

．トリクロピル、ベンタゾン及びベンタゾンのナトリウム塩の分析法

1 対象物質

トリクロピルはフェノキシ酢酸系除草剤であり、主に非農耕地の広葉雑草などの防除に、遊離型、アミン塩、ブトキシエチルエステルの形態で用いられる。遊離型のトリクロピルの水溶解度は 440 mg/L (25)、蒸気圧は 0.17 mPa である。ベンタゾンはダイアジン系の除草剤であり、水田や畑地の一年生雑草の防除に用いられる。水溶解度は 500 mg/mL、蒸気圧 0.46 mPa で酸および塩基性で安定に存在する。

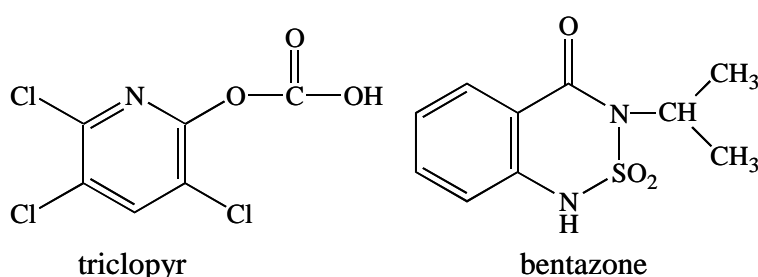


表 1 対象物質

項目番号	物質名	化学名	分子式 (分子量)	CAS NO.
164	トリクロピル triclopyr	[(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)oxy] acetic acid	C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃ (256.4725)	55335-06-3
257	ベンタゾン bentazone	3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin- 4(3H)-one-2,2-dioxide	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S (240.2764)	25057-89-0

2 目標検出下限値及び定量下限値

本法が目標とする検出下限値は表 2 の通りであり、定量下限値はその 3 倍値となる。

表 2 目標とする検出下限値

物質名	水質 (µg/L)	底質 (µg/kg)	生物 (µg/kg)
トリクロピル	0.01	1	3
ベンタゾン	0.01	1	3

3 分析法の概要

水質試料は塩酸で pH 2 に調整し、ジクロロメタンによる振とう抽出を行い、アルカリ分解、ジクロロメタンによる洗浄と再抽出を経て、ジアゾメタンで誘導体化し、GC/MS(SIM)

で定量する。底質と生物試料は、1N 水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1:9) で抽出し、濃縮、アルカリ分解の後、ジクロロメタン洗浄、pH 2 への調整、20%ジクロロメタン/ヘキサン抽出、濃縮、メチル誘導体化を経て、GC/MS で定量する (図 1~3)。

本法は、トリクロピルの遊離型、アミン塩および 2-プトキシエチルエステル型は遊離型として、ベンタゾンとそのナトリウム塩はベンタゾンとして総量を求める。また、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) や 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4,5-T) のフェノキシ酢酸系農薬との一斉分析が可能である。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

ベンタゾン：純度 97% 以上の農薬分析用標準物質または既知濃度に調製した標準溶液

トリクロピル：純度 97% 以上の農薬分析用標準物質または既知濃度に調製した標準溶液

フェナンスレン-d₁₀：フェナンスレンの重水素標識体、純度 98% 以上、または既知濃度に調製した標準溶液

ベンタゾン-d₇：ベンタゾンの重水素標識体、純度 98% 以上、または既知濃度に調製した標準溶液

ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、無水硫酸ナトリウム：残留農薬分析用または同等のものであって、測定を妨害する成分を含まないもの

ジエチルエーテル：残留農薬分析用、用時に蒸留し、測定を妨害する成分を含まないもの

塩化ナトリウム：600 で 4 時間加熱したもの、または同等な品質なもの

N-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン：ジアゾメタン発生試薬 (注 1)

水酸化ナトリウム：試薬特級または同等な品質のもの、1N 水酸化ナトリウム溶液は粒状試薬 40 g を精製水 1 L に溶解したもの

塩酸：精密分析用または同等な品質のもの、塩酸 (1+10) は濃塩酸と精製水を 1:10 で混合したもの

窒素ガス：高純度窒素 1 級 (純度 99.999% 以上)

精製水：蒸留水または超純水

(2) 器具及び装置

硬質ガラス瓶、分液ロート、共栓付試験管、メスシリンダー、メスフラスコなどガラス器具

振とう機

ホモジナイザー：(注2)

超音波抽出装置：超音波洗浄器を用いることができる

ロータリーエバポレータ(恒温槽つき)

ウォーターバス

ジアゾメタン発生装置：密閉性が高い専用器具

シリカゲルカートリッジカラム：容量 3 mL 程度のミニカラムにクロマトグラフィー用シリカゲルを 0.5~1 g 充填したもの

ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5 試料の採取・運搬

水質試料は、予めアセトン、ヘキサン等によく洗浄したもので、容量 1 L 程度の共栓またはねじ栓つき硬質ガラス瓶に満水に入れ、氷冷・遮光して、実験室へ持ち帰る。分析操作は可能な限り速やかに行い、試料容器中の全量を分析に供試する。やむを得ず保管が必要な場合は、1~2日を限度として冷暗所(4)に置く。

底質試料は、エクマンバージ型採泥器等によって表層泥(0~10 cm)を採取し、目視でできる夾雑物を除いて、硬質ガラス瓶、ポリエチレン製袋または箱等に入れ、氷冷・遮光状態で実験室へ持ち帰る。この試料は、孔径 2 mm 目の篩に通した後、20分間の遠心分離(3,000 rpm)で間隙水を除き、均質に混合したものを分析に供する。底質試料の保存は、調製試料を-4で凍結させる。

採捕した生物試料は、ポリエチレン製袋に入れ、氷またはドライアイスで保冷したクーラーボックスに収納して、実験室に持ち帰る。生物試料の分析部位は、原則として筋肉組織(可食部)である。生物試料の保存は-4での凍結による。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「[5.1 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項](#)」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料水 1 L を分液ロートに採り、内標準物質としてペンタゾン-d₇ (5 µg/mL) 0.1 mL を添加し十分に混合して、塩酸 (1+10) で pH 2 に調整、塩化ナトリウム 25 g で塩析し、ジクロロメタン 100 mL を加えて 10 分間振とうした後、十分静置してジクロロメタン層を分取する (注 3)。水層へは再度ジクロロメタン 100 mL を加えて同様の抽出操作を繰り返し、十分静置してジクロロメタン層を先の抽出液に合わせる。ジクロロメタン抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて浴温 25 で留出液が出なくなるまで減圧濃縮した後、メタノール 10 mL、1N 水酸化ナトリウム溶液 10 mL、精製水 10 mL を添加し、70 の水浴中で 15 分間アルカリ分解を行う。分解液を 100 mL 容の分液ロートに移し、液性が塩基性であることをみて、ジクロロメタン 30 mL を加え 5 分間振とう洗浄、十分静置してジクロロメタン層を分液する。続いて、水層は塩酸 (1+5) で pH 2 に調整し、ジクロロメタン 30 mL を加えて 10 分間振とう抽出を行う。十分静置してジクロロメタン層を分取して、別の容器に移す。水層には再度ジクロロメタン 30 mL を加えて同様の抽出を繰り返し、先のジクロロメタン抽出液に合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水する。このジクロロメタン抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて 25 で減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

(イ) 底質試料

均一化した湿泥 10 ~ 25 g を 50 mL の遠沈管に採取し、内標準物質としてペンタゾン-d₇ (5 µg/mL) 0.1 mL を添加、十分に混合する。これに、1N 水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1:9) 20 mL を加え、振とう機で 10 分間振とうし、さらに 10 分間超音波処理を行う。その後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄みのアセトン層を分取する。残渣には 1N 水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1:9) 20 mL を加えて、同様な操作をさらに 2 回繰り返し、アセトン層を合わせる。アセトン抽出液は、浴温 25 のロータリーエバポレータでアセトンの留出がなくなるまで減圧濃縮し、メタノール 5 mL と 1N 水酸化ナトリウム溶液を 10 mL 加えて、70 のウォータバス中で 15 分間アルカリ分解を行う。分解液は 100 mL 分液ロートに移し、液性が塩基性であることを確認して、ジクロロメタン 30 mL を加え、5 分間振とうする。十分に静置した後、ジクロロメタンを捨て、水層は塩酸 (1+5) で pH 2 に調整、

20%ジクロロメタン含有ヘキサン 50 mLを加えて、10 分間振とう抽出を行う。十分に静置して、20%ジクロロメタン含有ヘキサン層を分取し、水層にこの混合溶媒を 50 mL加えて抽出を繰り返す。抽出操作は 3 回行い、合わせた 20%ジクロロメタン含有ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ロータリーエバポレータを用いて 25 ℃で減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

(ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 10~25 gに内標準液としてペンタゾン-d₇ (5 µg/mL) 0.1 mLを添加して混合した後、1N水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1:9) 30 mLを加え、10 分間ホモゲナイザー抽出を行い、さらに 10 分間超音波抽出して、3,000 rpmで 10 分間遠心分離を行い、上澄みのアセトン層を分取する。この抽出操作は 3 回繰り返して、アセトン抽出液を合わせ、濃縮する。その後のアルカリ分解、20%ジクロロメタン含有ヘキサンによる抽出、脱水、濃縮の操作は底質試料と同様である。

(2) 試料液の調製

水質、底質および生物質試料から得られた抽出濃縮物は直ちにメタノール 0.5 mLとジアゾメタン/ジエチルエーテル溶液 1 mLを加えて室温で 1 時間静置、メチル化反応を行う。反応終了後、ドラフト内で窒素ガスを緩やかに吹き付け、乾固直前まで濃縮し、ヘキサン 0.5 mLと内標準物質のフェナンスレン-d₁₀ (0.5 µg/mLヘキサン溶液) 10 µLを加えてよく混合したものを測定用の試料液とする。

なお、精製の必要があれば、誘導体化の後、シリカゲルカートリッジカラムに負荷し、ヘキサン 5 mLで洗浄、次いで 20%エチルエーテル含有ヘキサン 5 mLで被験物質を溶出し、窒素気流下で 0.5 mLまで濃縮して測定用の試料液を得る。

(3) 空試験液の調製

試料量に対応した精製水を用いて、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って得られた試験液を空試験に用いる。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水試料 1,000 mL、底質と生物試料の 20 g に定量下限値の 5 ~ 10 倍になるよう検量

線作成用標準液のアセトン溶液を加え、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って添加回収試験液を得る。

(5) 標準液の調製

トリクロピルとベンタゾンの標準物質はそれぞれ 100 mg 正確に秤取り、100 mL のメスフラスコに移してヘキサンに溶解し、1,000 mg/mL の標準原液とする。既知濃度の標準溶液を標準原液とすることができる。標準原液を等量混合しヘキサンで順次希釈、10 µg/mL の標準溶液を調製する。

サロゲート標準物質のベンタゾン-d₇は 5.0 µg/mLアセトン溶液、シリンジスパイク用内標準物質のフェナンスレン-d₁₀は 1.0 µg/mLヘキサン溶液に調製する。

(6) 測定(注4)

(ア) GC/MS 測定条件

GC/MS 測定条件の一例を参考として示す。これを参考にして適宜設定する。

(a) ガスクロマトグラフ

試料注入部：スプリットレス、オンカラム、昇温気化方式などの非分割方式のもの

キャピラリーカラム：メチルシリコンまたはフェニルメチルシリコン系、内径 0.2 ~ 0.3 mm、長さ 20 ~ 30 m、膜厚 0.2 ~ 0.3 µm

キャリアーガス：純度 99.999%以上の高純度ヘリウム、流速 1 mL/min、線速度 35 cm/sec

カラム恒温槽：50 (2 min) (20 /min) 180 (5 /min) 280 (10 min)。

注入口温度：250

(b) 質量分析計

イオン化法：電子衝撃イオン化(ED)法、イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250

インタフェース部:ダイレクトカップリング(250)

イオン検出法：選択イオンまたは全イオン検出

モニターイオン：フェナンスレン-d₁₀ m/z188

トリクロピル-メチル m/z 210、269、212

ベンタゾン-メチル m/z 212、254、133

ベンタゾン-d₇-メチル m/z 219、261、140

(イ) 検量線

(a) 標準液の測定

混合標準液をヘキサンで希釈し、対象物質（0 および 0.05 ~ 1.0 µg/mL）を目安に 5 段階以上の検量線用標準液を作成し、各濃度の標準溶液 0.5 mL とサロゲート標準溶液（5 µg/mL ベンタゾン-d₇アセトン溶液）0.1 mL を正確に試験管に入れる。これにメタノール 0.5 mL とジアゾメタン/エチルエーテル溶液 1 mL を加え、1 時間室温でメチル化を行う。反応終了後、ドラフト内で窒素を緩く吹き付け、乾固直前まで濃縮する。これにヘキサン 0.5 mL とフェナンスレン-d₁₀ヘキサン溶液（1.0 µg/mL）を 10 µL 加える。

これらの 1 または 2 µL の一定量を GC/MS に注入し、クロマトグラムを得る。

(b) ピーク面積（または高さ）の強度比の確認

得られたクロマトグラムから、定量用と確認用質量のイオン強度比が、対応するマススペクトル上の強度比とほぼ一致することを確認する。

(c) 検量線の作成

ベンタゾンはベンタゾン-d₇、トリクロピルはフェナンスレン-d₁₀とのピーク強度（面積または高さ）比および濃度比から検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

実試料、空試験あるいは添加回収試験から得られた試料液を 0.5 mL 定容とし、フェナンスレン-d₁₀（1.0 µg/mLヘキサン溶液）を 10 µL 添加して、GC/MS 注入用の試料液とする。注入量は検量線作成用の混合標準液と同量であって 1 または 2 µL である。検出されたクロマトグラム上のピークについて、同定確認の後、対応するサロゲート標準物質または測定用内部標準物質のピーク強度（面積または高さ）に対する対象物質のピーク強度の比から、検量線または相対感度係数により定量する。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

測定対象物質、サロゲート標準物質および内標準物質の定量イオンと確認イオンのピークが、検量線に用いた標準物質などの保持時間の±5秒以内に出現し、定量イオンと確認イオンのピーク強度比が検量線作成に用いた標準物質などの強度比の±20%以内で一致していればその物質が存在しているとみなす。

(2) 定量及び計算

検量線から求めた検出量により、次式で濃度を算出する。

濃度 (µg/L、µg/g) = 検出量 (ng) × [最終液量(mL)/注入量(µL)] × [1/試料量(L、g)]

底質試料は水分を補正し、乾燥重量あたりに換算する。

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「[8. 分析精度管理](#)」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) ジアゾメタン発生装置を用いてジアゾメタン-エーテル溶液を調製する。ジアゾメタンは毒性が極めて高いため、この操作は必ずドラフト内で行う。*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンのジアゾメタン発生試薬に代えて、取扱が容易なトリメチルシリルジアゾメタンなどのメチル化剤を使用してもよい。

(注2) 万能ホモジナイザー (ポリトロン)、超高速万能ホモジナイザー (ヒスコトロン)、攪拌分散器 (ウルトラターラックス) またはその同等品

(注3) ジクロロメタンは排水・排気中に混入しないよう、除去装置を取り付けるなどの配慮を要す。

(注4) モニターイオンの設定には干渉の有無に留意する。

(備考1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課 (1998) IX 農薬の分析法 ii フェノキシ酢酸系農薬の分析法 .外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物) , ppIX7-10.

分析法フローチャート

水質試料

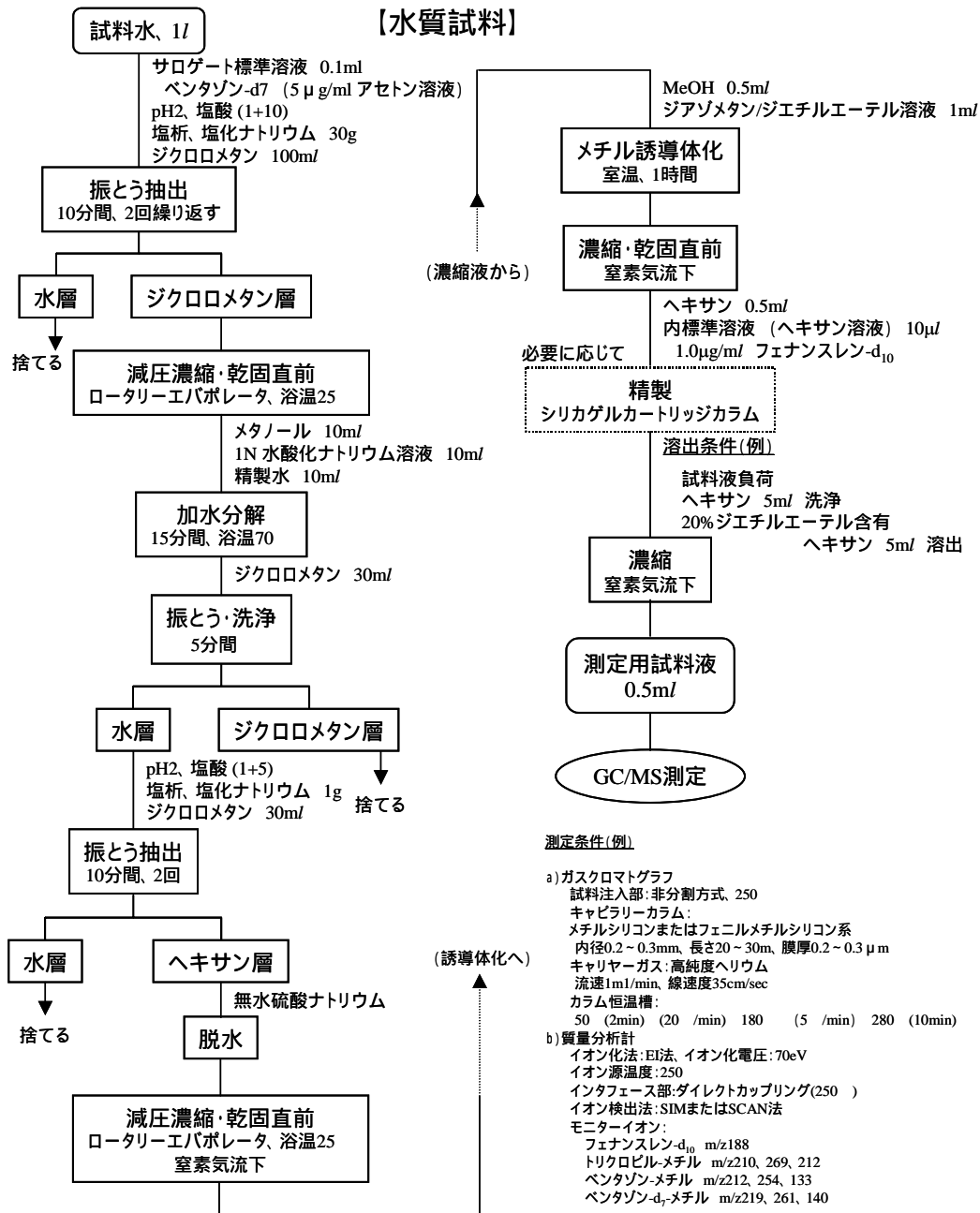


図1 水質試料におけるトリクロピルおよびペンタゾン分析の操作手順

底質試料

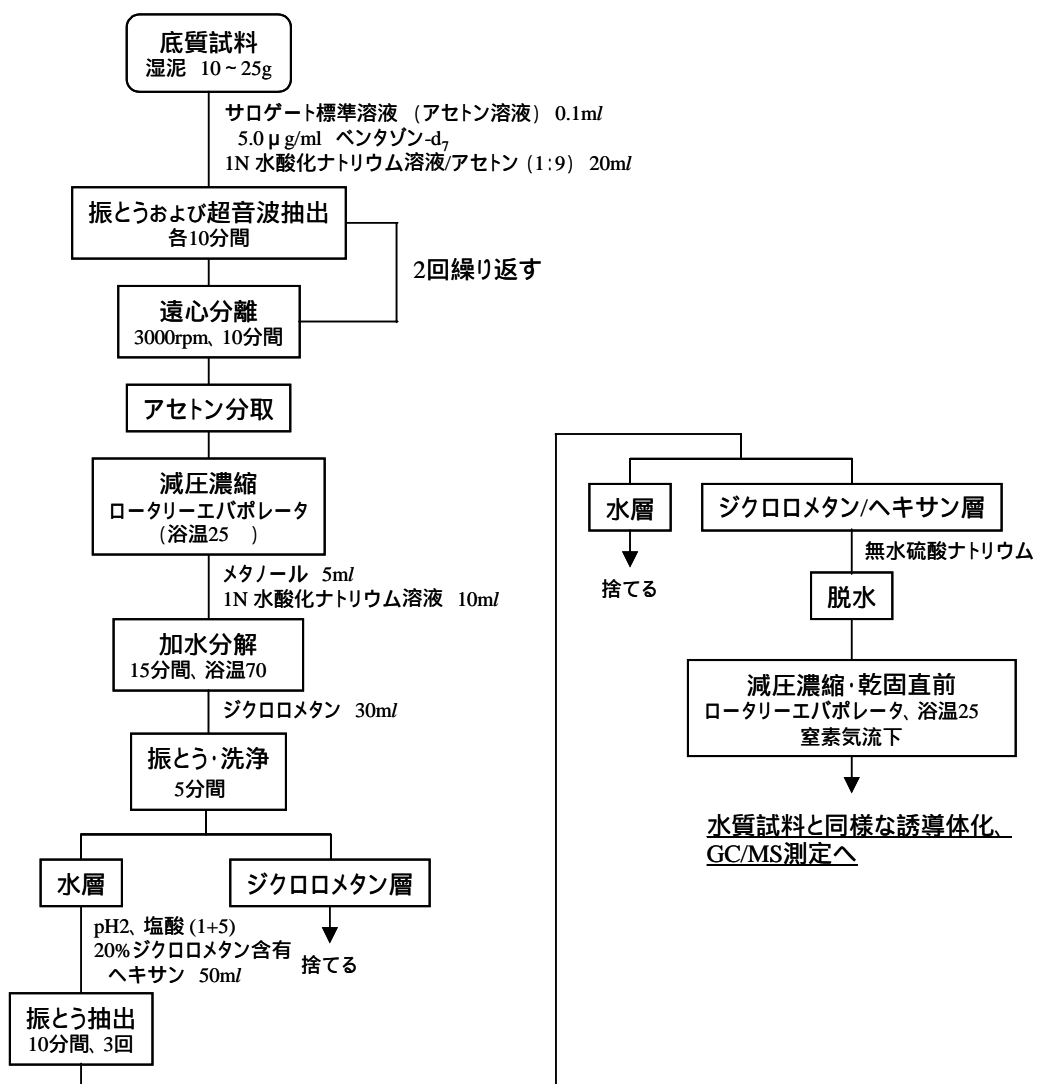


図2 底質試料におけるトリクロピルおよびペンタゾン分析の操作手順

生物試料

【生物試料】

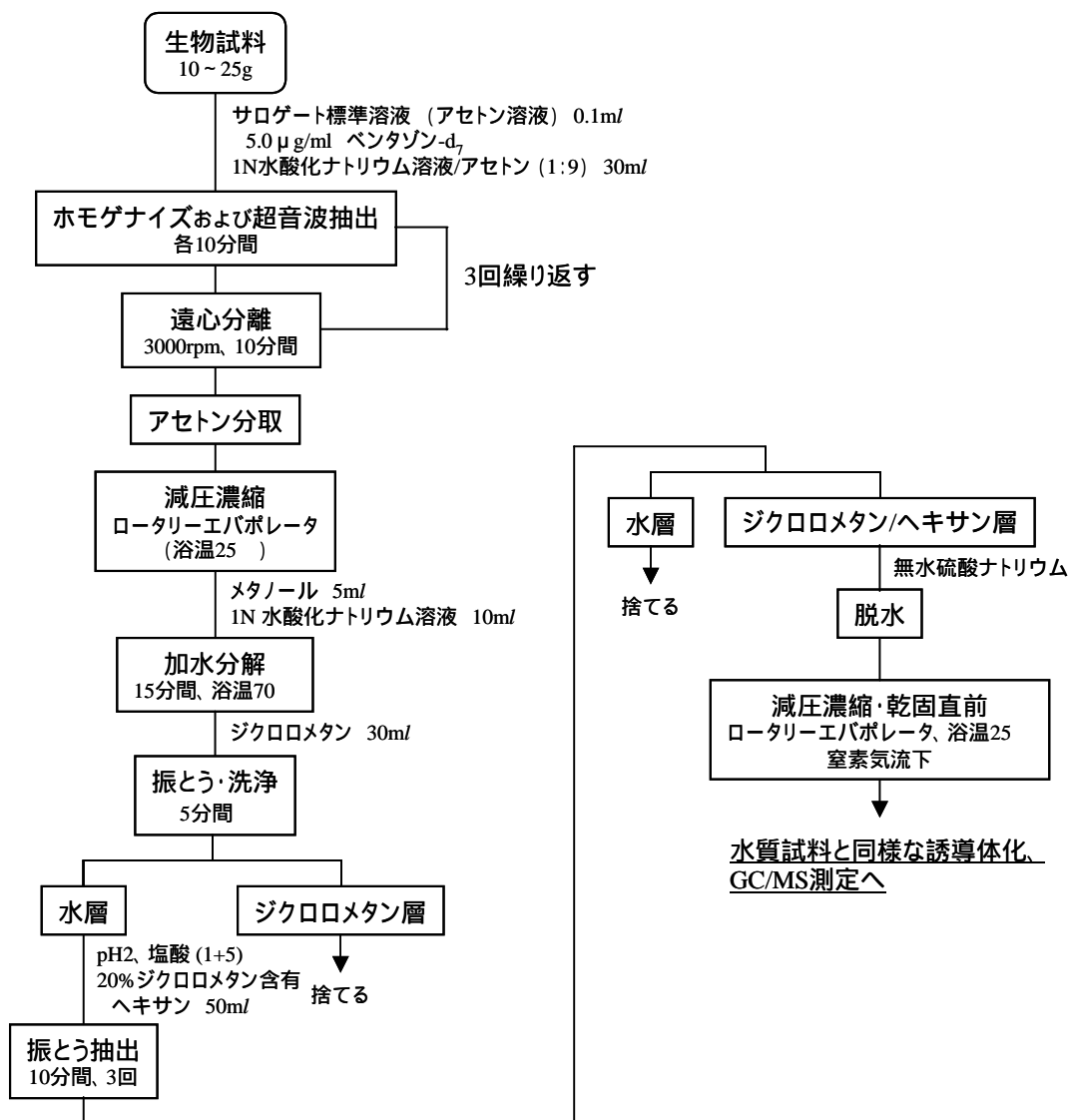


図3 生物試料におけるトリクロピルおよびペンタゾン分析の操作手順