

5 穀類及び牧草中の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の改正基準値相当の濃度における妥当性確認

高橋 雄一^{*1}, 山下 奈々^{*2}

Validation Study of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Determination Method in Grains and Grass Hay for Feed by LC-MS/MS at Concentration Equivalent to the Revised Regulation Values

TAKAHASHI Yuichi^{*1} and YAMASHITA Nana^{*2}

(^{*1} Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Current affiliation: Fukuoka Regional Center, FAMIC)

^{*2} Nagoya Regional Center, FAMIC)

A validation study was conducted on a method for determining 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in grains and grass hay at concentration equivalent to the revised regulation values and the limits of quantification. The method, which uses a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), is compiled in the Feed Analysis Standard of Japan.

Briefly, 2,4-D and related compounds were first added with water, and then extracted with acetone under acidic condition. The extracted solution was purified by liquid-liquid partition with a 10 % (w/v) sodium chloride solution and hexane-ethyl acetate (1:1). 2,4-D related compounds, such as 2,4-D ethyl, in the sample solutions were hydrolyzed to 2,4-D under alkaline condition. The hydrolyzed sample solution was purified with a solid phase extraction (SPE) column (Mega Bond Elut C18, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). It was then purified by liquid-liquid partition with a 10 % (w/v) sodium chloride solution and diethyl ether, followed by further purification with an SPE column (InertSep GC/PSA, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan). The purified sample solution was injected into LC-MS/MS to determine the concentration of 2,4-D. LC separation was then carried out using an ODS column (Atlantis T3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm, Waters Co.; Milford, MA, USA) with a gradient of 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In MS/MS analysis, a negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on five types of grains and grass hay. 2,4-D and 2,4-D ethyl were added at following levels: 2 mg/kg for oats, wheat, milo and rye; 0.01 and 2 mg/kg for barley; and 5 and 400 mg/kg for wheat straw. The results showed that mean recoveries ranged from 87.1 % to 100 % for 2,4-D, and 81.2 % to 93.0 % for 2,4-D ethyl. The relative standard deviation of repeatability (RSD_r) was 7.3 % or less for 2,4-D and 8.4 % or less for 2,4-D ethyl.

Key words: 2,4-D and related compounds; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grass hay; grain; validation study

キーワード：2,4-D 及び関連化合物；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；乾牧草；穀物；妥当性確認

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター，現 福岡センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

1 緒 言

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下「2,4-D」という．）は 1950 年に国内登録されたフェノキシ系の除草剤であり，オーキシシン作用により植物の分裂組織を異常に活性化させ，茎葉の奇形を生じさせることで除草効果を示すと考えられている¹⁾．

我が国では，農林水産省令において穀類及び牧草中の基準値が設定されているが，令和 6 年 8 月 26 日付けで飼料中の 2,4-D（2,4-D ナトリウム塩，2,4-D ジメチルアミン塩，2,4-D エチル，2,4-D イソプロピル，2,4-D ブトキシエチル及び 2,4-D アルカノールアミン塩（以下「2,4-D 関連物質」という．）を含む．）の残留基準値²⁾が改正され，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦は 0.5 mg/kg から 2 mg/kg に，牧草は 260 mg/kg から 400 mg/kg に基準値が引き上げられた．しかし，これらの飼料における基準値相当濃度の妥当性が確認されていないことから，妥当性確認が急務となっている．

そこで，今回，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦については飼料分析基準³⁾に収載されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）法（その 1）により，牧草については，同法（その 2）により 2,4-D の改正後の基準値濃度における妥当性確認を行ったので，その概要を報告する．また，大麦及び牧草中の 2,4-D の定量下限濃度における妥当性確認も行ったので併せて報告する．なお，2,4-D 関連物質には，加水分解により 2,4-D に変換してから定量する化合物が含まれていることから，本検討は 2,4-D 及び 2,4-D 関連物質から加水分解が必要な 2,4-D エチルを選定して実施することにした．

参考に 2,4-D 及び 2,4-D エチルの構造式等を Fig. 1 に示した．

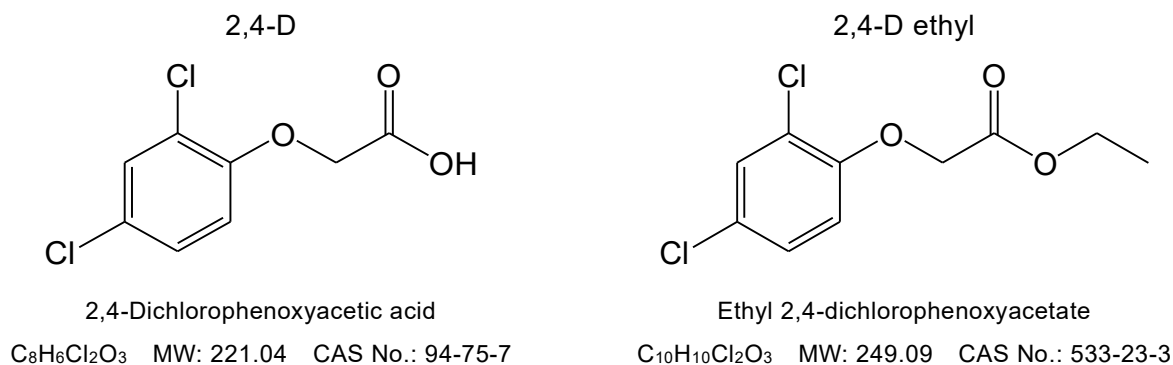


Fig. 1 Chemical structures of 2,4-D and 2,4-D ethyl

2 実験方法

2.1 試 料

えん麦，大麦，小麦，マイロ，ライ麦及びウィートストローはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，分析用試料とした．

2.2 試 薬

1) アセトニトリル，アセトン，酢酸エチル，ジエチルエーテル，トルエン，ヘキサン，塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬・PCB 試験用を用いた．メタノールは抽出操作には残留農薬・PCB 試験用を，溶離液には LC/MS 用を用いた．酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液（LC 用，富士フイルム和光純薬工業製）を用いた．水は Milli-Q

Advantage (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

2) 2,4-D 標準原液

2,4-D 標準品 (関東化学製, 純度 98.0 %) 25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて 2,4-D 標準原液を調製した (この液 1 mL は, 2,4-D として 0.5 mg を含有)。

使用に際して, 2,4-D 標準原液の一部を, メタノールーギ酸 (1000+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D として 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 及び 0.4 µg を含有する各 2,4-D 標準液を調製した。

3) えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦添加用 2,4-D 標準液

2,4-D 標準原液の一部をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D として 20 µg を含有するえん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦基準値濃度添加用 2,4-D 標準液及び 1 mL 中に 2,4-D として 0.1 µg を含有する大麦定量下限濃度添加用 2,4-D 標準液を調製した。

4) ウィートストロー添加用 2,4-D 標準液

2,4-D 標準品 80 mg を量って 20 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてウィートストロー基準値濃度添加用 2,4-D 標準液 (この液 1 mL は, 2,4-D として 4 mg を含有) 及び 1 mL 中に 2,4-D として 50 µg を含有するウィートストロー定量下限濃度添加用 2,4-D 標準液を調製した。

5) 2,4-D エチル標準原液

2,4-D エチル標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97.0 %) 25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて 2,4-D エチル標準原液を調製した (この液 1 mL は, 2,4-D エチルとして 0.5 mg を含有)。

6) えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦添加用 2,4-D エチル標準液

2,4-D エチル標準原液の一部をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 20 µg を含有するえん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦基準値濃度添加用 2,4-D エチル標準液及び 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 0.1 µg を含有する大麦定量下限濃度添加用 2,4-D エチル標準液を調製した。

7) ウィートストロー添加用 2,4-D エチル標準液

2,4-D エチル標準品 80 mg を量って 20 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてウィートストロー基準値濃度添加用 2,4-D エチル標準液 (この液 1 mL は, 2,4-D エチルとして 4 mg を含有) 及び 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 50 µg を含有するウィートストロー定量下限濃度添加用 2,4-D エチル標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 振り混ぜ機: レシプロシェーカー SR-SDW タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: Mega Bond Elut C18 カートリッジ (充てん剤量 1 g) Agilent Technologies 製
- 4) グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: InertSep GC/PSA カートリッジ (充てん剤量 500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

5) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQD Waters 製

2.4 定量方法

えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦は飼料分析基準第 6 章第 1 節 2.1 に従い操作した. ただし, 基準値濃度における試験において, 最終溶液中の 2,4-D 濃度が検量線の範囲外になることが予想されたため, 最終溶液の一定量をメタノールーギ酸 (1000+1) で 5 倍希釈してから測定した. ウィートストローは飼料分析基準第 6 章第 1 節 2.2 に従い操作した.

定量法の概要を Scheme 1 に, LC-MS/MS の測定条件を Table 1 及び 2 に示した.

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Atlantis T3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm), Waters
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution – 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (70:30) → 10 min → (0:100) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection amount	5 µL
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Negative ion mode)
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	Negative ion 0.6 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.2 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Pymetrozine	218	105	-	35	20
		-	78	35	40

なお, 加水分解により 2,4-D エチルは 2,4-D になることから, 2,4-D エチルを添加して添加回収試験を行った際の回収率の計算は, 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量を次式により 2,4-D エチル量に換算し, 添加した 2,4-D エチルの試料中濃度で除してその割合を求めることにより行った.

試料中の 2,4-D エチル量 = $A \times 249.1 / 221.0$

A : 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量

Sample 10 g (300 mL of Erlenmeyer flask)

- added 20 mL of water (grass hay: 30 mL) and allowed to stand for 30 min
- added 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of acetone (grass hay: 120 mL) and shaken for 30 min
- filtrated with suction filter (No. 5B of JIS P 3801) under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetone
- filled up 200 mL with acetone
- diluted sample solution of grass hay 500-fold with acetone

8 mL of sample solution

Liquid-liquid partition I (300 mL of separatory funnel)

- added 100 mL of sodium chloride solution (10 % (w/v))
- added hexan-ethyl acetate (1:1) and shaken for 5 min (two times: 100 mL and 50 mL)
- put hexan-ethyl acetate layer into 300 mL of Erlenmeyer flask
- added sodium sulfate
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 2 mL of methanol

Hydrolysis reaction

- added 1 mL of NaOH (1.5 mol/L)
- refluxed in water bath (80 °C) for 30 min
- adjusted pH to 7.5~8.0 with HCl (1.5 mol/L)
- added 16 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 % (w/v))

Mega Bond Elut C18 cartridge

- washed with 10 mL of methanol and 10 mL of water
- applied sample solution
- eluted with 20 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 % (w/v))-methanol (1:1)

Liquid-liquid partition II (300 mL of separatory funnel)

- added 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of sodium chloride solution (10 % (w/v))
- applied sample solution
- added diethyl ether and shaken for 5 min (two times: 50 mL)
- put diethyl ether layer into 200 mL of Erlenmeyer flask
- added sodium sulfate
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 5 mL of acetonitrile-toluene (3:1)

InertSep GC/PSA cartridge

- washed with 10 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- applied sample solution
- washed with 5 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- eluted with 30 mL of acetonitrile-toluene-formic acid (75:25:1)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 1.0 mL of methanol-formic acid (1000:1)
- diluted sample solutions of orts, barley, wheat, milo and rye, to which the reference concentration has been spiked, 5-fold with methanol-formic acid (1000:1)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for 2,4-D in grains and grass hay

2.5 添加回収試験

2.2 の 3), 4), 6) 及び 7) の添加用 2,4-D 標準液又は添加用 2,4-D エチル標準液を添加に用いた。試料への標準液の添加は、試料 1 点につき添加用 2,4-D 標準液又は添加用 2,4-D エチル標準液のいずれか一方のみを添加することで行った。

2,4-D として、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4-D として 160 ng/mL）、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（同 4 及び 160 ng/mL）、ウィートストローに 5 及び 400 mg/kg 相当量（同 4 及び 320 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、2,4-D エチルとして、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4-D として 142 ng/mL）、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（同 3.55 及び 142 ng/mL）、ウィートストローに 5 及び 400 mg/kg 相当量（同 3.55 及び 284 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 添加回収試験

2.5 により、改正後の基準値濃度及び定量下限濃度での添加回収試験を実施した。その結果は Table 3 及び 4 のとおり、2,4-D については平均回収率は 87.1~100 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.3 % 以下、2,4-D エチルについては平均回収率は 81.2~93.0 %、 RSD_r は 8.4 % 以下の成績が得られ、飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定められた目標値（真度：70 % 以上 120 % 以下、精度：0.01 mg/kg では 22 % 以下、2 mg/kg では 14 % 以下、5 mg/kg では 12 % 以下、400 mg/kg では 6.4 % 以下）を満たす結果であった。なお、得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 3 Recoveries for 2,4-D

Spiked level (mg/kg)	Oats		Barley		Wheat		Milo	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	100	7.2	—	—	—	—
2	89.4	1.4	87.1	1.3	89.0	6.3	91.8	2.8
5	—	—	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	—	—	—	—	—

Spiked level (mg/kg)	Rye		Wheat straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	—	—
2	91.1	2.2	—	—
5	—	—	96.8	7.3
400	—	—	93.6	2.5

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 4 Recoveries for 2,4-D ethyl

Spiked level (mg/kg)	Oats		Barley		Wheat		Milo	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	89.2	8.4	—	—	—	—
2	84.2	3.0	93.0	3.2	82.5	2.3	81.2	2.1
5	—	—	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	—	—	—	—	—

Spiked level (mg/kg)	Rye		Wheat straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	—	—
2	85.1	3.2	—	—
5	—	—	81.5	8.3
400	—	—	81.4	2.7

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

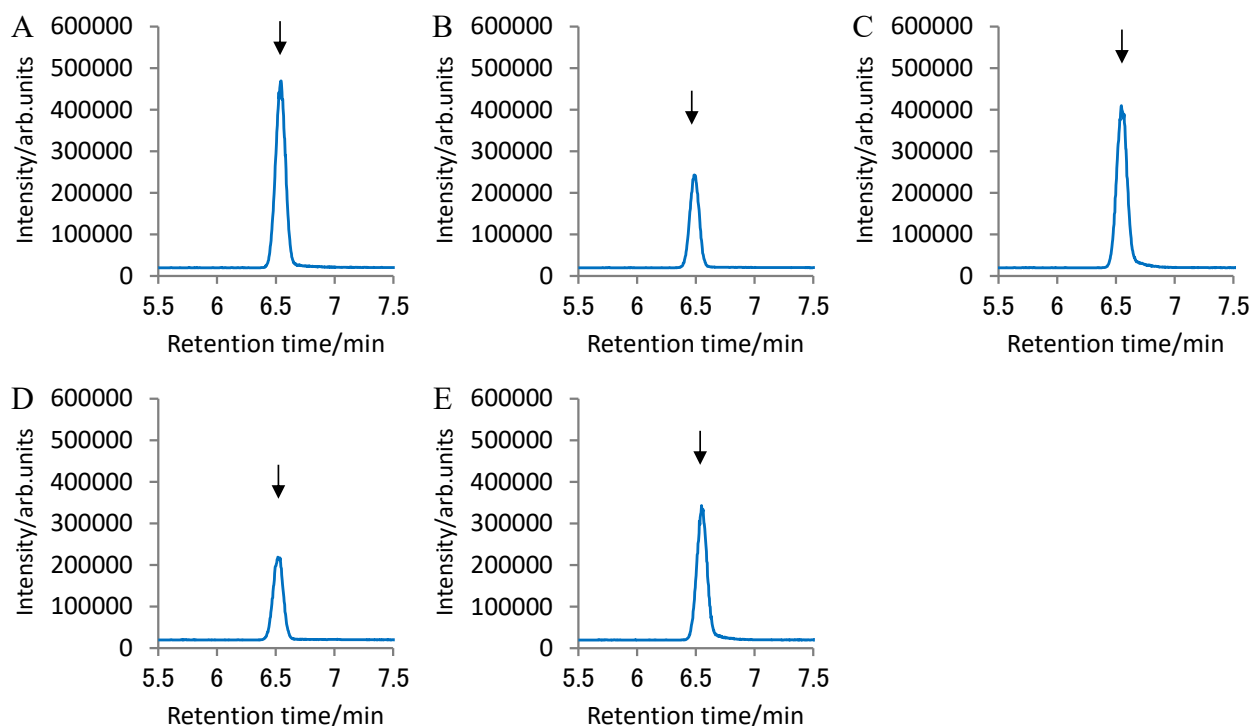


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of 2,4-D in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peak of 2,4-D)

A: Standard solution (300 ng/mL of 2,4-D (1.5 ng as injection amount))

B: Sample solution of barley (spiked at 2 mg/kg of 2,4-D (0.8 ng as injection amount))

C: Sample solution of wheat straw (spiked at 400 mg/kg of 2,4-D (1.6 ng as injection amount))

D: Sample solution of barley (spiked at 2 mg/kg of 2,4-D ethyl (0.8 ng as injection amount))

E: Sample solution of wheat straw (spiked at 400 mg/kg of 2,4-D ethyl (1.6 ng as injection amount))

4 まとめ

穀類及び牧草中に残留する 2,4-D 及び 2,4-D エチルについて、添加回収試験を実施したところ、以下の結果が得られ、飼料分析基準に収載されている分析法の基準値濃度及び定量下限濃度における妥当性が確認された。

- 1) 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量、ウィートストローに 5 及び 400 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：2,4-D 農薬評価書，平成 29 年 12 月 (2017)。
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023)。