

## 固相抽出-HPLC を用いたチウラムの前処理法と保存性の検討

山口県環境保健センター  
川上 千尋・堀切 裕子・佐々木 紀代美

### Studies on Pretreatments of Thiuram by Solid-Phase Extracion /HPLC and the Stability of Thiuram

KAWAKAMI Chihiro, HORIKIRI Yuko, SASAKI Kiyomi  
*Institute of Public Health and Environment, Yamaguchi Prefectural Government*

#### はじめに

水質汚濁防止法の環境基準項目等に定められているチウラムは、環境庁告示第 59 号（以下、「公定法」という。）において、分析の前処理として溶媒抽出（液液抽出）又は固相抽出が定められおり、当所では、溶媒抽出で前処理を行っていた。一方、固相抽出は、使用する有機溶媒が少量であることから、環境負荷の軽減と労働環境の改善に寄与できる。そこで、固相抽出によるチウラムの前処理法について検討を行った。

また、チウラムは、ジスルフィド結合（S-S）が不安定なため、水中ではジチオカーバメイトを生成し、他方、酸化によりチオールエステルを形成するなど、分解されやすいとされている（図 1）。そこで、水質試料中等のチウラムの保存性についても検討したので報告する。

#### 方法

##### 1 試薬

チウラム標準品（1,000 mg/L in アセトニトリル）は、AcuuStandard 社製を、アセトニトリルは、富士フィルム和光純薬（株）社製 LC/MS 用及びチウラム測定用を、EDTA-2Na は、関東化学（株）社製の特級を使用した。

##### 2 器具及び装置

固相カラムは、GL サイエンス社製 InertSep SlimJ PLS-3（以下、「PLS-3」という。）を用いた。クリーンアップカラムは、GL サイエンス社製 InertSep SlimJ AL-A（以下、「AL-A」という。）及び昭和電工社製 Autoprep MF-1（以下、「MF-1」という。）を用いた。HPLC は日本ウォーターズ（株）Acquity UPLC H Class を使用した。分析条件は表 1 に示す。

##### 3 固相抽出操作

###### (1) 固相カラムの脱水方法の検討

超純水 500 ml にチウラム 0.3 µg（環境基準の 1/10 に相当する濃度）を添加し、図 2 に示す方法で前処理を行った。固相抽出後は、シリンジで固相カラム内の水分を軽く押し出した後、脱水を遠心分離又は窒素通気で実施した。遠心分離は 3,000 rpm で 10 分間、窒素通気は 10 分～60 分間行い、脱水後のカラムの水分量及び回収率を求めた。

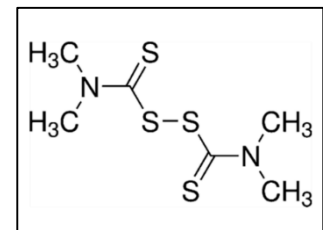


図 1 チウラム

表 1 HPLC 分析条件

装置	Acquity UPLC H Class
カラム	Waters ACQUITY UPLC BEH C18カラム (粒径1.7µm 2.1mm×100mm)
移動相	0.1% ぎ酸-蒸留水：アセトニトリル=70：30
流量	0.5 ml/L
試料注入量	2 µl
カラム温度	40 °C
検出波長	UV 272 nm

## (2) クリーンアップ操作の検討

当センターに搬入された事業所の排水 100 ml にチウラム 0.6 μg（排水基準の 1/10 に相当する濃度）を添加し、次に示す 3 種類のクリーンアップ操作を図 2 の方法に追加して、回収率を求めた。①洗浄後の固相カラムに 30%アセトニトリル含有水 3 ml を通液した後、超純水 10 ml で再度洗浄した。②PLS-3 の下側にアセトニトリル 5 ml でコンディショニングした AL-A を連結し溶出した。③アセトニトリルで溶出後、1 ml に定容した最終溶液を MF-1 に通液した。

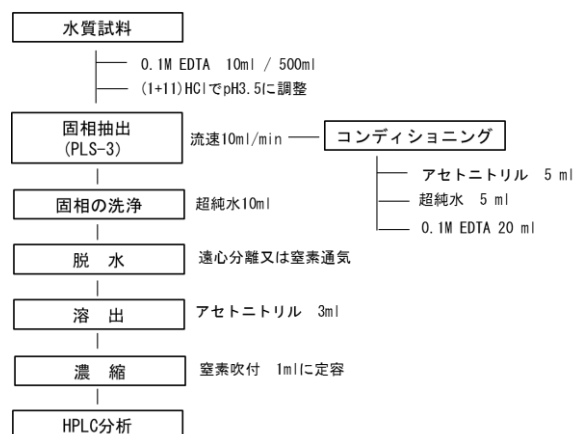


図 2 分析方法

## 4 チウラム保存性の検討

### (1) 水質試料中の保存性

当センターに搬入された地下水 500 ml にチウラム 0.3 μg、排水 100 ml にチウラム 0.6 μg（各々環境基準及び排水基準の 1/10 に相当する濃度）を添加し、冷暗所（4℃）で 0～2 日間保存した後、チウラム濃度を求めた。なお、用いた試料は、チウラムが定量下限値（環境基準及び排水排水基準の 1/10）未満であることをあらかじめ確認した。

### (2) 最終溶液中の保存性

(1) と同様の試料を固相抽出し、濃縮後の最終溶液を 10 ml 濃縮管に入れ、冷凍（-20℃）で 0～7 日間保存した時のチウラム濃度を求めた。

### (3) 標準溶液中の保存性

アセトニトリルで調整したチウラム標準液（0.1 mg/L～1.0 mg/L）を 10 ml 濃縮管に入れ、冷凍（-20℃）で 0～7 日間保存した時のチウラム濃度を求めた。

## 結果及び考察

### 1 試料の前処理

#### (1) 脱水方法の検討

遠心分離及び窒素通気を用いて、適切な脱水方法とその条件と検討した。遠心分離（3,000 rpm）を 10 分行った際の固相カラムの水分量及び回収率を表 2 に示す。カラムの水分量は、遠心分離後も約 0.2 g 残存していた。表 2 には示していないが、遠心分離を 30 分行っても水分量に変化は見られなかった。遠心分離では、固相カラム中の水分を完全に除去できなかったことから、回収率、変動係数ともに良好な結果が得られなかったと推察された。次に、窒素通気によるカラムの水分量及び回収率を求めた（表 3）。窒素通気 40 分間で水分が完全に除去されており、回収率は、10 分を除いて概ね良好であったが、通気時間が長いほど変動係数が小さい傾向であった。また、40 分と 60 分の回収率及び変動係数に差がなかったことから、脱水方法は、窒素通気 40 分間とした。

表 2 遠心分離による固相カラムの水分量と回収率（n=3）

遠心分離後の固相カラムの水分量 (g)	回収率 (%)	変動係数 (%)
0.267	73.9	7.25

表 3 窒素通気による固相カラムの水分量と回収率（n=3）

通気時間	通気後の固相カラムの水分量 (g)	回収率 (%)	変動係数 (%)
10分	0.178	79.9	9.47
20分	0.040	88.0	6.16
30分	0.003	89.9	1.83
40分	0.000	94.7	0.77
60分	0.000	94.4	0.10

## (2) クリーンアップ操作の検討

公定法には、クリーンアップ操作については記載されていない。しかし、HPLC 分析においては、夾雑物質は定量に影響を与える場合がある他、分析機器への負荷となるため、クリーンアップ操作は重要である。そこで、排水（A, B, C）を用いて 3 つのクリーンアップ操作における回収率を求めた。3 種類の操作とも回収率に大きな差は見られなかった（図 3a）。また、試料 C のクロマトグラムから、いずれの方法もチウラムより保持が弱い夾雑物質の除去に効果が見られることがわかった（図 3b）。3 つの排水ともに、チウラムの定量に影響を及ぼすピークは確認されなかったことから、チウラムと保持時間が近い夾雑物質がある場合のクリーンアップ効果については検証できなかった。しかし、分析機器への負担軽減の面から、これらの操作は効果があることがわかった。操作性の面から②AL-A と③MF-1 が優れているが、③MF-1 は、最終溶液 1 ml をクリーンアップカラムに通液するため、HPLC 分析に供することができる溶液が減少し、HPLC 分析において検討等のための複数回の分析が難しくなると考えられた。以上より、クリーンアップ操作は②AL-A を用いることとした。

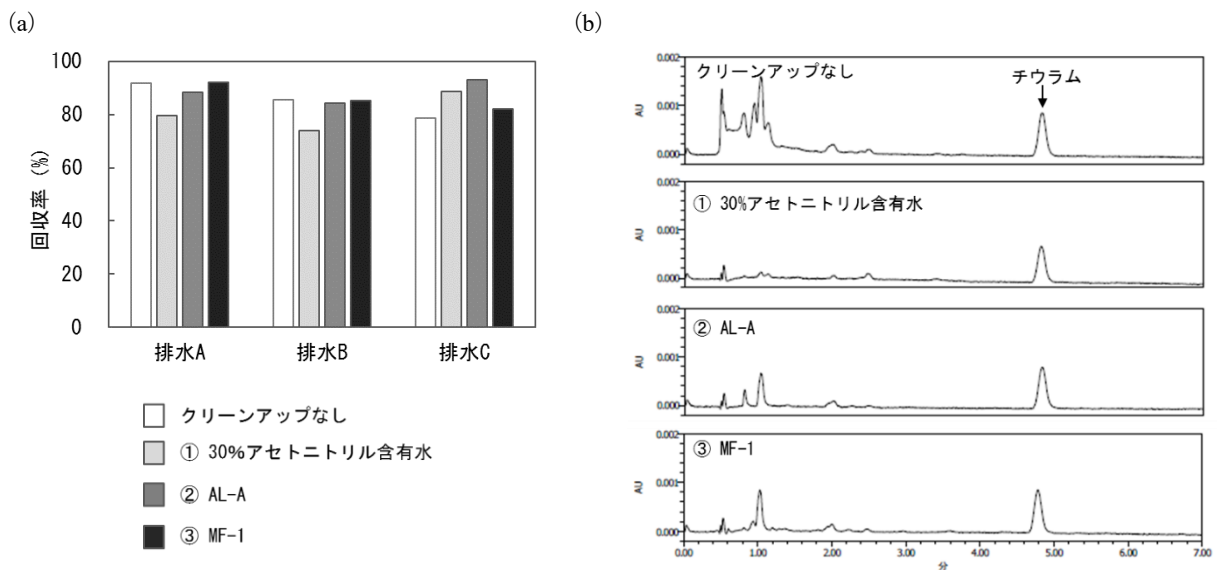


図 3 クリーンアップ操作の比較

## 2 チウラムの保存性について

### (1) 水質試料中の保存性

蒸留水中のチウラムは、冷暗所での保存が最も保存性が良いとの報告<sup>2)</sup>がある。そこで、チウラムを添加した地下水及び排水（D, E）を冷暗所（4℃）で 0~2 日間保存した際の濃度変化を見た（図 4）。地下水は、2 日後でも初期濃度の 97.6 % の割合を示したが、排水 D, E は、低下傾向を示し、排水 E は 2 日後には初期濃度の 37.1 % まで低下した。排水 E は、排水 D と比較して COD、BOD 等の有機物指標や金属（Cu、Zn）の濃度が高いことから、排水中に含まれる有機物や金属などの様々な夾雑物質により、チウラムの分解や吸着などが起こったためと推察される。地下水等の夾雑物質が少ない試料においては、2 日間の冷暗所保存では濃度低下は起こりにくい、排水のように夾雑物質が多い試料中では濃度低下が低下することがわかった。

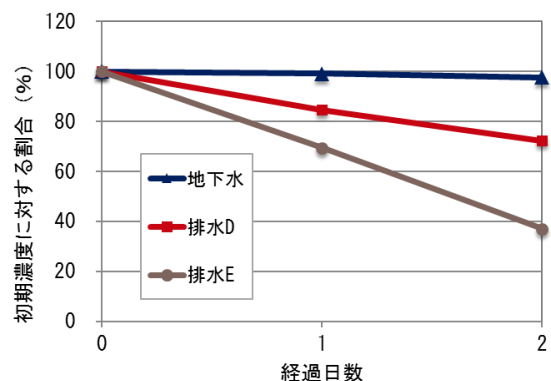


図 4 水質試料中の濃度変化 (n=3)

## (2) 最終溶液中の保存性

チウラムを添加した地下水及び排水を固相抽出し、濃縮後の最終溶液を 10 ml 濃縮管に入れ、冷凍 (-20℃) で 0~7 日間保存した際の濃度変化を見た (図 5)。いずれも保存 2 日~3 日でわずかに減少し、7 日後、地下水は初期濃度の 87.1 %、排水は 91.4 %であった。7 日間の冷凍保存で急激な濃度低下は見られなかったものの、わずかに低下していたことから、固相抽出後、1~2 日後までには HPLC 分析を行うことが望ましい。

## (3) 標準液中の保存性

チウラムは、アセトニトリル中で安定である<sup>3)</sup>と言われており、アセトニトリルで調整した標準液は保存性が高いと考えられる。しかし、アセトニトリル中の不純物により分解する可能性がある<sup>4)</sup>とされている等、標準液の保存性については、確認が必要と考えられる。そこで、0.1 mg/L~1.0 mg/L に調整した各標準液を 10 ml 濃縮管に入れ、冷凍 (-20℃)、0 日~7 日間保存し、チウラムの濃度変化を見た (図 6)。0.1 mg/L は 7 日間保存で初期濃度の 79.9 %に減少していたが、0.2 mg/L~1.0 mg/L では、7 日間保存後も濃度に変化はなかったことから、標準液を冷凍保存する際は、0.2 mg/L 以上の濃度が必要であることがわかった。

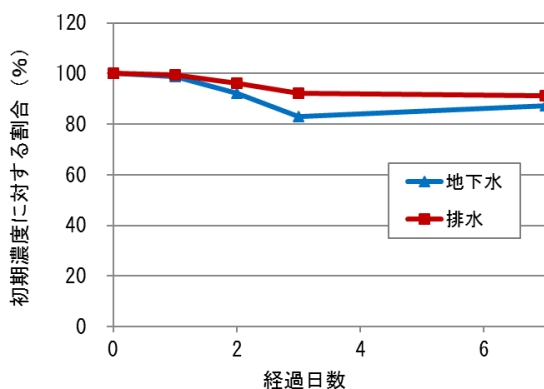


図 5 最終溶液中の濃度変化 (n=3)

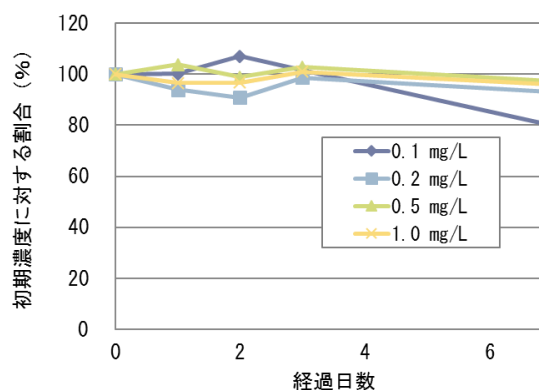


図 6 標準液の濃度変化(n=3)

## まとめ

### 1 前処理法の検討

適切な脱水方法とその条件を検討した結果、窒素通気 40 分間以上でカラムの水分が完全に除去され、回収率、変動係数ともに良好であったことから、脱水は窒素通気 40 分間とした。また、3 つのクリーンアップ操作を比較検討したところ、いずれの方法も、回収率に影響はなく、チウラムより保持が弱い夾雑物質の除去に効果が見られた。操作性の良さと最終液量が 1ml 確保できる点から AL-A を用いることとした。

### 2 チウラムの保存性検討

水質試料中のチウラムは、2 日間の冷暗所保存で、地下水では初期濃度の 97.6 %であったが、排水では 37.1 %に低下した。また、最終溶液中では、7 日間の冷凍保存で地下水は初期濃度の 87.1 %、排水は 91.4 %とわずかに減少した。アセトニトリルで調整した標準液では、低濃度 (0.1 mg/L) において 7 日間の冷凍保存で 79.9 %に減少した。

## 参考文献

- 1) (一社) 廃棄物資源循環学会. 廃棄物関連試料の分析マニュアル. 2015, 428p.
- 2) 三好益美. チウラムの分解性と固相抽出カラムを用いた前処理法の検討. 香川県環境保健センター所報. 2008, 第7号, p118-121.
- 3) 松井利夫. チウラムの分解性の検討. 全国環境研会誌. 2007, 32巻2号, 7.
- 4) 富士フィルム和光純薬(株). アセトニトリル (製品情報).

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0101-1528.html>