水道水中シマジン, チウラムおよびチオベンカルブの 全自動 HPLC 分析システムの構築

小玉 修嗣, 松永 明信, 大戸 幹也
山本 敦, 水上 英一

富山県衛生研究所

(〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山17-1)

[平成 7 年 1 月 23 日受理]

Establishment of a Fully-automated HPLC Analytic System for Simazine, Thiram and Thiobencarb in Tap Water

Shuji KODAMA, Akinobu MATSUNAGA, Mikiya OHTO

Atsushi YAMAMOTO and Eiichi MIZUKAMI

Toyama Institute of Health

(17-1, Nakataikoyama, Kosugi-machi, Toyama 939-03)

[Received January 23, 1995]

Summary

A fully-automated HPLC system for simultaneous determination of three pesticides, simazine, thiram and thiobencarb, in tap water was developed.

A test tap water was made up in a solution of 2mM sodium ascorbate and 1mM EDTA in order to prevent the decomposition of thiram and thiobencarb from residual choline and metal ions. Three ml of the tap water injected by the auto sampler was passed through an enrichment column, where the pesticides were trapped quantitatively. The pesticides were then flushed from the column onto an analytic column, where the separation was achieved, and they were measured by the UV detector. The recoveries of simazine (0.3 $\mu\text{g/l}$), thiram (0.6 $\mu\text{g/l}$) and thiobencarb (1.0 $\mu\text{g/l}$) spiked to 7 tap water samples were 93-100%, 92-98% and 81-88%, respectively. It may be possible that many samples are continuously analyzed within a running time of 30minutes by the proposed system. Therefore, it is suggested that the analytical system is effective for daily assay of simazine, thiram and thiobencarb in tap water as a screening method.

Key words: simazine, thiram, thiobencarb, simultaneous determination, HPLC

1. はじめに

水道水質に関する新たな基準 (46項目)¹⁾ が平成 5 年 12 月 1 日から施行された。この基準には、除草剤であるシマジンとチオベンカルブ, 殺菌剤であるチウラム, また, 殺線虫剤である 1,3-ジクロロプロペンの計 4 種類の農薬が含まれる。これらのうち, 1,3-ジクロロプロペン

は四塩化炭素などの低沸点有機化合物とともに公定法で一斉分析できる。シマジンとチオベンカルブに関しては, 固相抽出/GC-MS 法により一斉分析できるが, チウラムは固相抽出/HPLC 法であるため, これら 3 種類の農薬を公定法では一斉分析できない。ルーチン分析の効率化の観点から, これら 3 農薬の一斉分析によるスクリーニング法の検討が行われている²⁾。著者らは, HPLC の

試料注入装置にミニカラムを組み込んだオンライン固相抽出 HPLC 分析法を開発し、日常分析に適する方法であることを報告してきた^{3), 4)}。この方法は、検水をミニカラムに直接注入して農薬を補集・抽出した後、流路を切り替えてミニカラムからの溶出と分析カラムでの分離を連続して行うものである。今回は、この分析法をさらに省力化する目的でオートサンプラーを組み込み、シマジン、チウラムおよびチオベンカルブを一斉分析できる全自動 HPLC 分析システムについて検討した。その結果、いずれも厚生省が指定した検出限界目標値（それぞれ $0.3 \mu\text{g/l}$ 、 $0.6 \mu\text{g/l}$ および $1 \mu\text{g/l}$ ）まで測定可能であったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 標準溶液の調製

シマジン（和光純薬工業製・残留農薬用）7.5mg、チウラム（ガスクロ工業製）30mg、およびチオベンカルブ（和光純薬製・残留農薬用）50mg をそれぞれアセトニトリルに溶かして 50ml としたものを標準原液とした。この 3 種類の標準原液を 53% アセトニトリル溶液（0.1mM EDTA-2Na を含む）で適宜一定量に希釈および混合して標準溶液とした。なお、EDTA-2Na はチウラムの安定化のために添加した⁵⁾。

2. 2 検量線の作成

手動注入器を用いて、 $30 \mu\text{l}$ の各標準溶液を分析カラムに直接導入し、各農薬の注入量とピーク面積から検量線を作成した。

2. 3 濃縮カラムへの捕集率の測定法

各標準溶液を精製水（1mM EDTA-2Na を含む）で 100 倍に希釈し、希釈標準溶液とした。捕集率は、 $30 \mu\text{l}$ の標準溶液を手動注入したときの各農薬のピーク面積を 100% とし、その標準溶液から調製した希釈標準溶液 3 ml を用いて得られた各ピーク面積から算出した。なお、精製水は MILLI R/Q WATER PURIFIER（ミリポア製）により調製し、希釈に際しては、RSpak DE-613 カラム（昭和電工製、6 mm i.d. x 150mm）に通して吸着成分を除去した。

2. 4 水道水の前処理法

水道水を分析する場合には、オルト・トリジン法⁶⁾により残留塩素濃度を測定した後、2 mM アスコルビン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA を添加して検水とした。

2. 5 装置

HPLC 装置は、日立製作所製 L-6300 形ポンプ、同 AS-4000 形オートサンプラー（4 ml 仕様）、同 L-4250 形

UV-VIS 検出器、島津製作所製 CTO-10AC 形カラムオープンおよびセンチュリー科学製 EIE010 形スイッチングバルブを組み合わせて構成した。

データ処理およびシステムの制御には、PAN 通信を用いた日立製作所製 D-6100 形 HPLC マネージャーを用いた。

2. 6 全自動 HPLC システム

全自動 HPLC システムの流路図を Fig. 1 に示した。オートサンプラーで検水または希釈標準溶液 3 ml を採取した。これを濃縮用ポンプで送られる洗浄液（10% アセトニトリル）で、濃縮カラム（昭和電工製の RSpak DE-613 を 4 mm i.d. x 10mm カラムに充填）に 1 ml/min の流速で 6 分間送液し、農薬を補集・抽出した。なお、ベースラインを安定化するために、濃縮用ポンプで送られる洗浄液は洗浄カラムに通した後、オートサンプラーに接続した。

つぎに、スイッチングバルブを切り換えることにより、分析用ポンプから送られてくる移動相（53% アセトニトリル）を 1.5 ml/min の流速で濃縮カラムに通過させた。ここで溶出された農薬を分析カラム（昭和電工製、RSpak DE-613、6 mm i.d. x 150mm）に導入し、分離された成分を UV-VIS 検出器を用いて 230nm（シマジン）、270nm（チウラム）および 220nm（チオベンカルブ）の吸光度を測定した。カラム温度は、カラムオープンにより 40℃ に設定した。

3. 結果および考察

3. 1 HPLC 条件の検討

シマジン（ 0.3mg/l ）、チウラム（ 0.6mg/l ）およびチオベンカルブ（ 1mg/l ）を含む標準溶液を用いて、これら 3 農薬の保持時間に及ぼす移動相中のアセトニトリル濃度の影響について検討した。その結果、3 農薬ともアセトニトリル濃度の増加に伴って保持時間は減少した。アセトニトリル濃度は 3 農薬が 5–20 分の間に溶出する 53% に設定した。つぎに、カラム温度の影響について検討した。30–45℃ の範囲では、温度の上昇に伴って 5–14% 保持時間が減少した。しかし、各農薬の分離やピーク面積には差はみられなかった。したがって、以下の実験では、カラム温度を 40℃ に設定した。

3. 2 検量線の作成

0.03 – 3mg/l のシマジン、 0.06 – 6mg/l のチウラムおよび 0.1 – 10mg/l のチオベンカルブを含む標準溶液 $30 \mu\text{l}$ を手動注入器により注入し（ 0.3 – $30 \mu\text{g/l}$ のシマジン、 0.6 – $60 \mu\text{g/l}$ のチウラムおよび 1 – $100 \mu\text{g/l}$ のチオベンカルブを含む溶液 3 ml に対応）、得られたクロマトグラムからピーク面積から検量線を作成した。その結果、

Fig. 1 Schematic diagram of a fully-automated HPLC system

3種類の農薬は全て相関係数0.9999以上の良好な直線性を示した。したがって、いずれの農薬も検出限界目標値まで測定可能であると推定された。

3. 3 濃縮カラムにおける濃縮条件の検討

検水中の農薬を濃縮用カラムに濃縮する場合、オートサンプラーで採取した検水は、濃縮用ポンプから送液される洗浄液により濃縮カラムに送られる。この間に農薬の拡散が起こるといわれているため、送液条件について検討した。試料として、シマジン ($3 \mu\text{g/l}$)、チウラム ($6 \mu\text{g/l}$) およびチオベンカルブ ($10 \mu\text{g/l}$) を含む希釈標準溶液 3 ml を用い、精製水を洗浄液として用いたときの送液量と捕集率との関係を Fig. 2 に示した。その結果、採取試料量に相当する 3 ml を送液しても各農薬の捕集率は不十分であり、完全に試料を捕集するためには 6 ml の送液が必要であった。この送液は洗浄操作も兼ねているため、洗浄液にアセトニトリルを添加したときの影響について検討した。その結果、チウラムとチオベンカルブの場合、0–20% のアセトニトリル濃度の範囲内では捕集率に変化はみられなかったのに対し、シマジンでは 20% アセトニトリルによりピークが消失した。そこで、洗浄液のアセトニトリル濃度を 10% に設定した。濃縮時における送液速度は、いずれの農薬についても、0.5–2 ml/min の範囲内で回収率は一定していたため、1 ml/min とした。本分析法においては、洗浄液は洗浄

Fig. 2 Relationship between flow volume of washing solution by loading solution pump and recovery of 3 pesticides

Three ml of diluted standard solution containing simazine ($3 \mu\text{g/l}$; ○), thiram ($6 \mu\text{g/l}$; △) and thiobencarb ($10 \mu\text{g/l}$; □) was passed through the enrichment column by loading solution pump

カラムを通してオートサンプラーに送液されるが、このカラム操作は妨害ピーク生成を抑える有効な手段であった。

オートサンプラーによる希釈標準溶液の採取量と各農

薬のピーク面積との間には、いずれの農薬についても4 mlまで直線関係がみとめられた。しかし、本オートサンプラーでの採取量は4 mlが上限であり、3 mlの採取量でも検出限界目標値まで検出できるため、採取量を3 mlに設定した。

本法においては、希釈標準溶液や洗浄液を濃縮カラムに流す方向と移動相を濃縮カラムに流す方向を同一にしている。これに対し、方向を逆にする、いわゆるバックフラッシュ方式を用いている報告もある⁷⁾。そこで、それぞれの方式で捕集率を検討したところ、両者に差はみられなかった。したがって、カラムの安定性を考慮し、本法では濃縮カラムを通過する方向を同一にした。また、濃縮カラムには、分析カラムと同じ昭和電工製のRSpak DE-613を充填した4 mm i.d. x 10mm カラムを用いたが、ODS系のLiChroCART 4-4 (MERCK製、4 mm i.d. x 4 mm)を用いても捕集率に差はなかった。

つぎに、シマジン (0.3–30 $\mu\text{g/l}$)、チウラム (0.6–60 $\mu\text{g/l}$) およびチオベンカルブ (1–100 $\mu\text{g/l}$) を含む種々濃度の希釈標準溶液を用いて捕集率を求めた。Table 1に示したように、シマジン、チウラムおよびチオベンカルブの捕集率は、それぞれ95–100%、90–100% および85–90%と良好な値を示し、かつ、CV値も全て4%以下であった。

3. 4 水道水を分析するための前処理法の検討

水道水の前処理法について検討した。0.5mg/lの残留

塩素を含む水道水にシマジン (3 $\mu\text{g/l}$)、チウラム (6 $\mu\text{g/l}$) およびチオベンカルブ (10 $\mu\text{g/l}$) を添加した後、室温 (25–30℃) で放置したときの各農薬の分解の経時変化をFig. 3に示した。シマジンの回収率は約95%と一定していたのに対し、チウラムは速やかに、チオベンカルブは徐々に消失し、従来の報告と一致した^{8),9)}。上記の水道水に対して2 mM アスコルビン酸ナトリウムを添加して残留塩素を消失させると、チオベンカルブの分解は抑えられたのに対し、チウラムの分解は影響を受けなかった。つぎに、上記の水道水に2 mM アスコルビン酸ナトリウムおよび1 mM EDTAを添加したところ、チウラムの分解も抑えられることがわかった。

そこで、富山県内7ヵ所から採取した水道水 (残留塩素濃度0.1–0.8mg/l) にアスコルビン酸ナトリウムとEDTAを添加し、各農薬が不検出であることを確認した後、3種類の農薬を添加して回収率を測定し、Table 2に示した。また、クロマトグラムの一例をFig. 4に示した。その結果、シマジンで93–102%、チウラムで88–100%、チオベンカルブで81–88%と良好で、かつ、CV値は4%以下であった。したがって、水道水にこれら農薬が存在していれば再現性よく測定できると推定された。

平成6年4月から11月の間に、富山県内の水道水約150検水について公定法と並行して本法でも分析した。しかし、3種類の農薬はいずれの方法でも検出されなかった。

Table 1 Recovery of 3 pesticides spiked to purified water

Pesticides	Added ($\mu\text{g/l}$)	Recovery ^{a)} (%)	CV ^{b)} (%)
Simazine	0.3	97.1 $\pm$ 1.8	1.9
	0.9	99.1 $\pm$ 3.5	3.5
	3.0	98.4 $\pm$ 1.1	1.1
	30	98.9 $\pm$ 0.6	0.6
Thiram	0.6	91.4 $\pm$ 3.3	3.6
	1.8	93.6 $\pm$ 1.5	1.6
	6.0	95.1 $\pm$ 2.6	2.7
	60	98.5 $\pm$ 0.8	0.8
Thiobencarb	1.0	85.0 $\pm$ 2.6	3.1
	3.0	89.0 $\pm$ 1.4	1.6
	10	88.1 $\pm$ 2.9	3.3
	100	87.0 $\pm$ 1.1	1.3

a) mean value $\pm$ standard deviation (n = 7).

b) coefficient of variation.

Fig. 3 Time course of decomposition of 3 pesticides after spiking to tap water

One ml of standard solution containing simazine (0.3mg/l ; A), thiram (0.6mg/l ; B) or thiobencarb (1.0mg/l ; C) was diluted 100-fold with tap water containing 0.5mg/l chlorine. Three ml of the mixture standing at room temperature (25–30°C) was applied.

○ : tap water alone ; △ : 2mM sodium ascorbate was added to tap water ; □ : 2mM sodium ascorbate and 1mM EDTA were added to tap water.

Table 2 Recovery of 3 pesticides spiked to 7 tap water samples in Toyama Prefecture

Sample number	Recovery (%)					
	Simazine		Thiram		Thiobencarb	
	added ($\mu\text{g/l}$)	added ($\mu\text{g/l}$)	added ($\mu\text{g/l}$)	added ($\mu\text{g/l}$)	added ($\mu\text{g/l}$)	added ($\mu\text{g/l}$)
	0.3	3.0	0.6	6.0	1.0	10.0
1	94.6	98.6	97.2	93.7	81.5	81.8
2	100.0	101.4	96.4	93.7	84.1	81.8
3	95.9	96.7	97.2	99.5	83.6	87.6
4	95.4	97.5	92.2	88.8	83.1	82.6
5	96.5	95.8	95.3	92.4	85.9	84.9
6	96.5	98.6	93.8	97.3	84.0	86.4
7	93.0	94.9	94.5	90.6	87.6	82.3
Mean	96.0	97.6	95.2	93.7	84.3	84.5
SD	2.2	2.2	1.9	3.7	2.0	2.3
CV	2.3	2.3	2.0	3.9	2.4	2.7

4. まとめ

本全自動 HPLC 分析システムは、水道水に農薬が残留していれば、前処理した検水をオートサンプラーにセットするだけで、再現性よく、かつ検出限界目標値までシマジン、チウラムおよびチオベンカルブを測定すること

ができ、スクリーニング法として有用であると考えられた。また、本分析システムは 1 分析が約 30 分で終了し、連続自動分析が可能であるため、日常分析に適する方法であると考えられる。

シマジン、チウラムおよびチオベンカルブを一斉分析する全自動 HPLC 分析システムについて検討した。オー

Fig. 4 Typical chromatogram of 3 pesticides

Broken line shows a chromatogram of pre-treated tap water with simazine ($3 \mu\text{g/l}$; A), thiram ($6 \mu\text{g/l}$; B) and thiobencarb ($10 \mu\text{g/l}$; C). Solid line shows that without pesticides. 0–6min of the retention time correspond to sampling time.

トサンプラーで採取した検水 3 ml を濃縮カラムに送液し、農薬を捕集・抽出した。つづいて、流路を切り換えて濃縮カラムと分析カラムを接続し、分析用ポンプから送液される移動相により各農薬を分離し、UV 検出器を用いて測定した。富山県内 7 ヶ所から採取した水道水にシマジン ($0.3 \mu\text{g/l}$)、チウラム ($0.6 \mu\text{g/l}$) およびチオベンカルブ ($1.0 \mu\text{g/l}$) を添加したところ、回収率はそれぞれ 93–100%、92–98% および 81–88% であった。本システムは、1 分析約 30 分で連続自動分析が可能であるため、日常分析に適し、スクリーニング法として有用と考えられる。

文 献

- 1) 平成 4 年 12 月 21 日付、水質基準に関する省令、厚生省令第 69 号
- 2) 伊藤伸一、節田節子、内藤昭治：固相抽出／高速液体クロマトグラフィーを用いた水中のシマジン、チウラム、チオベンカルブの同時分析法の検討、水道協会雑誌、**63**、22–26 (1994)
- 3) 山本 敦、大戸幹也、細呂木志保、松永明信、水上英一：オンライン固相抽出による水中アシュラムの HPLC 分析、衛生化学、**38**、374–377 (1992)
- 4) 大戸幹也、山本 敦、松永明信、水上英一：オンラ

イン固相抽出高速液体クロマトグラフィーによる飲料水中のゴルフ場使用農薬 4 種類（メコプロップ、オキシシン銅、シマジン、チウラム）の同時定量、分析化学、**43**、71–74 (1994)

- 5) 山田直樹、富田伴一、茶谷邦男：固相抽出－HPLC を用いた環境水中のゴルフ場農薬チウラム、イプロジオン及びベンスリドの同時分析法、衛生化学、**38**、566–570 (1992)
- 6) 日本水道協会発行：「上水試験方法」、pp309–313 (1985)
- 7) 加藤充哉、塚林 裕、堀 秀朗、四月朔日富司子、波木利志栄、南由美子：ゴルフ場排水に含まれる農薬の検査方法（第 3 報）－カラムスイッチング／HPLC 法によるカルバリル、オキシシン銅、チウラム、ベノミル及びアシュラムの同時分析、石川保環年報、**30**、271–275 (1993)
- 8) 大戸幹也、山本 敦、松永明信、高柳信孝、健名智子、斉藤行雄、水上英一：塩素処理水中のゴルフ場使用農薬の分解、環境化学、**3**、59–64 (1993)
- 9) 鈴木玲子、小木曾正敏、田辺仁志：水中の農薬の分解に及ぼす残留塩素の影響、愛知農総試研報、**15**、151–155 (1983)