

## 水質、底質及び魚類中のチオファネートメチルの 分析法について

### Analytical Method of Thiophanatemethyl in Water, Sediment and Fish

担当者 西野茂幸 小田達也

#### 1. はじめに

本報告は、平成3年度に環境庁より化学物質環境汚染実態調査の一環として、化学物質分析法開発調査の委託を受け、水質、底質及び魚類中のチオファネートメチルの分析法を開発したものである。

#### 2. 分析法

水質試料は、ヘキサン洗浄後、ジクロロメタン抽出を行い、MBC(メチル2-ベンゾイミダゾールカーバメイト)に変換して、再度ジクロロメタンで抽出し、ジアゾメタンでメチル化した後、GC/MS(SIM)で定量する。

底質及び生物試料は、メタノールで抽出し、ヘキサン洗浄を行い、ジクロロメタンに転溶した後、水質試料と同様に処理する。

#### 試験法

##### 【試料の採取及び保存】

環境庁「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従い、前処理操作は試料採取後、速やかに行う。

##### 【試料の前処理】

〔水質試料〕 試料1Lを2Lの分液ロートにとり、ヘキサン100mlで3分間振とう洗浄した後、1N-塩酸10ml、ジクロロメタン100mlを加え、5分間振とう抽出する。静置後、ジクロロメタン層を分取し、さらにジクロロメタン100mlを加えて同様の操作を行う(注1)。ジクロロメタン層を合わせて、液層分離ろ紙で脱水し(注2)、300mlの平底フラスコに受け、ロータリーエバポレーターを用い40℃以下で乾固直前まで濃縮する(注3)。平底フラスコに沸石を数個入れ、50%酢酸10ml、1N-硝酸銀溶液1mlを加え、蛇管形冷却管にセットし、沸騰水浴中で30分間加熱還流を行った

後、冷却管の頂頭より1N-塩酸5mlで2回管壁を洗浄する(注4)。放冷後、水溶液を100mlの分液ロートに移し、ジクロロメタン20mlを加え、3分間、2回洗浄を行った後、100mlのビーカーに移し、pHメータを使用し、5N-水酸化ナトリウム溶液でpHを6~7に調整する(注5)。次に、水溶液を200mlの分液ロートに移して、ジクロロメタン50mlを加え、5分間、2回振とう抽出を行い、ジクロロメタン層を合わせて、無水硫酸ナトリウムを少量のせた液層分離ろ紙で脱水し(注2)、200mlの平底フラスコに受け、前処理液とする。

〔底質・生物試料〕 試料20gを100mlの共栓付き遠沈管に取り、メタノール50mlを加え、15分間振とう抽出した後(注6)、3000rpmで15分間遠心分離を行い、抽出液を500mlの分液ロートに移す。再度試料にメタノール50mlを加え、同様の操作を行い、抽出液を合わせる。これにヘキサン50mlを加え、3分間、2回振とう洗浄する。静置後、水層を別の500mlの分液ロートに移し、1N-塩酸5ml、10%食塩水200ml及びジクロロメタン50mlを加え、5分間、2回振とう抽出を行い、ジクロロメタンに転溶する。ジクロロメタン層を合わせ、液層分離ろ紙で脱水した後は、水質試料と同様に、濃縮、加熱還流、溶媒洗浄等を行い、前処理液とする。

##### 【試料液の調製】

各前処理液をロータリーエバポレーターで約3ml程度まで濃縮した後、5mlの濃縮受器に移し、フラスコ内をジクロロメタン約2mlで2回洗い、さきの濃縮受器に合わせ。窒素ガスを吹き付けて乾固する。次に、メタノール0.5ml、ジアゾメタン/エーテル溶液(注7)0.5mlを加え、密栓をして室温で1時間反応を行う。反応後、酢酸30 $\mu$ l及びアントラセン-d<sub>10</sub>(1 $\mu$ g/

ml, ヘキサン溶液) 0.2 ml を加え, よく振りまぜて, 測定試料液とする。

#### 【空試料液の調製】

試料と同じ量の水を用い, 【試料の前処理】及び【試料液の調製】と同様に操作を行い, 得られたものを空試料液とする。

#### 【標準液の調製】

標準品 10 mg を精秤して, メタノールで正確に 100 ml とし, 100 µg/ml の標準原液とする。これをメタノールで順次希釈し, 0.3~2.0 µg/ml の標準溶液を作成する。

#### 【測定】

(GC/MS の条件) (注 11)

カラム: DB-WAX 0.32 mm×30 mm 膜厚 0.25 µm (J&W 社製)

カラム温度: 80°C (1 分間) → 250°C (7 分間) 20°C/min 昇温

注入口温度: 210°C

注入方法: スプリットレス(スプリットレス時間 1 分)

キャリアーガス: He 線速度 21 cm·sec<sup>-1</sup> at 80°C (ヘッド圧 40 kPa)

イオン化法: EI

インターフェース温度: 250°C

イオン源温度: 200°C イオン化電圧: 70 V

設定質量数: m/z 146, 205

m/z 188 (内部標準物質: アントラセン-d<sub>10</sub>)

#### 【検量線】

チオファネートメチルの標準溶液 0.3~2.0 µg/ml を段階的に各々 1.0 ml を 200 ml の平底フラスコにとり, ロータリーエバポレーターで濃縮, 乾固後(注 3), 試料と同様に 50%酢酸 10 ml, 1 N-硝酸銀溶液 1 ml を加え, 加熱還流以下の操作及び【試料液の調製】の操作を行い(注 8), 各々 2 µl を GC/MS に注入し, 標準物質と内部標準物質のピーク面積比から検量線を作成する。

#### 【定量】

試料液 2 µl を GC/MS に注入し, 得られたピーク面積の比から検量線により定量値を求める。

#### 【計算】

計算値 (µg/ml 又は µg/g) = 検出量 (ng)

$$\times \frac{\text{最終試料量 (ml)}}{\text{GC/MS 注入量 (µl)}} \times \frac{1}{\text{試料量 (ml 又は g)}}$$

(検出限界及び定量限界) 本分析法に基づく検出限界を下記に示す (注 9)。

	試料量	検出限界	定量限界
水質試料	1L	0.23 µg/L	0.77 µg/L
底質試料	20g	7.8 µg/kg	—
生物試料	20g	6.3 µg/kg	—

## 試薬・器具

### 【試薬】

チオファネートメチル標準品: 和光純薬工業製 残留農薬試験用

ヘキサン, メタノール, ジクロロメタン, エーテル: 残留農薬試験用 (注 10)

塩酸, 酢酸, 硝酸銀, 塩化ナトリウム, 水酸化ナトリウム: 試薬特級 (注 10)

無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験用

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアジン: Aldrich 社製 (注 3)

アントラセン-d<sub>10</sub>: Aldrich 社製

### 【器具】

ウォーターバス: 加熱還流に使用する。

ポリトン型ホモジナイザー: 生物試料の均質化に使用する。

ロータリーエバポレーター: 溶媒の濃縮に使用する。

pH メーター

ジアゾメタン発生器: 環境庁環境保健部保健調査室 (化学物質分析法開発調査報告書総覧, 上巻, P. 870 参照)

液層分離ろ紙: 1 PS 15 cm (Whatman 社製) を使用する。そのまま使用すると, クロマトに多数妨害ピークが出るので, ジクロロメタンで超音波洗浄器を使用し 30 分間, 2 回洗浄し, 風乾して使用する。

ガラス器具: 分液ロート (100, 200, 500 ml), 濃縮受器 (5 ml), ピーカー (100 ml), 平底フラスコ (200, 300 ml), 共栓付け遠沈管 (100 ml), 蛇管形冷却管 (外套長 300 mm)。

### ~~~~~ 注 解 ~~~~~

(1) この抽出時に, チオファネートメチルはジクロロメタン層に, MBC として存在するものは酸性水溶

液に分離する。

- (2) ジクロロメタン層の脱水に無水硫酸ナトリウムを使用すると、チオファネートメチルではかなり無水硫酸ナトリウムへの吸着が認められ、MBCでも多量に使用すると吸着が認められたので、チオファネートメチルは、液層分離ろ紙のみ、MBCは葉さじ1杯程度の無水硫酸ナトリウムをのせた液層分離ろ紙で脱水する。
- (3) チオファネートメチルは、ジクロロメタン溶液で完全に乾固すると、分解することがあるので、約1ml程度まで濃縮した後、窒素ガスをおだやかに吹き付けてジクロロメタンを揮散させる。メタノール溶液では乾固しても分解しないので、標準溶液は乾固してもよい。
- (4) この加熱還流でチオファネートメチルがMBCに変換する。また、塩酸洗浄で淡い紫色の塩化銀の沈殿ができる。
- (5) MBCは酸性の水に溶けやすく、また酸性では有機溶媒で抽出されないので、pHを中性付近に調整して抽出する。
- (6) 生物試料は、ポリトロン型ホモジナイザーで均質化してから振とうする。
- (7) ジアゾメタン発生器を使用し、内管に500mgのN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、外管にエーテル約5mlを入れ、セプタムを付けたねじ蓋をして、氷冷する。マイクロシリンジでセプタムから10%水酸化ナトリウム溶液3mlを少しずつ注入し、時々ふりませジアゾメタンガスをエーテルが十分黄色になるまで吸収させる。N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンは発ガン性があり、ジアゾメタンガスは有毒なので、手袋をし、ドラフト内で換気を十分にしておく。
- (8) チオファネートメチルからMBCへの閉環反応において、その反応率は100%にはならないので、チオファネートメチル標準品もMBCへの閉環反応から試料と同様の操作を行い検量線を作成する。
- (9) 検出限界及び定量限界は「検出限界等の定め方について」(平成3年5月29日)により算出した。なお、生物試料の検出限界は底質における求め方に準じた。
- (10) 1N-塩酸、5N-水酸化ナトリウム溶液、10%食塩水は、ジクロロメタンで洗浄し、50%酢酸はジク

ロメタン：ヘキサン(1:4)で洗浄し、エーテルは蒸留して使用した。

- (11) GCはHewlett-Packard社製5890, MSは日本電子社製Automass50を使用した。

	水 質		
試料濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	0.3	0.6	0.9
応答値 ( $\bar{X}$ )	0.1799	0.3966	0.5877
標準偏差 ( $\sigma R$ )	0.0221	0.0240	0.0473
検出力 (Dn)	0.1152	0.0577	0.0586
検出限界 ( $\bar{D} \times 3$ )		0.2313	
定量限界 ( $\bar{D} \times 10$ )		0.7716	
不偏分散 (Fd)		4.580	

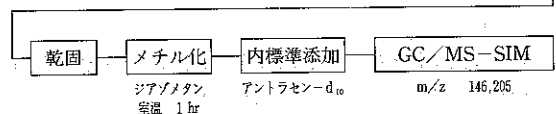
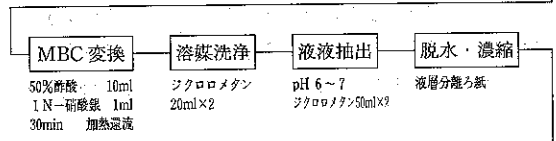
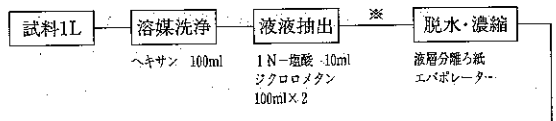
	底 質	生 物
検出限界推定値 ( $\mu\text{g/kg}$ )	6.0	6.0
試料濃度 ( $\mu\text{g/kg}$ )	30	30
分析値 ( $\bar{X}$ )	21.0	20.4
標準偏差 (Sc)	2.5	2.0
検出限界 (DL)	7.85	6.28
95%信頼区間	5.02-17.27	4.01-13.81

### 3. 解 説

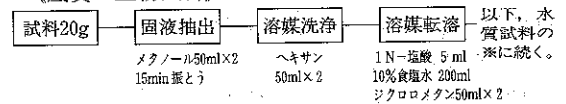
#### 【分析法】

(フローチャート)

#### 《水質試料》



#### 《底質・生物試料》



〔分析法の検討〕

3-1. 検量線

検量線の例を図1に示す。

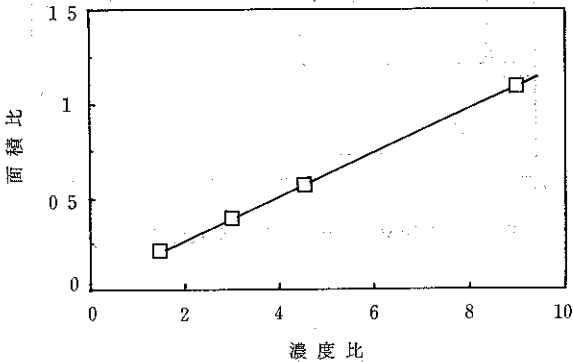


図-1 MBC-Meの検量線

3-2. 低濃度添加回収実験

水質試料1L, 底質・生物試料20gに標準品を添加し, 本分析法に従って行った添加回収実験の結果を示す。

試料	添加量(μg)	試料量	回数	回収率(%)	C.V.(%)
精製水	0.3	1L	4	77.7	12.2
精製水	0.6	1L	4	83.7	6.5
精製水	0.9	1L	4	85.7	8.0
河川水	0.6	1L	4	83.3	6.6
海水	0.6	1L	4	82.1	7.3
底質	0.6	20g	7	70.0	11.7
生物	0.6	20g	7	68.0	9.8

3-3. 分解性スクリーニング試験

常法に従い, HPLC法により測定した結果, チオファネートメチルはアルカリ性ではかなり分解が認められた。

pH	初期濃度(μg/ml)	1時間後(%)	5日後	
			暗所(%)	明所(%)
5	2.5	100.5	89.6	—
7	2.5	98.7	94.2	90.9
9	2.5	96.9	29.6	—

3-4. 分析法の検討

チオファネートメチルは, そのままではGCにより

分析できないので, MBCに変換し, MBCをさらにジアゾメタンでモノメチル化して, GC/MSで測定した。

チオファネートメチルからMBCへの閉環反応時の触媒として, 酢酸銅と硝酸銅についてその反応率を検討した結果を表-1に示す。反応率は酢酸銅より硝酸銀の方が高く, 再現性のある結果から得られたので, 閉環反応時の触媒は硝酸銀を使用した。

キャピラリーカラムは, 無極性, 微極性のカラムではMBC-Meのテーリングがみられたが, 強極性のカラムでは, 良い結果が得られたので, DB-MAXを使用した。

表-1 2種触媒における閉環反応率

触媒	反応率(n=10)	C.V.(変動係数)
酢酸銅 0.2g	75.8%	3.3%
1N-硝酸銀溶液 1ml	90.9%	3.6%

3-5. クリーンアップの検討

チオファネートメチルは, 中性付近の水からはヘキサンでは抽出されず。MBCは酸性水溶液からジクロロメタンで抽出されないため, これらの物性よりヘキサン洗浄とジクロロメタン洗浄による溶媒洗浄により, クリーンアップを行った。

3-6. マススペクトル

MBC-Meのマススペクトルを図2に示す。ベースピークのm/z 146をモニター質量数とし, 分子イオン

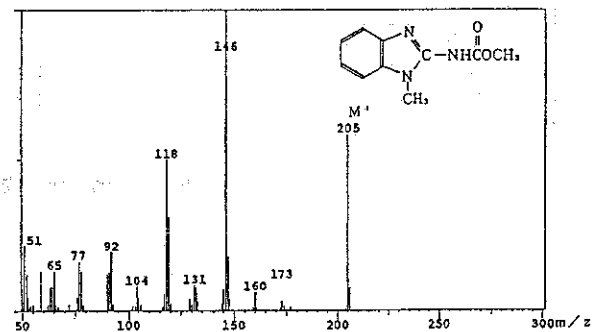


図-2 MBC-Meのマススペクトル

ピークの m/z 205 を確認質量数とした。

### 3-7. クロマトグラム

図3に標準品のSIMクロマトグラム, 図4, 図5に環境試料のクロマトグラムを示す。

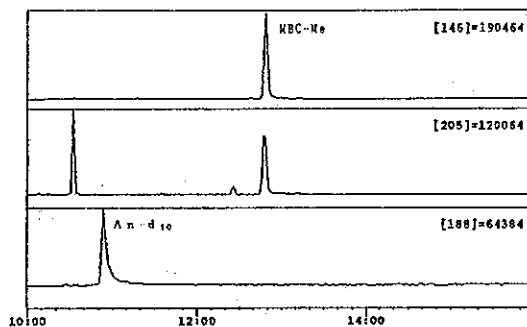


図-3 標準品のMBC-Meクロマトグラム

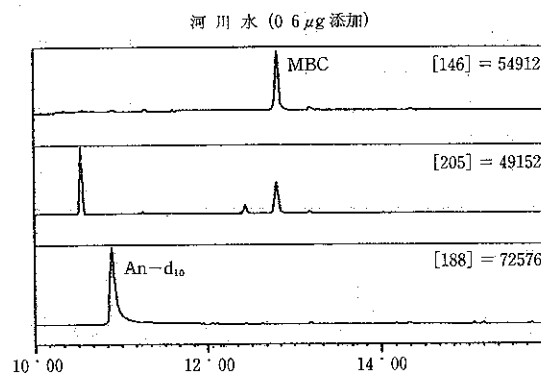
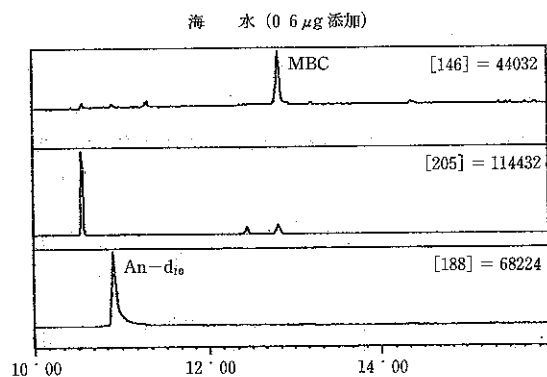
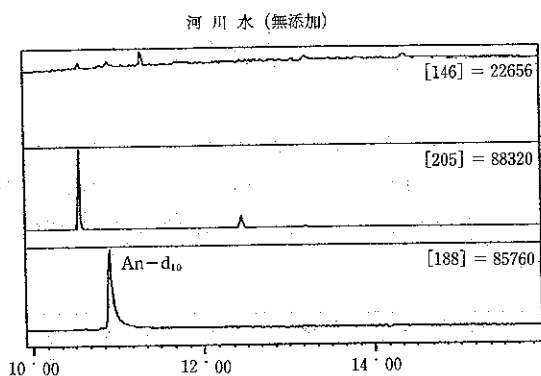
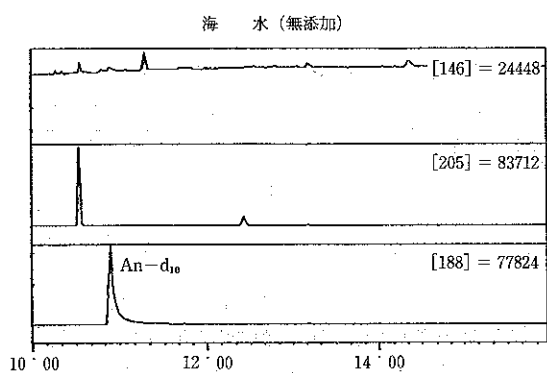


図-4 河川水, 海水のクロマトグラム

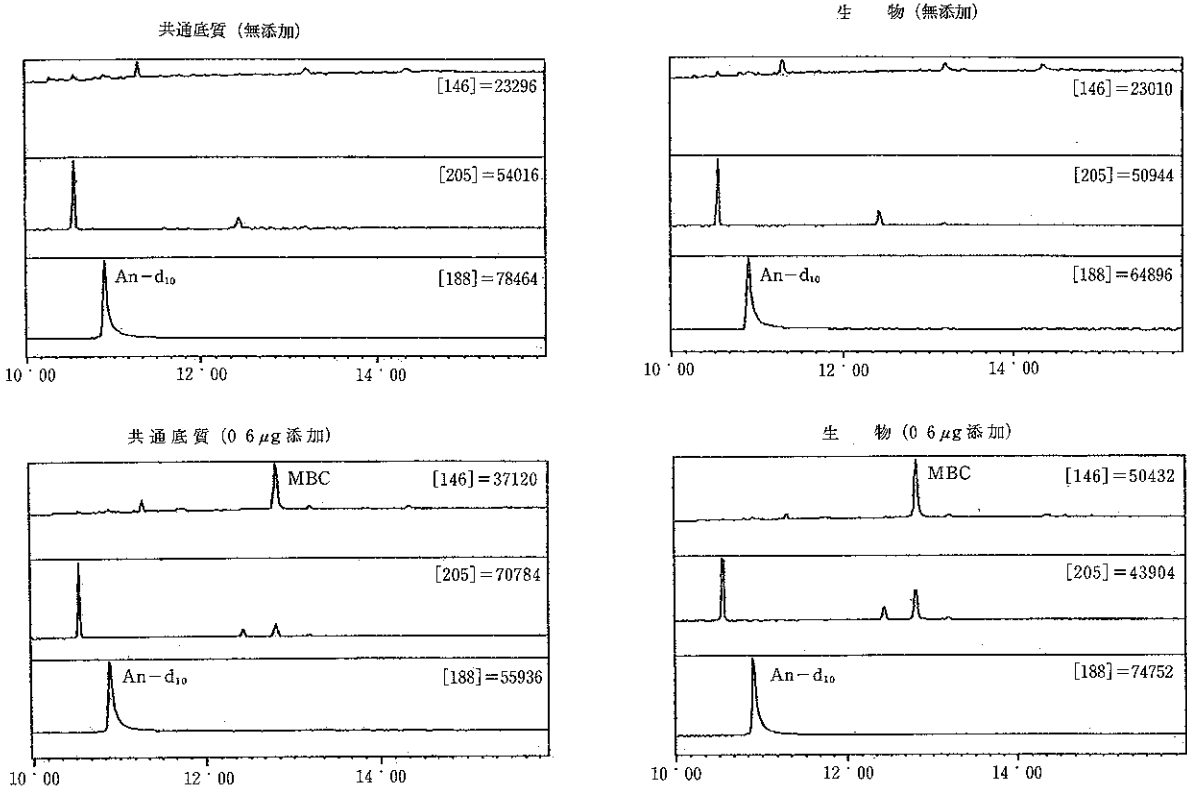


図-5 共通底質, 生物のクロマトグラム

**【評価】**

本分析法により, 環境中に ppb オーダーで存在するチオファネートメチルの定量を行うことができる。

**参考文献**

- (1) 後藤真康, 加藤誠哉・増補残留農薬分析法, P. 148-150, ソフトサイエンス社 (1987)
- (2) 環境庁保健調査室・化学物質分析法開発調査報告書総覧 (上巻), P. 498-514 (1991)
- (3) 厚生省生活衛生局食品化学課編・残留農薬分析

法, P.138-144, 社団法人 日本食衛生協会 (1985)

- (4) 小野成男, 他・分析化学, 24, P.750-754(1975)
- (5) 小野成男, 遠山典宏・日本農薬学会誌, 7, P. 363-371 (1982)
- (6) 小野成男・日本農薬学会誌, 7, P. 481-485 (1982)  
(公害検査課水質検査係)