

## ジラムの分析

大阪市立環境科学研究所 森脇 洋

### 1 はじめに

ジネブ、マンゼブ、マンネブ、マンコゼブといったエチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤、ジラム、チラムなどのジメチルジチオカーバメート系殺菌剤をはじめとするジチオカーバメート系の化合物は古くから果樹、野菜の病害防除に広く使用されている。

これらの化合物には変異原性を有するものもあり、環境における実態を把握することは重要で、簡便で精度の高い分析法が求められている。

ジチオカーバメート系農薬分析の従来法は、配位子を酸分解することにより生成する二硫化炭素およびアミンを吸光光度法あるいはGCで検出する手法、また配位子をメチルエステル化し、生成したメチルエステルをHPLCなどで検出する手法が挙げられる。<sup>1</sup>

しかし、これら手法はいずれもジチオカーバメート系農薬を分解することにより分析を行うため、ジチオカーバメートの総量が得られるのみで、ジチオカーバメート系農薬を選択的に検出することに至っていない。

そこでジチオカーバメート系農薬が個別に分析できることを目指して、ジチオカーバメート系農薬のうち、変異原性を有することが知られているジラムに着目した。<sup>2</sup>ジラムは図1に示したようなジメチルジチオカーバメートを配位子とする亜鉛錯体である。ジラムの使用量は日本国内で年間300tを越えると考えられ、環境中におけるジラムの濃度、動態を検討するため、その選択的分析は重要な意味を有している。そこで誘導体化を行わないジラムの検出法を検討した。検出機器としては難揮発性化合物の検出が可能であるLC/MSを用いた。

物質名	分子量	log K <sub>ow</sub>	水溶解度	用途
ジラム	305.8	3.4	0.03μg/ml	船底塗料・殺菌剤

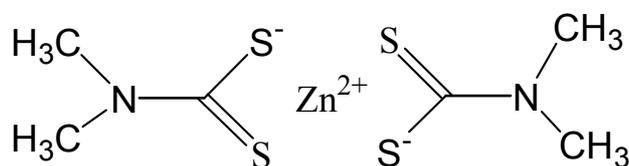


図1 ジラムの化学構造式

## 2 LC/MSによるジラムの検出

フローインジェクション法によりジラムを LC/MS により検出する条件を探索した結果、大気圧化学イオン化法(APCI/MS)のポジティブイオンモードでコロナ電流  $1.5 \mu\text{A}$  の条件で、プロトン付加イオンのマススペクトルが得られた。マススペクトルを図 2 に示す。また、計算により求めたジラムの同位体パターンも併せて示す(図 2b)。

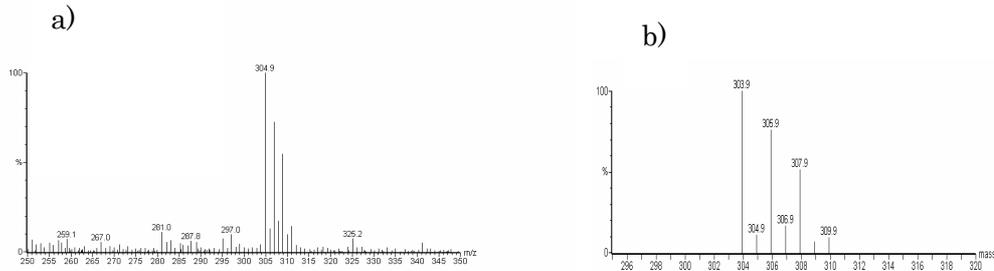


図 2 a) ジラムの APCI/MS スペクトル; b) 計算により得られたジラムの同位体パターン

同位体パターンが一致することから得られたマススペクトルはジラムのプロトン付加体であることが確認できた。次にジラムを LC カラムで分離後、MS により検出することを試みた。移動相としてメタノール/水を用い、親水性化合物の分離に有利である Agilent ZORBAX SB-aq カラムで検討したところ、良好な形状のピークが得られた。

検量線を作成し、濃度とピーク面積の関係を検討した結果、ジラムが  $2\text{--}20\text{mg/L}$  の濃度範囲で良好な直線性が得られた。装置の検出限界値は  $S/N 3$  で、ジラム検出限界絶対量として  $20 \text{ ng}$  であった。

このように LC/MS は従来、直接的な検出が困難であったジラムを誘導体化せずに検出することを可能にし、その分析への適用が大いに期待できる。次に LC/MS/MS を用いたジラムの検出を検討した。LC/MS/MS は LC/MS と比較し、高感度かつ高選択的な分析が実現できる可能性があり、環境分析への展開が期待できる。使用した LC/MS/MS はアプライドバイオ社 API2000 である。

APCI/MS/MS の条件としてプレカーサーイオン  $m/z 305$  のプロダクトイオン  $m/z 88$  を MRM モードにより測定した。

LC 分離条件は LC/MS の場合と同様にして検量線を作成、検討したところ、 $0.1\text{--}1.0 \text{ mg/L}$  の濃度範囲で良好な直線性が得られ、LC/MS/MS を用いることにより LC/MS より約 20 倍、高感度なジラムの分析が達成できた。

## 3 ジラムの LC/MS による環境分析

前項で述べたように、ジラムは LC/APCI/MS で検出可能であるが<sup>3</sup>、 $0.1 \text{ mg/L}$  以下のレベル

になると LC/MS 系内で亜鉛イオンが銅イオンに変換され、一部が銅ジメチルジチオカーバメートとなる影響が大きく見られる。このため、良好な検量線が得られなくなる。ジラムは環境中でも同様の反応が起こることが報告されている<sup>4</sup>ことから、ジラムの環境分析を開発するうえで、ジラムを銅ジメチルジチオカーバメートに変換し、銅ジメチルジチオカーバメートを LC/MS/MS で測定する手法を検討することとした。

水試料からの分析は以下のように行った。最初に、水試料 1L をアンモニア水で pH8-9 に調整する。さらに酢酸銅 1mM 水溶液 10mL を添加後、ジクロロメタン 100mL により液々抽出、メタノールを 20mL 加え、エバポレーターにより 1mL まで濃縮後、内部標準物質としてダイアジノン-d10 体のメタノール溶液(1mg/L) 10 $\mu$ L を添加後、LC/MS/MS により検出を行う。

分析条件を決定するために銅ジメチルジチオカーバメート 10mg/L のメタノール溶液を調整し、これを用いて最適化した。LC/MS はアプライドバイオシステム API-2000 により測定を行った。銅ジメチルジチオカーバメートは ESI/MS のポジティブイオンモードで検出でき、マススペクトルは[M+H]<sup>+</sup>(m/z 303)が観測された。このイオンピークについてプロダクトイオンを測定したところ、m/z 88 が観測された。MS スペクトル、MS/MS スペクトルを図 3 に示す。

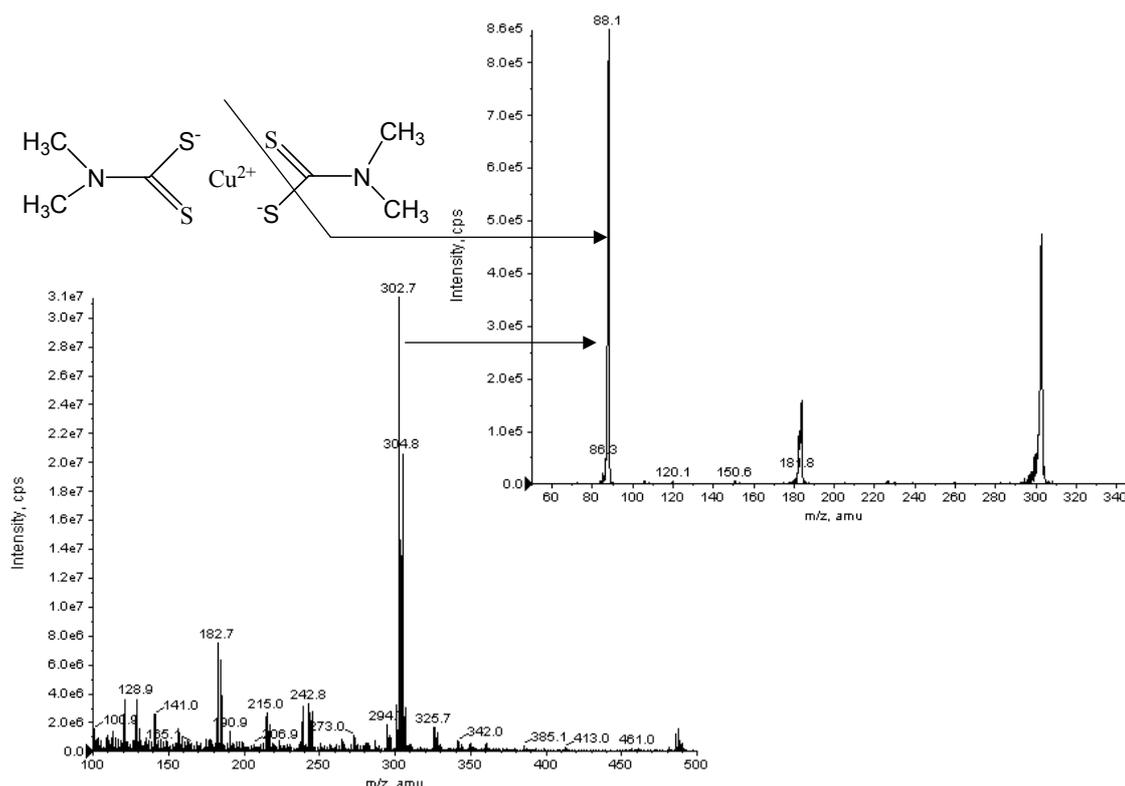


図 3 銅ジメチルジチオカーバメートの MS スペクトルと MS/MS スペクトル

LC には Agilent 1100series を用いた。移動相はメタノール/水系で、カラムは Tosoh ODS 80Ts (2.0x150mm, 5 $\mu$ m)を用いた。質量分析は MRM モードで 303 $\rightarrow$ 88 で測定を行った。内部標準物質であるダイアジノン-d10 体については同様に MRM モードで 315 $\rightarrow$ 170 で測定した。

50ng/mLの標準溶液を5回繰り返し測定した際の検出限界値は8 ng/mLであった。銅ジメチルジチオカーバメート(10-1000ng/mL)の検量線を図4に示した。

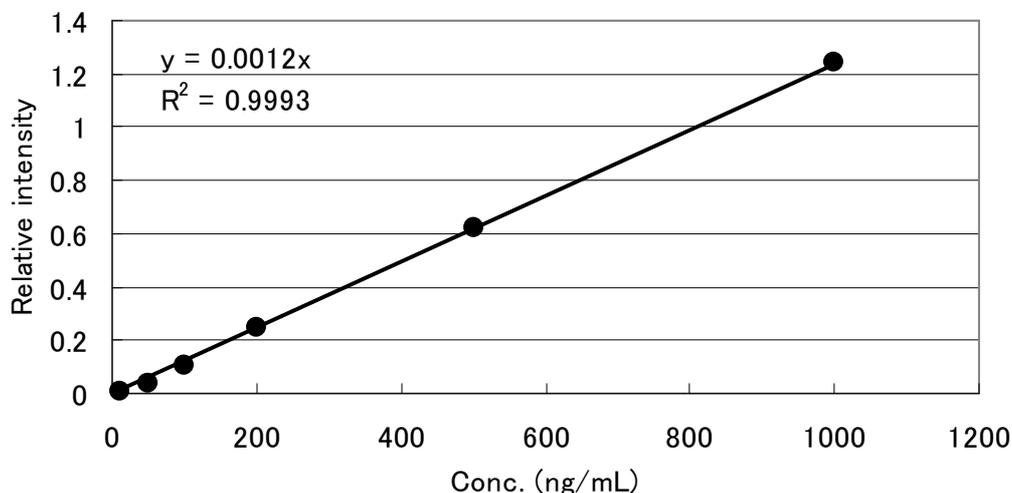


図4 銅ジメチルジチオカーバメートの検量線

次にジクロロメタンによる液液抽出で添加回収試験を行った。ジラム 1 $\mu$ g を精製水、あるいは河川水 1L に添加し、酢酸銅水溶液(1mM)を 10mL、ジクロロメタン 100mL を加え、10 分の振とう後、ジクロロメタン層を取り出し、脱水後、メタノール 20mL を加えて、エバポレーターで 1mL まで濃縮した。内部標準を添加後、試料液 10 $\mu$ L を LC/MS/MS に注入した。結果を表 1 に示す。pH による回収率の変化を見たところ、pH は 8-9 の塩基性条件が最適であり、100% 近い回収率が得られた。銅ジメチルジチオカーバメートについても同様の添加回収試験を行ったところ、ジラム同様に回収された。また、河川水についてこの分析方法でジラムの分析を行った。マトリックスによる妨害ピークはほとんど見られず、添加回収試験の結果も良好であった。なお、無添加の場合はジラムのピークは見られなかった。添加回収試験におけるマスクロマトグラムを図 5 に示した。

Table 1 添加回収試験結果

試料(1L)	ジラム(添加量)	pH	Recovery (%)
精製水	1 $\mu$ g	5	3.4
精製水	1 $\mu$ g	7	4.6
精製水	1 $\mu$ g	8.5	99
精製水	1 $\mu$ g	10	77
精製水	1 $\mu$ g	8.5	94
精製水	1 $\mu$ g	8.5	90
精製水	1 $\mu$ g <sup>1)</sup>	8.5	105
河川水	1 $\mu$ g	8.5	108
河川水	0	8.5	検出されず

1) 銅ジメチルジチオカーバメート 1 $\mu$ g を添加した。

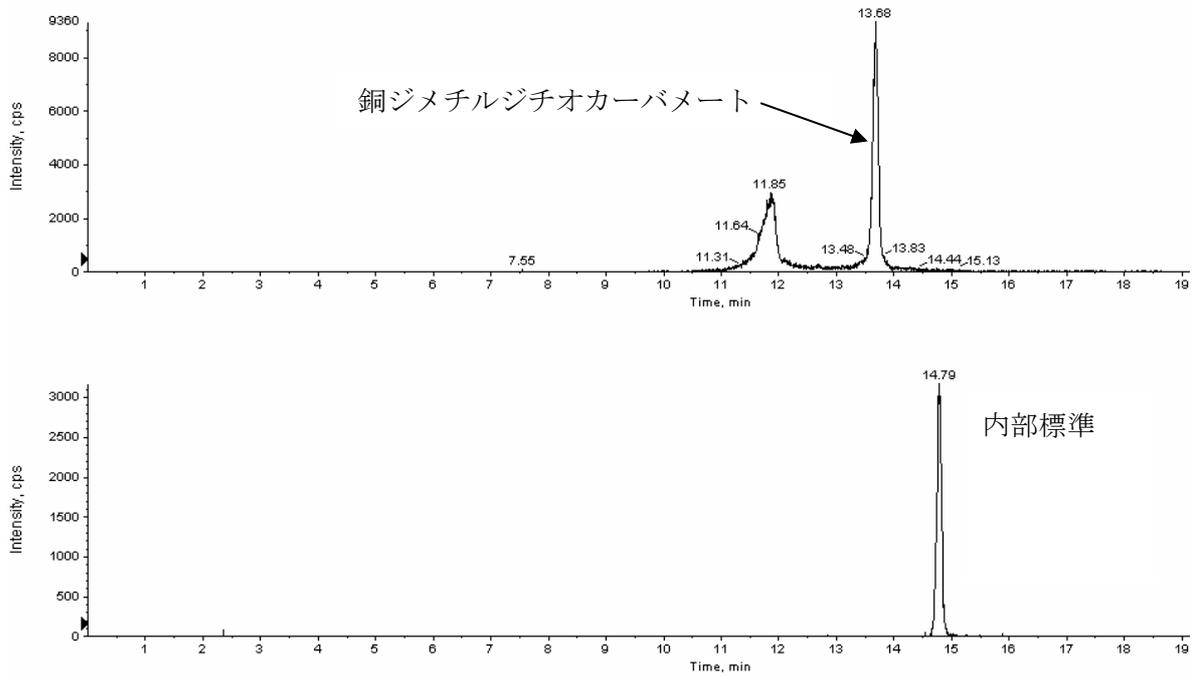


図 5 河川水(1L)への添加回収試験

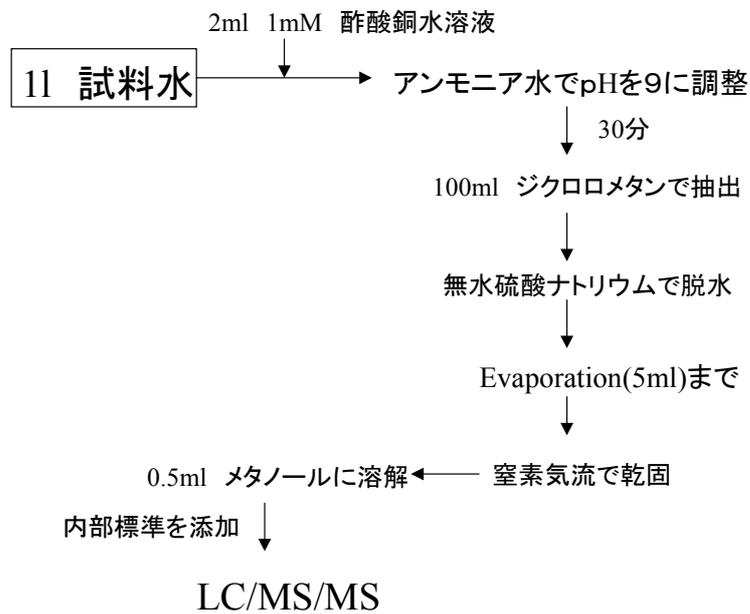


図 6 水質試料についてのジラムの LC/MS/MS 分析フローチャート

#### 4 LC/MS/MSによるジラムの環境分析における問題点

前項でジラム LC/MS/MS 分析法の環境分析への適用を検討した。しかしながら、添加回収試験において添加量が試料 1L につき 500ng 以下であると、回収率が極端に低下する。ジラムの配位子であるジメチルジチオカーバメートは様々な金属と錯体を形成することが可能である。このことから、ジラムから銅ジメチルジチオカーバメートへの液液抽出における変換反応が、基質であるジラムの濃度が低いケースにおいて、様々なマトリックスにより妨害されていると考えられる。ジラムの反応性を落とすことを狙い、還元剤であるアスコルビン酸を液中に添加し、同様に液液抽出を行った。精製水では、アスコルビン酸添加により、1L にジラム 100ng を添加した回収試験においても、ほぼ 100% の回収率が得られた。しかしながら、河川水についてはアスコルビン酸の効果はほとんど見られなかった。これは、河川水では環境マトリックスが多いため、アスコルビン酸の添加によっても、ジラムが銅置換以外の様々な反応を起こしてしまうことによると考えられる。

#### 5 おわりに

ジラムの LC/MS 分析方法について、解説した。試料水中の濃度が  $1\mu\text{g/L}$  以上のレベルでは、液液抽出法により、ジラムの分析が可能であることが分かった。しかしながら、ここで示した方法は  $1\mu\text{g/L}$  以下の濃度レベルでは、マトリックスによる妨害を受け、精度よい分析が困難であることが分かった。ジラムは環境中で様々な金属イオンと反応し、中心金属が変換していると考えられる。今後は、ジラムのこうした物性を考慮に入れ、ジラムの環境分析法や環境リスク評価を行う必要があると考えられる。

#### 参考文献

1. Y. Hanada, T. Tanizaki, M. Koga, H. Shiraishi, M. Soma; *Anal. Sci.*, 2002, **18**, 441.
2. Y. Shirasu, M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi and T. Kada; *Mutation Res.*, 1976, **40**, 19.
3. H. Moriwaki, Y. Yamaguchi, M. Fukushima; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 2374.
4. M. Palov, B. Renzo; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1986, **37**, 931.
5. J. Phinney, K. Bruland; *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, **16**, 2046.