

Technical Note

大容量試料導入—高速液体クロマトグラフィー法を用いる
水道中ジクワットの迅速分析

吉川循江*、堀切佳代、前沢 仁

Rapid Determination of Diquat in Tap Water by
HPLC with Large-Volume Sample Injection

Yukie Kikkawa, Kayo Horikiri, Hitoshi Maezawa

Yokohama City Institute of Health, 1-2-17 Takigashira, Isogo, Yokohama, Kanagawa 235-0012

Abstract

Solid-phase extraction/HPLC method had been commonly used for the determination of diquat as a herbicide in tap water. Though the concentration of diquat in the drinking water was can be quantitatively determined down to only 1/5 of the target value adopted in water quality management (0.005 mg/L). However, simple and quick measurement was achieved by injecting a 500 μ L-volume of sample solution onto a HPLC column instead of the solid-phase extraction commonly used for diquat analysis. The signal-to-noise ratio for concentration at 50 μ g/L of the target value was 10 or greater, with the repeatability with 6.7% as RSD, and the sensitivity and repeatability were both satisfactory. In spike recovery tests using mineral water and tap water, the recovery was almost 100% for a diquat at a concentration of 0.0005 mg/L.

Keywords: Diquat, Solid-phase extraction, HPLC, Large-Volume Injection Sample Water analysis

1. 緒言

田畑に限らず公園や駐車場などで除草剤として使用されているジクワット (1,1'-エチレン-2,2'-ビピリジニウム ジブロミド、Mw : 344.05) は、バラコートとの混合製剤として販売されている。ジクワットは日本では使用量が多い農薬のひとつであり、2008年度の化学物質排出移動量届出制度 (Pollutant Release and Transfer Register: PRTR) データ[1]によると、1年間に230tあまりが環境中に排出されたと見積もられている。日本における水道水の水質管理目標設定項目のうち農薬類 (102項目) は各農薬に設定された目標値の1/100の低濃度から目標値まで検査することが求められている。し

たがって、ジクワットは水質管理目標値が0.005mg/Lであるから、検査方法として必要な濃度範囲は0.00005mg/L~0.005mg/Lである。現在、検査方法[2](以下、通知法)として示されている固相抽出—HPLC法 (SPE-HPLC法) では固相抽出操作で100倍に濃縮して感度を稼いでいるにもかかわらず、定量下限値の目安として示されている値は試料中の濃度として0.001mg/Lである。ジクワットが使用量の多い農薬であるにも関わらず、検出事例があまり報告されないのは、通知法の定量下限値が高いことが一因と考えられる。

定量下限付近での再現性が良好でないことから感度の向上を目的として、飲用水中の農薬の分析にシングル四重極LC

横浜市衛生研究所

〒235-0012 横浜市磯子区滝頭1-2-17

Tel: 045-754-9811

Fax: 045-754-2210

E-mail: yu00-kikkawa@city.yokohama.jp

-MS (ESI) を適用した例が報告されている[3]。分離には HILIC カラムを用い、移動相にはアセトニトリルとギ酸アンモニウムを用い、イオンペア剤を用いていない。この方法の検出下限値は0.025mg/Lで感度は十分とはいえない。最近の質量分析装置の高感度化にともなって、検出器にMS/MSを用いた分析も報告されている。ターボイオンプレートリプル四重極 LC-MS/MS 法[4]の検出下限値は0.0003mg/L、飛行時間型 LC-MS 法[4]では0.0034mg/Lであり、十分な感度が得られない。

装置の感度向上とともに前処理方法を検討して、ジクワットの大容量試料濃縮を実現するために、固相抽出カラムの種類や溶出溶媒[3,5,6]を検討する試みも実施されたが、固相抽出操作を組み合わせることで、試料中の濃度として0.00005 mg/Lの濃度を定量できたのは、on-line SPE-LC-MS/MS 法[4]および SPE-LC-MS 法[3]のみであった。いずれも500倍に濃縮することからマトリックス成分の影響を避けられず、また回収率や再現性が低いことからジクワット-d4を用いたサロゲート法による定量値の補正が必要とされている。いずれにせよ固相抽出操作が煩雑であり高額な機器を要することから日常の検査に利用するのは難しい。このため、厚生労働省健康局水道課長が設置する水道水質検査法検討会[6]では方法の改善が継続審議されている。

一方、ジクワットを含む製品を用いた自殺や清涼飲料水などへの混入による犯罪の際に行われる検査では、飲食物、血液、尿中の様々な夾雑物とその検査の妨害になる。そのために夾雑物を取り除くことを目的とした固相抽出操作による前処理法が検討されている[7]。しかし、これらの検査に用いられたジクワットの濃度は2 mg/L[7]であり、水道水検査に求められている濃度範囲(0.00005mg/L~0.005mg/L)よりも3桁も濃度が高いため、これらの方法をそのまま飲用水検査に応用することは難しい。この他、血清などの夾雑物からジクワットの選択性を高めるためポストカラム標識法[8]が用いられている。

飲用水の農薬検査で用いられる固相抽出は夾雑物の除去よりも目的成分の濃縮がその主な目的であると考えられる。したがって、カルボフラン、カルバリル、メソミルの農薬検査では、固相抽出操作をせずにろ過した試料500 μ LをHPLC-ポストカラムに直接導入する方法が示されている[2]。ジクワット検査法でLC/ESI-MSへ試料200 μ Lを直接注入する方法[9]では、カラムにODSを用い、移動相および試料にはMS検出器にも対応できるイオンペア剤としてノナフルオロ吉草酸(NFPA)を添加している。この方法の検出下限値は0.0002mg/Lで感度は十分とはいえない。

そこで、ジクワットを0.00005mg/L濃度まで精度よく、より簡便で迅速に測定することを目的に、通知法として示されている固相抽出-HPLC法の固相抽出操作を省略して大容量試料を直接HPLCに導入する方法を検討したので報告する。

2. 実験

2.1 試薬

ジクワット標準品には和光純薬製ジクアトジプロミド一水和物標準品を使用した。1-ペンタンスルホン酸ナトリウムは和光純薬製イオンクロマトグラフ用を、ジエチルアミンは和光純薬製試薬特級を、リン酸は関東化学製試薬特級をそれぞれ使用した。またEDTAは同仁化学より購入した。

1) ジクワット標準原液、標準溶液の調製

ジクワットはジクワットジプロミドともジクアトジプロミドとも称され、厚生労働省による目標値はジクワット(Mw=184)として重量濃度で規定されている[10]。そこで、標準溶液は次の通り調製した：ジクワット標準原液(50mg/L)はポリプロピレン製メスフラスコを用いてジクアトジプロミド一水和物標準品4.92mgを精製水に溶かして50mLとした。次に、標準原液50mg/Lから0.2mg/L溶液、0.02mg/L溶液を調製した。また、0.2mg/L溶液から0.005mg/L溶液を順次希釈して調製した。標準溶液0.00005、0.0001、0.0002、0.0005、0.001mg/Lはジクワット標準溶液0.005mg/Lから調製した。また、0.002mg/L溶液は0.02mg/L溶液から調製した。

2) 移動相の調製

HPLC用移動相は、1-ペンタンスルホン酸ナトリウム3.0g、ジエチルアミン10mL、リン酸13.5mLを精製水に溶解し、1Lとした。

3) EDTA溶液の調製

EDTA \cdot 2Na(10g)を精製水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液(20g/L)を数滴加え(pH4.6)100mLとした。

2.2 試料

ボトルドウォーターA(硬度30、採水地山梨県、鉱水)及びボトルドウォーターB(硬度62、採水地フランス、鉱泉水)を使用した。ボトルドウォーターは水道水を代表する試料として、硬度、TOCなどが異なる2種を選択した。遊離残留塩素を含む水道水(硬度54~62)を当所(横浜市衛生研究所、神奈川県横浜市)給水栓から採水して使用した。

実試料としては、横浜市内の地下水を水源とする自己水源型専用水道9施設から原水8試料及び浄水9試料を2009年6月~2009年8月に採水して使用した。なお、ショッピングセンターなど自己水源型専用水道施設では各施設の敷地内から汲み上げた地下水を浄水処理設備にて凝集沈殿、塩素系消毒剤添加等の処理過程を経て浄水として施設内に供給している。

1) 試料の調製

試料は全てポリテトラフルオロエチレン製容器に採水した。濁度1以上の試料についてはろ過して用いた。

2) 添加回収試験

添加回収試験用溶液0.0001、0.0005、0.005mg/Lは、試料にジクワット標準溶液0.005mg/Lを20 μ L、0.02mg/Lを25

μL、0.2mg/L を25μL 添加し、全量 1 mL としたものを用いた。

2.3 ジクワットの HPLC 分析

ジクワットの分離条件は、通知法[2]に準じて移動相にペンタンスルホン酸ナトリウム、カラムにはオクタデシルシリル化シリカゲルカラムを用いた。試料は通知法に報告されている固相抽出の操作を省いて分析した。また、検量線の作成および試料の測定はピーク面積法で行った。

1) HPLC

HPLC 装置は DIONEX 社製 UltiMate3000 システムを用いた。装置構成は次の通り：高圧グラジエントポンプ HPG-3400、カラム恒温槽 TCC-3200、オートサンプラー WPS-3000 TSL、SST10mm をセルとして装着した紫外可視 (UV/VIS) 検出器 VWD-3400 を用いた。カラムには関東化学社製 Mightysil RP-18PA (5 μm, 4.6mm I.D., 150mm) をカラム温度 40℃ で用いた。移動相には 2.1.2) に示した通知法と同一の組成を用い、流量 1.0mL/min で送液した。試料溶液は 4℃ に設定したオートサンプラーに装填し、500μL のサンプルループに 1000μL 容量のシリンジで吸引速度は 10μL/秒で導入した。UV/VIS 検出器の測定波長は 313nm とした。

2) 容器及び器具

採水容器はポリテトラフルオロエチレン製、検査に使用したメスフラスコ等の器具はポリプロピレン製を使用した。

3) 検量線の作成

標準溶液を 7 点 (0.00005、0.0001、0.0002、0.0005、0.001、0.002、0.005mg/L) 調製して、ピーク面積値から、絶対検量線法により検量線を作成した。

3. 結果

3.1 ジクワット検量線の作成

通知法[2]では試料 (0.001~0.04mg/L) に含まれるジクワットを固相抽出することで濃度を 100 倍濃縮する。一方、標準液は濃縮操作をせずに濃縮後の濃度に相当する 0.1~4 mg/L の範囲の濃度の溶液を作成して HPLC に一定量注入することになっている。ここでは、導入できる試料の容量内で十分な感度が得られるか否かを検討するため、試料の導入量を 500μL に変更し、ジクワットの管理目標値の 1/100 に相当する 0.00005mg/L から 0.005mg/L までの間で検量線を作成した。その結果、ジクワット濃度とピーク面積の相関係数 (r²) は 0.999 を示す良好な直線性が得られた (Figure 1)。

なお、検量線の作成にあたっては 200μL と 500μL の注入量を検討したが、得られたピーク面積と注入量の関係、ピーク形状などを考慮して、定量下限値をより低く設定できる 500 μL とした。

3.2 ジクワット溶液の再現性試験

ジクワットの管理目標値の 1/100 に相当する 0.00005mg/L

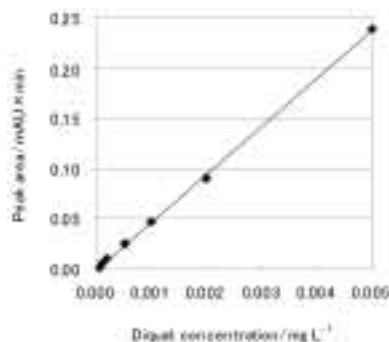


Figure 1. Calibration curve for HPLC analysis of diquat by large-volume injection method.

Calibration fitting $y = 47.781x - 0.0003$

Linearity diquat concentration (0.00005 mg/L ~ 0.005 mg/L)

$R^2 = 0.9994$

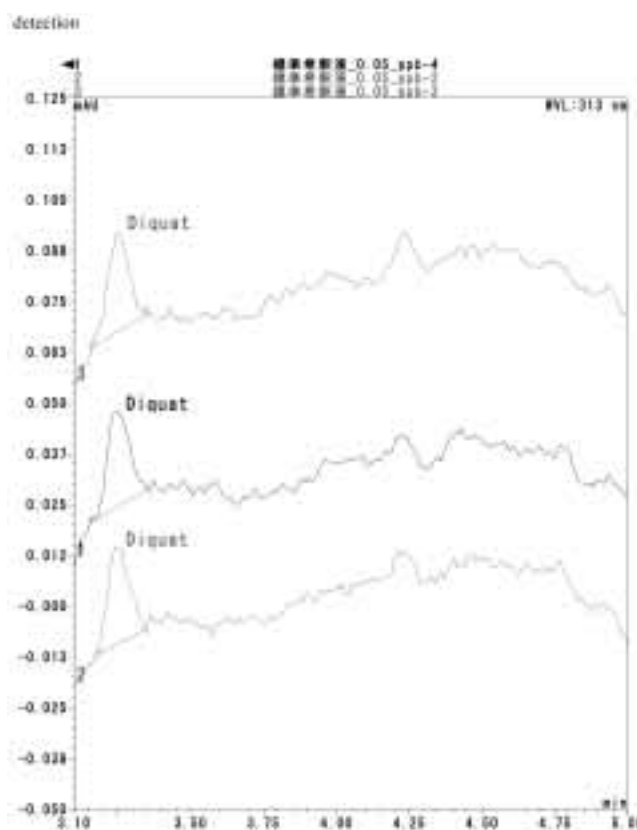


Figure 2. Analysis of diquat solution (0.00005 mg L⁻¹) by HPLC with UV absorption detection.

溶液のクロマトグラフを Figure 2 に示した。S/N 比は Table 1 に示したとおり平均 10 以上を示し、十分な測定感度が得られた。また、再現性についても Table 1 に示したとおり、0.0005mg/L 及び 0.00005mg/L の濃度の 5 回繰り返し精度は相対標準偏差 (%) として 1.03% 及び 6.65% であった。これらのことから、定量下限値は 0.00005mg/L であった。

3.3 試料におけるベースラインの安定性

従来の通知法では500mLの試料を逆相系固相抽出カラム例えばC18、MCX、WCXなどに捕捉し、5 mLに抽出濃縮して、そのうち一定量例えば50μLを注入している。したがって、注入量は原試料として5000μLを導入したことになる。今回の我々の方法では試料を固相抽出せずにHPLCに200μL或は500μL注入したところ、Table 2に示した浄水8、原水

9では0.00005mg/L（定量下限値）未満の濃度であるがジクワットと思われるピークが検出された。ジクワットは通知法の条件では空隙容積付近に溶出されるので、これとは別に試料に標準品を添加した試験溶液を調整してピークの位置を確認した。また、いずれの試料にも妨害ピークは認められなかった。以上の結果から、今回用いた標準的なHPLCシステムを用いれば、固相抽出を行うことなく、検査法として求

Table 1. Repeatability (*n* = 5) of recovery estimated from peak area and retention times of diquat in water samples.

Concentration	0.5 μg/L			0.05 μg/L			S/N
	Results (μg/L)	Peak area (mAU×min)	Retention time (min)	Results (μg/L)	Peak area (mAU×min)	Retention time (min)	
1st	0.5427	0.0259	3.247	0.0501	0.0024	3.247	12.38
2nd	0.5441	0.0260	3.240	0.0434	0.0021	3.240	9.91
3rd	0.5387	0.0257	3.240	0.0429	0.0020	3.247	10.80
4th	0.5299	0.0253	3.240	0.0440	0.0021	3.240	7.77
5th	0.5398	0.0257	3.240	0.0437	0.0021	3.247	11.02
Average	0.539	0.0257	3.241	0.0448	0.0021	3.244	10.4
SD	0.00555	0.000268	0.00313	0.0029794	0.0001517	0.00383	1.70
CV (%)	1.0	1.0	0.10	6.7	7.1	0.12	16.4

Table 2. Recovery of diquat in spiked untreated and treated water samples from some water treatment plants sourced from underground water.

Plant		Direct injection Recovery (%)			
		Diquat concentration (μg/L)			
		5.0	0.5	0.1	0.5 + EDTA
1	Untreated water 1 ^a	51.8	42.2	58.5	47.3
	Treated water 1	91.5	119.9	65.2	98.2
2	Untreated water 2 ^a	86.6	74.0	75.6	89.7
	Treated water 2	96.5	102.6	98.2	101.0
3	Untreated water 3	96.4	105.7	89.0	101.5
	Treated water 3	95.8	101.4	106.6	98.9
4	Untreated water 4	98.6	100.4	70.4	103.7
	Treated water 4	97.4	124.3	84.1	106.8
5	Untreated water 5	93.1	105.7	81.6	103.0
	Treated water 5	98.6	103.5	85.8	101.8
6	Untreated water 6	97.7	112.6	36.4	109.2
	Treated water 6	96.6	113.6	33.0	101.7
7	Untreated water 7	96.7	111.3	103.1	101.9
	Treated water 7	97.6	110.4	101.6	98.6
8	Untreated water 8	–	–	–	–
	Treated water 8	–	86.2	92.4	84.4
9	Untreated water 9	–	96.4	103.4	95.4
	Treated water 9	–	92.0	90.7	94.3
Sample injection volume (μL)		200	500	500	500

a. After chlorination

められている0.00005mg/Lの濃度までを、容易に定量することができた。ジクワットは固相抽出効率が悪く、回収率や再現性が低いことからジクワット-d4を用いたサロゲート法による定量値の補正が必要とされるなど定量性が懸念されていたが、本法のように、標準溶液のみならず試料についても直接、HPLCに導入することで、定量性と感度を同時に解決することができた。

3.4 添加回収試験

ボトルドウォーターおよび水道水にジクワットを0.005mg/L、0.0005mg/L及び0.0001mg/L濃度で添加し、その回収率を求めた。結果をTable 3に示す。0.005mg/L（目標値）、0.0005mg/L（目標値の1/10）濃度の回収率はいずれの試料

もほぼ100%を示したが、0.0001mg/L（目標値の1/50）濃度の回収率は75.9%~96.5%と若干低かった。これらはジクワットの溶出直前にベースラインの低下が起り、ピーク面積が過小評価されたためと思われる。

次に、実試料にジクワットを添加して回収率を求めた。得られた結果をTable 3に示す。また、各試料の回収率はマトリックス（蒸発残留物、硬度、Na）に影響される[3]ことが指摘されていることから、水試料の物性値をTable 4に示した。0.005mg/L、0.0005mg/L濃度の回収率は原水1、2を除き約80~120%を示した。原水1、2の回収率が低くなったのはTOC、濁度、蒸発残留物の値が高いことから、ジクワットが濁質微粒子へ物理的吸着することが原因と考えられる。0.0001mg/L濃度では、施設3は硬度160mg/Lであるが

Table 3. Recovery of diquat in spiked samples.

Concentration (µg/L)	Recovery (%)			
	5.0	0.5	0.1	0.5 + EDTA
Mineral water A	101.1	103.2	98.4	102.3
Mineral water B	103.7	99.3	94.5	103.0
Tap water	100.5	99.4	77.4	97.8
Tap water + ascorbic acid	104.8	104.9	86.8	103.4

Table 4. Quality of the spring water samples before and after chlorination at some water treating plants.

Plant	Items	Total residue on evaporation	Turbidity	Hardness	Sodium	Free available chlorine	pH	TOC
		mg/L		mg/L	mg/L	mg/L		
1	Untreated water 1 ^a	312	0.9	93	71.3	≥6.0	7.0	4.38
	Treated water 1	26	0.2	0.13	17.8	0.7	7.5	0.32
2	Untreated water 2 ^a	243	0.6	88	32.9	0.7	7.4	1.14
	Treated water 2	214	0.2	89	32.3	1.0	7.5	0.50
3	Untreated water 3	226	<0.1	160	9.4	<0.05	7.8	0.57
	Treated water 3	229	<0.1	160	9.9	0.7	7.9	0.52
4	Untreated water 4	161	<0.1	83	8.9	<0.05	7.4	0.63
	Treated water 4	166	<0.1	83	12.6	0.7	7.5	0.63
5	Untreated water 5	148	<0.1	80	7.8	-	7.6	0.34
	Treated water 5	146	<0.1	80	9.8	0.6	7.6	0.31
6	Untreated water 6	158	<0.1	84	8.7	<0.05	8.0	0.34
	Treated water 6	155	<0.1	84	9.4	0.4	8.0	0.35
7	Untreated water 7	131	<0.1	70	9.7	<0.05	7.9	0.42
	Treated water 7	162	<0.1	70	18.4	0.7	7.8	0.41
8	Untreated water 8	-	-	-	-	-	-	-
	Treated water 8	177	<0.1	92	11.3	0.5	7.6	0.47
9	Untreated water 9	142	<0.1	66	11.3	<0.05	8.2	0.39
	Treated water 9	159	<0.1	66	14.4	0.7	8.0	0.38

a. After chlorination

回収率は100%前後であり、施設5、7、8、9、浄水2、4についても80~110%を示した。一方、施設6は硬度84mg/Lで回収率が35%に、浄水1はイオン交換をしていて硬度0.13mg/Lであるが65%にまで低下した。これらのことから、回収率の低下と硬度の間には関係がないことがわかった。また、EDTAを添加すると、若干、回収が上昇したので、金属イオンの影響が示唆された。

なお、残留塩素によるジクワットの還元が懸念されるのでアスコルビン酸を添加してその影響をみたが、本実験では、残留塩素による妨害もないと考えられた。

4. 考察

低濃度で検出感度の低い物質をHPLCで分析する場合、前処理としての固相抽出法は有効であり、様々な用途で用いられている。しかし固相抽出による濃縮操作では、試料に含まれる夾雑物の一部が目的成分とともに溶出されることが原因となり、妨害ピークの出現や目的成分の保持時間の再現性の低下が起こる。さらにジクワットの吸着・抽出効率が悪いことから、通知法の感度は大幅に低下した。従って濃縮を行うことなく測定することでより高い信頼性が得られると考えられる。

また、試料のクリーンアップを目的とする前処理の場合には、試料の水質によってその必要性が異なる。試料が自己水源型専用水道施設から採水する原水、浄水では、Table 2に示したとおり、河川水を水源とする原水などに比べて濁度などが低く、共存成分の濃度が低いため、前処理を必要としない。一方、固相抽出操作が必要な水試料ならば溶出液にpH 2.2の硫酸を使用し、バックフラッシュ溶出するなど低濃度でも良好な回収率が得られる条件を検討する必要があり、その際、界面活性剤やフミン質に代表される有機物などによる回収率の低下[11]に注意を要する。

さらに、ジクワットは分解を受けやすいことが指摘されている[8]ので、測定はできるかぎり迅速に行う必要がある。今回、固相抽出操作を省略する方法が開発されたことで、より簡便に、しかも迅速に分析することが可能となった。また、固相抽出操作の省略は定量性の改善も期待できる。

今回検討した直接大容量試料導入HPLC法は、固相抽出—HPLC法[2]の固相抽出操作を省略しただけで、その他は従来の分析条件を適用できる。また、この検査方法は高額な機器を使用するLC-MS法[9]やLC-MS/MS法[4]と比べて感度が劣ることはなく、同等の感度が得られた。

5. 結論

水試料中のジクワット分析に用いられる通知法では固相抽出操作が適用されるが、回収率の低下[5,7]が指摘されていた。ここでは500 μ Lの水試料を直接HPLCに導入することで、感度と定量性を改善できることを示した。操作が簡便になったことで、水中で不安定なジクワットの濃度を迅速に測定することが可能となった。若干の低濃度領域における感度の低下は通知法に準じて採用した分析条件、すなわちジクワットのピーク幅の広がりや早い溶出時間が原因と考えられた。今回は通知法と合わせるために、このような結果となったが、分離条件を再検討し、さらにUPLCなどの高分離能カラムを用いれば、さらに高感度が期待できる。本法を用いれば、ジクワットによる水質汚染をより詳細に解析することが可能と思われる。

文献

- [1] 平成20年度PRTRデータの概要～化学物質の排出量・移動量の集計結果～ http://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/gaiyo_H20/7_shukeihyo_4.pdf
- [2] 水質管理目標設定項目の検査方法 厚生労働省健康局水道課長通知 健発第1010001号 最終改正 平成22年2月17日。
- [3] 巻幡希子；山崎富夫；英保次郎. *分析化学* **2007**, *56*, 579–585.
- [4] Núñez, O.; Moyano, E.; Galceran, M. T. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *525*, 183–190.
- [5] 鈴木俊也；岡本 寛；稲葉美佐子；宇佐美美穂子；永山敏廣. *東京健安研七年报* **2005**, *56*, 299–303.
- [6] 厚生労働省健康局水道課長設置 水道水質検査法検討会 平成21年度第2回（平成22年1月26日）議事要旨。
- [7] 鈴木雄亮；金子 毅. *分析化学* **2009**, *58*, 1029–1034.
- [8] Hara, S.; Sasaki, N.; Takase, D.; Shiotsuka, S.; Ogata, K.; Futagami, K.; Tamura, K. *Anal. Sci.* **2007**, *23*, 523–526.
- [9] Takino, M.; Daishima, S.; Yamaguchi, K. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 707–711.
- [10] 農薬個別表 No. 67 ジクワット <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/nouyaku.pdf>
- [11] Ibáñez, M.; Picó, Y.; Mañes, J. *J. Chromatogr. A* **1996**, *727*, 245–252.