

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

—LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討（Ⅱ）—

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴

水質第二科

【調査研究】

# 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 —LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討（Ⅱ）—

## Studies on Conditions for Simultaneous Analysis of Pesticides by LC/MS（Ⅱ）

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴  
水質第二科

Toyohiro Urayama, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka, Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

### 要 旨

環境試料(水質)中のナプロアニリド，バミドチオン，モリネート，フェリムゾンの4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，その基礎的な検討を行った。

[キーワード：バミドチオン，フェリムゾン，農薬，多成分分析，LC/MS/MS]

[Key words : Vamidothion, Ferimzone, Pesticides, Simultaneous Analysis, LC/MS/MS]

### 1 はじめに

ナプロアニリド及びモリネートは除草剤，バミドチオンは殺虫剤，フェリムゾンは殺菌剤であり，いずれも稲等で使用され，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。また，いずれも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GC/MSで分析が困難なゴルフ場に関連する17農薬のLC/MSによる同時分析法を検討し，逆相系固相と活性炭系固相を併用する方法で抽出し，LC/MS/MS-SRM法で定量する方法が有効なことを報告した<sup>1)</sup>。今回は，この検討結果を基礎に4農薬について，異性体のHPLCによる相互分離，親水性の農薬から疎水性の農薬までを効率よく同時分析するための基礎的な検討を行い，分析法を確立したので報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試薬

メタノール：LC/MS分析用

精製水：ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

固相カートリッジ：Sep-Pak Plus C18 Waters社製

1mol/L硝酸：関東化学製

酢酸アンモニウム：試薬特級

#### 2.2 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：XTerra MS C18 3.5 $\mu$ m

2.1 mm  $\phi$   $\times$  150mmL (Waters社製)

移動相：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

0.1～1min A：80→60 B：20→40 liner gradient

1～19min A：60→36 B：40→64 liner gradient

19～19.1min A：36→0 B：64→100 liner gradient

19.1～30min A：B = 0：100

30～30.5min A：0→80 B：100→20 liner gradient

30.5～43min A：B = 80：20

流量：0.2mL/min

カラム温度：40℃

注入量：10  $\mu$ L

(MS条件)

使用機種：Micromass Quattro micro API

Cone：24V(Naproanilide), 22V(Vamidothion),

25V(Molinate), 40V(Ferimzone),

Collision：14eV(Naproanilide), 13eV(Vamidothion),

13eV(Molinate), 22eV(Ferimzone),

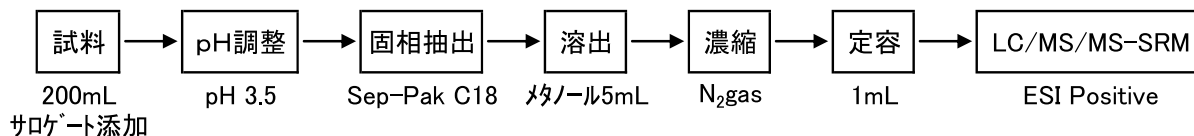


図1 分析フロー

Capillary : 3kV, SourceTemp : 100℃,  
 DesolvationTemp : 500℃,  
 DesolvationGas : 600L/hr, ConeGas : 50L/hr  
 イオン化法 : ESI Positive  
 モニターイオン : Naproanilide 292 → 171,  
 Vamidothion 288 → 146, Molinate 188 → 126,  
 Molinate-d<sub>12</sub> 200 → 138, Ferimzone 255 → 132

### 2.3 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200mLにサロゲート溶液(0.4μg/mL, メタノール溶液)を5μL添加し, 1mol/L硝酸を加えてpH3.5に調整した。固相カートリッジSep-Pak Plus C18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, 試料を10mL/min.で通水した。通水終了後の固相カートリッジに精製水15mLを通して洗浄した後, 窒素ガスを5分間通気して間隙水を除き, 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)で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

対象物質のうちナプロアニリドは, ESI PositiveとESI Negativeのいずれでもイオン化が可能であった。

ESI Positiveでは, インフュージョンでのスペクトルは図2に示すように擬分子イオン(m/z 292)よりもナトリウム付加体(m/z 314)が多く生成していたが, 酢酸アンモニウムを移動相とするHPLC分析では, 図3に示すように擬分子イオンと同一の保持時間に検出されなければならないナトリウム付加体(m/z 314 > 314)は全く検出されず, 擬分子イオンから生成したプロダクトイオン(m/z 292 >

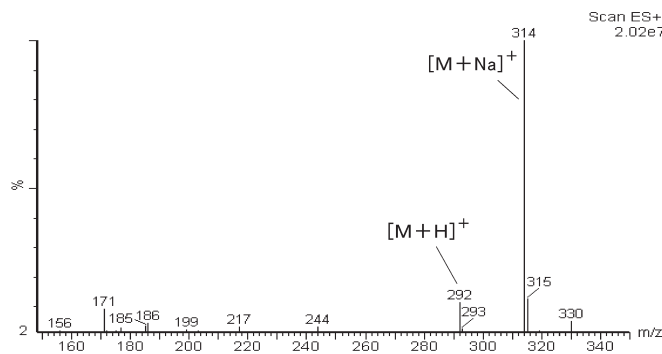


図2 ナプロアニリドのマスペクトル

171, m/z 290 > 143)のみが高感度に検出された。

一方, ESI Negativeモードでもナプロアニリドは高感度に検出可能であったが, 夾雑物質の影響を受けて, 回収率が150%に達するなどの増感作用が認められた。この増感作用は, Positiveモードでは認められず, 良好な定量性が得られることから, 他の3農薬も同時分析できるPositiveモードを選定した。

また, 全ての対象物質がMS/MS(SRM)測定が可能であったことから, ノイズが少なくS/N比の良い高感度測定が可能SRM測定を採用した。

#### 3.1.2 液クロカラムの選定

対象物質のうち(E)-フェリムゾン, 図4に示すようにカラムによってブロードでテーリングしたピーク形

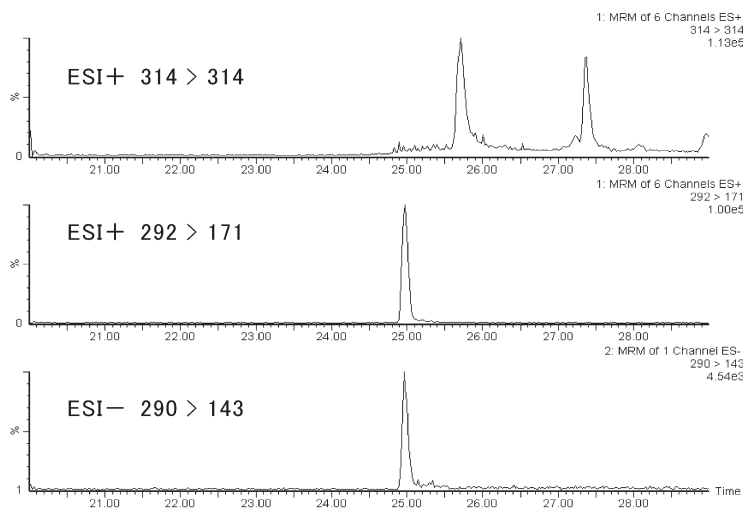


図3 ナプロアニリドのマスキロマトグラム

状になり、高感度な分析は不可能であった。

XTerra MS C18とAtlantis dC18カラムではシャープなピークとなったが、(E)-フェリムゾンと(Z)-フェリムゾンのピーク分離が良好な傾向を示したXTerra MS C18を採用した。

### 3.1.3 移動相条件の検討

対象物質のうち、フェリムゾンはE体とZ体の2つの異性体があり、測定イオンが同一であるためピークを相互分離する必要がある、この2つの異性体を分離するには40%メタノール/水から64%メタノール/水まで緩やかにグラジエントする必要がある。

一方、親水性の高いバミドチオンのピークをシャープ

にするには、初期条件を20%メタノールとし、メタノール濃度を短時間に上げる必要があった。

これらを両立させるため、0~1分の1分間で20%から40%までメタノール濃度を増加させ、その後1~19分の18分間で40%から64%まで緩やかにメタノール濃度を増加させることで、バミドチオンのピークをシャープにし、フェリムゾンの異性体を相互分離することができた。(図5)

更に、疎水性が高く、保持時間の遅いナプロアニリドのピークをシャープに出すため、フェリムゾンの保持時間の直前から100%メタノールとする条件とした。

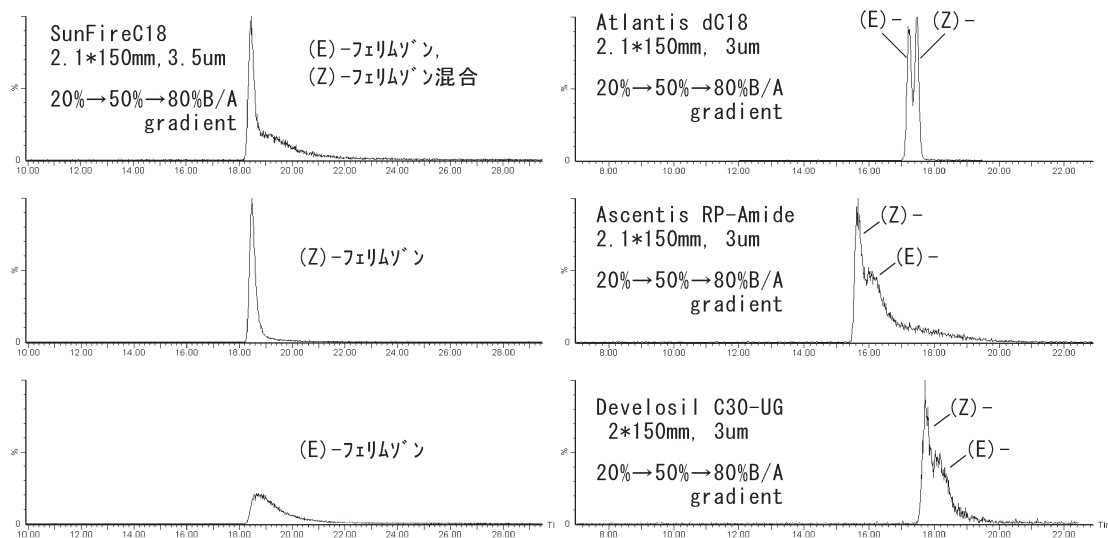


図4 カラムの違いによる (E)-フェリムゾンのクロマトグラムの変化

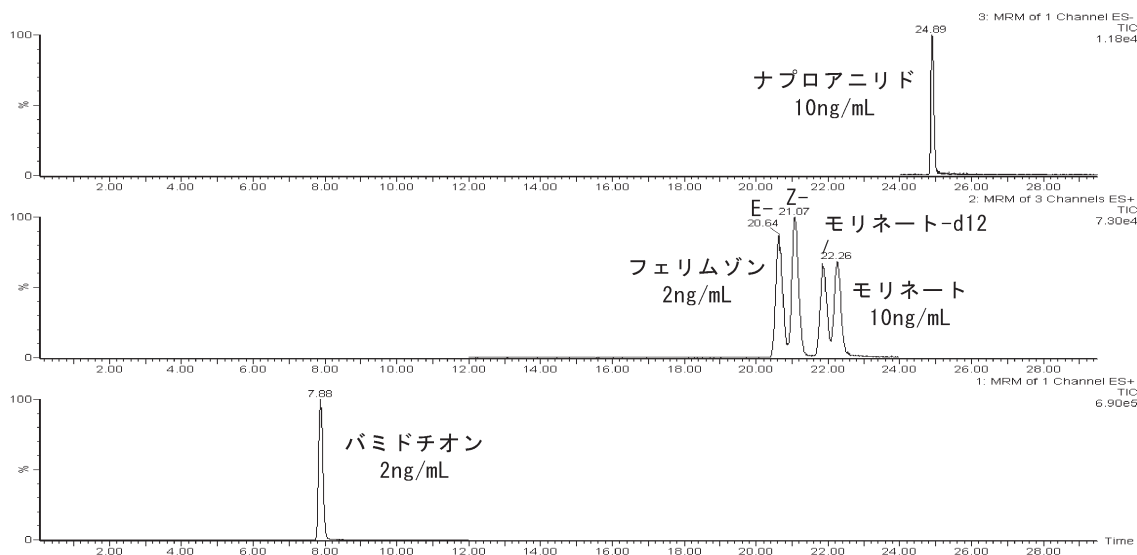


図5 標準品のクロマトグラム(XTerra MS C18)

### 3.1.4 注入量等の検討

LCカラムとの相互作用が小さいバミドチオンでは、図6に示すとおり注入量を20  $\mu$ Lにするとややピークが広がり、30  $\mu$ L以上ではリーディングしてピーク形状が崩れる現象がみられたため、注入量を10  $\mu$ Lとする必要があった。

また、注入液のメタノール濃度については、図7に示すとおりバミドチオン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。

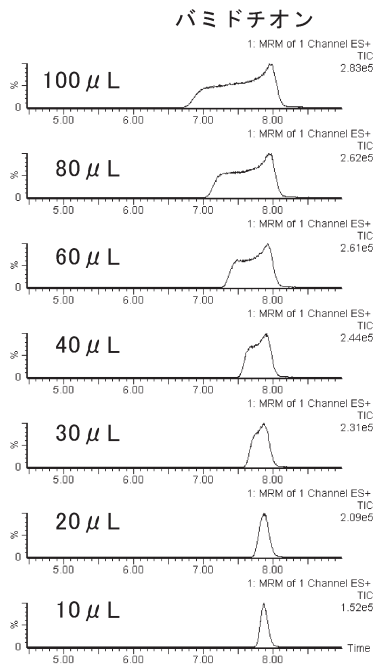


図6 試料注入量とクロマトグラム  
(バミドチオン, 50%メタノール溶液)

### 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。

精製水100mLに標準品(Vamidochion: 2ng, Ferimzone: 各2ng, Naproanilide: 10ng, Molinate: 10ng)を添加し通水、メタノール5mLで溶出後、更にアセトニトリル5mLで溶出した。

図8に示すように、ポリマー系の固相材であるPS-2、PLS-3等ではフェリムゾン及びモリネートの回収率が低く、活性炭カラムであるAC-2では全ての物質でほとんど

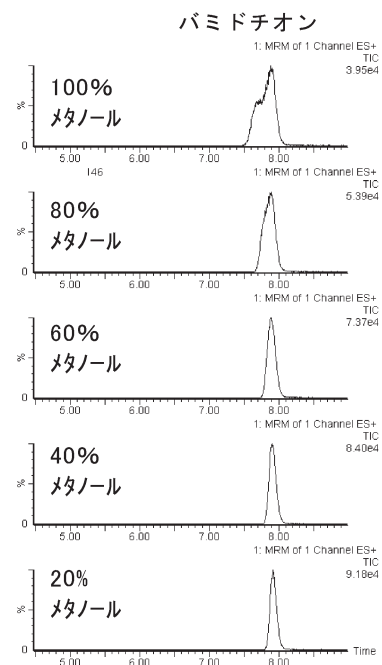


図7 注入液メタノール濃度とピーク形状  
(バミドチオン, 注入量10  $\mu$ L)

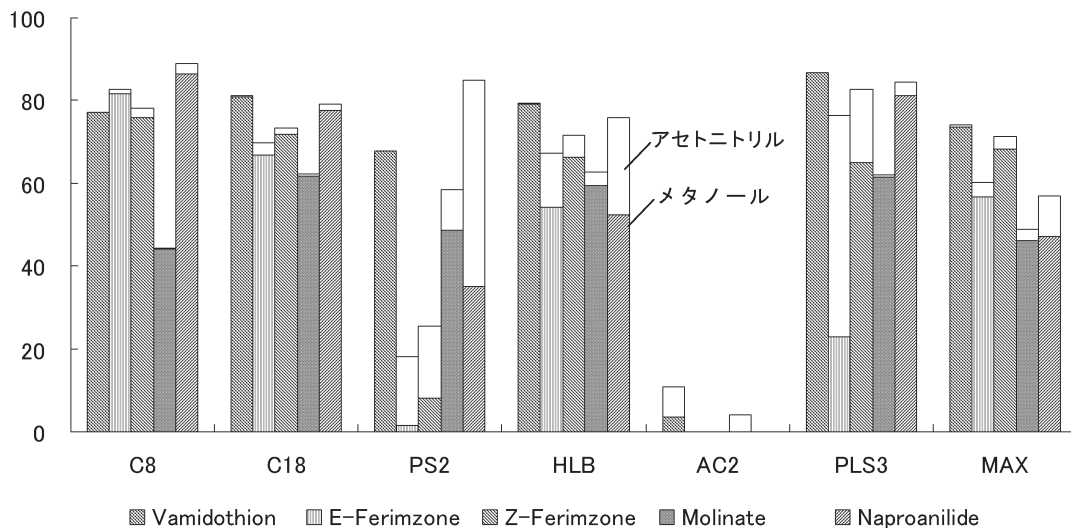


図8 固相カートリッジと回収率

ど回収できなかった。一方、SepPak Plus C18及びOasis HLBは良好な回収率を示したが、C18カートリッジは全ての物質で60%以上の回収率を示し、かつメタノール5mLで溶出できることから、SepPak Plus C18を採用した。

### 3.2.2 通水時のpHの検討

海水100mLに標準品を添加し、pHを調整して通水し、メタノール5mLで溶出した。

図9に示すとおりいずれの物質もpH5で回収率が低く、pH3～3.5で最も高い回収率となったので、通水時のpHを3.5とした。

### 3.3 分解性スクリーニング試験

環境水中におけ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1に示した。ナプロアニリドは明所5日後でほぼ完全に分解したことから、試料の保存及び前処理においては、光の影響をできるだけ避ける必要がある。

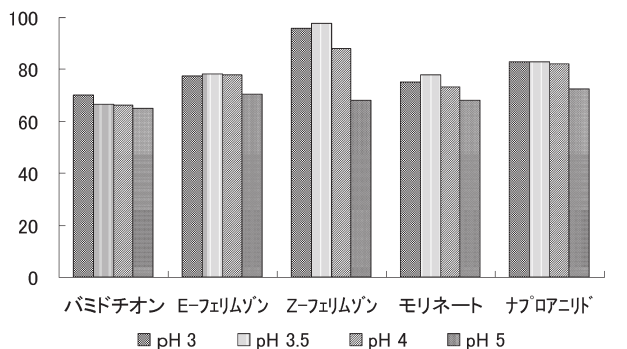


図9 通水時のpHと回収率

### 3.4 添加回収試験結果

添加回収試験の結果を表2に示した。水溶性の高いバミドチオンの回収率が約65%とやや低くなったが、他の物質は83%以上の回収率を示し、変動係数も5.7%以下と良好な結果が得られた。

表1 分解性スクリーニング試験

物質名	pH	初期濃度 (μg/L)	1時間後の残存率 (%)	5日後の残存率	
				暗所 (%)	明所 (%)
バミドチオン	5	0.02	100	89	-
	7	0.02	100	90	89
	9	0.02	100	89	-
モリネート	5	0.1	100	90	-
	7	0.1	100	94	92
	9	0.1	100	93	-
ナプロアニリド	5	0.1	100	84	-
	7	0.1	100	92	3
	9	0.1	100	86	-
(E)-フェリムゾン	5	0.02	100	100	-
	7	0.02	100	100	100
	9	0.02	100	100	-
(Z)-フェリムゾン	5	0.02	100	100	-
	7	0.02	100	100	100
	9	0.02	100	100	-

表2 添加回収実験結果

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲートの回収率 (%)
海水	バミドチオン	200	無添加	5	ND	-	-	-
		200	0.1	7	0.34	67	4.8	-
		200	1	5	3.2	65	4.2	-
	E-フェリムゾン	200	無添加	12	0.40	-	5.7	-
		200	2	5	8.78	84	5.4	-
	Z-フェリムゾン	200	無添加	12	0.69	-	5.5	-
		200	2	5	9.41	87	4.6	-
	モリネート	200	無添加	5	ND	-	-	-
		200	2	7	9.2	92	5.3	72
		200	20	5	104	104	1.7	75
ナプロアニリド	200	無添加	5	ND	-	-	-	
	200	1	7	4.2	83	4.8	-	
	200	10	5	44	87	3.9	-	



### 3.5 検出下限値と環境試料の分析

検出下限値を表3に示したが、1.9ng/L以下の検出下限値が得られ、高感度な測定が可能であった。

表3 検出下限値及び定量下限値

物質	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	検出下限値 (MDL) (ng/L)	定量下限値 (MQL) (ng/L)
Vamidothion	200	1	0.062	0.16
Molinate	200	1	1.9	4.9
Naproanilide	200	1	0.77	2.0
E-Ferimzone	200	1	0.080	0.21
Z-Ferimzone	200	1	0.14	0.35

環境試料の分析結果を図10に示したが、全ての物質について妨害のないクロマトグラムが得られたが、フェリムゾンは海水試料からE体が0.040ng/L、Z体が0.069ng/Lで検出され、また、試料採取後1年半を経過した海水試料からも検出されることから、海水中に安定に存在するものと推定された。

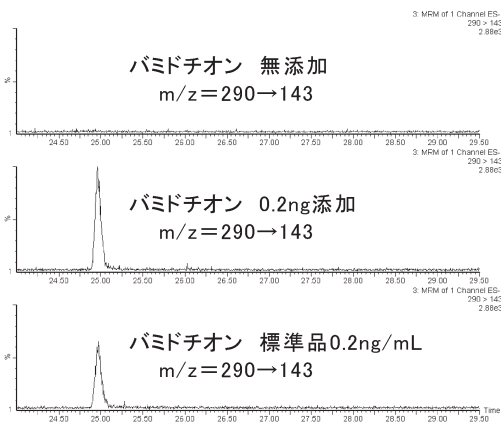


図10-1 海水(瀬戸内海)のクロマトグラム (バミドチオン)

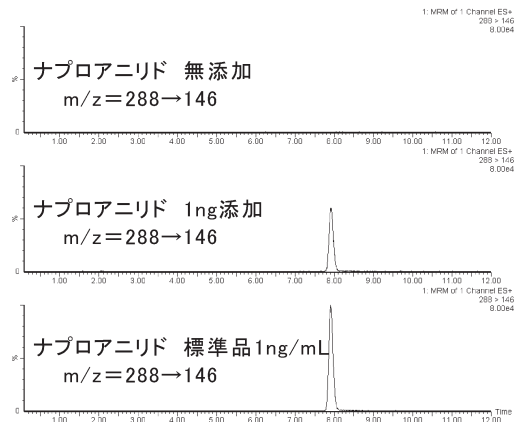


図10-2 海水(瀬戸内海)のクロマトグラム (ナプロアニリド)

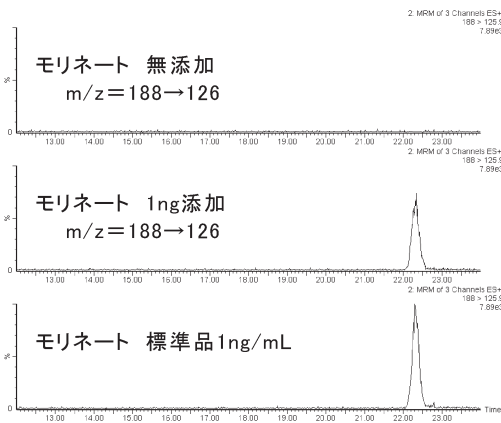


図10-3 海水(瀬戸内海)のクロマトグラム (モリネート)

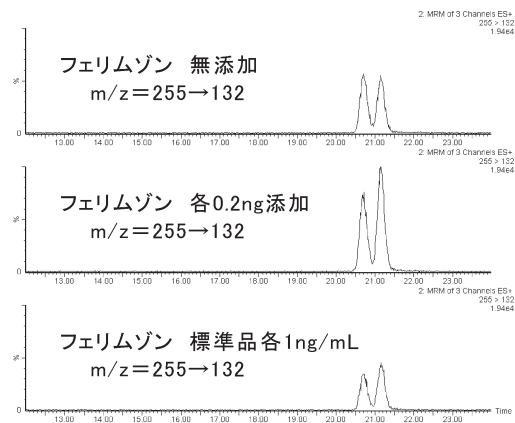


図10-4 海水(瀬戸内海)のクロマトグラム (フェリムゾン)

### 4 まとめ

4 農薬の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) ナプロアニリドは、ESI PositiveとESI Negativeのいずれでも測定できるが、Negativeでは夾雑物質による増感作用で定量性に問題が生じた。
- 2) 移動相のメタノール濃度を細かく設定することで、異性体を相互分離した上で、親水性の農薬から疎水性の農薬まで高感度に分析することができた。
- 3) 抽出に用いる固相カートリッジは、SepPak Plus C18が対象物質の中で回収率の低いモリネートの回収率が最も高く、メタノール5mLで全ての物質が溶出できた。
- 4) 通水時のpHは、いずれの対象物質でもpH3～3.5で最も高い回収率となった。
- 5) 分解性スクリーニング試験において、ナプロアニリドは明所5日後でほぼ完全に分解した。

- 6) バミドチオンの添加回収率が約65%とやや低くなったが、他の物質は83%以上の回収率を示した。
- 7) 環境試料を分析した結果、フェリムゾンが海水試料からE体が0.040ng/L, Z体が0.069ng/L検出された。

なお、本研究は環境省委託の平成18年度化学物質分析法開発調査（環境安全課）<sup>2)</sup>と連携して実施した。

## 文 献

- 1) 浦山豊弘, 杉山広和, 劔持堅志, 藤原博一, 鷹野洋, 吉岡敏行: LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討, 岡山県環境保健センター年報30, 57-62, 2006
- 2) 環境省環境保健部環境安全課: 平成18年度化学物質分析法開発調査報告書 (ナプロアニリド・バミドチオン・モリネート・フェリムゾン, 岡山県環境保健センター), 掲載予定, 2007