

報 文

スペクトルの微分解析を用いる高速液体クロマト
グラフィーによる水中の除草剤の分析小玉 修嗣^{®*}, 山本 敦*, 齋藤 行雄*
高柳 信孝*, 松永 明信*

Determination of herbicides in water by HPLC using a derivative analysis of spectra

Shuji KODAMA, Atsushi YAMAMOTO, Yukio SAITO,
Nobutaka TAKAYANAGI and Akinobu MATSUNAGA*

*Toyama Institute of Health, 17-1, Nakataikoyama, Kosugi-machi, Toyama 939-03

(Received 29 September 1995, Accepted 5 December 1995)

Two kinds of herbicides, dymron and mefenacet, in irrigation water were determined by HPLC using a derivative analysis of spectra. That is, herbicides were applied to HPLC with photodiode array detection, and their zero-(smoothing) to fourth-order derivative spectra were obtained from derivative treatment of the spectral data. By plotting the derivative values at the maximum or minimum wavelengths of their derivative spectra against analysis time, a highly selective chromatogram was processed. We have named this approach a "derivative spectrum chromatogram technique". Although the two herbicides could not be separated under the usual chromatographic conditions, by this technique, they could be determined individually. To ensure the selectivity of this technique, an identical factor, based on the formula of vector inner product between the two peak shapes of the chromatograms of derivative values for sample and standard solution, was used for peak purity check. The contents of dymron and mefenacet in samples determined by this technique agreed well with those obtained by the GC/MS method, respectively. Therefore, it is thought that the derivative spectrum chromatogram technique is useful as a selective detection method for HPLC.

Keywords : derivative spectrum chromatogram technique; herbicide; photodiode array detection; HPLC; irrigation water.

1 緒 言

単一波長で目的成分を定量する HPLC 分析では、目的成分と未知成分の保持時間が接近している場合、定量が不正確あるいは不可能となる。HPLC カラムからの溶出液の光吸収スペクトルを経時的に記録できるフォト

ダイオードアレイ検出器 (PDA) が開発され、目的成分と未知成分の光吸収の重ならない波長を調べながら定量することが可能となった。しかし、化合物の光吸収は一般に幅広いバンド状であるため、目的成分だけを選択的に定量することは困難である。選択性を発現させるためには、化合物の幅広い吸収バンドをなんらかの処理によって幅狭くする必要がある。

光吸収スペクトルの連続性は微分処理を可能とし、一

* 富山県衛生研究所: 939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1

般的に微分次数が高くなるほどバンド幅の狭いスペクトルを与える。この微分スペクトルの極大（又は極小）波長の微分値を経時的にプロットすることにより、微分値のクロマトグラムが得られる。著者らは、このような性質を利用して、PDA データから目的成分を選択的に検出できる方法を開発し、“微分スペクトルクロマトグラム法”とした¹⁾。本法を用い、田植え時に繁用される除草剤（ダイムロン及びメフェナセット）について、農業用水を分析した。

2 実験方法

2.1 試料

農業用水を 1995 年 5 月 10 日に採水し、0.45 μm のフィルターで汙過したものを試料とした。

2.2 試薬

ダイムロンの標準品は林純薬製の残留農薬試験用を、メフェナセットの標準品は和光純薬製の残留農薬試験用を用いた。アセトニトリル及び蒸留水は HPLC 用を、アセトンは残留農薬試験用を使用した。

2.3 装置

HPLC 装置は、日立製作所製 L-6300 形ポンプ（2 台）と AS-4000 形オートサンプラー（4 ml 仕様）、島津製作所製 SPD-M10AV 形 PDA と CTO-10AC 形カラムオーブン、昭和電工製分析カラム（RSpak DE-613, 6 mm i.d. $\times$ 150 mm）と Merck 製濃縮カラム（LiChro CART4-4, 4 mm i.d. $\times$ 4 mm）、及びセンシュー科学製 EIE010 形スイッチングバルブを組み合わせで構成した。

システムの制御は、PAN 通信による日立製作所製 D-6100 形 HPLC マネージャーを用いた。三次元データの取り込みは、島津製作所製 CLASS-M10A LC ワークステーションにより行った。微分スペクトルクロマトグラムによる解析は、NEC PC-9801 パーソナルコンピュータを用い、N88-BASIC Version 5.0（Microsoft, Redmond, WA, USA）で作成したプログラムで行った¹⁾。

2.4 標準溶液及び希釈標準溶液の調製

ダイムロン 100 mg あるいはメフェナセット 100 mg をそれぞれアセトン 100 ml に溶解し、標準原液（1000 mg/l）とした。各標準原液を個別にアセトニトリルで種々の濃度に希釈して標準溶液（0.333～20 mg/l）を調製した後、蒸留水で 100 倍に希釈したものを希釈標準溶液（3.33～200 $\mu\text{g/l}$ ）とした。又、各標準原液をアセ

トンで希釈混合したものを GC/MS 標準溶液（各 0.1～10 mg/l）とした。

2.5 HPLC の測定条件

HPLC は、既に報告した全自動 HPLC 分析システムに準じて行った²⁾。すなわち、オートサンプラーで採取した希釈標準溶液又は試料 3 ml を濃縮カラムに供し、農薬を捕集・抽出した。次に、スイッチングバルブを切り換え、移動相（56% アセトニトリル）を 1 ml/min の流量で濃縮カラムに通過させ、溶出された農薬を分析カラムに導入した。分離された成分は PDA を用い、1.28 秒間隔で 200～327 nm の吸光度を測定した。

2.6 微分スペクトルクロマトグラムの解析

希釈標準溶液の三次元データをアスキー変換して得られたデジタルデータから、Savitzky-Golay 法³⁾により、ピークトップにおける 0～4 次微分スペクトルを作成した。各微分スペクトルにおいて、微分値の極大（あるいは極小）波長を求めた。その波長の微分値を経時的にプロットして、微分スペクトルクロマトグラムを作成した。試料についても、上記と同じ微分処理回数と波長の組み合わせを用いて、微分スペクトルクロマトグラムを作成した。

2.7 ピーク形状の一致度の算出

試料の特定波長における特定次数の微分スペクトルクロマトグラムのピーク純度を調べるために、希釈標準溶液（100 $\mu\text{g/l}$ ）のピーク形状との一致度をベクトルの内積の公式から算出した。

$$\text{一致度 } (r) = \frac{\sum_t [A(t) \times B(t)]}{\sqrt{\sum_t [A(t)]^2} \times \sqrt{\sum_t [B(t)]^2}}$$

$A(t)$ 及び $B(t)$ は、それぞれ保持時間 (t) における試料及び希釈標準溶液の特定次数・特定波長の微分値である。一致度は $-1 \sim +1$ までの値をとり、 $+1$ に近づくほどクロマトグラムパターンの一致度は高くなる。

2.8 GC/MS 分析条件

上水試験方法に準じて行った⁴⁾。すなわち、試料を Sep-Pak Plus PS-2（Waters 製）に供して農薬を捕集・抽出した後、ジクロロメタンで溶出した。溶出液を硫酸ナトリウムで脱水した後、アセトンに溶媒置換し、GC/MS に供した。キャピラリーカラムは DB-1（0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μm ; J & W Scientific 製）を用いた。ダイムロン及びメフェナセットの測定質量数

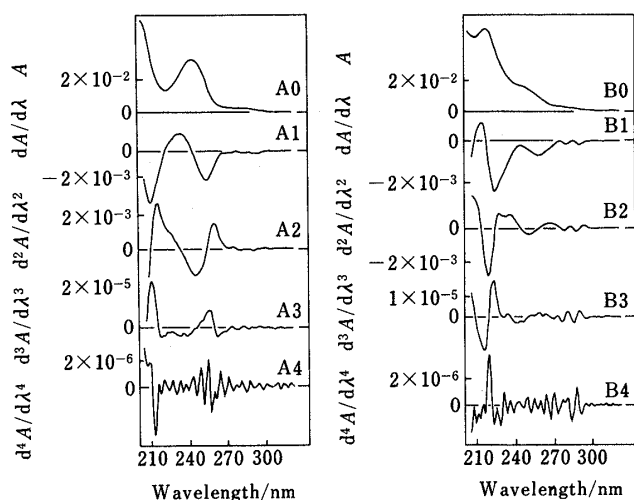


Fig. 1 Derivative spectra of dymron and mefenacet
The diluted standard solution containing 100 $\mu\text{g/l}$ dymron or mefenacet was applied into HPLC individually. The zero- to fourth-order derivative spectra of dymron (A) and mefenacet (B) were prepared from the photodiode array data at the peak maximum. A0 to A4 or B0 to B4 represent zero- to fourth-order derivative spectra of dymron (A) or mefenacet (B), respectively.

(m/z) は, それぞれ 107 及び 192 とした. 試料中の農薬の定量は, 絶対検量線法を用いてピーク面積法により算出した.

3 結果及び考察

3.1 微分スペクトルの作成

希釈標準溶液を用いてダイムロンとメフェナセットの保持時間を検討したところ, 48~80% の範囲で移動相のアセトニトリル濃度を変えても両者は分離しなかった. そこで, 保持時間が約 14 分となる 56% アセトニトリルを移動相とし, ダイムロンとメフェナセットの希釈標準溶液 (100 $\mu\text{g/l}$) を用いて, それぞれの吸光度が最も大きくなる保持時間のスペクトルを 0~4 回微分処理した (Fig. 1). その結果, 微分次数が高くなるほど, 正又は負のバンドが多数出現し, かつバンド幅が狭くなった. 各微分次数において, 極大 (極小) 波長のうち, 絶対値の大きい 3 波長を選択し, 下記の組み合わせを以後の実験に用いた. ダイムロンでは, 1 次微分として 210, 234, 255 nm, 2 次微分として 215, 245, 260 nm, 3 次微分として 210, 256, 262 nm 及び 4 次微分として 212, 255, 258 nm を用いた. メフェナセットでは, 1 次微分として 214, 224, 258 nm, 2 次微分として 219,

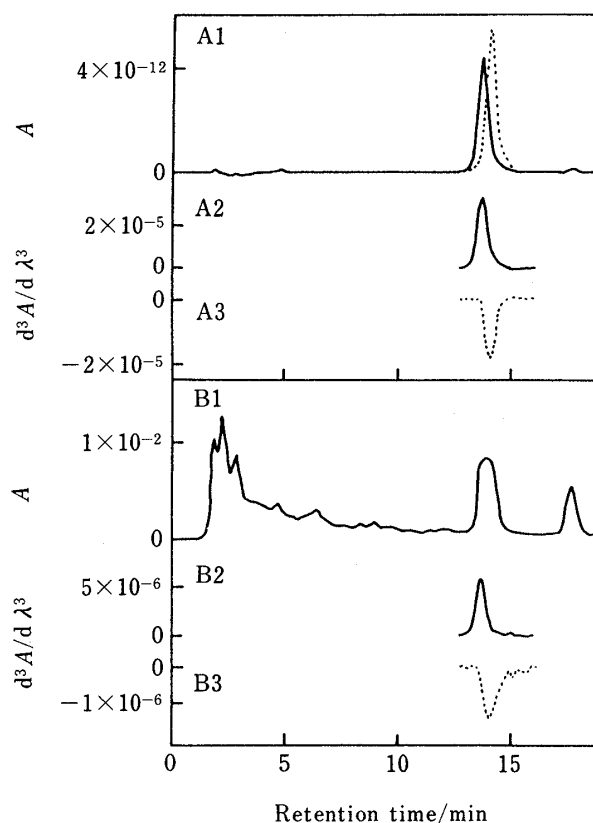


Fig. 2 Derivative spectrum chromatograms of dymron and mefenacet in diluted standard solution and irrigation water

A: The diluted standard solution containing 100 $\mu\text{g/l}$ dymron or mefenacet was applied into HPLC individually. A1: usual chromatograms (zero-order) of dymron (solid line) and mefenacet (dotted line) at 210 nm. A2 and A3: third-order derivative spectrum chromatograms of dymron at 210 nm and of mefenacet at 215 nm, respectively. B: The irrigation water was applied into HPLC. B1: usual chromatogram at 210 nm; B2 and B3: third-order derivative spectrum chromatograms of dymron at 210 nm and of mefenacet at 215 nm, respectively.

227, 235 nm, 3 次微分として 215, 222, 287 nm 及び 4 次微分として 219, 227, 288 nm を用いた.

3.2 検量線の作成

希釈標準溶液を用いて, 前述の微分次数と波長の組み合わせにおける微分クロマトグラムから, ピーク高さ法により, 12 種類 (1~4 次微分, 各 3 波長) の検量線を作成した. その結果, いずれの検量線においても, ダイムロン及びメフェナセットの両者は, 3.33~200 $\mu\text{g/l}$ の範囲で良好な直線性を示した ($r \geq 0.999$).

Table 1 Analytical values of dymron and mefenacet in irrigation water obtained by a derivative spectrum chromatogram technique with various combinations of derivative order and wavelength

Derivative order	Dymron			Mefenacet		
	Wavelength/ nm	Identical factor, <i>r</i>	Analytical value/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Wavelength/ nm	Identical factor, <i>r</i>	Analytical value/ $\mu\text{g l}^{-1}$
1st	210	0.998	16	214	-0.452	—
	234	0.820	13	224	0.958	8
	255	0.995	17	258	0.650	47
2nd	215	0.957	14	219	0.357	5
	245	0.999	16	227	0.802	22
	260	0.995	15	235	0.924	8
3rd	210	0.995	19	215	0.927	6
	256	0.979	14	222	0.877	8
	262	0.899	15	287	0.827	12
4th	212	0.969	19	219	0.960	8
	255	0.925	16	227	0.878	18
	258	0.913	16	288	0.514	7

3・3 農業用水中のダイムロン及びメフェナセットの分析

ダイムロン (210 nm) 及びメフェナセット (215 nm) の 3 次微分スペクトルクロマトグラムを Fig. 2 に示す。Fig. 2, A1 は 210 nm における通常のクロマトグラム (0 次微分), A2 はダイムロンの 210 nm における 3 次微分スペクトルクロマトグラム, A3 はメフェナセットの 215 nm における 3 次微分スペクトルクロマトグラムである。一方, 農業用水の 210 nm における通常のクロマトグラム (Fig. 2, B1) では, ダイムロンとメフェナセットの保持時間が接近しているため, 両者は分離せず, 定量は不可能であった。又, それらのピークに未知成分が混入している可能性も考えられた。そこで, 農業用水について得られた HPLC-PDA データから, 210 nm 及び 215 nm における 3 次微分スペクトルクロマトグラムを作成し, それぞれ B2 及び B3 に示した。その結果, B2 及び B3 の保持時間はそれぞれ A1 と A2 及び A1 と A3 に示したダイムロンとメフェナセットの保持時間と一致し, 検量線より, それぞれ 19 $\mu\text{g/l}$ 及び 6 $\mu\text{g/l}$ と算出された。

次に, 微分次数と極大 (極小) 波長の 12 種類の組み合わせについて, それぞれ微分スペクトルクロマトグラムを作成し, ダイムロンとメフェナセットを定量した (Table 1)。ダイムロン及びメフェナセットの定量値はそれぞれ 13~19 及び 5~47 $\mu\text{g/l}$ であり, 又, それぞれのピーク形状の一致度は 0.820~0.995 及び -0.452~0.985 であった。なお, メフェナセットの 1 次微分の

214 nm における微分スペクトルクロマトグラムでは, 希釈標準溶液で正のピークとなるのに対し, 試料では負のピークであったため, 一致度が負の値を示し定量ができなかった。メフェナセットの場合, ピーク形状の一致度に低い値が多く見られた原因としては, ①メフェナセットの特定微分次数における極大 (極小) バンド波長で, ダイムロンも正又は負の微分値を持つ場合が多く見られること, ②ダイムロンの濃度に比べて, メフェナセットの濃度が低いこと, などが考えられる。微分スペクトルクロマトグラムを用いると, 微分次数と波長により様々な組み合わせによる定量が可能である。しかし, 目的成分を定量するためには, 特定の微分次数と波長の組み合わせを適切に選択する必要がある。ピーク形状の一致度が高いことは, その微分スペクトルクロマトグラムにおける目的成分のピーク純度が高いことであり, 定量値の信頼性も高いと考えられる。今回はあえて, ピーク形状の一致度が 0.9 以上を示す微分次数と波長の組み合わせを用いたところ, ダイムロン及びメフェナセットの定量値はそれぞれ 14~19 及び 6~8 $\mu\text{g/l}$ となり, ばらつきが小さくなった。これらの値を平均し, ダイムロンとメフェナセットの定量値をそれぞれ 16 及び 8 $\mu\text{g/l}$ とした。なお, これらの定量値は GC/MS を用いたときの定量値 (それぞれ 17 及び 7 $\mu\text{g/l}$) とよく一致した。なお, ピーク形状の一致度が 0.9 以上を示す個々の組み合わせ (ダイムロンで 10 種類, メフェナセットで 4 種類) について, 本分析を 7 回繰り返したときの定量値の再現性 (RSD 値) を調べたところ, ダイムロンで 5~8%, メフェナセットで 8~12% であった。

微分スペクトルクロマトグラム法では, 目的成分の保持時間と既知あるいは未知成分のそれとが重なっている, 目的成分を分別定量しようと考えられる. 著者らは, 試料として農業用水を用い, その中に含まれる 2 種類の農薬を分析できた. 但し今回の分析では, 未知成分の存在も否定できないが, 2 種類の目的成分の保持時間が互いに重なり合っており, 既知成分と既知成分の分別定量であった. 今回の実験では, ベクトル内積の公式を用いてピーク形状の一致度を算出し, 0.9 以上の一致度を示す定量値を採用したが, このことについては種々の検討の余地が残っていると思われる. しかし, 微分スペクトルクロマトグラムのピーク形状の一致度を考慮することにより, 微分スペクトルクロマトグラム法を目

的成分と未知成分の組み合わせにも適用できると推定される. 従って, 微分スペクトルクロマトグラム法は HPLC の選択的検出法として有用であると考えられる.

文 献

- 1) A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *Analyst* (London), **120**, 377 (1995).
- 2) 小玉修嗣, 松永明信, 大戸幹也, 山本 敦, 水上英一: 環境化学, **5**, 81 (1995).
- 3) A. Savitzky, M. J. E. Golay: *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).
- 4) 日本水道協会編: “上水試験方法”, p. 327 (1993), (日本水道協会)

要 旨

スペクトルの微分解析を用いた HPLC により, 農業用水中に含まれる 2 種類の除草剤 (ダイムロンとメフェナセット) を分析した. すなわち, 2 種類の標準化合物を HPLC に供し, フォトダイオードアレイ検出器から得られたそれぞれのスペクトルデータを 0~4 回微分処理し, 微分スペクトルを得た. 単純な移動相を用いたため, 通常のクロマトグラム (0 次微分) では, 2 種類の除草剤は分離されなかった. これに対し, 標準化合物の 1~4 次微分スペクトルとその極大 (極小) 波長の組み合わせを用いて, 農業用水のスペクトルデータを微分した値を経時的にプロットした微分値のクロマトグラムでは, 両者を分別定量できた. 農業用水を用いた微分値のクロマトグラムと標準化合物のそれとの一致度を指標としたピーク純度を考慮すると, 農業用水中のダイムロン及びメフェナセットの定量値は, GC/MS で得られたそれぞれの定量値とよく一致した. 従って, 本法は HPLC の選択的検出法として有用であると考えられる.