ノ ー ト

河川水中における内分泌攪乱作用が疑われる農薬類のガスクロ
マトグラフィー/質量分析法による定量

茨 木 剛^{®*}, 小熊千佳子*, 田辺 顕子*, 川田 邦明*, 坂井 正昭*,
貴船 育英*

Determination of endocrine disrupting pesticides in
river water by GC/MS

Tsuyoshi IBARAKI, Chikako OGUMA, Akiko TANABE, Kuniaki KAWATA,
Masaaki SAKAI and Ikuei KIFUNE*

*Niigata Prefectural Research Laboratory for Health and Environment, 314-1, Sowa, Niigata 950-2144

(Received 18 January 1999, Accepted 2 March 1999)

A solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometric method was applied to determine endocrine disrupting pesticides in river-water samples. The target compounds were seven pesticides (cypermethrin, ethylparathion, fenvalerate, metribuzin, nitrofen, permethrin and vinclozolin). A water sample of 500 ml was passed through a Sep-Pak PS-2 cartridge. The pesticides were eluted with 4 ml of acetone and 4 ml of hexane, and then 4ml of ethyl acetate. The eluate was concentrated to 1ml and determined by GC/MS. The overall recoveries from ground water were 80% to 107%, except for pyrethroids (cypermethrin, fenvalerate and permethrin). A membrane-extraction disk (SDB-XC) was also applied to determine these pesticides and another six pesticides (alachlor, atrazine, carbaryl, malathion, simazine and trifluralin). Pesticides in a water sample of 500 ml were extracted using a membrane disk, and then eluted by 20 ml of ethyl acetate. After dehydration, the eluate was concentrated and determined by GC/MS. Pyrethroids can be extracted relatively well by this method. The overall recoveries of all the target compounds from ground water and river water were 49% to 99% and 56% to 112%, respectively. The limits of quantification in water were $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ to $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords : endocrine disruptor; pesticide; membrane extraction disk; solid phase extraction; GC/MS.

1 緒 言

最近, 生物の内分泌作用を攪乱する化学物質が“環境

ホルモン”とも呼ばれ大きな話題になっているが, 有機塩素系農薬をはじめ多くの農薬類について内分泌攪乱作用があるとの疑いが持たれている¹⁾. このため, これら内分泌攪乱作用が疑われている農薬の一斉分析法の確立が急務となっている。

* 新潟県保健環境科学研究所: 950-2144 新潟県新潟市
曾和 314-1

Table 1 Quantification and identification ions of all target pesticides by GC/MS

Compound	Use ^{a)}	Monitoring ion	
		Qut. ^{b)}	Id. ^{c)}
Alachlor*	H	160	188
Atrazine*	H	200	173
Carbaryl*	I	144	115
Cypermethrin	I	163	181
Ethylpatrathion	I	109	291
Fenvalerate	I	125	167
Malathion*	I	125	127
Metribuzin	H	198	144
Nitrofen	H	283	202
Permethrin	I	183	163
Simazine*	H	201	186
Trifluralin*	H	306	264
Vinclozolin	F	198	212

a) H: herbicide; F: fungicide; I: insecticide

b) *m/z* for quantitative analysisc) *m/z* for identification* previously investigated by using a solid phase cartridge²⁾³⁾

著者らは固相抽出/ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS 法) による農薬の一斉分析法を検討し^{2)~5)}, 約 100 種類の農薬及び分解生成物を対象として新潟県内河川における農薬の濃度変動を調査してきた⁵⁾⁶⁾。この分析法^{2)~5)}の対象農薬には, 1997 年に作成された環境庁の報告書において, 内分泌攪乱作用が疑われているとされる農薬類のうち 6 種 (除草剤のアラクロール, アトラジン, シマジン及びトリフルラリン, 殺虫剤のカルバリル及びマラチオン) が含まれていた。これら 6 種の農薬については, 新潟県内の河川を対象とした農薬モニタリングを実施し, その調査結果を既に報告した⁷⁾。

これら 6 農薬以外で内分泌攪乱作用が疑われている農薬のうち, 除草剤のメトリブジン及びニトロフェン, 殺菌剤のピンクロゾリン, 殺虫剤のエチルパラチオン, ペルメトリン, シベルメトリン及びフェンバレーートの 7 農薬について, この分析法の適用可能性を検討した。また, これら 13 農薬について, ディスク型固相を用いた分析法を検討したので合わせて報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

対象とした農薬の一覧を Table 1 に示す。このうち, ペルメトリン及びフェンバレーートは 2 種の, シベル

メトリンは 4 種の異性体の混合物である。

農薬標準品は, 和光純薬製及び関東化学製を用い, アセトンに溶解して 1 mg/ml としたものを農薬標準原液とした。農薬混合標準液は農薬標準原液を混合し, アセトンで各 20 µg/ml とした。内標準物質は, Aldrich 製 1,4-ジヨードベンゼン及び 9-ブromoアントラセンをアセトンに溶解し, 各 200 µg/ml の混合溶液として用いた。ポリエチレングリコール (PEG) は和光純薬製 PEG200 及び PEG300 をアセトンに溶解し, 各 10 mg/ml の混合溶液とした。

アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, ジクロロメタン及びメタノールは関東化学製残留農薬試験用を, 無水硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬試験用を用いた。

2.2 器具及び装置

1 µm ガラス繊維汙紙は東洋濾紙製 GA-100 をアセトンで洗浄して用いた。固相抽出用カートリッジは, Waters 製 Sep-Pak PS-2 を用いた。ディスク型固相は, 3M 製エムボアディスク SDB-XC を用いた。

固相抽出装置は, Waters 製 Sep-Pak コンセントレーターを使用した。ガスクロマトグラフ/質量分析装置は日本電子製 Automass 50 を用いた。カラムは Hewlett-Packard 製 HP-5 Trace analysis (内径 0.32 mm 及び 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm) 及び J & W 製 DB-17 (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.15 µm) の 3 種類を用いた。

2.3 分析方法

2.3.1 固相カートリッジによる分析^{2)~4)} 分析は既報³⁾に従って行った。すなわち, 水試料 500 ml をガラス繊維汙紙で汙過し, 汙液についてはあらかじめアセトン及び水各 5 ml でコンディショニングした固相カートリッジに 10 ml min⁻¹ で通水する。固相カートリッジを水 10 ml で洗浄し, 15 分間アスピレーターで吸引し水分を除去する。アセトン, ヘキサン及び酢酸エチル各 4 ml で溶出後, 各フラクションをそれぞれ窒素吹き付けにより 1 ml に濃縮し, 内標準溶液 5 µl 及び PEG200 + 300 溶液 10 µl を添加して GC/MS で定量する。また, 汙紙に吸着した農薬についてはアセトンで超音波抽出を行い, アセトン抽出液をロータリーエバポレーターで 1 ml に定容後, 汙液と同様に GC/MS により測定する。GC/MS 条件を Table 2 に示す。

なお, 本分析法において, アラクロール等 6 農薬については, 河川水を用いた添加回収試験で回収率が 84

Table 2 Conditions for gas chromatography/mass spectrometry

Conditons for gas chromatography	
Column	i) HP-5 Trace Analysis 30 m × 0.32 mm. i.d. $d_f = 0.25 \mu\text{m}$ ii) HP-5 Trace Analysis 30 m × 0.25 mm. i.d. $d_f = 0.25 \mu\text{m}$ iii) DB-17 30 m × 0.25 mm. i.d. $d_f = 0.15 \mu\text{m}$
Column temperature	50°C (1 min) → 20°C/min → 150°C → 10°C/min → 280°C
Injection temperature	250°C
Carrier gas	Helium
Column pressure	i), iii) 2 psi → 99 psi/min → 15 psi (0.5 min) → 99 psi/min → 2 psi ii) 0.9 psi → 99 psi/min → 10 psi (0.5 min) → 99 psi/min → 0.9 psi
Injection	Splitless (purge on time 0.5 min)
Conditions for mass spectrometry	
Ionization method	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Ionization current	350 μA
Interface temperature	230°C
Ion source temperature	230°C
Scan range	m/z 50 ~ 450
Scan speed	400 ms/scan

～110% と良好な結果が得られている²⁾³⁾。

2・3・2 ディスク型固相による分析 水試料 500 ml をあらかじめアセトン, メタノール及び水各 10 ml でコンディショニングしたディスク型固相に通水する。ディスク型固相を水 10 ml で洗浄し, 15 分間アスピレーターで吸引し水分を除去する。酢酸エチル 20 ml で溶出後, ロータリーエバポレーター及び窒素吹き付けにより 1 ml に濃縮し, 2・3・1 と同様 GC/MS で定量する。

3 結果と考察

3・1 内分泌攪乱作用が疑われている農薬類の GC/MS 測定

メトリブジンについては m/z 198 以外にはイオン強度の強いピークがないのでこのイオンを定量イオンとして選択した。ピンクロゾリンに関しては定量イオンとして m/z 285(M^+) や 212 を選択することにより定量が可能であるが, m/z 198 や 144 (メトリブジンの確認イオン) も生じるため, ピンクロゾリンの定量イオンとして m/z 198 を選択しない場合でもこの 2 農薬のカラムによる分離が定量のためには不可欠となる。しかし, 各 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の農薬混合標準液を著者が 90 種の農薬の一斉分析³⁾⁴⁾に用いてきたカラム (液相 5% フェニルメチルシリコン, 内径 0.32 mm) を用いて測定したところ, メトリブジンとピンクロゾリンのピークがほとんど同一の保持時間で出現した。

そこで, 液相は同じで内径のより細い (0.25 mm) カラム及び液相の異なるカラム (50% フェニル 50% ジメ

Fig. 1 Mass chromatograms of endocrine disrupting pesticides

(a)HP-5 Trace Analysis (i.d. 0.25 mm) (b)DB-17.
1: metribuzin; 2: vinclozolin; 3: ethylparathion; 4: nitrofen; 5: permethrin; 6: cypermethrin; 7: fenvalerate

チルポリシロキサン)の2種について検討した。得られたマスキングマトグラムの一例をFig. 1に示す。前者ではピークの分離が不十分であったのに対し、後者ではメトリブジンとピンクロゾリンを分離可能であることが分かった。更に他の農薬についても良好に分離できたことから、後者のカラムを測定に用いることとした。なお、定量限界はシベルメトリン及びニトロフェンが0.2 µg/l、その他の農薬が0.1 µg/lであった。

3・2 固相カートリッジを用いた添加回収試験

2・3・1に従って地下水を用いた添加回収試験を行った。なお、固相カートリッジは2個を直列に連結したものをを用い、2個の固相カートリッジを別々に分析した。結果をTable 3に示す。ピレスロイド系殺虫剤(シベルメトリン、フェンバレーレート及びベルメトリン)を除きおおむね良好な回収率が得られた。しかし、ピレスロイド系殺虫剤の回収率は50%以下と低く、相対標準偏

差も21%から29%と大きかった。なお、2段目の固相カートリッジからはいずれの農薬も検出されなかった。

良好な回収率が得られた4農薬は、アセトン及びヘキサンでの溶出で十分な回収率が得られた。先に検討したアトラジン等6農薬についても、カルバリルを除きアセトン及びヘキサン各4 mlでの溶出で十分との結果が得られている³⁾。したがって、カルバリルを分析の対象としない場合は酢酸エチルでの溶出を省略することが可能である。

回収率の低かった3農薬のうち、フェンバレーレートについては懸濁物質(SS)やガラス器具の壁面に強く吸着することが指摘されている⁸⁾。このことから固相カートリッジを用いた濃縮に50分間を要する本実験においては、濃縮操作中に、実験に用いたガラス器具や、固相カートリッジへ通水するための流路系等へ吸着していることが推察される。

Table 3 Recoveries of pesticides added to ground water and river water

Compound	Solid phase cartridge		Membrane extraction disk	
	Recovery, %	RSD, %	Recovery, %	RSD, %
Cypermethrin	31	21	88	2.3
Ethlparathion	107	5.5	86	4.1
Fenvalerate	37	29	82	6.1
Metribuzin	104	2.6	70	5.7
Nitrofen	80	5.9	103	2.6
Permethrin	44	24	80	3.3
Vinclozolin	96	6.1	56	7.2
Alachlor	100*	3.9	74	4.5
Atrazine	110*	5.0	84	1.5
Carbaryl	98*	6.6	112	9.3
Malathion	97*	2.2	80	5.8
Simazine	101*	4.8	97	1.3
Trifluralin	84*	5.2	98	2.3

* previously investigated (recoveries from river water)³⁾. $n = 4$

Table 4 Recoveries of pesticides added to membrane extraction disk

	Recovery, %				
	Extract solvent				
	Acetone	Hexane	Ethyl acetate	Diethylether	Dichloromethane
Permethrin	24	61	71	67	64
Cypermethrin	44	64	72	59	53
Fenvalerate	24	67	62	58	46

$n = 1$

3・3 ディスク型固相を用いた添加回収試験

3・3・1 溶出溶媒の検討 ビレスロイド系殺虫剤について固相カートリッジでは満足な結果が得られなかったため, シマジン⁹⁾やアトラジン等¹⁰⁾の分析で良好な結果が得られているディスク型固相の適用を検討した. ディスク型固相に農薬各 1 µg を添加し, アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル及びジクロロメタン各 20 ml で溶出し, 溶出溶媒の検討を行った. 結果を Table 4 に示す. 溶出に酢酸エチルを用いることにより, 固相カートリッジで十分な回収率が得られなかったビレスロイド系の 3 農薬が比較的良好に回収された. また, 他の農薬についても 81% から 105% の良好な溶出率が得られたため, 溶出溶媒として酢酸エチルを用いることとした. なお, 溶出溶媒の量については, 5 ml 程度の量でも十分であったとする報告⁹⁾もあるが, フェンバレートのように極めて吸着性の高い⁹⁾農薬を分析する場合はより多くの溶媒が必要と考えられた. そこで, 10 ml の酢酸エチルで 2 回の溶出を行ったところ, 大多数の農薬は最初の 10 ml でほぼ完全に溶出されるが, フェンバレート等は 1 回目で 90% 程度, 2 回目で 10% 程度が溶出されたため, 溶出に用いる酢酸エチルの量は 20 ml とした.

3・3・2 添加回収試験 信濃川で採水した河川水 (pH 6.98, SS 15.2 mg l⁻¹) を用い, 2・3・2 に従って農薬の添加回収試験を行った. なお, 固相抽出法で良好な結果が得られたアラクロール等 6 農薬²⁾³⁾についても合わせて検討を行った. 実験に用いた河川水からはいずれの対象農薬も定量限界以下であった. なお, 結果を Table 3 に示す. 固相カートリッジでは十分な回収率が得られなかったビレスロイド系殺虫剤については, 80% から

88% と固相カートリッジを用いた場合より高い回収率が得られた. また, 他の農薬についてもおおむね 70% から 100% 近い回収率が得られた. ディスク型固相で回収率が低かった農薬は, いずれも固相カートリッジで良好な回収率が得られている物質であり, この 2 法を併用することによってこれら 13 農薬の環境分析が可能であると考えられた.

(1998 年 12 月, 日本内分泌攪乱
化学物質学会 (環境ホルモン学
会) 研究発表会で一部発表)

文 献

- 1) 環境庁リスク対策検討会監修: “環境ホルモン”, (1997), (環境新聞社).
- 2) A. Tanabe, H. Mitobe, K. Kawata, M. Sakai: *J. Chromatogr. A*, **754**, 159 (1996).
- 3) 田辺顕子, 水戸部英子, 川田邦明, 坂井正昭: 日本分析化学会第 45 年会講演要旨集, p. 150 (1996).
- 4) 田辺顕子, 水戸部英子, 川田邦明, 坂井正昭: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **47**, 481 (1998).
- 5) 田辺顕子, 水戸部英子, 川田邦明, 坂井正昭: 環境化学, **8**, 227 (1998).
- 6) 水戸部英子, 茨木 剛, 川田邦明, 田辺顕子, 坂井正昭: 第 32 回日本水環境学会年会講演集, p. 16 (1998).
- 7) 茨木 剛, 水戸部英子, 田辺顕子, 川田邦明, 坂井正昭: 第 1 回日本水環境学会シンポジウム講演集, p. 78 (1998).
- 8) D. A. Hinckley, T. F. Bidleman: *Environ. Sci. Technol.*, **12**, 995 (1989).
- 9) 栗山清治, 柏原督弘: 環境化学, **5**, 807 (1995).
- 10) D. Barcelo, G. Durand, V. Bouvot, M. Nielen: *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 271 (1993).