野菜中のクロロフェノール類の残留分析

(昭和 52 年 12 月 8 日受理)

飯田 勝彦^{*1} 渡辺 重信^{*} 池田 陽男^{*}

Analysis for Residue of Chlorophenols in Vegetables

Katsuhiko IIDA, Shigenobu WATANABE
and Haruo IKEDA

(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories; 52-2, Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama)

The purpose of this investigation was to determine chlorophenols residue in vegetables. 2, 4-Dichlorophenol, 2, 4, 5-trichlorophenol, 2, 4, 6-trichlorophenol and 2, 3, 4, 6-tetrachlorophenol were extracted with benzene by a improved essential oil distillator. Chlorophenols in benzene were extracted with 2% sodium chloride in 0.1M potassium carbonate solution. And chlorophenols were acetylated with acetic anhydride and extracted with *n*-hexane. *n*-Hexane solution was analyzed by gas chromatography using an electron capture detector.

The lower limits of detection in vegetable (50 g) of 2, 4-dichlorophenol, 2, 4, 5-trichlorophenol, 2, 4, 6-trichlorophenol and 2, 3, 4, 6-tetrachlorophenol were 0.004, 0.002, 0.002 and 0.001 ppm, respectively. The recovery of these chlorophenols ranged from 80 to 101% on addition of 0.5~10 µg of chlorophenols on tomato.

Residue levels of chlorophenols in nine vegetables were analyzed. Chlorophenols were not detected in all samples.

(Received December 8, 1977)

BHC, DDT, ドリン剤などの有機塩素系農薬は、残留性が高く、食品汚染の影響が大きいため使用禁止になっている。現在、使用されている農薬は分解しやすく、かつ安全使用基準があるために食品衛生法に基づく規格基準の残留農薬調査ではほとんど検出されない。しかし、易分解性農薬の分解物がそのままの形で、あるいは活性の強い物質に変化して残留する可能性もあるので、食品中の農薬分解物について調査する必要がある。従来、農薬の分解については多くの総説があるが^{1), 2)}、食品中の分解物の残留分析についてはエチレンビスジチオカルバメート剤の分解生成物であるエチレンチオウレア³⁾とチオフアネートメチルの代謝物⁴⁾についての報告が知られている。しかし、易分解性農薬の構成成分の一つであり、ポリクロロジベンゾダイオキシンの前駆物質になる可能性があるという報告^{5), 6)}の知られているクロロフェノール類については、その代謝に関する報告⁷⁾はあるが残留分析についての報告は少ない。すなわち、Farrington ら⁸⁾は鶏肉中の 2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノールおよびペンタクロロフェノールを DNP 化して分析し、また、Renberg⁹⁾は 2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノールおよびペンタクロロフェノールについてイオン交換で精製の後、メチル化により水中および魚中の分析をした。しかし、これらはいずれも防ばい剤として使用された場合の残留分析についての報告であり、農薬分解生成物としてのクロロフェノール類の残留分析についての報告は例がない。そこで、我々は野菜中のクロロフェノール類の存在を調査する目的で 2, 4-ジクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4, 6-トリクロロフェノールおよび 2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノールの 4 種のクロロフェノールについて簡易な分離分析法を検討し、野菜中の残留分析を行ったので報告する。

実験方法

1. 試 薬

1) クロロフェノール標準溶液

2, 4-ジクロロフェノールは東京化成工業(株)製特級、2, 4, 5-トリクロロフェノールは東京化成工業(株)製 1 級を石油エーテルで再結晶したもの、2, 4, 6-トリクロロフェノールは東京化成工業(株)製 1 級をリグロインで再結

* 神奈川県衛生研究所：横浜市旭区中尾町 52-2

*¹ 現在；神奈川県公害センター湘南支所：神奈川県平塚市豊原町 2-17

晶したもの、2,3,4,6-テトラクロロフェノールは東京化成工業(株)製化学用をリグロインで再結晶したものをそれぞれ使用した。ベンゼン 1 ml 中には、2,4-ジクロロフェノール 1 μg 、2,4,5-トリクロロフェノール 0.5 μg 、2,4,6-トリクロロフェノール 0.5 μg 、2,3,4,6-テトラクロロフェノール 0.25 μg を含有する溶液とした。

2) 内部標準溶液

α -BHC は和光純薬(株)製残留農薬分析用標準品を使用した。ベンゼン 1 ml 中には α -BHC 0.2 μg を含有する溶液とした。

3) *n*-ヘキサン、ベンゼンおよび無水硫酸ナトリウムは和光純薬(株)製残留農薬分析用試薬を用いた。なお無水硫酸ナトリウムは700°で6時間加熱して用いた。

4) 無水酢酸は和光純薬(株)製特級試薬を2回蒸留し139~140°の留分を集めた。

5) その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。水および2%塩化ナトリウム 0.1 *M* 炭酸カリウム溶液は使用前ベンゼンで洗浄した。

2. 装 置

1) ガスクロマトグラフ

(株)島津製作所製 GC-3BE (ECD, ^3H)

2) 改良型精油定量装置

スギヤマゲン(株)製、Fig. 1 に示す。

3. 操 作

3.1 クロロフェノールの抽出

野菜 50 g を残留農薬試験と同様にミキサーで粉碎均一化し、1 L 丸底フラスコに入れ、水 500 ml を加え、これにリン酸を1~2 ml 加え酸性とし、シリコン樹脂を塗布した沸石を入れた。これを改良型精油定量装置に装着した後抽出部には、5~10 ml の水を入れ、抽出溶媒としてベンゼン 5 ml を加えた後、マントルヒーターで2時間加熱還流した。次にベンゼン層をとり、2%塩化ナトリウム 0.1 *M* 炭酸カリウム溶液 20 ml で3回抽出し水層を合わせアセチル化用試験溶液とした。

3.2 クロロフェノールのアセチル化

3.1で得られた試験溶液に無水酢酸 1 ml、*n*-ヘキサン 5 ml を加え1分間激しく振とうし、アセチル化すると同時にヘキサン層へアセチル化を転溶させた。*n*-ヘキサン層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。その後内部標準溶液 1 ml を加え 5 ml としガスクロマトグラフにより定量した。

4. 検量線の作成

クロロフェノール標準溶液の0.25, 0.50, 0.75, 1.00 および 1.25 ml をそれぞれベンゼンで 5 ml とし、アルカリ抽出以後の操作は操作の項で述べたように行った。得られたガスクロマトグラムから α -BHC とのピーク高比により検量線を作成した。

5. ガスクロマトグラフィーの条件

カラム管; 内径 3 mm, 長さ 2.1 m のガラス製

Fig. 1. Distillator

充てん剤; 5%シリコン OV-17 (クロモソルブ W, 80~100メッシュ)

温度; 注入口 190°, カラム恒温槽 175°

キャリアガス; 窒素 1.0 kg/cm²

実験結果および考察

1. 抽出条件の検討

クロロフェノールの抽出については従来から PCP について多くの方法が報告されていて、ほとんどが、有機溶媒による抽出であるが、水蒸気蒸留による方法も知られている¹⁰⁾。また、改良型精油定量器により農薬を抽出する方法¹¹⁾が報告されている。そこでクロロフェノールの抽出についてはできるだけ使用溶媒量を少なくするために Fig. 1 に示す改良型精油定量装置を用い、抽出溶媒、抽出時間について検討した。

1.1 抽出溶媒

抽出溶媒を検討するためにクロロフェノール標準溶液 1 ml を水 500 ml に添加し、抽出溶媒として *n*-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルおよびエチルエーテルを用い実験操作に従って各クロロフェノールの回収率を比較した。Table 1 に示したように4種のクロロフェノールの平均回収率で比較すると *n*-ヘキサン 56.5%、ベンゼン 81.8%、酢酸エチル 63.5%、エチルエーテル 58.8% でベンゼンが最も回収率が良いため、以後抽出溶媒としてベンゼンを使用した。

1.2 抽出時間

抽出時間を検討するためにクロロフェノール標準溶液 1 ml を水 500 ml に添加し、実験操作に従って蒸留時

Table 1. Effect of Extract Solvent on the Recovery from Water

Chlorophenols	Added (μg)	Recovery (%)			
		Extract solvent			
		<i>n</i> -Hexane	Benzene	Ethyl ether	Ethyl acetate
2, 4-Dichlorophenol	1.00	68	95	84	62
2, 4, 5-Trichlorophenol	0.50	59	84	76	77
2, 4, 6-Trichlorophenol	0.50	54	77	52	52
2, 3, 4, 6-Tetrachlorophenol	0.25	45	71	42	44

Table 2. Effect of Distillation Time on the Recovery from Water

Chlorophenol	Added (μg)	Recovery (%)					
		Distillation time (hr)					
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
2, 4-Dichlorophenol	1.00	66	73	84	95	80	84
2, 4, 5-Trichlorophenol	0.50	55	65	80	74	81	81
2, 4, 6-Trichlorophenol	0.50	62	66	77	73	74	76
2, 3, 4, 6-Tetrachlorophenol	0.25	39	51	63	68	69	71

Fig. 2. Effect of reaction periods for acetylation of chlorophenols

Fig. 3. Effect of amount of acetic anhydride for the acetylation of chlorophenols

間を0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5および3.0時間と変化させてクロロフェノールの回収率を比較した。結果は Table 2 に示してあるが4種のクロロフェノールの平均値を比較すると、0.5時間で55.5%, 1.0時間で63.8%, 1.5時間で76.0%と増加した。以後、2時間で77.5%, 2.5時間で76.0%, 3時間で78.0%とほぼ77%前後で一定となり、これ以上回収率の向上は望めないで抽出時間は2時間とした。

1.3 アルカリによる抽出

改良型精油定量装置により抽出したベンゼン溶液から農薬などの他の妨害物を除去し、クロロフェノール類をアセチル化しやすくするためにアルカリ溶液で抽出した。Chau ら¹²⁾が PCP について行った方法に従い、0.1

M 炭酸カリウム溶液で抽出すると野菜の場合ではエマルジョンを形成したので、2% 塩化ナトリウム 0.1 *M* 炭酸カリウム溶液をベンゼンからの抽出液とした。この場合、抽出率、アセチル化の反応性とも変化しなかった。

2. アセチル化の検討

従来、アセチル化についてはピリジンなどの触媒を使ってアセチル化する報告が多い。しかし、触媒による妨害物の混入も考えられ、また GC に注入する前に触媒を除く手間もかかる。そこで Chau ら¹²⁾の抽出したアルカリ溶液に *n*-ヘキサンおよび無水酢酸を入れてアセチル化させ、同時にアセテートを *n*-ヘキサン層へ転溶させる方法が抽出操作も必要ないのでこの方法を用いた。次に反応時間、無水酢酸量について検討した。

Table 3. Reproducibility of Acetylation of Chlorophenols

 $n=5$

Volume (ml)	Statistics	Chlorophenols			
		2, 4-DCP (1 ppm)	2, 4, 5-TCP (0.5 ppm)	2, 4, 6-TCP (0.5 ppm)	2, 3, 4, 6-TCP (0.25 ppm)
0.25	$\bar{x}$	0.21	0.33	0.47	0.44
	σ	0.013	0.015	0.005	0.022
	C (%)	6.25	4.55	0.96	5.09
0.50	$\bar{x}$	0.38	0.55	0.79	0.71
	σ	0.021	0.021	0.016	0.016
	C (%)	5.42	3.85	2.08	2.32
0.75	$\bar{x}$	0.55	0.79	1.13	1.03
	σ	0.019	0.015	0.023	0.029
	C (%)	3.48	1.92	2.02	2.77
1.00	$\bar{x}$	0.71	0.95	1.38	1.33
	σ	0.022	0.023	0.030	0.032
	C (%)	3.05	2.41	2.19	2.37
1.25	$\bar{x}$	0.84	1.16	1.63	1.61
	σ	0.030	0.042	0.057	0.032
	C (%)	3.52	3.62	3.51	1.93

2.1 反応時間

反応時間について検討するためにクロロフェノール標準溶液 1 ml をベンゼンで 5 ml とし、アルカリで抽出後、 n -ヘキサン 5 ml、無水酢酸 1 ml を加えた。反応時間を、0.5, 1, 5 および 10 分間振とうした場合と 1 時間かく拌した二つの場合についてそれぞれの GC の α -BHC に対するピーク高比でアセテート生成率を比較した。Fig. 2 に示すとおり 0.5 分間振とうでは平均 1.03 で、1~10 分間振とうおよび 1 時間かく拌とも平均 1.08~1.12 でほとんど差がなかった。PCP については、Chau¹²⁾は 1 時間かく拌、岡ら¹³⁾は 10 分間振とうでアセチル化しているが、4 種のクロロフェノールでは反応時間 1 分間でほぼ最高値に達しそれ以後反応はないため反応時間は 1 分間振とうすることにした。

2.2 無水酢酸量

無水酢酸量を調べるために、クロロフェノール標準溶液 1 ml をベンゼンで 5 ml とした後、アルカリで抽出し、実験操作のうち無水酢酸量を 0.2, 0.5, 1.0 および 2.0 ml と変えてアセテートの生成率を調べた。その結果、Fig. 3 に示すとおり無水酢酸の量は 1 ml で最高値を示すため、無水酢酸の量は 1 ml とした。

2.3 再現性

検量線の項の操作をそれぞれ 5 回繰り返して、それぞれのクロロフェノールのアセチル化の反応の再現性を求めた。Table 3 に示すように、2, 4-ジクロロフェノール 1 ppm 0.25 ml 添加の場合変動係数 6.25% と少し高いがほぼ $\pm 4\%$ 以下の誤差であり良好な再現性を示した。

3. 検量線

実験操作の検量線の作成の項により検量線を作成し Fig. 4 に示した。横軸にクロロフェノール重量を示し、縦軸に相対ピーク高さ（クロロフェノールのアセテートのピーク高さを α -BHC のピーク高さで除したもの）を示した。2, 4-ジクロロフェノールは 0.2~1.2 ng、2, 4, 5-トリクロロフェノールと 2, 4, 6-トリクロロフェノールは 0.1~0.6 ng、2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノールは 0.05~0.3 ng の範囲でほぼ直線性が得られた。

4. 添加回収実験

ダイコンおよびトマトのホモジネートにクロロフェノール標準溶液 1 ml および 10 倍濃度の溶液 1 ml を添加して回収率を求めた。結果は Table 4 に示した。ダイコンでは 2, 4, 5-トリクロロフェノール 5 μ g 添加の場合 82%、2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール 0.25 μ g 添加の場合 79%、2.5 μ g 添加の場合 76%、トマトでは 2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール 0.25 μ g 添加の場合 80% と若干低い但他はすべて 85% 以上であった。特にトマトでは平均 93.6% と良好な回収率を得た。4 種のクロロフェノールの中では 2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノールが 76~85% と低かった。また、Fig. 5 にダイコンおよびダイコンにクロロフェノール標準溶液 1 ml 添加したときのガスクロマトグラムを示してある。若干妨害ピークが見えるがいずれも標準のクロロフェノールのアセテートのピークと一致しないので測定上差し支えないと思われた。したがって、さらにカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップは行わなかった。また、本実験操作による検出限界は 2, 4-ジクロロフェノール 0.004 ppm、2, 4, 5-トリクロ

Fig. 4. Calibration curve of chlorophenols

Table 4. Recovery of Chlorophenols Added to Vegetables

Chlorophenols	Added (μg)	Recovery (%)	
		Radish	Tomato
2, 4-Dichlorophenol	1.0	86	97
	10.0	96	99
2, 4, 5-Trichlorophenol	0.50	98	99
	5.0	82	88
2, 4, 6-Trichlorophenol	0.50	98	100
	5.0	85	101
2, 3, 4, 6-Tetrachlorophenol	0.25	79	80
	2.5	76	85

ロフェノールおよび2, 4, 6-トリクロロフェノール 0.002 ppm, 2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール 0.001 ppm であった。

5. 野菜の測定結果

この分析法を用いて神奈川県下の市場から収去した 9

Fig. 5. Gas chromatograms of extracts from radish after acetylation

A, Extract to which 1 μg of 2,4-dichlorophenol (1), 0.5 μg of 2,4,5-trichlorophenol; (2), 0.5 μg of 2,4,6-trichlorophenol; (3), 0.25 μg of 2,3,4,6-tetrachlorophenol; (4), and 0.04 μg of α -BHC; (5), added before acetylation.

B, Extract after acetylation.

Fig. 6. Pesticides producing chlorophenols

種類の野菜についてクロロフェノールの残留調査を行った。分解してクロロフェノールを生成する可能性のある農薬を Fig. 6 に示した。それぞれの農薬からその構成成分のクロロフェノールが生成し、PCP からは2,3,4,6-テトラクロロフェノールなど3種のテトラクロロフェノールと5種のトリクロロフェノールが生成する²⁾。このなかで現在使用されているのは、殺虫剤として ECP および EPBP、除草剤として 2,4-D, NIP, CNP およびクロメトキシニル、除草剤および殺菌剤として PCP、植物生長調整剤として 2,4,5-T であり、ロンネルは登録されていない。また、調査した野菜についてみると、ニンジンおよびダイコンには EPBP, NIP および CNP を、キャベツおよびスイカには EPBP および NIP を、キュウリには EPBP および ECP を、ナツミカンには PCP および 2,4,5-T を使用している。したがって、2,4-ジクロロフェノールはニンジン、ダイコン、キャベツ、スイカおよびキュウリに、2,4,5-トリクロロフェノールはナツミカンに、2,4,6-トリクロロフェノールはニンジンおよびダイコンに、2,3,4,6-テトラクロロフェノールはナツミカンに残留する可能性があり、その他のトマト、ナスおよび生茶はクロロフェノールが残留する可能性のないものであった。結果としては実際にクロロフェノールを分解生成する農薬が使用されている野菜についても、使用されていない野菜と同様に4種のクロロフェノールは前項検出限界の範囲ではすべて検出されなかった。

ま と め

農薬の一次分解産物であるクロロフェノール類について野菜中の存在を調査する目的で改良型精油定量装置を用いて抽出し、アセチル化する簡便な分析法を検討し、この方法で分析した。その結果、野菜中には4種のクロ

ロフェノールは検出されなかった。したがって、クロロフェノール類は野菜中には残留せず、さらに分解あるいは重合していると考えられる。クロロフェノール類の変化生成物について他の農薬との関連も考えられるのでさらに調査する必要があると思われる。

文 献

- 1) 上杉康彦, 塚野 豊, 松中昭一, 見里朝正, 宮本純之: 化学総説, **2**, 57 (1973).
- 2) 鎌塚昭三: 農薬科学, **3**, 107 (1976).
- 3) 宇野正清, 上田栄次, 岡田 作, 陰地義樹: 食衛誌, **18**, 53 (1977).
- 4) 伊藤誉志男, 豊田正武, 慶田雅洋: 同上, **18**, 26 (1977).
- 5) Plimmer, J. R., Klingebiel, U. I.: Science, **174**, 407 (1971).
- 6) Higginbotham, G. R., Huang, A., Firestone, D., Verrett, J., Ress, J., Campbell, A. D.: Nature, **220**, 702 (1968).
- 7) Shafik, T. M., Sullivan, H. C., Enos, H. R.: J. Agr. Food Chem., **21**, 295 (1973).
- 8) Farrington, D. S., Munday, J. W.: Analyst, **101**, 639 (1976).
- 9) Renberg, L.: Anal. Chem., **46**, 459 (1974).
- 10) 能勢和夫: 農薬生産技術, **14**, 36 (1966).
- 11) 松本 浩, 岡 尚男, 河村典久, 榎府直大: 食衛誌, **16**, 165 (1975).
- 12) Chau, A. S. Y., Coburn, J. A.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **57**, 389 (1974).
- 13) 岡 日出生, 永井 勇, 田坂美和子: 食衛誌, **18**, 419 (1977).