

6.2 LC/MS を用いた水中農薬の一斉分析

環境中の農薬の挙動を把握するため、GC/MS 及び HPLC による農薬の一斉分析法の検討が必要である。HPLC で通常用いられている UV 等の検出法では選択性に乏しく、一斉分析を行うためには多くの物質をカラムによって良好に分離する条件を検討しなければならない。しかしながら、良好な分離条件を見出すのは困難である。一方、LC/MS では分子イオンの質量数によって選択的に定量することが可能であるため一斉分析への適用が容易であると考えられる。さらに、選択イオン検出(SIM)法を用いて定量することにより、感度の向上が期待される。本調査では、従来、主に HPLC で測定されてきた農薬類のうち、除草剤 8 種(アシュラム、ジウロン(DCMU)、フラザスルフロン、リニュロン、MCPB、メコプロップ(MCPP)、ピラゾスルフロンエチル及びシデュロン)、殺菌剤 1 種(チウラム)及び殺虫剤 2 種(アセフェート及びトリクロルホン(DEP))に対して LC/ESI-MS 法の適用を試みたのでその結果を報告する。

6.2.1 実験

6.2.1.1 対象物質

今回対象とした農薬を表 6.2.1-1 に示す。LC/MS におけるモニターイオンをあわせて示す。いずれの農薬についても、ESI Positive では $[M+H]^+$ を、ESI Negative では $[M-H]^-$ をモニターイオンとして選択した。

表6.2.1-1 対象農薬

農薬名	用途	分子式	モニターイオン	帰属
Acepahte	I	$C_4H_{10}NO_3PS$	184	$[M+H]^+$
Asulam	H	$C_8H_{10}N_2O_4S$	231	$[M+H]^+$
Diuron(DCMU)	H	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	233	$[M+H]^+$
Flazasulfuron	H	$C_{13}H_{12}F_3N_5O_5S$	408	$[M+H]^+$
Linuron	H	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	249	$[M+H]^+$
MCPB	H	$C_{11}H_{13}ClO_3$	247*	$[M-H]^-$
	H		229	$[M+H]^+$
Mecoprop(MCPP)	H	$C_{10}H_{11}ClO_3$	227*	$[M-H]^-$
	H		213*	$[M-H]^-$
Pyrazosulfuron-ethyl	H	$C_{14}H_{18}N_6O_7S$	415	$[M+H]^+$
Siduron	H	$C_{14}H_{20}N_2O$	233	$[M+H]^+$
Thiuram	F	$C_6H_{12}N_2S_4$	241	$[M+H]^+$
Trichlorfon(DEP)	I	$C_4H_8Cl_3O_4P$	257	$[M+H]^+$

H: 除草剤, I: 殺虫剤, F: 殺菌剤, *: ESI Negativeの場合

6.2.1.2 装置及び試薬

LC/MS は Hewlett Packard 製 HP1100 LC/MSD を用いた。農薬標準品は和光純薬製及び関東化学製を用いた。有機溶媒は関東化学製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた。酢

酸アンモニウム及びトリフルオロ酢酸は和光純薬製試薬特級を用いた。固相カートリッジは Waters 製 Sep-Pak plus PS-2 を用いた。

6.2.1.3 フローインジェクションによる条件の最適化

ESI 法においてはフラグメンター電圧（ドリフト電圧）を変えることによって感度が大きく変化する。よって、フラグメンター電圧の最適化は重要となる。そこで、カラムを通さず直接 MS に注入するフローインジェクションを行うことでフラグメンター電圧の最適化を行った。移動相については、表 6.2.1-2 に示す 3 種について検討を行った。

メタノール：水 = 50 : 50
メタノール：5mM トリフルオロ酢酸(pH 2.45) = 50 : 50
メタノール：30mM 酢酸アンモニウム(pH 5.0) = 50 : 50

6.2.1.4 LC 条件の検討

ODS 系及びポリマー系の 2 種類のカラムを用いて LC/MS(scan)で測定した。LC/MS 条件を表 6.2.1-3 に示す。

表6.2.1-3 LC/MS条件

使用機種	HP1100 LC/MSD
使用カラム	Waters SymmetryShield RP8(ODS系) 2.1mm×150mm, 5μ Supelco TPR-100 (ポリマー系) 2.1mm×150mm, 5μm
カラム温度	40
移動相	メタノール：30mM 酢酸アンモニウム 40 : 60 100 : 0(0min 15min)
流速	0.2ml/min
イオン化法	ESI

6.2.1.5 SIM での感度及び検量線の作成

農薬の標準溶液(濃度 2 μg/ml から 0.02 μg/ml)を LC/MS(SIM)で測定し、検量線を作成した。

6.2.1.6 添加回収実験

今回の対象農薬のうち、アセフェート、アシュラム及び MCPB を除く 8 農薬について添加回収実験を行った。市販のミネラルウォーター500ml に濃度が 4 μg/l または 0.2 μg/l となるように農薬標準溶液を添加し、1N 塩酸で pH を 3.5 に調整したものをあらかじめアセトニトリル及び水各 5ml でコンディショニングした固相カートリッジに 10ml/min で通水した。水 10ml で固相カートリッジを洗浄後、アスピレーターで通気乾燥した。アセトニトリル 4ml で溶出し、溶出液に窒素ガスを吹き付けて 1ml に濃縮した。得られた溶液を LC/MS(SIM)で定量した。

6.2.2 結果

6.2.2.1 フローインジェクションによる条件の最適化

フローインジェクションにより最適化されたフラグメンター電圧及び scan での感度を表 6.2.2-1 に示す。対象農薬の多くはフラグメンター電圧が 60V から 80V のときに高い感度が得られたものが多かったが、分解性の高いチウラムはフラグメンター電圧が 40V のとき感度が高く、フラグメンター電圧を上げると感度が大きく低下した。また、カルボキシル基を持つメコプロップは ESI Positive では感度が得られず、ESI Negative で検出が可能であった。移動相については、メタノール/30mM 酢酸アンモニウムの系を用いた場合に最も高い感度が得られた。

表6.2.2-1 フローインジェクションにより得られた最適フラグメンター電圧及びscanでの感度

農薬名	移動相		移動相		移動相	
	フラグメンター電圧(V)	DLs** (µg/ml)	フラグメンター電圧(V)	DLs (µg/ml)	フラグメンター電圧(V)	DLs (µg/ml)
Acephate	40	5	40	5	40	1
Asulam	60	5	60	5	60	1
Diuron(DCMU)	60	5	80	1	80	1
Flazasulfuron	80	5	80	1	80	1
Linuron	60	5	80	1	80	0.5
MCPB*			40	5	60	5
Mecoprop(MCPP)*	20	1	40	5	60	1
Pyrazosulfuron-ethyl	80	5	80	1	80	0.5
Siduron	80	1	100	0.5	120	0.5
Thiuram	60	1	40	1	40	0.5
Trichlorfon(DEP)	40		80	5	80	5

* : ESI Negative での測定 ** : scan 測定における検出下限濃度

6.2.2.2 LC 条件の検討

2 種のカラムを用いて得られた保持時間を表 6.2.2-2 に示す。ポリマー系のカラムでより良好な結果が得られたため、今回の検討にはポリマー系カラムを用いることとした。得られたクロマトグラムの例を図 6.2.2-1 から図 6.2.2-3 に示す。なお、アセフェート及びアシユラムについては、いずれのカラムによっても保持されず、これら 2 農薬の測定にあたっては LC 条件を更に検討する必要があると考えられた。

農薬名	ODS(Symmetry Shield RP8)		Polymer(TPR-100)	
	保持時間 (min)	DLs** (µg/ml)	保持時間 (min)	DLs (µg/ml)
Diuron(DCMU)	13.6	1	15.2	0.5
Flazasulfuron	8.5	5	12.0	1
Linuron	14.7	0.5	17.0	0.5
MCPB*	13.8	0.5	15.7	1
Mecoprop(MCPP)*	9.9	5	11.4	5
Pyrazosulfuron-ethyl	10.3	1	13.9	1
Siduron	14.7	0.5	16.0	0.5
Thiuram	9.4	1	16.0	1
Trichlorfon(DEP)	4.8	5	5.8	5

* : ESI Negativeでの測定, ** : scan測定における検出下限濃度

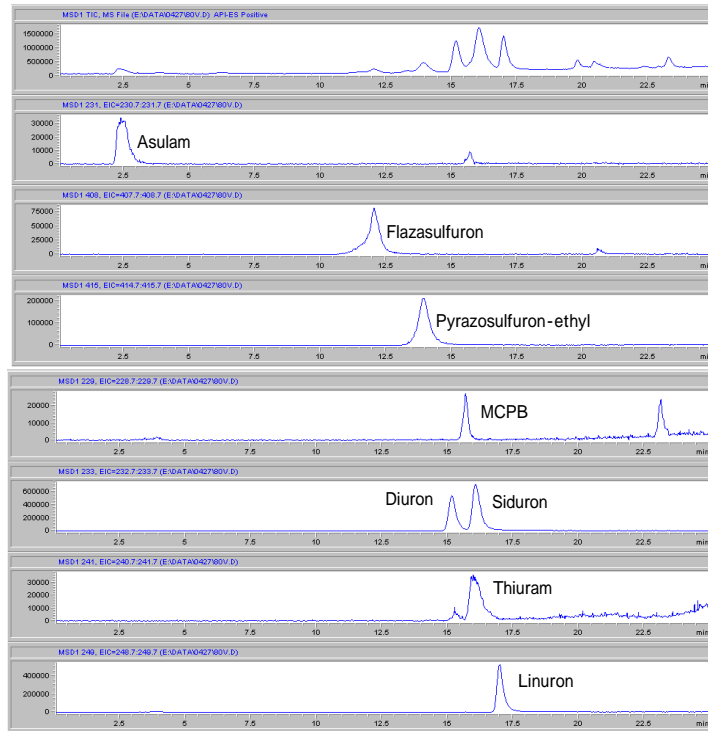


図 6.2.2-1 LC/MS による農薬のクロマトグラムの例
(ESI Positive, フラグメンター電圧 80V)

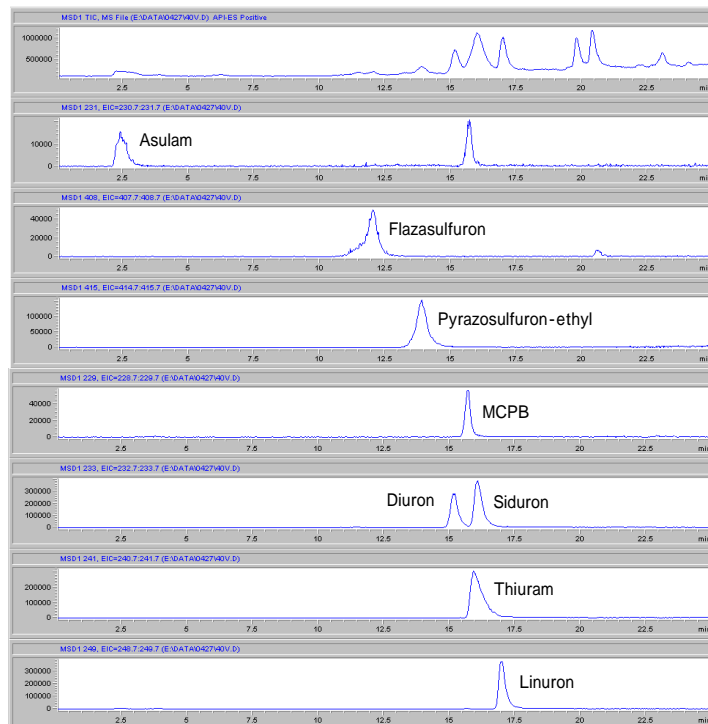


図 6.2.2-2 LC/MS による農薬のクロマトグラムの例
(ESI Positive, フラグメンター電圧 40V)

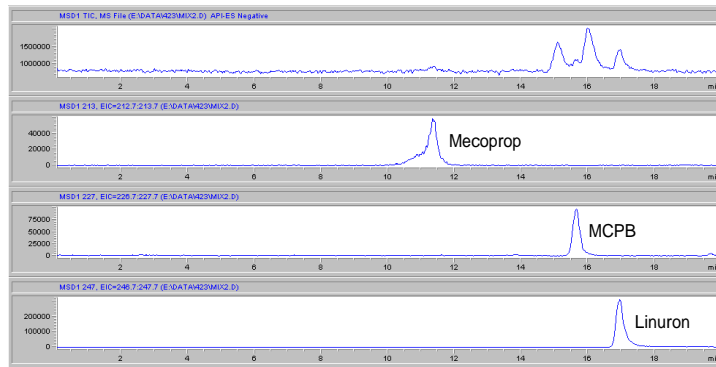


図 6.2.2-3 LC/MS による農薬のクロマトグラム例
(ESI Negative, フラグメンター電圧 50V)

6.2.2.3 SIM での感度及び検量線の作成

いずれの農薬についても $0.02 \mu\text{g/ml}$ の溶液を十分測定可能であった。濃度 $0.02 \mu\text{g/ml}$ の標準溶液のクロマトグラム例を図 6.2.2-4 に、検量線の例を図 6.2.2-5 に示す。

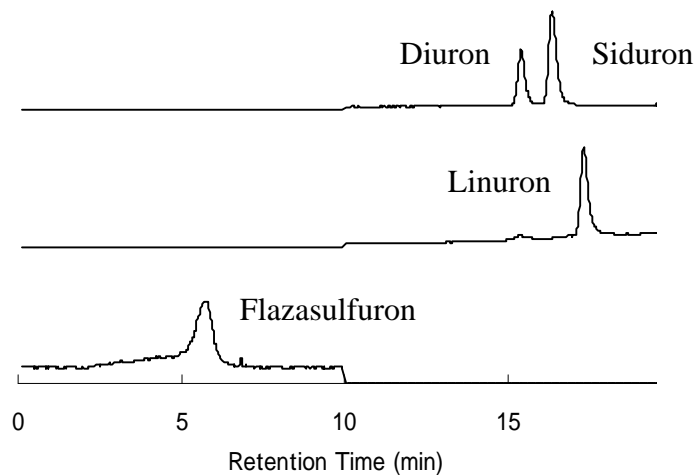


図 6.2.2-4 SIM クロマトグラム例(各 $0.02 \mu\text{g/ml}$)

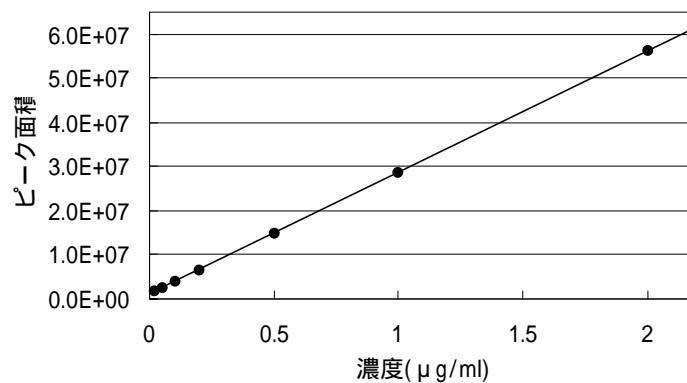


図 6.2.2-5 検量線の例(Siduron)

6.2.2.4 添加回収実験

添加回収実験の結果を表 6.2.2-3 に示す。対象農薬のうち、ジuron、シデュロン及びリニuronの 3 農薬については良好な回収率が得られた。その他の農薬については回収率が約 50%と低かった。回収率の低い農薬はいずれもクロマトグラムのピーク形状が悪く、特に添加回収の試料についてはリーディング等が著しくなる傾向が見られた。今回対象とした農薬の大多数については Sep-Pak PS-2 を用いた固相抽出-HPLC 法で良好な回収率が得られており、今回の低い回収率は LC/MS でのピーク形状の悪さが正確な定量に支障を及ぼしたことに起因するものと思われた。したがって、これらの農薬について LC 条件（カラム、溶離液等）を更に検討する必要があるものと考えられた。

表6.2.2-3 添加回収実験の結果

農薬名	LC/MS条件		回収率(%)	
	イオン化法	アグリメント電圧(V)	4 µg/l	0.2 µg/l
Diuron(DCMU)	ESI Pos.	80	90.2 (3.7)	92.9 (6.0)
Linuron	ESI Neg.	50	101 (1.4)	104 (5.0)
Siduron	ESI Pos.	80	93.7 (4.5)	96.4 (6.8)

()に変動係数を示す

6 . 2 . 3 まとめ

LC/ESI-MS を用いることにより、農薬類 9 種の測定が可能であった。LC 条件等についてさらに検討の必要があるものの、今後、LC/MS を用いてより多くの農薬類を高感度で一斉分析することが可能になるものと期待された。