

. 多成分農薬分析法

1. 対象物質

本法は、トリアジン系除草剤のアトラジン、シマジン、メトリブジン、N-メチルカルバメート系殺虫剤のカルバリル^{注1)}、酸アミド系除草剤のアラクロール、有機リン系殺虫剤のエチルパラチオン、マラチオン、ジフェニルエーテル系除草剤のニトロフェン、ジニトロフェノール系除草剤のトリフルラリン、ピレスロイド系殺虫剤のシペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ピンクロゾリンの各農薬の測定に適用する。ここで、エスフェンバレレートは光学異性体の混合物であるフェンバレレートの有効成分であるため、定量用標準混合液の作成にあっては注意を要す。また、一部^{注2)}を除いて水質環境基準の健康項目と要監視項目に挙げられる農薬にも適用できる。

注1) カルバリルはGC/MSの装置条件によって分解する場合がある。この際は、HPLCのポストカラム誘導体化法、あるいはGC/MSのアセチル化などの誘導体化を行う。

注2) 底質、生物試料のクロロタロニルやイソキサチオンの分析など困難なものもある。

2. 目標検出限界

各農薬の検出限界値は、水質では0.01~0.05 $\mu\text{g/l}$ 程度、底質と生物試料では0.5~50 $\mu\text{g/kg}$ を目標とする。

3. 分析法の概要

水試料中の農薬は、ジクロロメタンによる溶媒抽出または逆相型のカートリッジカラムで固相抽出し、脱水・濃縮、内標準物質を添加した後、GC/MS(SIM)で定量する。底質試料については、アセトンで振とうし、超音波抽出を行った後、アセトン抽出液に精製水を加えてジクロロメタンで振とう抽出または一旦濃縮して精製水に溶解させた溶液から固相抽出を行い、フロリジルとグラファイトカートリッジカラムで精製、内標準物質を添加した後、GC/MS(SIM)で定量する。生物試料は、アセトニトリルで抽出後、ヘキサンで洗浄して脂質成分を除去し、精製水を加えてジクロロメタンで再抽出、脱水・濃縮の後、フロリジルカラムで精製して、測定用内標準物質を加えてGC/MS(SIM)で定量する。

4. 試薬・器具

(1) 試薬類

- a) 農薬標準品： 残留農薬分析用で純度または濃度が保証されたもの
- b) 内標準物質： フェナンスレン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} 、クリゼン- d_{12} 、ペリレン- d_{12}
- c) ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、アセトニトリル、無水硫酸ナトリウム： 残留農薬分析用
- d) 塩化ナトリウム： 600 $^{\circ}\text{C}$ で4時間加熱、または同等のもの
- e) 窒素ガス： 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- f) 精製水： 蒸留水または超純水など測定の妨害となる物質を含有しないもの

(2) 器具および装置

- a) 分液ロート、共栓付試験管、クロマトグラフ管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコなどガラス器具
- b) 振とう機

- c) 固相抽出カラム： オクタデシル基結合型シリカゲル(ODS)、スチレンジビニルベンゼン共重合体(ポリスチレン樹脂)、ポリメタクリレート樹脂、ポリアミド樹脂またはこれらと同等の性能を有する基材を200-1,000mg充てんしたもので、試料を通す直前にジクロロメタン5ml、アセトン5ml、精製水5mlで洗浄したもの
- d) 固相抽出装置： 加圧型または吸引型で、通水速度の制御が可能なもの
- e) フロリジリカートリッジカラム： 容量3ml程度のカラムにクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムを約1g充てんしたもの、または同等品
- f) グラファイトカーボンカートリッジカラム： 容量3ml程度のカラムに非孔性グラファイトカーボンを0.2～0.3g充てんしたもの、または同等品
- g) 濃縮器： クデルナダニッシュ(KD型)型濃縮器又はロータリーエバポレータ
- h) ホモジナイザー： 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)、攪拌粉散器(ウルトラターラックス)またはその同等品
- i) 超音波抽出器： 超音波洗浄器または同等品
- j) ガラス繊維ろ紙： 孔径1 μ mであって、測定妨害となる物質を含まないこと
- k) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 分析操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料

a) 溶媒抽出

懸濁物質量の多い試料水(目安としてSS濃度50 μ g/ml以上)は予めガラス繊維ろ紙(孔径：1 μ m)によるろ過を行い、懸濁物質とろ液を個別に抽出する。

懸濁物質中の農薬は、アセトンによる超音波抽出を行い、抽出液はろ液試料に移す。抽出と洗浄に用いるアセトンの量は、ろ液量の5%程度にとどめる。

懸濁物質量の少ない試料水またはろ液試料は、その1 lを分液ロートにとり、塩化ナトリウム50gおよびジクロロメタン50mlを加え、振とう機で10分間抽出し、静置してジクロロメタン層を分取する^{注3)}。同様な抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン抽出液は300ml容の分液ロートに合わせ、ヘキサン100mlを加えて^{注4)}、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、KD濃縮器またはロータリーエバポレータを用いて2mlまで濃縮する。

注3) ジクロロメタン抽出液の分取は、振とう後十分に静置し、水とジクロロメタン層が分離した後に行う。エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることで分離を促すことができる。

注4) ヘキサンは脱水効果を高め、かつ濃縮時の被検物質の損失防止で加える。

b) 固相抽出

固相カラム通水時に目詰まりが想定される場合、試料水は孔径1 μ m程度のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を検液とする。ろ紙は5-10ml程度のアセトンで超音波抽出を行い、アセトン抽出液はろ液に合わせる。

試料500mlを固相カラムに吸引または加圧しながら、毎分10mlで通水させる。次に、精製水10mlを流し、カラムを洗浄した後、約10分間アスピレーター吸引で、または遠心分離等で水分を分離除去する。固相カラムの上端からアセトン3mlまたは20%アセトン/ヘキサン溶液10mlを緩やかに通し、農薬を溶離させ、試験管に受ける。アセトン抽出液に窒素ガスを緩やかに吹き付けて一旦2ml程度まで濃縮し、ヘキサン5mlを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、再び窒素ガスで2mlに濃縮する。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを遠沈管に採り、アセトン25mlを加え、10分間振とう抽出し、さらに10分間超音波抽出を行う。抽出後、3,000rpmで10分間遠心分離し、上澄みのアセトン層を分取する。この操作を3回繰り返してアセトン層を合わせる。本操作の後、溶媒抽出または固相抽出のいずれかの操作を行う。

溶媒抽出では、アセトン抽出液を5%塩化ナトリウム水溶液400mlを入れた1l容分液ロートに移し、ジクロロメタン50mlを加えて、振とう機で約10分間振とうする。放置後、ジクロロメタン層を三角フラスコ500mlに移す。分液ロートの水層にジクロロメタン100mlを加え、再び約10分間振とうし、放置後、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせる。ジクロロメタン抽出液は無水硫酸ナトリウム約30gを用いて脱水した後、ヘキサン約50mlを加え、ロータリーエバポレータまたはKD濃縮器で2mlに濃縮する。

固相抽出では、アセトン抽出液をロータリーエバポレータまたはKD濃縮器で約10mlまで濃縮し、全量を精製水250mlに溶解する。濃縮フラスコまたは管は少量のアセトンで洗い合わせる。精製水中のアセトン量は5%を超えないよう注意する。水質試料と同様に、この試料容液を予めコンディショニングした固相カラムに吸引または加圧しながら5~10ml/minで通す。通水後、精製水10mlを通してカラムを洗浄し、約10分間吸引または遠心分離等で水分を分離除去する。次いで、固相カラムの上端からアセトン3mlまたは20%アセトン/ヘキサン溶液10mlを穏やかに通し、分析対象農薬を溶出させ、試験管に受ける。溶出液は、窒素ガスを緩やかに吹き付けて約2mlとし、ヘキサン約5mlを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、再度窒素ガスで濃縮し2mlとする。

5.1.3 生物試料^{注5)}

細切し均一化した湿組織10~25gにアセトニトリル50mlを加え、10分間ホモゲナイザーで高速攪拌し、さらに10分間超音波容器内に置いて抽出する。生物組織とアセトニトリルの混合物は、3,000rpmで15分間遠心分離し、上澄み液のアセトニトリル層を分取する。残渣にはアセトニトリル50mlを加えて、同様の操作を行い、アセトニトリル層を合わせる。

次いで、アセトニトリル・ヘキサン分配によって抽出液から脂質成分を除く操作を行う。アセトニトリル抽出液は1l容の分液ロートに移し、アセトニトリルを飽和させたヘキサン30mlを加え、5分間振とうする。静置後、下層のアセトニトリル層を別の分液ロートに移し、ヘキサン層は捨てる。アセトニトリル層に再度アセトニトリル飽和ヘキサン30mlを加えて5分間振とうし静置する。アセトニトリル層を別の分液ロートに移し、精製水5mlを加えて、緩やかに攪拌、暫時静置する。アセトニトリル層の上部にヘキサンが分離した後、アセトニトリル層を別の分液ロートに移し、5%塩化ナトリウム水溶液500mlを加えて攪拌混合する。これにジクロロメタン50mlを加え、10分間振とうして静置、ジクロロメタン層を分取する。アセトニトリルと塩化ナトリウム水溶液の混合層には再びジクロロメタン50mlを加えて振とうし、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、無水硫酸ナトリウムで脱水し、浴温40℃以下のロータリーエバポレータで約10mlに濃縮する。混在するアセトニトリルを完全に留去させるために、濃縮液にノナン10mlを加えて、再び約2mlまで濃縮する。

注5) 抽出溶媒にメタノールを用いてもよい。この場合、メタノール・ヘキサン分配法を用いて脂質成分を除去する。メタノール抽出液をヘキサンで振とう洗浄し、5%塩化ナトリウム水溶液を加えて、ジクロロメタンで抽出する操作である。ここで得られた濃縮液にはメタノールの残存はない。

5.2 精製法

水質試料は必要に応じて精製を行うが、一般にはその必要はなく、5.2項の「測定用試料容液

液の調製」に進む。

底質と生物試料については、原則としてフロリジルカラムクロマトグラフィーによる抽出濃縮液の精製を行う。なお、クロマトグラフィーの操作条件を一例として示すが、用いる基材の特性、活性状況、充てん量等により測定対象農薬の溶出範囲が変わるので、溶出量など最良の精製効果が得られる条件を予め確認するものとする。

底質試料からの抽出液の精製にはフロリジルカートリッジカラムを用いる。予めヘキサン10ml通したフロリジルカートリッジカラムに5~10mlの注射筒を装着する。粗抽出液の全量を注射筒に移し、容器内壁をヘキサン1mlずつで2回洗浄して合わせ、自然落下させる。注射筒内に粗抽出液が無くなったのをみて、ヘキサン10mlを加え、同様に流下させる。この溶出画分は捨てる。次いで、20%アセトン含有ヘキサン10mlで溶出し、試験管に受ける。この溶出液は濃縮器あるいは窒素ガスで約2mlまで濃縮する。

この濃縮液の着色が著しく、不揮発性夾雑物が測定の妨害となる恐れがある場合は、グラフアイトカーボン系カートリッジカラム(Envi-Carb, 3ml, 0.25gなど)による精製を行う。このカラムは使用直前に20%アセトン含有ヘキサン10mlでコンディショニングする。その後、濃縮液を負荷して、50%アセトン含有ヘキサン5mlで溶出し、この間の溶出液は全量を試験管に受け、窒素ガスを吹き付けて約2mlまで濃縮する。

生物試料の粗抽出液はフロリジルカラムクロマトグラフィーで精製する。フロリジルは130℃で一夜乾燥し、デシケータ中で放冷したものを使う。このフロリジル10gをクロマトグラフ管(内径1.0~1.5×長さ30cm)にヘキサンで湿式充てんして、約2gの無水硫酸ナトリウムを積層する。カラムはヘキサン10ml程度で洗い、液面をカラムヘッドまで下げる。無水硫酸ナトリウムの層が乱れないように粗抽出液をカラムに負荷して流下させ、続いて少量のヘキサン(2ml程度)で数回容器を洗ってカラムに注ぎ、カラム壁面を洗いながら流下させ、液面をカラムヘッドに合わせる。最初にヘキサン100mlで展開して、この溶出液は捨てる。次いで、20%アセトン含有ヘキサン100mlで展開し、この溶出液を濃縮器で約2mlに濃縮する。

5.3 測定用試料溶液の調製

水質試料の粗抽出液あるいは底質、生物試料から得られた溶出液は、さらに窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を留去し、直ちに測定用内標準溶液を0.5ml添加し、GC/MSの試験液とする。

5.4 空試験液の調製

試料と同量の精製水を用いて、5.1~5.3項の操作を行い水質、底質および生物試料ごとに空試料液を調製する。

5.5 標準液の調製

各農薬標準物質の100 μ g/mlアセトン溶液を標準原液とする。標準原液を等量混合してアセトンで順次希釈して1.0 μ g/mlの標準混合溶液を調製する^{注6)}。これを0-1.0ml段階的にとり、測定用内標準溶液0.5ml加えて、窒素ガス気流下で0.5ml定容として、検量線作成用の標準液とする。

測定用内標準溶液は、フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、クリセン-d₁₂、ペリレン-d₁₂の各0.5 μ g/mlアセトン混合溶液である。

これらの標準溶液は密閉し冷暗所で保管する。

注6) フェンバレレートは、光学異性体の混合物であり、エスフェンバレレートを有効成分とする。したがって、これらを混合すると濃度が不明瞭となる恐れがある。エスフェンバレレートは国内流通していない状況があるので、環境モニタリングにあっては、フェンバレレートのみを標準液に混合するとよい。ピークトップ部分が僅かに分離する後方成分がエ

がエスフェンバレレートに相当する。

5.6 測定

a) GC/MSの分析条件の設定

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム： 溶融シリカキャピラリーカラム(内径 0.25mm 長さ 30m 液相膜厚 0.25 μ m)
液相はメチルシリコン系またはフェニルメチルシリコン系の無極性から微極性カラムでブリーディングがなく、分離性能と再現性に優れたもの。

カラム温度： 50°C(1min)-20°C/min-200°C -5°C/min-280°C(5min)

注入口温度： 250

注入法： スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス： ヘリウム(線速度 40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度： 280°C

イオン源温度： 270°C

イオン化エネルギー： 70eV

イオン化電流： 300 μ A

イオン化法： 電子衝撃イオン化(EI)法

質量校正

MS に質量校正用標準物質の DFTPP (decafluorotriphenylphosphin)、PFTBA(Perfluorotributylamine)または PFK(Perfluorokerosene)を導入して、MS の質量校正プログラムによりフラグメントパターンおよび分解能(500 以上)などの校正を行うと共に、装置の感度等の基本的なチェックを行い、これらの結果は測定結果とともに記録に残す。

モニターイオン： 表1 のとおり

表1 測定対象物質のモニターイオン

測定対象物質	最多同位体 分子量	モニターイ オン(M/Z)	参照 内標準物質
内標準物質			
IS-1 フェナンスレン-d ₁₀	188	188	-
IS-2 フルオランテン-d ₁₀	212	212	-
IS-3 クリゼン-d ₁₂	240	240	-
IS-4 ペリレン-d ₁₂	264	264	-
測定対象農薬			
()内のモニターイオンは確認用			
アトラジン	215	200 (215)	IS-1
アラクロール	269	160 (188)	IS-1
シマジン	201	201 (186)	IS-1
エチルパラチオン	291	109 (291)	IS-2
カルバリル	201	144 (115)	IS-2
マラチオン	330	173 (127)	IS-2
ニトロフェン	283	283 (202)	IS-3
トリフルラリン	335	306 (335)	IS-1
メトリブジン	214	198 (144)	IS-1
シペルメトリン (4成分)	415	163 (181)	IS-4

エスフェンバレート	419	125 (167)	IS-4
フェンバレート (2成分)	419	125 (167)	IS-4
ペルメトリン (2成分)	390	183 (163)	IS-4
ピククロゾリン	285	198 (212)	IS-1

注：内標準物質の対照はメチルシリコン系のカラムによる。

b) 検量線

検量線作成用の試験液2 μ lをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度（面積または高さ）比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2 μ lをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度（面積または高さ）比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C： 試料水中の農薬濃度($\mu\text{g/l}$)

S_{abs} ： 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc} ： 試料液の最終液量(ml)

V_{inj} ： GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl} ： 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度（定量限界値付近）の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s ($\mu\text{g/l}$ またはkg)

定量下限値 = 10s ($\mu\text{g/l}$ またはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

. フェノキシ酢酸系農薬の分析法

1. 対象物質

本法はフェノキシ酢酸系の2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) および2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T) の測定に適用する。

2. 目標検出限界

本法の検出限界は、水質では0.05 $\mu\text{g/l}$ 、底質と生物では5~10 $\mu\text{g/kg}$ を目標とする。

3. 分析法の概要

水試料を pH2 の酸性条件でジエチルエーテル抽出して、アルカリ分解、ジクロロメタンによる洗浄と抽出を経て、ジアゾメタンで誘導体化し、GC/MS (SIM) で定量する。底質と生物試料中のフェノキシ酢酸系の農薬は、1N 水酸化ナトリウム-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、pH2 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。

本方法は、生体内で加水分解作用を受ける可能性を想定して、フェノキシ酢酸系農薬の遊離型と結合型(エステル化物)の総量を求めることを意図している。

4 試薬・器具

(1) 試薬類

- a) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D): 農薬分析試験用標準品
- b) 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T): 残留農薬試験用標準品
- c) 内標準物質(フェナンスレン-d₁₀)
- d) 内標準物質: 2,4-ジクロロフェニル酢酸
- e) 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
- f) ジエチルエーテル: 残留農薬分析用、用時に蒸留したもの
- g) 塩化ナトリウム: 600°C で4時間加熱、または同等のもの
- h) 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
- i) 水酸化ナトリウム: 試薬特級
- j) 塩酸: 精密分析用
- k) 窒素ガス: 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- l) 精製水: 蒸留水または超純水

(2) 器具および装置

- a) 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
- b) 振とう機
- c) ホモジナイザー: 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
- d) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
- e) ロータリーエバポレータ(恒温槽つき)
- f) ウォーターバス
- g) ジアゾメタン発生器具: 密閉性が高い専用器具
- h) シリカゲルカートリッジカラム: 容量3ml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0.5~1g充填したもの
- i) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 分析操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料^{注1)}

試料水1lを分液ロートにとり、塩化ナトリウム25gを添加した後、20%塩酸でpH2に調整し、ジエチルエーテル100mlを加えて10分間振とう抽出し、十分静置してジエチルエーテル層を分取する。水層は再度ジエチルエーテル100mlを加えて同様の抽出操作を繰り返し、十分静置してジエチルエーテル層を先の抽出液に合わせる。ジエチルエーテル抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて浴温25°C^{注2)}で流出液が出なくなるまで減圧濃縮した後、メタノール10ml、1N水酸化ナトリウム10ml、精製水10mlを添加し、70°Cの水浴中で15分間アルカリ分解を行う^{注3)}。分解液を100ml容の分液ロートに移し、液性がアルカリ性であることをみて、ジクロロメタン30ml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^{注4)}。続いて、水層を20%塩酸でpH2に調整し、ジクロロメタン30ml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30ml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°Cで減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

注1) フェノキシ酢酸系の物質は、強陰イオン交換体を有する固相カラムによって効果的に抽出できるが、保持容量とマトリックスの影響に課題が残っており、溶媒抽出法のみを示した。

注2) 乾固しないよう注意する。

注3) 2,4-D、2,4,5-Tのエステル化合物が存在すれば、それらを含めた測定法となる。

注4) アルカリ分解後のジクロロメタン洗浄では、水層が透明になるまで十分に静置時間をとって分離させる。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを50mlの遠沈管に採取し、内標準液として2,4-ジクロロフェニル酢酸(20µg/ml) 0.1mlを添加、十分に混合した後、1N水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) 20mlを加え、振とう機を用いて10分間振とう、さらに10分間超音波振動を与えて、3,000rpm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-アセトン(1:9) 20ml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°C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5mlと1N水酸化ナトリウム溶液を10ml加えて、70°Cのウォ-タバス中で15分間アルカリ分解を行う。分解液は100ml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30ml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、水層を20%塩酸でpH2に調整、20%ジクロロメタン含有ヘキサン50ml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50ml加えて抽出を繰り返す。抽出操作は3回を行い、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°Cで減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

5.1.2 生物試料

細切し均一化した湿組織10~25gに内標準液として2,4-ジクロロフェニル酢酸(20µg/ml) 0.1mlを添加して混合した後、1N水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) 30ml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、3,000rpm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

と同様である。

5.2 測定用試料液の調製

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0.5mlとジアゾメタン/ジエチルエーテル溶液1ml^(注5)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0.5mlと内標準物質のフェナンスレン-d₁₀(0.5μg/mlヘキサン溶液) 10μlを加えてよく混合したものを測定用の試料液とする。

注5) ジアゾメタン発生の専用器具にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンとジエチルエーテルを入れ、氷冷下、10%水酸化ナトリウム水溶液を加えて発生させたジアゾメタンをジエチルエーテルに捕集し、ジアゾメタン/エーテル溶液を調製する。この操作は必ずドラフト内で行う。

5.3 精製操作

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5mlで洗浄、次いで20%エチルエーテル含有ヘキサン5mlで被験物質を溶出し、窒素気流下で0.5mlまで濃縮して測定用の試料液を得る。

5.4 空試験液の調製

試料量に対応した精製水を用いて、5.1～5.3項に従った操作を行い、水質、底質および生物質試料の空試料液を調製する。

5.5 標準液の調製

2,4-Dと2,4,5-T標準品をそれぞれ100mg正確に秤取り、100mlのメスフラスコに移してヘキサンに溶解し、1,000μg/mlの標準原液とする。標準原液を等量混合しヘキサンで順次希釈、10μg/mlの標準溶液を調製する。測定用内標準溶液は、フェナンスレン-d₁₀の0.5μg/mlヘキサン溶液である。

5.6 測定

a) GC/MS測定条件

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム: 溶融シリカキャピラリーカラム(内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25μm) 液相はメチルシリコン系またはフェニルメチルシリコン系の無極性から微極性カラムでブリーディングがなく、分離性能と再現性に優れたもの。

カラム温度: 50°C(1min)-20°C/min-200°C -5°C/min-280°C(5min)

注入口温度: 250

注入法: スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス: ヘリウム(線速度 40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度: 280°C

イオン源温度: 270°C

イオン化エネルギー: 70eV

イオン化電流: 300μA

イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

モニターイオン: m/z188 (フェナンスレン-d₁₀)

m/z199、234 (2,4-D-Me)
m/z233、263 (2,4,5-T-Me)

b) 検量線

混合標準液をヘキサンで希釈し、対象物質(0-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を目安に5段階程度の検量線用標準液を作成し、各濃度の溶液0.5mlを正確に試験管に入れる。これにメタノール0.5mlとジアゾメタン/エチルエーテル溶液1ml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0.5mlとフェナンスレン-d₁₀ヘキサン溶液(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を10 μl を加える。

これらの2 μl をGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2 μl をGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng}/\text{l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / (V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml}))$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度($\mu\text{g}/\text{l}$)

S_{abs} : 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc} : 試料液の最終液量(ml)

V_{inj} : GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl} : 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s ($\mu\text{g}/\text{l}$ またはkg)

定量下限値 = 10s ($\mu\text{g}/\text{l}$ またはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

ベノミルの分析法

1. 対象物質

本法はベノミルの測定に適用する。ベノミルの加水分解物であるメチル2-ベンゾイミダゾール (MBC: Methylbenzimidazol-2-yl carbamate) について定量する間接法であり、ベンゾイミダゾール系のチオファネートメチルやチアベンダゾールが共存すればそれらの総量となる。

2. 目標検出限界値

水質におけるMBCの検出限界値は $0.1\mu\text{g/l}$ 、底質については $2\mu\text{g/kg}$ 、生物は $20\mu\text{g/kg}$ を目標とする。MBC濃度に1.52(ベノミル分子量/MBC分子量)を乗じた値がベノミル濃度に相当する。

3. 分析法の概要

水試料は塩化ナトリウムの塩析条件下でジクロロメタン抽出し、脱水、濃縮、ジアゾメタンによるメチル化の後、GC/MSで定量する。底質試料中のベノミルは、メタノールとともに振とうと超音波抽出を行い、酢酸エチルに溶媒置換して0.1N塩酸で分解、pH2への調整の後、ジクロロメタン抽出し、ジアゾメタンによるメチル化を経て、GC/MSで定量する。生物試料については、アセトニトリルで超音波と振とう抽出した後、ヘキサンで脱脂洗浄を行い、酢酸エチルへの溶媒置換、0.1N塩酸による分解以後の操作は底質試料と同様である。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- a) ベノミル: 農薬分析試験用標準品、純度98%以上
- b) 内標準物質(フェナンスレン- d_{10})
- c) ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、酢酸エチル、無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用
- d) ジエチルエーテル: 残留農薬分析用、用時に蒸留したもの
- e) 塩化ナトリウム: 600°C で4時間加熱、または同等のもの
- f) N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンまたはトリメチルシリルジアゾメタン: ジアゾメタン発生試薬
- g) 水酸化ナトリウム: 試薬特級
- h) 塩酸: PCB分析用
- i) 窒素ガス: 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- j) 精製水: 蒸留水または超純水

(2) 器具および装置

- a) 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
- b) 振とう機
- c) ホモジナイザー: 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
- d) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
- e) 濃縮器: クデルナダニッシュ(KD型)型濃縮器又はロータリーエバポレータ
- f) ジアゾメタン発生器具: 密閉性が高い専用器具
- g) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 試験操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料

試料1lを分液ロートにとり、塩化ナトリウム50gを加え、ジクロロメタン50mlで10分間振とう抽出する。静置後、ジクロロメタン層の分離をみて、別の300ml容分液ロートに分取する^{注1)}。この操作をさらに2回繰返し、ジクロロメタン抽出液を合わせる。

この抽出液はロータリーエバポレータを用いて減圧濃縮し、酢酸エチル10-20mlに再溶解して100ml容の分液ロートに移す。このなかに0.1N塩酸50mlを加えて5分間振とうして、静置後塩酸層を別の分液ロートに移す。さらに、酢酸エチルで塩酸層を洗浄して、分離後ビーカーに移す。

塩酸層は水酸化ナトリウム(5Nまたは0.2N)水溶液でpHを6.4に調整して、200ml容の分液ロートに移す。これにジクロロメタン50mlを加えて5分間振とうして静置する。分離後、ジクロロメタン層を別の容器に分取する。水層はジクロロメタン50mlを加え同様に振とう抽出し、分離後ジクロロメタン抽出液を合わせる。ジクロロメタン抽出液にヘキサン50mlを加え、無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD濃縮器またはロータリーエバポレータで3-5ml程度まで濃縮、さらに窒素気流下で乾固する。

注1) エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることによって分離を促すことができる。

注2) ジアゾメタン発生の専用器具にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンとジエチルエーテルを入れ、氷冷下、10%水酸化ナトリウム水溶液を加えて発生させたジアゾメタンをジエチルエーテルに捕集し、ジアゾメタン/エーテル溶液を調製する。この操作は必ずドラフト内で行う。ジアゾメタン/エーテル溶液の代わりに、トリメチルシリルジアゾメタンを用いることができるが、不純物が多く、反応時間も長くなる傾向がある。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥試料10~25gにメタノール50mlを加えて15分間振とう抽出し、さらに15分間超音波抽出を行い、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのメタノール層を分取した後、残渣にメタノール50mlを加えて、同様の抽出操作を繰り返して、メタノール層を先の抽出液に合わせる。メタノール抽出液は浴温約40°Cのロータリーエバポレータで乾固直前まで濃縮し、残液に0.1N塩酸30mlおよび酢酸エチル50mlを加え、200ml分液ロートに移して5分間振とうする。静置後酢酸エチル層を分取して、水層に酢酸エチル50mlを加えて、同様に振とう抽出、酢酸エチル層を先の抽出液に合わせて、浴温40°C以下で乾固直前まで減圧濃縮する。残留物を酢酸エチル50mlに溶解して100ml分液ロートに移し、0.1N塩酸30mlを加えて5分間振とうする。塩酸層を分取して、酢酸エチル層に0.1N塩酸を20ml加え、再び5分間振とう、塩酸層を分取して合わせる。塩酸抽出液は5Nおよび0.2N水酸化ナトリウム水溶液でpH6.4に調整した後、ジクロロメタン50mlを加えて5分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取して、水層にジクロロメタン30mlを加えて5分間振とう、ジクロロメタン層を合わせる。ジクロロメタン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、ジクロロメタンを減圧留去する。

5.1.3 生物試料

細切し均一化した生物組織10~25gにアセトニトリル50mlを加えて15分間ホモゲナイズ抽出し、さらに15分間超音波抽出を行い、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのアセトニトリル層を分取した後、残渣にアセトニトリル50mlを加えて、同様の抽出操作を繰り返して、アセトニトリル層を先の抽出液に合わせる。アセトニトリル抽出液は、アセトニトリル飽和ヘキサン30mlで2回振とう洗浄した後、浴温約40°Cのロータリーエバポレータで乾固直前まで濃縮し、残液に0.1

0.1N塩酸30mlおよび酢酸エチル50mlを加えて溶解し、以後は底質試料と同様の操作を行う。

5.2 測定用試料液の調製

ジクロロメタン抽出液の溶媒留去後直ちにメタノール0.5ml、ジアゾメタン/エーテル溶液1mlを加え^{注2)}、室温で1時間静置して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、内標準物質のフェナンスレン-d₁₀ (0.5μg/mlヘキサン溶液) 0.2mlを加えて、よく混合したものを測定用の試料液とする。

5.3 空試験液の調製

試料量に相当する精製水を用いて、5.1～5.3項の操作を行い、水質、底質および生物湿試料の空試料液を調製する。

5.4 標準液の調製

ベノミル標準物質の100mgを正確に秤とり、メタノールで溶解して100mlとしたものが1,000μg/mlの標準原液である。標準原液の1mlを予め0.2N塩酸50mlを入れた100ml容の分液ロートに入れ5分間振とうする。その後、5Nと0.2Nの水酸化ナトリウムでpH6.5に調整し、塩化ナトリウム2.5gを加えて、ジクロロメタン20mlで加水分解産物のMBCを振とう抽出する。静置後、分離したジクロロメタンは無水硫酸ナトリウムで脱水しながら100mlのメスフラスコに移す。この抽出操作をさらに2回繰り返し、メスフラスコにジクロロメタン抽出液を合わせ、ジクロロメタンで全量を100mlとする。この10μg/ml MBCジクロロメタン溶液をさらに10倍希釈した標準溶液を0-1.0mlの間で段階的に試験管にとり、窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を除去、直ちにメタノール0.5mlとジアゾメタン/ジエチルエーテル溶液1mlを加えて1時間室温で放置してメチル化を行う。反応後、ドラフト内で窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を除き、内標準物質のフェナンスレン-d₁₀ (0.5μg/mlヘキサン溶液) 0.2mlを加えて、よく混合したものを検量線作成用の試料液とする。

MBCの分析用標準物質を用いて検量線用標準液を作成することもできる。ベノミル濃度への換算は1.52を乗じる。

5.5 測定

a) GC/MS測定条件

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム: 5%フェニルメチルシリコン化学結合型キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、液相膜厚0.25μm)またはこれと同等の性能をもつもの

カラム温度: 50°C(1min)-20°C/min-200°C-5°C/min-280°C(5min)

注入口温度: 250

注入法: スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス: ヘリウム(線速度40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度: 280°C

イオン源温度: 270°C

イオン化エネルギー: 70eV

イオン化電流: 300μA

イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

モニターイオン: m/z188 (フェナンスレン-d₁₀)

m/z146、205 (MBC-Me)

b) 検量線

検量線作成用の試料液2μlをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2μlをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度(μg/l)

S_{abs}: 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc}: 試料液の最終液量(ml)

V_{inj}: GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl}: 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s (μg/lまたはkg)

定量下限値 = 10s (μg/lまたはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて±20%以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

. アミトロールの分析法

1. 対象物質

アミトロール(3-アミノ-1,2,4-トリアゾール)

2. 目標検出限界

本分析法の検出限界は水質で 1 μ g/l、底質で 1 μ g/kg を目標とする。

3. 分析法の概要

本分析法は、水試料を pH4.0 に調整後フルオレスカミンと反応させ、ODS 系の固相カラムを用いて濃縮し、HPLC-蛍光検出法で定量する方法である。底質試料については 2%アンモニア水で超音波と振とう抽出を行い、遠心分離の後、ろ過する。ろ液は煮沸によってアンモニアを除去して、*o*-フタルアルデヒド溶液を加え、ジクロロメタンで妨害物質を洗浄除去した後、フルオレスカミンによる誘導体化反応を行う。反応終了後、アミトロールのフルオレスカミン誘導体を固相抽出し、HPLC で分離した後、蛍光検出する。生物試料は、エタノールと 40%含水エタノールで超音波と振とう抽出を行い、陽イオン交換樹脂カラムで精製の後、フルオレスカミンによって誘導体化を行い、HPLC で蛍光検出する。

4. 試薬・器具

(1) 試薬

- a) アミトロール(amitrol)、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール： 農薬分析試験用標準品、純度 98%以上
- b) フルオレスカミン(flourescamine)： 商品名フルラム(fluram)に同じ。市販品をそのまま使用
- c) フタルアルデヒド溶液： 0.1M ほう酸緩衝液(pH9.5)50ml、*o*-フタルアルデヒド-エタノール溶液 5ml(5ml のエタノールに 270mg の *o*-フタルアルデヒドを溶解)および 2-メルカプトエタノール 0.2ml を混合する。この試薬は使用の都度 2-メルカプトエタノールを 50 μ l 追加して用いる。
- d) 酢酸緩衝液： 氷酢酸(特級)と酢酸ナトリウム(特級)のそれぞれ 60g、16.4g を精製水に溶かし 600ml としたものを、pH3.8-4.0 となるよう酢酸または酢酸ナトリウムで微調整する。
- e) メタノール、アタノール、ジクロロメタンおよびアセトン： 残留農薬分析用
- f) 塩化ナトリウム： 700 $^{\circ}$ C で 4 時間加熱後使用。または、残留農薬分析用
- g) アンモニア、プロパノール： 試薬特級
- h) ろ紙： No.5C(5 種 C)
- i) オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)系固相カラム： 大容量で保持能力の高いもの
- j) 精製水： 蒸留水または超純水
- k) 強酸性陽イオン交換樹脂： ムロマック AG50W-X8 あるいはその同等品
- l) 弱酸性陽イオン交換樹脂： アンバーライト IRC-50 あるいはその同等品

(2) 器具および装置

- a) 高速液体クロマトグラフ： 蛍光検出器付
- b) 恒温槽
- c) 注射筒
- d) クロマトグラフ管
- e) 比色管、メスフラスコ、分液ロート、共栓付試験管、メスフラスコなどガラス器具
- f) ホモジナイザー： 万能ホモジナイザー(ポリロン)、超高速万能ホモジナイザイザー(ヒスコロン)、攪拌分散器(ウルトラターラックス)またはその同等品
- g) 超音波抽出装置： 超音波洗浄器を用いることができる

5. 分析操作

5.1 抽出および測定用試料調製法

5.1.1 水質試料

試料水を5種Cのろ紙でろ過し、ろ液20mlを50ml容の比色管に移す。次に、2mlの酢酸緩衝液(pH4.0)^{注1)}と0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液4ml^{注2)}を加え、直ちに充分混合して2時間20℃の恒温槽中で反応させる。反応完了後、50mlの注射筒に移し、塩化ナトリウム17gと1N塩酸1mlを加え、毎分5-10mlの流速でODS系カートリッジカラムを通過させ、フルオレスカミン誘導体を吸着させる。精製水2mlで洗浄した後、メタノールを用いて溶出し、正確に2mlとして試料液とする^{注3), 4)}。

注1) 酢酸緩衝液添加後、pH3.8-4.0の範囲にあることを確認する。

注2) 0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液の添加量は、反応効率に影響することから正確に4ml添加する。ちなみに、アミトロール水溶液に対して15-30%に相当する0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液が最大蛍光強度を示す。

注3) 通常の河川水や海水では妨害は認められないが、必要に応じてo-フタルアルデヒドによる精製を行う。o-フタルアルデヒドはフルオレスカミンと同様に1級アミン類(R-NH₂)と反応するが、アミトロールとは反応しない。このため、フルオレスカミン-アセトン溶液を添加する前に、o-フタルアルデヒドでアミノ基をもつ妨害物質と反応させ、ジクロロメタンで抽出除去する。

注4) アミトロールフルオレスカミン誘導体は、安定性に乏しいため、固相カラム溶出後は直ちに分析に供する。反応開始後2時間で蛍光強度は最大となり2時間から4時間後までほぼ一定、その後は時間経過とともに退色する。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを50mlの遠沈管にとり、2%アンモニア水10mlを加えて10分間振とう、さらに10分間超音波抽出する。抽出後、3,000rpmで5分間遠心分離を行い、上澄みの水層を分取して、No.5Cのろ紙でろ過する。この操作は2回繰り返す。100mlビーカーにろ液を合わせ、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)10mlを加え、煮沸してアンモニアを完全に除去する。冷却後20ml定容として、50mlの分液ロートに移し、o-フタルアルデヒド溶液1mlを加え10分間放置して反応させる。ここで、アンモニアの除去が不完全な場合は水層が黄色を呈するので、o-フタルアルデヒド溶液による精製を繰り返す。次いで、ジクロロメタン10mlを加えて5分間振とうし、水層を洗浄する。この洗浄操作は2回繰り返す。洗浄後、水層は煮沸することによってジクロロメタンを除去し、放冷して50mlの比色管に移す。以後は水質試料と同様に操作する。

5.1.3 生物試料

細切均一化した湿組織10~25gを遠沈管にとり、エタノール20mlを加えて5分間ホモゲナイズし、さらに5分間超音波抽出して、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのエタノール層を分取して、残渣に40%含水エタノール20mlを加えて、同様な操作を繰り返す。上澄み液を先のエタノール抽出液に合わせる。エタノール抽出液に精製水50mlを加えて分液ロートに移し、ヘキサン20mlで5分間振とう洗浄する。静置後、下層を別の分液ロートに採り、ヘキサンによる洗浄を繰り返す。エタノール/水抽出液は100ml定容として、うち10mlを丸底フラスコに採り、過酸化水素1mlを加え、75℃で30分間加熱還流し、放冷する。

酸化処理した抽出液10mlは、強酸性陽イオン交換カラム^{注5)}に負荷して、精製水10mlで洗浄後、2.8%アンモニア水12mlで溶出し、減圧濃縮器フラスコに採る。これにn-プロパノール30mlを加え、45℃以下で濃縮して乾固する。残留物は精製水5mlで再溶解する。

次いで、弱酸性陽イオン交換カラム^{注6)}に溶解液5mlを負荷して、精製水50mlで洗浄した後、2.8%アンモニア水35mlで溶出し、濃縮フラスコに採る。溶出液にはn-プロパノール100mlを加えて、濃縮乾固し、0.1M酢酸緩衝液2mlに溶解する。

この溶解液の1mlに0.2%フルオレスカミン/アセトン溶液0.1mlを加えて十分に混合し、1時間放置する。その後、0.1Mホウ酸ナトリウム0.5mlを加えて、HPLCの定量用試験液とする。

注6) 内径 10mm、長さ 300mm のカラム管に、強酸性陽イオン交換樹脂(粒径 0.063 ~ 0.156 μ m) 1ml を精製水で充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流下させる。このカラムは精製水 5ml で洗い、抽出液を負荷する。

注7) 同様のクロマトグラフ管に、弱酸性陽イオン交換樹脂(粒径 0.33 ~ 0.50 μ m) 5ml を精製水で充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流下させる。このカラムは 1N 塩酸、2.8%アンモニア水、1N 塩酸の順に洗浄し、続いて精製水で洗液が中性になるまで洗う。これに溶解液を負荷する。

5.2 空試験液の調製

試料量に対応する精製水を用いて、5.1 項の操作を行い水質、底質、生物試料の空試験液を調製する。

5.3 標準液の調製

アミトロールを正確に 100mg 秤り取り、精製水を加えて 100ml とし、これを標準原液 (1,000 μ g/ml) とする。標準原液は精製水で順次希釈して、5 μ g/ml まで個別に 5 段階程度の検量線作成用の標準液を調製する。

5.4 測定

a) HPLC-蛍光検出の測定条件例

カラム: ODS 系充填剤、内径 5mm×長さ 15cm 程度、粒径 5 μ m

カラム槽温度: 40°C

溶離液: 9%酢酸水溶液-メタノール(10:9)

流量: 2ml/min

検出器: 励起波長: 395nm、蛍光波長: 480nm

b) 検量線

精製水と各濃度段階の標準液を個別に 10ml 容のメスフラスコに 1ml 入れ、精製水 1ml、酢酸緩衝液 (pH4.0) 0.2ml、0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液 0.4ml を加え直ちに十分混合する。2 時間 20°C の恒温槽中に静置後、メタノールを加えて 10ml 定容とし、ゼロを含む 0.5 μ g/ml までの検量線作成用の試験溶液とする。これらの試験溶液は 20 μ l を HPLC に注入し、濃度とピーク強度 (面積または高さ) から検量線を作成する。検量線作成用の試験溶液は用時調製が原則であるが、-20°C で 1 週間以内の保管であれば、蛍光強度の低下はない。

なお、試料水を *o*-フタルアルデヒドによる精製を行った場合は、検量線用の試験溶液も予め同様な処理を行わなければならない。

c) 定量

試料液 20 μ l を HPLC に注入し、得られたピーク強度により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times \frac{V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000}{V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})}$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度(μ g/l)

S_{abs} : 検量線から求めた試料液中農薬量 (ng)

V_{conc} : 試料液の最終液量 (ml)
 V_{inj} : HPLCへの注入量 (μ l)
 V_{spl} : 試料水量 (ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をHPLCに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s (μ g/lまたはkg)

定量下限値 = 10s (μ g/lまたはkg)

7. HPLC装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

・メソミルの分析法

1. 対象物質

メソミルの測定に適用する。また、アルディカーブやカルバリルなどのN-メチルカルバメート農薬の測定にも利用できる。

2. 目標検出限界

メソミルの検出限界は水質で 0.03μ g/l、底質で 2μ g/kg、生物で 1μ g/kgを目標とする。

3. 分析法の概要

本法は、N-メチルカルバメート系農薬のアルカリ条件下での加水分解で生成するメチルアミン(CH_3NH_2)を一級アミンの蛍光誘導体化試薬であるo-フタルアルデヒド(OPA)と反応させ、蛍光検出することを測定原理とする。

水試料は塩化ナトリウムによる塩析下でジクロロメタン抽出し、OPAによるポストカラム誘導体化蛍光法で定量する。底質については、アセトンで超音波と振とう抽出し、また生物試料はメタノールでホモジナイズ抽出した後、遠心分離を行い、それぞれ抽出液を得る。抽出液には10%塩化ナトリウム水溶液を加え、ヘキサンで振とう洗浄して、ジクロロメタンで再抽出する。ジクロロメタン抽出液は脱水し、減圧濃縮して、シリカゲルカートリッジカラムで精製、10%アセトン含有ヘキサンで溶出させる。溶出液は濃縮し、内部標準物質としてのアルディカーブスルフォキシドを添加し、HPLCのポストカラム誘導体化法で蛍光検出する。

4. 試薬・器具

(1) 試薬

- a) メソミル: 残留農薬標準品(純度99%以上)
- b) アルディカーブスルフォキシド: 残留農薬標準品
- c) ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル: 残留農薬分析用
- d) メタノール: 高速液体クロマトグラフ用
- e) o-フタルアルデヒド、2-メルカプトエタノール: 生化学用またはそれと同等のもの、または専用反応液
- f) ほう酸緩衝液
- g) 塩化ナトリウム: 特級試薬を650Cで24時間加熱またはそれと同等のもの
- h) 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用
- i) 精製水: 蒸留水または超純水で測定の妨害となる物質を含まないもの
- j) シリカゲル: クロマトグラフ用
- k) 水酸化ナトリウム: 試薬特級、または専用反応液
- l) 窒素ガス: 高純度(99.99%以上)

(2) 器具及び装置

- a) ホモジナイザー: 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
- b) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
- c) ロータリエバポレータ(恒温槽付き)
- d) クデルナダニッシュ型(KD)濃縮器
- e) 振とう機
- f) 分液ロート、ビーカー、フラスコ、共栓付試験管など
- g) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): カルバメート農薬分析システムを付属したもの

5. 分析操作

5.1 抽出および測定用試料調製

5.1.1 水質

試料1 lを2 l容の分液ロートにとり、塩化ナトリウム100g(海水では70g)およびジクロロメタン50 mlを加え、振とう機で10分間抽出、静置してジクロロメタン層を分取する^{注1)}。同様な抽出操作をさらに2回繰り返す。ジクロロメタン抽出液は300 ml容の分液ロートに合わせ、ヘキサン100mlを加えて^{注2)}、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、ロータリエバポレータを用いて30°Cで乾固直前まで減圧濃縮する^{注2, 3, 4)}。さらに、窒素気流下で乾固、その直後に内部標準物質として1µg/mlのアルディカーブスルフォキシドのメタノール/精製水溶液(1:9)を1ml正確に加え、測定用の試料液とする^{注5)}。

注1) ジクロロメタン抽出液の分取は、振とう後充分に静置し、水とジクロロメタン層が分離した後に行う。エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることによって分離を促すことができる。

注2) ヘキサンは脱水効果を高め、かつ減圧濃縮時における被検物質の損失防止の目的で加える。なお、30°C濃縮では損失は認められない。

注3) クデルナダニッシュ型(KD)濃縮器および窒素気流下での濃縮も可能である。

注4) 試料水中に測定の妨害となる物質が存在する場合は、ヘキサン洗浄またはシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を試みる。ヘキサン洗浄は、ジクロロメタン抽出に先だって、ヘキサン50mlで数回抽出と同様の操作を行う方法である。また、5%含水シリカ

カゲルカラムクロマトグラフィー(充てん量1g)では、ジクロロメタン10mlによる洗浄の後、10%アセトン含有ジクロロメタン20mlで溶出させることができるが、事前に溶出パターンのチェックを要す。

注5) クロマトグラムの形状不良(ピーク割れなど)の原因となるため、HPLCの移動相と同じ組成の溶媒とする。

5.1.2 底質および生物

試料10~25gを100mlの共栓付き遠沈管に採取し、メタノール50mlを加えて、底質試料は10分間振とう抽出、生物試料はホモジナイズ抽出して、さらに両試料とも10分間超音波抽出を行う。その後、遠心分離(3,000rpm 10分)により、上澄みのメタノール層を分離する。試料に再びメタノール50mlを加えて振とう抽出分離を行い最初のメタノール層と合わせる。得られた抽出液を、予め10%塩化ナトリウム水溶液500mlの入った1lの分液ロートへ移し、ヘキサン50mlを加え、振とう機で5分間振とうする。静置後、水層を1l容の三角フラスコに採りヘキサン層を捨てる。水層を分液ロートに戻して再びヘキサン50mlを加え同様の操作で洗浄し水層を採取する。水層を分液ロートに戻してジクロロメタン50mlを加えて振とう機で5分間振とうし、静置してジクロロメタン層を採取する。再び水層にジクロロメタン50mlを加えて、同様な抽出操作をさらに2回繰り返す。ジクロロメタン抽出液は合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水して、ヘキサン10mlを加え、浴温30°Cのロータリーエバポレータを用いて乾固直前まで減圧濃縮する。

5.1.3 精製

底質と生物試料から得られた抽出濃縮液はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。シリカゲルカラムは内径10~12mm、長さ300mmのクロマトグラフ管に5%含水シリカゲル1gをジクロロメタンで充填し、無水硫酸ナトリウムを2cmの高さに積層して作成し、抽出濃縮液を負荷する。液面をカラムベッドまで下げてから、少量のジクロロメタンで濃縮容器を洗い、カラムに再度負荷した後、ジクロロメタン10mlでカラムを洗浄し、この溶出液は捨てる。液面が断続しないように受器として50mlの褐色ナス型フラスコを置き、10%アセトン/ジクロロメタン20mlを流して被検物質を溶出させる。溶出液に1mlのメタノールを加えて減圧濃縮し、乾固直後1µg/mlの測定用内部標準(アルディカーブスルフォキシド)液(溶媒はメタノール:水=1:9)を正確に1ml加え、測定用試料液とする。なお、カラムクロマトグラフィーの溶出条件は事前にチェックしなければならない。

5.2 空試験液の調製

試料量に対応した精製水を用いて、5.1項に従った操作で空試料液を調製する。

5.3 標準液の調製

標準物質100mgを正確に秤取り、メタノールを正確に100ml加えて1000µg/mlの標準原液とする。標準原液は溶媒(メタノール:精製水=1:9)を用いて希釈し、対象物質(0-1.0µg/ml)および測定用内部標準物質(アルディカーブスルフォキシドµg/ml)を含む混合標準液を作成する。この標準液は常温で10日間程度安定であるが、冷暗所保存が望ましい。

5.4 測定

a) HPLC

測定条件の一例を示す。

〔分離〕

使用カラム: カルバメート系農薬分析用ODSカラム

移動相: メタノール: 精製水(1:9)

流速： 1ml/min
カラム温度： 40°C

〔反応〕

反応液1： 50mM 水酸化ナトリウム
温度： 100°C
流量： 0.4ml/min
反応液2： α -フタルアルデヒド/ほう酸緩衝液
温度： 50°C
流量： 0.4ml/min

〔検出〕

蛍光検出器： 励起波長345nm、 蛍光波長450nm

b) 検量線

検量線作成用の標準液20 μ lをHPLCに注入し、被験物質と内部標準物質の示すピーク強度（面積または高さ）比を用いて検量線を作成する。

c) 定量

試料液20 μ lをHPLCに注入し、被験物質と内部標準物質のピーク強度比を用いて検量線から定量する。

d) 計算

水試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C： 試料水中の農薬濃度(μ g/l)
S_{abs}： 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)
V_{conc}： 試料液の最終液量(ml)
V_{inj}： HPLCへの注入量(μ l)
V_{spl}： 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度（定量限界値付近）の標準溶液をHPLCに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s (μ g/lまたはkg)

定量下限値 = 10s (μ g/lまたはkg)

7. HPLC装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

追記

農薬の分析法は、主に次の知見に基づいてまとめている。

- 1) 環境庁水質保全局水質規制課 監修 (1993) 環境水質分析法マニュアル. 環境化学研究会.
- 2) 荻野泰夫、今中雅章、畑宏、石田立夫 (1983) 1-ナフチルカーバメイト(NAC). 昭和57年度化学物質分析法開発調査報告書, pp207-213, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和58年5月)
- 3) 奥村為男、今村清、西川嘉範 (1988) カルバメート剤 (BPMC、MTMC、PHC、MIPC、XMC、NAC、methyl 2-benzimidazol carbamate). 昭和62年度化学物質分析法開発調査報告書, pp83-99, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和63年6月)
- 4) 橋本浩一、高橋幸治、西川嘉範、服部幸和 (1992) シメトリン、トリシクラゾール、プロベナゾール、イソプロチオラン、ベンチオカーブ、キャプタン、カルボスルファン、ベンタゾン、カルボフラン. 平成3年度化学物質分析法開発調査報告書, pp35-54, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成4年6月)
- 5) 奥村為男、西川嘉範 (1993) キタジンP、フェントロチオン(MEP)、ダイオジノン、フェンチオン(MPP)、エジフェンフォス(EDDP)、マラチオン、イソキサチオン、EPN、メチダチオン、サリチオン、ホサロン、ホスメット(PMP)、 α -クロルフェンビンホス(α -CVP)、 β -クロルフェンビンホス(β -CVP). 平成4年度化学物質分析法開発調査報告書, pp65-94, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成5年6月)
- 6) 内藤宏孝、角脇怜 (1994) トリフルラリン、ツマサイド. 平成5年度化学物質分析法開発調査報告書, pp35-55, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成6年6月)
- 7) 中村又善、黒川陽一、松枝隆彦、高田智、深町和美 (1996) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、メコプロップ、p-t-ブチル安息香酸. 平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, pp109-126, 環境庁環境保健部環境安全課 (平成8年6月)
- 8) 門上希和夫 (1984) 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール. 昭和58年度化学物質分析法開発調査報告書, pp269-276, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和59年5月)
- 9) 肥塚加奈江、劔持堅志 (1992) メソミル、オキサミル. 平成3年度化学物質分析法開発調査報告書, pp55-68, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成4年6月)
- 10) 永山敏廣、小林麻紀、塩田寛子、森野雅世、田村行弘 (1994) 農産物中のN-メチルカーバメイト系農薬分析法. 食衛誌 35, 470-478.
- 11) 志賀直史、俣野修身、後藤真康 (1977) ベノミルおよびチオファネートメチルの残留分析法. 日農誌 2, 27-27.

目標検出限界を達成する意図から、結果的にGC/MSに頼ることとなり、前処理がかなり煩雑となっている。現状では、検討結果の不十分さから取り上げることができなかったが、最近のLC/MSやGC/MS/MSなどの分析機器の進歩には著しいものがあり、これらの活用で操作上の簡略化など、早急な測定方法の改良が期待される。

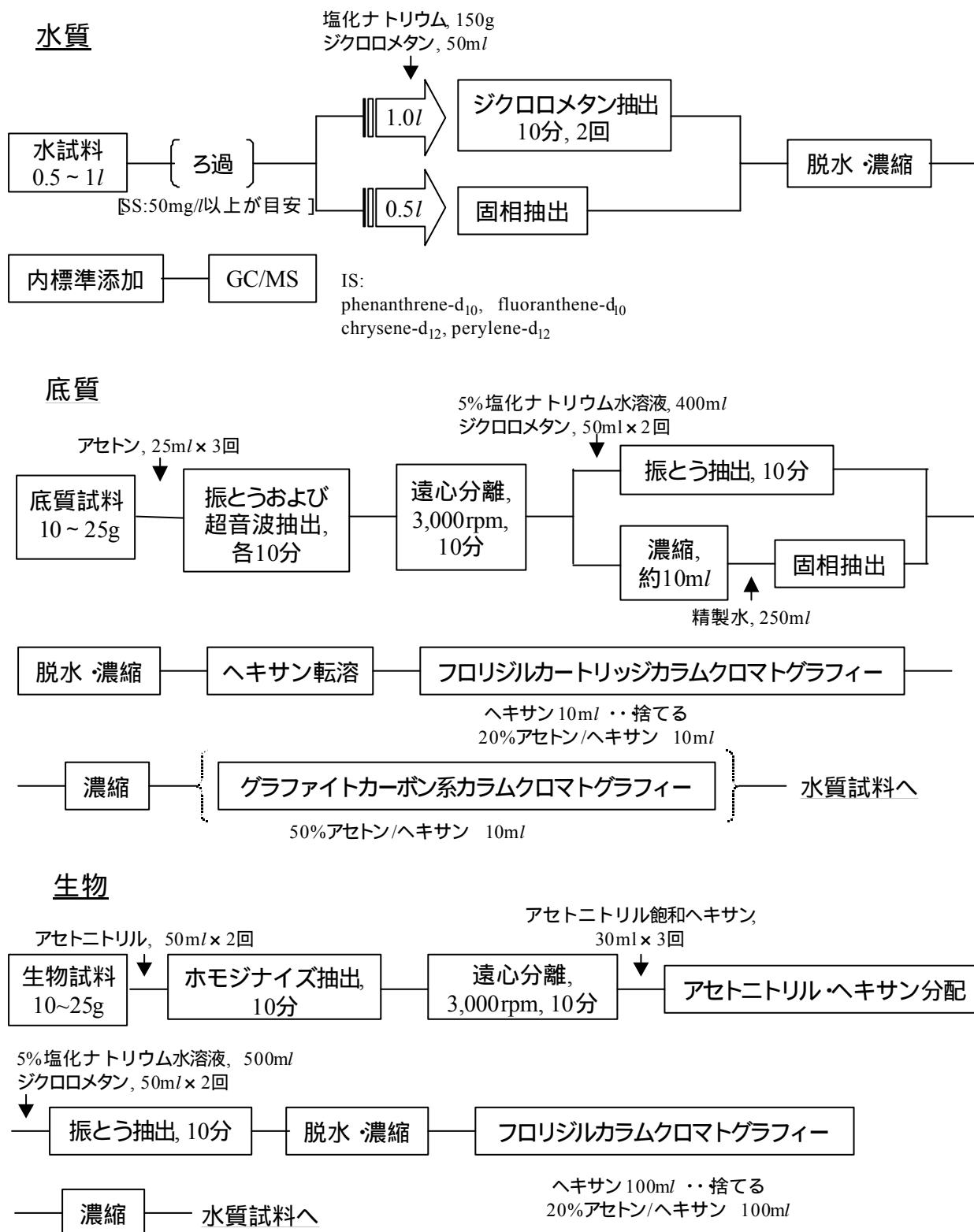


図1 農薬類の多成分一括分析法

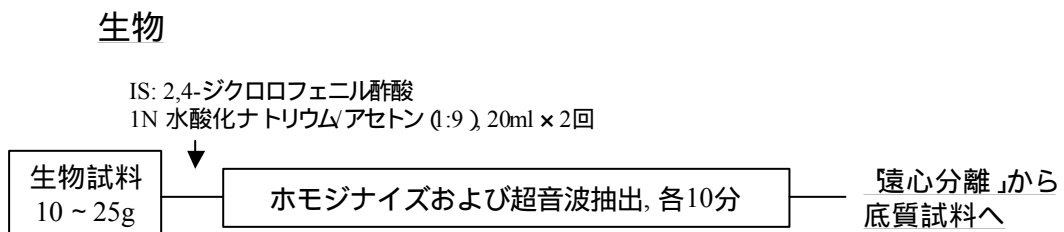
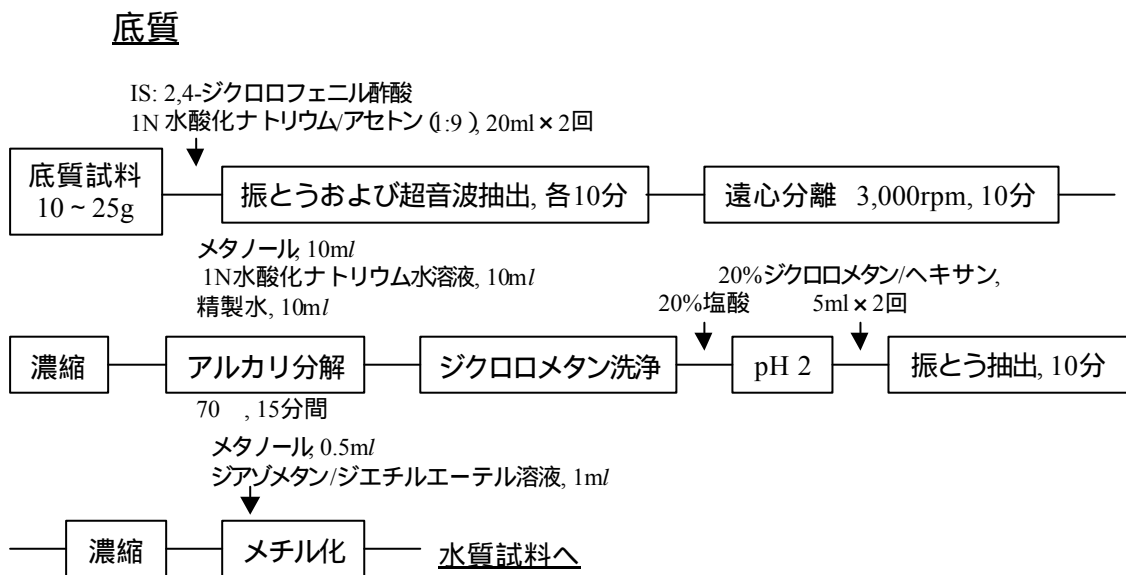
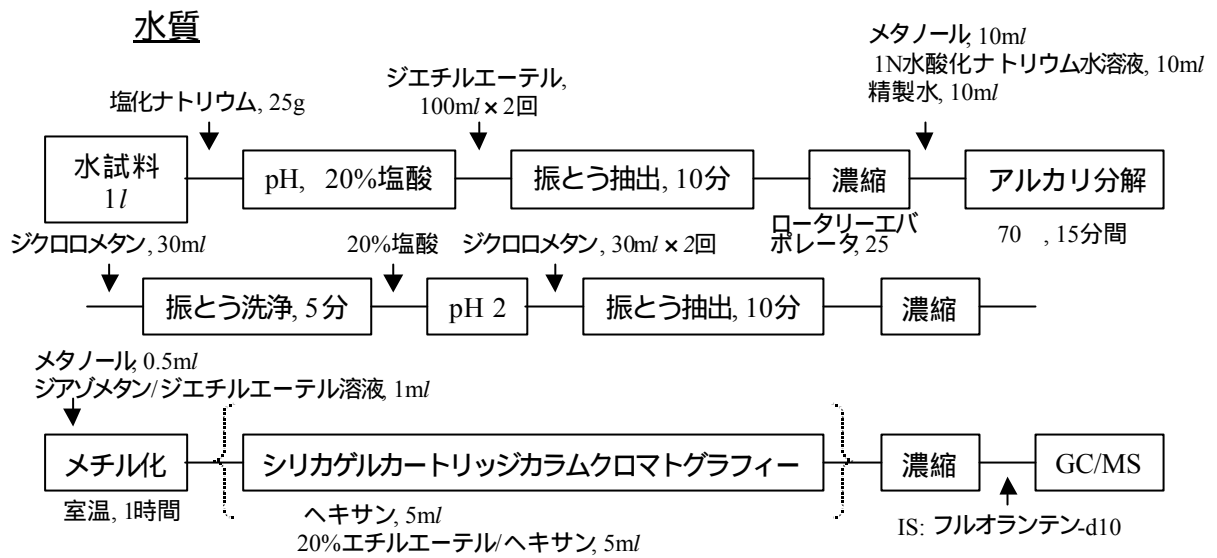
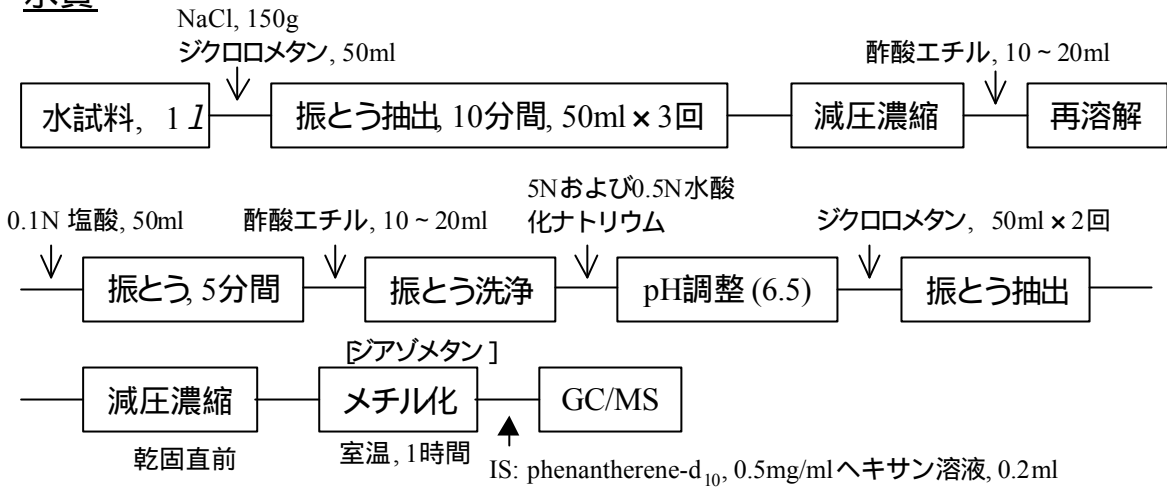
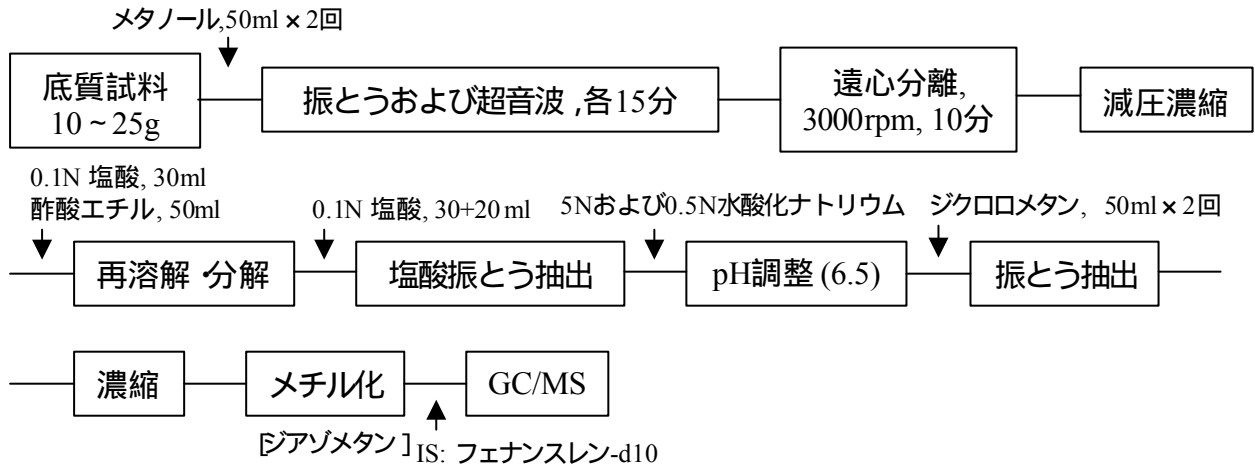


図2 フェノキシ酢酸系農薬の分析法

水質



底質



生物

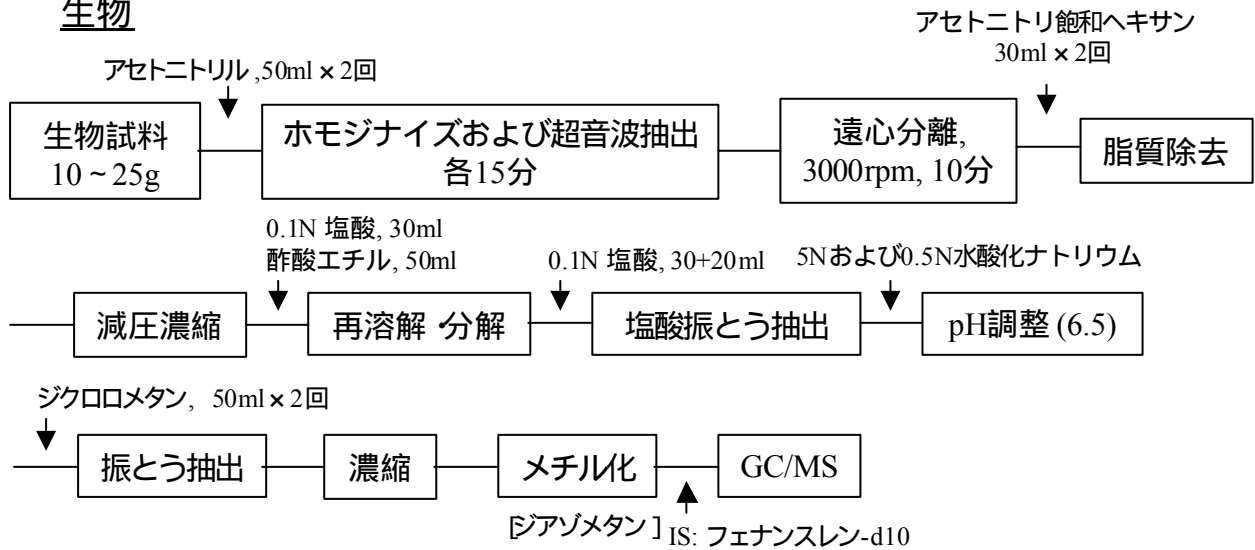
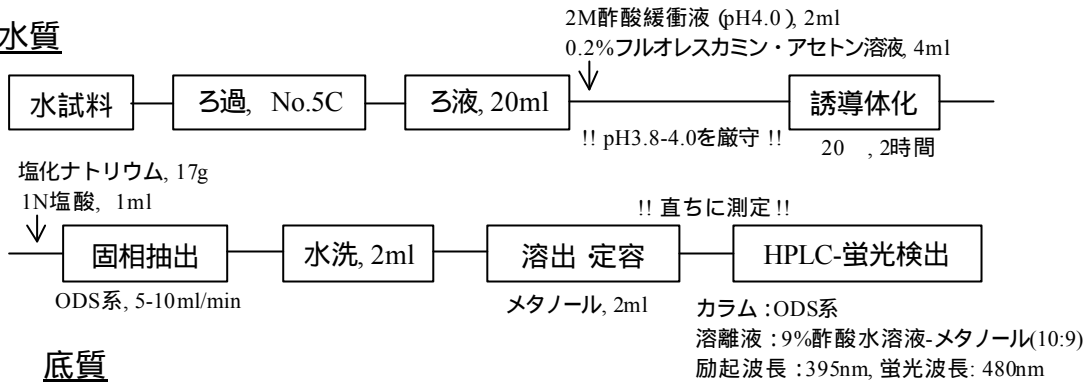
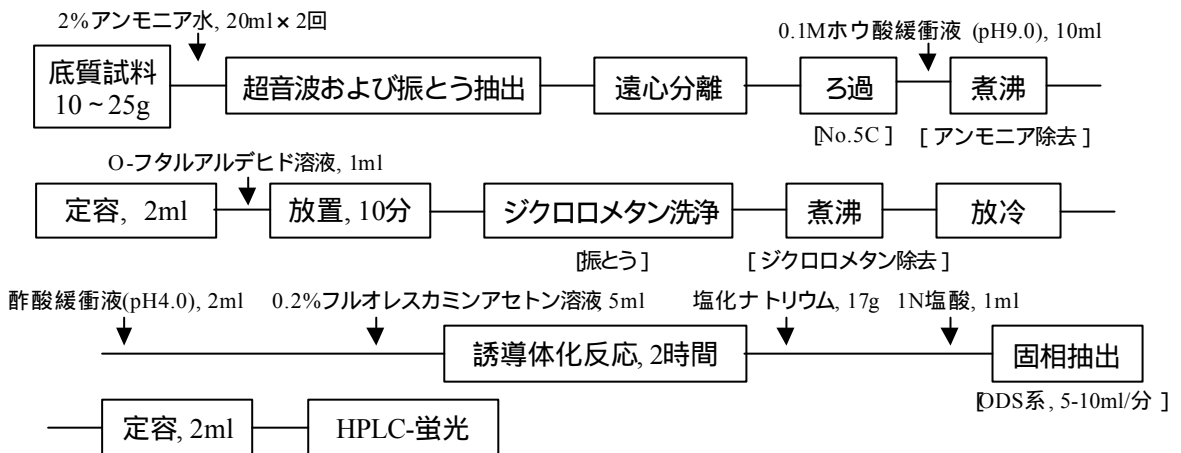


図3 ベノミルの分析法

水質



底質



生物質

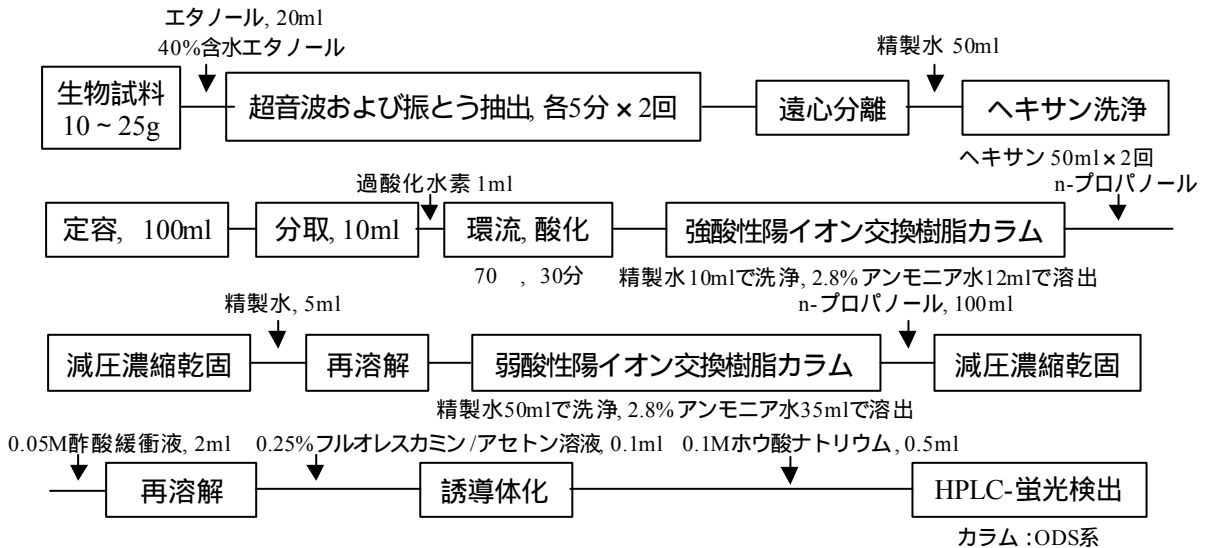
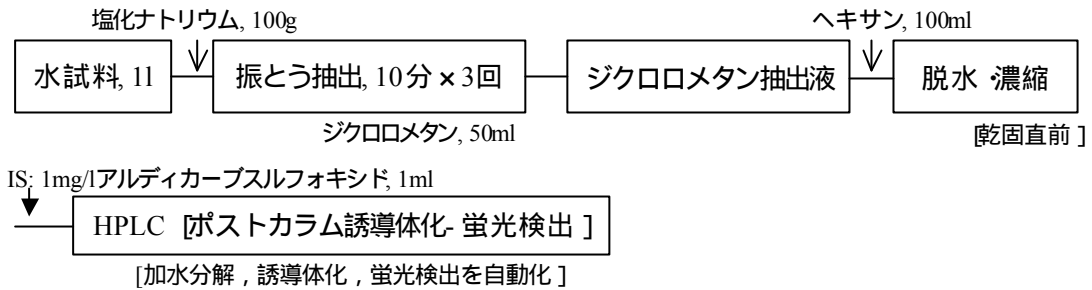
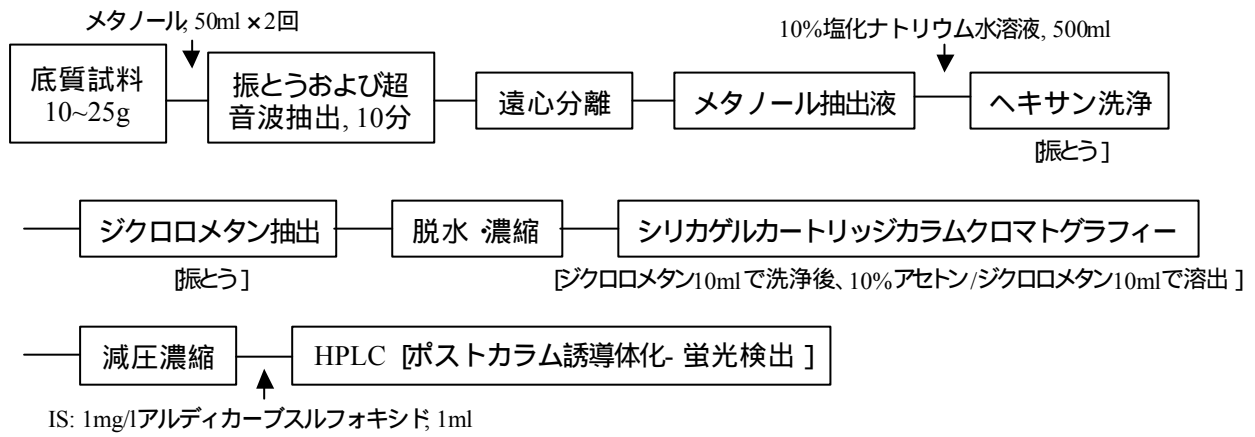


図4 アミトロールの分析法

水質



底質



生物

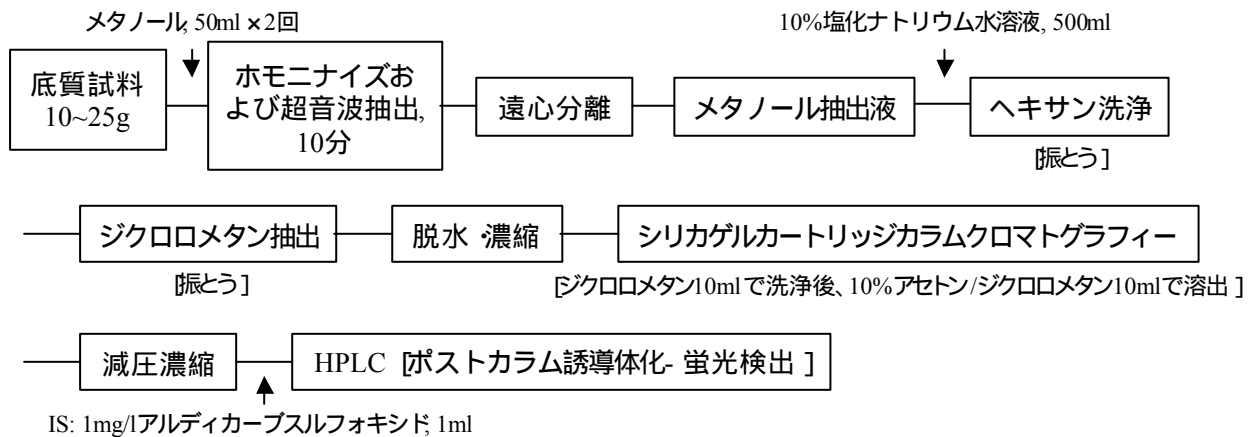


図5 メソミルの分析法