

ゴルフ場農薬の多成分同時分離分析と固相抽出挙動 ならびにその水中分解性について*

中山 将人**・波多 宣子***
倉 光 英 樹***・田 口 茂***

キーワード ①ゴルフ場農薬 ②固相抽出 ③水-オクタノール分配定数 ④疎水性相互作用
⑤水中分解性

要 旨

ゴルフ場からの排水に含まれる恐れがある8農薬について、固相抽出を用いた多成分同時分離分析法を検討した。その結果、固相としてSDB(スチレンジビニルベンゼン)、溶出溶媒にアセトンまたはアセトニトリルを用いたところ、回収率、RSDともに良好な値が得られた。また、農薬の固相抽出挙動について、化学物質の疎水性を表わす水-オクタノール分配定数(P_{ow})で考察したところ、 $\log P_{ow}$ が小さい、つまり親水性の農薬が回収率が他よりもやや低く、これは固相との疎水性相互作用が小さいためであると推察された。さらに水中における農薬の分解性について、室内実験を行ったところ、生分解、化学分解、揮発などで濃度減少していくことがわかった。

1. はじめに

ゴルフ場では、芝の生育のため殺虫剤、殺菌剤、除草剤などの農薬を散布する。富山県内には16カ所のゴルフ場があり、2004年における農薬使用量¹⁾は、殺虫剤が7.7t、殺菌剤が4.7t、除草剤が6.3tとなっている。近年、低残留性・低毒性の農薬が使用されているものの、新しく開発された農薬が次々と普及していくことから、これからもゴルフ場の農薬について監視する必要がある。

環境省は、ゴルフ場農薬の暫定的な指針²⁾を示し、排水中の45農薬について指針値を定めている。このうち10農薬は、2001年12月の改正で新たに規制対象となったが、富山県では国の指針値に

基づく県の指導値をまだ定めていない。これまで、既存35農薬の富山県の指導値³⁾は、国の指針値の1/10に設定しており、よりいっそう低い検出限界が求められることから、感度、精度ともに良好な分析の検討が必要である。

これらの背景を鑑みて、本研究では、この10農薬のうち、多成分同時分離分析が可能であるとされる5農薬と、最近ゴルフ場において使用が確認された3農薬あわせて8農薬(シプロコナゾール、テトラコナゾール、トリフルミゾール、プロピコナゾール、以下、G群とする。アゾキシストロビン、シデュロン、ハロスルフロンメチル、フラザスルフロン、以下、H群とする。)について、ディ

*Simultaneous Determination of Pesticides in Effluent from Golf Courses by Solid Phase Extraction and the Retention Behavior of the Pesticides, and Investigation of the Degradation of the Pesticides in Water

**Masato NAKAYAMA (富山県環境科学センター) Toyama Prefectural Environmental Science Research Center

***Noriko HATA, Hideki KURAMITZ and Shigeru TAGUCHI (富山大学理工学研究部(理)) Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama

スク型固相を用いた多成分同時分離分析法を検討するとともに、農薬の固相抽出における挙動を、化学物質の疎水性の目安となる水-オクタノール分配定数^{4),5)} (P_{ow})で考察した。さらに、農薬の水中の分解性について室内実験により検証した。

これら8農薬の構造および使用状況を図1および表1に示した。すでに多くのゴルフ場で使用されていることが分かる。G群はすべて殺菌剤であり、構造的な特徴としてC(炭素)とN(窒素)の複素環(トリアゾールもしくはイミダゾール)を有している。作用は菌類のステロール生合成を阻害し死滅させる。H群はアゾキシストロピンが殺菌剤で残りは除草剤である。このうちハロスルフロロンメチルとフラザスルフロロンはスルホニル尿素系除草剤⁶⁾であり、高い除草活性ときわめて低毒性であることからもっとも注目されている除草剤である。作用は雑草のアセトラクテート合成酵素を阻害し、枯死させる。

2. 方 法

2.1 試 薬

農薬は和光純薬工業の残留農薬試験用標準品を使用し、G群はアセトンに溶かして0.5mg/Lとしたものを、H群はアセトニトリルに溶かして10mg/Lとしたものを標準原液とし、適宜希釈して使用した。

アセトン、アセトニトリル、メタノールなどの有機溶媒は、和光純薬工業の残留農薬試験用標準品を使用した。

超純水はミリポア社製超純水装置システム Milli-Q で精製したものを使用した。

GC/MS測定において、マトリックス効果の影響を低減するために試料に添加する内部標準物質クリセン d_{12} は和光純薬工業製を使用し、アセトンに溶かして20mg/Lとしたものを使用した。

2.2 固相抽出装置

固相は3M社製エムポアディスク SDB-XD(ϕ 47

表1 富山県内のゴルフ場における農薬の使用状況(2004年)

農 薬		使 用 ゴルフ場数	散 布 量 (kg または L)	散布面積(m ²)
G	シプロコナゾール	3	20.4	181,000
	テトラコナゾール	9	206.5	956,200
	トリフルミゾール	2	53.8	67,000
	プロピコナゾール	7	307.9	667,450
H	アゾキシストロピン	14	200.9	655,771
	シデュロン	7	170.0	76,018
	ハロスルフロロンメチル	11	67.5	1,760,196
	フラザスルフロロン	5	4.7	94,067

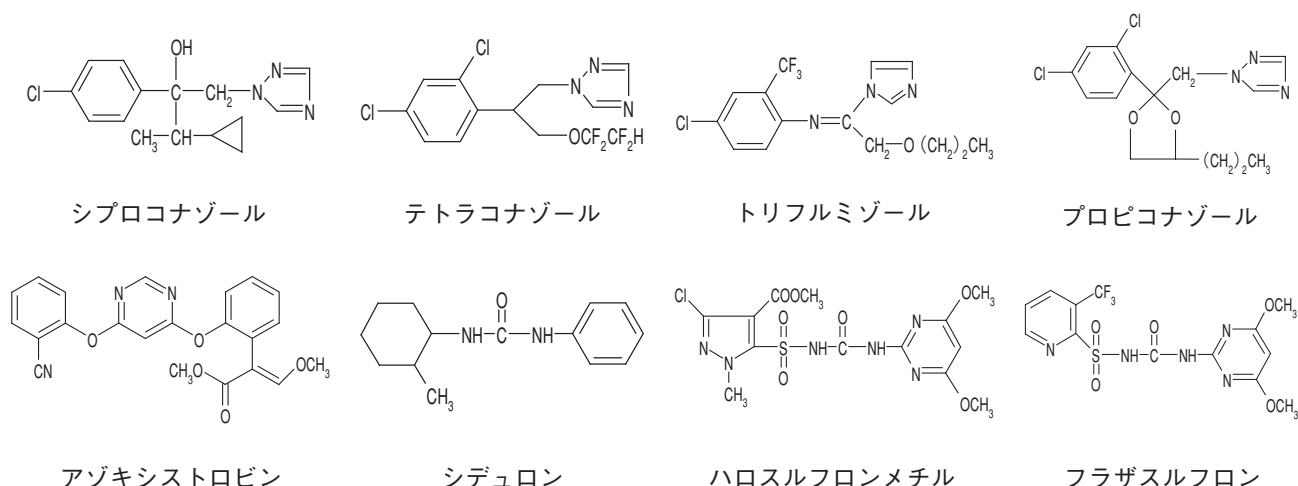


図1 農薬の構造

mm)を使用した。これは、スチレンジビニルベンゼン共重合体で構成されている固相である。これをGLサイエンス社製のマニホールドにセットし、吸引しながら抽出した。なお検体に懸濁物質が多い場合は、あらかじめアドバンテック東洋社製ガラス繊維ろ紙(φ47mm)でろ過し、ろ紙残留物は超純水で洗浄した後、ろ液に加えた。

2.3 分析装置

G群の農薬を測定するガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)はアジレント社製HP 5890/5972を使用した。また、H群の農薬を測定する高速液体クロマトグラフ(HPLC/UV)はアジレント社製HP 1100を使用した。それらの条件を表2および表3に示した。

さらに、農薬の水における分解生成物を測定する液体クロマトグラフ質量分析計(LC-ESI/MS)は、ウォーターズ社製2690 Separations Module(LC)とMICROMASS[®] Quattro micro(ESI/MS)を用いた。測定条件を表4に示した。

3. 結果および考察

3.1 超純水を用いた添加回収試験

農薬混合標準液を、G群は0.001mg/L、H群は0.02mg/Lとなるように超純水に溶解し、添加回収試験を行った。

この結果とこれまでの農薬の固相抽出による分析法⁷⁾⁻¹⁰⁾を参考にして、以下のような分析法を確立した。

3.1.1 G群農薬

ディスク型固相SDB-XDをアセトンで超音波洗浄し、マニホールドにセットした後、アセトン5mL、メタノール5mL、超純水10mLでコンディショニングを施す。試料水500mLを通水し、固相を30%(v/v)メタノール水で洗浄した後、吸引脱水する。固相の農薬をアセトン5mLで2回溶出させ、ロータリーエバポレーター、窒素気流で1mLに濃縮する。クリセン d_{12} を0.2 μ g添加しGC/MSで測定する。

3.1.2 H群農薬

ディスク型固相SDB-XDをマニホールドにセットした後、アセトニトリル5mL、超純水10

表2 GC/MSの条件

カラム オープン キャリアガス 注入量	HP-5MS(Agilent, 30m×0.25mm×0.25 μ m) 50°C(2min)–30°C/min–170°C(4min)–10°C/min–270°C(3min) He, 1mL/min スプリットレス, 2 μ L		
農薬	RT(min)	m/z	
		Tg	Q1
テトラコナゾール	15.91	336	159
トリフルミゾール	16.90	206	278
シプロコナゾール	18.21	222	139
プロピコナゾール	19.24, 19.37	173	259

表3 HPLC/UVの条件

カラム オープン 溶離液 注入量	RSpak GOLF-413(Shodex, 4.6×150mm) 40°C 25mM KH ₂ PO ₄ 水溶液:アセトニトリル=50:50(pH3.3), 1mL/min 20 μ L	
農薬	RT(min)	波長(nm)
フラザスルフロン	7.67	240
シデュロン	8.98	240
アゾキシストロピン	10.31	235
ハロスルフロンメチル	12.41	245

表4 LC-ESI/MSの条件

カラム オープン 流量	Atlantis® dc18 3μm (Waters, 2.1×150mm) 40℃ 0.2mL/min		
溶離液および グラジェント	A: 0.5%ギ酸水 B: 0.01%ギ酸メタノール		
	時間 (min)	A (%)	B (%)
	0	50	50
	2	60	40
	20~23	10	90
	23.01~37	95	5
注 入 量	20μL		
イオン化モード キャピラリー電圧 コーン電圧, ガス流量 脱溶媒温度, ガス流量 イオン源温度	ESI ポジティブモード 3kV 25V, N ₂ 50L/hr 350℃, N ₂ 500L/hr 120℃		

mLでコンディショニングを施す。あらかじめpH 3.3に調製した試料水500mLを通水し、固相を10% (v/v)アセトニトリル水で洗浄した後、吸引脱水する。固相の農薬をアセトニトリル5 mLで2回溶出させ、ロータリーエバポレーター、窒素気流で1 mLに濃縮し、HPLC/UVで測定する。

3.1.3 回収率とRSD

上記の方法での添加回収試験の結果、回収率は90.6~99.3% (G群), 90.0~102% (H群), 相対標準偏差(RSD)は4.9~7.3% (G群), 0.8~1.5% (H群)であり、ともに良好な結果が得られた。また、農薬の固相抽出における挙動を、物質の疎水性の目安となる水-オクタノール分配定数 (P_{ow}) を用いて考察した。回収率と $\log P_{ow}$ の関係を図2(a)に示す。トリフルミゾールとフラザスルフロンは他の農薬に比べてやや低い回収率であったが、これは $\log P_{ow}$ が小さく、固相との疎水性相互作用がやや弱いためであると考えられた。

3.2 河川水を用いた添加回収試験

ゴルフ場からの排水は、しばしば懸濁物質(SS)を含み、農薬の定量に影響を与える。そこでゴルフ場排水と性状が似ている河川水を用いた添加回収試験を行い、SSによる影響を調べた。なお試験水は固相抽出の前にガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ紙残留物は超純水5 mLで2回洗浄した後、ろ液に加えた。

この結果、回収率は81.3~98.1% (G群), 82.7~101% (H群), 相対標準偏差(RSD)は4.2~7.3%

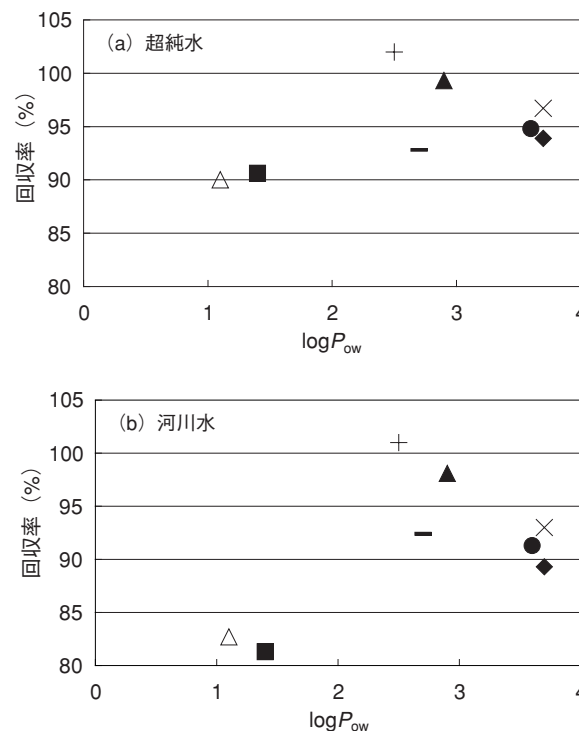


図2 回収率と $\log P_{ow}$

G群: ▲シプロコナゾール ◆テトラコナゾール
 ■トリフルミゾール ×プロピコナゾール
 H群: +アゾキシストロビン -シデュロン
 ●ハロスルフロメチル △フラザスルフロ

(G群), 1.2~2.8% (H群)であった。回収率と $\log P_{ow}$ の関係を図2(b)に示した。超純水での結果と比べると回収率は全体的にやや低くなった。これは、ガラス繊維ろ紙で除去できなかった夾雑物が固相に吸着し、農薬の抽出挙動に影響を与えたのではないかと考えられた。しかしながら、回

収率80%以上、RSD10%以下であることから、この方法でゴルフ場排水中の8農薬を精度よく定量できるものと考えられた。

3.3 水中での農薬の分解

ゴルフ場で散布された農薬は、土壤に浸透して生分解もしくは化学分解によってほとんど消失していくものと考えられるが、その一部は河川や湖などの公共用水域に排出される恐れがある。土壤中の8農薬の分解についてはいくつか報告^{11),12)}があるが、水中での分解に関する研究は少ない。よって、ゴルフ場排水中の8農薬の分解について、約40日間にわたる調査を行った。

この分解試験では以下の3つのタイプの試料水を用意した。

- (1) ゴルフ場排水に農薬を添加した試料水。
100mLの試料水を300mL三角フラスコに移し、蓋をせずに攪拌しながら恒温槽で20℃に保った。数日後、引き上げて前述の分析法で8農薬を定量した。この試料水は微生物を含む水として想定している。なお、使用したゴルフ場排水に8農薬は検出されず、その水質は、pH:7.0, SS:5.8mg/L, BOD:2.0mg/L, COD:2.8mg/L, 全窒素:1.24mg/L, 全りん:0.037mg/Lであった。
- (2) 超純水に農薬を添加した試料水(蓋なし)。
(1)と同じく100mL試料水を300mL三角フラスコに入れて、蓋をせずに攪拌しながら恒温槽で20℃に保った。この試料水は微生物を含まない水として想定している。
- (3) 超純水に農薬を添加した試料水(蓋あり)。
試験中に農薬が揮発しないように100mLフランびんに試料水を入れ、恒温槽で20℃に保った。なお農薬の設定濃度は、G群は国の指針値が決められているプロピコナゾール(0.5mg/L)を参考に、富山県の指導値がその1/10になることを想定して0.05mg/Lとした。また、H群は国の指針値のうちもっとも低いハロスルフロンメチルとフラザスルフロン(0.3mg/L)を参考に、0.03mg/Lとした。

その結果、アゾキシストロビン、シデュロン、シプロコナゾール、テトラコナゾール、プロピコナゾールについては、約40日間の試験ではほとんど分解または揮発は観測されなかったが、トリフ

ルミゾール、ハロスルフロンメチル、フラザスルフロンについては濃度の低下がみられた。

トリフルミゾールの結果について図3(a)に示した。(1)ゴルフ場排水と(2)超純水(蓋なし)の比較ではその濃度減少がほぼ同じ割合であり、さらに、(2)超純水(蓋なし)と(3)超純水(蓋あり)を比較すると(3)の減少割合が小さいことから、水中のトリフルミゾールは主に揮発と化学分解によって消失し、生分解はほとんど発生しないものと考えられた。また、この結果から推定される水中半減期はおよそ15日であった。

ハロスルフロンメチルの結果を図3(b)に示した。(2)超純水(蓋なし)と(3)超純水(蓋あり)の比較ではその濃度減少がほぼ同じ割合であり、さらに(1)ゴルフ場排水と(2)超純水(蓋なし)を比較すると(1)の減少割合が大きいことから水中のハロスルフロンメチルは、揮発は生じず、主に生分解と化学分解によって消失していくものと考えられた。また、この結果から推定される水中半減期はおよそ15日であった。

フラザスルフロンの結果を図3(c)に示した。(1)ゴルフ場排水、(2)超純水(蓋なし)、(3)超純水(蓋あり)ともにその濃度減少がほぼ同じ割合であることから、水中のフラザスルフロンは揮発と生分解はほとんど生じず、主に化学分解によって消失していくものと考えられた。また、この結果から推定される水中半減期はおよそ17日であった。

これらの結果について、土壤と水では試料の形態は異なるが、農薬の土壤半減期と比較した。農薬開発者は、農薬を農薬取締法に基づき登録する際に土壤半減期を明示し、また、それが1年を超えてはいけない。8農薬の土壤半減期を表5に示した。分解等が確認されなかった5農薬の土壤半減期は31~120日と長く、分解等が確認された3農薬は<7~30日と比較的短いことから、この実験結果は妥当なものと考えられた。

3.4 水中における農薬の分解生成物

水中での分解が確認されたトリフルミゾール、ハロスルフロンメチルおよびフラザスルフロンについて、その分解生成物をLC-ESI/MSにより調べた。

LC-ESI/MSではエレクトロスプレーイオン化(ESI)によるソフトなイオン化が行われ¹³⁾、GC/MS

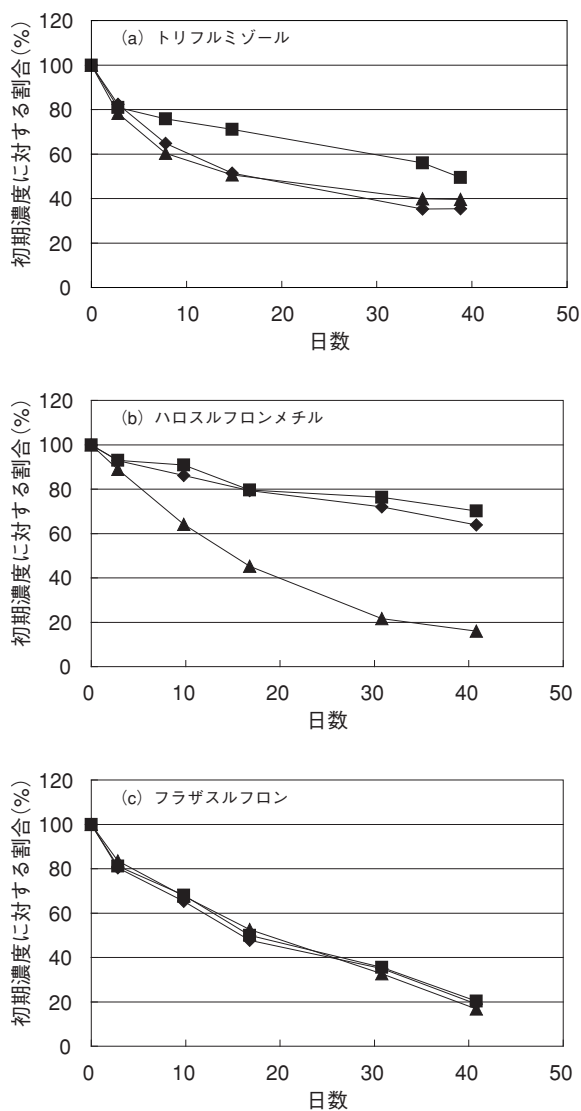


図3 農薬の分解曲線

▲ゴルフ場排水 ◆超純水(蓋なし) ■超純水(蓋あり)

表5 農薬の土壌半減期

農 薬		土壌半減期(日)
G	シプロコナゾール	50~70
	テトラコナゾール	56~81
	トリフルミゾール	14
	プロピコナゾール	120
H	アゾキシストロビン	31~93
	シデュロン	90
	ハロスルフロメチル	7~30
	フラザスルフロン	<7

で多用されている電子イオン化(EI)と異なり、測定物質が解離することなくMS部に導入される。

それぞれの農薬を超純水およびゴルフ場排水に

5 mg/Lとなるよう添加した100mLの試料水を300mL三角フラスコに移し、蓋をせずに攪拌しながら恒温槽で20℃に保った。約10日後引き上げて、試料水10mLをガラス繊維ろ紙でろ過したのち、濃縮せずにLC-ESI/MSで測定した。

トリフルミゾールについて、これまでいくつかの分解生成物や分解経路についての報告^{14),15)}がなされており、これらに基づいて分解生成物の同定を試みた。しかし、これまでの分解生成物は官能基として塩素を有しており、塩素同位体比(³⁵Cl:³⁷Cl=3:1)の情報を持つマススペクトルが観測されるはずであるが、質量数が2異なり、強度比が3:1となるマススペクトルは観測されなかった。この原因についてははっきりとはわからないが、分解生成物を特定するためには、LC-ESI/MSなどの測定の諸条件を検討しなければならないことなどが考えられた。

ハロスルフロメチルについては、図4(a), (b)のように[M+H]⁺=254.22, 156.17となる物質が主に観測された。これまで図5のように土壤中スルホニル尿素系農薬の加水分解が報告されている¹⁵⁾が、今回のLC-ESI/MSによる測定の結果、超純水およびゴルフ場排水を用いた試料水から検出された主な分解生成物は、この加水分解による生成物であると推察された。さらに、[M+H]⁺=254.22の分解生成物は塩素を有するため図4(c)のように質量数が2異なるマススペクトルが観測された。

フラザスルフロンについても、ハロスルフロメチルと同様に加水分解による生成物が主に観測された。そのイオンクロマトグラフを図6に示す。なおフラザスルフロンは塩素を有せず、このため同位体比による情報は得られなかった。

4. ま と め

ゴルフ場で使用されている8農薬について、固相抽出を用いた多成分同時分離分析法を、超純水および河川水による添加回収試験で検討した。その結果、固相としてSDB、溶出溶媒にアセトンまたはアセトニトリルを用いたところ、回収率、RSDともに良好な値が得られ、ゴルフ場排水の測定に十分利用できることがわかった。

農薬の固相抽出挙動について、水-オクタノー

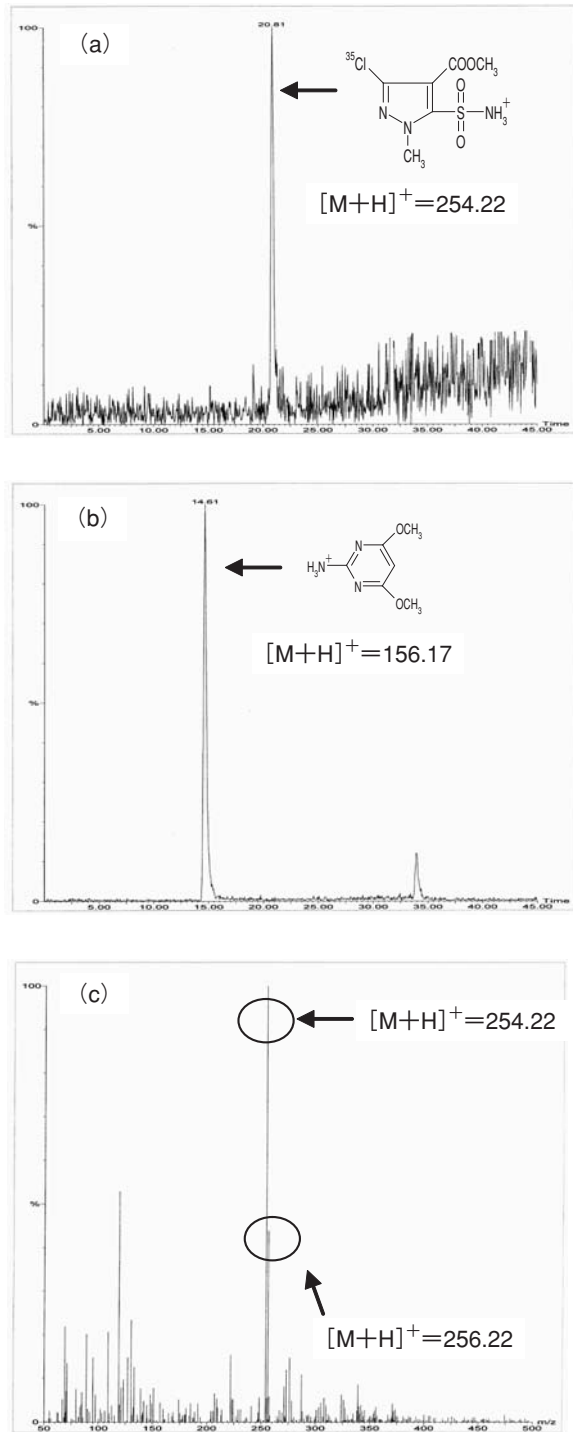


図4 ハロスルフロンの分解生成物のイオンクロマトグラム((a), (b))とマススペクトル((c))

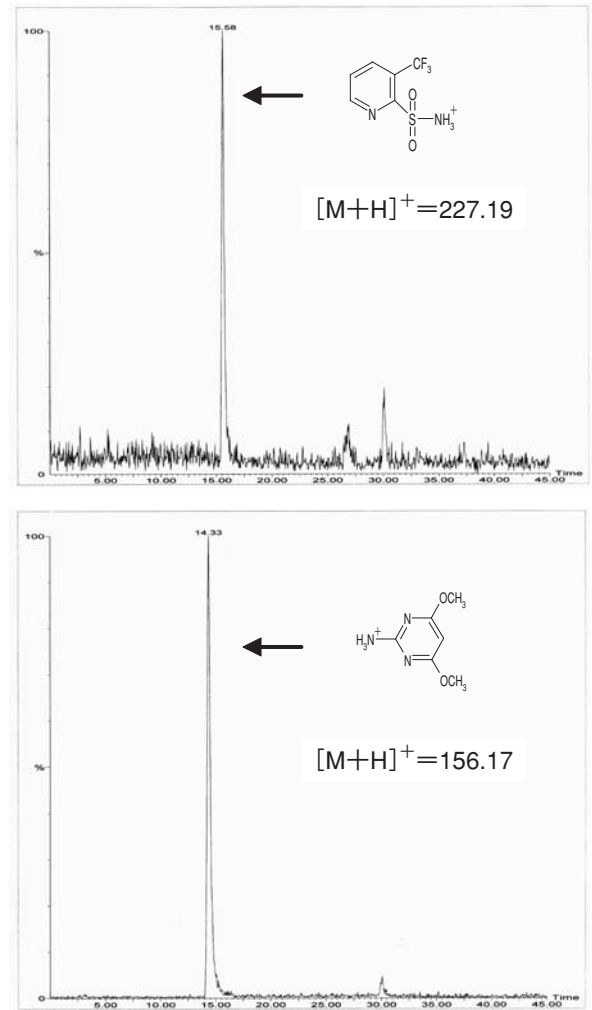


図6 フラザスルフロンの分解生成物のイオンクロマトグラム

分配定数(P_{ow})で考察したところ、 $\log P_{ow}$ が小さい、つまり親水性の農薬であるトリフルミゾールとフラザスルフロンの回収率が低く、これは固相との疎水性相互作用が小さいためであると推察された。

さらに水中における農薬の分解性について、室内実験を実施したところ、トリフルミゾール、ハロスルフロンの分解性を示した。分解生成物をLC-ESI/MSで測定したところ、ハロスルフロンの分解生成物として

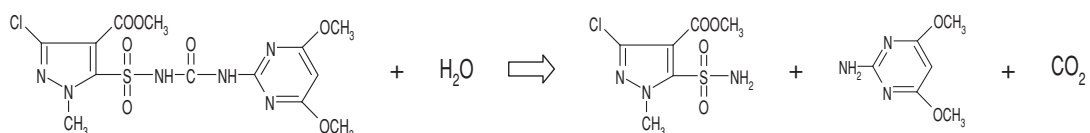


図5 ハロスルフロンの加水分解

スルフロンは加水分解による生成物が主に生じていることがわかった。

これにより、ゴルフ場で使用される農薬の水中における挙動について、およそ明らかにすることができた。

—引用文献—

- 1) 富山県：富山の農業年報，2004
- 2) 環境省：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁防止に係る暫定指導指針，2001
- 3) 富山県：富山県ゴルフ場農薬安全使用指導要綱，1998
- 4) Haeberlein M., Brinck T.: Prediction of water octanol partition coefficients using theoretical descriptors derived from the molecular surface area and the electrostatic potential. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, 289-294, 1997
- 5) Zissimos M. A., Abraham H. M., Barker C. M., Box J. K., Tam Y. K.: Calculation of Abraham descriptors from solvent water partition coefficients in four different systems; evaluation of different methods of calculation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, 470-477, 2002
- 6) Russell H. M., Saladini L. J., Lichtner F.: Sulfonylurea herbicides. *Pesticide Outlook*, **13**, 166-173, 2002
- 7) 荒川久雄，笠井信善，藤平蔵芳光，浦谷一彦：水質汚濁物質の測定方法に関する研究(第2報)，富山県環境科学センター年報，**22**，94-98，1994
- 8) 秋山由美，吉岡直樹，矢野美穂，辻 正彦：残留農薬多成分分析法の新規農薬への適用，兵庫県立衛生研究所年報，**31**，117-125，1996
- 9) Young S. M.: Preparation of environmental samples for determination of sulfonylurea herbicides by solid-phase extraction using a polymeric sorbent. *J. AOAC Int*, **81**, 99-104, 1998
- 10) Akiyama Y., Yoshioka N., Tsuji M.: Studies on pesticide degradation products in pesticide residue analysis. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **39**, 303-309, 1998
- 11) Gardner S. D., Branham E. B.: Effect of Turfgrass Cover and Irrigation on Soil Mobility and Dissipation of Metolachlor and Propiconazole. *J. Environ. Qual.*, **30**, 1612-1618, 2001
- 12) Dermiyati, Kuwatsuka S., Yamamoto I.: Degradation of the Herbicide Halosulfuron-methyl in Two Soils under Different Environmental Conditions. *J. Pesticide Sci.*, **22**, 282-287, 1997
- 13) 環境省：LC/MSを用いた化学物質分析法開発マニュアル，2000
- 14) Kobayashi H., Jimbo Y., Matano O., Goto S.: Stability of Triflurzinol and Its Metabolites in Extracts from Crops. *J. Pesticide Sci.*, **16**, 405-411, 1991
- 15) Gomyo T., Morishima Y., Yamazaki S., Dairiki H., Ono S., *Anal. Sci.*, **7**, 579-584, 1991