

LC/MS を用いた水中農薬の分析

井上 智 出口修一 松原 洋 浅井忠男 井上博雄

Determination of pesticides in water by Liquid chromatography mass spectrometry

Satoshi INOUE, Syuichi DEGUCHI,
Hiroshi MATSUBARA, Tadao ASAI, Hiroo INOUE

An analytical method for the determination of carbofuran, thiram, bentazone, (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) and triclopyr in water with Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) has been developed.

By using electrospray ionization, carbofuran and thiram produced positive Quasi-molecular ion, but bentazone, 2, 4-D and triclopyr produced negative Quasi-molecular ion. Five pesticides were able to be clearly separated on a C30 column with 0.05% formic acid-acetonitrile as mobile phase. After the sample solution was adjusted at pH 3 with formic acid and passed through a solid phase which was packed with combination polymer, the sample was eluted with acetonitrile-methanol (1:1). Then the eluate was analyzed by LC/MS. The recoveries of carbofuran, bentazone, 2, 4-D and triclopyr spiked to source water of water supply were more than 94%, respectively. And the recovery of thiram was approximately 77%.

Keywords: pesticide, carbofuran, thiram, bentazone, (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid, triclopyr, solid-phase extraction, C30 column, LC/MS

はじめに

農薬類は、農作物等に被害を与える各種有害生物を排除するため、水田、畑地、ゴルフ場等で広く使用されており、これらの農薬類が水道水源を含む湖沼、貯水池、河川等を汚染することが懸念される。このため、「水質基準に関する省令」(平成4年12月21日厚生省令第69号)及び「水道水質に関する基準の制定について」(平成4年12月21日衛水第264号)で水道水源で検出される可能性があり、人の健康への影響が危惧される農薬が、水質基準項目として4種類、監視項目として15種類規定されている。

また、従来の基準に比較し対象項目が増加したため、個別分析法では対応が不可能となり、一部農薬については、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)を用いた多成分同時の一斉分析法が採用されているが、GC/MS法で測定不能なもの、または、困難なものについては、誘導体化GC/MS法及び高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が採用されている。一方、誘導体化GC/MS法は、操作の複雑性や誘導体化に用いる試

薬の毒性等問題点が多く、また、HPLC法は、検出器の選択性が低いため同定の精度が不十分であるとともに感度が低いため定量限界値が高くなる等問題点が多い。

そこで、基準項目と監視項目計19農薬のうち、GC/MS法による一斉分析法の対象外である、カルボフラン、チウラム、ベンタゾン、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、トリクロピルの5農薬について、直接分析を行うHPLC法と選択性の高い質量分析法を組み合わせた液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)法により検討したので報告する。

材料と方法

1 装置

液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS) 高速液体クロマトグラフはHP 1100(ヒューレットパッカード社)を、質量分析計はイオン源にエレクトロスプレーイオン源(ESI)及び大気圧化学イオン源(APCI)を装着し、二重収束光学系を採用したJMS-LCmate(日本電子株式会社)を用いた。

2 測定条件

測定条件を表1に示した。

表1 LC/MSの測定条件

分離カラム: Develosil C30-UG-5 (野村化学株式会社)
2.0 mm i.d × 150 mm
カラム温度: 40℃
移動相: 0.05%ギ酸・アセトニトリル(8:2)→(20min)→(0:10)
流速: 0.2ml/min
試料注入量: 5μl
イオン化モード: エレクトロスプレー
スイッチングモード: 加速スイッチング
スイッチングスピード: 0.5sec/channel
分解能: 750
測定モード及びモニターイオン
ポジティブモード
カルボフラン: 222
チウラム: 241
ネガティブモード
ベンタゾン: 239
2,4-D: 219
トリクロピル: 254
リングレンズ電圧: 35V
オリフィス電圧: 5V
ディゾルベータティングプレート温度: 200℃
オリフィス温度: 150℃
ネプライジングガス: 窒素ガス
ネプライジングガス流量: 1.0l/min

3 試 薬

農薬標準品等の試薬は、和光純薬工業株式会社製を用いた。アセトニトリルはチウラム測定用を、メタノールは高速液体クロマトグラフ用を、ギ酸は試薬特級を用いた。

農薬標準液は、5種の農薬をそれぞれアセトニトリルに溶解して100mg/lの標準原液を調製し、ベンタゾンは、更にアセトニトリルで希釈し10mg/lの標準原液を調製後、それぞれの標準原液をアセトニトリル・メタノール(1:1)混液に混合し標準液を調製した。

固相カートリッジは、ジーエルサイエンス株式会社製Aquisis PLS-3シリンジバレル型を用いた。

4 実験操作

固相カラムをアセトニトリル・メタノール(1:1)混液5ml、精製水5mlで洗浄及び活性化した後、検水600mlを吸引により、流速10~20mlで流下させた。精製水10mlで洗浄した後、30秒間吸引により水分を除去した。

次に、固相カラムの上端からアセトニトリル・メタノール(1:1)混液3mlを緩やかに流し、流出液を試験管に受け、3mlに定容したものを測定に用いた。

5 実験試料

農薬添加回収実験に使用した試料水は、精製水、水道水原水であり、水道水原水は愛媛県南部のT町にあるSダムを水源とするN浄水場の原水を8月に採水し、ガラスフィルター(ワットマンGF/C、孔径1.2μm)でろ過後、試験に供した。

表2 リングレンズ及びオリフィス電圧の最適条件

農薬名	リングレンズ電圧(V)	オリフィス電圧(V)
カルボフラン	50	10
チウラム	35	5
ベンタゾン	45	10
2,4-D	35	5
トリクロピル	35	5

結果及び考察

1 LC/MS測定条件の検討

(1) LC/MSにおけるイオン源の選定

水中等の農薬分析におけるLC/MSのイオン化法としては、フリットFABを用いた方法^{1,2)}、ESIを用いた方法^{3,4)}、APCIを用いた方法⁵⁾等が報告されているが、その取扱いの容易さ等からESI法とAPCI法が繁用されている。そこで、対象農薬の最適イオン化法を選択するため、それぞれのイオン化法について、各農薬標準液1mg/lを用い、フローインジェクション法により、イオン化状況を確認した。

その結果、ESI法では、ポジティブモードにおいてカルボフランとチウラム、ネガティブモードにおいてベンタゾン、2,4-D、トリクロピルと5農薬の擬分子イオンピークを生成した。一方、APCI法では、ポジティブモードにおいてカルボフラン、ネガティブモードにおいてベンタゾンと2農薬の擬分子イオンピークしか生成しなかった。

このため、今回の測定には、対象農薬全てをイオン化することができるESI法を用いることとした。

(2) 質量スペクトル測定条件の検討

ESI法において、質量スペクトルに影響を及ぼすと考えられるリングレンズ電圧とオリフィス電圧⁶⁾をそれぞれ0~50V、0~10Vの範囲で変化させ、各農薬標準液1mg/lを用い、フローインジェクション法により最適イオン化条件を検討した。なお、移動相には、バックグラウンド値を低下させ、感度の向上を図るため、0.05%ギ酸・アセトニトリル(1:1)混液を用いた。

各農薬の最適測定条件を表2に示した。

ポジティブモードでは、カルボフランに比べチウラムの感度が低いため、また、ネガティブモードではトリクロピルの感度が最低のため、チウラムとトリクロピルの感度が最高となる条件のリングレンズ電圧35V、オリフィス電圧5Vを用いることとした。

この条件で得られた各農薬のマススペクトルを図1に示した。カルボフランでは、 $m/z=222$ 、チウラムでは $m/z=241$ に $[M+H]^+$ の擬分子イオンの強いピークが、ベンタゾンでは、 $m/z=239$ 、2,4-Dでは $m/z=219$ 、トリクロピルでは、 $m/z=254$ に $[M-H]^-$ の擬分子イオンの強いピークが見られ、全てベースピークとなったので、それぞれの擬分子イオンでSIM測定することとした。

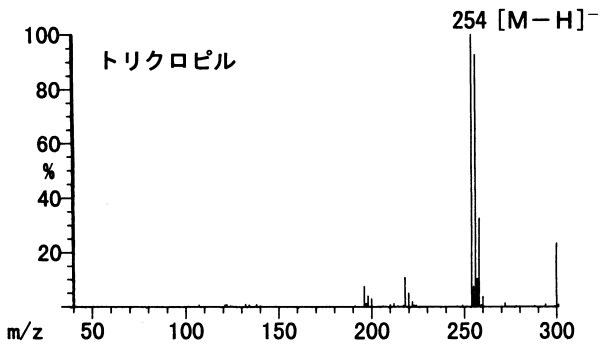
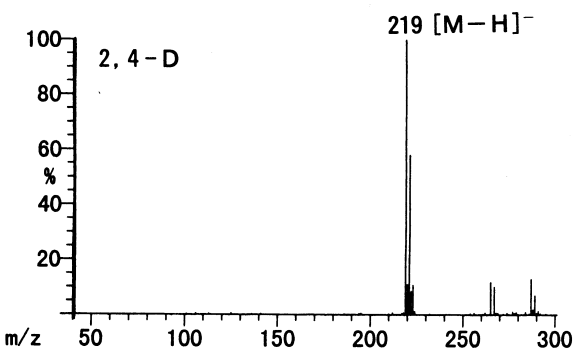
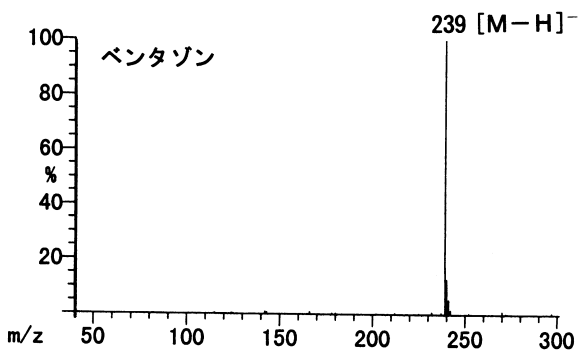
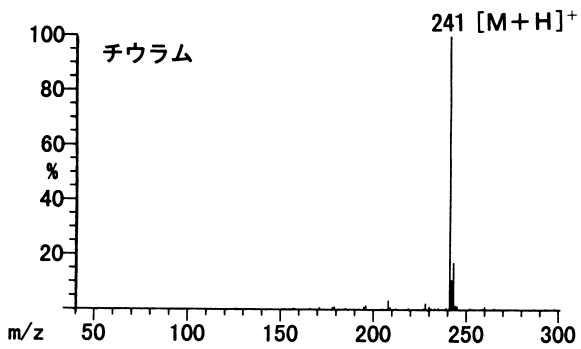
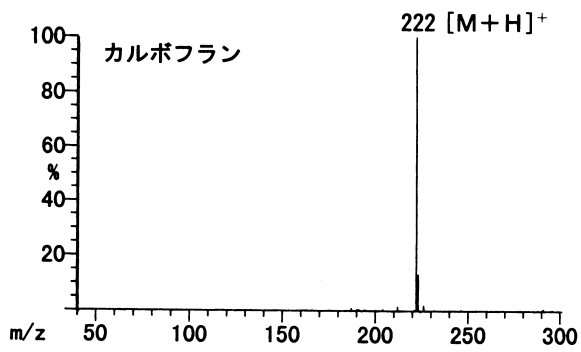
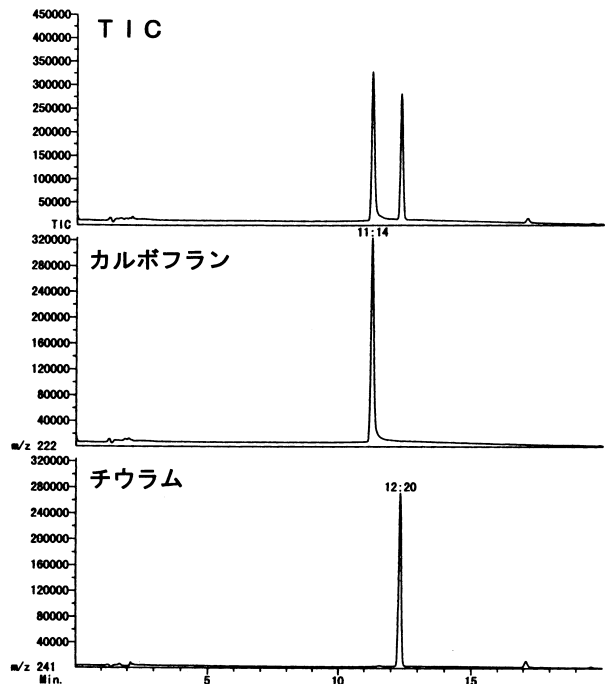


図1 各農薬のマススペクトル

(1) ポジティブモード



(2) ネガティブモード

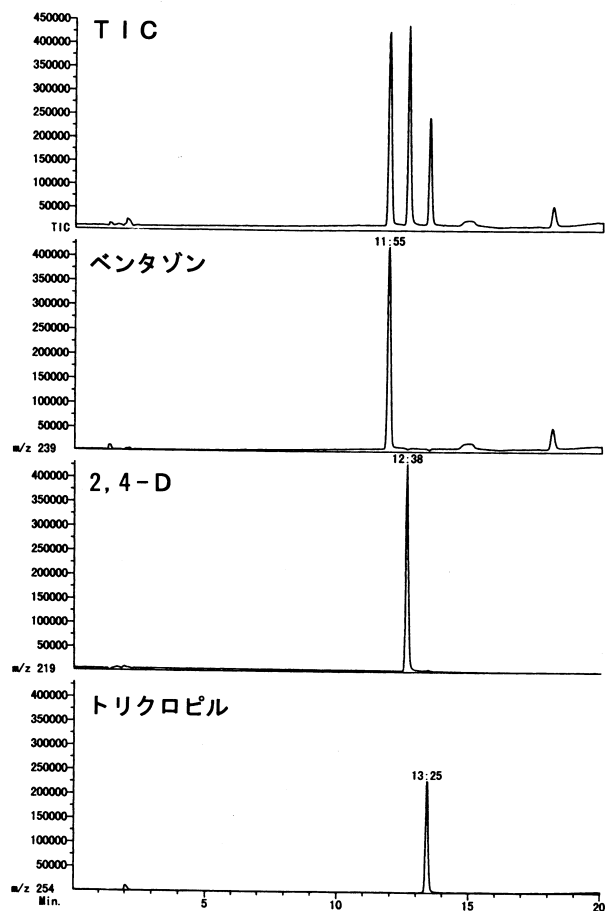


図2 全イオンクロマトグラム及び各農薬のマスクロマトグラム (ベンタゾンは0.01mg/l, その他は0.1mg/l)

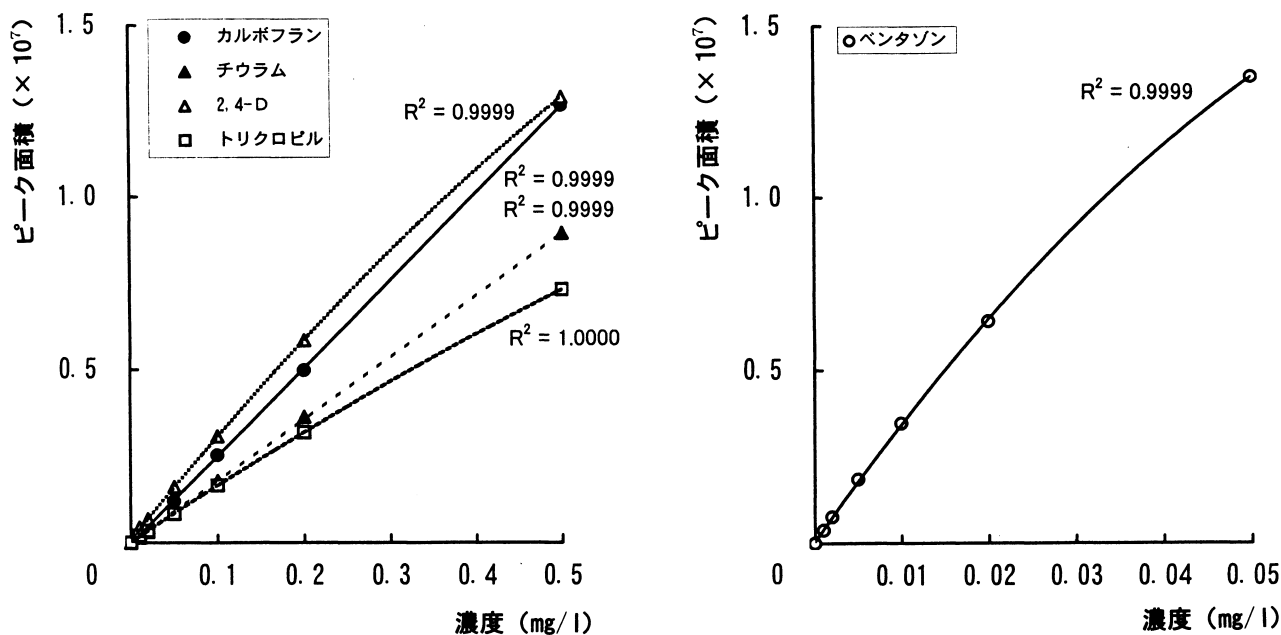


図3 各農薬の検量線

(3) HPLC分離条件の検討

農薬の分析では、一般的に、カラムはODS系、移動相はリン酸緩衝液が用いられるが、LC/MSでは、不揮発性の塩を含む溶液は長時間使用すると試料導入部が塩で汚染されたり、詰まってしまうため使用できない⁷⁾。

このため、揮発性の塩である酢酸アンモニウムが用いられている。一方、検出感度を上げるためには、溶媒の電気伝導度を下げる必要がある。そこで、塩基性低分子化合物に通常使用される、0.05%ギ酸・アセトニトリル混液⁷⁾を用いることとした。しかし、ODS系カラムと0.05%ギ酸・アセトニトリル混液の組み合わせでは、各農薬のピークが完全に分離しなかった。このため、水100%の移動相でも良好な分離能力を発揮するC30カラムを使用し、最適条件を検討した。その結果、表1で記した条件で最も良好な結果が得られ、保持時間による各農薬の定性が可能となった。この条件で得られた各農薬の全イオンクロマトグラム及びマスクロマトグラムを図2に示した。

(4) 検量線

カルボフラン、チウラム、2,4-D、トリクロピルは、0.01~0.5mg/l、ベンタゾンは、0.001~0.05mg/lの範囲で検量線を作成した。その結果を図3に示した。カルボフランとチウラムは一次式の、ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルは二次式の良好な検量線を示し、その相関係数は0.9999~1.0000の範囲であった。

2 固相抽出条件の検討

(1) 溶液pHの検討

ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルの3農薬は、酸性化合物のため、固相抽出時の溶液のpHにより、回収率が変動すると考えられる。このため、ベンタゾンは0.00005

mg/l、その他の農薬は0.0005mg/lとなるように精製水に農薬標準液を加えた後、ギ酸及びアンモニア水で試料溶液のpHを変化させ、固相への農薬の吸着条件を検討した。

その結果を図4に示した。

なお、分析対象農薬の吸着能力向上を図るため、固相には、疎水性と親水性を併せ持つコンビネーションポリマーを用いた。

カルボフランは、pH2~7の範囲で回収率はほぼ一定でpHの影響はみられなかった。

チウラムは、pH3~4の範囲で回収率はほぼ一定であったが、2及び5~7の範囲では回収率の低下がみられた。

ベンタゾンは、pH3~5の範囲で回収率はほぼ一定であったが、2及び6~7の範囲では回収率の低下がみられた。

2,4-D、トリクロピルはpH2~5の範囲で回収率はほぼ一定であったが、pH6~7の範囲では回収率の低下がみられた。

以上から、5農薬ともpH3~4の範囲では、90%以上の回収率を示したので、ギ酸でのpH調整が容易な3に調整し、固相に吸引することとした。

(2) 溶出溶媒の検討

固相から農薬を溶出する条件を検討するため、ベンタゾンは0.00005mg/l、その他の農薬は0.0005mg/lとなるように精製水に農薬標準液を加え、固相に吸着させた後、溶出溶媒としてアセトニトリル・メタノール混液3mlを用い、組成を変化させ溶出率を測定した。

その結果を図5に示した。

カルボフランは、全組成でほぼ一定の溶出率を示した。

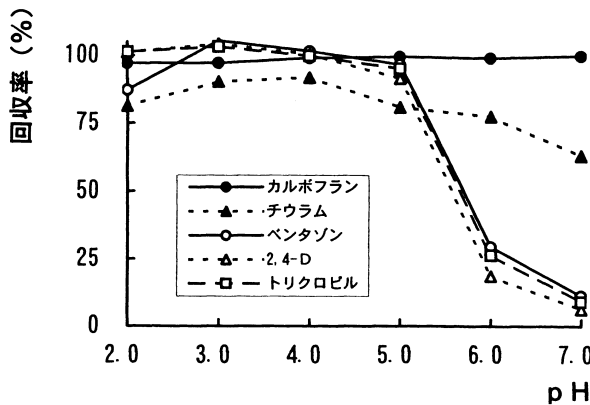


図4 pHと回収率の関係

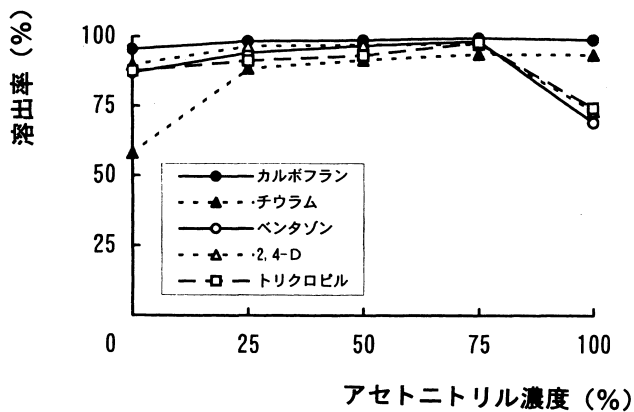


図5 アセトニトリル・メタノール混液組成と溶出率の関係

また、チウラムは、メタノールのみでの溶出では、溶出率の低下がみられたが、他の組成では溶出率はほぼ一定であった。ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルは、アセトニトリルのみでの溶出では、溶出率の低下がみられたが、他の組成では溶出率はほぼ一定であった。

以上から、5農薬ともアセトニトリル濃度25～75%の範囲では90%以上の溶出率を示したので、溶出溶媒は、アセトニトリル・メタノール(1:1)3mlとすることとした。

3 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため、ベンタゾンは、農薬標準液をそれぞれ0.000005mg/l及び0.00005mg/lとなるように、その他の農薬は、農薬標準液をそれぞれ0.00005mg/l及び0.0005mg/lとなるように、精製水、水道水原水に添加し、回収率を測定した。その結果を表3に示した。

カルボフラン、ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルの4農薬の回収率は94%以上と良好な結果を示した。また、チウラムも精製水での回収率は90%以上であったが、水道水原水での回収率は74.5～79.9%と低下を示した。

木曾らによると、HPLCの直接注入法によるチウラムの測定においても、河川水をろ過し、回収率を検討した際、チウラムのピークが完全に消失したことが報告されている⁸⁾。これらのことから、チウラムの環境水中で

表3 精製水と水道水原水での農薬の回収率

農薬名	濃度 (mg/l)	回収率	
		精製水	水道水原水
カルボフラン	0.00005	95.9(3.2)	97.1(3.0)
	0.0005	98.7(3.7)	96.2(3.2)
チウラム	0.00005	93.7(2.1)	79.9(3.4)
	0.0005	91.1(4.4)	74.5(8.7)
ベンタゾン	0.000005	97.5(4.1)	94.2(4.0)
	0.00005	95.6(1.8)	98.3(3.9)
2,4-D	0.00005	98.6(2.2)	99.5(1.2)
	0.0005	97.5(1.3)	97.0(1.9)
トリクロピル	0.00005	97.0(4.0)	95.4(2.2)
	0.0005	96.2(1.4)	96.9(1.8)

(n=5, ()内は変動係数)

の挙動等回収率低下の原因について更に検討が必要と思われる。

一方、変動係数は、全添加濃度で10%未満と良好な結果を示した。

まとめ

水道水の基準項目及び監視項目に規定されている農薬のうちGC/MSによる一斉分析法が適用されないカルボフラン、チウラム、ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルの5農薬のLC/MSによる分析法を検討したところ
1 ESI法によりカルボフラン、チウラムは、ポジティブモードで、ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルは、ネガティブモードで強い擬分子イオンピークを生成した。

2 C30カラムと0.05%乙酸・アセトニトリル混液移動相を用い5農薬を分離することが可能であった。

3 ベンタゾンは0.001～0.05mg/l、その他の農薬は0.01～0.5mg/lの範囲で良好な検量線を示した。

4 固相にコンビネーションポリマーを用い、試料溶液のpHを3に調整後、吸着させ、アセトニトリル・メタノール(1:1)混液で溶出させることにより5農薬の抽出が可能となった。

5 水道水原水への添加試験の結果、カルボフラン、ベンタゾン、2,4-D、トリクロピルの4農薬の回収率は94%以上と良好な結果を示したが、チウラムは74.5～79.9%であった。

文献

- 1) 大倉敏裕ほか：衛生化学. 40, 266-273 (1994)
- 2) 大倉敏裕ほか：水環境学会誌. 20, 324-331(1997)
- 3) 上村仁ほか：水道協会雑誌. 69, 30-34 (2000)
- 4) Antonio D. et al: Anal. Chem. 69, 2819-2826(1997)
- 5) W. Harvey N. et al: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 78, 1312-1316 (1995)
- 6) 金井みち子：質量分析. 45, 225-232 (1997)
- 7) 宮城大：質量分析. 45, 101-111 (1997)
- 8) 木曾祥秋ほか：水道協会雑誌. 69, 68-78 (2000)