

水質、底質及び魚類中の アセフェートの分析法について

Analytical Method of Acephate 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4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、底質及び魚類中のアセフェートの分析法を開発したものである。

2. 分析法

水質試料は、活性炭カラムに通水、吸着させた後、アセトンで溶出する。溶出液を濃縮、乾固して、無水硫酸ナトリウムを加え、ジクロロメタンで抽出を行い、濃縮し、アセトンに転溶した後、GC-FPDで定量する。

底質及び生物試料は、水で抽出した後、抽出液を活性炭カラムに通水、吸着させ、アセトンで溶出する。溶出液をn-ヘキサンで洗浄した後、以下水質試料と同様に操作する。

試験法

【試料の前処理】

〔水質試料〕試料1lを活性炭カラム(注1)に毎分15ml以下の流速で通水し(注2)、目的物質を吸着させた後、精製水50mlを流してカラムを洗浄する。次に、アセトン25mlで溶出させ(注3)、溶出液を100~200mlの平底フラスコに受ける。溶出液を70°Cのウォーターバス中でロータリーエバポレーターにより濃縮し、乾固する。乾固した残さに無水硫酸ナトリウム10gを入れ、ジクロロメタン10mlで3回よく混和し、抽出する。抽出液を合わせて、減圧KD濃縮器で0.5ml程度まで濃縮する。アセトン10mlを加え、さらに1~2mlまで濃縮して、アセトンに転溶し、試料前処理液とする。

〔底質・生物試料〕試料20gを100mlの共栓付遠沈管にとり、精製水50mlを加えて、底質では15分間振とう抽出を行い、生物では5分間ホモジナイズ抽出を

行った後、3000rpmで15分間遠心分離を行い、抽出液を分取する。残さに再度精製水50mlを加え、同様の操作を行い、抽出液を合わせる。抽出液を活性炭カラムに通水(注2)、吸着させた後、精製水50mlでカラムを洗浄する。次に、アセトン25mlで溶出させ(注3)、溶出液を100mlの分液ロートに受ける。溶出液にn-ヘキサン20mlを加え、3分間激しく振とうして溶媒洗浄を行う。静置後、n-ヘキサンは捨て、水溶液を分取し、濃縮、乾固後、水質試料と同様の操作を行い、試料前処理液とする。

【試料液の調製】

各試料前処理液に酢酸0.05mlを加え(注4)、窒素ガスを吹きつけて正確に1mlとし、測定用試料液とする。

【空試料液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【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100mgを正確に秤取り、アセトンで正確に100mlとして、これを標準原液(1000µg/ml)とする。標準原液をアセトンで適宜希釈し、酢酸の濃度が5%となるように添加して、0.2~2.0µg/mlの標準液を作成する。

【測定】

〔GC-FPD条件〕(注5)

使用機種・Hewlett-Packard社製5890シリーズII
カラム・DB-17 0.25mm×15m 膜厚0.25µm
(J&W社製)

カラム温度・80°C(1min)---18°C/min---250°C(3min)

注入方法・スプリットレス

注入口温度・250℃ 検出器温度・280℃
 キャリアーガス・He 線速度 4l cm/sec at 80℃
 (ヘッド圧 60 kPa)
 Air・75 ml/min
 H₂ガス・65 ml/min
 メイクアップガス・N₂ 40 ml/min
 検出器・FPD (Pモード)

〔検量線〕

0.2~2.0 μg/ml の標準液 1 μl をとり、さらにポリエチレングリコール 100 ppm 溶液 (アセトン溶液) 1 μl をとり (注6) GC-FPD に注入し、得られたピーク高さから検量線を作成する。

〔定量〕

試料液 2 μl を GC-FPD に注入し、得られたピーク高さから検量線から定量値を求める。

〔計算〕

計算値 (μg/ml 又は μg/g) =

$$\text{検出量 (ng)} \times \frac{\text{最終液量 (ml)}}{\text{GC 注入量 (μl)}} \times \frac{1}{\text{試料量 (ml 又は g)}}$$

〔検出限界及び定量限界〕

本分析法の検出限界及び定量限界を下記に示す。(注7)

試料	試料量	検出限界	定量限界
水質	1 ℓ	0.16 μg/ℓ	0.53 μg/ℓ
底質	20 g	4.8 μg/kg wet	—
生物	20 g	4.8 μg/kg	—

試薬・器具

【試薬】

アセフェート標準品・和光純薬工業製 残留農薬試験用

アセトン、ジクロロメタン、ヘキサン、無水硫酸ナトリウム・残留農薬試験用

酢酸・試薬特級

活性炭・和光純薬工業製 活性炭素 クロマトグラフ用 (500 g 商品コード番号: 031-02135)

ポリエチレングリコール 200・試薬和光 I 級

精製水・Milli-QSP 超純水装置 (MILLIPORE 社製) で精製した水を使用した。

【器具】

ポリロン型ホモジナイザー・生物試料の抽出に使用する。

振とう器・溶媒洗浄に使用する。

ロータリーエバポレーター、KD 濃縮器・溶媒の濃縮に使用する。

活性炭カラム・精製水中に保存した活性炭を内径 1 cm×長さ 30 cm のクロマト管に 7 cm の高さに充填して使用する。

ガラス器具・クロマト管 (1 cm×30 cm)、平底フラスコ (100~200 ml)、分液ロート (100 ml)、共栓付遠沈管 (100 ml)

~~~~~ 注 解 ~~~~~

- (1) 活性炭はアセトンで洗浄して使用する。洗浄方法は、ビーカーに活性炭を入れアセトン (活性炭量の約 5 倍量) を加え、数回攪拌し、一夜放置後アセトンを捨て、ろ紙上でアセトンが完全に揮散するまで風乾し、精製水で十分洗浄して使用する。
- (2) 固形物を除去するため、活性炭カラムの上部に脱脂綿を詰めて通水し、脱脂綿は精製水洗浄時に除去する。
- (3) 最初にアセトン 5 ml を入れ、クロマト管に栓をして数回反転させ気泡を除去してから、残りのアセトン 20 ml を流す。
- (4) GC-FPD 測定の際、アセトン溶液では、アセフェートが一部注入口に吸着して残るため酢酸を添加して吸着を防止する。
- (5) インジェクションのライナーは、シラン処理したものを使用する。
- (6) 底質や生物試料では、マトリックス成分の影響により、標準品に比べピークがシャープに立ち上がり過大な定量値を与える場合があるので、標準品にもマトリックス成分としてポリエチレングリコールを添加してピークの立ち上がりを良くし、定量値の誤差を小さくする。
- (7) 検出限界及び定量限界は「検出限界の定め方について」(平成 4 年 5 月 27 日) により、下記のとおり算出した。

|                             | 水 質    |        |        |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| 試料濃度 ( $\mu\text{g}/\ell$ ) | 0.25   | 0.5    | 1.0    |
| 応答値 (x)                     | 550    | 1215   | 2653   |
| 標準偏差 ( $\sigma_R$ )         | 38.6   | 66.4   | 148.9  |
| 検出力 ( $D_n$ )               | 0.0278 | 0.0434 | 0.0892 |
| 検出限界 ( $D \times 3$ )       |        | 0.16   |        |
| 定量限界 ( $D \times 10$ )      |        | 0.53   |        |
| 普遍分散 (Fd)                   |        | 14.8   |        |

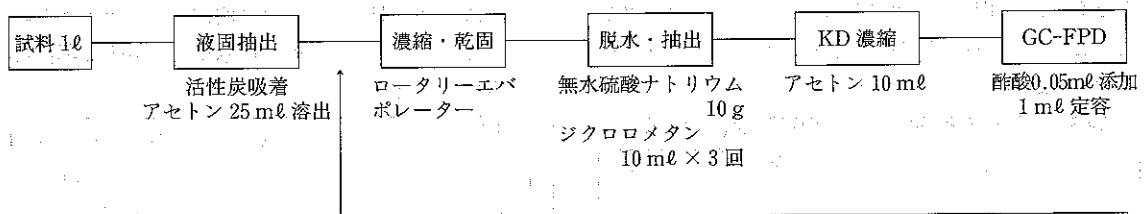
|                                     | 底 質      | 生 物      |
|-------------------------------------|----------|----------|
| 検出限界推定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 5.0      | 5.0      |
| 試料濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )    | 25       | 25       |
| 分析値 (x)                             | 21.0     | 20.5     |
| 標準偏差 ( $S_c$ )                      | 1.53     | 1.54     |
| 検出限界 (DL)                           | 4.80     | 4.84     |
| 95%信頼区間                             | 3.0-10.5 | 3.1-10.6 |

### 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 抽出法の検討

アセフェートは、水溶解度が非常に高く、通常の液液抽出法では、水から有機溶媒にほとんど抽出されない。既存の分析法では、水質試料で水をそのまま濃縮する方法、塩析剤を用いた液液抽出法があるが、濃縮法では海水で濃縮の際、塩の析出がひどく突沸する、液液抽出法では多量の塩析剤を使用しなければならないことから、液固抽出法について検討した。

ODS カラム、XAD 樹脂ではアセフェートは全く吸

表 1 活性炭の充填高さ と 吸着率

| 活性炭充填高さ | 吸着率 (%) |
|---------|---------|
| 1 cm    | 62.6    |
| 3 cm    | 79.5    |
| 5 cm    | 98.1    |
| 7 cm    | 98.7    |
| 9 cm    | 98.5    |

着しなかったが、活性炭には完全に吸着し、アセトンによる溶出も良好であったので、活性炭を用いた液固抽出法を採用した。

内径 1 cm、長さ 30 cm のクロマト管を使用して、アセフェートの活性炭への吸着率とアセトンによる回収率を検討した。活性炭の充填高さ と 吸着率の関係を表 1 に、活性炭カラムからのアセトン溶出量 と 回収率の関係を表 2 に示す。この結果より、活性炭の充填高さは 7 cm、アセトンの溶出量は 25 ml とした。

表 2 活性炭カラムからの回収率

| アセトン溶出量 | 回収率 (%) |
|---------|---------|
| 10 ml   | 74.6    |
| 15 ml   | 83.3    |
| 20 ml   | 97.9    |
| 25 ml   | 97.0    |
| 30 ml   | 97.3    |

### 3-2 GC/MS と GC-FPD の再現性の検討

カラム, GC 条件を全く同様にして, GC/MS と GC-FPD にアセフェートの標準品 0.5 ppm を注入した結果を表 3 に示す。

GC/MS では酢酸を添加しないとピークはほとんど出なく, 酢酸を添加しても変動係数は 16.5% とバラツキが大きく, 良好な再現性は得られなかった。

GC-FPD では酢酸を添加しないと変動係数は 11.0% で, 酢酸を添加すると変動係数は 5.2% と再現性が良くなり, ピーク高も約 1.3 倍高くなった。

検出下限の点でも, GC-FPD のほうが GC-MS に比べ 10 倍近く感度が良いため, 定量は酢酸を添加して GC-FPD により行った。

GC/MS では酢酸を添加しないとピークはほとんど出なく, GC-FPD では酢酸を添加しなくてもピークが出ることから, GC-MS ではイオン源部でアセフェートの吸着がおきているものと考えられる。

表 3 GC/MS と GC-FPD の再現性 (n = 5)

| 検 出 器            | 変動係数 (%) | ピーク高さ |
|------------------|----------|-------|
| GC/MS (5% 酢酸添加)  | 16.5     | —     |
| GC-FPD (酢酸無添加)   | 11.0     | 1.00  |
| GC-FPD (5% 酢酸添加) | 5.2      | 1.28  |

### 3-3 誘導体の検討

アセフェートの NH 基の部分について誘導体化が可能なら, 吸着の問題が解消されるのではないかと考え, ジアゾメタン, トリメチルシリルジアゾメタンによるメチル化, 無水トリフルオル酢酸によるアセチル化について検討を行ったが, メチル化ではピークが 2 本に分かれ感度がなく, アセチル化では反応後の水洗浄で反応物質が水層に移行してピークは全く出なかった。

### 3-4 検量線

検量線の例を図 1 に示す。

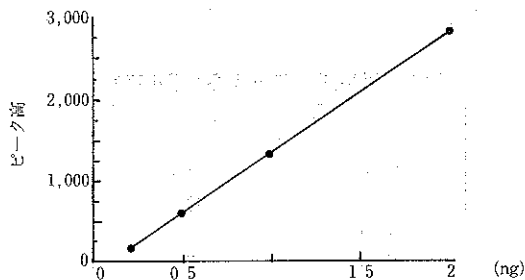


図 1 アセフェートの検量線

### 3-5 低濃度添加回収試験

水質試料, 底質及び生物試料に標準品を添加し, 本分析法により行った添加回収試験の結果を下記に示す。

低濃度添加回収試験

| 試 料 | 添加量 (μg) | 試料量  | 回数 | 回収率 (%) | CV (%) |
|-----|----------|------|----|---------|--------|
| 精製水 | 0.25     | 1ℓ   | 4  | 94.7    | 7.0    |
| 〃   | 0.5      | 1ℓ   | 4  | 95.5    | 5.4    |
| 〃   | 1.0      | 1ℓ   | 4  | 93.2    | 5.8    |
| 河川水 | 0.5      | 1ℓ   | 4  | 92.7    | 7.5    |
| 海水  | 0.5      | 1ℓ   | 4  | 86.5    | 6.7    |
| 底質  | 0.5      | 20 g | 7  | 84.0    | 7.3    |
| 生物  | 0.5      | 20 g | 7  | 82.0    | 7.5    |

### 3-6 分解性スクリーニング結果

常法に従い, HPLC 法により測定した結果は下記のとおりであり, アセフェートは水中では pH に関係なく安定であった。

| pH | 放置時間 | 初期濃度 (μg/ml) | 1時間放置後 (%) | 5日間放置後 (%) |      |
|----|------|--------------|------------|------------|------|
|    |      |              |            | 暗所         | 光照射  |
| 5  |      | 10           | 102.4      | 93.5       | —    |
| 7  |      | 10           | 98.2       | 97.1       | 91.9 |
| 9  |      | 10           | 101.9      | 96.1       | —    |

### 3-7 クロマトグラム

GC-FPD による標準品のクロマトグラムを図 2, 環境試料のクロマトグラムを図 3 に示す。

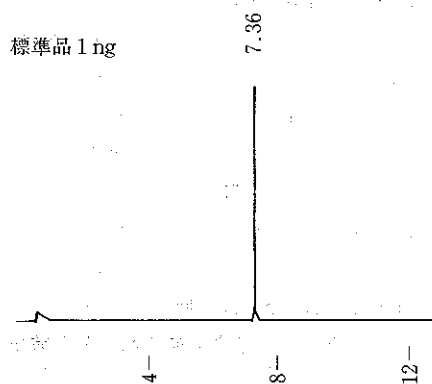
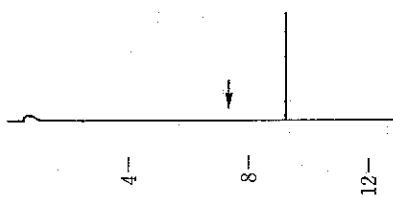
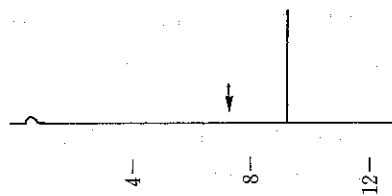


図 2 標準品のクロマトグラム

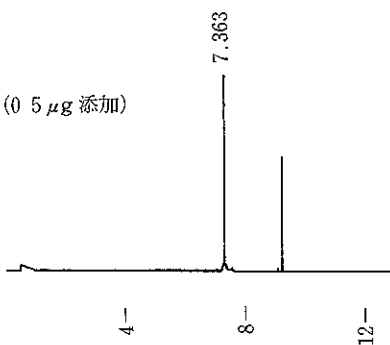
河川水 (無添加)



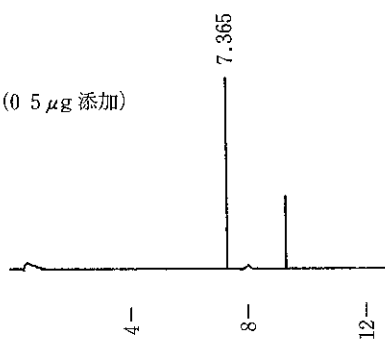
海水 (無添加)



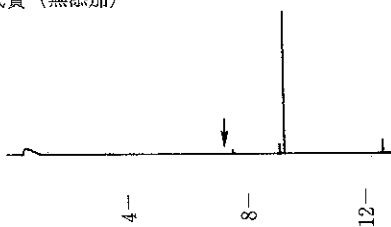
河川水 (0.5  $\mu\text{g}$  添加)



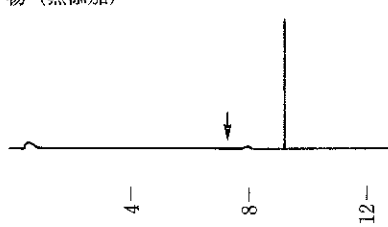
海水 (0.5  $\mu\text{g}$  添加)



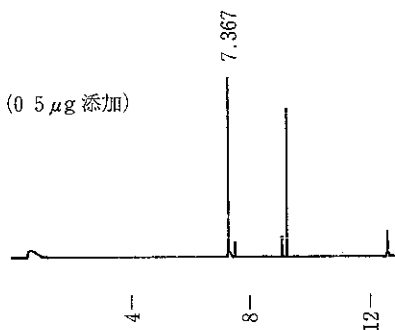
共通底質 (無添加)



生物 (無添加)



共通底質 (0.5  $\mu\text{g}$  添加)



生物 (0.5  $\mu\text{g}$  添加)

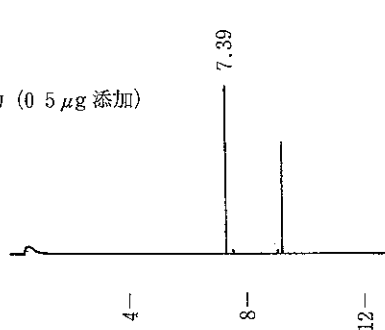


図3 環境試料のクロマトグラム

### 【評価】

本分析法により、環境中に ppb レベルで存在するアセフェートの定量を行うことが可能である。なお、環境試料の分析では、すべて不検出であった。

### 参考文献

- (1) 後藤真康, 加藤誠哉・残留農薬分析法, p. 82-83, ソフトサイエンス社 (1980)
- (2) 厚生省生活衛生局食品化学課編・残留農薬分析法, p. 108-112, 社団法人 日本食品衛生協会 (1985)
- (3) 奥村為男・水中のアセフェートのガスクロマトグラフィ質量分析法による定量, 環境化学, 2, p. 31-35 (1992)
- (4) 倉田泰人, 杉崎三男・水中のアセフェートのガスクロマトグラフィによる定量, 環境化学, 2, p. 533-539 (1992)
- (5) 奥村為男・移動液相ガスクロマトグラフィ・GC/MSによる超微量分析の問題点と対策の一案(環境試料中の農薬分析を例として), 第32回大気汚染学会講演要旨集, p. 161-162  
(公害検査課水質検査係)