

# ISOLUTE® 101 を使用した環境中農薬（シマジン、チオベンカルブ、チウラム）分析のための前処理法

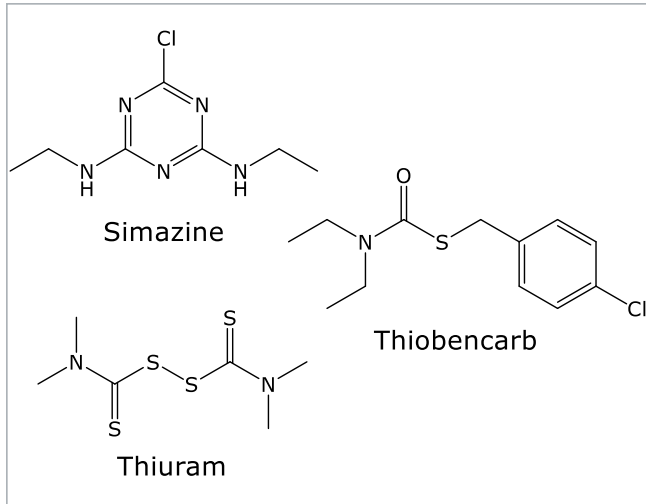


Figure 1. 対象物質構造

## はじめに

このアプリケーションノートでは、ISOLUTE 101を利用した固相抽出による環境試料からの農薬類（シマジン、チオベンカルブ、チウラム）の前処理法を詳しく説明します。

シマジン (simazine, Figure 1) はトリアジン系の除草剤、チオベンカルブ (thiobencarb, Figure 1) はチオカーバメート系の除草剤、チウラム (thiuram, Figure 1) はジチオカーバメート系の殺菌剤として広く用いられている農薬です。これらは環境中から検出される代表的な農薬として、水道法における「水質管理目標設定項目」、水質汚濁に関わる環境基準における「人の健康の保護に関する環境基準」や土壌汚染対策法における「第3種特定有害物質」に指定されており、それぞれにおいて設定された基準値の順守が求められています。また、それぞれの分析法も定められていますが、代表的な公定法である昭和46年環境省告示59号付表5及び付表6では固相抽出法による前処理が認められています。

ISOLUTE 101は、この告示中でも指定されている非修飾型のポリスチレンジビニルベンゼン共重合体 (Figure 2) を基本骨格とした固相抽出カラムです。疎水性相互作用がODSよりも強いいため、水試料中に含まれる幅広い疎水性をもった有機化合物を効率よく捕集できるのが特徴です。

このアプリケーションノートでは、前述の昭和46年環境省告示59号付表5及び付表6に準拠した手法を紹介します。ISOLUTE 101を利用することで、高流速 (100 mL/min) 条件でも高い回収率と良好な再現性が得られます。また、窒素ガスパージのみで脱水乾燥過程が完了するため、分析時間が大きく短縮され、作業が大幅に効率化されます。

## 分析対象

シマジン (Simazine, CAS: 122-34-9)

チオベンカルブ (Thiobencarb, CAS: 28249-77-6)

チウラム (Thiuram, CAS: 137-26-8)

## 前処理手順

### 使用製品

ISOLUTE 101 200 mg/6 mL, part number 101-0020-C

### 試料

試料水 200 mLに10 %EDTA・2Na溶液4 mLを加える。チウラムを測定する場合にはさらに塩酸を加え、pH 3.5に調整する。

### 試料負荷

メタノール5 mL、10 %EDTA・2Na溶液4 mL、精製水15 mLでコンディショニングを行ったカラムに、吸引式ポンプにより、流速 100 mL/minで通液を行う。

### 洗浄・乾燥

精製水10 mLを吸引式ポンプによりカラムに通液 (100 mL/min) して洗浄した後、窒素ガスを30分流して乾燥させる。

### 溶出

シマジン、チオベンカルブにおいてはアセトン5 mL、チウラムにおいてはアセトニトリル5 mLをカラムに緩やかに通し、溶出させる。

### エバポレート&再溶解

シマジン、チオベンカルブ：得られた溶出液を35 °C温浴上で窒素ガス吹付により約1 mLまで濃縮する。濃縮後ヘキサン5 mLにより再溶解し、再度35 °C温浴上の窒素ガス吹付により1 mLまで濃縮し、内標準として10 mg/Lフェナントレン-d<sub>10</sub>を20 µL及び5,000 mg/L PEG (PEG 200 及びPEG 300の1:1混合物) 20 µLを加え、GC/MS測定を行う。

チウラム：得られた溶出液を35°C温浴上で窒素ガス吹付により1 mLまで濃縮する。濃縮した溶出液をそのままバイアルに移し、HPLC/UV測定を行う。

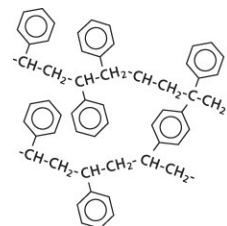


Figure 2. ISOLUTE 101基本骨格

## GC/MS 条件 (シマジン、チオベンカルブ)

### 装置

Agilent GC7890A/5975C

### 分析カラム

HP-5 MS (30 m x 0.25 mm, 膜厚0.25 µm, Agilent)

### キャリアガス

ヘリウム

### カラム流量

1.1 mL/min

### カラム昇温条件

Table 1 参照

### 気化室温度

150 °C

### インターフェース温度

280 °C

### イオン源温度

230 °C

### イオン化法

EI

### MS条件

Table 2 参照

### 注入量

1 µL (スプリットレス)

## HPLC/UV条件 (チウラム)

### 装置

Agilent 1100

### 分析カラム

XDB-C18 (75 mm x 3.0 mm, 3.5 µm, Agilent)

### カラム温度

40 °C

### 移動相

**A:** 水

**B:** アセトニトリル

### HPLC移動相条件

Table 3 参照

### 検出波長

272 nm

### 注入量

10 µL

Table 1. GC カラム昇温条件

Time (min)	温度
0→1	50 °C
2→11.5	(20 °C/min)
11.5→12.5	280 °C

Table 2. MS 条件

	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)
シマジン	201	173
チオベンカルブ	100	72
フェナントレン-d <sub>10</sub>	188	160

Table 3. HPLC 移動相条件

Time (min)	%A	%B
0→2	80	20
2→8	80→10	20→90
8→12	10	90

Table 4. 他社製品利用時との1バッチ当たり処理時間の比較

工程	ISOLUTE 101	他社製品
コンディショニング	約7分	約20分
試料導入	約2分 (100 mL/min)	約15分 (13 mL/min)
脱水工程	30分: 窒素ガスバージ	15分: 遠心分離 30分: 窒素ガスバージ
溶出	約3分	約9分
合計	約42分	約89分



## 結果

Figure 3及び4に、シマジン、チオベンカルブ混合標準液のマスクロマトグラム及びチウラム標準液のクロマトグラムを示しました。

Table 4に1バッチ当たりの各工程毎及び合計の作業時間を比較しました。他社製品（縦列）は告示法に準拠していません。ISOLUTE 101使用（縦列）では、試料導入（流速 13mL/min→100mL/min）と脱水工程（遠心操作の省略）の工程を変更しています。ISOLUTE 101は通液性が高いため、通液速度の高速化が可能でした。更に、遠心分離による脱水工程を省略出来ました。また、コンディショニング及び溶出の工程は告示法に準拠し変更していませんが、ISOLUTE 101の高い通液性の効果により、時間短縮が可能でした。合計の作業時間は、約50分削減出来ました。

この変更した手法を、精製水試料の添加回収試験を用いて、バリデーションを行いました。シマジンとチオベンカルブの検量線は、内標準であるフェナントレン-d10 (0.2 mg/mL) との物質比を横軸に、ピーク面積比を縦軸にしています。試料を200倍濃縮した際に相当する濃度域 (0.05–0.5 mg/mL) において、良好な直線性が得られています。定量下限濃度付近における添加回収試験を行った結果をTable 5に示しました。n=5における3種農薬の回収率及び再現性は、ISOLUTE 101を用いた手法が告示法準拠の他社製品と比較して全て優れておりました。これは、本法が告示法同等以上のメソッドである事を示しております。

湖沼水への添加回収試験も行いました。結果をTable 6に示します。実試料においても、精製水の場合と同程度の高い回収率と良好な再現性が得られていることから、本法は、十分な妥当性をもつ手法であると提案します。

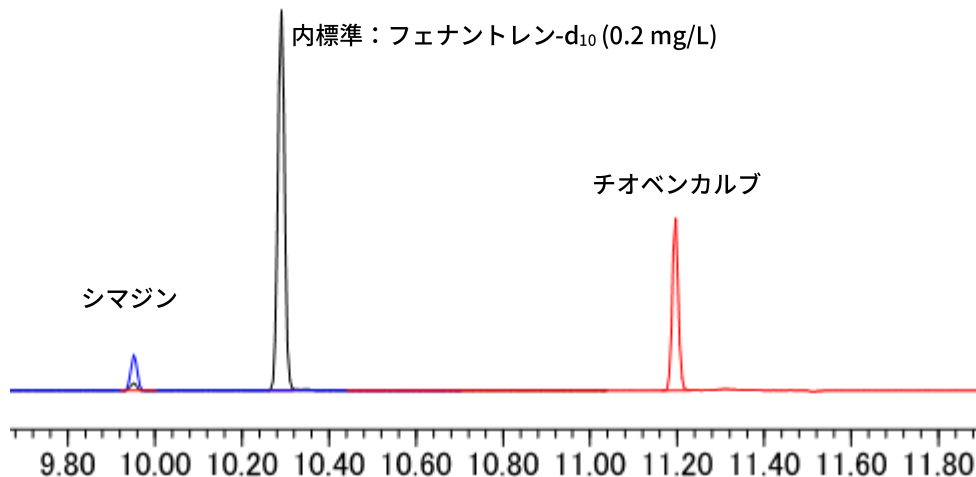


Figure 3. シマジン、チオベンカルブ混合標準液 (0.2 mg/L) におけるマスクロマトグラム(SIM)

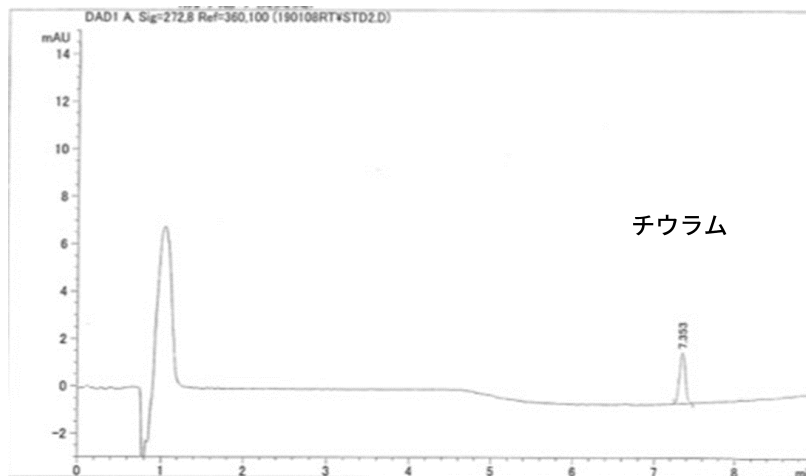


Figure 4. チウラム標準液 (0.25 mg/L) におけるクロマトグラム ( $\lambda = 272 \text{ nm}$ )

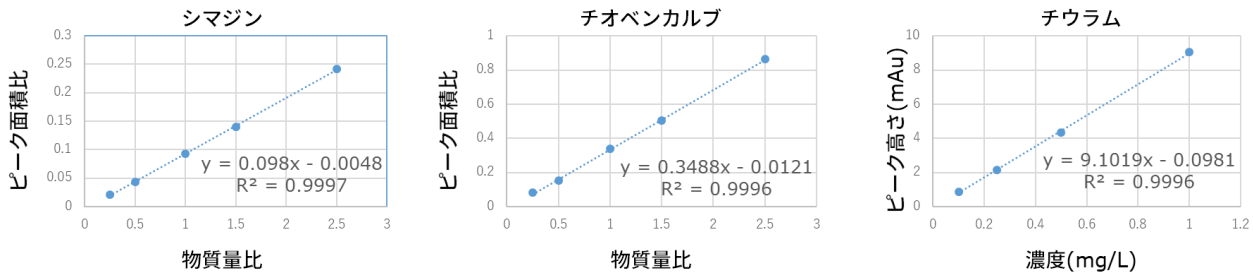


Figure 5. シマジン、チオベンカルブ (0.05~0.5 mg/L) 及びチウラム (0.1~1.0 mg/L) の検量線

Table 5. シマジン、チオベンカルブ、チウラムの測定下限における精製水への添加回収試験結果 (n=5)

試料	平均値 (µg/L)	RSD (%)	回収率 (%)	参考値：他社製品 RSD (%)	参考値：他社製品 回収率 (%)
シマジン (精製水)	0.308	2.18	102.5	1.85	85.9
チオベンカルブ (精製水)	0.295	2.64	98.5	1.62	92.5
チウラム (精製水)	0.532	2.68	106.4	1.54	81.7

Table 6. シマジン、チオベンカルブ、チウラムの測定下限における湖沼水への添加回収試験結果 (n=5)

試料	平均値 (µg/L)	RSD (%)	回収率 (%)
シマジン (湖沼水)	0.318	5.30	106.0
チオベンカルブ (湖沼水)	0.325	4.49	108.3
チウラム (湖沼水)	0.520	6.21	104.0

## まとめ

- ISOLUTE 101を用いることにより、他社同等品を用いた場合 (13 mL/min) よりも、圧倒的に早い流速 (100 mL/min) で試料を通液させる事が出来るようになりました。また、これまで必須であったカラム洗浄後の遠心分離による脱水操作が不要にもなったことから、従来法と同様の再現性と回収率を維持したままで、作業時間を1バッチ辺り約50分削減することが可能となりました。
- TurboVap®LVやBiotage® Horizon SmartPrepなどの自動化装置を利用することで、さらなる作業の効率化が期待できます。

## Ordering Information

Part Number	Description	Quantity
101-0020-C	ISOLUTE 101 200 mg/6 mL	30
415000	TurboVap®LV	1
41964	TurboVap®LV Multi Rack (48 Positions, 10-20 mm Tubes)	1
SPE2-2616	Biotage® Horizon SmartPrep II Extractor Base Module Configured With 6 mL Plunger Assembly	1

本アプリケーションノートは、株式会社総合環境分析様のご協力により作成いたしました。

### お問い合わせ先

本社 : 〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F

TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121

西日本 : 〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-28, 4F

TEL 06-6397-8180 FAX 06-6397-8170

URL <http://www.biotage.co.jp/>

E-mail: [Japan\\_info@biotage.com](mailto:Japan_info@biotage.com)

Part Number: AN190520

© 2019 Biotage Japan. All rights reserved. No material may be reproduced or published without the written permission of Biotage. Information in this document is subject to change without notice and does not represent any commitment from Biotage. E&OE. A list of all trademarks owned by Biotage AB is available at [www.biotage.com/legal](http://www.biotage.com/legal). Other product and company names mentioned herein may be trademarks or registered trademarks and/or service marks of their respective owners, and are used only for explanation and to the owners' benefit, without intent to infringe. This application note is intended for research use only, not for diagnostic use.