

ディスク型固相抽出による水中の農薬分析法の検討(1)

Study of Pesticide Analysis with Disk-format Solid Phase Extraction (1)

柴田 幸雄 Yukio SHIBATA
関 昌之 Masayuki SEKI
黒沢 康弘 Yasuhiro KUROSAWA

キーワード：固相抽出，農薬，HPLC，GC-MS

Key words : solid Phase extraction, pesticide, HPLC, GC-MS

1 はじめに

水中農薬による環境汚染に対しては水質汚濁に係る環境基準，要監視項目や排水基準による監視，「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針」(以下ゴルフ場指針とする)による指導等の施策を講じてきた。川崎市においても1989年よりゴルフ場を対象とした農薬調査を実施してきた。

これらの対象農薬は増加傾向にあり，ゴルフ場指針では設定当初21種類であったが1997年の改正により現在では35種類が対象となっている。

これらの基準や指針には各物質毎や多成分同時分析法が示されている。しかし，多成分同時分析法といっても対象農薬によって溶媒抽出法，減圧濃縮法，ミニカラムによる固相抽出法等と前処理操作が多く，また時間のかかる方法である。

そこで，試料の前処理をより簡便に，所要時間を短縮することを目的として，通水速度に制限がないことや乾燥が可能のため脱水操作が不要である¹⁾ディスク型固相の適用について検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 分析対象物質

分析対象物質は以下に示す環境基準，排水基準，ゴルフ場使用農薬に係る暫定指針対象農薬とした。

環境基準項目

チラム，シマジン，チオベンカルブ …………… 3物質

要監視項目

イタチチオン，ダ イアジ ノン，フェントチオン，イソプロチオン，オキシ銅，クロロニル，プロセサミト²⁾，EPN，ジクロロホス，フェノ³⁾カルブ，イソホ⁴⁾ンホス，クロロトコフェン …………… 12物質

ゴルフ場使用農薬に係る暫定指針

アセフェト(アセフェト，メタミト⁵⁾ホス)，イタチチオン，イソフェノ⁶⁾ホス，ダ イアジ ノン，トリクロホス，ヒリ⁷⁾グフェンチオン，フェントチオン，イソプロチオン，イゾ⁸⁾プロジオン，エトリジ⁹⁾アゾ¹⁰⁾ニル，オキシ銅，キヤ¹¹⁾タン，クロタロニル，クロネ¹²⁾ブ，チラム，トルクロホス¹³⁾メチル，フルトラニル，ベンシクロ¹⁴⁾ン，メタリキシル，メ¹⁵⁾フ¹⁶⁾ロニル，ア¹⁷⁾シ¹⁸⁾ラム，ジ¹⁹⁾チ²⁰⁾セル，シマジン，テル²¹⁾グ²²⁾カルブ²³⁾，トリクロ²⁴⁾ヒ²⁵⁾ル(トリ²⁶⁾クロ²⁷⁾ヒ²⁸⁾ル²⁹⁾ロ³⁰⁾キシ³¹⁾エ³²⁾チ³³⁾ル，トリ³⁴⁾クロ³⁵⁾ヒ³⁶⁾ル³⁷⁾酸)，ナ³⁸⁾フ³⁹⁾ロ⁴⁰⁾ハ⁴¹⁾ミ⁴²⁾ト⁴³⁾，ヒ⁴⁴⁾リ⁴⁵⁾グ⁴⁶⁾チ⁴⁷⁾カル⁴⁸⁾ブ⁴⁹⁾，

ブ⁵⁰⁾タ⁵¹⁾ホ⁵²⁾ス，フ⁵³⁾ロ⁵⁴⁾セ⁵⁵⁾サ⁵⁶⁾ミ⁵⁷⁾ト⁵⁸⁾，ベン⁵⁹⁾シ⁶⁰⁾リ⁶¹⁾ト⁶²⁾，ベン⁶³⁾テ⁶⁴⁾イ⁶⁵⁾タ⁶⁶⁾リ⁶⁷⁾ン，ベン⁶⁸⁾ソ⁶⁹⁾ル⁷⁰⁾ラ⁷¹⁾リ⁷²⁾ン，メ⁷³⁾コ⁷⁴⁾ロ⁷⁵⁾ッ⁷⁶⁾フ⁷⁷⁾，メ⁷⁸⁾ル⁷⁹⁾グ⁸⁰⁾チ⁸¹⁾ム⁸²⁾コ⁸³⁾ン …………… 35物質 (37物質) 合計43物質

2.2 使用固相

ディスク型固相にはホリスチレンジ⁸⁴⁾ビ⁸⁵⁾ニ⁸⁶⁾ル⁸⁷⁾ベン⁸⁸⁾ゼ⁸⁹⁾ン系の3M社製Empore SDB-XD 47mmφ とカーボン系のEmpore Carbon Disk 47mmφ を用いた。

2.3 試薬

農薬標準品：和光純薬工業製および関東化学製残留農薬試験用

溶出溶媒 (アセトン，アセ⁹⁰⁾ニ⁹¹⁾トリ⁹²⁾ル⁹³⁾，酢⁹⁴⁾酸⁹⁵⁾エ⁹⁶⁾チ⁹⁷⁾ル⁹⁸⁾，メ⁹⁹⁾チ¹⁰⁰⁾ル¹⁰¹⁾ア¹⁰²⁾ル¹⁰³⁾コ¹⁰⁴⁾ール¹⁰⁵⁾，ヘ¹⁰⁶⁾キ¹⁰⁷⁾サン¹⁰⁸⁾)

：和光純薬工業製および関東化学製残留農薬試験用

内標準物質 (Fluoranthene-d10)：CIL製

精製水：Branstead NANO pure IIにより調製

2.4 標準溶液の調製

農薬標準試薬をアセトン，ヘキサン等を用い1000mg/l標準原液を調製した。この原液を混合，希釈しアセトンで添加用混合標準溶液10mg/l，およびGC/MS分析検量線用標準溶液0.1~1.0mg/lを調製した。

HPLC分析には90%アセ⁹⁰⁾ニ⁹¹⁾トリ⁹²⁾ル⁹³⁾で検量線用標準溶液0.1~1.0mg/lを調製した。

2.5 装置および分析条件

GC/MS分析は Fluoranthene-d10を内標準に用いSIM法で行った。装置の条件は表1に示した。

表1 GC/MS分析条件

GC/MS: HP6890+HP5973MSD (HEWRETT PACKARD)
GC Column: DB-17(J&W) 15m×0.25mm×0.25μm
Carrier Gas: He
Flow rate: 1.0ml/min Constant
Oven Temp.: 50°C(1min)→10°C/min→250°C
Inj. Mode: Splitless(purge on at 1min)
Inj. Vol.: 1μl
Inj. Temp.: 220°C
Interface Temp.: 250°C
Source Temp.: 210°C
Ionization: EI 70eV

測定対象物質は基準や指針の公定法に従った。ターゲットイオンは表2に示した。

HPLC分析条件は表3に示した。

表2 ターゲットイオン

No	農薬名	Target	No	農薬名	Target
1	ジクロホス	185	21	ベンディメタリン	252
2	メタミトフオス	141	22	イソフェンホス	213
3	エトリジアルゾール	211	23	メチルダィムロン	107
4	クロネブ	191	24	ブタホス	286
5	アセフェート	136	25	フルトコニル	173
6	ベンゾフルリン	292	26	トリクロピル	
7	ベンシクロン	180		-プロトキシエチル	182
8	フェノキカルブ	121	27	キヤフタン	149
9	プロピサミト	173	28	ナフロハミト	128
10	タィジンリン	137	29	イソキサチオン	177
11	シマジン	201	30	イソプロチオラン	162
12	イロペンフオス	204	31	クロルピロフェン	317
13	クロロタコニル	266	32	メフロニル	119
14	ジチオヒル	354	33	イプロジオン	314
15	テルブカルブ	205	34	ヒリナチカルブ	181
16	トルクロフオスメチル	265	35	EPN	157
17	メタキシル	206	36	ヒリタフェンチオン	340
18	クロルヒリス	197	37	DEP	109
19	チオベンカルブ	100	IS	Fluoranthene-d10	212
20	フェネトチオン	277			

表3 HPLC分析条件

HPLC	: Waters 510 + UV 490
Column	: Wakosil Agri-9 4.6mm φ × 250mm
Eluent	: CH ₃ CN/50mM KH ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄ (pH3.7) =35/65 (v/v) Added 0.01% EDTA-2Na
Flow	: 1.0ml/min at 45°C
Inj. Vol.	: 20 μl
Detection	: UV 230, 240, 270 nm アシュラム 270nm オキシ Cu 240nm トリクロピル, メフロップ, チウラム 230nm
ベンシクロン分析時	
Eluent	: CH ₃ CN/50mM KH ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄ (pH3.7) =45/55 (v/v) Added 0.01% EDTA-2Na
Flow	: 1.0ml/min at 35°C
Detection	: UV 230nm

2.6 固相抽出操作

ディスク型固相を用いた水中農薬の抽出法を図1、2に示した。農薬の分析はGC/MS法とHPLC法とで行い抽出操作もそれぞれ分けて行った。

固相の乾燥操作は吉田の報告²⁾による方法を採用した。これにより無水硫酸ナトリウムを用いた脱水操作は省略できた。

HPLC法では溶離液が水溶液であり、抽出操作では特に脱水操作は不要である。

固相ディスク SDB-XD

洗 浄

— 溶出溶媒 10ml

活性化

— アセトンまたはメタノール 10ml

— 精製水 20ml

試料抽出 pH7, 100ml/min

— 試料溶液 500ml

— 精製水 10ml

乾 燥 50°C 20min

溶 出

— 溶出溶媒 2.5ml × 3

内標準添加

— Fluoranthene-d10 1 μg/ml × 1 ml

濃縮・定容 1ml N₂ガス気流

GC/MS分析

図1 固相抽出操作 (GC/MS分析用)

固相ディスク SDB-XD

洗 浄

— 溶出溶媒 10ml

活性化

— アセトンまたはメタノール 10ml

— 精製水 20ml

試料抽出 pH3.5, 100ml/min

— 試料溶液 200ml

— 精製水 10ml

空吸引 1min

溶 出

— 溶出溶媒 2.5ml × 3

— 2%ジエチレングリコールアセトン溶液 0.5ml

溶媒留去 N₂ガス気流

転 溶

— アセトニトリルで1ml

HPLC分析

図2 固相抽出操作 (HPLC分析用)

3 検討試験と結果

3.1 溶出溶媒の選定

ディスク型固相SDB-XDの捕集・溶出を含む回収率を求める予備段階として、固相からの溶出溶媒を選定する

ため次の試験を行った。

予め一定量の標準試料を固相に添加し、試薬溶媒を乾燥後、各種の溶出溶媒により溶出操作を行い、得られた溶液濃度から溶媒ごとの溶出率を求めた。

なお、固相への標準試料の添加量は、環境基準項目を検水量 500ml で、またゴルフ場農薬暫定指針項目を検水量 200ml で分析した場合を想定して $5 \mu\text{g}$ ($10\text{mg}/\text{l} \times 0.5\text{ml}$) とした。

溶出溶媒にはアセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、メチルアルコール、ヘキサンを用いた。ジクロロメタンは疎水性溶媒であり脱水操作において非常に便利な溶出溶媒であったが環境基準対象物質であるため除外した。

試験操作を図 3、4 に示した。

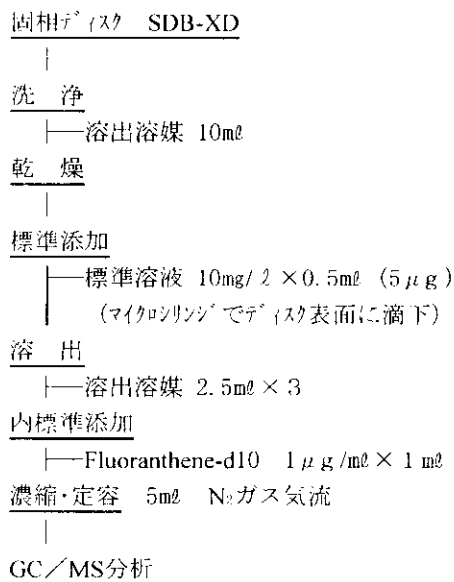


図 3 溶出試験操作 (GC/MS分析用)

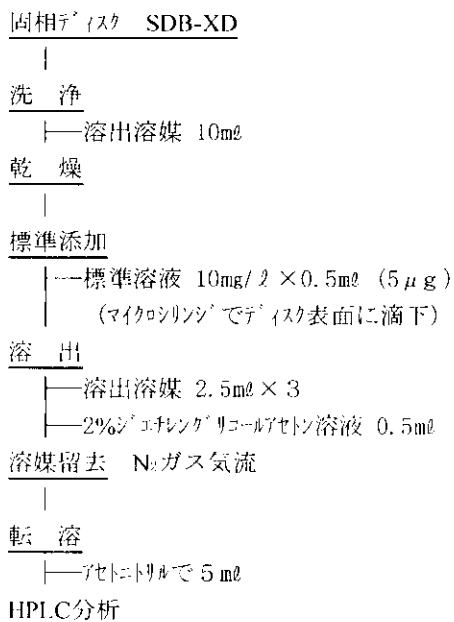


図 4 溶出試験操作 (HPLC分析用)

GC/MSによるTICを図5にHPLCによるクロマトグラムを図6に示した。ベンシドは公定法ではGC/MS法で規定されているが、本法では検出されず、HPLC法で対応することとした。トリクロルン(DEP)は本法では熱分解によりジクロロボス(DDVP)として検出されるため分析条件を変更して別途行った。

結果を表4に示す。

ヘキサンではマトリクス、アセート、アセラムについては溶出できずシマジン、林シ銅、トリクロルンについても低溶出率であった。

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチルについては良好な溶出率であった。メタノールはキアクチン以外は良好な溶出率であった。

以上の結果から添加回収試験でGC/MS法対象物質の固相溶出溶媒にはアセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノールを用いることとした。HPLC法対象物質の固相溶出溶媒には親水性の高いアセトン、アセトニトリル、メタノールを用いることとした。

3.2 精製水への添加回収試験

ディスク型固相SDB-XDに各標準試薬を添加した精製水を通水し、固相に捕集した後、検出試験3.1で決定した溶媒で溶出し回収率を求めた。この試験はGC/MS法とHPLC法について行い試験操作は図1、2に示した。HPLC法では溶出溶媒のうちアセトン、メタノールは溶媒のピークが目的物質ピークに影響を与えるためこれらについてはアセトニトリル転溶を行った。

標準試料の精製水への添加量は $5 \mu\text{g}$ ($10\text{mg}/\text{l} \times 0.5\text{ml}$) とした。精製水の量はGC/MS法分析対象試料は500ml ($0.01\text{mg}/\text{l}$) とした。HPLC法対象試料は200ml ($0.025\text{mg}/\text{l}$) とした。

通水速度は流量の制御が難しいこと、通水速度は回収率に依存しないとの報告³⁾もあり、実試料においては十分な通水速度と思われる約100ml/minについて行った。

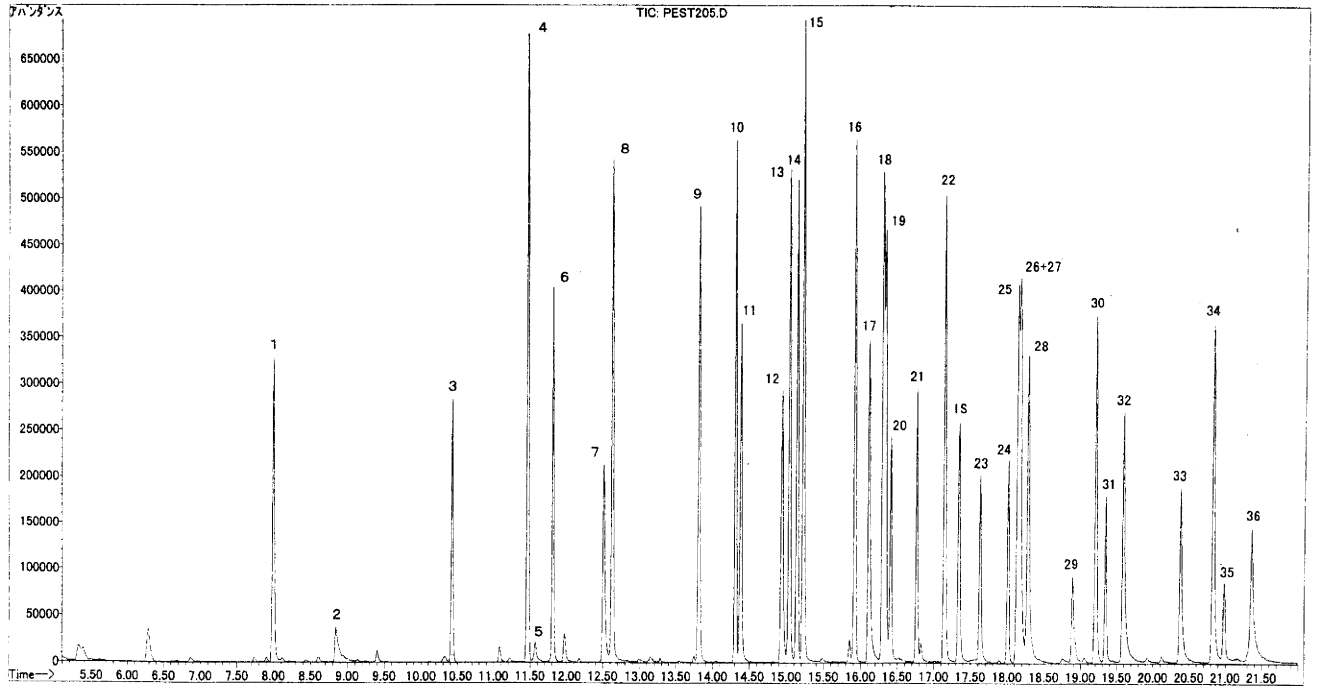
試験結果を表5に示した。マトリクス、アセートはすべての溶媒において検出されなかった。溶出試験3.1においては良好な溶出率を示していたことからこの2物質は固相に全く捕集されていないと思われる。トリクロルン(DEP)がどの溶出溶媒でも低い回収率であったことと酢酸エチルでヒリガクチンの回収率が低い以外は各溶媒良好な回収率を示していた。

マトリクス、アセート以外の農薬はディスク型固相に抽出されることが確認された。

3.3 カボンディスクによる精製水への添加回収試験

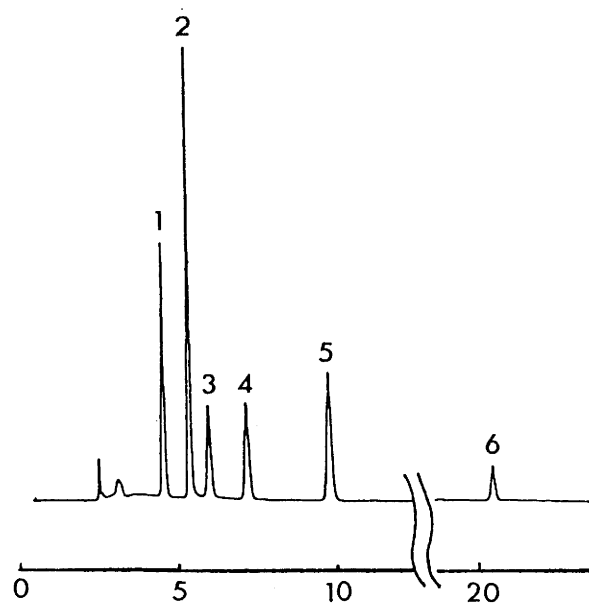
3.2の添加回収試験で全く回収できなかったマトリクスは公定法では試料溶液の減圧濃縮法が、またアセートは活性炭カラム捕集が規定されている。マトリクス、アセートともに水溶解度が高い極性物質であるのでカボンディスクの適用を検討した。添加回収試験は3.2と同様に行ったが、カボンディスクは試料溶液中の溶媒濃度により回収率が低下するため、添加するマトリクス、アセート標準試料は水溶液を用いた。溶出溶媒にはアセトンとメタノールについて行った。試験操作を図7に、試験結果を表6に示した。

マトリクス、アセートともに良好な回収率を示した。



1:Dichlorvos, 2:Methamidophos, 3:Etridiazol, 4:Chlorneb, 5:Acephate, 6:Benfluralin, 7:Pencycuron, 8:Fenobucarb, 9:Propyzamide, 10:Diazinon, 11:Simazine, 12:Iprobenphos, 13:Chlorothalonil, 14:Dithiopyr, 15:Terbcarb, 16:Tolclofos-methyl, 17:Metalaxyl, 18:Chlorpyrifos, 19:Thiobencarb, 20:Fenitrothion, 21:Pendimethalin, 22:Isofenphos, 23:Methyldymron, 24:Butamifos, 25:Flutolanil, 26:Triclopyl-Butoxyethyl, 27:Captan, 28:Napropamide, 29:Isoxatyion, 30:Isoprothiolane, 31:Chlornitrofen, 32:Mepronil, 33:Iprodione, 34:Pyributicarb, 35:EPN, 36:Pyridaphenthion

図5 CG/MS クロマトグラム



Detection:UV 270nm (0→4.8min), 240nm (4.8→5.5min), 230nm (5.5→)

Sample: 1) Asulam, 2) Oxine-Cu, 3) Triclopyr, 4) Mecoprop, 5) Thiuram, 6) Bensulide

図6 HPLC クロマトグラム

表4 溶媒別溶出率

(n=3)

		Acetone	AN	Ethyl Acetate	Methanol	n-Hex
GC/MS						
1	Dichlorvos	88%	74%	97%	97%	70%
2	Methamidophos	98%	85%	140%	92%	-
3	Etridiazol	82%	79%	100%	111%	95%
4	Chlorneb	89%	82%	92%	103%	105%
5	Acephate	83%	83%	121%	88%	-
6	Benfluralin	76%	83%	97%	122%	115%
7	Pencycuron	86%	78%	96%	79%	72%
8	Fenobucarb	87%	79%	100%	96%	90%
9	Propyzamide	87%	82%	96%	95%	102%
10	Diazinon	88%	84%	95%	101%	103%
11	Simazine	86%	81%	97%	92%	35%
12	Iprobenphos	75%	77%	95%	102%	76%
13	Chlorothalonil	89%	84%	92%	95%	103%
14	Dithiopyr	87%	86%	94%	96%	102%
15	Terbcarb	88%	84%	97%	98%	100%
16	Tolclofos-methyl	88%	87%	91%	96%	104%
17	Metalaxyl	85%	83%	106%	114%	71%
18	Chlorpyrifos	88%	88%	88%	92%	97%
19	Thiobencarb	88%	88%	91%	88%	94%
20	Fenitrothion	75%	82%	102%	120%	103%
21	Pendimethalin	76%	81%	95%	117%	105%
22	Isofenphos	84%	81%	82%	96%	94%
23	Methyldymron	82%	129%	118%	192%	86%
24	Butamifos	74%	77%	83%	111%	99%
25	Flutolanil	91%	93%	89%	103%	90%
26	Captan	71%	86%	106%	30%	87%
27	Napropamide	92%	96%	89%	109%	86%
28	Isoxatyion	69%	79%	85%	65%	88%
29	Isoprothiolane	85%	86%	82%	98%	89%
30	Chlornitrofen	82%	84%	83%	92%	91%
31	Mepronil	94%	107%	85%	122%	71%
32	Iprodione	93%	114%	77%	89%	64%
33	Pyributicarb	94%	115%	67%	109%	74%
34	Pyridaphenthion	92%	129%	76%	144%	68%
HPLC						
35	Asula,m	86%	86%	80%	91%	-
36	Oxine-Cu	82%	75%	63%	71%	43%
37	Triclopyr	86%	86%	81%	93%	45%
38	Bensulide	86%	91%	91%	91%	91%

表5 添加回收試驗結果

(n=5)

	Acetone		Acetonitril		EthylAcetate		Methanol	
	Mean %	CV%	Mean %	CV%	Mean %	CV%	Mean %	CV%
GC/MS								
1 Dichlorvos	98	8	92	12	112	4	107	8
2 Methamidophos	-	-	-	-	-	-	-	-
3 Etridiazol	92	9	110	8	124	5	100	9
4 Chlorneb	90	6	89	8	96	2	95	7
5 Acephate	-	-	-	-	-	-	-	-
6 Benfluralin	78	8	101	4	102	6	82	5
7 Pencycuron	87	13	85	10	92	6	97	10
8 Fenobucarb	96	9	91	9	103	3	109	7
9 Propyzamide	99	12	91	12	96	9	113	11
10 Diazinon	95	12	91	10	100	5	104	8
11 Simazine	94	9	94	8	99	5	106	9
12 Iprobenphos	98	11	108	11	114	3	104	11
13 Chlorothalonil	91	9	84	7	98	3	96	6
14 Dithiopyr	87	11	86	9	93	4	91	7
15 Terbcarb	93	9	89	9	98	3	103	8
16 Tolclofos-methyl	99	10	97	9	104	3	103	4
17 Metalaxyl	95	9	101	8	105	3	107	8
18 Chlorpyrifos	90	10	89	9	94	3	95	5
19 Thiobencarb	90	9	88	9	93	3	94	4
20 Fenitrothion	86	7	115	8	111	7	91	3
21 Pendimethalin	84	7	113	8	108	6	87	2
22 Isofenphos	93	10	93	10	85	10	101	11
23 Methyldymron	84	11	96	11	111	7	108	14
24 Butamifos	84	6	104	7	96	4	89	4
25 Flutolanil	101	9	114	11	121	4	106	11
26 Triclopyl-Butoxyethyl	91	9	93	11	101	3	95	9
27 Captan	82	17	85	14	118	14	80	4
28 Napropamide	89	8	91	10	97	2	96	8
29 Isoxatyion	75	10	97	10	104	10	84	3
30 Isoprothiolane	89	8	91	9	91	3	93	8
31 Chlornitrofen	80	8	113	8	105	9	82	3
32 Mepronil	96	9	117	13	126	8	99	10
33 Iprodione	86	11	96	12	101	7	91	6
34 Pyributicarb	81	13	91	14	56	18	81	6
35 EPN	96	9	106	10	95	23	120	11
36 Pyridaphenthion	80	16	102	13	100	9	86	6
37 DEP	68	1	65	6	41	15	39	4
HPLC								
38 Asulam	80	5	105	1	-	-	85	8
39 Oxine-Cu	70	5	67	5	-	-	65	10
40 Triclopyr	112	2	103	3	-	-	120	4
41 Mecoprop	118	1	105	1	-	-	125	3
42 Thiuram	80	5	99	1	-	-	76	10
43 Bensulide	97	3	96	3	-	-	97	2

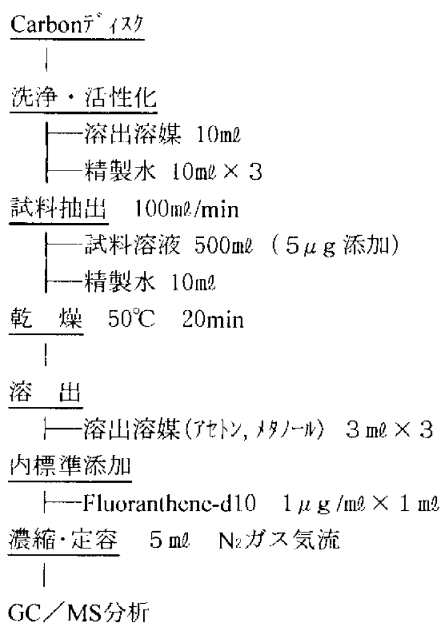


図7 Carbonディスク抽出操作

表6 添加回収試験結果 (Carbonディスク)

(n=5)

	Acetone		Methanol	
	Mean %	CV %	Mean %	CV %
Methamidophos	94	4	82	10
Acephate	96	4	111	4

4 まとめ

環境基準, 排水基準, ゴルフ場暫定指針対象農薬について公定法の多成分同時分析法では43物質の内, 試料の前処理法として逆相系シカムの固相抽出法によるものが36物質, 活性炭カラムの固相抽出法によるものが2物質, 溶媒抽出法によるものが4物質, 試料を直接減圧濃縮するものが1物質と規定されているが, 本試験で43物質の内41物質はポリマー系ディスク型固相(SDB-XD)により抽出が可能であった。また抽出不可能なメタミドホス, アセファートはカーボン系ディスク型固相(Carbon Disk)で抽出することが可能であった。

なお, ペンシドは公定法ではGCまたはGC/MS法で規定されているが検出されず, HPLC法を用いた。

今回抽出率の低かった DEPは熱分解のため他成分とは別の分析条件で分析しなくてはならなかったが, 加圧注入法³⁾や ウォカム注入法⁴⁾についての報告があり, 今後DEPの回収率と分析法について検討の予定である。

文献

- 1) 吉田政治: 水中農薬のディスク型固相抽出法による迅速分析, 大阪府監視センター所報 18, 37-41 (1997)

- 2) 上森仁志, 吉田貴三子, 福本正巳, 近藤孝一, 松浦脩治: シアプロピルシリカゲルを用いた高速液体クロマトグラフィーによるゴルフ場使用農薬の同時定量, 分析化学, 44(6), 443-447 (1995)
- 3) 栗山清治, 柏原督弘: ディスク型固相抽出の農薬分析への応用, 環境化学, 5(4), 807-819 (1995)
- 4) 鈴木 茂: ガスクロマトグラフ/化学イオン化質量分析法による大気中アセファート及びトリクロロホンの分析, 分析化学, 44(1), 41-48 (1995)