

ゴルフ場で使用される農薬の 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた一斉分析法の検討

武田 真由美

A Simultaneous Analytical Method of Pesticides Applied to Golf Courses Using a Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer

Mayumi TAKEDA

ゴルフ場で使用される農薬については、監視対象数が過去5年間で72農薬から354農薬(平成29年3月1日現在)と急増し、分析の効率化が求められている。そこで、当所で分析法の確立されていない20農薬について、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下、LC/MS/MS)を用いた一斉分析法を検討した。試料は、pHを3.5に調整した場合と調整しない場合の2群に分け、それぞれを全自動固相抽出装置を用いて200倍濃縮し、LC/MS/MSを用いて測定した。各農薬の検量線は1—20 µg/Lの範囲でいずれも良好な直線性を示した。定量下限値は0.12—3.25 µg/Lであり、試料を200倍濃縮した場合、いずれの農薬においても十分な精度で測定が可能であった。添加回収率は、pHを調整した場合では16農薬、しない場合では17農薬が70—120%の範囲内であった。したがって、試料のpHを調整しない場合であれば17農薬についてLC/MS/MSを用いた一斉分析が可能となった。

キーワード：ゴルフ場、農薬、液体クロマトグラフタンデム型質量分析法、固相抽出

Keywords : Golf course, Pesticide, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Solid phase extraction

はじめに

平成25年6月に「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針」が一部改正され、従来の72農薬に加え、新たに農薬取締法に基づく水質汚濁に係る農薬登録保留基準値(以下、水濁基準値)が設定されている農薬について、水濁基準値の10倍値が水濁指針値として監視対象となった。さらに、平成29年3月9日に「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止及び水産動植物被害の防止に係る指導指針」が定められ、水産動植物被害に係る農薬登録保留基準値(以下、水産基準値)が設定されている農薬が追加され、水産基準値の10倍値が水産指針値として設定された。そのため、平成29年3月1日現在で合計354農薬が監視対象となっている。わずか5年間で監視対象農薬数が大幅に増加しており、類似の分析条件で測定可能な農薬については、一斉分析により効率化を図る必要性が高まっている。

当所では、平成24年に宮尻ら¹⁾により確立された液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下、LC/MS/MS)を用いた22農薬の一斉分析法などによって、平成27年度末で45農薬について一斉分析が可能となっている。今回、上記以外の20農薬について、LC/MS/MSを用いた一斉分析法を検討した。京都府の検出の有無を判断する検出限界値については、京都府ゴルフ場農薬安全使用指針の中の水質モニタリングマニュアルで、水濁指針値や水産指針値が10 µg/L未満で

ある場合は指針値の10分の1、10 µg/L以上である場合は1 µg/Lと定めている。今回、検討の対象とした20農薬については、できる限り多くの農薬の定量下限値が京都府の検出限界値を下回ること、前処理における回収率が化学物質環境実態調査実施の手引き(平成27年度版)²⁾での許容範囲である70—120%であることを満足できるようLC/MS/MSによる一斉分析法を検討したので報告する。

材料と方法

1. 対象農薬

平成27年度以降に京都府内の監視対象ゴルフ場で使用され、当所における分析法が確立されていない農薬のうち、環境省によりLC/MS/MSによる個別分析法が示されている農薬(https://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/golf_course/analysis.html)や藤沢ら^{3,4,5)}の方法を参考に、フルセトスルフロン、クロラントラニプロール、ホラムスルフロン、メタミホップ、ペンフルフェン、メトコナゾール、フルベンジアミド、ベンチオピラド、ミクロブタニル、エトベンザニド、キノクラミン、クロリムロンエチル、メトラクロール、フェノキサスルホン、プロジアミン、イソキサベン、プロパモカルブ塩酸塩、MCPA、フラメトピル、トリアジフラムの20農薬を一斉分析の検討対象とした。

2. 試薬等

農薬標準品のうち、ベンチオピラド、エトベンザニド、キノクラミン、フラメトピル及びトリアジフラムは関東化学社製、メタミホップ、ペンフルフェン及びミクロブタニルは

(平成30年12月20日受理)

Sigma-Aldrich 社製、MCPA は DES 社製、フェノキサスルホンは林純薬工業社製、ホラムスルフロンは AccuStandard 社製、それ以外は富士フィルム和光純薬社製を使用した。塩酸は特級、メタノール及びアセトニトリルは LC/MS 用、ギ酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用を用いた。固相カートリッジは Waters 社製 Oasis HLB Plus を用いた。

3. 標準原液及び検量線用標準列の作製

農薬の標準品を各々アセトニトリルに溶解し、個別に 1 mg/mL の標準原液を作製した。メトコナゾールについては cis 体と trans 体の異性体が存在するが、指導指針では単一の農薬として評価することになっていること、LC/MS/MS ではこれらの異性体のピークを分離することが困難であることから、両者の標準品を等量混合し、メトコナゾールとして、1 mg/mL の標準原液とした。

各農薬標準原液を 100 μL ずつ分取し、アセトニトリルで

10 mL に定容し、0.01 mg/mL の 20 種混合標準液を作製した。検量線用標準液は、0.01 mg/mL の 20 種混合標準液をアセトニトリル・水混液 (1:1) で希釈して 1.0—20 μg/L の範囲で作製した。

4. LC/MS/MS による測定条件

測定装置及び測定条件を表 1 に、対象農薬におけるイオンモード及び測定質量数等を表 2 に示す。

装置検出下限値 (IDL) 及び装置定量下限値 (IQL) については、化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 27 年度版)²⁾ を参考に、検量線の最小濃度を 7 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて次式より算出した。

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

$$IQL = 10 \times \sigma_{n-1}$$

$t(n-1, 0.05)$: 危険率 5%、自由度 $n-1$ の t 値 (片側、 $n=7$ の場合は 1.9432)

表 1. ゴルフ場で使用される農薬測定における液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の測定条件

液体クロマトグラフ	使用機種	Acquity UPLC (Waters 社製)	
	使用カラム	Acquity UPLC HSS C18 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) (Waters 社製)	
	移動相	A: 5mMギ酸アンモニウム、 B: メタノール 0 → 0.5 min A:95 B:5 linear gradient 0.5 → 2.0 min A :95 → 55 B:5 → 45 linear gradient 2.0 → 8.0 min A :55 → 5 B:45 → 95 linear gradient 8.0 → 13.5 min A :5 B:95 13.5 → 17 min A :95 B: 5	
	流速	0.4 mL/min	
	カラム温度	40°C	
	注入量	5 μL	
	試料温度	11°C	
	タンデム型質量分析計	使用機種	Quattro Premier XE (Waters 社製)
		キャピラリー電圧	3.0 kV
		コーンガス流量	50 L/hr
デソルベーションガス流量		N ₂ (800 L/hr)	
ソース温度		120°C	
デソルベーション温度		400°C	

表 2. 検討対象農薬における液体クロマトグラフタンデム型質量分析の測定質量数等の測定条件

農薬名	イオンモード	測定質量数		コーン電圧(V)	コリジョン電圧(V)
		プレカーサーイオン	プロダクトイオン		
フルセトスルフロン	ESI (+)	488	156	25	23
クロラントラニリプロール	ESI (+)	484	177	18	44
ホラムスルフロン	ESI (+)	453	182	24	24
メタミホップ	ESI (+)	441	123	35	33
ペンフルフェン	ESI (+)	318	234	24	18
メトコナゾール	ESI (+)	320	70	32	22
フルベンジアミド	ESI (-)	681	254	32	38
ペンチオピラド	ESI (+)	360	276	23	14
マイクロブタニル	ESI (+)	289	70	26	20
エトベンザニド	ESI (+)	340	149	33	22
キノクラミン	ESI (+)	208	105	38	29
クロリムロンエチル	ESI (+)	415	83	31	37
メトラクロール	ESI (+)	284	176	23	25
フェノキサスルホン	ESI (+)	383	203	19	15
プロジアミン	ESI (+)	351	250	28	27
イソキサベン	ESI (+)	333	165	30	20
プロパモカルブ塩酸塩	ESI (+)	189	102	34	16
MCPA	ESI (-)	199	141	25	15
フラメピル	ESI (+)	334	157	35	33
トリアジフラム	ESI (+)	334	192	48	24

σ_{n-1} : IDL 算出のための測定値の標準偏差

5. 試料の前処理方法の検討

精製水に0.01 mg/mLの20種混合標準液を200倍濃縮後に10 µg/Lとなるように添加したものを回収率試験用の試料とした。試料8本用意し、うち4試料を1 mol/L塩酸を用いてpH 3.5に調整した。全自動固相抽出装置(ジーエルサイエンス社製AQUA Trace ASPE 799)を用いて、各試料200 mLを通水した後、アセトニトリル4 mLで固相カラムから溶出させたものを約0.5 mLまで濃縮し、アセトニトリル・水混液(1:1)で1 mLに定容した。今回検討した前処理のフローを

図1に示す。

6. 一斉分析法による京都府内河川水の測定

今回確立された一斉分析法により、府内河川水を試料として農薬の分析を行った。河川水は図2に示す京都府の環境基準点15地点において、平成30年1月から2月に採水し、分析に供した。

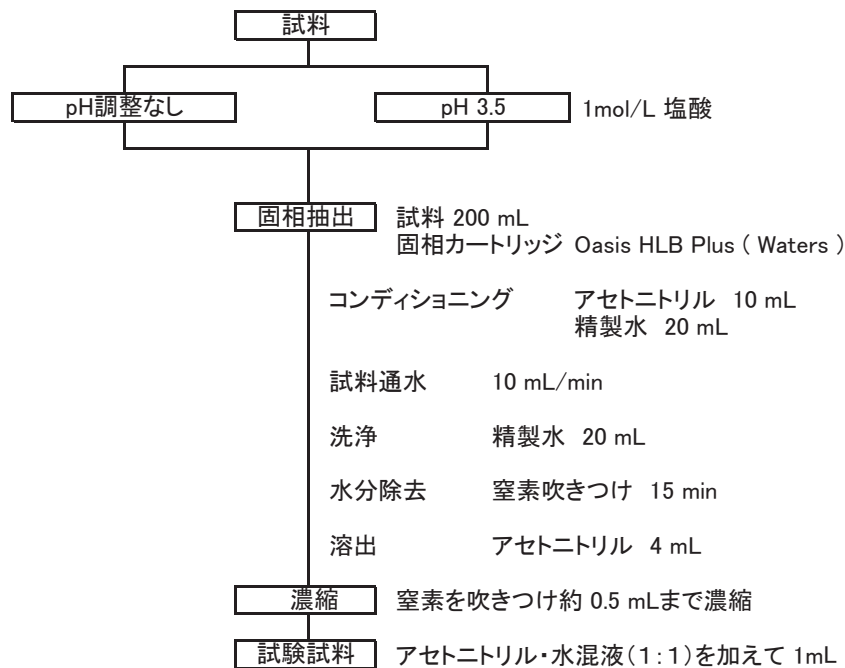
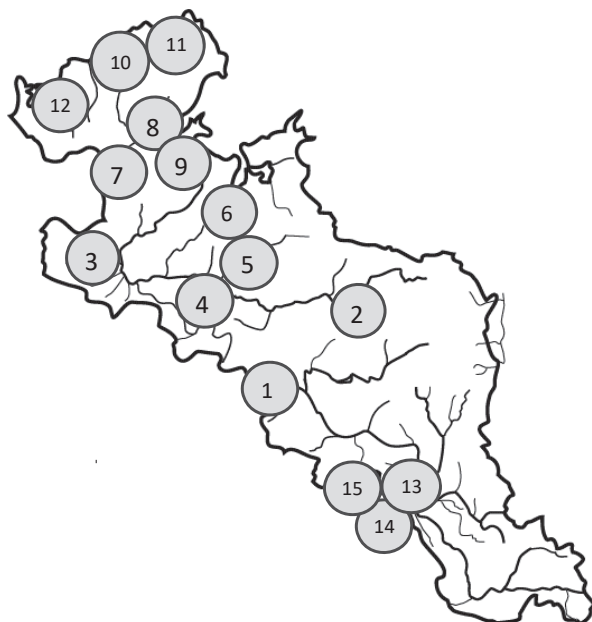


図1. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析法を用いた一斉分析法の前処理フロー



地点番号	河川名	地点名
1	園部川	神田橋
2	由良川	安野橋
3	牧川	天津橋
4	由良川	山家橋
5	上林川	五郎橋
6	伊佐津川	相生橋
7	野田川	六反田橋
8	野田川	堂谷橋
9	大手川	京口橋
10	竹野川	荒木野橋
11	宇川	宇川橋
12	佐濃谷川	高橋橋
13	宇治川	御幸橋
14	木津川	御幸橋
15	大谷川	二ノ橋

図2. 固相抽出液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた一斉分析を行った府内河川水試料の採水地点

結果

1. LC/MS/MS を用いた分析精度

表3に示すとおり、すべての農薬について、検量線の寄与率 (r^2) は、0.99 以上であった。また、IQL は、0.12—3.25 $\mu\text{g/L}$ の範囲であった。

2. 前処理による回収率の差異

試料の前処理による各農薬の回収率を表4に示す。pH 調整の有無に関わらず、メタミホップと MCPA の回収率は、35.2—55.6% と低く、イソキサベン の回収率は、140% 前後と高い結果となった。プロパモカルブ塩酸塩は、pH 調整なしでは回収率が 93.8% であったが、pH 3.5 では 10% 以下と著しく低かった。以上の結果を除くと、回収率は 70—120% の範囲であり、その農薬数は、試料の pH 調整を行った場合は 16 農薬、pH 調整を行わなかった場合は 17 農薬であった。

3. 京都府内の河川における検出状況

京都府内の河川水について、確立した一斉分析法で測定した結果、17 農薬のいずれもが水濁基準及び水産基準の報告下限値を下回った。

考察

今回検討対象となった 20 農薬の IQL は 0.12—3.25 $\mu\text{g/L}$ の範囲であり、前処理により 200 倍濃縮した試料については、京都府の検出限界値を十分に下回る。よって、20 農薬について全自動固相抽出装置を用いた LC/MS/MS による一斉分析

が可能であると考えられた。しかし、前処理法によって、回収率が pH 調整の有無に関わらずメタミホップ及び MCPA で 70% を下回り、イソキサベン は 120% を上回った。回収率については、化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 27 年度版)²⁾ では 70—120% となっているため、上記 3 物質については、今回検討した全自動固相抽出装置を用いた LC/MS/MS による一斉分析から除外した。また、プロパモカルブ塩酸塩については、pH 調整なしでは回収率が 93.8% であったが、pH 3.5 では 10% 以下と著しく低くなった。それ以外の 16 農薬については、いずれの場合も回収率が 70—120% の要件を満たした。このことから、プロパモカルブ塩酸塩を加え

表 4. 固相抽出液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた一斉分析法の回収率

農薬名	回収率(%)※	
	pH調整なし	pH3.5に調整
フルセトスルフロ	90.4	93.3
クロラントラニリプロール	85.7	88.4
ホラムスルフロ	93.2	94.2
メタミホップ	49.0	47.4
ペンフルフェン	84.9	86.1
メコナゾール	106	102
フルベンジアミド	110	108
ペンチオピラド	90.3	91.6
マイクロブタニル	99.0	99.5
エトベンザニド	84.4	83.2
キノクラミン	96.3	92.8
クロリムロンエチル	114	103
メトラクロール	103	99.6
フェノキサスルホン	111	105
プロジアミン	78.3	71.9
イソキサベン	147	138
プロパモカルブ塩酸塩	93.8	8.6
MCPA	35.2	55.6
フラメピル	98.8	96.3
トリアジフラム	94.1	98.7

※前処理方法については本文に示す

表 3. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析法による検討対象農薬の検量線の寄与率 (r^2)、装置検出限界及び指針値等

農薬名	r^2	IDL($\mu\text{g/L}$)	IQL($\mu\text{g/L}$)	指針値※		京都府の検出限界値($\mu\text{g/L}$)
				水濁指針値($\mu\text{g/L}$)	水産指針値($\mu\text{g/L}$)	
フルセトスルフロ	0.9998	0.14	0.37	1000	79000	1
クロラントラニリプロール	0.9988	0.23	0.60	6900	29	1
ホラムスルフロ	0.9998	0.16	0.41	13000	97000	1
メタミホップ	0.9996	0.12	0.30	110	280	1
ペンフルフェン	1.0000	0.12	0.32	530	100	1
メコナゾール	0.9995	0.20	0.51	500	2100	1
フルベンジアミド	0.9982	0.22	0.57	450	58	1
ペンチオピラド	0.9998	0.04	0.12	2000	560	1
マイクロブタニル	0.9999	0.09	0.23	630	9700	1
エトベンザニド	1.0000	0.06	0.16	1100	780	1
キノクラミン	0.9994	0.36	0.93	55	63	1
クロリムロンエチル	0.9983	0.15	0.38	2000	37	1
メトラクロール	0.9998	0.13	0.34	2500	230	1
フェノキサスルホン	0.9920	0.23	0.58	4500	9.3	0.93
プロジアミン	0.9998	0.39	0.99	1700	4.6	0.46
イソキサベン	1.0000	1.26	3.25	1300	1300	1
プロパモカルブ塩酸塩	0.9992	0.29	0.74	7700	100000	1
MCPA	0.9998	0.10	0.26	51	81000	1
フラメピル	0.9999	0.08	0.19	100	1400	1
トリアジフラム	0.9998	0.15	0.40	230	2500	1

※水濁指針値は、水濁基準値の10倍値。水濁基準値の設定がない農薬については指導指針別表の値
水産指針値は、水産基準値の10倍値

て17農薬の一斉分析を可能にするには、pHを調整せずに固相抽出することが適当である。

また、確立された一斉分析法により、京都府内の15地点の河川水について17農薬を測定した結果、すべての採水地点で水濁基準及び水産基準の報告下限値を下回った。

この分析法では固相抽出により200倍濃縮することで、17農薬の一斉分析が可能となった。しかし、表3に示すとおり、17農薬中の多くの農薬のIQLが京都府の検出限界値を十分下回っていることから、それらについては前処理を行わずに直接測定することができると思われる。今後は、回収率の低かったメタミホップとMCPAを加え、前処理なしのLC/MS/MSによる一斉分析も検討したい。

引用文献

- 1) 宮尻久美, 近藤博文, 蒲敏幸. 2012. 新規ゴルフ場使用農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた分析法の検討及び環境実態について. 京都府保健環境研究所年報, 第57号, 102-106.
- 2) 環境省総合環境政策局 環境保健部環境安全課. 2016. 化学物質環境実態調査実施の手引き(平成27年度版), 70-81.
- 3) 藤沢弘幸, 近藤隆之, 藤島裕典. 2015. LC/MS/MSを用いた農薬多成分同時分析法の確立に関する研究. 平成27年度富山県環境科学センター年報, 第43号, 93-99.
- 4) 藤沢弘幸, 藤島裕典. 2016. LC/MS/MSを用いた農薬多成分同時分析法の確立に関する研究(第2報). 平成28年度富山県環境科学センター年報, 第44号, 80-86.
- 5) 藤沢弘幸, 武藤章裕, 齋藤悠悟. 2017. LC/MS/MSを用いた農薬多成分同時分析法の確立に関する研究(第3報). 平成29年度富山県環境科学センター年報, 第45号, 100-105.