

## 特集

## 残留塩素系農薬の HPLC 分析に適した光分解-電導度検出法の開発

山本 敦, 松井順子, 三浦沙織

中部大学応用生物学部

## 1. 緒言

有機ハロゲン化合物には、ダイオキシンや PCB に代表されるように、残留性有機汚染物質 (POPs; Persistent Organic Pollutants) に指定されているものが数多くある。また、農薬類においても、未だ多くの有機ハロゲン化合物が存在する。一般に、有機ハロゲン化合物は、分離と選択性に優れたキャピラリー GC によって分析されてきた。ECD は、有機ハロゲン化合物に高感度・高選択性を示すため、POPs<sup>1)</sup> や揮発性有機ハロゲン<sup>2)</sup> 分析における主役を務めてきた。最近では検出器として、ハロゲン間の分別定量するために原子発光<sup>3)</sup> や質量分析計 (MS)<sup>4)</sup>、PCB 類とポリブロモジフェニル類を分別定量するために、より高選択性を有する TOF-MS の使用報告例<sup>5)</sup> もある。

2006 年 5 月より、残留農薬のポジティブリスト制が施行され<sup>6)</sup>、測定対象農薬数は従来の 250 余種から一挙に 800 種類以上に増えた。この中には、高極性で難揮発性の有機ハロゲン化合物もたくさん含まれる。これらは GC で対応できなくなるため、HPLC に頼らざるを得なくなる。ハロノニルフェノール類<sup>7)</sup> やハロ酢酸<sup>8)</sup> が LC/MS によって定量されている。LC は GC に比べて、試料の溶媒やマトリクスに対する制限が穏やかなため、前処理操作が簡便で済むという利点を有している。しかし、GC のように元素選択的な検出器に乏しく、高感度、高選択検出のためには MS の他に手段がないというのが現状である。MS はマトリクスの影響を受けやすく、微量定量が難しい。

以前、photo-conductivity という検出器<sup>9)</sup> が市販されていた。有機物一般を光分解でイオン化させ、電気伝導度検出する普遍的な装置であったが、感度の点で広く普及には至らなかった。ところで有機ハロゲ

ン化合物は、光分解によって脱ハロゲンを起こすことは良く知られている。<sup>10)</sup> この反応は、環境水中の POPs 類の無害化処理技術に利用<sup>11)</sup> されるほど効率が低い。そこで、逆相系 LC で分離後の有機ハロゲン体に光照射し、電気伝導度検出することを試みた。この系を最適化することで実際試料中の有機ハロゲン体が高感度、高選択的に測定可能なが判明すれば、GC での分析対応が困難な残留塩素系農薬に対して LC への転換が可能となり、食の安心・安全に大きく貢献できるものと考えられる。

## 実験方法

HPLC 装置は、GL サイエンス製 PU 613 型ポンプ二台、同 DG 660B 型デガッサ、同 CO 631 型カラムオープン、レオダイン 7125 型ループインジェクタ及び Shodex CD-5 型電気伝導度検出器で二液高圧グラジェント溶出系を構築した。分析カラムには、Cadenza CD-C18 (4.6 mm x 15 cm) を用い、カラム温度 40°C で、移動相の流速は 0.5 mL/min とした。アセトニトリル-水移動相は、0 min; 50% + 50% → 10 min; 100% + 0% → 15 min; 100% + 0% のリニアグラジェント溶出で行なった。なお、光分解過程における吸収スペクトル変化を調べる目的で、島津 SPD-M10Avp フォトダイオードアレイ検出器を使用した。

試料には、有機塩素系農薬として imazalil, chlorpyrifos、一般有機ハロゲン化合物として *p*-chloroaniline, 2,4,6-tribromophenol, hexabromocyclodecane (HBCD), tetrabromobisphenol-A (TBBPA)、非ハロゲン化合物として butylated hydroxyanisole (BHA), caffeine, anthracene, 2,6-dimethylphenol, diisobutyl phthalate, *N*-methylaniline を用いた。

今回、光源には Hitachi GL-15 低圧水銀灯を用い、光照射管には、石英管 (GL Sciences, 内径 0.5 mm, 有効長 20 cm)、内面チタニアコート石英管 (GL Sciences, 内径 0.5 mm, 有効長 20 cm)、UV 透過被服石英管 (polymicro- technology, 内径 0.1 mm) 及びテフロンチューブを用いて検討した。

## 結果と考察

### 光照射管の選択

一般に光分解反応は、直接光照射するよりもチタニアのような光触媒を用いたほうが効率よく進行する。<sup>12)</sup> 光触媒の影響を調べるために、同形の石英管内面にチタニアを被覆させたものとさせないものを用意し、光照射に伴う化合物のスペクトル変化を利用した。方法としてストップフローを用い、10 分間照射させた後にフローを再開してスペクトルを測定した。図 1 には有機塩素系農薬の chlorpyrifos と、非ハロゲン体としての BHA のスペクトル変化を示す。いずれも、チタニア被覆のほうが無被覆よりも大きなスペクトル変化が得られた。この傾向は、有機ハロゲン体の imazalil や TBBPA、非ハロゲン体のアントラセンでも同様であった。

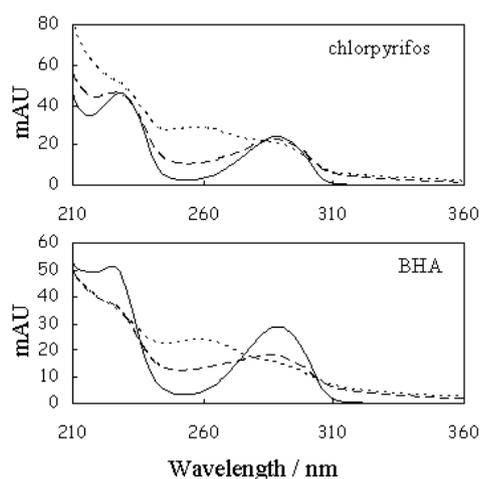


図 1. 紫外線照射による吸収スペクトル変化。実線が元のスペクトルで、破線が石英管、点線がチタニア被覆管での照射後のスペクトル。

そこで、有機ハロゲン体として *p*-chloroaniline, TBBPA, HBCD、非ハロゲン体として diisobutyl phthalate, BHA, *N*-methylaniline, anthracene の計 7 種の混合溶液を用いて HPLC / 光分解-電気伝導度

検出を試みた。光照射管には先と同様チタニア被覆の有無の石英管を用いた。結果を図 2 に示す。7 種成分が綺麗に分離されている。これに対し、光分解-電気伝導度検出では有機ハロゲン体のみがピークを形成した。光照射無しでは、全くピークを与えないことより、光脱ハロゲン反応によるハロゲンイオンの生成が推定された。しかし、チタニア被覆管では移動相のグラジェント溶出に伴うベースラインのドリフトが非常に大きかった。また、非ハロゲン体である BHA において僅かなピークを与え、有機ハロゲン体である TBBPA と HBCD においては、明らかに普通の石英管よりピーク強度は小さかった。チタニアによる光触媒反応で発生した OH ラジカルによって脱ハロゲン反応よりも酸化分解が優先されたためと考えられ、チタニア被覆管では検出の選択性に問題が残った。

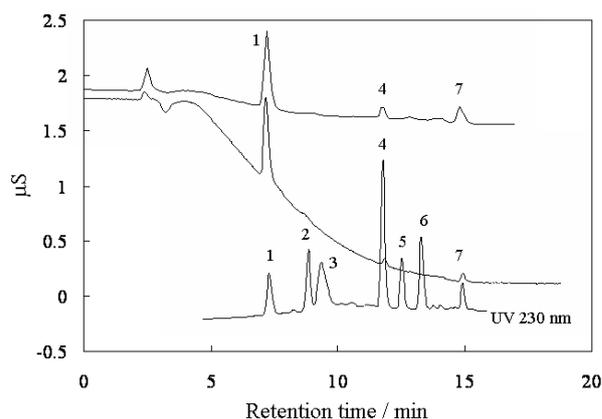


図 2. 光分解-電導度検出及び UV クロマトグラム。上から石英管、チタニア被覆管を反応管として使用したもの。一番下は 230 nm で検出したもの。Peaks: 1, *p*-chloroaniline; 2, BHA; 3, *N*-methylaniline; 4, TBBPA; 5, diisobutyl phthalate; 6, anthracene; 7, HBCD.

石英以外の材質としてテフロン管を用いたところ、有機ハロゲン体に対して石英管同様のシグナルを与えたが、チタニア管並みのベースラインドリフトも与えた。UV 透過被服石英管は石英管と同等の結果を与えたが、内径の大きなものが得られないため、これ以上の検討を断念した。以下の実験では、石英管による光照射を行なった。

照射時間と電気伝導度検出器応答性との相関

光照射管の容量を最適化するために、照射時間と感度の関係を調べた。試料としては先ほどの *p*-chloroaniline, TBBPA, HBCD を用いた。図 3 には、横軸に照射管の容量を、縦軸に流速 0.5 mL/min で送液した場合のピーク面積をとった関係を示す。*p*-chloroaniline は瞬時に脱ハロゲン化が起こり、ピーク強度は照射管容量、すなわち照射時間に依存しなかった。それに対して TBBPA と HBCD は、照射管容量の増大とともにピーク強度が大きくなった。TBBPA は容量約 0.7 mL でピーク強度増大の割合は小さくなっていったが、HBCD は依然増大傾向にあった。

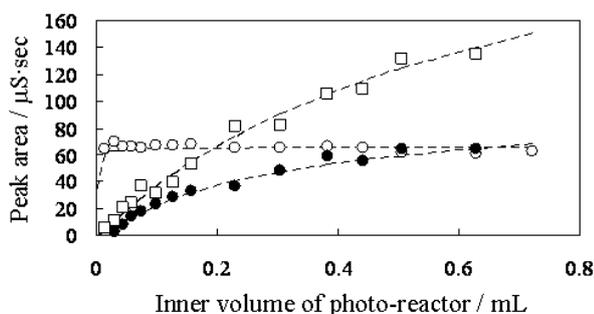


図 3. 照射管容量とシグナル強度の関係。Symbols: ○, *p*-chloroaniline; □, TBBPA; ●, HBCD.

そこで、照射管容量 0.7 mL におけるハロゲンイオンの生成率を求めた。方法としては、試料有機ハロゲン体と同モル濃度のハロゲン酸溶液を調製し、光照射無しで得られたピーク面積と比較した。有機塩素系農薬を中心に、結果を表 1 にまとめた。塩素原子を一つしか持たない *p*-chloroaniline における瞬時の脱塩素化反応は、ほぼ定量的に進行していることになる。芳香族ハロゲン化合物に関して言えば、電子供与基の存在がハロゲンイオンの生成を促進する傾向が認められる。図 3 は反応時間に対するハロゲンイオンの生成数と考えることができ、その関係として擬似ラングミュア式が成り立つことより、複数のハロゲン原子を持つ化合物の脱ハロゲン化の反応速度は、残されたハロゲン原子の数が少なくなるほど遅くなる。HBCD のような脂肪族臭素化合物では、光吸収は炭素-臭素結合に基づくため、結合数の減少が吸光係数の低下、強いては分解率の低下に繋がったものと

思われる。

表 1. 光脱ハロゲン反応の効率

<i>p</i> -chloroaniline	87.1%
diuron	86.5%
linuron	69.8%
4-bromoanisole	54.2%
2-bromobutane	43.7%
TBBPA	41.0%
prothiofos	33.3%
pyridaben	29.6%
chlorpyrifos	28.1%
dibromoacetic acid	12.1%
clofentezin	4.1%
HBCD	3.1%
imazalil	2.3%

#### 本法の特長

*p*-chloroaniline, TBBPA, HBCD の照射管容量 0.7 mL における検量線は、それぞれ 0.05, 0.1, 0.2 mmol の範囲まで、原点を通る良好な直線性が得られた。検量線の傾きは、ハロゲンイオンの生成率と分子中におけるその原子数の積に比例し、その値が大きくなるほど定量限界も低くなる。生成率が 45% で 3 つの臭素を持つ TBBPA の定量限界は絶対注入量で 1 pmol 程度であるのに対し、6 つも臭素を持ちながら生成率約 3% の HBCD のそれは 10 pmol 程度と劣っていた。

結論として、有機ハロゲン体よりハロゲンイオンを遊離させるためには、チタニアのような光触媒を用いないほうが効率よかった。ハロゲンイオンの遊離効率は光照射時間に依存し、照射管容量を大きくすることで高感度化が達成された。一方、この条件で非ハロゲン化合物は電気伝導度検出器にほとんど応答しないことより、有機ハロゲン化合物に対する高選択的検出法になりうることが示唆された。従って、本法は残留塩素系農薬の LC 分析に適した検出法であると考えられる。

#### 引用文献

- Holoubek I., Caslavsky J., Korinek P., Staffova K., Kohoutek J., Hrdlicka A., *Polycyclic Aromatic Compounds*, 9, 1996, 159-167.

Takahashi Y., Onodera S., Morita M., *Kankyo Kagaku*, 10, 2000, 273-280.

Campillo N., Vinas P., Lopez-Garcia, I., Aguinaga, N., Hernandez-Cordoba M., *Talanta*, 64, 2004, 584-589.

Vetter W., Janussen D., *Organohalogen Compounds*, 66, 2004, 394-399.

Cajka T., Hajslova J., Kazda R., Poustka J., *J.Sep.Sci.*, 28, 2005, 601-611.

平成 17 年 11 月 29 日付け厚生労働省告示第 497 号.

Ferguson P. L., Iden C. R., Brownawell B. J., *Environ.Sci.Technol.*, 35, 2001, 2428- 2435.

Loos R., Barcelo D., *J.ChromatogrA*, 938, 2001, 45-55.

Popovich, D. J. Dixon, J. B. Ehrlich, B. J., *J.Chromatogr.Sci.*, 17, 1979, 643-50.

西 末雄、堀本能之、分析化学、26, 1977, 757-61.

Wei L., Fujiwara K., Fuwa K., *Anal.Sci.*, 2, 1986, 213-17.

森 勝伸、埜田博史、山本 敦、塚本友康、池戸みかる、板橋英之、田中一彦、工業用水、565, 2005, 47-53.

Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi 487-8501, Japan.

<sup>2)</sup> Denso Co., 1-1 Showa-cho, Kariya-shi, Aichi 448-8661, Japan.

<sup>3)</sup> Toyota Central R&D Labs., Inc., 41-1 Nagakute, Nagakute-cho, Aichi 480-1192, Japan.

**Keywords** : Organochlorine pesticide residues, HPLC, photolysis, conductivity detection.

**Title** : Development of photolysis- conductivity detection method suitable for the analysis of organochlorine pesticide residues by high-performance liquid chromatography.

**Author(s)** : Atsushi Yamamoto<sup>1)</sup>, Junko Matsui<sup>1)</sup>, Saori Miura<sup>1)</sup>, Kazuhisa Uchiyama<sup>2)</sup>, Hiroshi Ito<sup>3)</sup>

**Address(es)** : <sup>1)</sup> College of Bioscience and

## Summary

Development of photolysis-conductivity detection method suitable for the analysis of organochlorine pesticide residues by high-performance liquid chromatography

Atsyshi Yamamoto<sup>1)</sup>, Junko Matsui<sup>1)</sup>, Saori Miura<sup>1)</sup>,  
Kazuhisa Uchiyama<sup>2)</sup>, and Hiroshi Ito<sup>3)</sup>

1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) Denso Co.

3) Toyota Central R&D Labs., Inc.

A high-performance liquid chromatographic detection method was developed for the highly selective determination of halogenated organics. The method is based on on-line dehalogenation upon irradiation with UV light. The conductance of the reversed column effluent, which increased due to the liberation of halogen ions from the halogenated organics, was monitored by a conductivity detector and was proportional to the original concentration of the analyte. The signal response of the proposed method depended on the length of the irradiation time. The efficiencies of photodegradation for 13 halogenated organics were assessed by comparing their peak areas with that of the equivalent halogen ion. The efficiency decreased with increasing number of halogen groups, and the aromatic halides did not always photochemically release the halogen ions more easily than the aliphatic ones.