

ゴルフ場排水中のグリホサート， グルホシネート及びホセチルの 同時分析法に関する検討

環境部門

The Study on the simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and foseethyl in waste waters from golf courses

Division of Environmental Pollution

Abstract

The solid-phase extraction and LC/MS analysis are generally applied for the simultaneous analysis of water soluble pesticides. In this study, we examined the simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and foseethyl in waste waters from golf courses.

400ml of water sample was passed through combined columns of a MCX cartridge (a strong cation exchanger) and a WAX cartridge (a weak anion exchanger). The pesticides were eluted from a WAX cartridge with formic acid/methanol(5:95) and measured by negative mode-LC/MS. The pretreatment has the advantage of shortening the analysis time for the three water soluble pesticides, as well as obtaining the good recovery rates.

Key Words : 農薬 pestyicides, グリホサート glyphosate, グルホシネート glufosinate, ホセチル foseethyl, 質量分析計付き高速液体クロマトグラフィー LC/MS, ゴルフ場排水 waste water from golf course

1 はじめに

ゴルフ場農薬による環境汚染については「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針」に基づき水質汚濁の防止が図られており、京都市においてもゴルフ場排水を対象とした水質調査を行っている。ゴルフ場農薬の分析については一般的に極性の低い農薬は GC/MS, 極性の高い農薬は LC/MS により分析されており、それらの農薬を簡便かつ迅速に分析することを目的として多成分同時分析法が報告されている⁽¹⁾⁻⁽³⁾。しかし対象農薬の物性により同時分析が困難である場合も多い。

グリホサート， グルホシネート及びホセチルはゴルフ場で使用される農薬である。グリホサート及びグルホシネートは除草剤として， またホセチルは殺菌剤として使用されているが， それらの使用量は多く⁽⁴⁾環境汚染が懸念される。これらの分析法として， グリホサートは蛍光誘導体化後， 高速液体クロマトグラフ⁽⁵⁾， グルホシネートはメチル誘導体化後ガスクロマトグラフ⁽⁶⁾， ホセチルはメチル誘導体化後 FPD 付きガスクロマトグラフ⁽¹⁾で分析する方法がある。いずれの農薬も一般的な LC/MS 分析対象農薬よりも極性が高い解離性の有機リン系農薬であるため， これまで個別に分析を行う必要があった。そこで今回，

これらの簡便な同時分析法を検討したので報告する。

2 方法

(1) 標準品及び標準溶液の調整

グリホサート標準品は和光純薬工業社製， グルホシネート標準品は Riedel-de-Haën 社製， ホセチル標準品は林純薬工業社製分析用試薬を用いた。グリホサート標準品， グルホシネート標準品及びホセチル標準品を再蒸留水に溶解させ 1000mg/L とした。これら標準液を混合， 再蒸留水でグリホサート及びグルホシネート 5mg/L， ホセチル 50mg/L としたものを混合標準溶液とした。

(2) LC/MS 分析条件

ア LC 条件

LC 機種：島津 LC-10AD VP

カラム：DIONEX IonPac AS 12A (2×200mm)

ガードカラム：DIONEX IonPac AG 12A (2×50mm)

移動相：A液 0.5%ギ酸：20mM ギ酸アンモニウム (99：1)

B液 アセトニトリル

A液：B液=80：20 イソクラティック

流速：0.2mL/min

カラム槽温度：40℃

注入量：20 μ L

イ MS 条件

MS 機種：島津 LCMS-2010

イオン化モード：ESI ネガティブモード

プローブ電圧：4kV

ネブライザーガス流量：1.5mL/min

CDL 温度：250°C

CDL 電圧：25V

モニターイオン：グリホサート 168.0, グルホシネート 180.1, ホセチル 109.0

(3) 前処理方法

コンディショニングした Oasis MCX (500mg:Waters) 及び Oasis WAX (500mg:Waters) の連結カラムに水試料 400mL を通液した後、再蒸留水 10mL で洗浄する。次に Oasis MCX カラムを取り外し Oasis WAX カラムをメタノール 10mL で洗浄した後、ギ酸水/メタノール (5:95) 10mL で溶出させ、窒素パージにより濃縮乾固する。最後にそれを再蒸留水 1mL で溶解し LC/MS で定量分析する。

3 結果及び考察

(1) LC/MS 条件の検討

グリホサート、グルホシネート及びホセチルは非常に解離性が高く、通常ゴルフ場農薬分析で使用する ODS 系のカラムに保持させることは不可能である。そこで、高極性物質の分析に適していると言われていた⁽⁷⁾⁻⁽⁹⁾表 1 の①~③のカラムについて検討を行った。その結果①及び②のカラムについては、保持されない、感度が非常に悪い等の理由から分析に不適切であることがわかった。一方イオンクロマトグラフ用のカラムである③のカラムでは 3 農薬とも保持され、他のカラムと比較して感度も良好であったため、③のカラムの移動相条件について詳細な検討を行った。今回試みた移動相条件について表 2 に示す。その結果ギ酸水/アセトニトリル系の移動相ではアセトニトリルの比率が高くなるに伴ってホセチルの感度が上昇し、また 20mM ギ酸アンモニウムを加えることによって 3 農薬の感度は上昇した。20mM ギ酸アンモニウムの比率は 1%程度が最もピーク形状がよく、それ以上比率を高くするとピーク形状がテーリングした。従って移動相③の条件が最適であると判断した。この条件で得られたクロマトを図 1 に示す。

なお、この条件により検量線を作成し装置検出下限 (IDL) を求めた結果、それぞれの IDL はグリホサート (0.076ng/mL)、グルホシネート (0.076ng/mL)、ホセ

チル (1.12ng/mL) であった。

(2) 抽出条件の検討

最適な固相カラムを選択するため表 3 に示す 3 種類のアニオン交換カラムについて検討を行った。各固相カラムをコンディショニング後、混合標準溶液 1mL を負荷し、メタノール 5mL で洗浄後、強アニオン交換系である Bond Elut SAX カラムはギ酸/メタノール (10:90) 20mL、弱アニオン交換系であるその他のカラムは 28%アンモニア水/メタノール (10:90) 20mL で溶出した。結果を図 2 に示す。

Bond Elut SAX カラムにおいては、グリホサートとグルホシネートは良好な回収率 (各 98%, 103%) が得られたがホセチルの回収率は低かった。またホセチルはメタノール洗浄液中にも溶出しなかった。ホセチルは 3 物質の中で最も解離性が強く、強アニオン交換カラムとの結合が強いため溶出させることが困難であると考えられる。Isolut PSA カラムでは、グルホシネートとホセチルの回収率が低く、メタノール洗浄液中に溶出していることが確認された。Isolut PSA カラムはシリカベースの弱アニオン交換カラムであり、グルホシネートとホセチルはこのカラム固定相との結合が弱いと考えられる。一方、ポリマーベースの弱アニオン交換カラムである Oasis WAX カラムでは、いずれも回収率が良好であり、メタノール洗浄液中にも溶出しなかったため Oasis WAX カラムを採用した。なお、溶出液は 28%アンモニア水/メタノール (10:90) 20mL では水比率が高く溶液量も多いため濃縮乾固に時間を要する。そこでいずれにおいても良好な回収率が得られる溶出液を検討した結果、28%アンモニア水/メタノール (5:95) 10mL が最適であった。

(3) ゴルフ場排水からの抽出法の検討

混合標準溶液 1mL を再蒸留水とゴルフ場排水各 200mL に添加し、Oasis WAX 150mg カラムによる回収率を検討した。その結果、表 4 に示すようにの回収率は再蒸留水では良好であったがゴルフ場排水 200mL ではいずれも悪かった。さらに試料の種類と試料量について検討した結果、再蒸留水では 1L でも 3 農薬とも良好な回収率を示したが、ゴルフ場排水では 10mL と少量であっても 3 農薬とも回収率は低かった。そこで、大谷らが報告している、アニオン交換カラムの前段にカチオン交換カラムを連結する方法の効果¹⁰⁾について検討を行った。すなわち WAX 150mg カラムの前段に充填剤量がそれぞれ 150mg, 500mg である MCX カラムを連結し、混合標準溶液を添加したゴルフ場試料 100mL に注入し

回収率を求めた（図3）。その結果、共に回収率が向上することを確認した。なお、グリホサート、ホセチルでは充填量 150mg の MCX カラムで十分な回収率が得られたが、グルホシネートの回収率を 80%以上達成するには 500mg の MCX カラムが必要であった。

ゴルフ場排水には様々な陽イオンや陰イオンが存在する。今回ターゲットにしている 3 農薬は、いずれもリン酸基を有しており、水試料中ではナトリウムイオンやカリウムイオンなど多くの共存イオンとイオン対を形成し、固相との結合が妨害される可能性がある。その問題を解決する方法として、WAX カラムの前段に十分な充填量の MCX カラムを付け、陽イオンを除去することが効果的であったと考えられる。図4には Oasis MCX 500mg カラムと Oasis WAX 500mg カラムをタンデムに連結し 50mL, 100mL, 200mL, 500mL, 1000mL のゴルフ場試料に混合標準液 1 mL を添加し、回収率を求めた結果を示した。図4に示すように試料量 400mL まではいずれも良好な回収率が得られたが試料量 1000mL では回収率が低下することがわかった。従って、この方法でゴルフ場試料は 400mL まで負荷させることが可能であると判断した。

以上の検討に基づき作成した固相抽出法を図5に示す。

4 まとめ

高極性のゴルフ場農薬 3 物質の同時分析法を検討した結果、LCカラムはイオン分析カラムである DIONEX Ion Pac AS12A, MS は ESI ネガティブモードで分析することで良好なクロマトグラムを得ることができた。前処理法は Oasis MCX 500mg と Oasis WAX 500mg をタンデムに連結させ、ギ酸水/メタノール (5:95) 10mL で溶出させることで回収率は良好であった。今回の添加回収試験で用いたゴルフ場試料では 400mL まで可能であったが、本分析法における抽出法はイオン交換カラムを使用するため、回収率は試料の性質によって大きく左右される。つまり夾雑物やイオン量が多いゴルフ場排水試料の場合は検体量を少な

くする等、分析法を適宜変更する必要があり、今後さらに多くの種類の検体で添加回収試験を実施し分析精度を高める必要がある。

また本分析法の検討過程において、LC/MS の分析感度が低下することを経験した。そのような場合は ESI パイプと CDL パイプを交換し、さらにレンズ部をクリーニングすることで解決できた。

5 参考文献

- (1) ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針、環水土第 77 号水質保全局長通知
- (2) 中原優子：LC/MS によるゴルフ場農薬の一斉分析方法の検討、熊本県保健環境科学研究所報, 32, 77-80 (2002)
- (3) 中原優子：LC/MS によるゴルフ場農薬の一斉分析方法の検討（第2報）、熊本県保健環境科学研究所報, 33, 87-90 (2003)
- (4) 農薬要覧 2007, 日本植物防疫協会
- (5) 環境庁環境保健部保健調査室 (1993) 平成4年度化学物質分析法会開発調査報告書
- (6) Allen-King, 他：Fate of the herbicide glufosinate-ammonium in the sandy, low-organic-carbon aquifer at CFB Borden, Ontario, Canada Journal of Contaminant Hydrology, 18, 161-179 (1995)
- (7) SUPELCO 商品カタログ
- (8) SeQuant 商品カタログ
- (9) DIONEX 商品カタログ
- (10) 大谷仁己, 他：イオン交換カートリッジを用いた河川水中のグルホシネート, グリホサートおよびフェノキシ酸系農薬の同時分析, 水環境学会誌, No. 20, 108-111 (1997)
- (11) 八木正博：エコ調査分析法開発

表1 検討に使用したカラムの種類

①	Discovery HS F5 (15cm×2.1mm, SUPELCO)
②	ZIC-HILIC (15cm×2.1mm, SeQuant)
③	Ion Pac AS12A (15cm×2.1mm, DIONEX)

表2 Ion Pac AS12A の条件設定に使用した移動相条件

	組成		比率(%)	
	A液	B液	A液	B液
①	0.5%ギ酸	アセトニトリル	90	10
②	0.5%ギ酸	アセトニトリル	80	20
③	0.5%ギ酸/20mM ギ酸アンモニウム(99:1)		80	20

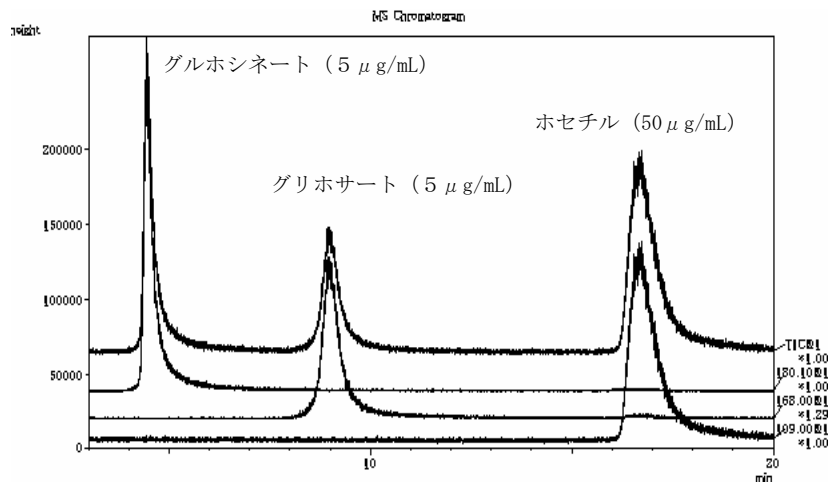


図1 3農薬のクロマトグラム

表3 検討に使用した固相カラムの種類

固相カラムの種類	メーカー	交換基の種類	基材ベース
Bond Elut SAX	VARIAN	強アニオン交換基	シリカ
Isolut PSA	ユニフレックス	弱アニオン交換基	シリカ
Oasis WAX	Waters	弱アニオン交換基	ポリマー

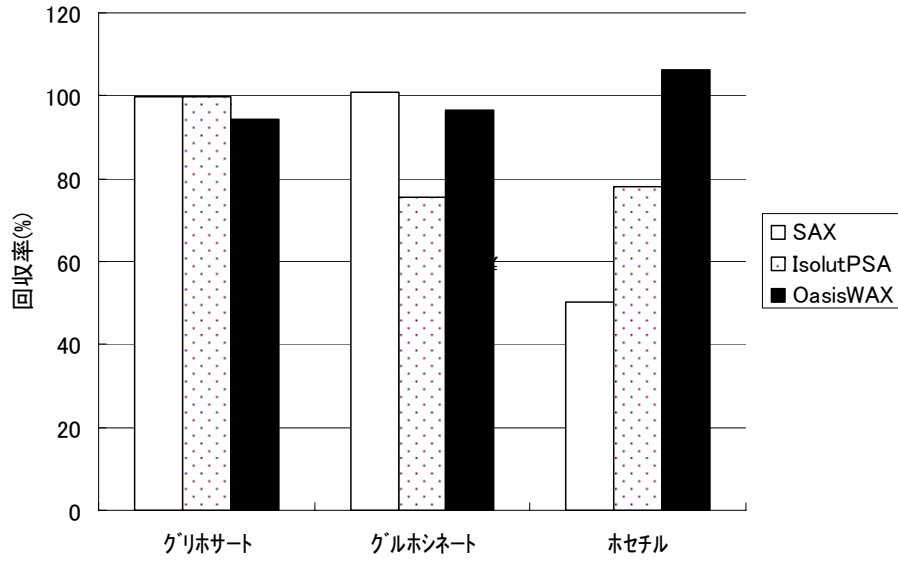


図2 固相の種類と回収率との関係

表4 蒸留水及びゴルフ場排水試料による添加回収試験

農薬名	回収率(%)	
	再蒸留水	ゴルフ場排水
グリホサート	100.2	9.8
グルホシネート	106.6	0
ホセチル	102.4	0

(n=3)

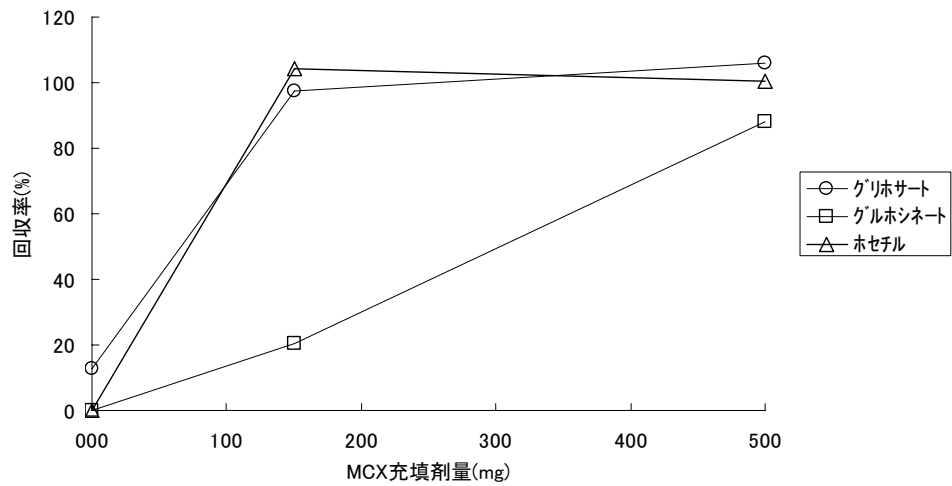


図3 MCX 充填剤量と回収率との関係

(ゴルフ場排水試料 100mL WAX150mg)

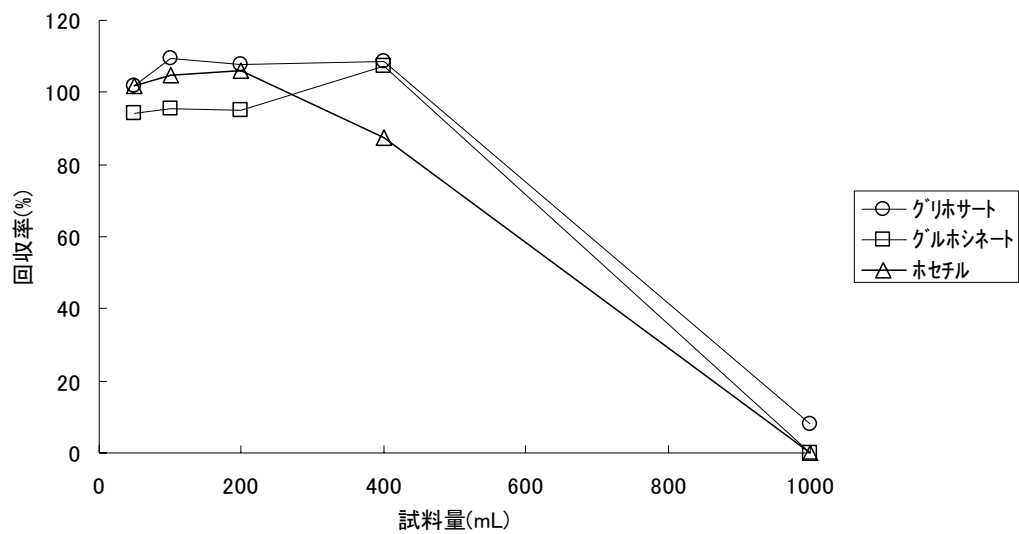


図4 試料量と回収率との関係
(MCX500mg WAX500mg)

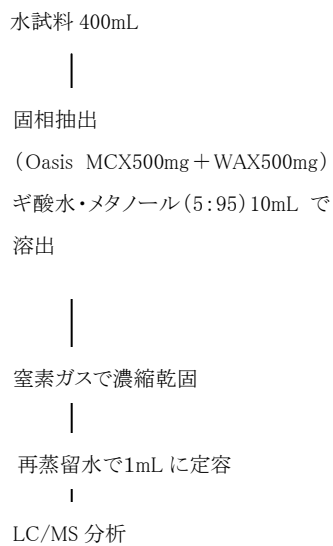


図5 前処理法フローチャート