

# ゴルフ場使用農薬の HPLC 及び GC/MS を用いた分析方法の検討について

穂積哲彦 小林美穂子 中吉憲幸 井上邦雄 藤田晃三

## 要 旨

札幌市のゴルフ場において使用されている農薬のうち、使用量が多いにも拘わらずその分析法が定まっていないものについて、HPLC 及び GC/MS を用いた分析法の検討を行った。対象とした農薬は、HPLC 法でチアメトキサム、クロチアニジン、MCPA、テブフェノジド、ヒメキサゾル、フロラスラム、GC/MS 法でテトラコナゾールである。

検討は 2 段階に分け実施した。最初に濃縮操作を行わずに定量下限 0.5mg/L を目標として行った。次に、固相抽出法を用いてさらに低濃度の定量下限 1 µg/L を目標として検討した。その結果何れの検討においても概ね満足すべき結果が得られた。

## 1. 緒 言

札幌市環境都市推進部では、ゴルフ場で使用される農薬については「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針」(以下指針)に基づいて指定された農薬を使用するように指導している。また使用される農薬の分析法も示されていることから、札幌市内のゴルフ場における農薬による環境影響調査を行っている。

しかし、現実には指定外であるが、低毒性の新規農薬の使用要望が強く、実際に相当量が散布されている。これらの農薬は分析方法が確立されていないため、監視指導業務等に支障をきたすことから、早急に分析方法を開発する必要性が生じている。このため高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及びガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いて分析が可能なもの(分析法があるもの)及び分析できる可能性があるものについて検討を行った。

## 2. 検討内容

HPLC 法による検討は、2 段階に分け実施した。

1 段階目は、目標定量下限値を 0.5mg/L とし検討を行った。指針では LC50 の 1/10 を目途に指針値を設定している。今回検討を行う農薬は、LC50 が 50mg/L 以上であり、実際にゴルフ場を指導するときの市独自の指針値は 5mg/L で良いとの見解から、指針値のさらに 1/10 である 0.5mg/L を定量下限値とした。この値は一般的な農薬の測定濃度より相当高いことから、分析法の開発も容易であり、環境影響調査の早急な実施が可能になるとの考えによる。

第 2 段階目は、目標定量下限値を 1 µg/L に設定した。これは当係での農薬測定では、従来からこの程度を定量下限値としてきたこと、水道の水質基準及び農薬のポジティブリスト制度との比較において、この程度の分析精度が必要であるとの判断である。

GC/MS 法による検討は、1 µg/L に定量下限値を設定した。

### 3. 対象と方法

#### 3-1 測定法と対象とした農薬

HPLC 法でチアメトキサム、クロチアニジン、MCPA、テブフェノジド、ヒメキサゾル、フロラスラム、GC/MS 法でテトラコナゾールである。

なお、MCPA は MCPA イソプロピルアミン塩の分解生成物であり、MCPA の測定から実際のゴルフ場で使用されている MCPA イソプロピルアミン塩を推測しようとするものである。

これらは和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)、Dr.Ehrenstorfer 社製の農薬分析用標準試薬を用い、HPLC はアセトニトリル、GC/MS は添加用をアセトン、検量専用をヘキサンでそれぞれ 1mg/mL とし標準原液とした。

#### 3-2 試薬

##### ・HPLC 用

純水：Milli-Q Elix (ミリポア社)

アセトニトリル、メタノール：残留農薬試験用

リン酸：特級

窒素：高純度窒素 ((株)エア・ウォーター社製)

固相抽出カラム：Oasys HLB 容量 225mg

##### ・GC/MS 用

純水：Mill-Q SP.TOC (ミリポア社)

ジクロロメタン：残留農薬試験用

メタノール：高速液体クロマトグラフィー用

アセトン、ヘキサン：残留農薬試験用

フェナントレン-d10：環境分析用

窒素：高純度窒素 ((株)エア・ウォーター社製)

固相抽出カラム：Sep-Pak Plus PS2 容量 265mg

#### 3-3 装置

##### ・HPLC

フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ (PDA/HPLC)

PDA:Waters 996 Photodiode Array Detector

HPLC:Waters 2690 Alliance

##### ・GC/MS

GC: HEWLETT PACKARD 社 HP6890

MS: HEWLETT PACKARD 社 HP5973

#### 3-4 分析条件

##### ・HPLC

PDA/PLC 使用カラム：Waters GolfPack HR-14

流速：1ml/min. カラム温度：40

移動相組成：

pH3-50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 45 : 55

##### ・GC/MS

カラム：Waters DB5-MS30m×0.25mm×0.25 μm

注入方法：スプリットレス

(パージ流量 20ml/min パージ時間 2min)

昇温条件：60 ~ 15 /min ~ 300 (5min.保持)

インジェクション温度：250

キャリアガス：ヘリウム 1.0ml/min (コンスタントフロー)

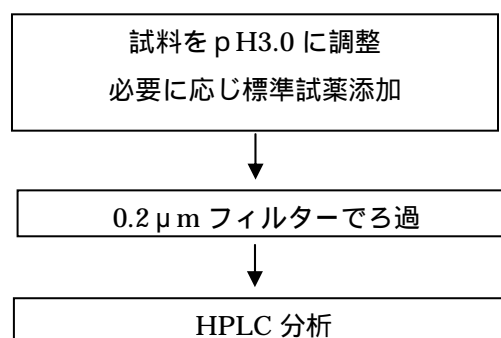
注入量：2 μL

定量イオン：336 確認イオン：337、338

内部標準物質：フェナントレン-d 10

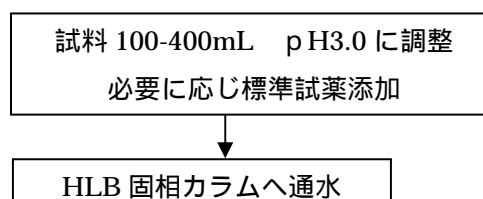
#### 3-5 HPLC (目標定量下限値 0.5mg/L)

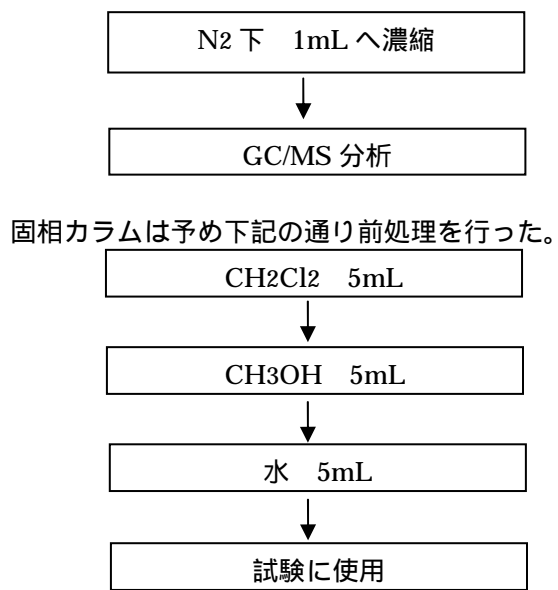
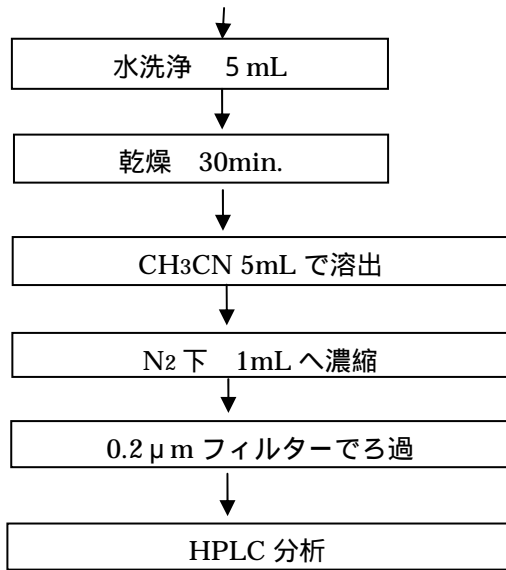
分析フローは以下の通りである。



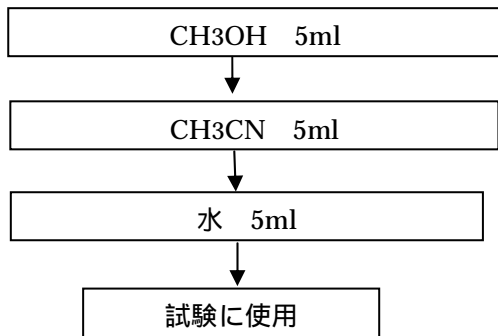
#### 3-6 HPLC (目標定量下限値 1 μg/L)

前処理を含めた分析フローは以下の通りである。

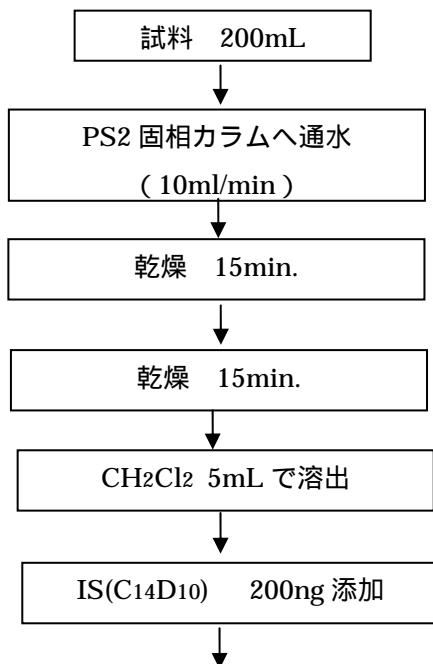




固相カラムは、予め下記の通り前処理をおこなった。



3-7 GC/MS (目標定量下限値 1 μg/L)  
前処理を含めた分析フローは以下の通りである。



#### 4. 結果

##### 4-1 HPLC (目標定量下限値 0.5mg/L)

純水を用い定量下限を検討した結果を表 4-1 に示す。全ての農薬について定量下限値 0.5mg/L を満足することができた。

表 4-1 純水を用いた定量下限値

農薬名	定量下限値 (mg/L)	変動係数 (%)	備考
ヒメキサゾル	0.06	6.7	n=10
チアメトキサム	0.10	1.9	n=10
クロチアニジン	0.07	1.4	n=10
MCPA	0.20	2.5	n=10
テブフェノジド	0.28	14	n=5
フロラスラム	0.30	5.2	n=10

実試料を用いたときの添加回収率を検討した結果を表 4-2 に示す。ヒメキサゾルの回収率は低値であるが、その他の農薬については良好な回収率が得られた。

表 4-2 実試料を用いた回収率

農薬名	ゴルフ場排水回収率 (%)	下水処理水回収率 (%)	備考
ヒメキサゾル	71.4	35.5	n=4, 3
チアメトキサム	96.7	96.1	n=3, 3
クロチアニジン	97.2	97.6	n=3, 3
MCPA	103	103	n=3, 3
テブフェノジド	88.9	100	n=3, 3
フロラスラム	101	98.2	n=3, 3

表 4-3 農薬名と最適測定波長

農薬名	最適測定波長
ヒメキサゾル	210nm
チアメトキサム	250nm
クロチアニジン	260nm
MCPA	225nm
テブフェノジド	260nm
フロラスラム	235nm

なお最適測定波長は、表 4-3 の通りであった。

また、保持時間と上記の最適測定波長の関係を検討したところ、これら 6 種の農薬の一斉分析できる可能性があり、実際に分析したところ良好に分離した。

#### 4-2 HPLC (目標定量下限値 1 μg/L)

純水を用い固相カラムにより濃縮した時の添加回収率は図 4-1 のとおりである。ヒメキサゾルは 100 mL 通水時に回収率 90%程度であったが、200mL 通水時には回収率が 60%弱に低下した。その他の農薬については良好な添加回収率が得られた。

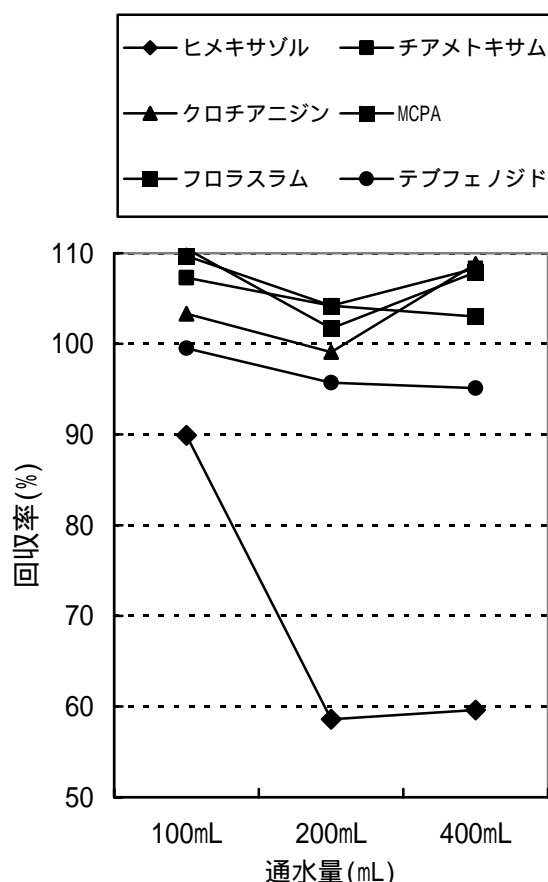


図4-1 純水を用いた添加回収率

添加回収率が良好であったことから、濃縮倍率を考慮し定量下限値を計算したものを表 4-3 に示す。目標としていた定量下限 1 μg/L を概略達成できた。一部達成できていない農薬もあるが、最終液量を調節することにより対処可能と考えられる。

表 4-3 純水を用いた定量下限値

農薬名	固相カラム通水量 200mL 時 の定量下限値(μg/L)	備考
ヒメキサゾル	0.6 (100mL 通水)	n=8
チアメトキサム	0.5	n=8
クロチアニジン	0.35	n=8
MCPA	1.0	n=8
テブフェノジド	1.4	n=8
フロラスラム	1.5	n=8

実試料であるゴルフ場排水を用いた場合の添加回収率を表 4-4 に示す。ヒメキサゾル及びチアメトキサムの回収率は低値であった。その他の農薬については良好であった。

表 4-4 ゴルフ場排水を用いた添加回収率

農薬名	通水量 100 mL 時の回収率(%)	通水量 200 mL 時の回収率(%)	備考
ヒメキサゾル	51.8	32.3	n=6
チアメトキサム	57.2	65.9	n=6
クロチアニジン	82.8	79.2	n=6
MCPA	93.3	89.3	n=6
テブフェノジド	82.7	81.4	n=6
フロラスラム	94.1	79.6	n=6

#### 4-3 GC/MS (目標定量下限値 1 µg/L)

純水を用い固相カラムにより濃縮したときの添加回収率を検討した結果を表 4-5 に示す。いずれの濃度でも良好な回収率が得られた。

表 4-5 純水での添加回収率

試料濃度	回収率 (%)	備考
0.125 µg/L	122	n=10
0.25 µg/L	113	n=10
0.5 µg/L	110	n=10
1.0 µg/L	108	n=10

添加回収率が良好であったことから、濃縮倍率を考慮し定量下限値を計算したものを表 4-6 に示す。目標としていた定量下限値 1 µg/L を十分達成できた。

表 4-6 テトラコナゾールの定量下限値

農薬名	定量下限値 (µg/L)	変動係数 (%)	備考
テトラコナゾール	0.115	8.4	n=10

市内 10 カ所の河川水を用いた場合の平均回収率を表 4-7 に示す。定量下限付近濃度である 0.125 µg/L においても、検量線中央付近濃度である 0.250 µg/L においても概ね良好な回収率が得られた。

表 4-7 河川水を用いた回収率

濃度	0.125 µg/L	0.250 µg/L
回収率 (%)	121	107
変動係数 (%)	5.1	6.8

純水を用いて固相カラムの飽和を検討した結果を表 4-8 に示す。通水量は 200ml とした。著しい飽和は認められないが、試料濃度の増加とともにわずかな回復率の低下がみられた。

表 4-8 高濃度試料水での添加回収率

試料濃度	回収率 (%)	備考
2.0 µg/L	93	n=1
3.0 µg/L	91	n=1
10 µg/L	82	n=1
15 µg/L	86	n=1
20 µg/L	88	n=1
30 µg/L	83	n=1

## 5. 考察

### 5-1 HPLC (目標定量下限値 0.5mg/L)

検討の第 1 段階目としては、濃縮操作なしで当初目標であった定量下限値 0.5mg/L を満足することができ、早期の環境影響評価が可能になった。

変動係数については、フロラスラムは大きかったが、一般的に言われている有機化合物の分析における 20% を満足しており、実用上は十分な値と考えられる。また、ヒメキサゾルの実試料での添加回収率が低値であるのは、共存物質の影響が大きいためであることがわかった。これは最大吸収波長が 210nm 以下であり、この近辺には共存物質の吸収が顕著であることが大きな理由と考えられる。実際の測定の

際には、試料濃度に応じて測定波長を長波長側に設定することにより、ある程度共存物質の影響を回避できると考えられる。なお、保持時間が短いため共存物質と同様な溶出挙動をすることも低回収率の原因と考えられた。

#### 5-2 HPLC (目標定量下限値 1 µg/L)

検討の第2段階目として、定量下限値 1 µg/L についても概ね達成できたが、固相カラムの添加回収率においてヒメキサゾルが低値であった。これは極性が高いことと、破過が起りやすいことから、ヒメキサゾルはカラムへの保持が弱い農薬であると推察された。この対策として、濃度に応じて固相カラム容量の大きなものを使用すること、通水量をできるだけ少量にすることなどより回避できるとも考えられる。

ヒメキサゾル及びチアメトキサムの低回収率のもう一つの原因としては、検討の第1段階同様、両者の保持時間が短いため共存物質の妨害を受けたことが考えられる。濃縮操作を行うことにより共存物質も同時に濃縮されたため、検討の第1段階では目立たなかった回収率の低下が特にチアメトキサムにおいて顕著に現れたとも考えられる。

#### 5-3 GC/MS (目標定量下限値 1 µg/L)

検討の結果、テトラコナゾールの GC/MS 分析が可能で、実試料を用いた回収率に問題はなく、十分実用に耐えるものとする。なお、高濃度試料で回収率の低下がみられたことから、固相カラムの飽和が推察され、分析の際には通水量を調整する必要がある。

#### 5-4 今後のこと

日頃から固相カラムメーカーの新製品開発状況に注目することにより、より効率的な固相抽出の方法を採用できると考えられる。技術的に固相カラムは未だ日進月歩の状況で、目が離せない状況である。

分析機器・方法も HPLC から LC/MS 等への流れ

が主流となってきている。共存物質の影響及び固相カラムによる濃縮が不十分なことは、LC/MS 等の高選択性・高感度検出器のおかげで克服可能と思われる。

今後とも簡便かつ高精度で農薬の一斉分析が可能となるような分析方法の検討を、積極的に進めていきたいと考えている。

## 6. 参考文献

- 1) 上水試験方法 2001年版, 日本水道協会
- 2) 下水道試験方法 1997年版, 日本下水道協会
- 3) JIS K0102 工場排水試験方法, 1998年
- 4) 残留農薬基準ハンドブック, 化学工業日報社
- 5) 残留農薬分析法 2002年, ソフトサイエンス社
- 6) 農薬データブック 1989年, ソフトサイエンス社
- 7) 農薬保留基準ハンドブック, 化学工業日報社
- 8) 化学物質環境実態調査実地の手引き 2005, 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課
- 9) 平成 15 年度札幌市ゴルフ場連絡協議会資料, 札幌市環境局環境対策課

## Detection and Identification of Pesticides Used at Golf Course by HPLC and GC/MS

Tetsuhiko Hozumi, Mihoko Kobayashi, Noriyuki Nakayoshi, Kunio Inoue and Kozo Fujita

Although a lot of kinds of pesticides are used at golf course in Sapporo city, detection and identification methods are not established yet for newly approved pesticides. We developed detection and identification method by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) for those pesticides in spilled rainwater from golf course. HPLC was used for thiamethoxam, clothianidin, MCPA, tebufenozide, hymexazol and florasulam. We developed our HPLC methods aiming at the detection limit of 0.5 mg/L and 1 $\mu$ g/L at the first and second stage, respectively. At the former stage we did not concentrate samples, and we used solid phase extraction to concentrate samples at the latter stage. GC/MS was used for tetraconazole aiming at the detection limit of 1 $\mu$ g/L. We could get the generally accurate and reliable results in all measurements.