

## 高速向流クロマトグラフを用いた農薬分析法の開発

浦西 洋輔・浦西 克維・山下 浩一

Simultaneous Analyses of Pesticides in Environmental Water using High-speed Counter-current Chromatography

Yosuke URANISHI・Katsushige URANISHI and Hirokazu YAMASHITA

### 1. 緒言

高速向流クロマトグラフィー (high-speed countercurrent chromatography, 以下 HSCCC) は強い遠心力とアルキメデスのスクリュウ効果によってカラム内に液体を固定し、その液体と混和しない他の液体を送液することで、二相間での分配平衡を利用して目的物の分離を行う手法である<sup>1~3)</sup>。HSCCC は固体充填剤を用いないため、溶質の充填剤表面への不可逆的な吸着が起こらない。更に、固体充填剤に親和性が高く移動相では溶出できない物質でも、固定相が液体であるため、カラム内の液体固定相から目的物を回収できる特徴的なクロマトグラフィーである。

HSCCC は、主にタンパク質の分離・分取に用いられている<sup>4)</sup>他、金属イオン<sup>5)</sup>や、カテキン類<sup>6)</sup>、抗酸化物質<sup>7)</sup>、食品中の残留農薬<sup>8)</sup>の分離・分析法等、多くの分野で応用されている。しかしながら、環境水中に残留する農薬の分離に HSCCC を適用した報告はなされていない。

そこで本研究では、河川水を試料とし、前処理として HSCCC を用いた多成分農薬一斉分析法について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料

環境水中の農薬調査を想定し、河川水を試料とした。今回の検討では、添加回収試験における Matrix の影響を調べるため、懸濁物質の少ない (SS: < 1 mg/L) 河川水 (以下 LMS) と懸濁物質の多い (SS: > 10 mg/L) 河川水 (以下 HMS) の 2 種類のブランク試料 (図 1) を用いた。

#### 2.2 試薬

アセトン、ヘキサン、トルエンは残留農薬・PCB 試験用、メタノール、酢酸アンモニウム溶液は LC/MS 分析用 (以上、富士フィルム和光純薬(株)製)、tert-ブチルメチルエーテル (以下 MTBE) は関東化学(株)製残留農薬・PCB 試験用を使用した。農薬混合標準原液は、富士フィルム和光純薬(株)製の農薬混合標準液水質-1-2 及び関東化学(株)製の農薬混合標準液 65 を使用し、LC/MS/MS 測定用の標準原液はメタノールで、GC/MS 測定用の標準原液はアセトンで適宜希釈して調製した。精製水は、小松電子(株)製うるびゅあ KE-0147A で作成した超純水を用いた。



図 1. 試料水 (左: LMS, 右: HMS)



図 2. 高速向流クロマトグラフ

## 2. 3 装置, 器具

前処理用の HSCCC 装置は, クツワ産業(株)製高速向流クロマトグラフ (Easy-PREPccc H 型, 図 2) を用いた。カラムチューブには, 内径 1.0 mm, 内容積 30 mL のテフロンチューブを用いた。固定相の溶出確認は(株)島津製作所製 LC20A SPD20A を用いた。

なお, 前処理後の農薬成分の分析に使用した機器及び測定条件は表 1 に示した。

## 2. 4 前処理方法

HSCCC 装置を用いた前処理方法は次のとおりとした。まず, カラム内に固定相 (*n*-hexane, MTBE, toluene 混合溶液) を充填させた後, 移動相 (試料 20 mL) を導入し, 高速向流クロマトグラフを 3 分間回転させ, 固定相と移動相を十分に向流分配させた。次に, 固定相を流速 1 mL/min で送液し, 固定相を押し出した。農薬は固定相中にトラップされるため, 検出器を用いて固定相の溶出を確認し, 固定相 1 mL を回収した。回収した固定相は窒素ガス気流下で乾固直前まで溶媒留去し, LC/MS/MS 用の試料はメタノールを, GC/MS 用の試料はアセトンを加えて溶解させ, 全量を 1 mL とした。

本調査では, 移動相を水 (河川水) とし, 固定相の溶媒比率を変化させることで, 目的物の分離・抽出効率の変動について検討した。

表 1. GC/MS 及び LC/MS/MS 測定条件

GC/MS	
GC system	GC-2010 Plus (Shimadzu)
Column	Rtx-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm
Column Temp	70°C(2 min) → 15°C/min → 200°C(0 min) → 4°C/min → 260°C(0 min) → 20°C/min → 280°C(3 min)
Carrier gas	Helium, 1.47 mL/min
Injection Temp	250°C
Injection Volume	Spritless, 1 μL
MS system	
Interface Temp	250°C
Ion source Temp	230°C
LC/MS/MS	
LC system	Acquity UPLC system (Waters)
Column	ACQUITY UPLC HSS C18 1.7 μm, 2.1 × 100 mm
Mobile Phase	A: 5 mM Ammonium acetate B: Methanol
Percentage of mobile phase A	95% A (0.7 min) → liner gradient, 0.8 min → 70% A → liner gradient, 7 min → 30% A → liner gradient, 2 min → 5% A → liner gradient, 1.5 min → 95% A
Flow Rate	0.4 mL/min
Column Temp	40°C
Injection Volume	5 μL
MS/MS system	
Ionization mode	ESI-Positive, ESI-Negative
Capillary voltage	0.5 kV (Positive, Negative)
Source temperature	150°C
Desolvation Temp	600°C
Desolvation gas	Nitrogen, 1000 L/hr

表 2. HSCCC-GC/MS 法を用いた添加回収試験結果 (n = 1)

Concentration Sample Solvent	1 ppm						Octanol-water partition coefficient (Log Pow)
	LMS						
	<i>n</i> -hexane:MTBE: toluene =						
Pesticides	0:1:0	3:1:0	3:1:0.5	3:1:1	2:2:1	1:3:1	
Alachlor	64%	69%	68%	89%	71%	83%	3.0
Butamifos	33%	45%	38%	73%	36%	52%	4.6
Cafenstrole	42%	62%	58%	96%	46%	57%	3.2
Captan	45%	50%	46%	74%	59%	74%	2.5
Diazinon	52%	48%	47%	73%	61%	77%	3.4
Dithiopyr	48%	55%	45%	82%	49%	63%	4.4
Etofenprox	43%	62%	56%	94%	35%	57%	6.9
Flutoranil	59%	78%	75%	96%	58%	79%	3.7
Iprodione	47%	67%	63%	98%	50%	67%	3.0
Isoprotholane	62%	82%	81%	103%	62%	76%	2.8
Mepronil	48%	67%	66%	96%	49%	72%	3.6
Napropamide	60%	76%	76%	99%	59%	75%	-
Pencycuron	56%	72%	64%	98%	67%	85%	4.6
Propiconazole	55%	76%	73%	93%	51%	74%	3.7
Propyzamide	66%	70%	69%	86%	71%	79%	2.9
Pyributicarb	31%	47%	40%	77%	35%	41%	4.7

※添加回収率が許容範囲 (70% ~ 120%) から外れた項目を網囲いで示した。

## 2. 5 添加回収試験

HSCCC-GC/MS 法は 1.0 mg/L, HSCCC-LC/MS/MS 法は 0.1 mg/L となるよう混合標準液を河川水に添加し、回収率を求めた。添加回収試験の評価については、化学物質環境実態調査実施の手引き<sup>9)</sup>に基づき回収率が 70 ~ 120 % 以内であれば良好な結果であると判断した。測定は、装置への負荷を考慮して、HSCCC-GC/MS 法では懸濁物質の少ない LMS のみを、より感度の高い HSCCC-LC/MS/MS 法については LMS 及び HMS の両方を対象とした。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 HSCCC-GC/MS 法を用いた添加回収試験

HSCCC 装置を用いて前処理を行った後、GC/MS にて測定を行った結果を表 2 に示す。HSCCC における固定相の検討として、まず非水溶性溶媒である *n*-hexane に、modifier (分離・抽出の改善を目的として加える添加材) として水にやや溶けやすい MTBE を組み合わせた。結果、*n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 0 の条件において良好な回収率が得られた農薬は、6 種のみであった。そこで、*n*-hexane と MTBE の中間的な水溶性を持つ toluene を加えることとした。toluene の比率として、1 割程度 (*n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 0.5) では、toluene を全く加えない結果 (*n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 0) と大きな変化が無かったため、toluene の比率を上げたところ (*n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 1, 2 : 2 : 1, 1 : 3 : 1), *n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 1 の条件において最も良好な結果が得られ、計 16 種の農薬について HSCCC 装置を用いた前処理が適用可能であった。

HSCCC を用いて目的物の分離を成功させるためには、適した溶媒系の選択が肝要である。既報<sup>10)</sup>では、HSCCC に使用する固定相の選択として、単一の溶媒系で成功することは稀で、modifier を加え 2 ~ 3 種類の溶媒を組み合わせたことが多いと述べている。本結果においても、MTBE 単相や *n*-hexane/MTBE の二相系よりも、*n*-hexane/MTBE/toluene といった水溶性の異なる三相の溶媒を使用する必要があった。また、これら三相の溶媒比率を変化させることで、抽出効率の上昇が見られた。

### 3. 2 HSCCC-LC/MS/MS 法を用いた添加回収試験

3. 1 にて良好な結果が得られた固定相の溶媒比率 (*n*-hexane : MTBE : toluene = 3 : 1 : 1) を用い、HSCCC 装置による前処理を行った後、LC/MS/MS にて測定を行った。結果、HSCCC-LC/MS/MS 法は計 28 種の農薬

表 3. HSCCC-LC/MS/MS 法を用いた添加回収試験結果 (n = 1)

Concentration	0.1 ppm		Octanol - water partition coefficient (Log Pow)
	Sample	HMS	
Solvent	<i>n</i> -hexane:MTBE: toluene =		
Pesticides	3:1:1		
Acetamiprid	0%	0%	0.8
Azoxystrobin	104%	86%	2.5
Bensulide	84%	74%	-
Boscalid	103%	112%	2.9
Butamifos	79%	82%	4.6
Cafenstrole	116%	114%	3.2
CafenstroleMetabolite	0%	0%	-
Clothianidin	0%	0%	0.7
Cumyluron	107%	98%	2.6
Cyclosulfamuron	0%	0%	1.5
Cyproconazole	106%	92%	3.1
Diazinon	84%	86%	3.4
Difenoconazole	76%	77%	4.4
Dithiopyr	66%	67%	4.4
Ethoxysulfuron	0%	0%	0.0043
Flazasulfuron	0%	0%	1.3
Flutolanil	99%	100%	3.7
HalosulfuronMethyl	0%	0%	-0.018
Imidacloprid	0%	0%	0.57
Isoprothiolane	101%	108%	2.8
Isoxathion	81%	83%	3.7
Mecoprop	0%	0%	-0.43
Mepronil	102%	96%	3.6
Metalaxyl	0%	0%	1.7
Oxaziclomefone	83%	91%	3.7
Pencycuron	90%	87%	4.6
Pendimethalin	92%	97%	5.1
Propiconazole	95%	92%	3.7
Propyzamide	100%	99%	2.9
Pyributycarb	66%	69%	4.7
Siduron	102%	80%	-
Simazine	0%	0%	2.1
Simeconazole	102%	104%	3.2
Tebuconazole	100%	89%	3.7
Tebufenozide	88%	97%	4.2
Terbucarb	91%	102%	-
Tetraconazole	95%	92%	3.5
Thiamethoxam	0%	0%	-0.13
Thifluzamide	99%	115%	4.1
Triclopyr	103%	101%	-
Triflumizole	85%	84%	5.0
TriflumizoleMetabolite	100%	92%	-

※添加回収率が許容範囲 (70% ~ 120%) から外れた項目を網囲いで示した。

について良好な回収率を得ることができた (表 3)。今回の添加回収試験では、LMS と HMS との間で、添加回収率に大きな差は見られなかった。また、オクタノール/水分分配係数 (以下 Log Pow) を比較すると、Log Pow : 2.2 ~ 2.5 を境に、この値より低い農薬は全く回収されなかった (図 3)。

四ノ宮<sup>11)</sup> は、本報とほぼ同種の農薬について固相カートリッジを用いた前処理を行い、河川水中農薬分析におけるマトリックス効果を調査しているが、保持時間の短い農薬が特に強いイオン化抑制を受けていると報告している。また、Bonfiglio ら<sup>12)</sup> は、生体試料

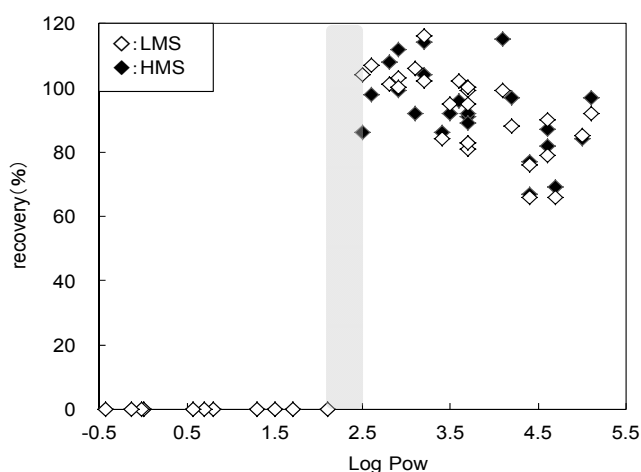


図3. 添加回収率と Log Pow の相関

を対象とした有機化合物の分析において、極性の高い物質ほどイオン化抑制を受けやすい傾向があると報告している。今回、Log Pow の低い親水性の農薬については全く回収されておらず、極性の高い物質におけるイオン化抑制効果を比較することはできなかった。しかし、これら Log Pow の低い農薬がマトリックス成分による影響を受けていた可能性については、今後さらなる検討が必要と考える。例えば、本報では、ハード面、すなわちカラムの回転速度・時間、運転時の温度、流速については検討していない。Duら<sup>13)</sup>は、流速が遅いほど固定相への保持は強くなると報告しており、これらの項目について検討すれば農薬の回収率をさらに向上できる可能性がある。

#### 4. まとめ

HSCCC を用いた前処理法を用いて、農薬の一斉分析法について検討した。結果、HSCCC-GC/MS 法において 16 種類、HSCCC-LC/MS/MS 法において 28 種類の農薬について良好な添加回収率を得ることができた。このことから、農薬成分は限定されるが HSCCC 装置が環境水中の農薬一斉分析法に適用できることが判明した。また、HSCCC-LC/MS/MS 法で LMS と HMS

の 2 種類の試料を用いて Matrix の影響を比較したところ、添加回収率に大きな差は見られなかった。本調査では、Log Pow の低い農薬は全く回収できなかったため、今後は流速等の項目についてさらに検討を重ね、農薬の回収率向上に努めたい。

#### 謝 辞

本研究において、クツワ産業株式会社様より高速向流クロマトグラフ装置 Easy-PREPccc H 型を貸与いただきました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Y. Ito : *J. Chromatogr. A*, **1065**, 145-168 (2005)
- 2) 北爪英一 : ぶんせき, **6**, 287-293 (2008)
- 3) 岡田靖則 : *Chromatography*, **31** (1), 45-50 (2010)
- 4) K. Shinomiya, Y. Kabasawa, K. Ynagidaira, et al : *J. Chromatogr. A*, **1005**, 103-112 (2003)
- 5) 石井一行, 田中由香, 秦恭子, 他 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53** (9), 953-958 (2004)
- 6) A. Yanagida, A. Shji, Y. Shibusawa, et al : *J. Chromatogr. A*, **1112**, 195-201 (2006)
- 7) 井之上浩一, 木村友美, 小島弘之, 他 : 日本食品化学学会誌, **18** (2), 71-76 (2011)
- 8) 岡田靖則, 岡田吉弘 : (公社) 日本食品衛生学会 第 114 回学術講演会公演要旨, (2018)
- 9) 環境省環境保健部環境保全課 : 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 27 年度版)
- 10) 原田健一 : *Pharmaceutical Society of Japan*, **25** (6), 551-556 (1989)
- 11) 四ノ宮美保 : 環境化学, **26** (4), 191-201 (2016)
- 12) Bonfiglio R, King RC, Olah TV, et al : *Rapid Commun. Mass Spectrin.*, **13**, 1175-1185 (1999)
- 13) Qizhen Du, Caijuan Wu, Guojun Qian, et al : *J. Chromatogr. A*, **835**, 231-235 (1999)