

# 対イオン添加による固相抽出法を用いた環境水中の アシュラム・オキシシン銅・チラムの同時分析方法の検討

江崎光洋<sup>1</sup>・古賀公泰<sup>1</sup>・松原英隆<sup>1</sup>・廣中博見<sup>1</sup>

## Simultaneous Determination Method of Asulam Oxine—Copper Thiram in Environmental Water with Solid Phase Extraction after Ion Pair Formation.

Mitsuhiro ESAKI, Kimiyasu KOGA, Hidetaka MATSUBARA, Hiromi HIRONAKA

環境水中におけるアシュラム、オキシシン銅、チラムの3成分を固相抽出法を用いて同時分析する方法を検討した。環境水試料に臭化テトラブチルアンモニウムを0.05%添加後pHを7~8に調整し、ポンドエルートC8カートリッジに負荷することにより、アシュラム、オキシシン銅の2成分を同時分析することができた。河川水からの回収率は、 $1\mu\text{g}/\ell$ の濃度でアシュラム104%、オキシシン銅73%であり、相対標準偏差はそれぞれ4.6%、及び6.2%であった。なお、チラムについては若干の問題が残り、今後の検討課題とした。

**Key Words:** 対イオン counter ion, 固相抽出 solid phase extraction, 環境水 environmental water, アシュラム asulam, オキシシン銅 oxine—copper, チラム thiram, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

### I はじめに

近年、ゴルフ場に使用される農薬による環境汚染が問題となっている。環境庁は平成2年5月に「ゴルフ場農薬に係る暫定指導指針」を、また厚生省は「ゴルフ場農薬に係る水道水の安全対策について」を各都道府県知事に対して通知し、ゴルフ場排水水及び水道水に対し殺虫剤6種類、殺菌剤8種類、除草剤7種類の合計21種類についての暫定水質目標値を設定した。これらの農薬の標準分析法<sup>1-2)</sup>は溶媒抽出後GC、或いはGC/MSによって測定するものがほとんどであるが、除草剤のアシュラム、殺菌剤のオキシシン銅及びチラムについてはGCで

測定困難なためHPLCによる測定が示されている。これら3種類の農薬について示された標準分析法は溶媒抽出をその濃縮手段とした個別の分析法がとられているが、環境水からの抽出方法に問題があるためその回収率は低く、また個別分析に要する時間と労力などの面からも問題が多い。そこで環境水中のアシュラム、オキシシン銅、チラムの3成分を同時分析することを目的とし疎水性対イオン試薬を用いた固相抽出を中心に分析法の検討を行った。その結果、試料水に臭化テトラブチルアンモニウムを添加しpHを7~8に調整後、ポンドエルートC8カートリッジに固相抽出する方法により、アシュラム、オキシシン銅の2成分は高い回収率で同時分析できることがわかり、これまでの個別分析法と比較して大幅な分析時間の短縮ができた。しかし、チラムを含めた3成分の同時

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

分析については若干の問題が残ったため、今後の検討課題にすることとした。

## II 材料及び方法

### 1. 試薬

1) アシユラム, オキシ銅, チラム: 和光純薬農業標準品

2) 標準溶液: 上記3成分をそれぞれメタノールに溶解させ1000 mg/l溶液とした後, HPLC用溶離液で順次希釈し混合標準溶液を作成した。

3) メタノール: 残留農薬分析用

4) アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフィー用

5) 臭化テトラブチルアンモニウム (TBA): 東京化成工業

6) ボンドエルトC8, C18: Analytichem International, リザーバー容量2.8 ml, 充填量500 mg

7) その他の試薬は特級を用いた。

### 2. 装置及び器具

#### 1) HPLC装置

ポンプ: 島津 LC-9A

検出器: 日本分光 UV-820

カラム恒温槽: 島津 CTO-6A

サンプルインジェクター: レオダイン 7125

分離カラム: GLサイエンス

Inertsil ODS-Cu

内径4.6 mm 長さ15 cm

#### 2) HPLC測定条件

移動相組成: 50 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.1 % EDTA (pH 3.5) / CH<sub>3</sub>CN (70 / 30)

流量: 1.0 ml/min

カラム温度: 40 °C

検出波長プログラム:

270 nm (0 ~ 3.2 min)

250 nm (3.2 ~ 10 min)

240 nm (10 min ~)

検出感度: 0.02 AUFS

注入量: 10 μl

#### 3) 固相抽出装置

容量200 mlのガラス製注射筒にカートリッジカラムを取り付け, ペリスターポンプ (東京理化学器械製MP-3型) で吸引できるようにした。また, カラムとポンプチューブとの接続には, SEP-PAK Connections Kit (Waters製) を用いた。

### 3. C8カートリッジカラムの前処理

ボンドエルトC8カートリッジカラム2本をアダプ

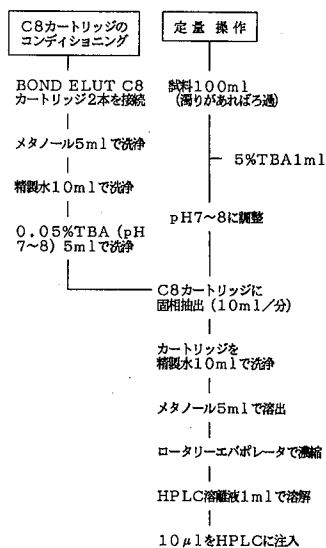


図1. 分析法フローチャート

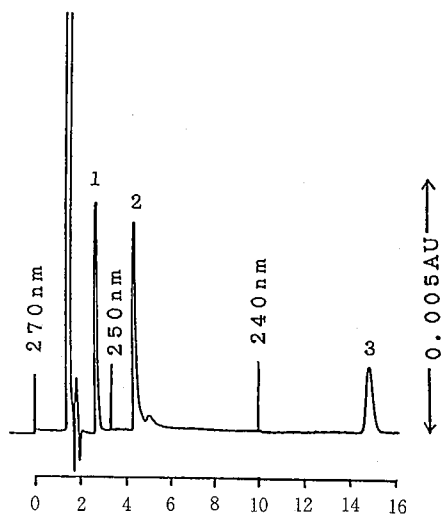


図2 標準溶液のHPLCクロマトグラム

カラム: Inertsil ODS-Cu (ID 4.6 \* 150 mm)

移動相: 50 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.1 % EDTA (pH 3.5) / CH<sub>3</sub>CN (70 / 30)

カラム温度: 40 °C; 流量: 1.0 ml/min

検出波長: 270 nm (0 ~ 3.2 min)

250 nm (3.2 ~ 10 min)

240 nm (10 min ~)

検出感度: 0.02 AUFS; 注入量: 10 μl

1 アシユラム 0.5 mg/l

2 オキシ銅 0.5 mg/l

3 チラム 1.0 mg/l

ターで直列に接続し、メタノール 5 ml, 精製水 10 ml で洗浄する。次いで、0.1 N-水酸化ナトリウム溶液で pH 7~8 に調整した 0.05 w/v % TBA 水溶液 5 ml を通じてコンディショニングを行った。

#### 4. 定量操作

環境水試料 100 ml をガラス製容器に取り、5 w/v % TBA 水溶液 1 ml を加えた後 0.1 N-水酸化ナトリウム溶液で pH 7~8 に調整する。これを固相抽出装置に導入し毎分 10 ml で C8 カートリッジカラムに負荷した。試料負荷後のカートリッジは接続したまま精製水 10 ml で洗浄し、アスピレータ等でカートリッジ内の水分をできるだけ除去した後、メタノール 5 ml で溶出した。溶出液はロータリーエボロレータで濃縮し、HPLC 溶離液 1 ml に溶解させ試料液とした。この 10 μl を HPLC に注入し、ピーク高さによる絶対検量線法を用いて 3 成分を定量した。図-1 にそのフローチャートを、図-2、に標準溶液の HPLC クロマトグラムを示す。

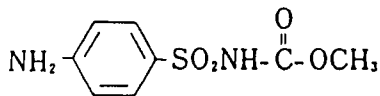
### III 結果と考察

#### 1. 固相抽出条件の検討 I

1) アルキルスルホン酸ナトリウム添加による固相抽出の検討

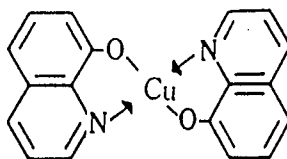
アシュラム、及びオキシシン銅はイオン性化合物である。アシュラムは構造内にアミノ基を持ち、酸性域では陽イオンに解離するものと考えられる。一方、オキシシン銅は 8-オキシキノリン 2 分子と銅との錯体である。8-オキシキノリンは等電点 pH 約 7.4 の両性電解質<sup>3)</sup> であり、酸性域では銅とのキレート結合がはずれ 8-オキシキノリンと銅とに解離<sup>4)</sup> する。このように両者は酸性域において陽イオンに解離することが予想され、アルキルスルホン酸イオンとのイオンペアの形成によって疎水性が増加し、C18 などの疎水性カートリッジに保持できるのではないかと考えられた。そこで、1-ペンタンスルホン酸ナトリウム (C5-SS と略す) から 1-ドデカンスルホン酸ナトリウム (C12-SS と略す) までの 7 種類のアルキルスルホン酸ナトリウム (R-SS と略す) を用いて 3 成分の固相抽出実験を行うこととした。

アシュラム、オキシシン銅、チラムの 0.5 mg/l 混合水溶液に C5-SS から C12-SS をそれぞれ 0.1 % 共存させ、その 10 ml をリザーバに取り付けた C18 カートリッジに負荷した。次いでメタノール 10 ml の溶出液を濃縮乾燥後 HPLC 溶離液で定容とした。この一定量を HPLC に注入し、C18 カートリッジによる各々 5 μg の回収率を求めた。その結果を図-4 に示す。アシュラムは C5-



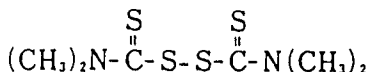
アシュラム

methyl sulfanyl carbamate



オキシシン銅

copper bis(8-quinolinolate)



チラム

tetramethylthiuram disulfide

図 3 農薬 3 成分の化学構造

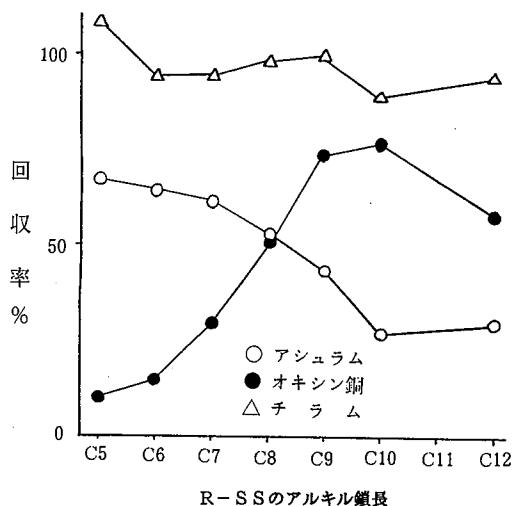


図 4 R-SSの種類による回収率の相違

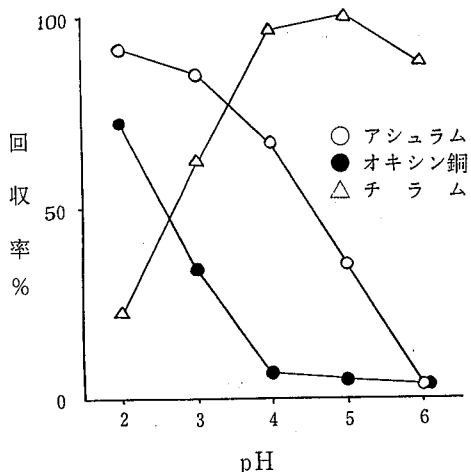


図5 C5-SS/C18固相抽出におけるpHの影響

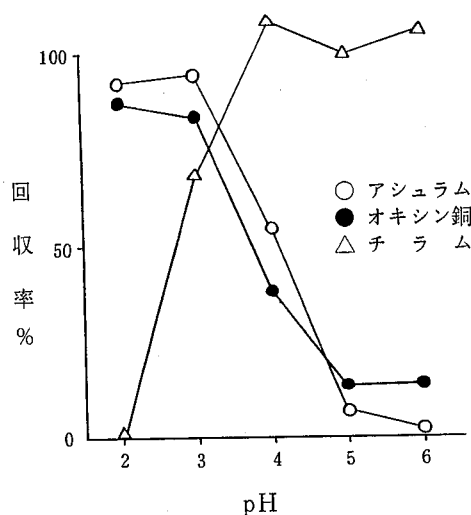


図6 C8-SS/C18固相抽出におけるpHの影響

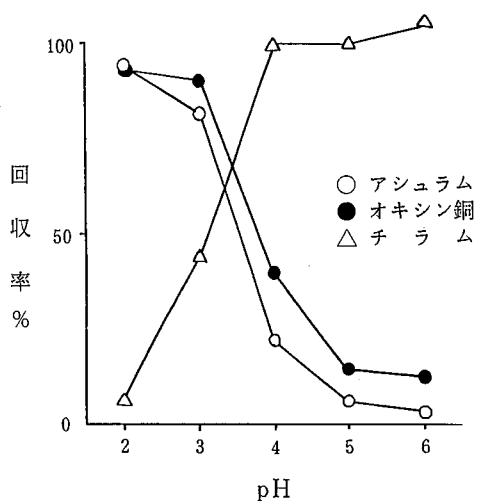


図7 C10-SS/C18固相抽出におけるpHの影響

SSを共存させた場合に回収率67%と最高値を示したが、R-SSのアルキル鎖長の増加につれて逆に回収率は低下し、C10-SSでは27%の回収率となった。オキシシン銅の場合はアシュラムと逆の傾向を示し、C5-SSでは10%であったものがアルキル鎖長の増加とともに回収率も高くなり、C10-SSで76%の回収率となった。一方、チラムはアルキル鎖長による影響は無く、C5からC12-SSまで89~108%と高い回収率を示した。このように、R-SSを共存させC18カートリッジに固相抽出を行う場合、アシュラムとオキシシン銅の回収率は用いるR-SSのアルキル鎖長によって相反する傾向にあることが分かった。また、対イオン試薬の濃度による影響をみるため、C8-SSを0.1%から0.5%に増加させ回収率を調べたところチラムへの影響は無かったが、アシュラムの回収率は減少し逆にオキシシン銅の回収率は増加するという傾向がうかがわれた。

このようなことから、3成分を同時分析するには、図-4におけるアシュラム及びオキシシン銅の交点、すなわち1-オクタンスルホン酸ナトリウム(C8-SS)を用いるのが最も効果的であろうと思われた。

## 2) イオン対形成に及ぼすpHの影響

アルキルスルホン酸ナトリウムを添加して3成分の固相抽出を行う際のpHの及ぼす影響について調べた。添加する対イオン試薬は、1)の実験で同時分析に最も効果的と思われたC8-SSの他、アシュラムの回収率の最も良かったC5-SS、オキシシン銅の回収率が最も良かったC10-SSをそれぞれ0.1%濃度で使い、pH2~6における3成分5 $\mu$ gの回収率を調べた。なお、操作は先の実験と同様にして行った。結果を図-5~7に示す。

解離性化合物であるアシュラムとオキシシン銅は、3種類のR-SSを用いた実験においてはほぼ同様な傾向がみられた。pH2~3の酸性域では72~94%の回収率を示したが、pHの上昇とともに回収率は低下しpH6では3~13%になった。このことから両者の解離、及びR-SSとの対イオン形成によるC18固定相への保持は、pH2~3の酸性域において最大になることがわかった。一方、チラムの回収率はpH2で6~23%、pH4~6で88~106%であり、アシュラム及びオキシシン銅とは逆の傾向を示すことがわかった。

このようなことから、3成分を同時に分析するためにはpH3~4の弱酸性域においてC8-SSを用いた固相抽出が最も効果があると思われた。

## 3) 試料の多量負荷時におけるアシュラムの流亡

これまでの結果からアシュラム、オキシシン銅、チラムの3成分を同時分析するには、試料にC8-SSを0.1%添加し、pHを3~4の酸性域とすることによりC18固定

相に保持させることができた。しかし、これまでは少量の試料による実験であり、実際の環境試料においては相当量の試料負荷が必要となってくる。そこで、精製水 500 ml を用い 3 成分それぞれ 10  $\mu$ g の回収率を調べた。なお、C 18 カートリッジへの試料導入はペリスターポンプを用い、負荷速度は 10 ml/分で行った。その回収率はオキシシン銅 87 %、チラム 85 % と良好であったが、アシュラムについては全く回収できないという結果となった。これは試料の負荷速度を 5 ml/分にしても同様であった。そこで、C 18 カートリッジでの破過容量を調べるため 3 成分の 1 mg/l 水溶液 100 ml について同様に操作を行い、カートリッジ通過液を 10 ml おきに分取し 3 成分の濃度を調べた。その結果、オキシシン銅とチラムは全てのフラクションにおいて検出されず C 18 カートリッジに完全に保持された。アシュラムの場合フラクション 1 では検出されず保持が認められたが、フラクション 2 で約 0.5 mg/l 検出され、それ以降は全く保持されずにカートリッジから流亡することがわかった。

ここまで、C 8-SS とのイオン対形成による疎水性増加を期待し固相抽出を検討してきたが、アシュラムの保持に問題が残り、本方法による 3 成分の同時分析はできないと判断された。

## 2. 固相抽出条件の検討 II

### 1) テトラブチルアンモニウム添加による固相抽出の検討

R-SS を用いた固相抽出ではアシュラムの保持に問題が残り 3 成分の同時分析はできなかった。そこでこれまでとは逆に、陰イオン用の疎水性対イオン試薬であるテトラブチルアンモニウム塩 (TBA と略す) を用いて 3 成分の固相抽出を試みた。TBA などの対イオンを添加した試料を疎水性固定相に負荷した場合、対イオンが固定相に保持されることによって固定相本来の表面疎水性が減少する<sup>5)</sup>。すなわち、TBA による微妙な疎水性の低下を利用してアシュラムのような極性化合物を保持できないものかと考えた。また、オキシシン銅の構造主体である 8-オキシキノリンの等電点 pH は 7.4 であり、塩基性域では TBA とのイオン対形成も期待される。そこで、3 成分の 1 mg/l 混合水溶液 100 ml に TBA を 0 ~ 1 % まで段階的に共存させ pH 7 に調整し、各 TBA 濃度における捕集率を調べた。なお、カートリッジはボンドエルト C 8 をアダプターで直列に 2 本接続して用い、捕集率は試料負荷前後の濃度を測定することによって求めた。結果を図-8 に示す。

アシュラムは TBA 無添加の場合 6 % の捕集率であり、カートリッジへの保持はほとんど認められなかったが、TBA 濃度の上昇とともに捕集率も増加し 0.05 % で 99

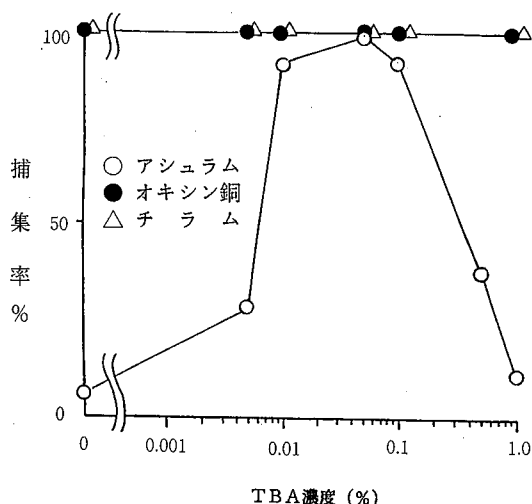


図 8 TBA 濃度と捕集率の関係

% の捕集率に達した。しかし、それ以降アシュラムの捕集率は減少し TBA 1 % 濃度では 11 % の捕集率となった。オキシシン銅及びチラムは TBA 濃度 0 % から 1 % まで C 8 カートリッジにはほぼ完全に捕集され、それぞれ 1 本目のカートリッジ上部にはオキシシン銅の保持帯と思われる黄緑色のバンドが観察された。また、この黄緑色帯は TBA 濃度の増加とともにバンド幅が狭まる傾向がみられた。しかし、TBA を添加せず捕集した場合メタノール溶出時に黄緑色バンドが幾分残り、カートリッジ中のオキシシン銅を完全に溶出させることができなかった。これは、8-オキシキノリンの 10 mg/l メタノール溶液 1 ml を C 8 カートリッジに負荷した場合、メタノール 20 ml でも 8-オキシキノリンが全く溶出しなかつのに比べ、0.05 % TBA 溶液を 5 ml 流すことによりメタノールで容易に溶出することができたことから説明できる。このことから、TBA はオクチルシリカ充填剤中の微量金属と 8-オキシキノリンとのキレートによる吸着を抑制する作用を持つのではないかと考えられた。一方、添加した TBA は 0.005 ~ 1 % 濃度までにおいて全てカートリッジに捕集され、メタノールで溶出されることがわかった。

### 2) pH の影響

TBA を添加して固相抽出を行う際の pH の影響を調べた。TBA を 0.05 % 共存させた 3 成分の 1 mg/l 混合水溶液 100 ml を用い、pH 2 ~ 10 における捕集率を調べた。なお、捕集率は 1) と同様にして求めた。結果を図-9 に示す。

アシュラム及びオキシシン銅は、各 pH 域において同様な傾向を示した。pH 2 における捕集率はアシュラム 19 %、オキシシン銅 14 % であったが、pH の上昇とともに捕

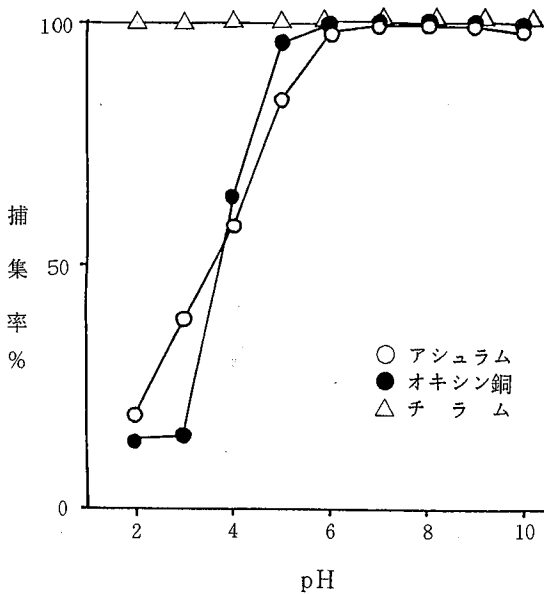


図9 pHと捕集率の関係

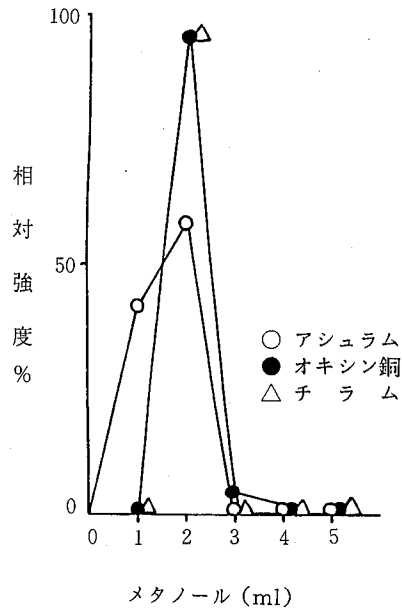


図10 溶出曲線

集率も増加しpH 6でそれぞれ98%、100%となり、それ以降は平衡値を示すことがわかった。これは、両者とも酸性域では陽イオンに解離するため、カートリッジに保持されなかったものと考えられる。pH 6以上の中性から塩基性域では、両者とも陽イオンへの解離が抑制されることにより疎水性が増加し、カートリッジへ保持されたものと考えられた。ところが、オキシシン銅は塩基性域では陰イオンに解離することも予想されるため、中性から塩基性域におけるオキシシン銅の保持がイオン対形成による保持なのか、或いは陽イオンへの解離抑制によるものかは不明であった。一方、チラムの捕集率はpH 2～10まで100%であり、PHの影響はみられなかった。このようなことから、TBAを添加して3成分を固相抽出する際のpHは、中性から塩基性にする必要があることがわかった。

### 3) カートリッジからの溶出条件の検討

カートリッジからの溶出はメタノールを用いて検討した。また、カートリッジは2本接続したまま溶出することにした。図-10にその溶出曲線を示す。オキシシン銅とチラムが上部カートリッジに狭いバンド幅で保持されるのに比べ、アシュラムは上下のカートリッジに跨る広いバンド幅で保持されるため溶出パターンが異なったが、メタノール4 mlでほぼ完全に溶出した。このことから、カートリッジからのメタノール溶出量は5 mlとした。なお、試料に添加したTBAは上部カートリッジに保持され3成分とともにメタノールで溶出された。このため、クロマトグラムには保持時間8分あたりにTBAのピー

クがみられるが、3成分の保持時間とは異なり問題なかった。

### 4) 定量操作、及び添加回収試験

精製水、及び河川水100 mlに3成分の標準溶液を0.1～10 μg添加し、図-1の分析フローにもとづき回収率を調べた。結果を表-1に示す。また、河川水標準添加試料のHPLCクロマトグラムを図-11に示す。

アシュラムの回収率は精製水及び河川水とも大差はなく、ほぼ完全に回収された。また相対標準偏差も小さく良好な再現性が得られた。オキシシン銅の場合も精製水と河川水における回収率に大きな差はみられなかったが、0.1～1 μgの低濃度添加時において回収率73～88%、相対標準偏差6.2～7.4%と若干の回収低下とバラツキが認められた。一方、チラムの回収率は低く、10 μg添加時で精製水48%、河川水31%であった。さらに、

表-1 添加回収試験結果

試料量	添加量 (μg)	アシュラム		オキシシン銅		チラム	
		回収率 (%)	RSD% n=4	回収率 (%)	RSD% n=4	回収率 (%)	RSD% n=4
精製水	0.1	103	5.8	76	6.4	0	—
	1	102	2.9	78	7.4	0	—
	10	100	1.7	99	2.9	48	27
河川水	0.1	104	4.6	73	6.2	0	—
	1	100	4.7	88	6.5	0	—
	10	98	4.4	98	2.6	31	35

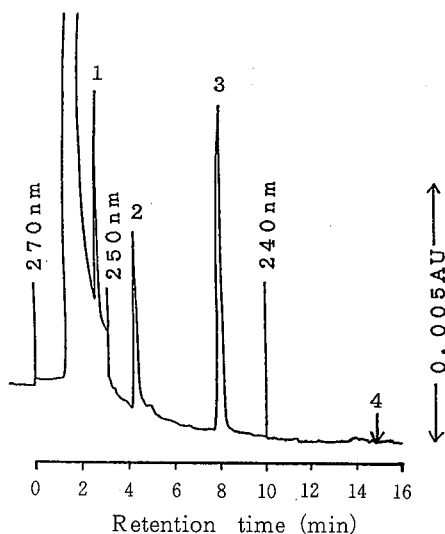


図11 河川水標準添加試料のHPLCクロマトグラム

カラム : Inertsil ODS-Cu  
(ID 4.6 \* 150 mm)  
移動相 : 50 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.1 %  
EDTA  
(pH 3.5) / CH<sub>3</sub>CN (70 / 30)  
カラム温度 : 40 °C ; 流量 : 1.0 ml / min  
検出波長 : 270 nm (0 ~ 3.2 min)  
250 nm (3.2 ~ 10 min)  
240 nm (10 min ~)  
検出感度 : 0.02 AUFS ; 注入量 : 10 μl  
河川水試料 100 ml にアシュラム 0.5 μg,  
オキシシン銅 0.5 μg, チラム 1.0 μg を添加  
1 アシュラム 0.45 mg / l  
2 オキシシン銅 0.42 mg / l  
3 T B A  
4 チラム

相対標準偏差はそれぞれ 27 %, 35 % であり, 再現性に乏しい結果となった。また, 0.1 及び 1 μg 添加の場合には全く回収できなかった。これまでの実験においてチラムの捕集率は常に良好であり, カートリッジからの溶出も問題なかったことから, メタノール溶出後の濃縮操作においてチラムが分解しているのではないかと考えられた。

### 3. まとめ

環境水中におけるアシュラム, オキシシン銅, 及びチラムの 3 成分を同時分析するため, 試料に疎水性対イオン試薬であるアルキルスルホン酸ナトリウムを添加する方

法(検討 I), 及びテトラブチルアンモニウムを添加する方法(検討 II)により, 疎水性カートリッジカラムに固相抽出できないかを検討した結果以下の知見を得た。

#### 1) 検討 I について

① 7 種の R-SS (アルキルスルホン酸ナトリウム) を用いて C18 カートリッジによる回収実験を行った結果, 3 成分の同時分析には C8-SS (1-オクタンスルホン酸ナトリウム) を用いるのが最も効果的であると思われた。

② pH の影響について調べたところ, アシュラム及びオキシシン銅の回収率は pH 2 ~ 3 の酸性域で 72 ~ 94 % であったが, pH の上昇とともに低下した。一方, チラムの回収率は pH 2 で 0 ~ 23 %, pH 4 ~ 6 で 88 ~ 106 % であった。

③ ①~②の結果をもとに, 精製水試料 500 ml における 3 成分の 10 μg 回収率を調べたところ, オキシシン銅 87 %, チラム 85 % であったが, アシュラムの回収が全くできなかった。そこで, アシュラムについてカートリッジからの破過容量を調べたところ, 試料負荷量が 10 ml を越えると全く保持できないことがわかり, 本法による 3 成分の同時分析はできないと判断された。

#### 2) 検討 II について

① TBA 濃度と捕集率との関係について調べた結果, アシュラムは TBA 濃度 0.05 % で 99 % の捕集率となった。オキシシン銅及びチラムは TBA 濃度に関係なくカートリッジにはほぼ完全に捕集されたが, TBA を共存させずに捕集した場合メタノールによるオキシシン銅の完全な溶出ができなかった。このことから試料に共存させる TBA 濃度は 0.05 % とした。

② 3 成分の捕集率と pH との関係について調べた結果, アシュラム及びオキシシン銅の捕集率は酸性域で低く, 中性から塩基性域において最大となった。一方, チラム捕集率への pH の影響はなかった。このことから, pH は 7 ~ 8 に調整することとした。

③ 本分析法による河川水 100 ml を用いた添加回収実験の結果, 0.1 μg 添加時 (1 μg / l) においてアシュラム 104 %, オキシシン銅 73 % であり, 相対標準偏差はそれぞれ 4.6 %, 及び 6.2 % であった。しかし, チラムは 0.1 ~ 1 μg において全く回収できなかった。また, 10 μg 添加時でも回収率 31 % と低く, 相対標準偏差 35 % と再現性の乏しい結果となった。これは, メタノール溶出液を濃縮する過程においてチラムが分解しているのではないかと考えられたが, 原因については今後の検討課題とした。

なお, 本研究の一部を「TBA を用いたアシュラム及びオキシシン銅の同時分析法」として産業用水調査会発行

の月刊誌「用水と廃水」に投稿済みである。

## 文 献

- 1) 環境庁：水質保全局長通知（環水土第 77 号），1990
- 2) 厚生省生活衛生局：水道環境部長通知（衛水第 152 号），1990
- 3) 坂口武一，上野景平：金属キレートⅡ，p 163，南江堂，東京，1966
- 4) 後藤真康，加藤誠哉：増捕残留農薬分析法，p 132，ソフトサイエンス社，東京，1987
- 5) 原 昭二，森 定雄，花井俊彦：クロマトグラフィー分離システム，p 129，丸善，東京，1981