

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

－ LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討－

Studies on Conditions for Simultaneous Analysis of Pesticides by LC/MS

浦山豊弘，杉山広和，劔持堅志，藤原博一，鷹野 洋，吉岡敏行*

水質第二科

*環境管理課

Toyohiro Urayama, Hirokazu Sugiyama, Katashi Kenmotsu, Hiroichi Fujiwara, Hiroshi Takano, Toshiyuki Yoshioka

【調査研究】

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

－ LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討－

Studies on Conditions for Simultaneous Analysis of Pesticides by LC/MS

浦山豊弘，杉山広和，劔持堅志，藤原博一，鷹野 洋，吉岡敏行*

水質第二科

*環境管理課

Toyohiro Urayama, Hirokazu Sugiyama, Katashi Kenmotsu, Hiroichi Fujiwara, Hiroshi Takano, Toshiyuki Yoshioka

要 旨

環境試料(水質)中のプロクロラズ，チフェンスルフロンメチル及びゴルフ場に関連する農薬の計17農薬の多成分同時分析法を検討した。分析法は，逆相系固相と活性炭系固相を併用して抽出しLC/MS-SRMで測定する方法で，感度の悪いオキシシン銅を除く16農薬について目標とした0.1 μ g/Lレベルでの分析が可能なが確認された。

[キーワード：プロクロラズ，チフェンスルフロンメチル，農薬，多成分分析，LC/MS]

1 はじめに

プロクロラズは稲(種子処理)等で使用される農薬(殺菌剤)，チフェンスルフロンメチルは小麦等で使用されるスルホニル尿素系の農薬(除草剤)であり，いずれも特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(PRT法)の第二種指定化学物質に指定されており，食品衛生法において食品，添加物等の規格基準が定められている農薬である。

当センターでは，平成17年度に環境省の化学物質環境実態調査においてプロクロラズ及びチフェンスルフロンメチルの分析法¹⁾の開発を行うとともに，この分析法を基礎に，ゴルフ場に関連する農薬のうちGC/MSでの同時分析が困難な農薬を併せた計17農薬の同時分析の可能性についての基礎的な検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 対象農薬

分析法開発対象物質の2物質(プロクロラズ，チフェンスルフロンメチル)，ゴルフ場農薬のうちHPLCによる同時分析が行われている9物質(アシラム，アゾキシストロビン，オキシシン銅，シデュロン，チウラム，トリクロピル，ハロスルフロンメチル，フラザ

スルフロン，メコプロップ(MCPP))，GC/MS項目であるが他の多成分と同時分析できない5物質(アセフェート，トリクロロホン(DEP)，ベンスリド(SAP)，メタミドホス(アセフェートの分解生成物)，チオジカルブ)，苦情時のGC/MS一斉分析対象物質約100物質のうち酸性下での抽出を必要とする1物質(ベンタゾン)の計17物質について検討を行った。

2.2 試薬

メタノール：LC/MS用

精製水(移動相溶液を含む)：

ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

固相カートリッジ：

Aqsis PLS-3(200mg/6mL) ジーエルサイエンス製

Sep-Pak Plus AC-2 Waters製

1mol/L硝酸：関東化学製

酢酸アンモニウム：試薬特級

ギ酸：高速液体クロマトグラフ用

2.3 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を下記に示す。

(LC条件)

使用機種：Waters社製 Alliance2695

カラム：Develosil C30-UG-3 2mm ϕ ×150 mmL(野村化学)

表1 各物質の測定条件(SRM測定)

物質名	イオン化法	モニターイオン(m/z)		コーン電圧(V)	コリジョン電圧(eV)
		プレカーサー	プロダクト		
Prochloraz	ESI Positive	378	310	20	10
Thifensulfonmethyl	ESI Positive	388	167	25	15
Acephate	ESI Positive	184	143	25	10
Methamidophos	ESI Positive	142	94	25	10
Oxine-copper	ESI Positive	146	118	45	22
Asulam	ESI Positive	231	156	15	10
DEP	ESI Positive	257	109	25	20
Thiodicarb	ESI Positive	355	163	20	10
Thiram	ESI Positive	241	88	20	10
Flazasulfon	ESI Positive	408	182	30	15
Siduron	ESI Positive	233	137	30	15
Azoxystrobin	ESI Positive	404	372	30	15
Halosulfuronmethyl	ESI Positive	435	182	25	20
SAP	ESI Positive	398	314	20	10
Bentazone	ESI Negative	239	132	35	25
Tricopyl	ESI Negative	254	196	20	10
MCPP	ESI Negative	213	141	20	15

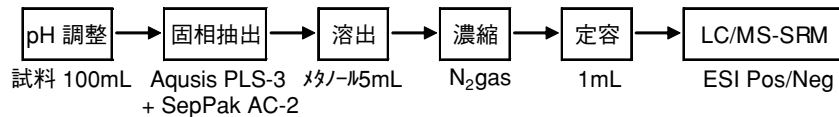


図1 分析フロー

移動相：条件I

- A：0.3mM酢酸アンモニウム水溶液， B：メタノール
- 0～0.1min A：B=80：20
- 0.1～9min A：80→0 B：20→100 liner gradient
- 9～20min A：B=0：100
- 20～20.5min A：0→80 B：100→20 liner gradient
- 20.5～33min A：B=80：20

条件II

- A：0.05%ギ酸， B：アセトニトリル
- 0～2min A：B=80：20
- 2～10min A：80→0 B：20→100 liner gradient
- 10～20min A：B=0：100

以下，条件Iと同じ

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

Capillary：5kV， SourceTemp：100℃，

Desolvation Temp：500℃， DesolvationGas：600L/hr，
ConeGas：50L/hr

イオン化法， モニターイオン， コーン電圧及びコリ
ジョン電圧：表1 参照

2.4 分析方法

図1に示す分析方法について検討した。その詳細は
次のとおりである。

水質試料100mLに1mol/L硝酸を加えてpH3.5に調整
した。固相カートリッジPLS-3及びAC-2をそれぞれ
10mLのメタノールと20mLの精製水でコンディショ
ニングした後， PLS-3→AC-2の順に通水されるよう直列
に接続し10mL/minで通水し， 通水終了後の固相カ
ートリッジは直列に接続したまま精製水15mLを通し
て洗浄した。それぞれの固相を窒素ガスを5分間通気し
て間隙水を除き， それぞれの固相をメタノール5mL
を用いて溶出した。溶出液は40℃以下で窒素ガスを吹き
付けて約0.2mLまで濃縮した後， メタノール/水(1:1

v/v)を加えて1mLに定容し、試料液とした。

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 測定モードの検討

対象物質の大部分は ESI Positive で測定できたが、ベンタゾン、トリクロピル、メコプロップ(MC P P)の3物質は ESI Negative で測定する必要があった。(表1)

なお、使用機種(Micromass Quattro micro API)は Positive イオンと Negative イオンを同時測定することが可能なため、1回の注入で全ての農薬を分析できる測定条件を作成した。

また、測定法については S I M測定も検討したが、S I M測定では図2上段に示すとおりカラムバック等に起因する妨害が大きく高感度分析が不可能であったことから、図2下段のようにノイズが少なくS/N比の良い測定が可能な S R M(MS/MS)測定を採用した。

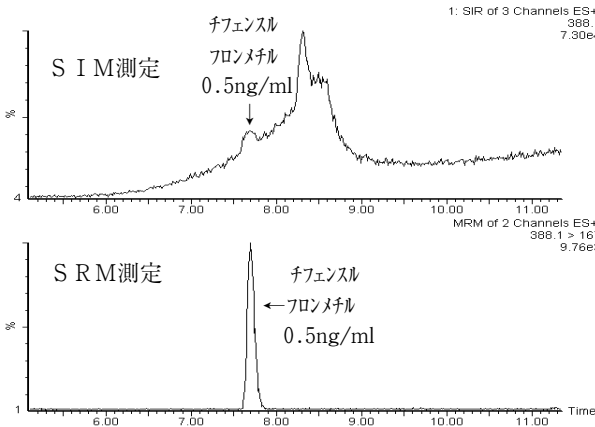


図2 SIMとSRMのクロマトグラムの比較
(チフェンスルフロンメチル)

3.1.2 移動相の検討

チフェンスルフロンメチルは水溶性が高く LogPow が小さいという特徴を持つ。このため移動相に塩を添加しないと図3上段に示すようにブロードなピークとなったが、酢酸アンモニウムを添加すると図3下段に示すようにシャープで感度の良いピークが得られた。しかし、この条件(条件 I)をゴルフ場関連農薬適用した場合には、ほとんどの対象物質が測定できたもののオキシシ銅は全く感度を示さなかった。(図4上段)

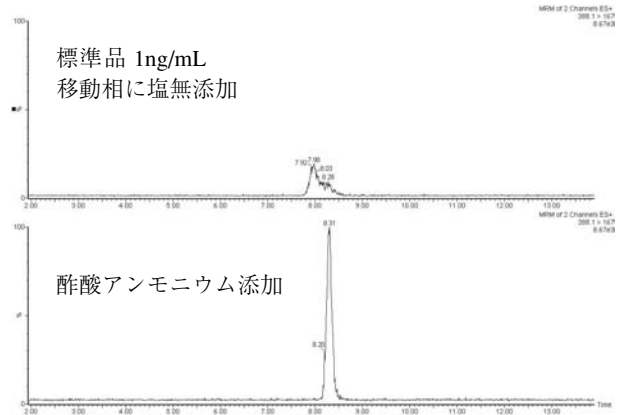


図3 塩添加とピーク形状の変化(チフェンスルフロンメチル)

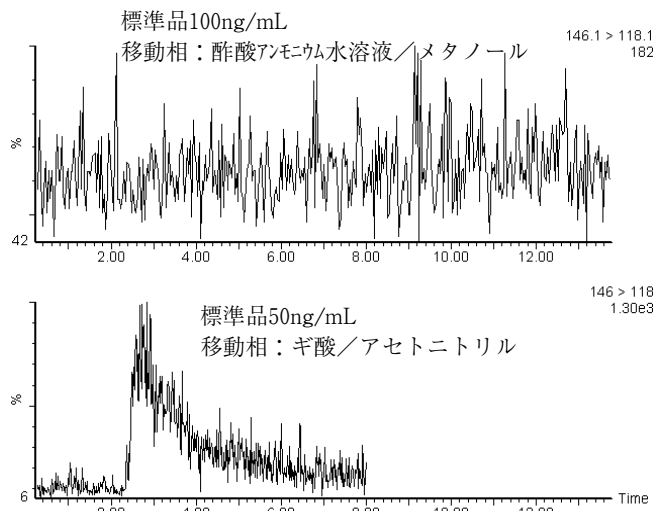


図4 移動相とオキシシ銅のクロマトグラム

このため、大野の報告²⁾を参考に、移動相をギ酸/アセトニトリル(条件 II)に変更したところ、オキシシ銅も測定できるようになった。しかし、図4下段に示すとおりオキシシ銅はテーリングし感度が低かったため、標準品濃度を他の農薬の5倍として以後の実験を行った。

条件 I と II の LC 分離と感度の比較結果を表 2 に示したが、ピーク強度が強く S/N 比も大きい物質は条件 I が多かったが、ゴルフ場農薬調査ではオキシシ銅を測定できることが必須であるため、条件 II を採用することとした。

3.1.3 ドウエル時間の調整

一般にドウエル時間(特定のイオンを測定する時間)が長い方がピーク強度が強くなり S/N 比が大きくなり高感度測定が可能になるが、多成分を同時に測定する場合は、1成分当りの測定頻度が少なくなることから、

表2 各物質の保持時間、ピーク高、S/N比、ドウエル時間

移動相 物質名	酢酸アンモニウム/メタノール(条件Ⅰ)				ギ酸/アセトニトリル(条件Ⅱ)				S/N比が 大きい条件
	保持時間 (min)	ピーク高	S/N比	ドウエル 時間(ms)	保持時間 (min)	ピーク高	S/N比	ドウエル 時間(ms)	
Prochloraz	14.1	6.9E+4	350	30*	13.3	1.7E+4	70	30*	条件Ⅰ
Thifensulfonmethyl	8.1	4.1E+4	220	30*	10.9	7.8E+3	49	30*	条件Ⅰ
Acephate	3.0	4.8E+3	42	200	2.3	2.6E+4	11	200	条件Ⅰ
Methamidophos	2.7	2.7E+3	51	200	2.3	4.6E+3	49	100	ほぼ同じ
Oxine-copper	—	—	—	—	2.8	1.2E+3	10	200	条件Ⅱ
Asulam	1.9	1.7E+3	16	200	3.6	4.9E+3	61	100	条件Ⅱ
DEP	8.8	1.2E+4	39	100	5.1	3.3E+3	38	200	ほぼ同じ
Thiodicarb	11.7	1.2E+4	60	100	11.2	4.7E+3	44	50	条件Ⅰ
Thiram	10.9	1.0E+4	89	100	11.8	2.5E+3	20	100	条件Ⅰ
Flazasulfon	9.7	5.6E+4	160	30	12.2	1.4E+4	72	30	条件Ⅰ
Siduron	12.8	1.1E+5	290	30	12.6	4.9E+4	71	30	条件Ⅰ
Azoxystrobin	12.5	1.7E+5	390	30	13.0	3.0E+4	100	30	条件Ⅰ
Halosulfuronmethyl	10.2	8.7E+3	59	100	13.1	4.0E+3	34	100	条件Ⅰ
SAP	13.5	1.1E+4	96	100	14.2	1.5E+3	14	100	条件Ⅰ
Bentazone	7.0	8.3E+3	76	100	11.4	9.7E+3	30	30	条件Ⅰ
Triclopyl	10.9	9.4E+2	12	200	12.3	1.2E+3	14	200	ほぼ同じ
MCPP	11.1	1.8E+4	86	30	12.5	1.5E+4	45	30	条件Ⅰ

*ピーク高及びS/N比は標準品10ng/mL(オキシシン銅は50ng/mL)での値 * : 分析法開発(2物質のみの分析)では200ms

ピーク面積を計算するための測定点数が少なくなり定量精度が悪化する。このため、個々の物質を測定する際のドウエル時間を調整して全体の感度と定量精度を最適化する必要がある。

今回の分析においては、全ての物質を同時に一定濃度以下まで測定することが目的であるため、感度の高い物質のドウエル時間を短く(最小で30ms)することで、感度の低い物質のドウエル時間を長く(200ms)してピーク強度及びS/N比を大きくした。その結果を表2に示したが、全ての物質を10ng/mL(オキシシン銅は50ng/mL)レベルでS/N比10以上で測定することができた。

3.1.4 イオン源の温度条件等の検討

デソルベーション温度、デソルベーションガス量、コーンガス量の3パラメータについて最適化を行った。

最もS/N比が小さかったオキシシン銅を対象に行ったところ、表3に示すとおり最適値は3パラメータとも、分析法開発時にプロクロラズ及びチフェンスルフロンメチルに対し設定した値と同じ値であった。

3.1.5 注入量等の検討

LCカラムとの相互作用が小さいチフェンスルフロ

表3 温度・ガス量変更による定量値の変化(オキシシン銅)

デソルベーション温度	<u>500℃</u>	450℃	400℃	350℃
オキシシン銅定量値	100	79	74	55
デソルベーションガス量	<u>600L/hr</u>	550L/hr	500L/hr	450L/hr
オキシシン銅定量値	100	98	86	82
コーンガス量	60L/hr	<u>50L/hr</u>	40L/hr	
オキシシン銅定量値	93	100	80	

※分析法の条件を100としてピーク高で定量。

下線太字が分析法開発(プロクロラズ及びチフェンスルフロンメチル)での条件

ンメチルでは、図5に示すとおり注入量を20μLにするとピークがリーディングする現象がみられたため、注入量を5μLとする必要があった。一方、ゴルフ場農薬の同時分析では感度を向上させるため注入量を10μLとしたが、ピークがリーディングする農薬はなかった。

また、測定試料のメタノール濃度については、図6に示すとおりチフェンスルフロンメチルでメタノールの割合が高いとピークがリーディングする現象が認められたため、50%メタノールで測定試料を作成した。

3.2 抽出条件の検討

3.2.1 固相カートリッジの検討

8種類の固相を用いて添加回収実験を行った。(表4)

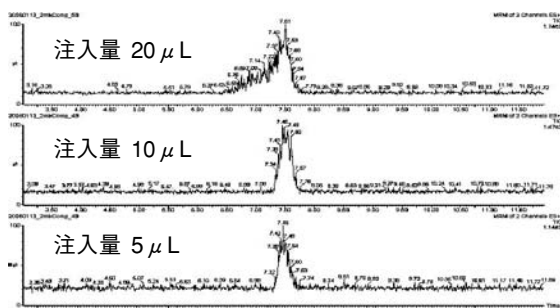


図5 注入量とピーク形状(チフェンスルフロメチル)

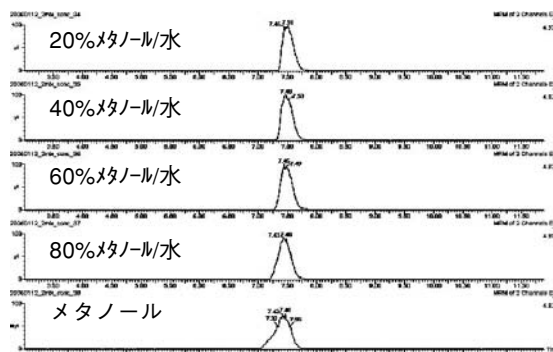


図6 メタノール濃度とピーク形状(チフェンスルフロメチル)

表4 固相カートリッジと回収率 (%)

	PLS2	PLS3	PS2	C8	C18	HLB	AC2	MAX
Prochloraz	87	97	78	89	85	89	0	80
Thifensulfuronmethyl	93	102	104	103	100	104	0	0
Acephate	13	10	12	0	0	15	94	14
Methamidophos	0	1	0	0	0	0	38	0
Oxine-copper	0	28	41	0	0	0	0	48
Asulam	5	48	24	0	0	49	0	0
DEP	68	86	75	8	90	70	8	26
Thiodicarb	85	117	88	96	102	107	0	78
Thiram	0	0	0	0	0	0	0	0
Flazasulfuron	100	107	107	100	98	106	0	0
Siduron	97	105	101	101	94	105	0	98
Azoxystrobin	92	99	86	99	94	96	0	83
Halosulfuronmethyl	90	102	96	110	95	96	0	0
SAP	93	115	91	81	102	115	0	75
Bentazone	59	76	64	5	0	97	0	0
Triclopyl	69	76	77	73	35	106	0	0
MCP	79	78	100	88	63	96	0	0

※精製水100mLに各農薬10ng(オキシシン銅は50ng)添加、pH未調整(実測値5.8)、各固相それぞれに通水し、メタノール5mLで溶出

表5 pHと回収率 (%)

	PLS-3		AC-2	
	pH3.5	pH5.8 (再掲)	pH3.5	pH5.8 (再掲)
Acephate	10	10	86	94
Methamidophos	0	1	91	38
Oxine-copper	76	28	0	0
Asulam	85	48	0	0
DEP	86	86	34	8
Thiodicarb	102	117	0	0
Thiram	34	0	0	0
Flazasulfuron	98	107	0	0
Siduron	95	105	0	0
Azoxystrobin	92	99	0	0
Halosulfuronmethyl	84	102	0	0
SAP	74	115	0	0
Bentazone	83	76	0	0
Triclopyl	90	76	0	0
MCP	92	78	0	0

※精製水100mLに各農薬10ng(オキシシン銅は50ng)添加、pHを3.5に調整し、各固相それぞれに通水メタノール5mLで溶出

アセフェート、メタミドホス及びチウラムを除く14物質の平均回収率は、PLS-3とHLBの2つが高い回収率を示した。

また、アセフェート及びメタミドホスは、活性炭固相のAC-2で回収率が高く、他の固相ではほとんど回収されなかった。また、チウラムは、いずれの固相でも回収されなかった。

3.2.2 pH及び溶出溶媒の検討

チフェンスルフロメチルでは塩基性で回収率が低くなる傾向が見られた¹⁾ので、PLS-3及びAC-2についてpHを3.5にして抽出操作を行ったところ、表5に示すとおりpH5.8では回収率の低かったメタミドホス、オキシシン銅、アシラムで高い回収率が得られるようになり、チウラムもPLS-3で回収できるようになった。

次に、ゴルフ場農薬のアセフェート及びDEPの分析法³⁾を参考に、PLS-3→AC-2と直列に連結して抽出操作を行ったところ、表6に示すとおりPLS-3を通過した液をAC-2で抽出してもアセフェート、メタミドホスは問題なく回収されていた。なお、アセフェートのAC-2での回収率は75%と少し低めとなっているが、PLS-3に10%が抽出されるためであり、両者を合計すると85%となった。

溶出溶媒については、PLS-3の対象物質、AC-2の対象物質共にメタノール5mLで溶出できることが確認されたので、メタノール5mLで溶出することとした。

3-5 定量下限値

苦情時及びゴルフ場農薬調査における溶媒抽出—GC/MS法で採用している0.1μg/Lを目標としたが、

表 6 2 固相連結時の回収率 (%)

	PLS-3	AC-2
Acephate	10	75
Methamidophos	0	92
Oxine-copper	95	0
Asulam	93	0
DEP	106	0
Thiodicarb	103	0
Thiram	35	0
Flazasulfron	91	0
Siduron	97	0
Azoxystrobin	86	0
Halosulfuronmethyl	96	0
SAP	80	0
Bentazone	88	0
Triclopyl	100	0
MCPP	97	0

※精製水100mLに各農薬10ng(オキシシン銅は50ng)添加
pHを3.5に調整し、PLS-3→AC-2と直列で通水
それぞれの固相をメタノール5mLで溶出

10ng/mL(オキシシン銅は50ng/mL)の標準品が十分に測定でき、精製水への添加回収試験で全ての農薬で回収できることが確認できたため、試料水を100倍濃縮することにより、定量下限値0.1 μ g/L(オキシシン銅は0.5 μ g/L)が達成できることが確認された。

4 まとめ

プロクロラズ、チフェンスルフロメチル及びゴルフ場に関連する農薬の計17農薬の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

1) チフェンスルフロメチルは移動相に酢酸アンモニウムを加えるとピークがシャープとなり、この移

動相条件で他のゴルフ場関連農薬の大部分も同時分析可能であった。しかし、オキシシン銅は酢酸アンモニウム水溶液/メタノールの移動相条件では測定できず、ギ酸/アセトニトリルの移動相に変える必要があった。

- 2) 逆相系固相PLS-3と活性炭系固相AC-2を連結し、酸性下で抽出操作を行うことで、対象とした17農薬全てを回収することができた。
- 3) 定量下限値は、ピークがブロードとなるオキシシン銅(下限値0.5 μ g/L)を除き、目標とした0.1 μ g/Lを達成できることが確認された。

なお、本研究は環境省委託の平成17年度化学物質分析法開発調査(環境安全課)と連携して実施した。

文 献

- 1) 環境省環境保健部環境安全課：平成17年度化学物質分析法開発調査報告書(プロクロラズ・チフェンスルフロメチル、岡山県環境保健センター)、Ⅲ-142-161, 2006
- 2) 大野ちづ子：ゴルフ場農薬の液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による測定について、環境化学, 14(3), 649-660, 2004
- 3) ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針について(平成2年5月24日付け環水土第77号、環境庁水質保全局長通知)