

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

宮尻 久美 近藤 博文 蒲 敏幸

LC/MS/MS Method for Determination of Pesticides in Waste Water from Golf Course and Results of Environmental Survey

Kumi MIYAJIRI Hirofumi KONDO Toshiyuki KABA

平成 22 年 9 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」が改正され、29 農薬についての指針値が追加されるとともに、検査方法についても大幅な見直しが行われた。この中で、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が示されたが、この方法の対象となっている農薬の内、新規 18 農薬及びその代謝物等の併せて 22 物質について、一斉分析法を検討した。環境省が提示した方法は、煩雑であるため、より簡便な分析法を検討した。その結果、すべての農薬について、暫定指針の分析法に示された感度である 1 ng/mL を下回る濃度まで分析可能な一斉分析法を確立した。また、府内南部の河川について実態調査を行った。4 農薬について 0.05 µg/L 以上検出された地点があったが、指針値よりもはるかに低い濃度であった。

キーワード：液体クロマトグラフタンデム型質量分析計、農薬、固相抽出

key words：LC/MS/MS, Pesticide, Solid phase extraction

はじめに

ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止を図るため、ゴルフ場から排出される農薬の実態を把握し、ゴルフ場に対して適切な指導を行う必要がある。その際の参考となるよう、環境省では「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」(以下「暫定指針」と記す。)を定めている。また、京都府ではゴルフ場における農薬の安全使用及び環境保全のため、「京都府ゴルフ場農薬安全使用指針」を定め監視を行っている。

平成 22 年 9 月に暫定指針が改正され、29 農薬についての指針値が追加されるとともに、検査方法についても大幅な見直しを実施された。この中で、新規農薬のほか、これまでガスクロマトグラフ (GC) で測定されていた農薬も加えた 47 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 (LC/MS/MS) を用いた一斉分析法が示された。

しかし、提示された方法 (図 1) は前処理方法が濃縮乾固を繰り返す煩雑な方法であることから、新規 18 農薬及びその代謝物等の併せて 22 物質について簡便な前処理方法による分析法を検討するとともに、京都府内の河川におけるこれら農薬の環境実態を調査したので報告する。

試料 200mL

塩酸 2mL 添加

固相抽出

ジヒェニルベンゼン-N-ヒェニルピロリドン共重合体ニカラム
コンデションング アセトン 5mL 水 5mL

試料を通水

水 10mL

水分除去 窒素ガスを通す

アセトン 30ml 溶出

アセトニトリル 2ml 添加

濃縮乾固

40℃以下で約 1mL まで(減圧濃縮器)

窒素ガス気流下で乾固

アセトン/ヘキサン混液 2ml 定容

アセトン/ヘキサン混液 1ml

濃縮乾固

水/メタノール混液 50ml 定容

LC/MS/MS

図 1. 環境省によって示された追加対象農薬の一斉分析法

材料と方法

1. 検討対象農薬

対象農薬は、暫定指針で、LC/MS/MS を用いた多成分同時分析法として示されている物質のうち、新規 18 農薬と、代謝物 2 物質、指針値既設定 2 農薬の 22 農薬を検討

表 1. 検討対象農薬と測定質量数

農薬名	指針値(mg/L)	イオンモード	測定質量数*1	コーン電圧(V)	コリジョン電圧(V)
アセタミプリド	1.8	ESI(+)	223 / 126	29	18
イミダクロプリド	1.5	ESI(+)	256 / 209	21	15
クロチアニジン	2.5	ESI(+)	250 / 169	20	15
チアメトキサム	0.47*2	ESI(+)	292 / 211	16	14
テブフェノジド	0.42	ESI(+)	353 / 297	15	9
ジフェノコナゾール	0.3	ESI(+)	406 / 251	28	25
シプロコナゾール	0.3	ESI(+)	292 / 125	29	27
シメコナゾール	0.22	ESI(+)	294 / 135	27	21
チフルザミド	0.5	ESI(+)	529 / 148	42	39
テトラコナゾール	0.1	ESI(+)	372 / 159	33	34
テブコナゾール	0.77	ESI(+)	308 / 125	31	30
トリフルミゾール] 0.5*3	ESI(+)	346 / 278	18	11
トリフルミゾール代謝物		ESI(+)	295 / 215	30	22
ボスカリド	1.1	ESI(+)	343 / 307	34	21
メタラキシル M] 0.58 (メタラキシルとして)	ESI(+)	280 / 220	20	13
メタラキシル		ESI(+)	280 / 220	20	13
エトキシスルフロロン	1	ESI(+)	399 / 261	29	14
オキサジクロメホン	0.24	ESI(+)	376 / 190	25	16
カフェンストロール] 0.07*4	ESI(+)	351 / 100	17	10
カフェンストロール脱カルバモイル体		ESI(+)	252 / 119	30	20
シクロスルファミロン	0.8	ESI(+)	422 / 218	40	30
メコプロップ	0.47	ESI(-)	213 / 141	22	17

* 1 プレカーサーイオン/プロダクトイオン

* 2 チアメトキサムの濃度と、クロチアニジンの濃度に 1.17 を乗じてチアメトキサムの濃度に換算したものととの和。

* 3 トリフルミゾールの濃度と、トリフルミゾール代謝物の濃度に 1.18 を乗じてトリフルミゾールの濃度に換算したものととの和。

* 4 カフェンストロールの濃度と、カフェンストロール脱カルバモイル体の濃度に 1.39 を乗じてカフェンストロールの濃度に換算したものととの和。

対象農薬とした。表 1 に対象農薬を示す。

2. 試薬及び器具

農薬の標準品は、和光純薬製、関東化学製及び Fluka 製を使用した。塩酸は特級（和光純薬製）、メタノールは LC/MS 用（関東化学製）、酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液（和光純薬製）を用いた。固相抽出装置は、ジーエルサイエンス社製全自動固相抽出装置 AQUA Trace ASPE699 を使用した。固相カートリッジは、表 2 に示す 6 種類について検討し、環境実態調査には、Waters 社製 Oasis HLB Plus (225mg) を用いた。

3. 測定装置及び測定条件

測定装置及び測定条件を表 3 に示す。

表 2. 検討した固相カートリッジ

	メーカー	充てん量(mg)	容量(mL)
Aqisus PLS-3	ジーエルサイエンス	200	6
Supel-Select HLB	SUPELCO	200	6
Oasis HLB Plus	Waters	225	0.8
SepPak Plus PS-2	Waters	265	0.8
SepPak Vac C18	Waters	500	6
Presep Agri	和光純薬	500	8

4. 標準原液の調製

22 農薬について、それぞれ適量秤量してメタノールに溶解し、各 500 µg/mL の標準原液を調製した。これらを混合して 22 農薬混合標準原液 (10 µg/mL) を作製した。

表 3. LC/MS/MS 測定装置及び測定条件

LC	
機種	: Waters 社製 Acquity UPLC
カラム	: AcquityHSS C18 (2.1mm × 100mm, 1.8µm)
移動相	: A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール
	A : 95 0 → 0.7min A : 95 → 70 0.7 → 1.5 min A : 70 → 30 1.5 → 8.5 min A : 30 → 5 8.5 → 10.5 min A : 5 → 95 10.5 → 12.0 min A : 95 12.0 → 14.0 min
流量	: 0.4 mL/min
カラム温度	: 40°C
注入量	: 5 µL
MS	
機種	: Waters 社製 Quattro Premier XE
キャピラリー電圧	: 1.0 kV
イオンソース温度	: 120°C
脱溶媒ガス温度	: 400°C
脱溶媒ガス流量	: 800 L/hr
コーンガス流量	: 50 L/hr

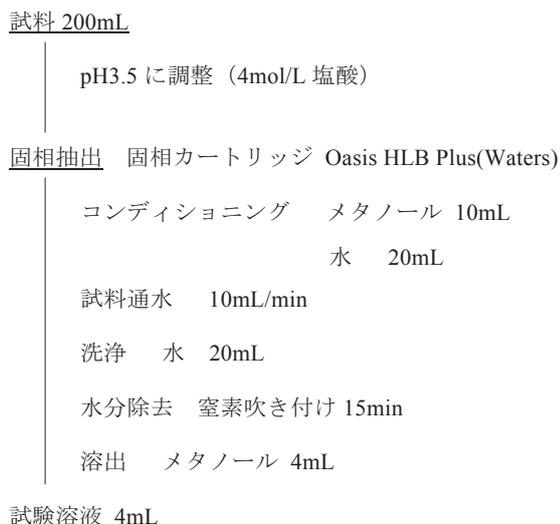


図 2. 前処理操作フロー

5. 前処理操作

試料 200 mL を 4 mol/L 塩酸を用いて pH 3.5 に調整し、全自動固相抽出装置を用いてメタノール 4 ml で溶出した。分析操作を図 2 に示す。

結果

1. 検量線

検量線用標準液は、22 農薬混合標準原液 (10 µg/mL) を適宜メタノールで希釈して、0.1~10 ng/mL の濃度範囲で 5 段階以上の濃度の溶液を作製した。結果を表 4 に示す。検量線の寄与率 (R²) はトリフルミゾール代謝物とメコプロップを除くと 0.99 以上であった。なお、トリフルミゾール代謝物とメコプロップは、検量線の濃度範囲を 0.5~10 ng/mL としたとき、R² はそれぞれ 0.998, 0.997 となった。

2. 装置検出限界 (IDL)

22 農薬混合標準原液からメタノールを用いて作製した 0.5 ng/mL の標準液を 7 回測定 (注入量 5 µL) し、化学物質環境実態調査実施の手引き¹⁾ により装置検出限界 (IDL) を求めた。すべての農薬において、1 ng/mL を下回る結果が得られた。(表 4)

3. 固相カートリッジの検討

6 種類の固相カートリッジについて、水 200mL に 22 農薬各 80ng を添加して前処理し、回収試験を行ったところ、表 5 の結果が得られた。この中で、回収率の最小値が最も高く、ばらつきの最も小さい Oasis HLB Plus (Waters) を以後の検討で用いることとした。

4. 定量下限値の検討

定量下限値については上水試験方法²⁾ に従い、変動係

表 4. 各農薬の検量線の R² と装置検出限界

農薬名	検量線の R ²	IDL (ng/mL) *1
アセタミプリド	0.9994	0.11
イミダクロプリド	0.9993	0.17
クロチアニジン	0.9903	0.17
チアメトキサム	0.9967	0.16
テブフェノジド	0.9984	0.18
ジフェノコナゾール	0.9993	0.22
シプロコナゾール 1	0.9993	0.20
シプロコナゾール 2	0.9980	0.23
シメコナゾール	0.9968	0.22
チフルザミド	0.9990	0.44
テトラコナゾール	0.9982	0.17
テブコナゾール	0.9947	0.41
トリフルミゾール	0.9987	0.09
トリフルミゾール代謝物	0.9574	0.47
ボスカリド	0.9998	0.27
メタラキシル M	0.9992	0.17
メタラキシル	0.9987	0.24
エトキシスルフロン	0.9994	0.09
オキサジクロメホン	0.9996	0.15
カフェンストロール	0.9996	0.24
カフェンストロール脱カルバモイル体	0.9990	0.23
シクロスルファミロン	0.9990	0.11
メコプロップ	0.9845	0.61

* 1 0.5ng/mL の標準液を 7 回測定して算出した。

数 20% 以下が確保されるときに濃度を求めた。以下に具体的な方法を示す。

22 農薬混合標準原液を水で希釈し、0.05 µg/L の水溶液を作製した。これを用いて 5 併行の試験を行い、平均値及び変動係数を求めた。結果を表 6 に示す。変動係数はいずれも 20% 以下であり、0.05 µg/L まで定量可能であることがわかった。

5. LC/MS/MS への直接注入法の検討

固相抽出操作の省略が可能かどうかを検討するため、22 農薬各 1 ng/mL の水溶液を作製し、pH 3.5 に調整して測定 (注入量 5 µL) を行ったが、ほとんどが検出されなかった。そこで、試料液中メタノール濃度が 10~50% (v/v) となるように 10 ng/mL の溶液を調製し測定した。その結果を表 7 に示す。メタノールの割合が増えるにつれ、ピーク面積が大きくなった。

6. 環境実態調査

京都府内の南部の河川 12 地点について、実態調査を行った。0.05 µg/L 以上検出された地点及び検出農薬を表 8 に示した。

考察

ゴルフ場使用農薬の 22 農薬について LC/MS/MS を用いた一斉分析法を検討した結果、全自動固相抽出装置を用いた方法ですべての農薬が目標とした 0.05 µg/L まで定量可能であった。今回は 50 倍濃縮で測定を行ったが、試料量を増やしたり、固相抽出後、濃縮を行うことで、

表 5. 対象農薬の各種固相カートリッジごとの回収率 (添加量 80 ng/200 mL)

農薬名							(%)
	Aqsis PLS-3	Supel-Select HLB	Oasis HLB Plus	SepPak Plus PS-2	Presep Agri	SepPak Vac C18	
アセタミプリド	78	91	94	94	99	98	
イミダクロプリド	67	83	83	89	90	95	
クロチアニジン	79	85	87	89	94	60	
チアメトキサム	76	81	86	87	93	38	
テブフェノジド	81	84	94	98	96	102	
ジフェノコナゾール	66	74	75	22	28	83	
シプロコナゾール1	88	80	94	95	100	98	
シプロコナゾール2	91	89	98	97	92	99	
シメコナゾール	91	90	97	95	95	97	
チフルザミド	85	87	93	100	97	86	
テトラコナゾール	80	84	92	92	87	97	
テブコナゾール	79	86	97	91	69	100	
トリフルミゾール	67	80	83	87	59	81	
トリフルミゾール代謝物	83	83	83	94	30	98	
ボスカリド	76	69	82	86	85	89	
メタラキシル M	74	74	86	93	102	100	
メタラキシル	73	72	87	93	100	102	
エトキシスルフロン	81	93	94	93	91	101	
オキサジクロメフォン	68	79	85	71	56	81	
カフェンストロール	80	81	97	85	77	98	
カフェンストロール脱カルバモイル体	91	99	94	91	96	98	
シクロスルフアムロン	71	61	80	80	50	90	
メコプロップ	90	94	98	92	100	99	
最小値	66	61	75	22	28	38	
標準偏差	8.1	8.7	6.6	16	23	15	

表 6. 各農薬の定量下限値

農薬名	検出範囲 (mg/L)	平均値 (mg/L)	CV (%)
アセタミプリド	0.041 - 0.058	0.053	8.9
イミダクロプリド	0.045 - 0.060	0.050	12.4
クロチアニジン	0.045 - 0.060	0.052	7.4
チアメトキサム	0.040 - 0.057	0.052	10.0
テブフェノジド	0.041 - 0.075	0.059	16.6
ジフェノコナゾール	0.026 - 0.043	0.036	17.1
シプロコナゾール1	0.042 - 0.061	0.052	10.3
シプロコナゾール2	0.047 - 0.059	0.052	7.0
シメコナゾール	0.047 - 0.065	0.055	8.6
チフルザミド	0.037 - 0.062	0.049	12.0
テトラコナゾール	0.047 - 0.061	0.055	8.2
テブコナゾール	0.041 - 0.065	0.050	10.0
トリフルミゾール	0.044 - 0.059	0.052	9.6
トリフルミゾール代謝物	0.036 - 0.078	0.055	19.1
ボスカリド	0.041 - 0.058	0.051	10.3
メタラキシル M	0.037 - 0.061	0.051	15.7
メタラキシル	0.040 - 0.064	0.052	15.4
エトキシスルフロン	0.042 - 0.055	0.051	7.9
オキサジクロメホン	0.038 - 0.050	0.045	10.3
カフェンストロール	0.044 - 0.060	0.052	9.8
カフェンストロール脱カルバモイル体	0.048 - 0.055	0.052	4.7
シクロスルフアムロン	0.028 - 0.047	0.040	15.3
メコプロップ	0.051 - 0.073	0.060	10.2

表 7. 10ng/mL に調製した試料の LC/MS/MS 直接注入法によるメタノール濃度別測定結果

(10ng/mL を 1 とした検出割合)

農薬名	試料中メタノール濃度 (% (v/v))				
	50	40	30	20	10
アセタミプリド	1.05	0.88	0.96	0.79	0.76
イミダクロプリド	0.98	0.83	0.89	0.89	0.72
クロチアニジン	1.05	0.88	0.98	0.86	0.77
チアメトキサム	1.01	0.89	0.91	0.85	0.81
テブフェノジド	0.94	0.71	0.54	0.15	0.03
ジフェノコナゾール	0.68	0.13	0.05	0.01	0.00
シプロコナゾール 1	0.97	0.75	0.81	0.45	0.21
シプロコナゾール 2	1.00	0.83	0.76	0.44	0.14
シメコナゾール	1.03	0.95	0.82	0.49	0.18
チフルザミド	0.88	0.63	0.32	0.22	0.08
テトラコナゾール	0.95	0.67	0.48	0.09	0.00
テブコナゾール	1.07	0.67	0.51	0.17	0.07
トリフルミゾール	0.88	0.40	0.19	0.02	0.00
トリフルミゾール代謝物	0.92	0.69	0.70	0.30	0.13
ボスカリド	0.92	0.55	0.39	0.12	0.05
メタラキシル M	0.99	0.88	0.90	0.79	0.72
メタラキシル	1.00	0.92	0.89	0.80	0.74
エトキシスルフロン	1.05	0.94	0.96	0.85	0.84
オキサジクロメフォン	0.68	0.15	0.07	0.02	0.01
カフェンストロール	0.86	0.51	0.29	0.06	0.02
カフェンストロール脱カルバモイル体	1.06	0.91	0.94	0.92	0.82
シクロスルファミロン	0.92	0.68	0.54	0.81	0.24
メコプロップ	1.08	0.94	0.89	0.93	0.79

表 8. 京都府内河川の実態調査結果

(µg/L)

	指針値	田原川 蛭橋	山田川 木津川 流入前	和束川 菜切橋	西川 桂川 流入前	犬飼川 並河橋
イミダクロプリド	1500	—*1	—	—	0.08	0.16
カフェンストロール	70*2	0.13	—	0.09	—	—
カフェンストロール脱カルバモイル体		0.26	0.05	0.10	—	—
オキサジクロメフォン	240	—	—	—	—	0.05

* 1 定量下限値未満

* 2 カフェンストロールの濃度と、カフェンストロール脱カルバモイル体の濃度に 1.39 を乗じてカフェンストロールの濃度に換算したものと和。

濃縮率を上げることにより、さらに低濃度まで定量可能と考えられる。

6 種類の固相カートリッジの回収率を比較した結果、Aquis PLS-3 (GL Sciences)、Supel-Select HLB (SUPELCO) 及び Oasis HLB Plus (Waters) の 3 種類は、全項目で回収率が 60% 以上となった。ジフェノコナゾールはどのカートリッジでも回収率が悪かったが、Oasis HLB Plus (Waters) は比較的良好的な値を示した。Oasis HLB Plus (Waters) は、今回の前処理条件に最も適していると考えられた。

固相抽出操作の省略が可能かどうかを検討するため、LC/MS/MS への直接注入により 22 農薬各 1 ng/mL の水溶液を測定したが、ほとんどが検出されず水試料を直接測定することはできなかった。しかし、メタノールを添加すると添加量の増加とともに検出割合は改善された。試料中メタノール濃度を 50% とした場合には、7 割程度以上のピーク面積は確保でき、固相抽出における回収率と同程度のレベルであった。指針値の 10 分の 1 程度まで

を測定するのであれば、直接注入法による測定が可能と考えられる。

実態調査では、4 農薬について 0.05 µg/L 以上検出された地点があったが、指針値の 200 分の 1 以下の濃度であった。検出された農薬は、比較的出荷量*1が多い農薬であることや、都市部の河川では検出されず、上流にゴルフ場や農地の多い河川で検出されていることから、当該農薬が実際にゴルフ場で使用されていることが示唆された。今後、ゴルフ場排水口付近の監視を強めていく必要があると思われる。

引用文献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版), 77-78.
- 2) 日本水道協会. 2011. 上水試験方法 2011 年度版, I 総説編, 75, 社団法人日本水道協会, 東京

* 1 国立環境研究所 Web Kids-Plus 暴露関連情報