フリット/高速原子衝突-液体クロマトグラフィー/質量分析法 (FRIT/ FAB-LC/MS) による水中の除草剤の同時分析

大倉敏裕, 武智拓郎, 出口修一, 石丸尚志,
真木 強, 井上博雄
愛媛県立衛生研究所

Simultaneous Determination of Herbicides in Water by Using FRIT/FAB-LC/MS

TOSHIHIRO OHKURA, TAKURO TAKECHI, SYUICHI DEGUCHI, TAKASHI ISHIMARU,
TUYOSHI MAKI and HIROO INOUE

*Ehime Prefectural Institute of Public Health, 8-234, Sanban-cho, Matuyama-shi,
790, Japan*

(Received December 13, 1993)

The simultaneous determination of phenylurea and carbamate herbicides (diuron, linuron, siduron, methyldymron, chlorpropham, and sweep) in water was studied using FRIT/fast atom bombardment (FAB)-liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

These herbicides were extracted from water by the use of an octadecyl-silica solid phase extraction (SPE) cartridge, and then eluted from the SPE cartridge with acetonitrile. Ethyl-*N*-phenylcarbamate was added as an internal standard to the eluates and these herbicides were determined by the FRIT/FAB-LC/MS-selected ion monitoring (SIM) method.

By this method, these herbicides were analyzed in river water, ground water and tap water to which the standard solution was added. These recoveries were more than approximately 90% and these standard deviations were less than 10%, respectively.

Keywords — LC/MS; FAB; solid phase extraction cartridge; carbamate; phenylurea

緒 言

近年, 水道水を取り巻く環境は産業活動の高度化や生活様式の変化に伴い多様化し, 各種化学物質による水道水源の汚染が危惧されている。

その中でも農薬については, ゴルフ場や水田等の農耕地において使用されている農薬による汚染が明らかとなり, 我が国では農薬 30 種類について, 「ゴルフ場使用農薬に係る暫定水質目標」が平成 2 年及び 3 年に設定され, また, 「水質基準に関する省令」等により基準項目及び監視項目として, 15 種類の農薬について基準値及び指針値が平成 4 年に設定された。

しかし, 多くの農薬については基準値や公定法が設定されておらず, 使用実態に即した汚染状況を把握するためには, 各種農薬の簡便で精度の高い分析

方法の開発が急務と考えられる。

従来から, 農薬分析にはガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が利用され, 特に精度の高い方法としてガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法が利用されている。

一方, GC による分離が困難な農薬や熱分解されやすい農薬は, HPLC や誘導体化した後, GC/MS 法により実施されている。

今回, 分析対象として選定したフェニル尿素系除草剤及びカーバメート系除草剤は, 一般に熱分解性を有するため, 直接 GC 分析は困難である。このことから, 従来よりこれらの分析は *N*-メチル化やトリフルオロアセチル化後, GC-FTD を用いる方法²⁾や, 加水分解後, モノクロロアセチル化し, GC-ECD で分析する方法,³⁾ 誘導体化をせず, HPLC-UV により分析する方法⁴⁾等により行われている。

しかし、これらの方法は誘導体化操作が煩雑であったり、検出器である分光光度計の選択性の低さから精度の良い結果が得られ難い等の問題点がある。

そこで、誘導体化操作を行うことなく、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、また、前処理操作の簡便な固相抽出による方法を検討したので報告する。

実験方法

1 試料 河川水、地下水、水道水。

2 試薬 ジウロン；東京化成工業製，リニュロン，メチルダイムロン，シデュロン，クロルプロファム，スウェップ；和光純薬工業製農薬標準品，トリフルオロ酢酸 (TFA)，アセトニトリル，メタノール；和光純薬工業製高速液体クロマトグラフ用，フェニル尿素，1,1-ジフェニル尿素，1,3-ジフェニル尿素，エチル-N-フェニルカーバメート (Et-NPC)，グリセロール，チオグリセロール；和光純薬工業製試薬及び試薬特級。

3 装置及び器具 質量分析計；日本電子製 AX-505 WA 型，高速液体クロマトグラフ装置；Waters 社製 LC-モジュール 1・600 E 型・501 型，センシュー科学製 3100 A 型，HPLC カラム；Waters 社製 μ Bondasphere 5 μ C 8 100 Å (3.9 mm i.d.×150 mm)，固相抽出カートリッジ；Waters 社製 Sep-Pak Light C 18，ガラス繊維ろ紙；Whatman 社製 GF-C (孔径 1 μ m)。

4 分析方法 分析手順は Chart 1 に示すとおり，試料 500 ml を適宜ガラス繊維ろ紙で濾過した後，Sep-Pak Light C 18 へ 2—4 ml/min で吸引しながら通した。その後，アセトニトリルで 0.5 ml 溶出し，溶出液に内部標準物質として Et-NPC (50 mg/1 50 μ l) 2.5 μ g を添加し，LC/MS-SIM 測定に供した。

LC/MS の分析条件は Table I に示したようにカラムは逆相系の C 8 を，移動相はメタノール/水 = 75/25 を使い，流速は 0.6 ml/min とした。また，FAB マトリックスとして 5% グリセロール・14 mM TFA をポストカラム法により 100 μ l/min の流速で添加し，空圧スプリッターを介して FRIT/FAB インターフェースにより MS に導入した。この時の MS へ導入される試料の FAB マトリックス組成は約 0.7% グリセロール・2 mM TFA であり，また，MS への導入量はイオン化室の真空度から換算して約 6 μ l/min であった。

各物質のプロトン化分子 (M+H)⁺，(ジウロン m/z ；233.025，リニュロン m/z ；249.020，メチルダイムロン m/z ；269.165，シデュロン m/z ；233.165，クロルプロファム m/z ；214.064，スウェップ m/z ；219.993，Et-NPC m/z ；166.087) を SIM モニターイオンとした。また，グリセロール由来の m/z ；259.139 を lock mass に用いて電場強度を補正し，各チャンネルを 200 msec 毎に電場スイッチングにより測定した。

定量値は内部標準物質に対する相対検量線法により算出した。

結果及び考察

1 FAB マススペクトル

今回分析対象とした除草剤の構造式及び FAB マススペクトルを Fig. 1 に示した。

なお，FAB マトリックスにはグリセロールを用いて測定し，グリセロール由来のバックグラウンドピークは差し引き補正した。

各々 (M+H)⁺ の相対強度は高く，クロルプロファムを除いて基準ピークとなっている。また，相対強度は低いグリセロール付加イオン (M+93)⁺，(M+185)⁺ も現れ，良好なスペクトルが得られた。

ジウロン (M.W.；232.1575) とシデュロン (M.W.；232.0170) は分子量が接近しており，(M+H)⁺ を完全に分離するためには分解能は計算上約 1700 が必要である。

本法においても実効分解能は 1500 から 2000 までの間に設定して測定した結果，良好な分離が得られた。

Chart 1. Analytical Procedure for Herbicides

TABLE I. LC/MS Conditions

HPLC Column	μ Bondasphere 5 μ C8 100 Å 3.9 $\times$ 150 mm
Mobil Phase	CH ₃ OH/H ₂ O = 75/25
Flow Rate	0.6 ml/min
Column Temperature	25 °C
FAB Matrix Solution	5 % glycerol, 14 mM TFA (CH ₃ OH/H ₂ O = 75/25)
Matrix Soln. Flow Rate	100 μ l/min
Split Pressure	3.0 kg/cm ²
LS/MS Interface	FRIT/FAB
Bombardment Particle	Xe (6 keV)
Ion Chamber Temperature	45 °C
Mass Resolution	1500
SIM Monitoring Ion	m/z ; 233.025, m/z ; 249.020, m/z ; 269.165, m/z ; 233.165, m/z ; 214.064, m/z ; 219.993, m/z ; 166.087
Switching Mode	Electric Field
Switching Rate	200 ms
Lock Mass	m/z ; 259.139 (glycerol)
Ion Multi. Voltage	1.8 kV

Fig. 1. FAB Mass Spectra of Phenylurea and Carbamate Herbicides

2 内部標準物質の検討

SIM 測定における内部標準物質としてフェニル尿素, その誘導体である 1,1-ジフェニル尿素, 1,3-ジフェニル尿素, そして, カーバメートの誘導体である Et-NPC について検討した。

Fig. 2 に各物質の構造式及び FAB マススペクトルを示した。

なお, FAB マトリックスにはグリセロールを用いて測定し, グリセロール由来のバックグラウンドピークは差し引き補正した。

各物質とも $(M+H)^+$ が基準ピークとなっているが, フェニル尿素は $(M+H)^+$ (m/z ; 137.071) の強度が弱く, また, SIM クロマトピークもブロードで適さなかった。

1,3-ジフェニル尿素及び 1,1-ジフェニル尿素では, $(M+H)^+$ (m/z ; 213.103) の同位体イオン (m/z ; 214.106) とクロルプロファムの $(M+H)^+$ (m/z ; 214.064) が本法の分解能では分離できないため, SIM クロマトグラム上に妨害ピークとして現れ, 定量精度が損なわれた。

一方, Et-NPC においては妨害ピークは認められなかった。また, SIM クロマトグラムもシャープなピークが得られたので, 内部標準物質には Et-NPC を用いることとし, その濃度を 5 mg/l とした。

3 FAB マトリックス組成の検討

FAB マトリックスにはグリセロールが一般的に用いられ, 他のマトリックス剤と混和し極性を高めることにより, $(M+H)^+$ の増強を図っている。⁵⁾

本法においては, LC が水・メタノールを移動相と

する逆相系であるため, LC/MS における FAB マトリックスは, ある程度の水溶性が必要である。マトリックス剤の中でも, 水溶性であるチオグリセロールはペプチドに対して $(M+H)^+$ 増強効果が報告されており, 今回, 測定対象としたフェニル尿素系除草剤及びカーバメート系除草剤は, ペプチド結合に類似した構造を有していることから, チオグリセロールの混和による効果が期待される。

一方, FAB におけるイオンの生成は, 液相におけるイオンの生成過程に準じて進むものと考えられており, プロトン供与体, いわゆるブレンステッド酸を添加することにより $(M+H)^+$ が増強されることから, 無機酸, 有機酸が使用されている。

そこで, 本法においてもグリセロール溶液に TFA 及び, チオグリセロールを添加しその影響を検討した。

HPLC 及び MS の測定は Table I に示した条件により, また, 各物質の濃度についてはジウロン, リニュロン, メチルダイムロン, シデュロン, クロルプロファム及びスウェップは 2 mg/l, Et-NPC は 5 mg/l として測定した。

3-1 TFA による影響 5%グリセロールへ TFA を添加したマトリックス溶液 (メタノール/水=75/25) を用いた場合の, LC/MS-SIM におけるピーク面積の変化 ($n=8$) を Fig. 3 に示した。

左のグラフの縦軸は, 5%グリセロールのみの場合のピーク面積に対する相対値 (%) を, また, 右のグラフの縦軸は, その際の変動係数 (%) を示した。

Fig. 2. FAB Mass Spectra of Internal Standard

Fig. 3. Effects of TFA in FAB Matrix Solution on LC/MS Response

—■— diuron, ---▲--- linuron, —△— methyldymron, —●— siduron, ---△--- chlorpropham, ---●--- swep, —□— Et-NPC.

Concentration of herbicides: 2.0 mg/l, Concentration of Et-NPC (I.S.): 5.0 mg/l, $n=8$.

Fig. 4. Effects of Thioglycerol in FAB Matrix Solution on LC/MS Response

—■— diuron, ---▲--- linuron, —△— methyldymron, —●— siduron, ---△--- chlorpropham, ---●--- swep, —□— Et-NPC.

Concentration of herbicides: 2.0 mg/l, Concentration of Et-NPC (I.S.): 5.0 mg/l, $n=8$.

ジウロン、リニュロン、メチルダイムロン、シデュロン及びクロルプロファムは、TFAを添加することによりピーク面積は増加したが、Et-NPC、スウェップは減少した。

また、変動係数は各物質ともTFAの添加に伴う大きな上昇はなく、28 mMまで5%以内と良好な結果であった。

3-2 チオグリセロールによる影響 グリセロール溶液へ0.5%から2.0%までの濃度にチオグリセロールを添加したマトリックス溶液を用いた場合のピーク面積の変化をFig. 4に示した。Fig. 3と同様に左のグラフは相対ピーク面積値(%)を、右のグラフは変動係数(%)について示した。

Et-NPCを除き、チオグリセロールの添加濃度が

1.0%までピーク面積は増加する傾向が見られたが、変動係数は、特にクロルプロファムにおいて大きく上昇し、精度の低下が見られた。

これは、チオグリセロールによるバックグラウンドレベルの上昇が原因と考えられる。

さらに、グリセロール、TFA、チオグリセロールの3種を混合したマトリックス溶液についても検討した。その結果、感度の面では相加的あるいは相乗的な効果は認められず、また、変動係数はチオグリセロール添加による上昇が認められ、精度の低下が見られた。

そこで、マトリックス溶液には5%グリセロール・14mMTFA（メタノール/水=75/25）を用いることとした。

4 LC/MS-SIM クロマトグラム

本法によるSIMクロマトグラムをFig.5に示した。

クロルプロファム (m/z ; 214.064)、スウェップ (m/z ; 219.993) のクロマトグラムにリニュロンのフラグメントイオンによるピークが現れたが、ピークの重なりは認められなかった。その他の物質も保持時間は接近しているが、MSの選択性によりピークの重なりは認められず良好な結果が得られた。

5 検量線

縦軸に内部標準物質 (Et-NPC) 5.0 mg/l に対するピーク面積比、横軸に各物質の濃度をプロットした。

各物質とも 0.25—5.0 mg/l の間で直線性を示し、一次回帰式は、ジウロン $Y=0.08615X-0.002112$ 、リニュロン $Y=0.07140X-0.003274$ 、シデュロン $Y=0.6872X+0.02829$ 、メチルダイム

Fig. 5. LC/MS-SIM Chromatograms of Herbicides

Concentration of herbicides: 2.0 mg/l, concentration of ethyl-*N*-phenylcarbamate (I.S.): 5.0 mg/l.

TABLE II. Detection Limits of Herbicides

Herbicide	Detection limits ($\mu\text{g/l}$, S/N=3)	
	LC/MS injection soln.	Sample soln.
Diuron	100	0.1
Linuron	50	0.05
Methylodymron	25	0.025
Siduron	10	0.01
Chlorpropham	100	0.1
Swep	150	0.15

ロン $Y=0.3190X+0.008045$ 、クロルプロファム $Y=0.1206X-0.002042$ 、スウェップ $Y=0.03055X-0.001779$ であった。

また、相関係数は各々0.999と良好な結果が得られた。

各物質の検出限界値は Table II に示すとおり S/N=3 の時 LC/MS 供試溶液として 10—150 $\mu\text{g/l}$ であり、試料からの抽出・濃縮操作と組み合わせることにより微量分析が期待できる。

本法においては、濃縮倍率は 1000 倍であるので、試料中での検出限界値は、0.01—0.15 $\mu\text{g/l}$ となる。

これは、LC への注入量が 20 μl であり、また、スプリット比が約 1/100 であるので MS への導入量は絶対量で 2—30 pg となる。

6 固相抽出条件の検討

試料から各除草剤を抽出する方法として、操作が簡便な固相抽出法について検討した。

固相抽出カートリッジは Sep-Pak Light C 18 を用い、溶出溶媒にはアセトニトリルを用いた。

Sep-Pak Light C 18 は固相重量が 130 mg と標準

Fig. 6. Elution Curves of Herbicide from SPE Cartridge

--□-- diuron, --△-- linuron, --□-- methylodymron, --△-- siduron, --○-- chlorpropham, --○-- swep.
Eluent: acetonitrile.

に比較し約 1/3 であるため、少量の溶媒量で溶出が可能であり、試料からの濃縮効率の向上が図られる。

各除草剤の濃度が 25 $\mu\text{g/l}$ となるよう蒸留水で調製した試料 200 ml を固相抽出カートリッジに通し、アセトニトリルでの溶出状況を検討した。

その結果、Fig. 6 に示すようにすべての物質とも、保持された量の 99–100% が 0.5 ml で溶出し、良好な結果が得られた。

この場合、試料からの濃縮倍率は、試料 500 ml に対して 1000 倍となるため、微量分析への適用が期待できる。

7 添加回収実験

実試料においては種々の物質が共存しており、そのため固相抽出における吸着、溶出、LC における分離及び FAB イオン化に影響を及ぼす可能性が考えられるが、種々の物質に対する系統的な実験は困難であるから、実試料への添加回収実験を行った。

河川水、地下水、水道水へ標準品を添加し、Chart 1 に示した方法で分析した結果を Table III に示した。

試料 500 ml に標準品 6 種を各々 0.5 μg 添加した場合、92.3–101.2% の回収率を示し、その標準偏差は 0.30–9.33% と良好な結果であった。

また、濁質（土壌粒子、浮遊物）のある河川水（濁

度 5 度）を用い、各除草剤を添加した後、ガラス繊維ろ紙（孔径 1 μm ）で濾過し、同様の操作により回収実験を行った。その結果、回収率は 89.7–98.1% と良好であった。

さらに、河川水 500 ml に標準品 6 種を 10 μg 添加した場合も 97.0–103.9% の回収率を示し、良好な結果であった。

試料中での各物質の検出限界値 ($S/N=3$) は、Table II に示すとおり、0.01–0.15 $\mu\text{g/l}$ であった。

ま と め

河川水、地下水、水道水の水試料中の除草剤 6 種の分析法を検討した結果、固相抽出カートリッジ・Sep-Pak Light C 18 を用い前処理後、LC/MS 法により、次のとおり迅速かつ高精度な分析が可能であることが明らかとなった。

1. 6 種除草剤を逆相カラムにより分離し、($M+H$)⁺ をモニターイオンとした FRIT/FAB-LC/MS-SIM 測定による分析が可能となった。

2. 内部標準物質として Et-NPC を用い相対検量線法により定量したところ、各物質とも 0.25–5.0 mg/l の間で直線性を示し、良好な結果が得られた。

3. FAB マトリックスに 5% グリセロール・14 mM TFA (メタノール/水=75/25) を用い、ポストカ

TABLE III. Recoveries of Added Herbicides from Water Samples

Herbicide	Added	Recovery (%)		
		River water	Ground water	Tap water
Diuron	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	99.7 $\pm$ 3.83	95.2 $\pm$ 2.29	100.5 $\pm$ 0.30
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	94.5 $\pm$ 4.38		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	97.0 $\pm$ 3.83		
Linuron	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	96.0 $\pm$ 3.32	95.8 $\pm$ 3.94	100.3 $\pm$ 4.21
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	95.2 $\pm$ 7.22		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	102.3 $\pm$ 3.82		
Methyldymron	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	92.9 $\pm$ 3.60	92.3 $\pm$ 2.65	99.3 $\pm$ 9.33
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	89.7 $\pm$ 8.58		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	102.3 $\pm$ 6.00		
Siduron	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	101.2 $\pm$ 3.70	98.7 $\pm$ 2.21	97.9 $\pm$ 6.55
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	94.9 $\pm$ 5.19		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	103.9 $\pm$ 4.13		
Chlorpropham	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	94.7 $\pm$ 1.82	95.5 $\pm$ 3.29	94.7 $\pm$ 5.30
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	93.8 $\pm$ 5.20		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	101.3 $\pm$ 3.00		
Swep	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	93.0 $\pm$ 2.70	92.9 $\pm$ 2.29	100.5 $\pm$ 3.81
	0.5 $\mu\text{g}/500\text{ ml}^a$	98.1 $\pm$ 4.70		
	10 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$	101.1 $\pm$ 4.08		

Mean $\pm$ S. D., $n=5$.

^{a)} With filtration.

ラム法により添加することで、感度の上昇が図れた。

4. 各物質の検出限界値 ($S/N=3$) は LC/MS 供試溶液として 10–150 $\mu\text{g/l}$, 試料中で 0.01–0.15 $\mu\text{g/l}$ であった。

5. 固相抽出カートリッジに Sep-Pak Light C 18 を用いることにより, 効率よく簡便に各除草剤を試

料から抽出することが可能となった。

6. 河川水, 地下水, 水道水を試料として添加回収実験を行った結果, 回収率はいずれも約 90% 以上を示し, また, その標準偏差も 10% 以下を示し, 良好な結果が得られた。

引用文献

- 1) K. Grob, Jr., *J. Chromatogr.*, **208**, 217 (1981).
- 2) J.F. Lawrence, G.W. Laver, *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 1106 (1975).
- 3) C.F. Aten, J.B. Bourke, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1428 (1977); 後藤真康, 加藤誠哉, “残留農薬分析法,” ソフトサイエンス社, 東京, 1980, pp.240–251.
- 4) R.G. Luchtefeeld, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 740 (1987).
- 5) K.L. Busch, S.E. Unger, A. Vinczw, R.G. Cooks, T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1507 (1982); A. Malorni, G. Malino, A. Milone, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**, 477 (1986); 土屋正彦, 大橋 守, 上野民夫 (編), “質量分析法の新展開,” 東京化学同人, 東京, 1988, pp.24–38.