

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^{**}, 小杉 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 KOSUGI^{**} and Toshio MAKI^{**}

Keywords: 農薬 pesticides, 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

水道水や河川水等に含まれる農薬の分析に関し、多成分一斉分析法¹⁻³⁾をはじめとする分析手法の迅速化、簡略化が求められている。また、測定値を容易に精度管理することを目的とし、分析系への試料注入や前処理に専用装置を導入するなど、分析手法の自動化も進められている^{4,5)}。

しかしその一方で、前処理系と分析系が各々個別に自動化されているため、前処理を終了した試料を、手作業で分析系へ移行させる必要があり、この過程での不純物の混入や目的成分の分解、および作業効率の低下が懸念される。これらの改善策として、前報⁶⁾において前処理と分析をオンラインで接続した自動化システムを提案した。

本システムは、前処理の手法である固相抽出の自動化装置とHPLC分析装置とが、自動バルブを介してオンライン接続されており、固相抽出後の目的成分の全量が、密閉系においてHPLCカラムへ導入されることを特徴としている。

前回の報告では、本システムを利用した水中農薬の分析に関し、直線性、再現性、および感度の点に着目し検討を行い、分析手法の迅速化、簡略化などの有効性が認められた。

今回は、上水試験法の従来法であるオフライン固相抽出 - HPLC分析との比較検討を行ったので、これについて報告する。

実験方法

1. 試薬および標準品

1) 標準品 アシュラム、オキシ銅、チウラム、メコプロップ、イプロジオン、ベンスリド、カルベンダジム、シデュロン、チオファネートメチル、ベノミルはジーエルサイエンス^(株)製農薬標準品を用いた。

2) 試薬 アセトン及びジクロロメタンは残留農薬分析用、アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用、水は

Milli-Q水を用いた。りん酸二水素カリウム、りん酸及び硝酸は試薬特級を用いた。

2. 試料液の調製

1) ろ過用ガラス器具の洗浄 エムポアTMディスク吸引マニホールド用ガラスウェア (300 mLガラスファネル、ガラスサポートベース、KEL-Fスクリーン) 又は1L三角フラスコを硝酸 (1+10) 水溶液 3 Lに一昼夜浸した。1L三角フラスコはジクロロメタン300 mLで容器内に気化ガスを充填させ、300 mLガラスファネル、ガラスサポートベース、KEL-Fスクリーンはジクロロメタン500 mLに浸し、1時間放置したのち、アセトンで洗い乾燥した。

2) 河川水のろ過 ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC社製 GA100 55mm quantity 100) を300 mLガラスファネルとKEL-Fスクリーンをひいたガラスサポートベースの間に挟み、クランプで固定、ろ液受けとしてガラスサポートベースの下部に1000 mL三角フラスコを配置した。次いで河川水を300 mLガラスファネル内に注ぎろ過を行った。

3) 試料液の調製 ろ液に5 mMの1-ペンタンスルホン酸ナトリウムを加え、硝酸 (1+10) 水溶液でpH3.5に調製し、適宜分取した混合標準原液を希釈して試料液とした。

3. 装置

1) HPLC: PU-1580ポンプ, UV-1S70紫外可視分光検出器, DP-L1500 W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。

4. 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。

5. 標準原液

アシュラム、オキシ銅、メコプロップ、チウラム、イプロジオン、ベンスリド、カルベンダジム、シデュロン、チオファネートメチル、ベノミル各農薬を4 mg精秤し、

* 第1報 東京衛研年報, 51, 263-266, 2000.

** 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, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1 装置

HPLC System	: LC600 シリーズ	ジーエルサイエンス(株)製
ポンプ	: PU610	
カラムオープン	: CO630	
オートサンプラー	: MIDAS	スパークホーランド社製
検出器	: L-7455形ダイオードアレイ検出器	日立製作所(株)製
データ処理装置	: D-7000形HPLCマネージャー	

オンライン自動固相抽出装置

自動固相抽出装置	: Prospekt2	スパークホーランド社製
固相	: Hysphere Resin GP (7 μm)	
送液部	: High pressure dispenser (HPD)	
固相抽出部	: Automated cartridge exchange (ACE)	
溶媒設置部	: Organizer	

オフライン自動固相抽出装置

自動固相抽出装置	: アクアトレース	ジーエルサイエンス(株)製
固相	: absolut NEXUS 60mg/3mL	パリアン社製

ベンスリド, カルベンダジム, シデュロン, チオファネートメチル, ベノミルはアセトニトリルに溶かしてそれぞれ 50 mLとし, アシュラム, オキシシン銅, メコプロップ, イプロジオンは100 mLにし, これらを標準原液とした. 標準原液中の各農薬濃度は, オキシシン銅40 μg/mL, カルベンダジム80 μg/mL, アシュラム40 μg/mL, チオファネートメチル80 μg/mL, チウラム20 μg/mL, メコプロップ40 μg/mL, シデュロン80 μg/mL, イプロジオン40 μg/mL, ベンスリド80 μg/mL, ベノミル80 μg/mL (カルベンダジムとして検出)である.

さらにチウラムはアセトニトリルに溶解して10 mLにし, さらに同液をアセトニトリルにて20倍希釈し200 mLとした.

これらの標準原液をそれぞれ 1 mL採取し, アセトニトリルで20倍希釈を行い, 混合標準原液とした.

6. 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.

1) オフライン固相抽出法

混合標準溶液を 1 mLとり, アセトニトリルで希釈し 8 mLとした. これを 2 mLとり硝酸 (1+10) 水溶液で pH3.5に調製したMilli-Q水で全量を4Lとし, 試験溶液とした. 負荷量を500 mLとして試験溶液の固相抽出を行った.

表2 オフライン固相抽出

作業工程	使用溶媒・ガス	使用量	条件
コンディショニング	:アセトニトリル	10mL	2mL/min
平衡化	:Milli-Q水	10mL	5mL/min
試料負荷	:試験溶液	500mL	20.0mL/min
洗浄	:Milli-Q水	5mL	20.0mL/min
乾燥	:窒素ガス	15min	1000mL/min
溶出	:アセトニトリル	6.5mL	0.5mL/min
濃縮	:窒素ガス	50min	500mL/min 40
再溶解	:アセトニトリル	1mL	
HPLC注入量	:	20 μL	

表3 HPLC条件

HPLC測定条件 (アイソクラティック)

カラム	:Shodex DE-613 150x4.6mmI.D 昭和電工(株)社製
移動相	:20mM リン酸緩衝液(pH3.1) : CH ₃ CN = 52 : 48
カラム温度	:40
測定波長	:UV200 ~ 300nm

各農薬の検出波長

オキシシン銅	:250nm	カルベンダジム	:280nm
アシュラム	:280nm	チオファネートメチル	:270nm
チウラム	:220nm	メコプロップ	:230nm
シデュロン	:240nm	イプロジオン	:210nm
ベンスリド	:220nm	ベノミル (カルベンダジムとして検出)	

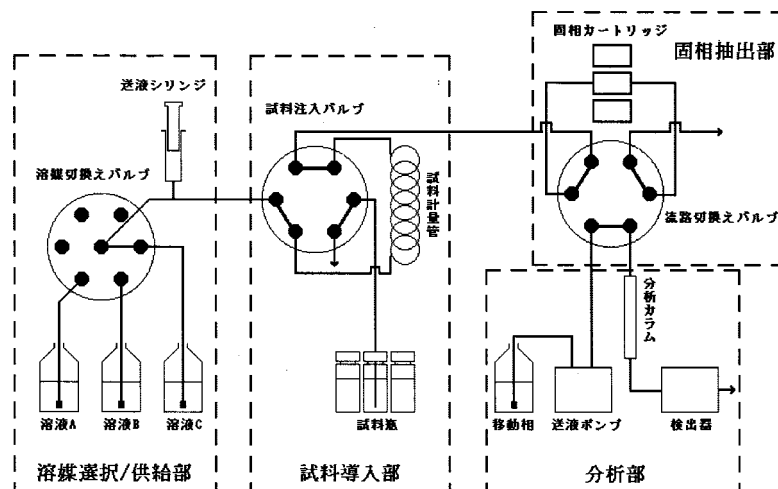


図1. オンラインシステム流路図

固相抽出操作は表2に示した。また、HPLC条件は表3のポリマーカラムによるアイソクラティックメソッドを採用した。

2) **オンライン固相抽出法** 混合標準溶液を1 mL採取し、硝酸(1+10)水溶液でpH3.5に調製したMilli-Q水により全量を200 mLとした。この溶液を20 mLとり、上記の溶液で全量を200 mLとし、試験溶液とした。試験溶液5 mLを用いて固相抽出を行った。固相抽出の操作は表4に示した。また、移動相条件は表3のポリマーカラムによるアイソクラティックメソッドを採用した。測定は、バルブ切り替えにより、固相から溶出された溶液は全量がHPLCに導入される。

3) **ポリマーカラム分析とODSカラム分析の検討** オンライン法による固相抽出を行い、ポリマーカラムによるアイソクラティック分析とODSカラムによるグラジエント分析の比較検討を行った。また、固相抽出時の直線性を検討するに当たって全ての農薬が同一濃度になるように調製した各標準原液をアセトニトリルで希釈し、新たに混合標準原液を調製した。

採取量の合計が40 mLになることから、オキシシン銅、シデュロン、ベンスリド、ベノミル、カルベンダジム、チオファネートメチルは16倍希釈、アシュラム、メコプロップ、イプロジオン8倍希釈、チウラムは4倍希釈となりオキシシン銅は2.5 µg/mL、その他は5 µg/mLとした。

試験溶液は5 mMの1-ペンタンスルホン酸ナトリウムをMilli-Q水に加え硝酸(1+10)にてpH3.5に調製した水溶液を希釈溶媒として混合標準原液を適宜希釈し、調製した。試験溶液を用いてオンライン固相抽出法の直線性の確認を行った。

4) **グラジエント法による河川水添加回収実験** 調製した試料液をオンライン固相抽出し、ODSカラムを使用したグラジエント法で添加回収試験を行った。試料濃度は表5に示したとおりである。

表4 オンライン固相抽出法

作業工程	使用溶媒	使用量	条件
コンディショニング	:アセトニトリル	2mL	1mL/min
平衡化1	:Milli-Q水	2mL	1mL/min
平衡化2	:20mM リン酸緩衝液 (pH3.5)	2mL	1mL/min
試料負荷	:試験溶液	5mL	1mL/min
洗浄	:20mM リン酸緩衝液 (pH3.5)	1.5mL	1mL/min
溶出	:HPLC移動相	10min	1mL/min

表5 試験試料中の各農薬濃度(河川水添加回収試験)

オキシシン銅	:20 µg/L	カルベンダジム	:20 µg/L
アシュラム	:8 µg/L	チオファネートメチル	:100 µg/L
チウラム	:8 µg/L	メコプロップ	:20 µg/L
シデュロン	:20 µg/L	イプロジオン	:20 µg/L
ベンスリド	:20 µg/L		
ベノミル	:20 µg/L	(カルベンダジムとして検出)	

実験結果及び考察

1. オフライン及びオンライン固相抽出法の比較検討

精製水添加回収試験の結果を表6に示す。その結果オフライン、オンライン固相抽出法ともに回収率はチウラムを除いて65%以上の値が得られた。変動係数はチウラムが大きい値となったが、これは分解による影響と考えられる。

オフライン固相抽出法ではカルベンダジムの回収率が65%であるのに対し、オンライン固相抽出法では123%と100%を上回っている。これはチオファネートメチルが時間の経過とともにカルベンダジムに分解してゆくことから、オンライン法では回収率の上昇が見られたと考えられる。それに対しオフライン法の結果は固相独自の性質により回収率が低く現れたと考えられる。固相抽出用の固相はオフライン、オンラインともポリマーベースであるが、固相間の性質差が現れている。しかしながら結果としては大差ないものといえる。

また、一回分析に要する時間を測定したところ、オフライン固相抽出法においては前処理時間が2時間近く要するのに対し、オンライン固相抽出法ではわずか25分という短時間で処理が可能であった。

2. ポリマーカラムによるアイソクラティック分析とODSカラムによるグラジエント分析の比較検討

分析時間が30分近くなるHPLC対象農薬分析においては溶出時間の遅いイプロジオンやベンスリドのピーク形状が悪くなる傾向がある。そこでODSカラムを用いてグラジエント分析での検討を行った結果、ピーク形状の向上が図れると

表6 回収率及び変動係数

(オフライン固相抽出法)

農薬名	回収率(%)	変動係数
カルベンダジム	65.9	2.57
アシュラム	70.4	2.05
オキシシン銅	74.4	3.67
メコプロップ	185.5	3.34
チオファネートメチル	66.3	7.71
チウラム	29.8	23.67
シデュロン	94.3	3.64
イプロジオン	102.0	6.20
ベンスリド	95.7	10.26

(オンライン固相抽出法)

農薬名	回収率(%)	変動係数
カルベンダジム	123.8	6.32
アシュラム	295.7	45.57
オキシシン銅	67.6	4.95
メコプロップ	96.8	6.88
チオファネートメチル	29.1	20.96
チウラム	68.4	21.00
シデュロン	99.8	2.66
イプロジオン	128.3	12.00
ベンスリド	72.4	17.61

もに汎用カラムでの分析も可能である事が分かった。図2にポリマーカラムによるアイソクラティック分析のクロマトグラム、及び図3にODSカラムによるグラジエント分析のクロマトグラムを示した。

1) 直線性の検討 0.5 µg/Lから500 µg/L濃度の試料をオンライン固相抽出法により前処理し、その直線性及び検出限界を求めた。変動係数は直線範囲内で最もバラツキの多い数値を採用した。

2) グラジエント法による河川水添加回収実験 オンライン固相抽出法により前処理を行い、グラジエント法で河川水添加回収試験を行いその結果を表7に示した。また、図

4に河川水に標準液を添加したクロマトグラムを示した。イプロジオン、ベンスリドともに95%以上の回収率が得られて良好であった。しかしながらカルベンダジムなどは100%以上の値になったことから、水中のバックグラウンドが重なっているものと考えられる。

まとめ

追加4成分を含むHPLC対象農薬10成分を一斉分析するに当たって、前処理及びその分析手法の検討を行った。

自動前処理装置によるオンライン固相抽出法では従来の固相抽出法に比べて一検体あたりに要する試料量が500 mL

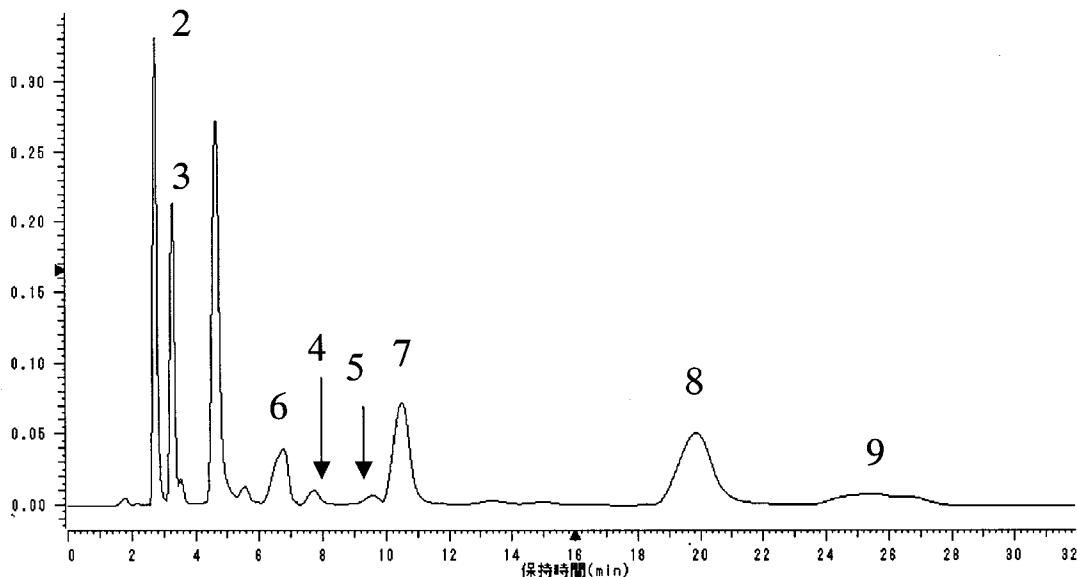


図2 ポリマーカラムによるアイソクラティック分析

1: オキシシン銅 2: カルベンダジム 3: アシュラム 4: チオファネートメチル 5: チウラム 6: メコプロップ
7: シデュロン 8: イプロジオン 9: ベンスリド 注入量 20 µL

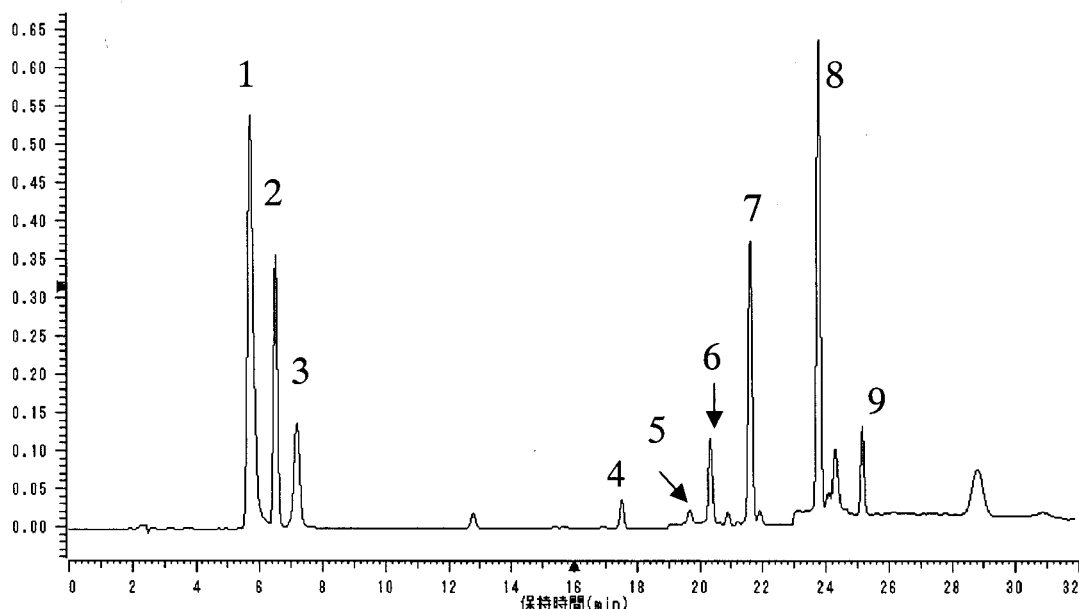


図3 ODSカラムによるグラジエント分析

1: オキシシン銅 2: カルベンダジム 3: アシュラム 4: チオファネートメチル 5: チウラム 6: メコプロップ
7: シデュロン 8: イプロジオン 9: ベンスリド 注入量 20 µL

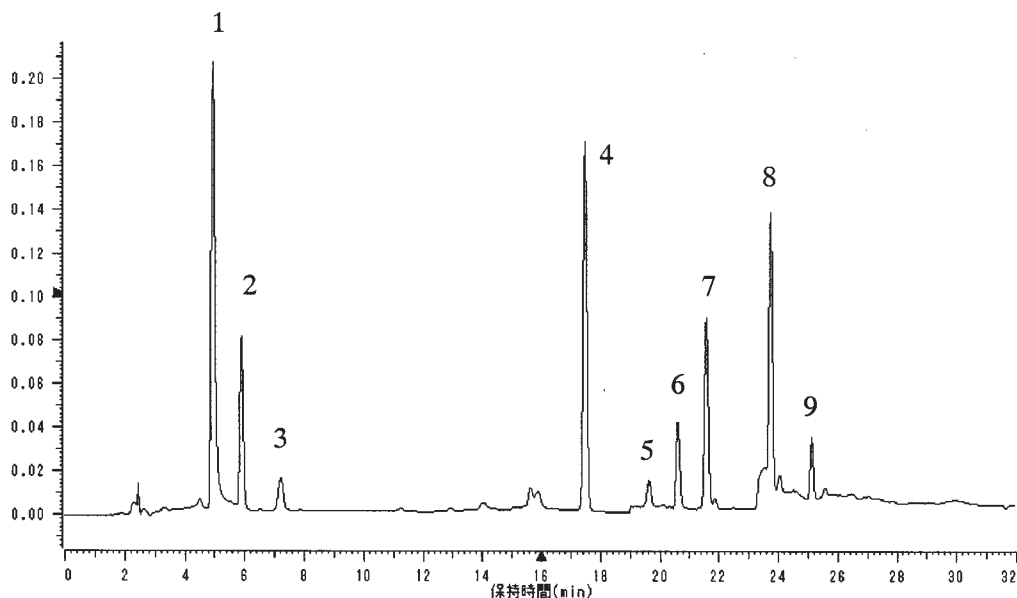


図4 河川水添加

表7 河川水添加回収試験

	試料濃度	回収率 (%)	CV (%)	
1	オキシ銅	20ug/L	135.7	2.33
2	カルベンダジム	20ug/L	253.3	4.66
3	アシュラム	8 ug/L	112.8	1.14
4	チオフアネートメチル	100ug/L	84.2	6.80
5	チウラム	8 ug/L	72.4	6.97
6	メコプロップ	20ug/L	104.6	0.15
7	シデュロン	20ug/L	119.8	1.49
8	イブロジオン	8 ug/L	97.0	1.64
9	ベンスリド	20ug/L	95.4	1.45

から5 mLと少量になっても感度はかわらず、また前処理時間も短縮された。

ポリマーカラムによるアイソクラティック法とODSカラムによるグラジエント法の分析においてはグラジエント手法の方が直線範囲、検出限界、再現性ととも良好な結果となった。これは各成分のピークがシャープに溶出できる事から定量が容易になった結果と考えられる。しかしなが

らチウラム等の低波長領域で測定を行う農薬については、グラジエント法の欠点とも言えるバックグラウンドの上昇の影響を受けるため定量性が損なわれてしまい、変動係数が大きな値となってしまった。チウラムは基準項目であり、本手法の定量下限が現基準値6 ppb付近となっているため、今後さらなる検討を要すると考えられる。

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.
- 6) 中川順一, 栃本 博, 小杉有希, 真木俊夫 : 衛研年報, **51**, 263-266, 2000 .