

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を用いた水中の農薬多成分同時分析法の検討—

前田大輔，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴（水質科）

【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を用いた水中の農薬多成分同時分析法の検討—

Simultaneous analysis of Pesticides in Water by LC/MS/MS

前田大輔, 劔持堅志, 吉岡敏行, 藤原博一, 中桐基晴 (水質科)

Daisuke Maeda, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka,

Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

要 旨

環境試料(水質中)のオキサミル, フルフェノクスロン, フルアジナム, ペンディメタリン, イソキサチオン, トルクロホスメチル, エチルチオメトン, メソミルの8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で抽出しLC/MS/MS-SRMで測定する方法とし, その基礎的検討を行った。

[キーワード: 農薬, 多成分分析, 水質, LC/MS/MS]

[Key words: Pesticides, Simultaneous analysis, water, LC/MS/MS]

1 はじめに

オキサミル, フルフェノクスロン, イソキサチオン, エチルチオメトン, メソミルは殺虫剤, フルアジナム, トルクロホスメチルは殺菌剤, ペンディメタリンは除草剤であり, オキサミル, フルアジナム, ペンディメタリン, イソキサチオン, トルクロホスメチル, エチルチオメトン, メソミルは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(PRTR法)の第一種指定化学物質に指定されている農薬である。

これらの農薬は環境基準や要監視項目としての指針はないが, 生産, 使用量や排出量が多いにもかかわらずその環境実態は不明である。このため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, 岡山県に分析法の開発が委託されたことから, これらの農薬をLC/MS/MSを用いて同時分析する方法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

メタノール: LC/MS用

アセトニトリル: LC/MS用

精製水: ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調整

固相カートリッジ: Oasis HLB Plus Waters社製

ギ酸: LC/MS用

1mol/L硝酸: 関東化学株式会社製

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 3 μm 2.1 mm ϕ \times 150 mm L
(Waters社製)

移動相: A: 0.35%ギ酸, B: メタノール

0~2min A: B = 95 : 5

2~7min A: 95 \rightarrow 5 B: 5 \rightarrow 95

linear gradient

7~20min A: B = 5 : 95

20~20.1min A: 5 \rightarrow 95 B: 95 \rightarrow 5

linear gradient

20.1~30min A: B = 95 : 5

流量: 0.2mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

注入量: 10 μL

(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 $^{\circ}\text{C}$

デゾルベーション温度：500℃

コーンガス流量：50L/hr

デゾルベーション流量：600L/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

2.3 分析法

図1に示す分析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を1mol/L硝酸でpH2に調整し，アセトニトリル10mL，精製水20mLでコンディショニングした固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に10mL/min.で通水する。通水終了後の固相カートリッジを精製水10mLで洗浄した後，注射器で空気を10mL通気して固相中の水分を除去する。アセトニトリル5mLを用いて溶出し，溶出液は30℃以下で窒素ガスを吹き付けて濃縮した後，50%アセトニトリルで5mLに定容し，試料液とした。

3 結果及び考察

3.1 移動相の検討

各物質の標準液(オキサミル20ng/mL，フルフェノクスロン20ng/mL，フルアジナム1ng/mL，ペンディメタリン5ng/mL，イソキサチオン5ng/mL，トルクロホスメチル20ng/mL，エチルチオメトン100ng/mL，メソミル5ng/mL)をギ酸/アセトニトリル，ギ酸/メタノール，酢酸アンモニウム/アセトニトリル，酢酸アンモニウム/メタノールのそれぞれの移動相で測定したときのピーク面積値を表2に示す。各物質ともメタノールを移動相としたほうがアセトニトリルより感度が良く，フルフェノクスロンやフルアジナムは酢酸アンモニウムの添加により，ペンディメタリン，エチルチオメトンやメソミルはギ酸の添加により感度が向上した。

実際の試料では，移動相組成の違いが感度に影響する可能性があるため，精製水または河川水100mLを固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に10mL/min.で通水，アセ

表1 各物質の測定条件

	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		
Oxamyl	ESI Positive	237.27	71.8	10	20
Flufenoxuron	ESI Positive	488.9	157.8	30	20
Fluazinam	ESI Negative	462.91	185.8	30	20
Pendimethalin	ESI Positive	282.09	212.0	15	10
Isoxathion	ESI Positive	314.08	104.9	25	16
Tolclofos-methyl	ESI Positive	301.09	174.9	30	26
Ethylthiometon	ESI Positive	278.5	88.9	10	10
Methomyl	ESI Positive	163.19	87.9	15	10



図1 分析法フローチャート

表2 各物質のピーク面積値に与える移動相組成の影響

物質名	移動相	ギ酸/アセトニトリル		ギ酸/メタノール		酢酸アンモニウム/アセトニトリル		酢酸アンモニウム/メタノール	
		ピーク面積	相対感度	ピーク面積	相対感度	ピーク面積	相対感度	ピーク面積	相対感度
Oxamyl		4.1E+03	(91)	4.5E+03	(100)	1.9E+03	(42)	2.4E+03	(53)
Flufenoxuron		1.2E+02	(2)	5.5E+03	(100)	5.2E+03	(95)	2.9E+04	(521)
Fluazinam		1.3E+03	(60)	2.2E+03	(100)	3.2E+03	(149)	3.6E+03	(164)
Pendimethalin		2.6E+01	(0)	6.9E+03	(100)	9.3E+01	(1)	8.0E+02	(12)
Isoxathion		1.6E+02	(3)	6.1E+03	(100)	2.7E+03	(44)	3.3E+03	(54)
Tolclofos-methyl		2.2E+01	(1)	3.5E+03	(100)	2.1E+02	(6)	1.3E+03	(37)
Ethylthiometon		2.0E+01	(1)	3.8E+03	(100)	8.8E+01	(2)	3.1E+02	(8)
Methomyl		3.7E+03	(88)	4.2E+03	(100)	7.0E+02	(17)	1.1E+03	(27)

※()は移動相にギ酸/メタノールを用いたときを100とした相対感度を示している

トニトリル5mLを用いて溶出し0.2mLまで濃縮し50%アセトニトリルで1mLに定容した抽出液に各物質の標準液を添加したものと、50%アセトニトリル溶液に各物質の標準液を添加したものを比較した結果を表3に示す。移動相にギ酸を用いたときは河川水を濃縮した抽出液に標準液を添加したものと50%アセトニトリル溶液に標準液を添加したものと(条件Ⅱ)を比較したところあまりマトリックス効果を受けていないが、移動相に酢酸アンモニウムを用いたときにはフルアジナム以外は50%アセトニトリル溶液に標準液を添加したときに比べて抽出液に標準液を添加したものはイオン化が促進され、約2~5倍の数値を示し過大な評価を得られた。また同様な現象は、固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に精製水のみを通水した場合(条件Ⅰ)にも認められ、河川水中の夾雑物による影響の他に固相マトリックスによる影響もあると思われる。

以上のことから感度がよくマトリックス効果の受けにくいギ酸/メタノールを移動相とした。

3.2 抽出条件の検討

3.2.1 固相カートリッジの検討

10種類の固相を用いて添加回収実験を行った。

精製水100mLに各物質の標準液(オキサミル20ng, フルフェノクスロン20ng, フルアジナム1ng, ペンディメタリン5ng, イソキサチオン5ng, トルクロホスメチル20ng, エチルチオメトン100ng, メソミル5ng)を添加し通水, アセトニトリル5mLで溶出した(表4)。水溶性の高いオキサミルやメソミルはC8, C18, tC18のようなシリカ系の固相剤の回収率は低く, PS-2やHLBのようなポリマー系の固相剤の回収率は高かった。その他の物質についても比較的高い回収率を示した親水性, 親油性基を併せ持つ水湿潤性ポリマーのOasis HLB Plusを固相として採用した。

3.2.2 通水時のpHの検討

河川水100mLに各物質の標準液(オキサミル20ng, フルフェノクスロン20ng, フルアジナム1ng, ペンディメタリン5ng, イソキサチオン5ng, トルクロホスメチル

表3 各物質のマトリックス効果に与える移動相組成の影響

物質名	移動相	ギ酸/アセトニトリル		ギ酸/メタノール		酢酸アンモニウム/アセトニトリル		酢酸アンモニウム/メタノール	
		条件Ⅰ	条件Ⅱ	条件Ⅰ	条件Ⅱ	条件Ⅰ	条件Ⅱ	条件Ⅰ	条件Ⅱ
Oxamyl		83	75	93	86	392	537	157	391
Flufenoxuron		139	134	118	119	173	199	264	208
Fluazinam		105	99	97	75	104	102	110	105
Pendimethalin		122	129	94	94	136	138	310	194
Isoxathion		92	78	107	100	186	274	501	497
Tolclofos-methyl		82	91	100	93	200	279	549	513
Ethylthiometon		79	108	102	90	122	140	452	365
Methomyl		89	81	98	100	504	515	256	481

※条件Ⅰ(製製水100mLを1mLまで濃縮した抽出液に標準品を添加したときの面積値/標準品の面積値)*100

※条件Ⅱ(河川水100mLを1mLまで濃縮した抽出液に標準品を添加したときの面積値/標準品の面積値)*100

表4 各種固相カートリッジによる精製水の回収率(%)

	C8	C18	tC18	HLB	PS-2	MAX	WAX	AC-2	CSP-800	Rdx
Oxamyl	6	90	55	107	125	109	109	70	115	118
Flufenoxuron	56	67	77	89	65	70	73	0	62	77
Fluazinam	87	77	89	86	82	0	0	0	72	68
Pendimethalin	75	78	81	76	78	79	73	0	54	37
Isoxathion	82	90	91	92	93	97	83	0	77	65
Tolclofos-methyl	89	85	96	88	88	90	84	0	76	54
Ethylthiometon	87	85	96	73	52	82	84	0	6	59
Methomyl	3	52	28	99	97	98	99	0	94	96

20ng, エチルチオメトン 100ng, メソミル 5ng)を添加し pHを調整して通水し, アセトニトリル 5mLで溶出した(表5)。オキサミルは pH10以上で, フルフェノクスロンは pH6を超えると回収率が低下したが, ほとんどの物質は酸性で高い回収率が得られたことから, pH2を通水時の pHとした。

3.2.3 試料量と最終液量の検討

精製水または河川水を固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に 10mL/min.で通水, アセトニトリル 5mLを用いて溶出し 50%アセトニトリルで定容した抽出液を, 試料

量 100mL 最終液量 5mL, 試料量 100mL 最終液量 1mL, 試料量 300mL 最終液量 1mL で得られた抽出液に標準液を添加したものと 50%アセトニトリル溶液に標準液を添加したものを比較した結果を表6に示す。オキサミル, イソキサチオン, メソミルは試料量を増やしてもマトリックスの影響は見られないが, ペンディメタリン, トルクロホスメチル, エチルチオメトンは試料を 300倍まで濃縮すると少し影響が認められ, フルアジナムはマトリックスの影響を最も受けやすい物質であった。固相カートリッジからの回収率やマトリックスの影響を考慮した結果, 試料量 100mL, 最終液量 5mL とすることとした。

表5 通水時の pH が回収率 (%) に与える影響

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11
Oxamyl	104	102	99	103	103	104	109	111	57	0
Flufenoxuron	80	79	85	79	34	16	17	24	20	13
Fluazinam	85	79	81	40	80	83	86	86	96	94
Pendimethalin	82	72	75	68	71	74	83	81	78	79
Isoxathion	99	90	94	90	94	87	95	94	100	98
Tolclofos-methyl	100	90	89	90	94	90	92	89	93	92
Ethylthiometon	85	73	86	59	58	60	70	79	83	82
Methomyl	104	101	108	103	102	103	106	103	106	102

表6 試料量を与えるマトリックス効果に対する影響

物質名	精製水			河川水		
	試料量/最終液量 100mL/5mL	100mL/1mL	300mL/1mL	100mL/5mL	100mL/1mL	300mL/1mL
Oxamyl	98	113	111	98	110	98
Flufenoxuron	103	128	116	103	121	124
Fluazinam	98	101	93	101	83	60
Pendimethalin	92	96	97	96	92	80
Isoxathion	102	116	115	103	109	98
Tolclofos-methyl	95	104	109	102	94	82
Ethylthiometon	91	105	101	98	94	82
Methomyl	101	100	105	104	105	102

※(精製水または河川水を濃縮した抽出液に標準品を添加したときの面積値/標準品の面積値) * 100

表7 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	Oxamyl	100	20	105	2.2
	Flufenoxuron	100	20	71	9.7
	Fluazinam	100	1	80	4.2
	Pendimethalin	100	5	74	4.5
	Isoxathion	100	5	102	3.2
	Tolclofos-methyl	100	20	98	2.8
	Ethylthiometon	100	100	63	2.9
	Methomyl	100	5	95	1.9

3.3 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表7に示した。回収率は63%~105%となりエチルチオメトンの回収率は63%とやや低くなったが他の物質は70%以上の回収率を示した。

3.4 分解性スクリーニング試験結果

環境水中におけるpHの変化や光による分解性を検討するため、分解性スクリーニング試験を行い、その結果を表8に示した。オキサミルは塩基性で7日後に完全に分解し、フルアジナムも塩基性で分解しやすい傾向を示したことから、試料の保存は酸性条件で保存することが必要である。

3.5 保存性試験結果

環境水中の保存安定性を検討するため保存性試験を行った。

河川水100mLに各物質の標準液を添加し直後に分析したものを100%として、添加して7日間冷暗所に保存後に分析したときの残存率と、添加直後に前処理を行った溶出液を7日間冷暗所に保存し分析したときの残存率を表9に示す。イソキサチオン、トルクロホスメチル、メソミルは7日後もほぼ100%の残存率となり環境水中でも分解しにくいと推定されたが、フルフェノクスロン、フルアジナム、エチルチオメトンはpHを調整しなければ7日後には20%~30%まで分解した。一方、酸性条件下では、約70~80%まで残存していることから、今後アスコルビン酸の添加等による分解防止を検討する必要性が認められた。

4 まとめ

8農薬の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はフルアジナム以外はESI Positiveモードによるイオン化、フルアジナムはESI Negativeモードでイオン化され、SRM(MS/MS)法による高感度測定が可能であった。
- 2) 移動相にギ酸/メタノールを用いることによりマトリ

表8 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	初期濃度 ($\mu\text{g/L}$)	7日後の残存率	
			暗所(%)	明所(%)
Oxamyl	5	2	65	59
	7	2	67	63
	9	2	0	0
Flufenoxuron	5	2	100	91
	7	2	105	96
	9	2	109	95
Fluazinam	5	0.1	95	92
	7	0.1	92	89
	9	0.1	58	47
Pendimethalin	5	0.5	95	96
	7	0.5	97	92
	9	0.5	97	99
Isoxathion	5	0.5	84	79
	7	0.5	84	79
	9	0.5	79	81
Tolclofos-methyl	5	2	95	92
	7	2	98	91
	9	2	95	95
Ethylthiometon	5	10	82	84
	7	10	76	88
	9	10	75	87
Methomyl	5	0.5	96	97
	7	0.5	96	95
	9	0.5	87	86

表9 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
			7日後 pH調整なし	7日後 酸性	
Oxamyl	河川水	試料	0.2	81	93
		粗抽出液	4	100	
Flufenoxuron	河川水	試料	0.2	42	68
		粗抽出液	4	100	
Fluazinam	河川水	試料	0.01	29	79
		粗抽出液	0.2	96	
Pendimethalin	河川水	試料	0.05	85	103
		粗抽出液	1	97	
Isoxathion	河川水	試料	0.05	99	102
		粗抽出液	1	102	
Tolclofos-methyl	河川水	試料	0.2	109	100
		粗抽出液	4	116	
Ethylthiometon	河川水	試料	1	28	73
		粗抽出液	20	91	
Methomyl	河川水	試料	0.05	99	95
		粗抽出液	1	100	

ックス効果を抑えて測定することができた。

- 3) 対象物質はpH2で通水することにより最も高い回収率が得られた。
- 4) 分解性スクリーニング試験において、オキサミルはpH9のときにはほぼ完全に分解し、酸性条件下では安定であった。
- 5) 添加回収率は70%以上の回収率を示したが、エチルチオメトンは63%とやや低値であった。

なお、本研究は環境省委託の平成21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
- 2) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課: 平成15年度化学物質分析法開発調査報告書(農薬, 北海道環境科学研究センター), 1-36, 2004
- 3) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課: 平成15年度化学物質分析法開発調査報告書(フルアジナム, 長野県環境保全研究所), 51-65, 2004
- 4) 村田さつき, 芦塚由紀, 梶原淳陸, 平川博仙, 堀就英, 中川礼子: ポジティブリスト制に対応したGC/MS及びLC/MS/MSによる残留農薬一斉分析法の検討, 福岡県保健環境研究所年報第34号, 67-72, 2007