

テクニカルレター

固相抽出/高速液体クロマトグラフィーによる河川水中のシマジン、チウラム及びベンチオカーブの同時分析

北見 秀明^{®*}, 渡辺 哲男^{**}, 北原 滝男^{***}, 石原 良美^{***}, 高野 二郎^{***}

Simultaneous determination of simazine, thiuram, and benthocarb in river-water by solid-phase extraction/HPLC

Hideaki KITAMI^{*}, Tetsuo WATANABE^{**}, Takio KITAHARA,
Yoshimi ISHIHARA and Jiro TANANO^{***}^{*}Sougou Kankyou Bunseki Co., Ltd., 1-13-2, Kamoi, Midori-ku, Yokohama, 226-0003^{**}Department of Resources and Environmental Science, School of Humanities and Culture, Tokai University, 1117, Kitakaname, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-1292^{***}Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, 1117, Kitakaname, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-1292

(Received 10 June 2002, Accepted 12 September 2002)

We studied a simple method for the simultaneous determination of simazine, thiuram, and benthocarb in distilled water and river-water by high-performance liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector (UV). As a result, good linearity of the calibration curve was obtained in the concentration range from 0.01 mg l⁻¹ to 0.5 mg l⁻¹. The detection limits based on S/N=3 were 1.0 µg l⁻¹ for simazine, 4.5 µg l⁻¹ for thiuram, and 6.5 µg l⁻¹ for benthocarb. Solid-phase extraction using activated carbon and elution with acetone was recommended for enriching the three pesticides. The recoveries from 200 ml of spiked river water samples at a concentration level of 2.5 µg l⁻¹ were 88.6~93.8%, and the relative standard deviations were 4.9~5.3%. This analytical method could be successfully applied to the determination of three pesticides in river water.

Keywords : HPLC/UV; solid-phase extraction; simazine; thiuram; benthocarb.

1 緒 言

ゴルフ場規制農薬として一般化されているシマジン、チウラム及びベンチオカーブは、我が国の水質汚濁防止法の環境基準項目及び排水基準項目として定められている。この農薬3種類の分析対象物質における測定前処理は、溶媒抽出(液液抽出)と固相抽出が公定法^{1)~6)}で定められている。この2種類の抽出方法のうち、固相抽出がよく用

いられているが、これら農薬の溶離において、水と混ざり合わないジクロロメタンを使用しなくても、アセトンで代替できることは既報⁷⁾⁸⁾でも報告した。このジクロロメタンは排水基準項目の揮発性有機化合物(volatile organic compounds, VOC)11種類に含まれており、VOC測定への汚染の原因となり、アセトンはアルデヒドの捕集及び測定に汚染の原因となる。そこで、測定環境に応じて使用する溶離溶媒の選択できる幅が広がれば、かなり実務において便利である。また、特に既報⁹⁾では、この農薬3種類の分析対象物質における測定時間と費用の改善に着目し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)における溶離液をメタノールとし、その測定の最適化の検討を行った。その際、既報⁹⁾では装置条件として、ホットダイオードアレイ検

^{*}(株)総合環境分析技術部技術開発課: 226-0003 神奈川県横浜市緑区鴨居1-13-2^{**}東海大学教養学部人間環境学科自然環境課程: 259-1207 神奈川県平塚市北金目1117^{***}東海大学理学部化学科: 259-1207 神奈川県平塚市北金目1117

出法, かつグラジエント溶離法⁹⁾を用いており, 測定するうへでは装置における費用が単純な系に比べてまだ削減可能と思われる。

そこで本研究では, シマジン, チウラム及びベンチオカーブの農薬 3 種類を分析対象物質として, ポンプ, 検出器, インテグレーター及びカラムといった最も単純な系において測定可能な, 固相抽出後のアセトニトリル-水系を移動相とした紫外分光光度検出による HPLC 測定の検討を行ったので, その結果について報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

シマジン, チウラム, ベンチオカーブの各農薬標準品は和光純薬製を使用し, アセトン, メタノール, ジクロロメタン, アセトニトリル等の溶媒は, 抽出には和光純薬製の残留農薬試験用 300 を使用し, 測定には関東化学製の HPLC 測定用を使用した。活性炭 (活性炭素) は和光純薬製のクロマトグラム用の Charcoal, Activated (粒径 63~300 μm) を使用した。また, 分析に用いた水はオートスチール (ヤマト科学製 YG221) により精製した蒸留水 ($0.2 \mu\text{S cm}^{-1}$ 以下) を使用した。標準液の調製は, アセトニトリルを溶媒として, 農薬 3 種類の分析対象物質の 1000 mg l^{-1} の標準原液をそれぞれ調製した。これら標準原液から適宜希釈し, 混合標準液を調製し, 実験に使用した。

2.2 装置及び条件

HPLC システムは, ポンプ (655 A-11), 紫外分光光度検出器 (655 A-21, 以上, 日立製作所製), インテグレーター (C-R6 A, 島津製作所製) を使用した。測定条件は以下のとおりである。カラム, 関東化学製 (Mightysil RP-18 GP, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$); カラムオープン温度, 室温 (25°C); 溶離液及び溶離条件, アセトニトリル-水 = 70/30%; 溶離液流量, 0.6 ml min^{-1} ; 測定波長, 230 nm; 注入量, 20 μl 。ここで既報⁹⁾では, 測定波長を 220 nm で検討を行ったが, 共存物質やベースライン等の影響を考慮し, ピークは若干小さくなるが, 今回の検討では 230 nm を採用した。

ディスク型固相抽出法¹⁰⁾では, エムポアTM 抽出ディスク SDB-XD (厚 0.5 mm, 径 47 mm) を使用し, 抽出装置には専用のディスクホルダー及びマニホールド (以上, 住友スリーエム製) を使用した。

カートリッジ型固相抽出法¹¹⁾では, GL-Pak PLS-2 (充填量 45 mg ml^{-1} , 粒径 $50 \mu\text{m}$) を使用し, 抽出装置には GL-SPE 加圧送液システム (以上, ジーエルサイエンス製) を使用した。

この 2 種類の固相 (ディスク型固相, カートリッジ型

固相) は公定法⁶⁾にも採用されており, 捕集能力などに優れていることが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。

活性炭カラム抽出法¹²⁾では, 活性炭カラムは測定前処理で使用するカラム管としては, 細い有機リン系農薬のクリーンアップ用のカラム管 (ガラス製, 内径 7 mm) に活性炭を 0.1 g 充填したものを使用した。

これらすべての器具に関して, アセトンで洗浄後, 常温 (20°C 前後) で乾燥し実験に使用した。

2.3 ディスク型固相抽出法, カートリッジ型固相抽出法及び活性炭カラム抽出法の操作条件

ディスク型固相抽出法¹⁰⁾では, まずディスク固相をアセトン 20 ml で洗浄し, 次にコンディショニングとしてメタノール 10 ml, 蒸留水 10 ml を通した後, 試料 200 ml を 200 ml min^{-1} で通水した。通水終了後, ディスクの洗浄として蒸留水 10 ml を通水し, その後アスピレーターによる吸引乾燥を 10 分以上十分行った後, アセトン 10 ml で溶離し, 溶出液に窒素ガスをゆるやかに吹き付け, 乾固させることによる測定物質の損失を避けるため, 0.1 ml まで濃縮を行った。このとき, アセトンを溶離溶媒として使用した場合の溶離溶媒除去に必要な時間は約 10 分程度であった。更にアセトンの測定段階でのベースライン等への影響を軽減するために, アセトニトリルで 10 ml にメスアップし, その溶液を HPLC に 20 μl 注入した。

カートリッジ型固相抽出法¹¹⁾では, まずカートリッジ固相をアセトン 5 ml で洗浄し, 次にコンディショニングとしてメタノール 5 ml, 蒸留水 5 ml を通した後, 試料 200 ml を 10 ml min^{-1} で通水した。通水終了後, 洗浄として蒸留水 5 ml を通水し, その後遠心分離による脱水を 10 分程度行った後, アセトン 5 ml で溶離し, 溶出液に窒素ガスをゆるやかに吹き付け, 0.1 ml まで濃縮を行った。このとき, アセトンを溶離溶媒として使用した場合の溶離溶媒除去に必要な時間は約 5 分程度であった。更にアセトニトリルで 10 ml にメスアップし, その溶液を HPLC に 20 μl 注入した。

活性炭カラム抽出法¹²⁾では, カラムに活性炭を 0.1 g 充填したものに, アセトン 20 ml で洗浄し, 次にディスク型固相抽出法との操作における差をなくすために, メタノール 10 ml, 蒸留水 20 ml を通した後, 各試料 200 ml を 15 ml min^{-1} で通水した。通水終了後, 活性炭カラムの洗浄として蒸留水 10 ml を通水し, その後アスピレーターによる吸引乾燥を 10 分以上十分行った後, アセトン 50 ml を 10 ml ずつ 5 回に分けて連続的に通して溶離し, その溶出液に窒素ガスを吹き付けて 0.1 ml まで濃縮を行った。このとき, アセトンを溶離溶媒として使用した場合の溶離溶媒除去に必要な時間は約 50 分程度であった。更にアセトニトリルで 10 ml にメスアップし, その溶液を HPLC に

20 μ l 注入した.

2.4 実試料

添加回収試験に使用した実試料は, 2002年5月に神奈川県茅ヶ崎市千ノ川で採水した河川水である. また, この河川水の成分分析は公定法^{9)~5)13)}に従って行った.

3 結果及び考察

3.1 HPLC 測定

本測定条件では, 約16分程度で農薬3種類の分析対象物質の分析が可能であり, 連続測定する場合におけるベースラインが安定するまでの時間は約20分であることが確認できた. また, 保持時間の日差変動については, 午前(8時ころ), 正午(12時), 午後(16時ころ)の3回測定($n=3$)で, シマジンが4.39分(相対標準偏差, RSD = 0.69%), チウラムが5.20分(RSD = 0.61%), ベンチオカーブが14.65分(RSD = 0.83%)であった. また, 同定性能に関してはLC/MS及び既報⁹⁾で使用したホットダイオードアレイ検出に比べ, 本測定条件では固定波長であるため劣るが, 検出感度は既報⁹⁾⁹⁾に比べ劣っていなかった.

この農薬3種類の混合標準溶液を, それぞれ0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5 mg l^{-1} に調製したものの7点から, 絶対検量線法により検量線を作成した. これら混合標準溶液を測定したところ, 本測定条件では農薬3種類の分析対象物質において検量線の直線性(相関係数, $r=0.992\sim0.999$)が得られた. このときの農薬3種類の分析対象物質の検出限界は $S/N=3$ でシマジンが1.0, チウラムが4.5, ベンチオカーブが6.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ であった. また, 0.05 mg l^{-1} の混合標準溶液の測定においては, 10回の繰り返し測定($n=10$)の結果, 農薬3種類の分析対象物質において, RSDが0.87~1.55%であり, 良好な結果が得られた.

次に, 活性炭カラム抽出法による添加回収後のクロマトグラム(測定時0.05 mg l^{-1})をFig. 1に示す. このFig. 1で(a)が蒸留水による添加回収試験を行ったときのクロマトグラムで, (b)が河川水による添加回収試験を行ったときのクロマトグラムである. この図から分かるように, (a)では保持時間3分程度のところにピークが存在している. これはアセトンであり, 固相抽出の際に残存しているものと思われる. よって固相抽出を行った場合, アセトニトリルに転溶する際に, アセトンをできるだけ少量にする必要があることが分かる. しかし, このクロマトグラムから分かるように, 固相抽出の際にアセトン-アセトニトリル=0.1/10程度であれば, このクロマトグラム程度の検出であるため, 測定には全く影響しないと考えられる. また, (b)では保持時間がシマジンよりも早い時間になんらかの共存物質の影響が出ていることが分かる. し

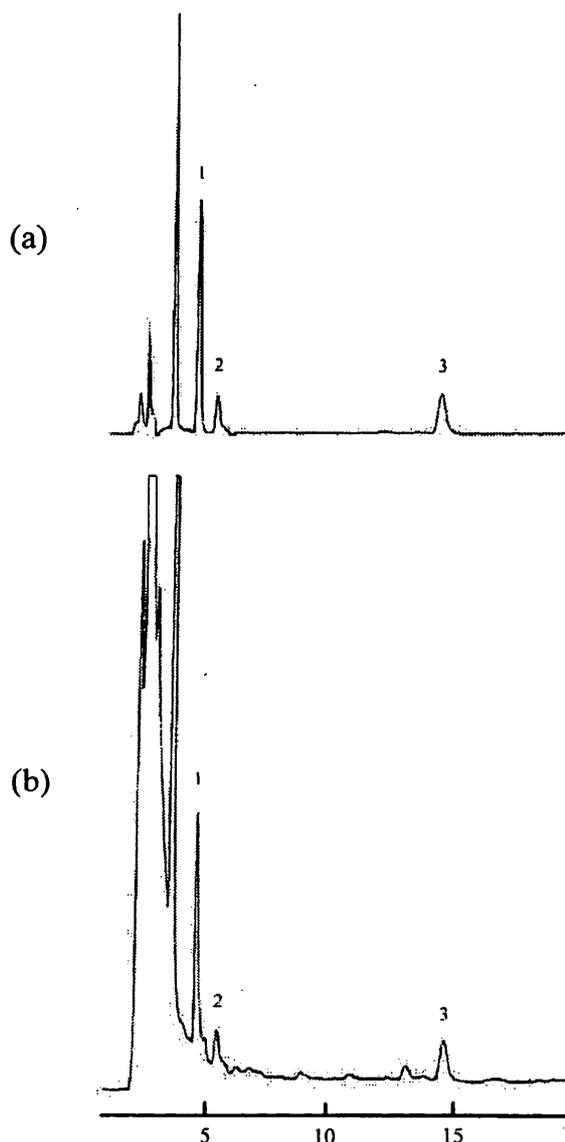


Fig. 1 Chromatogram of three pesticides spiked by HPLC/UV (0.05 mg/l)

(a): obtained by the recovery test using distilled water;
(b): obtained by the recovery test using river water; 1: simazine; 2: thiuram; 3: benthicarb

かし, この共存物質の影響で若干テイリングしているが, 今回の河川水程度の汚染度であった場合は, 定量にはさほど影響しないと思われる.

また, 今回の河川水を活性炭カラム抽出法で測定したところ, それぞれの農薬3種類の分析対象物質すべて検出限界以下であり, 全くピークとして存在しなかった.

3.2 抽出法の比較

抽出溶媒をアセトンとし, ディスク型固相抽出法, カートリッジ型固相抽出法, 活性炭カラム抽出法それぞれにおいて, 添加回収試験を行い, 回収率及びRSDの比較を行った. この試験は, 農薬3種類の分析対象物質をそれぞ

Table 1 Comparison of recoveries of three pesticides between solid phases on sale and activated carbon ($n = 5$)

No	Pesticide	Recovery, % (RSD, %)		
		Disk-format	Cartridge	Activated carbon
1	Simazine	97.3 (4.4)	96.7 (4.8)	96.1 (4.2)
2	Thiuram	93.5 (5.1)	91.7 (5.7)	92.8 (4.7)
3	Benthiocarb	95.9 (3.8)	93.2 (4.1)	94.6 (4.5)

Extraction solvent: acetone; Sample: distilled water

Table 2 Recoveries of three pesticides spiked in distilled water ($n = 5$)

No	Pesticide	Recovery, % (RSD, %) ^{a)}			
		Dichloromethane	Acetone	Acetonitrile	Methanol
1	Simazine	98.2 (3.9)	96.1 (4.2)	86.8 (5.6)	90.1 (4.8)
2	Thiuram	94.0 (4.1)	92.8 (4.7)	80.6 (5.1)	86.7 (4.3)
3	Benthiocarb	96.1 (4.3)	94.6 (4.5)	89.3 (5.8)	91.4 (5.0)

a) Activated carbon column

れ測定濃度が 0.05 mg l^{-1} になるように、200 ml の蒸留水にアセトニトリルに溶かした農薬 3 種類の混合標準溶液 0.0025 mg l^{-1} を 1 ml 添加し、直ちに回収し、 0.05 mg l^{-1} で HPLC 測定を行った。その結果を Table 1 に示す。この結果から分かるように、農薬 3 種類の分析対象物質において、3 種類の抽出方法ともに回収率、RSD が優れているが、活性炭カラム抽出法においては回収率 92.8～96.1%、RSD 4.2～4.7% であり良好である。これら結果から、安価であるという面を考慮すると、活性炭でも農薬 3 種類の分析対象物質の分析に適用できると思われる。また、固相抽出操作過程における汚染については、蒸留水を用いて操作空試験の検討を行ったが、HPLC 測定における検量線範囲 ($0.01 \sim 0.5 \text{ mg l}^{-1}$) においては農薬 3 種類の分析対象物質において全く影響がなかった。

3.3 活性炭カラム抽出を用いた蒸留水による添加回収試験

3.2 の結果より、安価であり回収率及び RSD が良好である活性炭カラム抽出による方法を用いて、溶離溶媒の比較による検討を行った。この試験は、農薬 3 種類の分析対象物質をそれぞれ測定濃度が 0.05 mg l^{-1} になるように、200 ml の蒸留水にアセトニトリルに溶かした農薬 3 種類の混合標準溶液 0.0025 mg l^{-1} を 1 ml 添加し、直ちに回収し、 0.05 mg l^{-1} で HPLC 測定を行った。その結果を Table 2 に示す。この結果から分かるように、ジクロロメタンで溶離した場合とアセトンで溶離した場合とで比較して、アセトンの場合は回収率が若干低くなっている。しかし、アセトンによる回収率 92.8～96.1%、RSD 4.2～4.7% であり、ほぼ公定法等で用いられるジクロロメタン同様優れていることから、十分アセトンで代替が可能であ

ると考えられる。また、溶離溶媒をアセトニトリル、メタノールにした場合は、農薬 3 種類の分析対象物質において回収率が 80% 台、かつ RSD も 5% を超えている場合もあり、ジクロロメタン、アセトンの場合に比べ劣っていることが確認できた。

3.4 活性炭カラム抽出を用いた実試料による添加回収試験

今回実験で使用した河川水の主要な項目を分析した結果、pH が 7.6 (22.2°C)、SS (浮遊物質) が 8.3 mg l^{-1} 、DO (溶存酸素) が 6.3 mg l^{-1} 、BOD (生物学的酸素消費量) が 7.7 mg l^{-1} 、COD (化学的酸素消費量) が 7.3 mg l^{-1} 、T-N (全窒素) が 5.50 mg l^{-1} 、T-P (全リン) が 0.504 mg l^{-1} 、大腸菌群が $140 \times 10^4 \text{ MPN}/100 \text{ ml}$ であった。また、チウラム、シマジン、ベンチオカーブについては、すべて検出限界以下であった。この成分分析の結果から、この河川水は公共用水域としての類型では D (α -中腐水性水域) であり、河川水としては有機物等による汚染度が若干高めと思われる。

そこで 3.3 の結果を参考にし、活性炭カラム抽出法を用いて溶離溶媒の比較による検討を行った。この試験は、まず河川水をメンブランフィルター (セルロースエステル混合、 $0.45 \mu\text{m}$, 90 mm, アドバンテック東洋製) を用いて汙過し、SS や有機物の影響をできるだけ除去した後、農薬 3 種類の分析対象物質をそれぞれ測定濃度が 0.05 mg l^{-1} になるように、200 ml の河川水にアセトニトリルに溶かした農薬 3 種類の混合標準溶液 0.0025 mg l^{-1} を 1 ml 添加し、直ちに回収し、 0.05 mg l^{-1} で HPLC 測定を行った。その結果を Table 3 に示す。この結果から分かるように、試験水に蒸留水を用いた場合に比べて、溶離溶媒がジクロ

Table 3 Recoveries of three pesticides spiked in river water ($n = 5$)

No	Pesticide	Recovery, % (RSD, %) ^{a)}			
		Dichloromethane	Acetone	Acetonitrile	Methanol
1	Simazine	94.6 (4.2)	90.3 (4.9)	83.6 (6.3)	88.2 (5.6)
2	Thiuram	90.1 (4.8)	88.6 (5.3)	76.2 (6.1)	80.9 (5.2)
3	Benthiocarb	93.2 (5.2)	93.8 (5.0)	80.9 (6.9)	89.8 (6.0)

a) Activated carbon column

ロメタン, アセトン, アセトニトリル, メタノール, どの場合も回収率が低くなっている。これは, Fig. 1の(b)からも明らかなように, メンブランフィルターで除去しきれなかった河川水に含まれる有機物等の影響が考えられる。しかし, 回収率, RSD共に河川水でも活性炭カラム抽出による方法は適用可能であると考えられる。

また, 溶離溶媒の差では, 3・3の結果と同様にジクロロメタンのほうが回収率, RSD共に若干優れているが, アセトンによる回収率88.6~93.8%, RSD 4.9~5.3%と, 十分アセトンで代替することが可能であると考えられる。

文 献

- 1) 環境庁水質保全局水質規制課: “新しい水質環境基準とその分析法”, (1993), (環境化学研究会).
- 2) 環境庁水質保全局水質規制課: “新しい排水基準と

その分析法”, (1994), (環境化学研究会).

- 3) 日本薬学会: “衛生試験法・注解”, (2000), (金原出版).
- 4) 日本水道協会: “上水試験方法”, (2001).
- 5) 日本下水道協会: “下水試験方法”, (1997).
- 6) JIS K 0128, 用水・排水中の農薬試験方法 (2000).
- 7) 北見秀明, 渡辺哲男, 北原滝男, 高野二郎: 日本化学会誌, **2002**, 183
- 8) 北原滝男, 高野二郎, 北見秀明, 渡辺哲男: 環境化学, **12**, 147 (2002).
- 9) 木口 倫, 鈴木雄二, 斎藤勝美: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 673 (1999).
- 10) 栗山清治, 柏原督弘: 環境化学, **5**, 807 (1995).
- 11) ジーエルサイエンス (株): 最新固相抽出法ガイドブック, (1995).
- 12) 北原滝男, 高野二郎, 北見秀明, 渡辺哲男: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 561 (2002).
- 13) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993).