土壌中の 2-methyl-4-chlorophenoxyaceto hydrazide (MCPH) および 4-methyl-2, 6-di-*tert*-butylphenyl *N*-methylcarbamate (MBPMC) の残留分析法

秋 場 利 子, 長谷川義起, 広 瀬 一 豊

財団法人 川村理化学研究所

(昭和 52 年 4 月 5 日受理)

Determination of the Mixture of Residues of MCPH and MBPMC in Soil

Toshiko AKIBA, Yoshiki HASEGAWA and Kazutoyo HIROSE

Kawamura Institute of Chemical Research, Urawa, Saitama 338, Japan

The method for analysis of residues of MCPH (2-methyl-4-chlorophenoxyaceto hydrazide) and MBPMC (4-methyl-2, 6-di-*tert*-butylphenyl-*N*-methylcarbamate) in soil was established by using gaschromatograph, equipped with an electron capture detector. The procedure is as follows: (1) Residue of MCPH in soil was extracted with acetone under the condition of below pH 1, and the extract was hydrolyzed with 20% hydrochloric acid at 75°C for 30 min. The hydrolysate was esterified with trifluoroethanol by using boron-trifluorid ether complex as catalyst at 80°C for 1 hr. The esterized product was analyzed by gaschromatography. (2) Residue of MBPMC in soil was extracted with methanol, and acetylated with trifluoroacetic anhydrid for 48 hr at room temperature after cleaned up by Florisil column chromatography. The acetylated product determined by gas chromatography. In MCPH, the recoveries from the samples fortified at the levels of 3.6 ppm to 0.36 ppm were ranged from 100% to 101%, and in MBPMC, the recoveries from the samples fortified at the levels of 5 ppm to 0.5 ppm derived from 94% to 98%.

緒 言

BHC, DDT など残留性の強い農薬の大量使用による食品や環境汚染が国際的にも重要な問題となったことにかんがみ, わが国でも昭和 46 年に農薬取締法が改正され BHC, DDT などの販売が禁止されるとともに, すべての農薬の登録申請に際し, 作物および土壌についての残留性の試験成績を提出することが義務づけられた。したがって新農薬の開発に際しては選択性と感度, 精度のすぐれた微量分析法を開発することが重要な課題となっている。著者らは, 芝用の除草剤として, フェノキシ酢酸系除草剤 2-methyl-4-chlorophenoxyaceto hydrazide

(MCPH) とカーバメート系除草剤 4-methyl-2, 6-di-*tert*-butylphenyl *N*-methylcarbamate (MBPMC) の混合剤の開発に伴い, 土壌中の両成分を分離定量する方法を開発した。

フェノキシ酢酸系農薬の分析法としてはすでにクロルエステル化¹⁾, ヨウ素化²⁾, ブロム化³⁾, ニトロ化⁴⁾等を行なったのち電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (ECD-GC) で定量する方法が報告されているが, 著者らは新たに MCPH を加水分解して 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCP) とし, トリフルオルエタノールでトリフルオルエチルエステルとして定量する方法を確立した, また, カーバメート系農薬についてはこれ

を加水分解したのち、吸光光度法⁵⁾、あるいはモノーあるいは トリー、ハロゲノアセチル化⁶⁻⁹⁾、またはジニトロフェニル化した¹⁰⁻¹²⁾ のち電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフィー (ECD-GC) で定量する方法があり、また各種カーバメート系農薬の残留分析法について多数の試み¹³⁾が報告されている。そして、より選択性の高い方法としてカーバメートを直接トリフルオルアセチル化して GC に供する方法が Lau らによって Landrin に応用され¹⁴⁾、さらに宮田ら⁷⁾、上路ら¹⁵⁾、関田ら¹⁶⁾によって多くのカーバメート剤への応用が試みられているが、MBPMC については検討されていない。そこで著者らはこの方法を MBPMC に適用するため反応条件を検討し分析法を確立した。この方法を用いて土壤中の両成分を分析し、おのおのの成分が他の成分の定量を妨害せず、良好な結果が得られたので報告する。

実験試薬および装置

1. 試 薬

1) メタノール、ジクロロメタン、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エーテル、アセトン：関東化学(株)製 残留農薬試験用

2) 無水トリフルオル酢酸：東京化成(株)製 特級試薬

3) 2,2,2-トリフルオルエタノール：半井化学薬品(株)製 特級試薬

4) ボロントリフルオリドエーテル溶液：森田化学(株)製 特級試薬

5) 2-メチル-4-クロロフェノキシ酢酸 (MCP)：東京化成(株)製 特級試薬

6) 塩酸：和光純薬(株)製 精密分析用

7) 無水硫酸ナトリウム：関東化学(株)製 特級試薬

8) α -BHC：ガスクロ工業(株)製 標準品 (純度 99%以上) mp 159~160°C

9) ペンタクロロフェニルアセテート (CPA)：呉羽化学(株)より譲渡されたものを mp 151~152°C になるまでベンゼンで再結晶して使用した。

10) MCPH：大日本インキ化学(株)より譲渡されたもの (純度 99% 以上) を mp 147°C になるまでアセトンで再結晶して使用した。

11) MBPMC：大日本インキ化学(株)より譲渡されたもの (純度 99% 以上) を mp 201~202°C になるまで再結晶して使用した。

12) α -BHC 標準溶液：*n*-ヘキサン 1ml 中に α -BHC 0.2 μ g を含有する。

13) CPA 標準溶液：*n*-ヘキサン 1ml 中に CPA

0.5 μ g を含有する。

14) MCPH 標準溶液：アセトン 1ml 中に MCPH 0.36 μ g を含有する。

15) MBPMC 標準溶液：メタノール 1ml 中に MBPMC 1 μ g を含有する。

16) フロリジル：フロリジル社製 60~100 メッシュ 10% 重量の水を加えて6時間振とうしたのち使用した。

2. 装 置

1) ガスクロマトグラフ：島津製作所(株)製 GC-4 BM 型 [ECD (⁶³Ni)]

2) NMR：日本電子製 JNM 4H-100 (100MHz)

3) クロマト管：内径 1.5cm、長さ 50cm のコック付ガラス管。

4) 振とう抽出器：入江商会(株)製

5) ロータリーエバポレーター：東京理化工機(株)製

3. 供試土壌

千葉県農業試験場より入手した洪積層火山灰壤土、および静岡県農業試験場高冷地分場より入手した富士火山灰壤土を用いた。

実験方法

1. MCPH

1) 検量線の作成

MCP を用いて MCPH 換算で 20, 40, 60, 80 ppm を含有するアセトン溶液を調製し、この 1ml をとり窒素を通じて乾固する。以下 3) の方法に従って ECD-GC 用検液を調製し、この検液について得られたガスクロマトグラムより、MCP のトリフルオルエチルエステル化物と α -BHC のピーク面積比を求め、MCPH と α -BHC の濃度比に対する検量線を作成する。

2) 土壌からの抽出方法

土壌試料 25g、アセトン 100ml を 500ml の共栓付三角フラスコにとり、塩酸で pH 1 以下としたのち 30 分間振とうする。濾紙 No. 5C にて吸引濾過し、さらにアセトン 100ml にて濾紙上の残渣をよく洗浄する。濾液をロータリーエバポレーターで 50°C にて 20~30ml に濃縮し、これに 20% 塩酸 10ml を加え還流冷却器を付けて 75°C にて 30 分間加熱し、MCPH を MCP に加水分解する。冷後、反応液に水 50ml を加えエーテル-*n*-ヘキサン混合溶媒 (3:1) 50ml ずつで 2 回振とう抽出する。有機溶媒層を合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水後、クデルナ・ダニッシュ濃縮器 (K-D 濃縮器) で 1ml に濃縮し、窒素を通じて溶媒を完全に揮散させる。

3) トリフルオルエチルエステル化

2) で得られた残留物にトリフルオルエタノール 0.5

ml, およびボロントリフルオリドエーテル溶液 0.5 ml を加え, 還流冷却器を付けて 80°C にて 1 時間加熱する。冷後, 水 1~2 ml を加え, *n*-ヘキサン 10 ml ずつで 2 回振とう抽出する。*n*-ヘキサン層を水 20 ml ずつで 2 回水洗したのち, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 50 ml のメスフラスコに移し, さらに *n*-ヘキサンを加えて全容を 50 ml とする。この溶液から正確に 2 ml または 5 ml を 10 ml の共栓付試験管にとり, これに α -BHC 標準溶液 1 ml を正確に加え, さらに *n*-ヘキサンで全容を 10 ml とし, ECD-GC 用検液とする。

2. MBPMC

1) 検量線の作成

MBPMC を 2.5, 5.0, 7.0, 10.0, 20.0 ppm 含む酢酸エチル溶液を調製し, 3) の方法に従って ECD-GC 用検液を作成する。この検液について得られたガスクロマトグラムより, MBPMC の N-TFA 化物と CPA のピーク面積比を求め, MBPMC と CPA の濃度比に対する検量線を作成する。

2) 土壌からの抽出方法

土壌試料 50 g, メタノール 150 ml を共栓付三角フラスコにとり, 1 時間振とうしたのち濾紙 No. 5C を用いて吸引濾過する。濾紙上の残渣をメタノール 100 ml を用いてよく洗浄し, 濾液を K-D 濃縮器を用いて 60°C で 1 ml に減圧濃縮し, 濃縮物をジクロルメタン 5 ml に溶解する。そして, ジクロルメタンで湿式法により 10% 含水フロリジル 9 g を詰めたクロマト管にジクロルメタン溶液を注入し, 少量のジクロルメタンでクロマト管の壁を洗浄後, ジクロルメタン 150 ml で溶出を行なう。溶出液は K-D 濃縮器にて 50°C で 1 ml に減圧濃縮する。

3) N-TFA 化

2) で得られた残留物を酢酸エチル 5 ml に溶解し, この酢酸エチル溶液 0.2 ml を正確に 10 ml の共栓付試験管にとり, 0.2 ml の無水トリフルオル酢酸を加え 10 分間振とう後室温にて 48 時間反応を行なう。反応終了後, 反応物を *n*-ヘキサン-エーテル混合溶媒 (9:1) 9 ml にて分液ロートに移し水 10 ml ずつで 3 回洗浄する。溶媒層を無水硫酸ナトリウムで脱水し, CPA 標準溶液を 0.4 ml 正確に加え, 混合溶媒で全容を 10 ml とし ECD-GC 用検液とする。

4) ガスクロマトグラフィーの条件

カラムおよび充てん剤: 2% シリコーン OV-1, クロモソルブ W AW DMCS, 60~80 メッシュ, ガラスカラム (3 mm×2 m)

カラム温度: MCPH (145°C), MBPMC (170°C)

検出器および注入口温度: 250°C

キャリアーガスおよび圧力: N₂ 1.3 kg/cm²

感度: 10² MΩ×0.04 V

注入量: MCPH (2 μl), MBPMC (3 μl)

実験結果および考察

1. MCPH

1) MCPH および MCP の土壌からの抽出条件

土壌中にて MCPH が MCP に変化することも推定し定量分析に際しては両成分を測定する方法を検討した。農薬無添加土壌 25 g に MCP 1,000 ppm のアセトン溶液 1 ml を添加し, 抽出溶媒としてメタノール, メタノール-アセトン (9:1) および (7:3), あるいはアセトンのおおの 100 ml を加え, よく攪拌後, pH を塩酸で 6~7, 3 および 1 以下に調製したのち, 30 分間および 1 時間振とうして抽出溶媒および抽出時の pH について検討した結果, pH 1 以下にて 30 分間アセトン抽出が最適であり 105% の抽出率を得た。また, この条件において MCPH の抽出をあわせ検討したところ, 100% の抽出率を得た。

2) MCPH の加水分解条件

MCPH の MCP への加水分解を MCPH 1,000 ppm のアセトン溶液 1 ml を用いて検討した結果を Table 1

Table 1 Hydrolysis of MCPH to MCP.

Reagent	Added (ml)	Temp. (°C)	Time (min)	Reaction (%)
0.1N NaOH	10	50	10	0
0.5N NaOH/50% MeOH	10	50	10	0
8% NaOH/70% MeOH	10	50	10	0
8% NaOH/70% MeOH	50	70	30	10
8% NaOH/70% MeOH	50	80	30	17
0.5N HCl	10	50	30	10
20% HCl	10	75	30	98

に示した。Table 1 より 20% 塩酸 10 ml を用いて, 反応温度 75°C, 反応時間 30 分で加水分解は完結していることが認められた。同様に MCPH 1 ppm について検討した結果も良好であった。この条件における加水分解前後の試料の NMR チャートを Fig. 1 に示した。MCPH で 4.56 ppm に認められた $-\text{OCH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$ に由来するピークは, 加水分解後すべて消失し MCP の場合と同じ 4.69 ppm に移動した。

Fig. 1 NMR spectrum. A: MCPH, B: MCP, C: Tri-fluoroethyl ester derivatives of MCP.

3) トリフルオルエチルエステル化条件

a) 反応温度

MCP 1 ppm, 5 ppm のアセトン溶液 1 ml を試験管に採取し、窒素を通じて乾固させ、2・2・2-トリフルオルエタノール 0.5 ml, およびボロントリフルオリドエーテル溶液 0.5 ml を加えて、反応温度 70°C, 80°C, 90°C で 1 時間反応させた。Fig. 2 に示したように反応温度 80°C で生成量は最高となり、90°C になると生成量は低下することが認められた。この結果より反応温度は 80°C とした。

b) 反応時間

反応温度 80°C における反応時間の影響を検討するため、反応時間を 30 分間、および 1, 2, 3, 4 時間として反応させた結果、1 時間以上で生成量は一定となることが認められたので、反応時間は 1 時間とした。

以上の結果より、反応温度 80°C, 反応時間 1 時間の条件でトリフルオルエチルエステル化反応は完結していることが確認された。この条件における MCP のトリフ

ルオルエチルエステル化前後の NMR チャートを Fig. 1 に示した。エステル化後のチャートには $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ のメチレンのカルテットが 4.74 ppm にみられ、その面積から 100% 反応していることが確認された。

4) MBPMC による妨害の検討

MBPMC はアセトンで抽出されるので、MCPH および MBPMC をおのおの 1,000 ppm 含有するアセトン溶液を作成し、実験方法 1 に従って検討した結果、ガスクロマトグラム上に MCP のトリフルオルエチルエステル化物以外のピークは認められず、MBPMC がアセトンで土壌から抽出されても MCPH の定量を妨害しないことが確認された。

この方法では、20% 塩酸を使用した激しい条件下で MCPH を加水分解しているが、この操作はクリーンアップ操作としても有効であったと思われる。本方法では、操作は簡便かつ容易であり、定量性、再現性も良好であった。今回検討した試料では Fig. 3 に示したとおり、ガスクロマトグラム上に妨害ピークはまったく認められなかった。

2. MBPMC

1) N-TFA 化反応溶媒の検討

MBPMC の N-TFA 化反応における溶媒の検討を NMR を使用して行なった。MBPMC 100 mg, 無水トリフルオル酢酸 2 ml を水洗、脱水処理したクロロホルム、アセトン、および酢酸エチル中にて、室温で反応させた。反応率は原料の MBPMC および N-TFA 化物の $\text{N}-\text{CH}_3$ のピーク面積比から求め、生成物の確認は ^{19}F NMR チャートからも行なった結果、クロロホルムで

Fig. 2 Effect of reaction temperature and reaction time on esterification of MCP.

MCP: ○ 5 ppm, × 1 ppm.

Fig. 3 Gas chromatogram of soil extracts.

- A: before esterification with trifluoroethanol.
 B: after esterification with trifluoroethanol.
 C: trifluoroethylester derivative of MCP (a).

はほとんど反応せず、アセトンでは N-TFA 化物の生成が認められるが副生成物も同時に生成した。これに対して酢酸エチル中では、N-TFA 化反応は良好で副生成物も生成しないことが認められたので、本溶媒を採用した。

2) 無水トリフルオル酢酸量と反応時間の検討

Lau らの報告¹⁴⁾によると、N-TFA 化反応を 16 時間、暗所、温室に放置して行っており、また、反応温度を上げることによって時間は短縮されうるとしている。また上路らの報告¹⁵⁾によると、前者の報告を検討し、加熱条件が 50°C、3 時間で誘導体の生成量は最大になったとしている。

著者らは、加熱時間と反応性との関連をみるため、MBPMC 5 μ g に無水トリフルオル酢酸 0.2 ml を添加後、60°C の湯浴上で、1, 2, 3 および 5 時間加熱して N-TFA 化を行なったが、反応収率のパラツキが大きく再現性は得られなかった。加熱により反応中に MBPMC

Fig. 4 Amount of trifluoroacetic anhydride and reaction time for N-trifluoroacetylation of MBPMC.

- Reaction time for 23 hr.
 —△— Reaction time for 46 hr.
 —○— Reaction time for 213 hr.

自身あるいは、トリフルオルアセチル誘導体が分解することが考えられる。そこで、MBPMC の 5 ppm 酢酸エチル溶液 0.2 ml を 10 ml の共栓付試験管に採取し、N-TFA 化反応に必要な無水トリフルオル酢酸の量と反応時間について検討を行なった。その結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 より N-TFA 化反応に必要な無水トリフルオル酢酸の量は 0.2 ml 以上であり、反応率は 46 時間以上で一定となることが認められたので、無水トリフルオル酢酸量は 0.2 ml、反応時間は室温で 48 時間とした。反応時間が長いのは、MBPMC の 2,6-ジターシャリーブチル基の立体障害が大きいと考えられる。この条件で得られた N-TFA 化物の定量性、再現性は良好であった。

3) N-TFA 化物の安定性

MBPMC の N-TFA 化物の GC 用検液を室温で 24 時間以上放置したのち GC 測定を行なったところ、顕著な減衰がみられたので、N-TFA 化物の安定性を調べるため、無水トリフルオル酢酸、酢酸エチル、酢酸を添加して、内部標準物質を CPA とし N-TFA 化物と CPA との GC によるピーク高さの比で安定性をみた。保存の方法は、室温で放置した。その結果、20 時間後でも無水トリフルオル酢酸を添加したものでは、上記の値はほぼ一定で、誘導体の安定性は非常に高いが、酢酸エチルを添加したものでは 45%、酢酸を添加したものでは 90% 以上減衰していることが認められた。また、溶媒無添加の N-TFA 化物を -20°C で保存した場合の安定性は 20 時間後でも良好であった。よってただちに GC 測定を行なわない場合においては、無水トリフルオル酢酸を

Fig. 5 Gas chromatograms of soil extracts. A: before N-trifluoroacetylation, B: after N-trifluoroacetylation, C: N-trifluoroacetyl derivatives of MBPMC (b).

添加して保存した。

今回検討した試料では Fig. 5 に示したとおり、ガスクロマトグラム上に妨害ピークはまったく認められなかった。Fig. 5 に示した MBPMC の N-TFA 化物としたピークは、NMR で構造を確認した MBPMC の N-TFA 化物と同一保持時間を示した。

4) MCPH による妨害の検討

MCPH および MBPMC はアセトンで同時に抽出されるので、土壌から両成分をアセトン抽出して、加水分解後得られる MCP と MBPMC をトリフルオロアセチル化する方法も考えられるが、この場合ガスクロマトグラム上に両成分を分析するのに妨害となるピークも出現し、これを除去するためにカラムクロマトグラフィー、および TLC などのクリーンアップを必要とすることを見いだしている。さらに両成分を同時分析するために MCPH の検出感度が低下することとなる。したがって、MCPH および MBPMC を別々に抽出、検出するほうが、より簡便で精度の高い方法と思われる。

MCPH および MCP は前述のごとく、メタノールで

は抽出されないので、MBPMC の分析を妨害することは考えられない。

添加回収実験

1. MCPH

千葉および静岡農業試験場より入手した農薬無添加土壌試料を 25 g 採取し、これに MCPH 標準溶液を、1.0 ml、および 0.1 ml 正確に添加して 24 時間後、実験方法 1 に記した方法に従って分析し回収率を測定した結果を Table 2 に示した。Table 2 より明らかなように MCPH

Table 2 Percent recovery of MCPH and MBPMC from soil by systematic analysis.

Pesticide	Added (ppm)	Recovery (%)	Average (%)
MCPH	0.36	89 . 111	100
	3.6	103 . 99	101
MBPMC	0.5	95 . 100	98
	5.0	90 . 98	94

の回収率は非常に高く、土壌残留分析に利用できるものと考えられる。

2. MBPMC

MCPH と同じ土壌試料を 50 g 採取し、MBPMC 標準溶液を 1.0 ml、および 0.1 ml 正確に添加して 24 時間後、実験方法 2 に記した方法に従って分析した結果を Table 2 に示した。Table 2 より明らかなように良好な回収率が得られ、土壌残留分析に利用できるものと考えられる。

検量線および検出限界

1. MCPH

MCPH の検量線作成の場合は MCPH 換算で 0.08~0.32 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内で原点を通る直線が得られた。

ガスクロマトグラフィーによる最小検出量は 0.02 ng、試料 25 g を用いて最終液量 10 ml であるので、その 2 μl を注入する場合の検出限界は 0.004 ppm であった。

2. MBPMC

MBPMC の検量線作成の場合は、MBPMC 0.05~0.4 $\mu\text{l/ml}$ の範囲内で原点を通る直線が得られた。

ガスクロマトグラフィーでの最小検出量は 0.03 ng、試料 50 g を使用して最終液量 10 ml であるので、その 3 μl を注入する場合の検出限界は 0.002 ppm であった。

要 約

土壌中に残留しているフェノキシ酢酸系除草剤 2-メチル-4-クロルフェノキシ酢酸ヒドラジド (MCPH) を加水分解したのち、トリフルオルエチルエステル化して ECD-GC で分析した。またカーバメート系除草剤として 4-メチル-2,6-ジターシャリーブチルフェニル-N-メチルカーバメート (MBPMC) を、N-TFA 誘導体として ECD-GC で分析した。誘導体とする際の反応条件について種々の検討を行なって分析法を確立した。

なお本論文は第 31 回日本食品衛生学会 (昭和 51 年, 東京) で一部発表した。

引 用 文 献

- 1) 農薬科学 1(2)(1973) 第 16 回農薬研究会講演要旨 10
- 2) 農薬科学 1(2)(1973) 第 16 回農薬研究会講演要旨 1
- 3) W. H. Gutenmann & D. J. Lisk: *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **46**, 859 (1963)
- 4) C. A. Bache, D. J. Lisk & M. A. Loos: *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **47**, 348 (1964)
- 5) D. P. Johnson: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **47**, 283 (1964)
- 6) R. J. Argauer: *Anal. Chem.* **40**, 122 (1968)
- 7) 宮田秀明・榎本 隆: 食衛誌 **15**, 483 (1974)
- 8) 星野和行・加藤玲子・佐藤信俊・堺 敬一: 食衛誌 **16**, 275 (1975)
- 9) L. I. Butler & L. M. McDonough: *J. Agric. Food. Chem.* **16**, 403 (1968)
- 10) D. G. Crosley & J. B. Bowers: *J. Agric. Food. Chem.* **16**, 839 (1968)
- 11) E. R. Holden: *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **56**, 713 (1973)
- 12) 高瀬 巖・大須賀重喜: 農薬生産技術 **30**, 22 (1973)
- 13) 日本農薬学会第 2 回大会シンポジウム (1977)
- 14) S. C. Lau & R. L. Maxmiller: *J. Agric. Food. Chem.* **18**, 413 (1970)
- 15) 上路雅子・金沢 純: 分析化学 **22**, 16 (1973)
- 16) 関田 寛・鈴木 隆・武田明治・田辺弘也: 食衛誌 **15**, 219 (1974)