

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
－ 公共用水域における魚への死時の農薬一斉分析法の検討 －

Study on the development of analysis method of chemical substances at the time
of water quality accidents

－ Study of simultaneous analysis method of pesticide residue at fish's death in public water areas －

吉岡敏行, 浦山豊弘, 山本浩司, 肥塚加奈江*, 難波順子* (水質科)

*衛生化学科

Toshiyuki Yoshioka, Toyohiro Urayama, Koji Yamamoto, Kanae Koeduka*, Junko Namba*

(Water Section),

*Food and Drug Chemical Research Section

要 旨

公共用水域において魚のへい死事象が発生した際の水質及び魚体中の残留農薬のGC/MS一斉分析法を検討した。農薬類354成分の添加回収試験を行ったところ、水質では溶媒抽出法で326成分、固相抽出法で306成分が良好な回収率であった。魚のエラでは、アセトン:ヘキサン抽出法で236成分、ジクロロメタン-ヘキサン抽出法で246成分が良好な回収率であった。

[キーワード: 公共用水域, 魚のへい死, エラ, 残留農薬, GC/MS]

[Key words: Public water areas, Fish's death, Gill, Pesticide residue, GC/MS]

1 はじめに

岡山県では、公共用水域において水質汚濁事象が発生した際に、その原因究明のための各種迅速分析法を検討し、確立してきた。特に、発生事例の多い油の流出や魚のへい死、白濁現象については、油種分析法^{1,2)}、残留農薬分析法³⁻⁶⁾、石灰硫黄合剤⁷⁾等の分析法を開発し、原因究明に役立てている。そのうち、残留農薬分析法については、現在までに、水質中の160成分について検体が搬入された翌日には分析結果が報告できる態勢を構築している。今回、分析可能な農薬成分数を増やすこと及び媒体として水質だけでなく、へい死した魚体中からの残留農薬の迅速分析法について検討したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

添加回収試験に使用する水は、当センター周辺の用水路で採水した。

添加回収試験に使用する魚は、金魚とボラを使用した。魚のエラの部分を切り取り、ホモジナイズし、試験を実施するまでは冷凍保存し、使用前に解凍した。

また、市販魚の実態調査として、11魚種(マアナゴ、ゲタ科、カレイ科、ヒラメ、ボラ科、サッパ、マダイ、

マアジ、ブリ、コイ) 23検体のエラを切り取り、ホモジナイズし、分析材料とした。

簡易な暴露試験には、購入した金魚(3cm程度)を約2週間、実験室で順化したもの及び実験室内で継代飼育したグッピーの成魚を使用した。

2.2 標準品及びカートリッジカラム

農薬標準液: PL2005農薬GC/MS Mix I ~ VII (林純薬工業: 354成分, 異性体及び代謝物を含む)

内標準液: ナフタレン-d₈, アセナフテン-d₁₀, フェナントレン-d₁₀, フルオランテン-d₁₀, クリセンドレン-d₁₂, ベンゾ(e)ピレン-d₁₂ (Cambridge Isotope Laboratories製)

ENVI-Carb/LC-NH₂: 500mg:500mg/6mL (SUPELCO製)

Multi Sep PR: (Romer Labs製)

Sep-Pak Plus PS-2: (Waters製)

Inert Sep Slim J Dry (2.8g): (ジーエルサイエンス製)

GF/C: (Whatman製)

ジクロロメタン, アセトン, ヘキサン, アセトニトリル, トルエン: 残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮溶媒 (和光純薬製)

2.3 装置

GC/MS : JMS-Q1000GC Mk II

GCカラム : Agilent DB-5MS+DG 30m 0.25mm × 0.25 μm

GC/MSの測定条件等は、既報⁸⁾のとおりである。

2.4 前処理方法

2.4.1 水質の前処理方法

図1に水質分析フローを示す。水質は、溶媒抽出と固相抽出を比較検討した。溶媒抽出は、試料1Lをジクロロメタン100mL、50mLで計2回抽出し、抽出液をあわせて後、ヘキサン20mLを加えて脱水した。抽出液はロータリーエバポレーターを用いて35℃以下で濃縮し、1mLに定容した後、内標準液を各0.1 μg添加した。固相抽出は、次のとおり実施した。はじめに、試料0.1Lをろ紙 (GF/C) でろ過し、ろ紙にアセトン2mLを加え、5分間超音波照射し、溶出した。アセトン溶出液は、ろ液にあわせた。ろ液はあらかじめ活性化したSep-Pak Plus PS-2に10mL/分の流速で通水した。通水終了後、PS-2を精製水10mLで洗浄し、2,500rpmで5分間遠心脱水した。PS-2の下側にInert Sep Slim J Dryを取り付け、ジクロロメタン8mLで溶出した。溶出液は窒素ガスで濃縮し、ヘキサンに転溶して0.5mLに定容し、内標準液を各0.05 μg添加した。

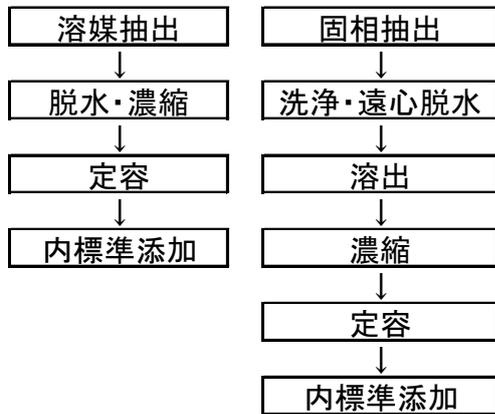


図1 水質分析フロー

2.4.2 魚の前処理方法

図2に魚の分析フローを示す。魚の分析は、既報⁶⁾の前処理方法を参考に、試料2gに水を20mL添加し、ジクロロメタン20mL (又はアセトン:ヘキサン=1:2 20mL) で振とう抽出を10分間実施した後、超音波抽出を10分間実施した。遠心分離を行い、ジクロロメタン層 (又はヘキサン層) をビーカーに移した。試料を含む水層はヘキサ

ン10mLで再度、振とう抽出を10分間実施した後、超音波抽出を10分間実施した。抽出液をあわせて脱水後、濃縮し、ヘキサンに転溶した。次に、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂後、アセトニトリル層を濃縮した。濃縮液をMulti Sep PRとENVI-Carb/LC-NH₂を連結したカラムに負荷し、アセトニトリル15mLで溶出した。上側のMulti Sep PRを外し、ENVI-Carb/LC-NH₂からトルエン:アセトニトリル (1:3) 25mLで溶出して、アセトニトリル15mLとあわせた。溶出液を濃縮し、ヘキサンに転溶・濃縮後、内標準液を0.1 μg添加して1mLに定容した。

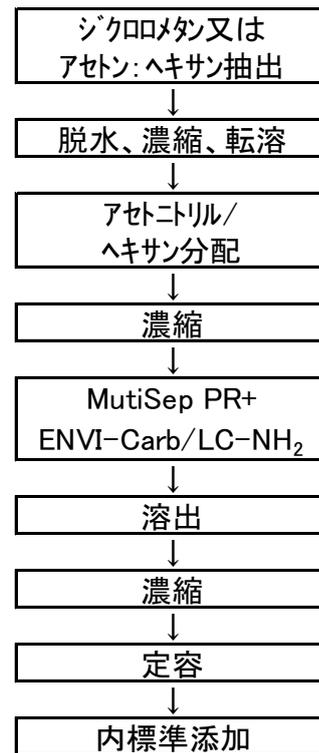


図2 魚分析フロー

2.5 魚の簡易暴露試験

暴露試験は、取扱が容易なことや小規模な実験であることから小型の金魚とグッピーを選定した。高濃度暴露試験では金魚を使用し、低濃度暴露試験では雌雄による取込量の違いがあるかどうか確認するために、グッピーの雌雄一対を使用した。

最初に、高濃度暴露試験として、1Lビーカーに脱塩素水道水1Lと農薬354成分各1 μgを添加した試験溶液を4個作成し、各ビーカーに金魚1尾を入れた。水質の農薬分析は、1, 3, 24時間後に実施した。金魚は、へい死した個体を1, 3, 24時間後に試験溶液から取り出し、農薬分析を実施した。

次に、低濃度暴露試験として、1Lビーカーに脱塩素水

水道水1Lと農薬354成分各0.1 μg 及び0.01 μg を添加したものを作成し、各ビーカーにグッピー2尾（雄1尾、雌1尾）を入れ、10日間の短期暴露試験を実施した。試験溶液は止水式で無曝気、エサは1日1回食べきる量だけ与え、試験溶液は1日1回交換した。試験終了後、0.1 μg /L濃度区のグッピー（雄、雌）の魚体を個別に農薬分析を実施した。なお、試験溶液には助剤は添加しなかった。

2.6 市販魚のエラの農薬分析

図2の魚の分析フローにしたがって魚のエラ2gの農薬分析を実施した。

3 検討結果及び考察

3.1 添加回収試験結果

水質は、農薬354成分の添加回収試験（溶媒抽出：各1 μg /L、固相抽出：各2 μg /L）を実施した。溶媒抽出の場合、回収率が良好（60～140%）な農薬は、326成分であった。固相抽出の場合、回収率が良好な農薬は300成分であった。溶媒抽出で回収率が60%未満であった農薬は、フルシラゾールやピフェナーゼ、ジタリムホス、ホルベット等8成分であった。固相抽出で回収率が60%未満であった農薬は、シフルトリンやフルシトリネート、フェンバレート、シベルメトリン等31成分であった。迅速な前処理が可能な点や回収率が良好な農薬数が多い点から判断すると、緊急時の分析法としては、ジクロロメタンを用いた溶媒抽出が適していると考えられた。

魚のエラは、農薬354成分の添加回収試験（各0.5 μg /g-wet）を実施した。金魚のエラへの添加回収試験（アセトン：ヘキサン抽出）の結果、回収率が良好な農薬は236成分であった。ボラのエラへの添加回収試験（ジクロロメタン抽出）の結果、回収率が良好な農薬は246成分であった。抽出溶媒による差は小さかった。緊急時の分析法としては、アセトン：ヘキサン抽出が適していると考えられた。

3.2 魚への簡易暴露試験結果

金魚への高濃度暴露試験の結果、1～3時間後に金魚はすべて死亡した。図3に試験期間中の代表的な農薬の経時的な濃度変化を示す。シンドンエチル（除草剤）やトリフルラリン（除草剤）は、水質濃度が直線的に減少し、24時間後に当初濃度の60%未満となった。同様の傾向を示した農薬は、94成分あった。これらの農薬は分解や吸着に伴い濃度が減衰したものと推察された。一方、メチルパラチオン（殺虫剤）やエンドスルファンサルフェート

（殺虫剤エンドスルファンの代謝物）は、24時間後も水質濃度がほとんど変化しなかった。このような傾向を示す農薬は、197成分あった。これらの農薬は、24時間程度ではほとんど分解や吸着が生じないと考えられた。

試験開始24時間後の金魚からは、農薬37成分が検出された。検出量は0.010～0.25 μg /1尾であった。試験溶液から金魚への検出された農薬の移行率は、1～25%であった。図4に魚から検出された代表的な農薬の経時的な濃度変化を示す。今回の設定濃度1 μg /Lでは、3時間以内には魚への取り込みや吸着は10%未満であったが、24時間後には10%を超過していた農薬があったことから、へい死後も魚への吸着が生じていたことが判明した。

グッピーへの低濃度暴露試験では、試験期間中、0.01 μg /L濃度区のグッピーはエサをよく食べたが、0.1 μg /L濃度区のグッピーはエサをほとんど食べなかった。いずれの濃度区のグッピーも10日後まで生存していた。0.1 μg /L濃度区のグッピーの農薬を分析したところ、検出された農薬は、クロルベンシド（除草剤）、ペルタン（殺虫剤）、メトキシクロール（殺虫剤）等15成分で、検出量は0.005～0.21 μg /1尾であった。最も濃度が高かったのは、エンドスルファンサルフェートであり、水中濃度に対する魚体中濃度の比は、2,100であった。なお、農薬標準溶液には α -エンドスルファンと β -エンドスルファンも入っているため、エンドスルファンサルフェート濃度は魚が代謝

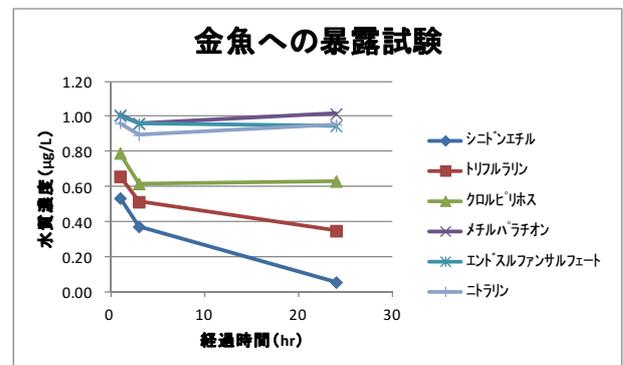


図3 代表的な農薬の濃度変化（水質）

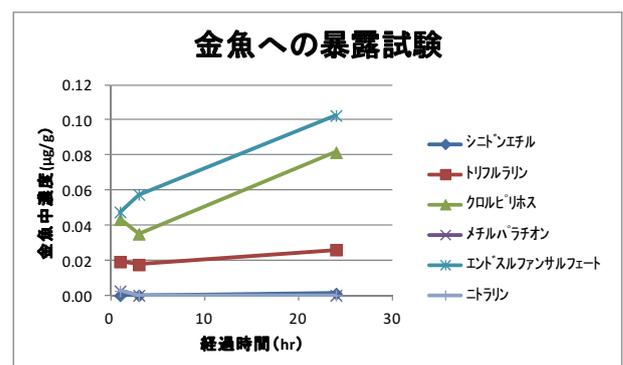


図4 代表的な農薬の濃度変化（魚）

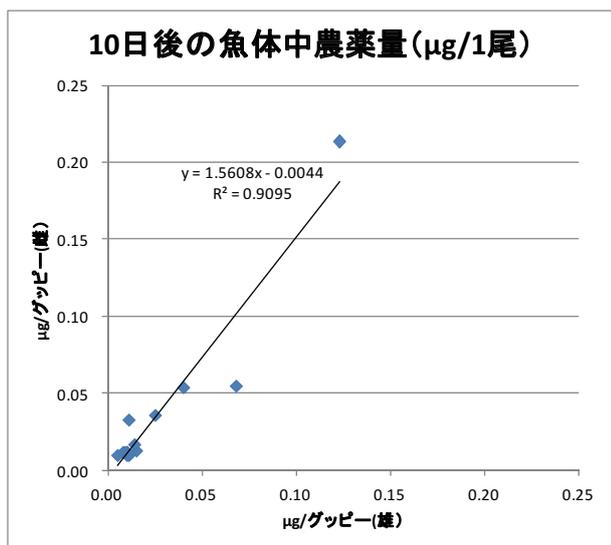


図5 雌雄の違いによる農薬検出量

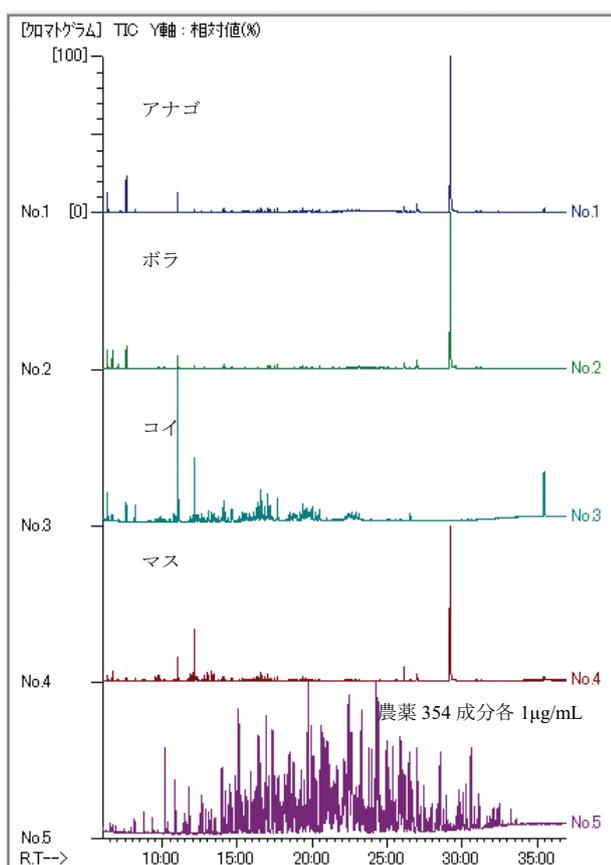


図6 代表的な魚のクロマトグラム

したものが合算されている可能性があった。魚がへい死しない低濃度の暴露試験の場合、魚が取り込む成分数は少なくなっているが、この原因は、今回の簡易暴露試験は、流水式でなくバッチ式であることが影響していると考えられた。試験溶液の交換は、1日1回だけであり、特に、水に溶けにくい農薬成分は魚が取り込む前にガラス壁に吸着し、魚へ暴露されにくかったと推測された。図5に検

出された15成分のグッピーの雌雄の違いによる検出量を示した。体が大きい雌は、体の小さい雄に比べて検出量が約1.5倍程度大きい傾向があり、検出量は体重に比例しているものと考えられた。

3.3 市販魚のエラの農薬分析結果

市販魚の実態調査として、11魚種23検体の農薬を分析した。図6にクロマトグラムの一例を示す。いずれの農薬も検出されなかった。今回実態調査に供した市販魚からは農薬が検出されなかったことから、一般に食用に供されている魚体からは農薬はほぼ検出されないと推測された。

4 まとめ

水質及び魚のエラ中の農薬一斉分析法を検討した。水質では、従来の160成分からおよそ倍程度の326成分の一斉分析が可能であった。魚のエラでは、246成分の一斉分析が可能であった。魚の簡易濃縮試験の結果、魚へ取り込まれた農薬成分が明らかになった。今後は、公共用水域において、魚のへい死事象が発生した場合には、水質及び魚体中の農薬分析を実施し、分析データの蓄積を行い、魚のへい死原因の究明に役立てる予定である。

文 献

- 1) 藤原博一, 吉岡敏行, 剣持堅志, 中桐基晴, 浦山豊弘: 環境中微量有害化学物質の分析, 検索技術の開発に関する研究—油分析に影響する各種要因について—, 岡山県環境保健センター年報, 32, 67-74, 2008
- 2) 吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和夫: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—GC/MSを用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—, 岡山県環境保健センター年報 37, 29-40, 2013
- 3) 吉岡敏行, 西島倫子, 山辺真一, 林義隆, 今中雅章ら: 河川における魚の死亡原因物質の特定について, 岡山県環境保健センター年報, 26, 26-28, 2002
- 4) 浦山豊弘, 剣持堅志, 藤原博一, 杉山広和, 鷹野洋: 環境中微量有害化学物質の分析, 検索技術の開発に関する研究—GC/MSによる農薬の多成分同時分析法の開発—, 岡山県環境保健センター年報, 29, 55-66, 2005
- 5) 吉岡敏行, 剣持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 前田大輔ら: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—岡山県の河川における農薬

類の環境実態調査一，岡山県環境保健センター年報
33, 65-72, 2009

- 6) 吉岡敏行, 難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美:
食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技
術の開発に関する研究一水産物及び穀類等の残留農
薬分析法の検討について一, 岡山県環境保健センター
年報, 40, 77-83, 2016
- 7) 北村雅美, 浦山豊弘, 藤田和男, 斎藤直己: 河川等
の汚濁事象における水質調査一水質の着色事例につ
いて一, 岡山県環境保健センター年報, 30, 25-29,
2006
- 8) 吉岡敏行, 劔持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 浦山豊
弘: 環境中超微量有害化学物質の分析, 検索技術の
開発に関する研究一GC/MSによる底質中の農薬多成
分同時分析法の検討一, 岡山県環境保健センター年
報, 32, 47-57, 2008