

【調査研究】

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

—LC/MS/MSを用いた生物中農薬の分析法の検討—

Study for Simultaneous Analysis Method of Pesticides in Organism by LC/MS/MS

大月史彦, 浦山豊弘, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 劔持堅志

Fumihiko Otsuki, Toyohiro Urayama, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi,
Katashi Kenmotsu (Department of Water)

要 旨

環境試料（生物中）における農薬2種類（フルフェノックスロン、フルアジナム）の同時分析法について検討した。

分析法は生物試料を有機溶媒で抽出後、リン酸緩衝液等で夾雑物を除去し、更にヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂したのち定容した。その一部を分取し、ENVI-Carb/LC-NH₂のデュアルレイヤー固相カートリッジで精製しLC/MS/MS（SRM法）で測定する方法とした。

LC/MSの機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線の使用が必要であった。その場合検量線標準溶液の保存性に留意する等の注意を要するが、本分析法は要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。また、環境試料を分析したところ、いずれの農薬も検出されなかった。

[キーワード：農薬, マトリックス効果, LC/MS/MS法]

[Key words : Pesticides, Matrix Effect, LC/MS/MS]

1 はじめに

フルフェノックスロン及びフルアジナムは、近年使用されている農薬であるが、環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、本県に分析法の開発が委託されたことから、当該調査と連携して当該物質をLC/MS/MSを用いて分析する方法を検討し、マトリックス効果等について知見を得るとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

フルフェノックスロン

和光純薬工業製（残留農薬試験用, 98.0%）

フルアジナム

和光純薬工業製（残留農薬試験用, 97.0%）

メタノール, ギ酸

LC/MS用

アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, アセトニトリル, トルエン

5000倍濃縮検定品

精製水

ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム

残留農薬・PCB試験用

リン酸二水素カリウム, リン酸水素二カリウム

特級

固相カートリッジ

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

NaCl飽和0.5Mリン酸緩衝液 (pH=7.0)

リン酸水素二カリウムを52.7 g, リン酸二水素カリウムを30.2 gそれぞれ量りとり, 1 L弱の精製水で溶かす。これをNaOHでpH=7.0に調整後, 塩化ナトリウムを飽和量入れ, 1 Lにメスアップする。(以下「リン酸バッファー」という。)

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム

Atlantis T3 150mm×2.1mm, 3μm (Waters製)

移動相

A (0.35%ギ酸) : B (メタノール)

0~2min A : B = 95 : 5
 2~7min A : 95→5
 B : 5→95 linear gradient
 7~20mi A : B = 5 : 95
 20~20.1min A : 5→95
 B : 95→5 linear gradient
 20.1~30min A : B = 95 : 5
 流 量 0.2mL/min
 カラム温度 40℃
 注 入 量 10μL

(MS条件)

使用機種 Micromass Quattro micro API
 キャピラリー電圧 0.5kV
 ソース温度 100℃
 デゾルベーション温度 500℃
 コーンガス流量 50L/hr
 デゾルベーションガス流量600L/hr
 イオン化法 ESI Positive (フルフェノクスロン)
 ESI Negative (フルアジナム)
 コーン電圧 30V (フルフェノクスロン)
 30V (フルアジナム)
 コリジョンエネルギー 20eV (フルフェノクスロン)
 20eV (フルアジナム)
 モニターイオン 488.9>157.8 (フルフェノクスロン)
 462.9>415.7 (フルアジナム)

2.3 分析法

図1に示す分析法について検討した。

生物試料10gを100mLのコニカルビーカーにとり、アセトン：ヘキサン=1：2を50mL加える。これを1minホモジナイズする。その後、吸引濾過し、濾紙上の残渣を25mLのアセトン：ヘキサン=1：2を用いて洗浄する。

40℃以下で乾固直前まで濃縮し、これに酢酸エチル：アセトニトリル=3：1を50mL、リン酸バッファーを50mL、塩化ナトリウムを1~2g加え、5min振とうして洗浄する。静置後、有機溶媒層をとる。水層に酢酸エチル：アセトニトリル=3：1を50mL再度加え、同様の操作を実施する。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、石英ガラスをフィルターとした漏斗でろ過する。

40℃以下で乾固直前まで濃縮し、これにアセトニトリル飽和ヘキサンを25mL、ヘキサン飽和アセトニトリルを30mL加え、5min振とうする。静置後、アセトニトリル層をとる。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリルを30mL再度加え、同様の操作を合計3回実施する。アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で50mL以下に濃縮しヘキサンを除去したのち、アセトニトリルで100mLに定容する。

このうち、20mLを分取し、20mLのトルエン：アセトニトリル=1：3であらかじめコンディショニング済みのENVI-Carb/LC-NH₂ (500mg/500mg) 固相に負荷する。この時流出する負荷液もとる。負荷後20mLのトルエン：アセトニトリル=1：3で溶出し、40℃以下で1mL程度まで濃縮する。10mLのアセトンを加え同様に1mL程度まで濃

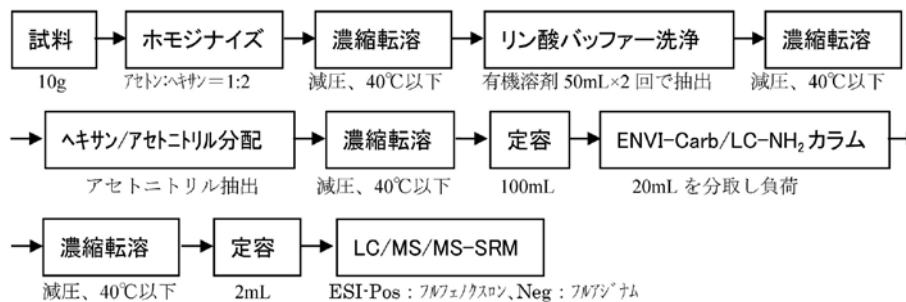


図1 分析法のフローチャート

表1 マトリックス効果の装置による違い (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

装置	Micromass Quattro micro API				AppliedAPI3200
	0.35%ギ酸		5mMCH ₃ COONH ₄		5mMCH ₃ COONH ₄
移動相	0.35%ギ酸		5mMCH ₃ COONH ₄		5mMCH ₃ COONH ₄
カラム	T3	Xterra	T3	Xterra	Xterra
フルフェノクスロン	38	51	50	47	96
フルアジナム	103	117	107	112	※

■は本開発での条件。

※AppliedAPI3200は臨時に借りたため、回収率が良好なフルアジナムは測定せず。

縮する。10mLのなし型フラスコに移し、再度5mLのアセトンを加え0.5mL程度まで濃縮する。これに40℃以下の乾燥窒素を吹き付けて乾固させる。

残渣に50%アセトニトリル溶液2mLを加え、0.45μmのフィルターでろ過したものを試料液とする。

なお、検量線作成用マトリックス抽出液については、上記と同様の操作を、検量線を希釈作成するのに十分な量が得られるだけ複数回繰り返した後、得られた抽出液を混合均一化したものを用いた。

3 結果及び考察

3.1 マトリックス効果の検討

フルフェノクスロンで見かけ上の回収率の低下が生じたため、マトリックス効果について各種の検討を実施した。

3.1.1 マトリックス効果の装置による違いの検討

マトリックス効果の装置による違いについて検討を行った結果を表1に示す。50%アセトニトリル溶液と、同組成のマトリックス含有溶液に標準物質を1ng/mLの濃度で添加し、マトリックス効果を確認した。Micromass Quattro micro APIではカラム、移動相によらず著しいイオン化抑制が生じたが、AppliedAPI3200ではイオン化抑制はほぼ起こらなかった。装置により、マトリックス効果が著しく異なる場合があるとの結果が得られた。

3.1.2 マトリックス効果の標準濃度依存性の検討

マトリックス効果の標準濃度依存性について検討を行った結果を表2に示す。フルフェノクスロンは、濃度によらずイオン化抑制のマトリックス効果がほぼ一定であり、フルアジナムは、高濃度でマトリックス効果によりイオン化が増進されていることがわかった。

3.1.3 マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性について検討を行った結果を表3に示す。添加濃度1ng/mLでマトリックス液の希釈率依存性を確認した。マトリックスの希釈率が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、マトリックス液は希釈できないことがわかった。

3.1.4 マトリックス効果のマトリックス種依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス種依存性について検討を行った結果を表4に示す。添加濃度1ng/mLでマトリックス液のマトリックス種依存性を確認した。マトリックスの種類が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、分析対象に応じてマトリックス検量線を作る必要があることがわかった。

表2 マトリックス効果の濃度依存性 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

濃度 ng/mL	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100
フルフェノクスロン	46	24	27	27	37	31	32	35	31	29	28	29	33
フルアジナム	56	68	81	83	94	98	98	103	103	115	123	154	196

表3 マトリックス液希釈倍率依存性確認 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

希釈倍率	抽出液原液	2倍希釈	5倍希釈	10倍希釈	マトリックス無し
フルフェノクスロン	40	51	70	77	100
フルアジナム	100	101	101	96	100

表4 マトリックス液種類依存性確認 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

種類	ヒラメ	マス	コイ	サーモン	アサリ	鶏肉	ボラ
フルフェノクスロン	78	70	86	67	52	64	52
フルアジナム	112	111	109	111	112	116	113

表5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ボラ	フルフェノクスロン	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.284	95	6.8
	フルアジナム	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.213	71	9.5

表6 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)				
			6日	12日	14日	17日	28日
フルフェノクスロン	標準溶液	0.1	—	—	—	—	92
		50	—	—	—	—	99
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	111	128	—	65	0
		50	103	117	—	85	33
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	95	—
フルアジナム	標準溶液	0.1	—	—	—	—	89
		50	—	—	—	—	102
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	115	136	—	110	0
		50	106	138	—	107	23
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	93	—

※粗抽出液は「2.3 分析法」中の「アセトニトリルで100mLに定容する。」まで実施したものとし、この粗抽出液20mLに0.2ngの標準を添加した。添加した粗抽出液を0日、14日保存後、カラム以降の前処理を実施した。

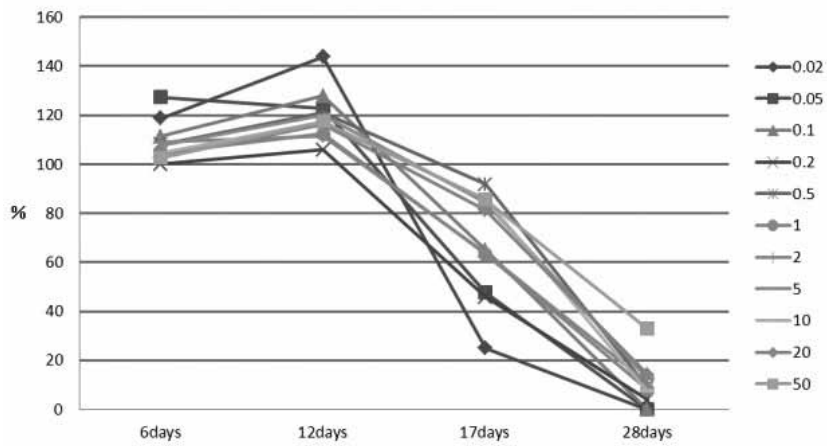


図2 マトリックス標準の残存率 (フルフェノクスロン)

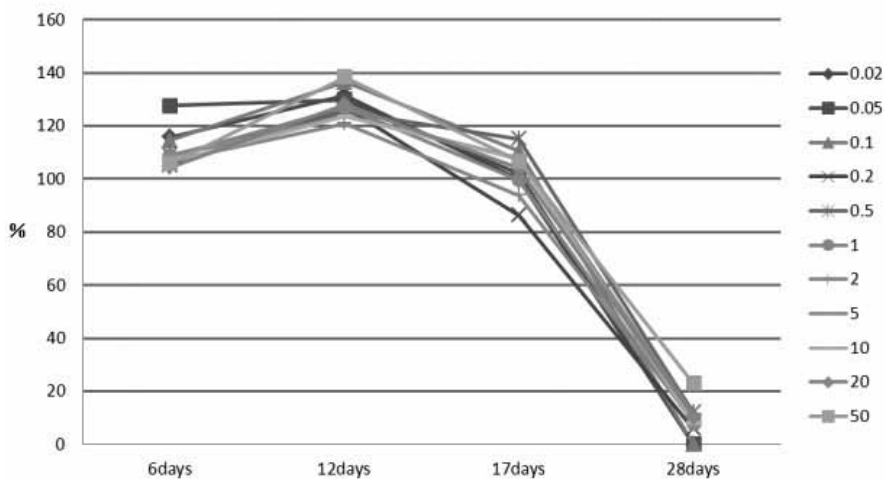


図3 マトリックス標準の残存率 (フルアジナム)

3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表5に示す。添加回収試験には水島沖において採取されたボラを使用した。フルフェノクスロン、フルアジナムともに良好な添加回収試験結果が得られた。

3.3 保存性試験結果

保存性試験結果を表6に示す。また、マトリックス標準液の各濃度における残存率を図2, 3に示す。

マトリックスの入っていない標準溶液の保存性は良好であり、マトリックス標準液は約2週間程度までは保存性が良好であった。また、粗抽出液による試験において、14日後の保存性が良好であるのも、この傾向と一致している。このことから、溶液を調整後、2週間以内での測定が必要であることがわかった。

3.4 環境試料の分析結果

平成23年8月に採取した環境試料の生物（水島沖のボラ）から対象物質は検出されなかった。定量下限はフルフェノクスロンが 0.025ng/g-wet 、フルアジナムが 0.032ng/g-wet であった。

4 まとめ

生物中の農薬2種の同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) LC/MSの機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線等を用いる必要があった。
- 2) マトリックス効果の程度は、装置、標準濃度、マトリックスの種類及び濃度などで変化するため適切なマトリックス検量線を用いる等の注意が必要であった。
- 3) 添加回収試験結果は良好であった。
- 4) 保存性試験結果から、溶液を調整後、約2週間以内での測定が必要であることがわかった。
- 5) 環境試料の生物（水島沖のボラ）から対象物質は検出されなかった。

なお、本研究は環境省委託の平成23年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課：化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農作物）、フルアジナム試験法、フルフェノクスロン試験法」，食安発第0124001号，平成17年1月24日，2005
- 3) 環境庁告示：フルアジナム試験法，環境庁告示第32号，平成12年4月28日，2000
- 4) 環境庁告示：フルフェノクスロン試験法，環境庁告示第20号（号外第84号），平成9年4月30日，1997