

固相抽出を用いた海水中フェニトロチオン分析法の検討

河野裕子 熊田裕子 藺田数夫 斎藤和男
理化学グループ

要 旨

現在溶媒抽出法を用いて分析している海水中のフェニトロチオン分析において、上水試験法等で農薬分析に用いられる固相抽出法を採用できるか検討を行った。

分析法を検討した結果、固相カラムは HLB カラム、溶出溶媒はアセトン、ジクロロメタン共に良い回収率を示した。また、海水は濁りがあるため、メンブランフィルターでろ過した後固相抽出を行うこととした。

溶媒抽出法と固相抽出法について比較した結果、ほぼ同程度の回収率が得られたことから、採水量が少なく操作も簡便である固相抽出法は十分海水中フェニトロチオンの分析に用いられると考えられる。

キーワード：フェニトロチオン(MEP)、海水、溶媒抽出法、固相抽出法

はじめに

フェニトロチオン(以下、MEP とする)は、スミチオンとして知られている有機リン系の殺虫剤である。毎年松くい虫特別防除事業に伴う安全確認調査の一つとして依頼を受け、散布前及び散布後の海水について分析を行っている。

前処理方法は、長年溶媒抽出法を用いてきた。この方法は、採水量が多い、多量の溶媒を使用する、操作が煩雑等いくつか問題がある。水道水等の農薬分析では、固相抽出法が汎用されている。また、JIS K 0128 用水・排水中の農薬試験方法(以下、JIS K 0128 とする)内にも固相抽出法は記載されている。この抽出法は、溶媒を少量しか使用せず濃縮操作が簡単であり一度に処理できる検体数も溶媒抽出法に比べて多い。しかし、水道水や工業用排水と海水では、水中に含まれる成分がかなり異なると予想されることから、固相抽出法を海水に使用できるか比較検討することとした。

方 法

1 試料

1) 模擬海水

海水の成分を参考に、塩化ナトリウム

137g、塩化マグネシウム 25g、炭酸カルシウム 5g、塩化カリウム 4g を採取し精製水で 5L としたものを模擬海水として用いた。

2) 検水

平成 18 年 6 月 16 日～7 月 3 日の期間内に 2 回散布があり、6 地点から散布前後に採水した海水計 24 検体を用いた。

2 試薬

1) 精製水

蒸留水をミリポア社製超純水製造装置 Milli - Q Labo で精製したものを使用した。

2) 溶媒

アセトン、ジクロロメタン、メタノール、ヘキサンは、いずれも和光純薬工業(株)社製残留農薬・PCB 試験用 5000 を使用した。

3) 標準液

MEP 標準品は和光純薬工業(株)社製残留農薬試験用を使用し、アセトンで 1mg/mL の標準原液を調製した。これを各使用する溶媒で逐次希釈して 0.01 ～ 0.15 μ g/mL の標準液を調製した。また、添加回収試験用として、原液をアセトンで希釈して 1 μ g/mL の液を調製した。

4) 内部標準液

9 - ブロモアントラセンはアルドリッチ社

製を使用し、アセトンで 1mg/mL の内部標準原液を調製した。これを各溶媒で希釈し 10µg/mL の内部標準液を調製した。

5) 固相カラム

Sep-Pak Plus C18, tC18, PS-2 及び Oasis HLB カートリッジカラムは、いずれも Waters 社製のカラムを使用した。

溶媒にジクロロメタン用いる場合は、ジクロロメタン 10mL, メタノール 10mL, 精製水 10mL, アセトンを用いる場合は、アセトン 10mL, 精製水 10mL で順次洗浄及び活性化を行った後速やかに使用した(いずれも流速は 5mL/min)。

6) メンブランフィルター

MIXED CELLULOSE ESTER (1.0µm × 47mm) は ADVANTEC 社製を用いた。

7) その他

塩化ナトリウム(特級), 塩酸(有害金属測定用), 無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用)は、いずれも和光純薬工業(株)社製のものを使用した。

3 装置および測定条件

1) 固相抽出装置

加圧型固相抽出用定流量ポンプ Waters 社製 Sep-Pak Concentrator を使用した。

2) ガスクロマトグラフ質量分析計

日本電子データ株式会社製 JMS - A150 型(ガスクロマトグラフは HP 社製 5890 型)を使用した。

3) 測定条件

GC/MS の測定条件を表 1 に示す。

4 試験溶液の調製

1) 溶媒抽出法

試料(ブランクは精製水)900mL を 2L 分液ロートに採取し(添加回収試験を行う場合は, MEP100µL 添加する), 塩酸(1 + 1)5mL, 塩化ナトリウム 20g を添加後へキサン 100mL で 10 分間振とうした。へキサン層を分取した後, 水層に更にへキサン 100mL を加え 10 分間振とうした。分液ロートを少量のへキサンの洗浄した後, へキサン層を合わせ無水硫酸ナトリウムを加え 30 分間以上放置し脱水を行い, 疎水ろ紙でろ過した。ろ液をロータ

表 1 MEP測定のGC/MS条件

項目	条件
カラム	DB-5MS (0.25mm × 30m, 0.25µm)
カラム温度	80 °C (2min) ~ 20 °C/min ~ 180 °C ~ 5 °C/min ~ 240 °C ~ 15 °C/min ~ 280 °C (4min)
注入口温度	200 °C
ガス流量	He 8spi (1mL/min)
注入量	2µL (スプリットレス)
イオン化電圧	70eV
測定 m/z	
MEP	277, 260
内部標準液	258, 256

リーエバポレーター及び窒素パージで 2mL 以下まで濃縮し, 内部標準液 10µL を添加後へキサンの 2mL に定容した。得られた GC/MS 用試験溶液はへキサン溶液であるので, 標準原液をへキサンの希釈し標準系列を調製した。分析フローを図 1 に示す。

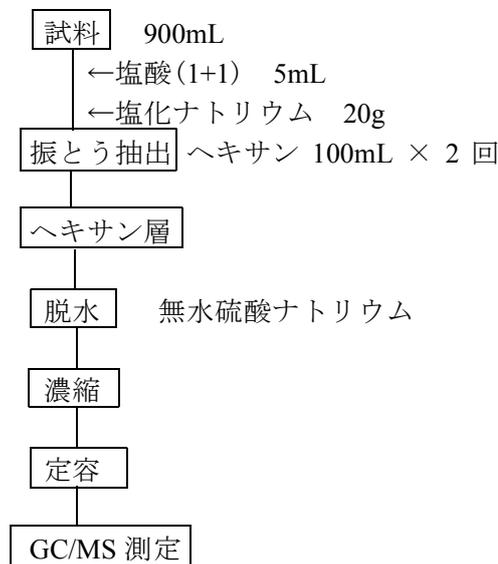


図 1 溶媒抽出法のフローシート

2) 固相抽出法

試料(ブランクは超純水)500mL を(添加回収試験を行う場合は, MEP50µL 添加する)定流量ポンプにより毎分 10mL で活性化した固相カラムに通水後, 固相カラムを精製水 15mL で洗浄した。30 分間以上窒素ガスを通

気し固相カラムを乾燥させた後、溶媒を用いて毎分 1mL の速さで 3mL 溶出させた。窒素パーズで 1mL 以下まで濃縮し、内部標準液を 5 μ L 添加後、各溶媒で 1mL に定容した。得られた GC/MS 用試験溶液の溶媒に合わせて、標準原液を希釈し標準系列を調製した。分析フローを図 2 に示す。

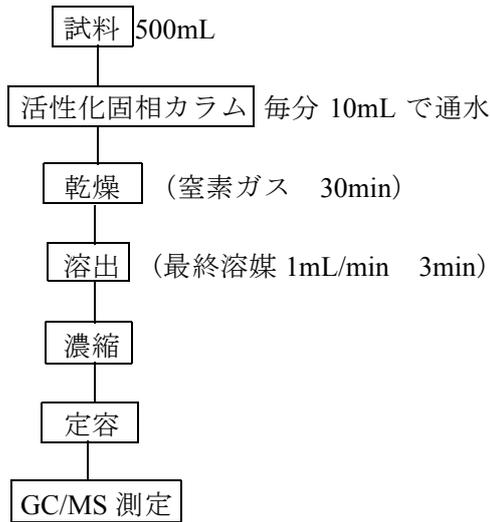


図 2 固相抽出法のフローシート

結果及び考察

1 分析法の検討

1) 固相カラムの選択

平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010001 号別添 4 目標 15 農薬類の検査方法(以下農薬類の検査法とする)¹⁾及び JIS K 0128 では、スチレンジビニル共重合体、オクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充填したもの又はこれと同等以上の性能を有するものとなっている。今回は、当所で使用しているオクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラムとして C18, tC18, スチレンジビニル共重合体の PS-2 カラム、非極性ポリマー充填剤の HLB カラム計 4 種類のカラムについて、模擬海水を用いて比較検討を行った。溶媒はジクロロメタンを使用した。得られた MEP 回収率を表 2 に示す。

添加した濃度は、MEP の水道水水質管理目標値 0.003mg/L の 1/30、定量下限値 0.00001mg/L の 10 倍に相当する。いずれのカラムも回収率は 70 %以上得られ、変動係数が 20 %を超えるものはなかった。回収率

表 2 選択固相カラムによる添加回収試験

カラム	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
HLB	0.0001	106.7	10.9
PS-2	0.0001	86.0	3.3
C18	0.0001	76.9	15.6
tC18	0.0001	79.5	6.9

注；3 回繰り返し測定を行った結果

では、HLB カラムが、変動係数では PS-2 カラムが最も良い結果となった。今回は海水を用いることから pH の適用範囲が広く吸着力が高い HLB カラムを使用することとした。

2) 抽出溶媒の選択

農薬類の検査法では、ジクロロメタンによる抽出、JIS K 0128 ではアセトンによる抽出を行うことになっている。ジクロロメタンは水質基準に関する省令では測定項目となっており、極力使用を抑えたいが、回収率を確認することは重要であると考えられるため、ジクロロメタン、アセトンについて実際の試料を用いて比較検討を行った。海水は、1 回目の散布前に採取したものを使用した。固相抽出法の各溶媒における回収率を表 3 に示す。

表 3 選択溶媒による添加回収試験

溶媒	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ジクロロメタン	0.0001	124.2	2.8
アセトン	0.0001	124.0	7.6

注；3 回繰り返し測定を行った結果

溶媒による添加回収試験の結果は、海水による影響のためか、すべての溶媒で 100 %を超える回収率となった。しかし、溶媒の種類での差はほとんどなかった。また、フェノール類の固相抽出分析を行う際に用いる酢酸エチルについても同様の操作を行い、回収率を求めた結果、121.0%とジクロロメタン、アセトンと同様の結果が得られた。ただし、劇物である酢酸エチルの使用は避けることとした。

今回使用した海水はかなり濁度があったため、固相抽出装置に負担がかかり一部に液漏

れが生じた。そこで、JIS K 0128 に記載されているメンブランフィルターろ過による比較検討を行った。使用したフィルターは、ろ過用セルロース混合エステルタイプで除粒子、除菌に用いるものである。得られた回収率を表 4 に示す。

表 4 ろ過による添加回収試験

溶媒	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ジクロロメタン			
ろ過無	0.0001	129.9	12.4
ろ過有	0.0001	95.7	6.1
アセトン			
ろ過無	0.0001	123.3	8.6
ろ過有	0.0001	85.8	8.8

注；3 回繰り返し測定を行った結果

ろ過による回収率は、ろ過しない場合と比較して低下した。しかし、ジクロロメタン、アセトン共に 80 %以上の回収率が得られ、変動係数も 10 %以内だった。圧力変動による液漏れ等を考慮すれば、ろ過は必ず行ったほうが良いと考えられる。

以上の結果から、固相抽出法には、ろ過、HLB カラム、ジクロロメタン、アセトンを用いることとした。

2 試料の測定

1) 抽出法による比較

溶媒抽出及び固相抽出による測定結果を表 5, 6 に示す。

表 5 溶媒抽出法による測定結果

No.	1 回目		2 回目	
	散布前	散布後	散布前	散布後
1	N.D.	0.00003	N.D.	0.0015
2	N.D.	0.00003	N.D.	0.00005
3	N.D.	0.00002	N.D.	0.00004
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

注；単位は mg/L

表 6 固相抽出法による測定結果

No.	1 回目		2 回目	
	散布前	散布後	散布前	散布後
1	N.D.	0.00003	N.D.	0.0013
2	N.D.	0.00003	N.D.	0.00005
3	N.D.	0.00003	N.D.	0.00003
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

注；ジクロロメタン抽出による。単位は mg/L

No.	2 回目	
	散布前	散布後
1	N.D.	0.0011
2	N.D.	0.00005
3	N.D.	0.00003
4	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.

注；アセトン抽出による。単位は mg/L

表 7 測定結果の比較

回	抽出法	No.1	No.2	No.3
1	溶媒抽出	0.00003	0.00003	0.00002
	固相抽出	0.00003	0.00003	0.00003
2	溶媒抽出	0.0015	0.00005	0.00004
	固相抽出			
	ジクロロメタン	0.0013	0.00005	0.00003
	アセトン	0.0011	0.00005	0.00003

注；単位は mg/L

1 回目の海水は、検討に使用したため海水量が少なく 2 種類の溶媒で固相抽出を行うことができなかつたため、より回収率の良いジクロロメタンのみを用いて測定を行った。

抽出法に関係なく 1 回目 2 回目共に散布前の検体については、MEP は検出しなかつた。散布後の検体については、3 地点から MEP を検出したが抽出法による差は認められなかつた(表 7)。

2) 添加回収試験

2 回目の散布前の海水を用いて添加回収試験を行い、結果を表 8 に示す。

表8 前処理別による添加回収試験

溶媒	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
溶媒抽出法	0.0001	122.1	6.1
固相抽出法			
ジクロロメタン	0.0001	110.7	9.5
アセトン	0.0001	102.3	0.8

注；3回繰り返し測定を行った結果

回収率は、いずれの前処理方法でも良い結果が得られた。また、ジクロロメタン、アセトン両者にもほとんど差はなかったことからどちらの溶媒を使用してもよいと考えられる。

3) GC/MS のクロマトグラフの比較

溶媒抽出を行った検体の TIC と固相抽出を行った検体の TIC の比較を行った。結果を図4に示す。

溶媒抽出法(図4-上段)は、固相抽出法に比べて MEP 付近のバックグラウンドが高く、夾雑物が多く含まれていた。このような試料を多検体注入することは、カラムや MS 内部が汚れやすくなり洗浄等のメンテナンス操作が頻繁に必要となってくる。

固相抽出においては(図4-中段, 下段), 前処理段階でかなり夾雑物を取り除かれているためクロマトグラフ内には MEP 及び内部標準液のピーク以外ほとんどピークが認められなかった。また, MEP 付近のバックグラウンドは溶媒抽出に比べて低かった。これらの結果からも溶媒抽出法よりも固相抽出法を採用したほうがよいと考えられる。

まとめ

海水中の MEP 分析は、現在公害分析指針 残留農薬の有機リン農薬の分析法²⁾ に準拠し、ヘキサンによる溶媒抽出法を行っている。

溶媒抽出法は、検水量が多く多量に有機溶媒を使用するうえ、抽出の際エマルジョンを生じて、水層と溶媒層の分離が困難な場合がある。また、溶媒による洗浄、無水硫酸ナトリウムによる脱水、疎水ろ紙によるろ過、エバポレーター及び窒素ガスによる濃縮操作など煩雑な操作が多い。固相抽出法では、これ

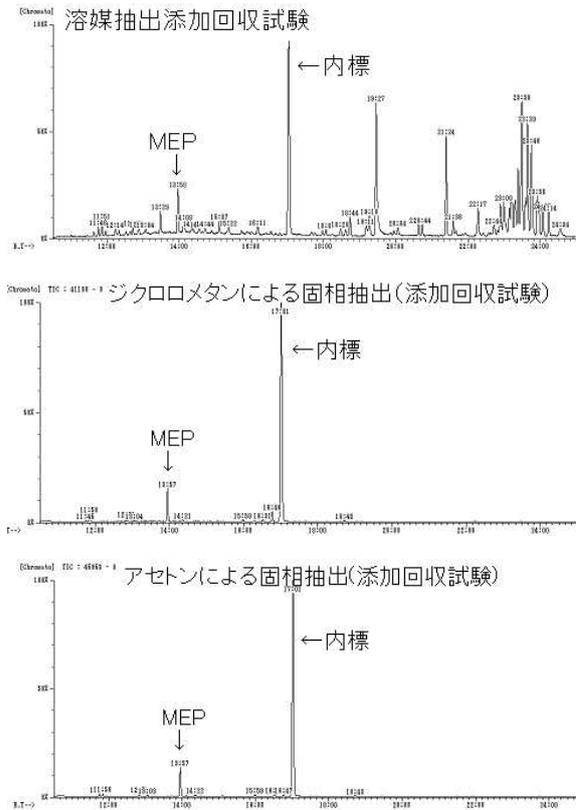


図4 前処理別によるTIC

らの操作が溶媒抽出法に比べて簡便である。

固相カラムは、添加回収試験から HLB カラムを選択し、溶出溶媒はジクロロメタン及びアセトンを使用した。

実際の採取試料は、天候、海水の量等によって状態が変化し、非常に濁ることがある。このような試料を固相抽出装置に直接通すと固相カラムが詰まり、圧力変動等により一定量の試料を採取することが困難になる場合がある。また、装置内に海水の汚れ等が付着しメンテナンス等が必要になる可能性も考えられるため、メンブランフィルターによるろ過操作を追加した(図5)。

以上の前処理法の検討結果を用いて、実際の試料について溶媒抽出法と固相抽出法の比較を行った。両者に大きな差はなく、十分固相抽出法を活用できると考えられる。また、使用する溶媒は、ジクロロメタン、アセトン共に良い回収率が得られたため、利便性を考慮すると JIS K 0128 に基づきアセトン抽出を行うのがよいと考えられる。

今後、固相抽出法を使用することにより現在 2L のガラス瓶に海水を採水しているが 1L の採水で十分であり、採水時の負担が軽減できる。また、分析については、2L の分液ロート等ガラス器具を多量に使用することもなく、使用溶媒量も 1/10 程度に減少することができるうえ、12 検体を同時に処理できるため分析も迅速に行えることとなる。

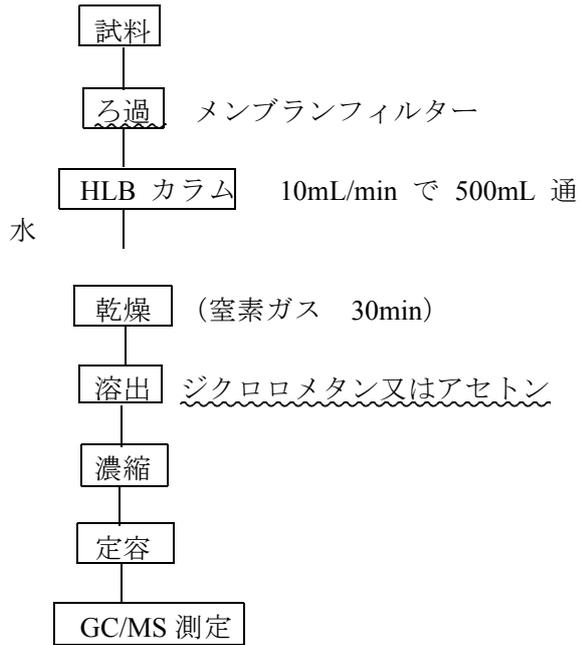


図 5 固相抽出法のフローシート

引用文献

- 1) 健水発第 1010001 号 別添 4 目標 15
- 2) 日本分析化学会関東支部編. 公害分析指針 6 水・土壌編 3a. 東京都：共立出版株式会社, 1972 ; 15-20.