

4 固相抽出-液体クロマトグラフ法によるチウラム分析の検討

水質管理課 小座間 国雄

○ 広沢 昭一

1. はじめに

水質汚濁防止法の一部改正により、新たに下水処理場からの排出規制項目として指定された農薬類に属するチウラムの測定方法は液体クロマトグラフ（HPLC）法が規定されている。また、チウラムの排出基準値が0.06mg/lと低濃度であるため、固相抽出といった濃縮操作が前処理として規定されている。しかし、下水試料のように様々な物質が含まれている場合、これらの物質も濃縮されるため、チウラムの測定に影響を及ぼすことがある。

今回、液体クロマトグラフの検出器としてフォトダイオードアレイ検出器を用い、測定条件の検討とともに固相抽出におけるクリーンアップ操作の検討を行ったところ、本測定方法の下水試料への適用性について知見が得られたので報告する。

2. 装置及び測定方法

(1) 装置

本検討で使用した装置、測定条件及び装置概略図を表-1、図-1に示す。

表-1 装置及び測定条件

(固相抽出装置)
コントローラ：流量設定(1~50ml/分)
タイマ：設定(1秒~9999時間)
ポンプ方式：デュアルシリンジポンプ
固相カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体充填剤
(HPLC)
検出器：フォトダイオードアレイ検出器
測定波長：220nm, 272nm
溶離液：りん酸緩衝液：アセトニトリル=60：40の組成
溶離液流量：1.0ml/分
分析カラム：ODS充填剤(φ4.6mm×L250mm)
カラム温度：40℃

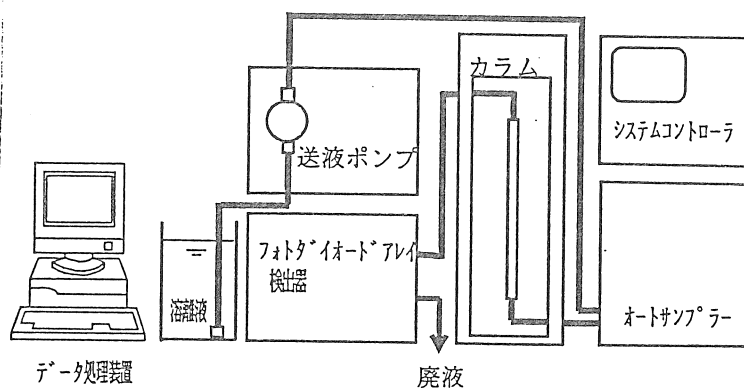


図-1 HPLC構成図

(2) 測定方法

pH:3.5に調整した試料をガラス繊維ろ紙(GA-100, 1.0μm)でろ過する。ろ液300mlを予め活性化した固相カラムに一定流速(10ml/分)で通水し、目的成分をカラムに吸着させる。次に固相カラムの洗浄を行った後、アセトニトリルを抽出溶媒として約1.0ml/分の流速で正確に3mlになるまで滴下し、これを検液とする。

この検液を表-1に示すHPLCの条件下で測定を行う。

3. 検討方法

(1) 直線性及び再現性の検討

チウラム標準物質100mgをアセトニトリル100mlに溶かし、チウラム標準原液(1000mg/l)を作成する。この原液をアセトニトリルを用いてチウラムの濃度が0.1~50mg/lとなるように段階的に希釈し、チウラム標準溶液を作成する。この溶液をHPLCにより測定し、濃度と面積の関係を求めることにより、直線性の検討を行った。また、標準溶液を5回繰り返し測定し、再現性の検討を行った。なお、HPLCへの試料の導入量は、20μlとした。

(2) クリーンアップ操作の検討

下水のように様々な物質が含まれている試料では、固相抽出による濃縮操作により、チウラム以外の物質も固相カラムに吸着される。また、アセトニトリルによる溶出操作では、それらの物質も固相カラムから溶離するのでHPLCによる測定時に、図-2に示すようなクロマトグラム上にピークとして出現し、チウラムの定量を行う上で妨害となることがある。

今回、固相カラムの洗浄を純水の代わりにアセトニトリルを水に混和したもの(アセトニトリル30%)を用い、洗浄量を変えた時のクリーンアップ効果の検討を行った。この時の洗浄量は、3, 6, 9, 12, 15mlの5段階とし、洗浄速度は3ml/分とした。また、この操作におけるチウラムの損失をみるため、蒸留水にチウラム標準溶液を添加し、固相抽出操作を行ったうえで、チウラムの回収率の比較検討を行った。なお、チウラムの添加量は試料中の濃度が0.01mg/lとなるようにした。

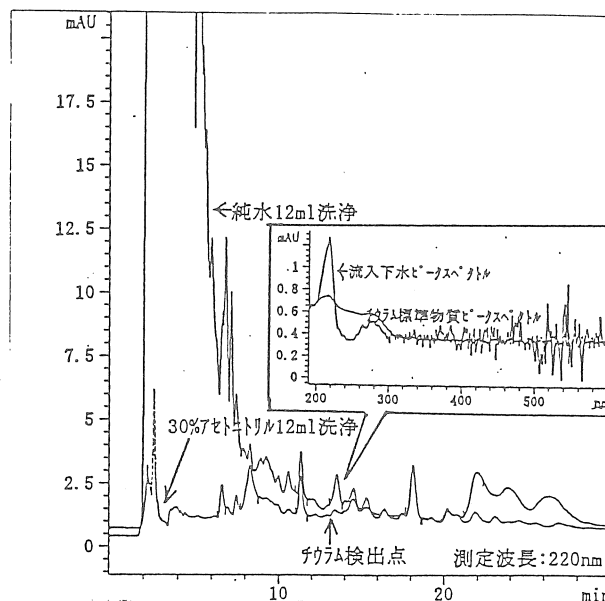


図-2 流入下水クロマトグラム

(3) 下水試料の測定及び添加回収の検討

合流式下水処理場の流入下水、処理水の測定とこれにチウラムの濃度が0.01mg/lとなるように標準添加したものをを用いて回収率の検討を行った。

(4) チウラムの活性汚泥処理への影響に関する実験

最初沈殿池流出水と返送汚泥を1:1で混合したものにチウラムを0.6, 6.0mg/lとなるように添加し、経時的に上澄液の窒素類、TOC、チウラムの測定を行うことにより、活性汚泥処理への影響及びチウラムの残存性についてビーカレベルでの実験を行った。なお、この時の実験条件は、MLSS:1500mg/l、DOは、高めとした。

3. 結果及び考察

(1) 直線性及び再現性の検討

図-3に直線性の検討結果、表-2に再現性の検討結果を示す。

HPLCによるチウラム標準物質濃度とピーク面積の測定結果では、0.1~50mg/lの範囲で良好な直線性が得られた。ただし、50mg/lを超えると分析カラムに残存するため、次の測定に影響を及ぼしていた。また、標準物質を5回繰り返し測定した結果では、チウラムの濃度が0.1mg/lの時に多少ピーク面積にバラツキがみられるが、他の濃度ではバラツキも少なく安定した測定結果が得られた。

チウラムの定量下限値は、固相抽出による濃縮倍率によって変わるが100倍濃縮を行った場合、環境基準値(0.006mg/l)の1/2となる。

(2) クリーンアップ操作の検討

図-2に示すように、固相抽出操作後の固相カラムの洗浄を純水の代わりに30%アセトニトリルを用いることによりHPLC測定時における妨害物質を除去することが可能であった。ただし、洗浄量が少ないとクリーンアップの効果が高いために、洗浄量を12ml以上にする必要がある。

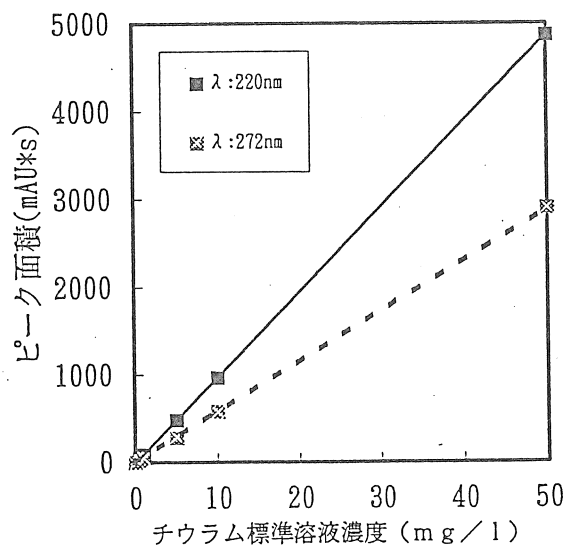


図-3 チウラム濃度と面積の関係

表-2 チウラム標準溶液の繰り返し測定結果

濃度 (mg/l)	面 積		標準 (mAU*s)	偏差 (mAU*s)	変動 (%)	係数 (%)
	220nm (mAU*s)	272nm (mAU*s)				
0.1	8.3	4.9	0.38	0.26	4.64	5.21
0.5	43.0	24.7	0.51	0.52	1.19	2.11
1.0	92.0	55.1	1.64	1.16	1.78	2.11
5.0	478.2	285.5	5.68	4.04	1.19	1.41
10.0	962.7	575.3	11.44	6.48	1.19	1.13
50.0	4867.1	2898.4	22.56	14.43	0.46	0.50

また、図-4に示すとおり、30%アセトニトリルによる固相カラムの洗浄量を変化させてもチウラムの損失はみられず、それぞれの洗浄量におけるチウラムの回収率は95%以上と良好な結果が得られた。

(3) 下水試料の測定及び添加回収の検討

下水処理場の流入下水及び処理水について、固相抽出後、30%アセトニトリル12mlによる固相カラムの洗浄を行い、HPLCによる測定を行ったが、クロマトグラムのベースラインも安定し、妨害物質の影響もみられず、チウラムの定量が可能であった。ただし、流入下水については、チウラムの保持時間と近接したところにピークが出現することがあり、これをチウラムと確認するためには、フォトダイオードアレイ検出器を用い、対象ピークとチウラム標準物質のスペクトルの比較を行うことが必要である。今回の測定では、流入下水のピークとチウラム標準物質のピークでスペクトルがことになっており、チウラムは検出されなかった。

流入下水、処理水への標準添加法を用いた回収率の測定結果を図-5に示す。

流入下水では、測定波長の違いにより、差はあるが、回収率は低い結果となっていた。これは、チウラムが有機物の存在下で分解し易いことに起因していると考ええる。処理水については、回収が90%程度と良好な結果であった。

(4) チウラムの活性汚泥処理への影響に関する検討

活性汚泥にチウラムをそれぞれ、排水基準の10倍、100倍となるように添加し、活性汚泥処理への影響を検討した結果、図-6に示すように、チウラム無添加のものと比較してもアンモニア性窒素の減少速度は、両者とも変わらず、硝化の進行は良好であった。また、TOCについても、除去が十分行われており、炭素系の処理も良好であった。

チウラムの残存性については、チウラムを0.6mg/lに添加したものは、上澄液中にチウラムが残存することはなかったが、チウラムを6.0mg/lとなるように添加したものでは、時間経過とともに減少はしているが、実験開始より4時間経過した時点でもチウラムが0.03mg/lと添加量の1/200程度上澄液中に残存していた。また、チウラムを高濃度に添加したものについては、時間経過とともにクロマトグラム上にチウラムの保持時間と異なった位置にピークの出現がみられ、チウラムの分解により、生成物が生じたものと考ええる。

4. まとめ

- (1) チウラム標準物質を用いたHPLCによる測定では、0.1~50mg/lの範囲で直線性、再現性ともに良好であった。また、固相抽出操作を行うことにより、定量下限値は環境基準の1/2程度となる。
- (2) 下水試料中のチウラムを測定する場合、固相抽出後の固相カラムを30%アセトニトリル12mlで洗浄することにより、HPLC測定時における妨害を除去することが可能となり、安定した測定が行える。
- (3) 今回の検討では、チウラムの活性汚泥処理への影響は認められなかったが、下水処理場にチウラムが高濃度に流入した場合、処理水中で検出される恐れがあり、監視・測定体制の確立が重要と考える。

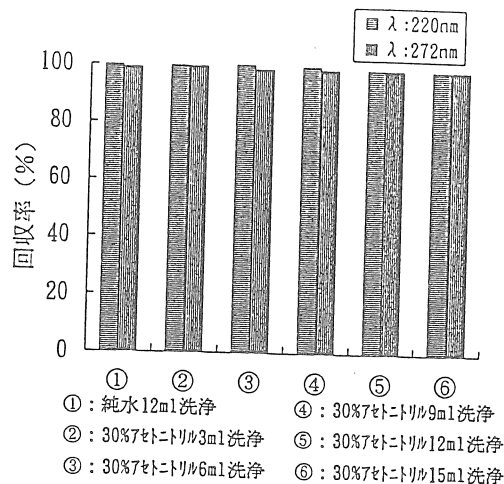


図-4 30%アセトニトリルによる洗浄量とチウラム回収率

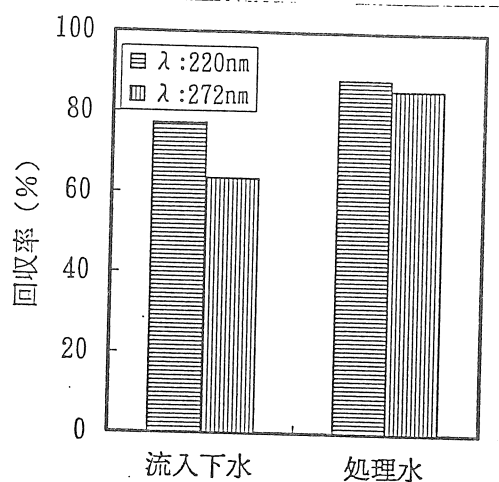


図-5 下水試料における回収率の結果

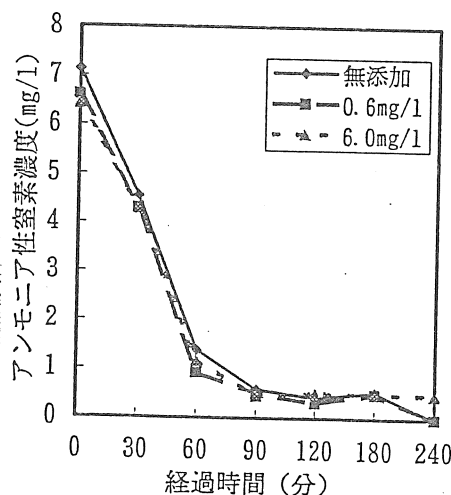


図-6 アンモニア性窒素の挙動