く含む試料では保持容量を大きくする必要があるといわれている¹⁾。しかし、ODANAKAらによれば、玄米20gからの抽出物に添加した水溶解度2600mg/l以下の7種類のカーバメート系農薬は固相量0.5gのカラムでも保持されている⁸⁾ことから、この点については検討が必要であろう。

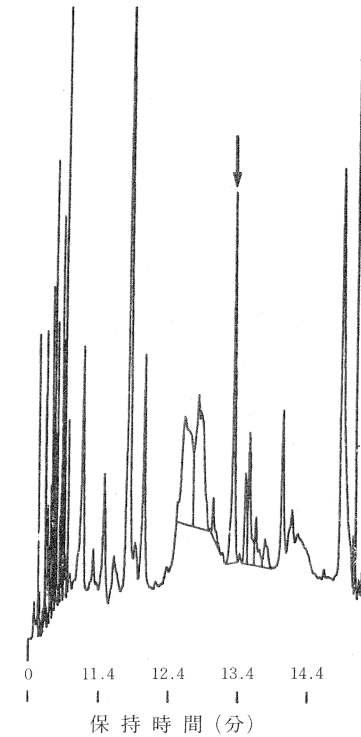
また、固相の保持容量不足の原因が玄米中の油分ではないかと考えられたので、アセトン抽出物をアセトニトリル/n-ヘキサン分配により精製した(試験4)。その結果、10gでも回収率が95.6%と向上した。玄米の場合は油分が多いことに加え、乾物率が高く、野菜等に比べ実質的な試料量が多いことも影響していると考えられる。

今回検討した分析法では、従来200～300mlのエチルエーテル等を用い、2～3回に分けて振とう抽出

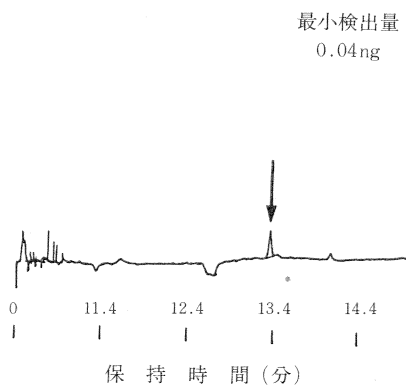
していた液々分配の行程を、C18カラムを使用することで溶媒量を1/10、時間的にも1/5程度に削



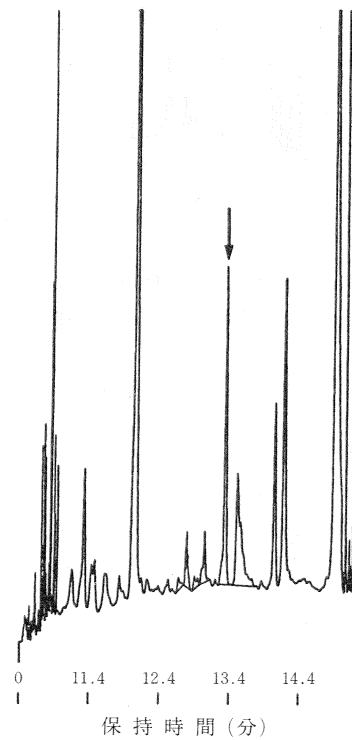
(a) 2,4-Dブチル標準溶液



(c) 固相抽出法による添加回収試験



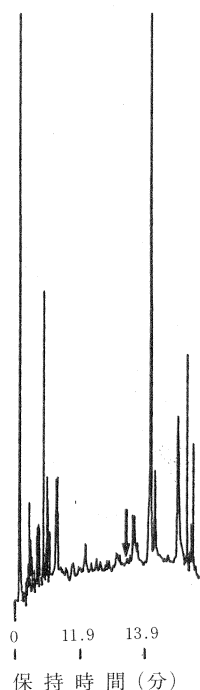
(b) 2,4-Dブチル標準溶液



(d) 後藤・加藤の方法による添加回収試験

減することが可能となった。カラムクリンアップについては今回検討していないが、従来のオープンカラムに代えてフロリジルミニカラムを使用することで、短時間に、かつ溶媒使用量も非常に少なくすることができた。回収率やクロマトグラムも従来法と変わらず（第2図）、2,4-Dの簡便な分析法と考えられる。

また、固相抽出法はODANAKA⁸⁾、西田⁵⁾が果実や水田使用農薬への応用についても検討しており、2,4-Dだけでなく、他の農薬との同時分析も可能なことなどメリットの多い分析法と思われる。



(e) 固相抽出法による無処理区

第2図 ガスクロマトグラムの一例

引用文献

- 1) Charles R Worthing・Raymond J Hance 編 (1991). *Pesticide Manual* 9th Edition. p.218-220.
- 2) 後藤真康・加藤誠哉 (1980). 残留農薬分析法 東京. ソフトサイエンス社. p.208-210.
- 3) 農薬環境保全対策研究会編 (1990). 農薬登録 保留基準ハンドブック. 東京. 化学工業日報社. p.61-63.
- 4) K. C. ヴァン ホーン編 (1986). 固相抽出法 ハンドブック. 東京. ユニフレックス. p.22-24. p.44. P.51.
- 5) 西田真由美, 富山成人, 小林裕子, 俣野修身 (1991). 水田用農薬の多成分残留分析法. 第15回農薬残留分析研究会資料集: 39-45.
- 6) 富山尚美, 小田中芳次, 飯塚太由, 俣野修身, 後藤真康 (1988). C18固相抽出カートリッジを利用した残留分析法の簡略化. 第12回農薬残留分析研究会資料集: 11-17.
- 7) 築地邦晃 (1985). 2,4,5-T系除草剤埋没周辺土壌の残留分析. 第9回農薬残留分析研究会要旨集: 50-54.
- 8) Yoshitugu ODANAKA・Naomi TOMIYAMA・Yukiko KOMA・Osami MATANO・Shinko GOTO (1991). The Use of Solid Phase Extraction for Pesticide Residue Analysis of Crops: An Alternative to Liquid-Liquid Partitioning. *J. Pesticide Sci.* 16: 247-255.