

水中農薬の自動固相抽出 - HPLC法による分析

中川 順一*, 栃本 博*, 竹島 有希*, 真木 俊夫*

Determination of Herbicides in Water by High-Performance Liquid Chromatography after Automated On-line Solid Phase Extraction

JUNICHI NAKAGAWA*, HIROSHI TOTIMOTO*, YUKI TAKESHIMA* and TOSHIO MAKI*

Keywords : 農薬 herbicides, 高速液体クロマトグラフィ-HPLC, 固相抽出 solid phase extraction (SPE)

はじめに

厚生省並びに環境庁は、水道水や河川水等に含まれる農薬に対する規制を強化拡充するために、その分析法を提示している。規制農薬の多成分一斉分析の前処理には、固相抽出法もしくは溶媒抽出法が採用されており、これまでこの前処理法を利用して、得られた抽出液をHPLCで分析した例が数多く報告されている¹⁻³⁾。しかし、これらの方法は、抽出操作に熟練を必要とし、更には人為的誤差が大きいという欠点がある。本法は、この固相抽出操作を自動化するとともに、HPLCによる分析までの行程を自動切り換えバルブを介してオンライン化することにより、分析行程の完全自動化を目的とする手法である^{4,5)}。今回、本法の有効性について河川水を用いて分析法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬

- 1) アシュラム (和光純薬社製) : 含量98.3% (GC)
- 2) オキシ銅 (和光純薬社製) : 含量98.0%以上 (GC)
- 3) チウラム (和光純薬社製) : 含量98.0% (GC)
- 4) MCP (関東化学社製) : 含量99.3% (GC)
- 5) イプロジオン (関東化学社製) : 含量98.2% (GC)
- 6) ベンスリド (和光純薬社製) : 含量98.0% (GC)
- 7) リン酸二水素カリウム (和光純薬社製) : 含量98.3% (GC)
- 8) アセトニトリル (和光純薬社製) : 残留農薬試験用

2. 装置

1) HPLC:PU-1580ポンプ, UV-1S70紫外可視分光検出器, DP-L1500Wデータ処理システム (日本分光社製) を使用した。

2) 自動固相抽出装置: PROSPEKT (Spark Holland社製) を用いた。

3. HPLC及び固相抽出装置の測定条件

表1に固相抽出条件及びHPLC条件を示した。

4. 標準原液

各農薬をそれぞれ10mg秤り採り、アセトニトリル100mlに溶解し100mg/L標準原液を調製した。

5. 分析方法

図1に検討に用いた自動固相抽出システムの概要を示す。

表1 固相抽出条件及び分析条件

【固相抽出条件】	
自動固相抽出装置	PROSPEKT
固相カートリッジ	10 × 2 mmI.D. HySphere-Resin GP
固相活性化	メタノール 2mL/min. 2min.
固相コンディショニング	精製水 (pH = 3.5) 2mL/min. 2min.
試料負荷	試料水 (pH = 3.5) 1mL/min. 5min.
固相洗浄	精製水 (pH = 3.5) 1mL/min. 2min.
固相からの試料溶出	HPLC移動相 1mL/min.
【分析条件】	
分析カラム	Inertsil ODS-3 150 × 4.6mmI.D. 5 µm (GL Sciences)
移動相	A: アセトニトリル B: 20mMリン酸二水素 - カリウム水溶液 (pH = 3.0)
グラジエント条件	A/B 10/90 (10min) 20min 80/20
HPLC分析流速	1.0mL/min
検出波長	UV 230nm
カラム温度	40

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3 - 24 - 1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3 - 24 - 1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

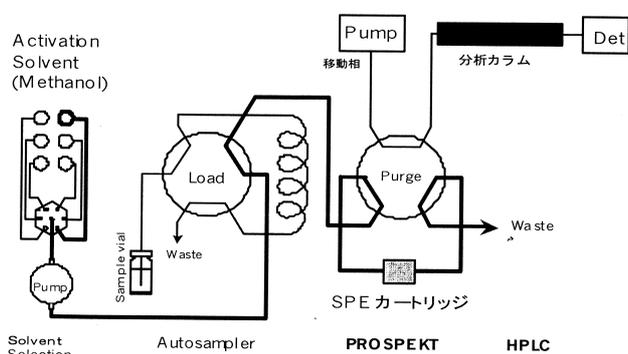


図1 自動固相抽出装置 (PROSPEKT): コンディショニング

実験結果及び考察

1. 分離条件の検討

本試験の対象農薬は、公定法において固相抽出による一斉分析法に採用されている農薬6成分を選定し、これら農薬の標準液を河川水に添加したものを試験溶液とした。

現在のの上水試験法では、「HPLCカラムにポリマー母体の物を使用する」とされているが、シリカゲル母体のカラムの方が理論段数も高く、S/Nが求めやすいと判断し、オクタデシル結合シリカゲル（以下ODSと略記する）を採用した。

2. クロマトグラムの改善

HPLC対象農薬のオンラインSPE-HPLC分析に関して、またODSカラムで分析を行うと、現行のアイソクラティック移動相では非常に長い分析時間を要するため、今回はグラジエント溶出を試みた。

グラジエント勾配の検討に関しては、分析条件最適化ソフトウェア“DryLab”を利用して、以下のように決定した。

A液：50mM KH_2PO_4 ，B液： CH_3CN ，A/B=80/20 (5min Hold) - (10min) 55/45 (3min Hold) - (6min) - 40/60 - (1min) - 20/80 (5min Hold)。この条件でHPLC直接注入、精製水添加試料のオンラインSPE-HPLC分析に関しては、再現性、回収率ともに問題はなかった。

しかし、河川水のオンライン分析において、河川水由来のブランクが8～20分の位置に幅広いピークとして溶出し、このブランクピークの上に目的成分であるアシュラムのピークとが重なり定量性が悪くなってしまった。アシュラムの基準値付近の濃度においては、このブランクピークの影響を強く受けずに定量できるが、基準値の1/10の濃度ではブランクピークの影響を大きく受け、CV値が39%になってしまい、全く定量性が無いクロマトグラムになった。

現在のところ、このブランクピークの原因は解明できていないが、おそらくフミン質であろうと推測される。

そこで、グラジエント勾配を再検討し、アシュラムがブランクピークに重ならないよう以下の条件に設定した。

A液：50mM KH_2PO_4 ，B液： CH_3CN ，A/B=90/10 (10min Hold) - (20min) 20/80 (5min Hold)。この条件に変更することにより、ブランクピークとアシュラムは完全に分離し、CV値も向上した。

固相カートリッジに関しては、ODS-3 (GL Sciences)，PLRP-S (Polymer Laboratory) の検討を行ったが、アシュラムやオキシシン銅など水溶性の高い目的成分がブレイクスルーしてしまい、実用には至らなかった。

今回採用したHySphere Resin-GPカートリッジ (GL Sciences) は、スチレンジビニルベンゼン共重合ポリマーであり、現行の試験法に記載されている固相とも一致し、固相のコンディショニングも、現行の試験法に記載されている方法を応用した。

また、OASIS固相カートリッジ (Waters) でも検討を行ったが、アシュラムのピークがブロードになり定量性が失われた。この原因として、OASISは粒子径が25～35 μm (平均30 μm)：HySphereは5～15 μm と大きいいため、固相への濃縮時及び固相からの溶出時にアシュラムが拡散してしまうためと考えられる。固相内で拡散した成分は、そのままHPLCカラムに導入されるため、当然のことながらピークバンドは広がってしまう結果になったと思われる。

また、チウラムの回収率が低い点に関しては、ポリマー分子内に存在するビニルピロリドンへの吸着など、ブレイクスルーではなく、吸着により溶出ししないと考えられる。

また、繰り返し試験を行っている過程でチウラムの回収率が悪くなるという現象が現れたが、この問題に関しては、OASISと同様に濃縮した成分のすべてが溶出されてこないためと考えられる。

この原因としてHySphere Resin-GPは、スチレンジビニルベンゼン共重合体であるが、ハイクロスリンクであるため一般のスチレンジビニルベンゼン共重合体より極性化合物の保持が強いといわれている。また河川水検討の前半と後半との間には数ヶ月のブランクがあり、その間に充填剤自身が変性してしまったか、あるいは何らかの物質が充填剤表面へ吸着したことによりチウラムの吸着活性が高くなってしまったと考えられる。

新たに購入した固相カートリッジでは、チウラムの回

収率も元通りに改善された。そのため今後、固相カートリッジの使用期限や保存方法について検討を行う必要があると考えている。

HySphere, OASISともに、チウラムの回収率に関して何らかの問題を抱えているが、これはアシュラムやオキシシン銅などの極性物質の保持を得るための弊害とも言える。

3. 検量線

各農薬の標準原液100mg/Lを用いオキシシン銅は水質基準値, その他の農薬は環境規制値(オキシシン銅40 μg/L, アシュラム200 μg/L, チウラム6 μg/L, MCP5 μg/L, イプロジオン300 μg/L, ベンスリド100 μg/L)になるように混合標準液を調製した。また, 段階的にアセトニトリルで希釈し, 1/10, 1/5, 1/2希釈標準溶液を調製した。この溶液のそれぞれ5 mlを用い検量線を作成した。その結果を図2に示す。図2に示すとおり, 各農薬とも直線性において良好な結果が得られた。

4. 定量下限

各農薬の標準原液100mg/Lを用いオキシシン銅10mg/L, アシュラム20mg/L, チウラム1 mg/L, MCP1mg/L, イプロジオン20mg/L, ベンスリド20mg/Lになるように混合標準液を調製した。次いで, 段階的にこの混合標準液をアセトニトリルで希釈し, 1/10, 1/5, 1/2希釈混合標準溶液を調製した。この溶液のそれぞれ5 mlを用い検量線を作成し, 各農薬の定量下限を求めた。本法での各農薬の定量下限値は, それぞれオキシシン銅3.5 μg/L, アシュラム1.2 μg/L, チウラム0.41 μg/L, MCP0.2 μg/L, イプロジオン10 μg/L, ベンスリド3.8 μg/Lである。

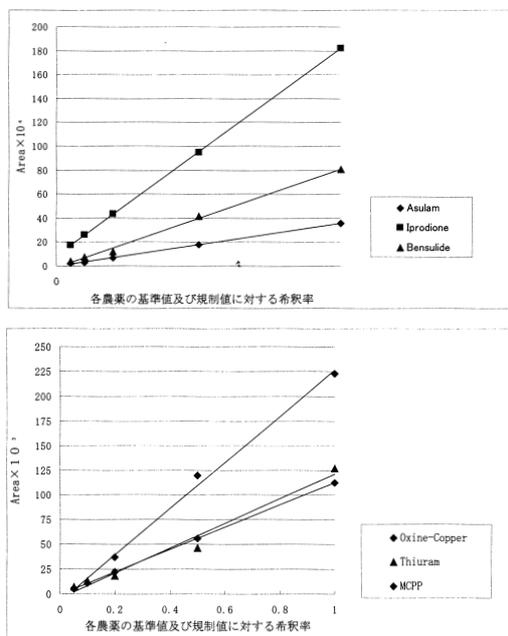


図2 検量線

図3に精製水並びに, 精製水に各農薬の定量下限値及び, 各農薬の定量下限値の5倍の濃度になるように調製した試料水のクロマトグラムを示した。

また, 図4にチウラムは水質基準値, その他の農薬については環境規制値の濃度になるように河川水に添加した試料, 又各農薬がその1/10濃度になるように調製した試料水並びに無添加の河川水のクロマトグラムを示した。

5. 再現性及び回収率

精製水での添加試験では, 各濃度のすべての農薬につ

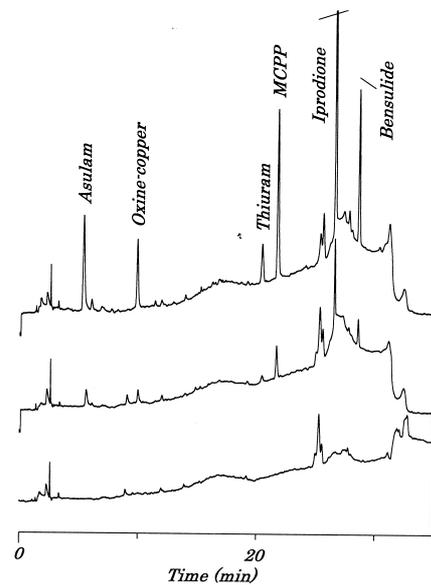


図3 精製水添加
上段 - 定量下限値の5倍
中段 - 定量下限値
下段 - 精製水ブランク

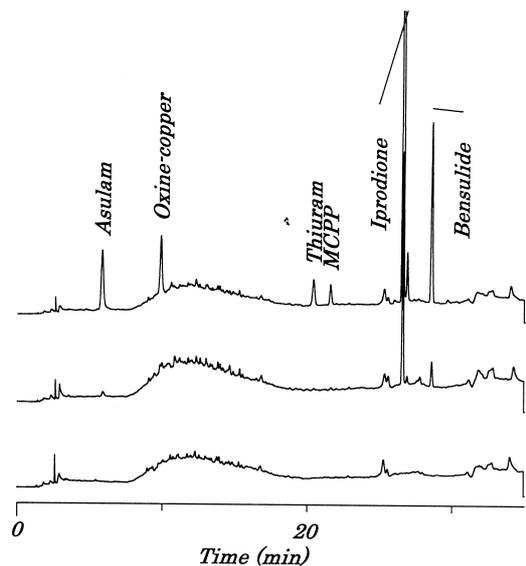


図4 河川水添加
上段 - 水質基準値
中段 - 水質基準値の1/10
下段 - 河川水ブランク

表 2 . 分析再現性および回収率

#	対象農薬	規制値 × 1/10 ($\mu\text{g/L}$)	河川A		河川B		河川C	
			再現性CV (%)	回収率 (%)	再現性CV (%)	回収率 (%)	再現性CV (%)	回収率 (%)
1	Oxine-copper	4	2.5	104	12.2	120	8.0	64
2	Asulam	20	2.1	90	9.5	120	1.5	115
3	Thiuram	0.6	1.4	99	2.6	83	12.2	49
4	MCP	0.5	3.1	113	1.4	87	1.1	114
5	Iprodione	30	0.6	101	4.1	94	0.7	92
6	Bensulide	10	4.1	120	6.1	107	2.1	102

規制値 - 水質基準値 (チウラム) 及び環境規制値 (ゴルフ場農薬)

いて変動係数10%以下であり、良好な結果を得られた。

また、河川水にチウラムは水質基準値、その他の農薬については環境規制値の濃度になるよう添加した試料水並びに、その1/10濃度になるように調製した試料水について再現性及び添加回収試験を行った。各設定濃度ごとに5回の測定を行い、再現性及び回収率について検討を行った。表2に河川水に水質基準値の1/10濃度及び、環境規制値の1/10濃度になるよう添加した試料水の再現性及び回収率に関する試験結果を示した。その結果、規制値の1/10濃度 (定量下限値) のオキシ銅を除き、再現性は0.2~15.8%、また回収率は、全ての添加濃度で河川水Cを除き80%以上であった。

オキシ銅に関しては、河川水Cにおいて回収率が64%と低い結果を示したのは、低濃度であるほど河川水ブランクの影響を強く受けているためと考えられる。

6. まとめ

近年提案されている分析指針は、測定値の精度管理に、より厳密さを求める傾向にある。

そのため、分析手法にも容易に精度管理をおこなえる測定法の要求が高まっている。本手法における分析操作の自動化により、迅速化・簡略化が図れるだけでなく、

人為的誤差を小さく抑えることができ、メソッドバリデーションへの対応も容易となる。また、本システムの利用により大幅に感度を向上できることが確認できた。固相カートリッジに保持された目的物質の全量を分析カラムに導入することができるため、今回5mlという少量のサンプルでも十分な感度を得ることができた。

今回、分析対象に農薬を選定したが、前処理から分析までの全行程が密閉系で行えるという利点を生かし、操作ブランクや実験室環境からのコンタミネーションが問題視されている物質の分析においても、本技術の応用が期待できる。

文 献

- 1) Baranowska, I. and Pieszko C.: *J. Chromatogr. Sci.*, **38**, 211-218, 2000.
- 2) Hostetler, K.A. and Thurman E.M.: *Sci. Total Environ.*, **248**, 147-155, 2000.
- 3) Peruzzi M., Bartolucci G. and Cioni F.: *J. Chromatogr. A.* : **867**, 169, 2000
- 4) Milles, G. R.: *J. Chromatogr.*, **813**, 63-70, 1998.
- 5) Pichon, V. and Hennion M. C.: *J. Chromatogr.*, **665**, 269-281, 1994.