キャピラリーガスクロマトグラフィー用新大量 試料導入法による農薬の高感度分析

田嶋 晴彦, 嶋村 直美
勸化学品検査協会 久留米研究所
(〒830 福岡県久留米市中央町19-14)

高岡 三奈子, 中園 金吾
勸化学品検査協会 東京事業所
(〒131 東京都墨田区東向島 4-1-1)

[平成 5 年 9 月 24 日受理]

Development of Large Volume Injection Method for Capillary Gas Chromatography and Applications for Pesticide Analysis

Haruhiko TAJIMA and Naomi SHIMAMURA
Chemicals Inspection & Testing Institute,
Kurume Research Laboratories
(19-14 Chuoh-machi, Kurume, Fukuoka 830)

Minako TAKAOKA and Kingo NAKAZONO
Chemicals Inspection & Testing Institute,
Tokyo Laboratory
(4-1-1 Higashimukoujima, Sumida-ku, Tokyo 131)

[Received September, 24, 1993]

Summary

A new large volume injection method (Dynamic Retention Gap Method: DRG) for capillary gas chromatography was developed.

The retention gap consisted of a fused silica tube (2m×0.53mm i.d.) and the pre-column (0.5m×0.53mm i.d.×0.5μm) was connected with the capillary column by a T-shape connector. A large volume of sample solution (100μl) vaporized in the injection port was rapidly introduced to the retention gap under large flow rate of carrier gas (20ml/min). After the solvent was purged through the T-shape connector, purge vent was closed and the sample was introduced to the capillary column.

High linearity between injection volume and peak area of pesticide was observed with an injection volume of 1 to 100μl in the DRG method.

In the splitless method, some pesticides (DEP, captan, pyridafention, etc.) were decomposed in the injection port by heat. But in the DRG method, those pesticides were able to be analysed with little thermal decomposition, because the pesticide was rapidly introduced to the retention gap from the injection port under large flow rate of carrier gas.

In the GC/MS analysis, the residual water in the sample solution caused a lowering of the

sensitivity. In the DRG method, the water was almost purged with solvent, then the contamination of the detector was less than the splitless method.

Key Words: large volume injection, retention gap, capillary gas chromatography, GC/MS, trace analysis, pesticides, solid phase extraction

1 はじめに

ゴルフ場で使用される農薬による水源の汚染が社会問題となり、ゴルフ場使用農薬は環境庁及び厚生省によって平成2年及び3年に規制された^{1)~2)}。また、平成4年には水道法の改正で新たに農薬が指定された³⁾。このように、農薬に対する社会的関心は高く、その実態調査と対策が強く求められている。

農薬の分析は従来主としてガスクロマトグラフ (GC) を用いて、電子捕獲型検出器 (ECD) や熱イオン化検出器 (FTD, NPD) 等で行われてきた。しかし近年、分析対象農薬の増加、調査対象試料の増加に対応するために、キャピラリーカラムとGC/MSを用いた農薬の一斉分析法が多く発表されている^{4)~7), 11)}。

しかし、分析に対する社会的要望はますます高度になってきている。農薬分析でも、分析対象農薬が増加するだけでなく、農薬自体も環境中で分解されやすい物、低濃度で薬効があるものが増加している。良分解性の農薬は分析する際にも熱分解や吸着が生じやすい物が多く、低濃度で薬効のある農薬は、環境中でより低濃度分析が求められる。

キャピラリーカラムGC法は急速に発展、普及してきたが、現在農薬分析に用いられる試料導入方法は大部分がスプリットレス法である。この方法はせいぜい2 μ l 程度しか試料を導入できない。また、注入口で気化した試料がカラムに導入されるまで約1分間かかるため熱分解性の化合物は注入口で熱分解するおそれがあり、高沸点化合物はディスクリミネーションをおこすという欠点がある。

著者らはリテンションギャップとして内径0.53mmのシリカチューブと内径0.53mmのプレカラムとを組合わせ、キャピラリーカラムとT字型コネクターで接続し、電磁弁で流路を切替える装置を考案した⁸⁾。試料注入時には大流量のキャリアガスを流しながら大量の試料を高速で注入することで、スプリットレス注入法の欠点であった試料の熱分解やディスクリミネーションを大幅に改善し、かつ100 μ l もの大量の試料を導入することを可能とした。本装置を農薬分析に応用したところ、従来より飛躍的に高感度分析が可能となった。

最近、農薬分析の前処理にミニカラムを用いた固相抽出法を用いる例が多くなっている^{5), 9) 10)}。この方法は操作が簡単で、溶媒の使用量が少ないという長所があるが

キャピラリー GC/MS 法では分析試料に残存する水分の影響で感度の変動が激しく、試料調製の際に十分に脱水する必要があった。本装置は溶媒と共に水分の大部分をGC系外にパージし、水分はキャピラリーカラム及びMSにはほとんど入らないため、従来分析できなかった含水試料も安定して分析でき、大量試料注入による感度増とあわせるで固相抽出法による前処理を大幅に簡素化することができた。

本装置はすべてGCメーカーの純正部品、GC用の汎用部品から構成され、GC本体の改造の必要もないため信頼性も高く、従来行っていたオートサンプラーを用いた自動分析にも実用することができた。

2 実験方法

2.1 原理

本研究で用いた装置の原理図をFig. 1及びFig. 2に示した。装置は内径0.53mmのシリカチューブと内径0.53mmのプレカラム組合わせたリテンションギャップ、T字型コネクター、電磁弁、及び分析カラムから構成されている。注入口はスプリット/スプリットレス注入口をスプリットレスモードで用いた。キャリアガス全流量は20ml/minとした。

試料注入は電磁弁を開いた状態で行う。このとき20ml/minの流量に設定したキャリアガスの大部分はリテンションギャップ、T字型コネクター、電磁弁を通り

Fig. 1 Schematic diagram of Dynamic Retention Gap (DRG) Method

Fig. 2 Principle of Dynamic Retention Gap (DRG) Method

GC系外にパージされる。導入された試料は注入口内で気化し、すみやかにリテンションギャップに導入される。シリカチューブ内で試料は、試料注入による空間的なピークバンドの広がりを持つが、プレカラムの先端で溶媒フォーカシングあるいは液相フォーカシングで濃縮される。溶媒がパージされた後電磁弁を閉じ、リテンションギャップと分析カラムを直結し、オープンの上昇を開始するとプレカラムに濃縮された試料は分析カラムに移動するが、プレカラムの相比は分析カラムの相比より大きいので試料はすみやかにプレカラムから分析カラムに移動し分析カラム先端で再濃縮される。このシリカチューブからプレカラム、プレカラムから分析カラムへ

の2度の濃縮という原理によって試料を大量に注入しても分析カラムの分離能をほとんど低下させることなく高感度分析が可能となる。本法はリテンションギャップを試料の大量導入、溶媒の除去、試料の濃縮という多目的で行うことから、動的リテンションギャップ (Dynamic Retention Gap: DRG) 法と呼ぶことにした。

2.2 装置

GC/MSは日本電子(株)製 Automass 120型及び AX-505 W型を用いた。試料注入はスプリットレスモードで行なった。リテンションギャップはHewlett-Packard社製内径0.53mmシリカチューブ2mとSPELCO製キャピ

ラーカラム SPB-1 (長さ0.5m, 内径0.53mm, 膜厚0.50 μ m) をガラス製コネクタで接続した。T字型コネクタはHewlett-Packard Co. 製 (Parts No. 05921-80890) を用いた。電磁弁はHewlett-Packard Co. 製スプリット/スプリットレス注入口用ソレノイドバルブ (Parts No. 19251-60560) を用い、そのオン・オフはGC本体で行った。分析用キャピラリーカラムはJ & W Scientific 製 DB-1 (長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μ m) を用いた。

カルフィッシャ水分計は京都電子工業(株)製 MKS-3P 型を用いた。

2. 3 試 薬

- (1) ゴルフ場農薬混合標準液：厚生省及び環境庁で測定が指示されたゴルフ場農薬30種類のうちGC/MSで一斉分析が可能な23種類の農薬標準 (ジエールサイエンス社製) をアセトン又はメタノール (残留農薬試験用：和光純薬) で各100ng/ml に調製した。
- (2) 含水ゴルフ場農薬標準液：メタノールに水分が0, 2, 5, 10及び20%となるように精製水を加え、それぞれの含水メタノールを用いてゴルフ場農薬標準を各100ng/ml に調製した。
- (3) DEP 標準液：DEP (ジエールサイエンス社製) をアセトンを用いて10 μ g/ml に調整した。
- (4) C18 カートリッジ：ジエールサイエンス 製 BondElute C18 (500mg/2.8ml)

2. 4 測 定

カラム：DB-1 (長さ：30m, 内径：0.25mm, 膜厚：0.25 μ m), カラム温度：60 $^{\circ}$ C (1分) - 20 $^{\circ}$ C/min - 200 $^{\circ}$ C

- 8 $^{\circ}$ C/min - 240 $^{\circ}$ C - 20 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C, 注入口温度 250 $^{\circ}$ C, キャリヤーガス：ヘリウム, 全流量20ml/min, ヘッドプレッシャー100kPa, スプリットレス法バージ開始時間：1 min, DRG 法バージ時間：20sec, GC/MS インターフェース温度：250 $^{\circ}$ C, イオン源温度：250 $^{\circ}$ C, イオン化方法：EI (70eV), 測定方法：選択イオン検出法 (SIM) とした。

ゴルフ場農薬混合標準液をスプリットレス法で2 μ l, DRG法で1, 2, 5, 10, 20, 50及び100 μ l 注入し、各ピーク面積を求めた。含水ゴルフ場農薬混合標準液をスプリットレス法及びDRG法でそれぞれ2 μ l 注入し、各ピーク面積を求めた。

3 結果及び考察

3. 1 DRG 法の試料注入量とピーク面積の直線性

DRG法でゴルフ場農薬標準を1 μ l から100 μ l 注入し、得られたピーク面積と注入量との関係をFig. 3に示した。Fig. 3は代表的な4種類の農薬についての例を示したが、注入量が1 μ l から100 μ l まで注入量とピーク面積は良好な直線を示し、実用的に50~100 μ l の注入も可能であることを確認した。その他の農薬も同様に良好な直線を示した。

スプリットレス法は試料注入時は注入口から分析カラムへのキャリヤーガス流量は1ml/min程度であり、注入された試料が注入口で気化してから分析カラムに入るのに約1分間かかる。また、注入口の容量は1ml以下であり、たとえ試料を大量に注入してもバックフラッシュでその大部分が失われる。そのためスプリットレス法では試料は通常2 μ l 以下しか注入できない。

一方、DRG法は試料注入時にキャリヤーガスを

Fig. 3 Relationship between injection volume and peak area of pesticide (DRG method)

20ml/minと大量に流すこと、またこの時のリテンションギャップによる圧力損失はほとんどないことから、大量に注入された試料もすみやかにリテンションギャップに導入されるため100 μ lという大量試料注入が可能となる。

3. 2 DRG 法による熱分解性の農薬分析

DEP (10 μ g/ml) をスプリットレス法、及びDRG 法で分析したクロマトグラムをFig. 4 に示した。DEP は熱分解性がありスプリットレス法では注入口で熱分解を起こしDDVP等に変化することが知られている。その

Fig. 4 Total ion chromatogram of DEP (splitless and DRG)

ため、DEPをスプリットレス法で分析するために注入口を100℃以下に下げることがあった。Fig. 4において注入口温度はスプリットレス法、及びDRG法とも250℃であり、スプリットレス法の場合はDEPは熱分解してほとんど検出できなかったが、DRG法の場合は良好なクロマトグラムを得ることができた。また、DRG法で認められたピークのマスペクトルをFig. 5に示した。マスペクトルからこのピークがDEPであることを確認した。

ゴルフ場農薬混合標準液2 μ lをスプリットレス法、及びDRG法で分析したクロマトグラムの一部をFig. 6に示した。注入量が同じであるので本来同程度のピーク面積が得られるはずであるが、全ピーク面積ともDRG法の方が大きかった。特に、熱分解性のあるcaptanやpyridafention等はスプリットレス法では注入口で熱分解して、ピーク面積は著しく少なくなり、ピーク形状も悪く、目的ピーク以外の熱分解物と思われるピークも多数見られた。

DRG法は注入時に大量のキャリアーガス流量を流しながら試料を注入するため、試料はすみやかに気化しリテンションギャップに導入される。そのため、スプリットレス法より熱分解は起こりにくい。また、注入口内で活性点や汚れがあった場合試料は吸着されることがあるが、DRG法では、試料の注入口での滞留時間が小さいため、そのような吸着も起こりにくい。

このような熱分解性や吸着性のある農薬の分析に

Fig. 5 Mass spectra of DEP

Fig. 6 Example of SIM chromatogram of pesticide

DRG 法が有効であることがわかった。ゴルフ場農薬は従来スプリットレス法で $2\mu\text{l}$ 程度注入して分析していたが、DRG 法では $100\mu\text{l}$ 注入できることと、熱分解が起こりにくいという理由で従来の数十倍から、数百倍もの高感度で分析できることを確認した。

3. 3 DRG 法を用いた固相抽出法の前処理の簡素化

最近、操作が簡単であること、使用する溶媒の量が少なくてすむこと、回収率が高く個人差が少ないこと、溶媒抽出でエマルジョンができやすい試料にも適用できること、といった理由で農薬分析においても従来の溶媒抽出法に代わって C18、ポリスチレンゲル、グラファイトカーボンブラックといった充填剤を用いた固相抽出法が多く用いられるようになってきている。

環境水質試料の固相抽出法による前処理方法の 1 例を Fig. 7 に示した。水質試料 200ml を固相抽出カートリッジに通したあと、メタノール等の溶剤約 3ml で溶出する。分析が HPLC 場合はこのメタノール溶液を直接分析できる。しかし、GC/MS 分析では (1) 濃縮倍率が小さいため、感度が足らない、(2) 残存する水分のため感度が大幅に変動する、という理由で直接分析することが出来ないため、さらに濃縮、塩析、転溶、脱水、濃縮という操作が必要である。これらの操作が簡素化できれば、固相抽出法の前処理が大幅に合理化でき、かつ前処理による回収率の低下や変動も最小に押さえることが出来る。

GC/MS のイオン源、分析部は高真空、高乾燥の状態で作動しており、そこに水分が入ると真空度の悪化や水分の吸着によるイオン化効率の悪化により感度は著しく

Fig. 7 Flow chart of solid phase extraction method

低下するため、水分は極力イオン源に入らないようにしなければならない。

ゴルフ場農薬混合標準液を水分が 0, 2, 5, 10 及び 20% 含むように調製し、それぞれの含水ゴルフ場農薬混合標準液をスプリットレス法及び DRG 法で分析し、水分 0% の標準液を分析したときに得られたピーク面積を 100 としたときの水分量とピーク面積の関係を Fig. 8 及び Fig. 9 に示した。

スプリットレス法では試料に含まれる水分の大部分は分析カラムを通り MS のイオン源に達する。そのため、Fig. 8 に示す通り試料に水分が含まれた場合、感度が大

Fig. 8 Variation in peak area of pesticide with water content in the standard solution (splitless method)

Fig. 9 Variation in peak area of pesticide with water content in the standard solution (DRG method)

Fig. 10 Flow chart of solid phase extraction method using DRG method

幅に低下することが分かる。

一方、DRG法では溶媒をバージする際に水分の大部分も同時にバージされ、水分はほとんど分析カラムやイオン源に入らないため、Fig. 9からもスプリットレス法に比べて感度の変動は著しく小さい。水分0%でのピーク面積を100としたとき、水分10%においてスプリットレス法では平均±標準偏差が 64 ± 11.8 なのに対してDRG法では 100 ± 6.7 であり、実用上問題ないと考えられる。

C18固相抽出カートリッジに精製水を通した後、(1) 3000rpmで5分間遠心分離、(2) 5分間窒素バージを行い、メタノール3mlを通し、溶出したメタノール溶液を5mlに定容し、その水分量をカールフィッシャ水分計で求めたところ、(1)(2)の処理を行わない場合は水分4.6%、(1)のみを行った場合は水分3.5%、(1)及び(2)を行った場合は水分は1.7%にまで下がった。この程度の水分だと、DRG法では問題にならない。また、DRG法は3.1から注入量を増やすことで従来より感度が上がることを考慮すると、DRG法を用いることで固相抽出法の前処理はFig.10に示したように大幅に簡素化することができる。

4 結 論

環境中の農薬等微量分析を行う際のスプリットレス法の欠点は以前から指摘されていた。スプリットレス注入口に代る注入口としてクールオンカラム法や圧力制御注入法(EPC, AFC)が製品化されているが、クールオンカラム法は標準液の分析では再現性よいデータがとれるが、マトリックスの多い環境試料ではリテンションギャップや分析カラムの汚染が激しく実用には耐えない。EPC法も高速大量試料注入の利点を生かせる高圧注入モードを用いると排気容量の小さい四重極型のGC/MSではイオン源の圧力が上がり安定して測定できないという欠点がある。DRG法は試料の高速大量注入といったダイレクト法の優れた試料注入方法を用い、か

つキャピラリーカラムの高分離、低吸着性を生かせる方法である。

DRG法の特長は、 $100\mu\text{l}$ もの試料を注入でき、従来より格段に高感度分析が可能である。注入口での熱分解や吸着がスプリットレス法に比べて著しくおこりにくい。溶媒、水分及び低沸点の不純物の大部分がバージで除けるので分析カラムや検出器の汚染が少ない、等である。また、固相抽出法へ応用するとその前処理が大幅に簡素化される。

また、DRG法に用いる部品は全て入手しやすいGCメーカーの純正部品や汎用部品で構成され、GC本体の改造等を行っておらず、構造も簡単なので信頼性も高い。従来のオートサンプラーを用いた自動分析も問題なく行える。

本法が農業等環境中微量分析に役立つことを望んでいる。

要 約

内径0.53mmのリテンションギャップとキャピラリーカラムとT字型コネクターで接続し、電磁弁で流路を切替える装置を開発した。試料の導入は大流量のキャリアガスを流しながら行い、溶媒を除去した後流路をキャピラリーカラムに接続するため、従来のスプリットレス注入法より試料を大量に注入でき、かつ熱分解や吸着もおこりにくい。そのため、従来より大幅に高感度分析が可能となった。溶媒や低沸点及び難揮発性の不純物はリテンションギャップで大部分除去されるため分析カラムや検出器の汚染は非常に少なくなった。本法は溶媒中の水分の影響を受けにくいので、農薬の分析に用いられる固相抽出法の前処理を大幅に合理化できた。本法は特殊な部品やGC本体の改造も不要で、オートサンプラーを用いた連続分析も従来通り行えた。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局、衛水第152号：ゴルフ場使用農薬に係わる水道水の安全対策について、平成2年5月31日
- 2) 環境庁水質保全局、環水土第77号：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係わる暫定指導指針について、平成2年5月24日
- 3) 厚生省令第69号：水質基準に関する省令、平成4年12月21日
- 4) 土橋 均、小野広孝、辰野道昭：2種類の溶融シリカキャピラリーカラム付きガスクロマトグラフィーを用いた薬物の検索システム、衛生化学, **34**, 256-265 (1988)
- 5) 奥村為男：キャピラリー・GC/MSによる農薬の分析について、水質汚濁研究, **14**, 109-122 (1991)

- 6) 奥村為男：メチルシリコンキャピラリーカラムカラムによる環境化学物質のためのGC・保持指標，環境化学，**1**，333-358（1991）
- 7) 剣持堅志，小田淳子，肥塚加奈江，鷹野 洋，萩野泰夫，森 忠繁：ゴルフ場農薬の分析法，環境化学，**3**，41-58（1993）
- 8) 田嶋晴彦，嶋村直美，青木三奈子：キャピラリーガスクロマトグラフィー用大量試料導入法の開発と応用，分析化学，**42**，573-579（1993）
- 9) 滝埜昌彦，山口憲治：ゴルフ場農薬の前処理方法の検討，環境化学，**3**，105-121（1993）
- 10) 平澤晴人，後藤 武，藤江幸一，浦野紘平：固相抽出法の水中有機物濃縮特性，第27回日本水環境学会年会講演集，504-505（1993）
- 11) 奥村為男，今村 清，日本水質汚濁研究会第24回水質汚濁学会講演集，323-324（1989）