

## 8) 多成分同時分析法におけるチオファネートメチル, チオファネートの回収率向上の検討

中堀 靖範 大津 一哲

### 要旨

チオファネートメチル及びチオファネートは、固相抽出カートリッジカラムを使用した多成分同時分析法で分解が進行しやすく、回収率が低下しやすいため、その原因と改善策を検討した。その結果、溶出液の濃縮中及び固相抽出カートリッジカラムへの通水中に分解が進行していることがわかった。改善策として、溶出液を濃縮せずに定容すること、試料にエチレンジアミン四酢酸ナトリウム及びL(+)-アスコルビン酸ナトリウムを添加することで十分な回収率が得られることがわかり、この手法により多成分同時分析法をチオファネートメチル及びチオファネートの定量に適用できることがわかった。

キーワード：LC/MS/MS，農薬，固相抽出カートリッジカラム，チオファネートメチル，チオファネート

### はじめに

ベンゾイミダゾール系農薬のチオファネートメチル(以下「TM」という。)及びチオファネート(以下「TE」という。)は殺菌剤として広く用いられ、それぞれカルベンダジム(以下「MBC」という。), エチル 2-ベンゾイミダゾールカルバマート(以下「EBC」という。)へ

分解しやすい性質を持つ<sup>1)</sup>。そのため「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「指針」という。)の多成分同時分析法を用いてTM及びTEを分析する場合、使用する固相抽出カートリッジカラム(以下「固相カラム」という。)の種類によっては分解が進行しやすい<sup>2)</sup>。

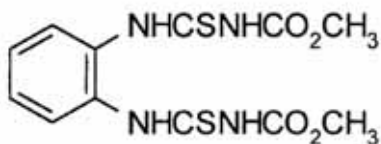


図1 チオファネートメチル(TM)

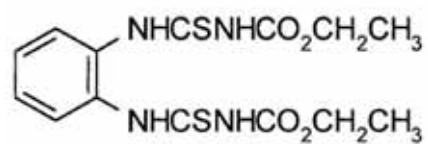


図2 チオファネート(TE)

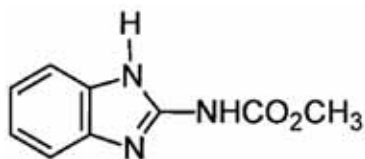


図3 カルベンダジム(MBC)

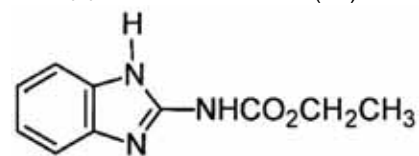


図4 エチル 2-ベンゾイミダゾールカルバマート(EBC)

このような分解が起きることによる問題点として、以下 ~ のような事項があげられる。

指針のTMの個別分析法では分解生成物のMBCの濃度をTMの濃度に換算し、別途定量したTMの濃度に加算して総量を求めることとしている。しかし、TM及びTEはMBC及びEBCを経由しない分解も起きる<sup>3)</sup>ことが知られており、分解生成物を換算したとしても、TM及びTEは分解が起きるほど回収率が低下しやすくなる。

ペノミルのように速やかにMBCへと加水分解する農薬があるため、検出されたMBC全てをTMの濃度に換算すると実際とは異なる濃度となる恐れがある。

EBCの標準品は市販されていないため、TEの分解生成物のEBCが検出されても正確には定量できず、TEの濃度に換算することができない。

このような問題から、指針におけるTMの分析は液-液抽出の個別分析法が指定されているが、本研究ではTM及びTEを含む様々な農薬を多成分同時分析法で定量分析するため、TM及びTE自体の回収率を向上させる手法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

### 実験方法

指針の「排水に係る標準分析方法（多成分同時分析法）」に準じて分析を実施した。ただし、本報告では固相カラムの溶出液にアセトニトリルのみを用い、試験液の濃度は5ppbとした。なお、固相カラムは、A社製の製品a、b（逆相系コンビネーションポリマー、充填量60、200、500mg）及びB社製の製品c（逆相系コンビネーションポリマー、充填量60、150、500mg）を使用した。

表1 LC分析条件

装置	島津製作所製Nexera
移動相	A液:0.1%ギ酸 B液:アセトニトリル
グラディエント条件	A:B=75:25(0min) 52:48(1.5~4min) 40:60(4~7min) 5:95(7~9min)
流速	0.3m /min
試料注入量	2μ
カラム	GL-Science製Inertsil ODS-3(2.1×100mm;2μm)

表2 MS/MS分析条件

装置	島津製作所製LCMS-8030
イオン化法	ESI Positive
ネブライザーガス流量	3.0 /min
ドラインガス流量	15.0 /min
インターフェイス電圧	3.5kV
検出器電圧	1.8kV
定量イオン	MBC(192.0 160.2), EBC(206.0 160.1) TM(342.8 151.2), TE(371.0 151.0)
確認イオン	MBC(192.0 132.2), EBC(206.0 134.1) TM(342.8 93.2), TE(371.0 86.0)

### 結果及び考察

#### 1 濃縮及び定容方法

固相カラムからの溶出液を濃縮する際のTM及びTEの分解の程度を調べるため、TMを50ppb含むアセトニトリル溶液5mlを、窒素吹き付け装置又は減圧濃縮装置により0.5mlまで加熱濃縮し、再度5mlまで定容した際のTM及びMBCの濃度変化を調べた。図5に結果を示したとおり、特に窒素吹き付け装置を用いた場合に分解が進行しやすく、濃縮時間が長くなるほど分解しやすいことがわかった。また、減圧濃縮器を用いた場合も、わずかに分解が進行し、緩やかな窒素吹き付けにより乾固させると、さらに分解することがわかった。そのため、TM及びTEを含む農薬分析では、目的物質の予測濃度や分析装置の検出下限値を勘案したうえで、5~10mlで定容できるように固相カラムから溶出し、濃縮せずにLC/MS/MSで測定を行うことが適当と考えられる。なお、やむを得ず濃縮が必要である場合は、減圧濃縮装置を用い、窒素吹き付けによる乾固は行わない方が良く考えられる。

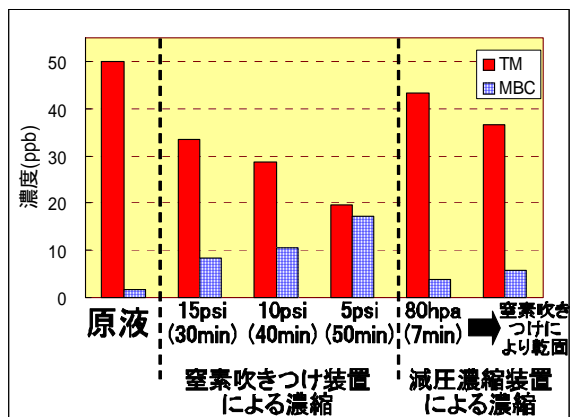


図5 濃縮によるTMの分解量

#### 2 固相カラム通水中の分解メカニズム

固相カラム通水中のTM及びTEの分解抑制のため、使用する固相カラムの充填量は少ない方が良くとされている<sup>2)</sup>。今回検討した固相カラムa、b、cについてTM及びTEの添加回収試験を行ったところ、図6、7に示すとおり、充填量が多くなるほど回収率が低下する文献と同様の結果が得られた。しかしながら、逆相系の固相カラムに保持されにくいMBCやアシュラム、オキシ銅のような農薬種は固相カラムの充填量が少ないほど回収率が低くなりやすく、これらの農薬を含む多成分同時分析においては、最低でも150~200mgの充填量を有する固相カラムの使用が必要であり、充填量の多い固相カラムでTM及びTEの分解をいかに抑制す

るかが課題となる。

ここで、TM 及び TE の固相カラム通水中の分解メカニズムを解明するため、同じ充填量の固相カラムに TM の負荷量を変えて回収率を調べた。その結果、図 8 に示すとおり負荷量が多いほど回収率が向上した。固相カラムを用いた一般的な農薬分析においては負荷量が多いほど固相カラムに保持されにくくなり、回収率が低下する傾向にあるが、それとは逆の傾向と言える。

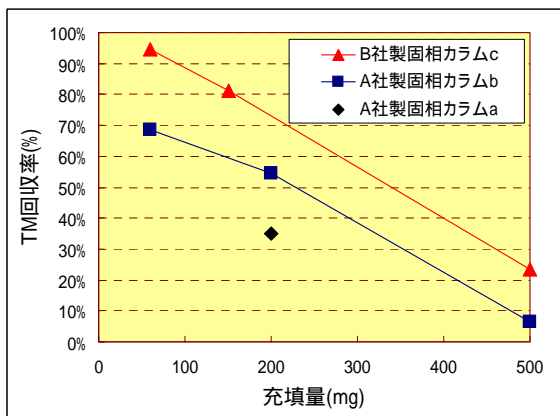


図 6 固相カラムの充填量と TM の回収率

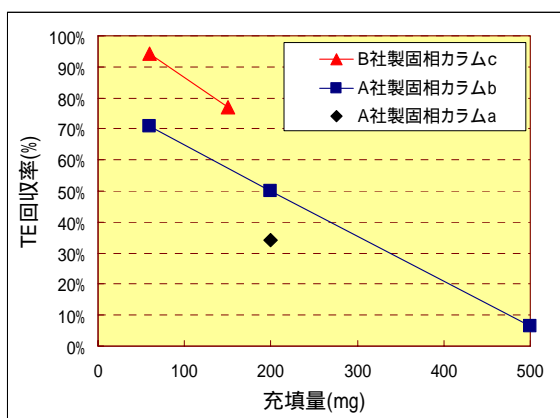


図 7 固相カラムの充填量と TE の回収率

これは、図 9 に示すとおり、TM の負荷量が増加しても損失量があまり増加しないため、見かけ上、負荷量を増やすほど回収率が増加していることがわかる。このことから、TM 及び TE の分解のほとんどは、最初にかかる一定量で起きていることが示唆された。

### 3 固相カラムの酸処理による分解抑制の検討

一般的に固相カラムには金属不純物が微量に含まれることから、この金属不純物が TM 及び TE の分解を引き起こしているのではないかと推測した。この推測に基づき、固相カラムの酸処理による不純物除去を検討した。方法としては、固相カラムをアセトニトリル(10ml)及びメタノール(10ml)でコンディショニングした後に、希釈した酸(25ml)を流した。その後、メタノール、水で十分に置換した後、通常の試験操作を行った。酸処理の検討には、硝酸(1+10)、塩酸(1+10)、硫酸(1+10)を用い、その結果を図 10 に示した。いずれの固相カラムを用いた場合も、ほぼ全てが酸処理により回収率が改善されており、特に塩酸(1+10)を用いることで回収率を大きく改善できた。しかしながら、図 11、12 に示すとおり、塩酸(1+10)処理を行った場合でも、

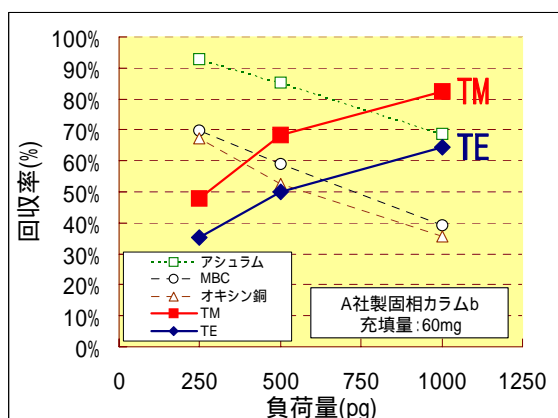


図 8 農薬の負荷量と回収率の変化

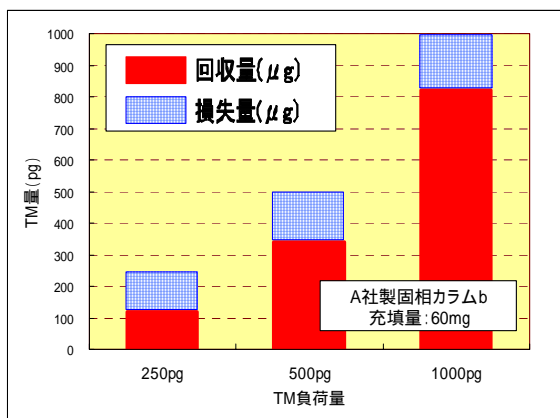


図 9 TM の負荷量と損失量

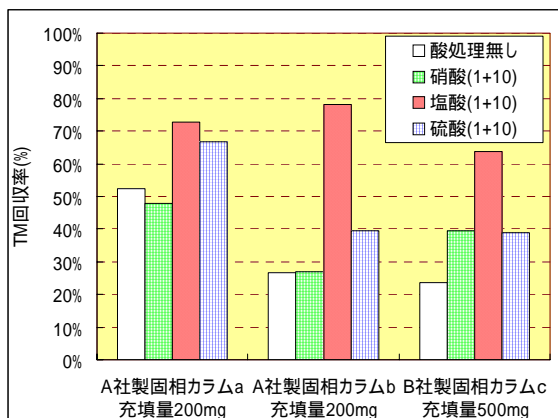


図 10 酸処理による TM 回収率の改善効果

充填量 200mg 以上の固相カラムでは十分には改善されないことがわかった。

この固相カラムの酸処理の検討において、溶出された金属不純物を特定するため、酸処理液の重金属分析を行ったところ、Al, Zn, Fe, Ni 等の金属が微量に検出されたが、含有量が極めて少なく製品やロットによりバラツキがあったため、分解の原因物質の特定には

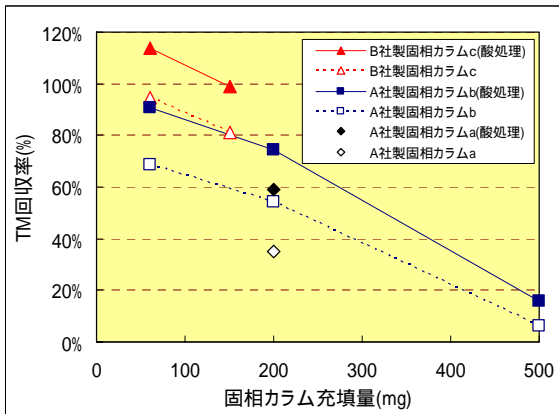


図 11 酸処理による TM 回収率改善効果

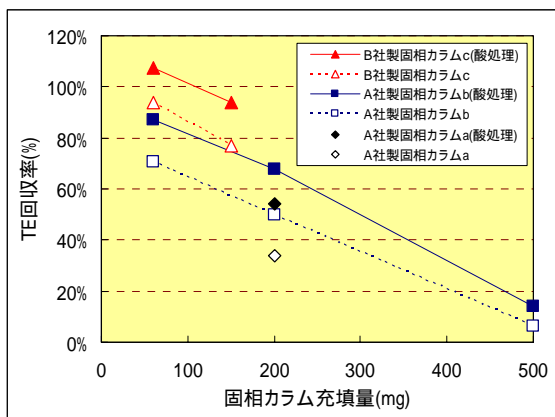


図 12 酸処理による TE 回収率改善効果

至らなかった。しかし、検討した 3 種の酸全てで回収率の改善効果が確認されたことから、TM 及び TE を分解するような金属不純物が固相カラムに含まれていることが推測された。

#### 4 マスキング剤、還元剤添加による分解抑制の検討

固相カラムの酸処理による金属不純物除去では改善効果が少なかったため、マスキング剤を添加し、金属不純物による分解を抑制する手法について検討した。水質管理目標設定項目で示される一斉分析法<sup>4)</sup>では、試料にエチレンジアミン四酢酸ナトリウム（以下「EDTA-2Na」という。）を添加する方法が用いられている。これを参考に、EDTA-2Na添加量によるTM及びTEの回収率の変化を調べた。その結果、図 13 に示すとおり、EDTA-2Naの添加量の増加に伴い、TM及びTEの回収率はある程度増加したものの、50%程度で頭打ちし、十分には改善されないことがわかった。

一方、指針の TM 個別分析法では、液-液抽出時の TM 分解抑制のため L(+)-アスコルビン酸ナトリウム（以下「SL-A」という。）を添加しており、また、試

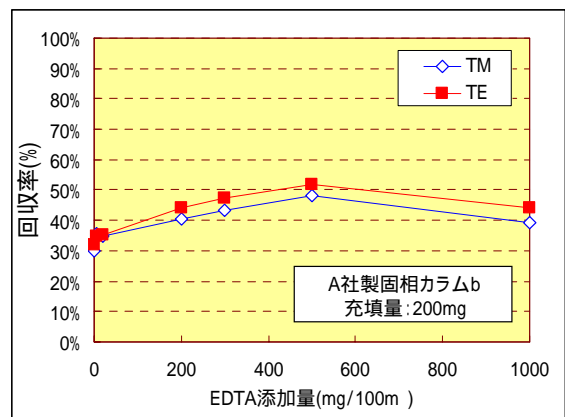


図 13 EDTA-2Na 添加量と TM 及び TE の回収率

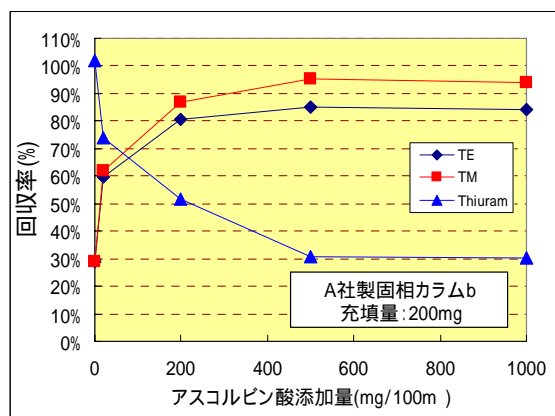


図 14 アスコルビン酸添加量と TM 及び TE, チウラム回収率

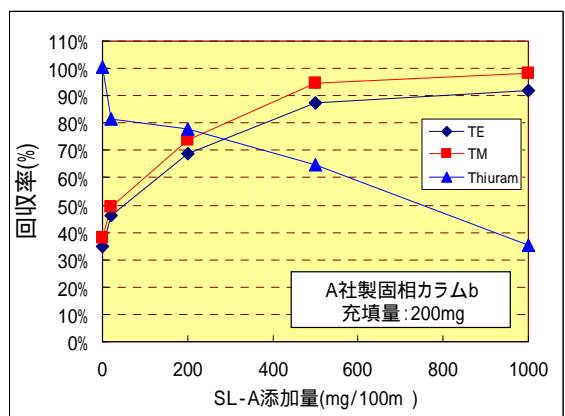


図 15 SL-A 添加量と TM 及び TE, チウラムの回収率

料や溶出液にアスコルビン酸を添加することで、TMの分解抑制や分解したTMを再生成する手法も報告されている<sup>2)</sup>。ここで添加しているSL-Aやアスコルビン酸は、TMの酸化的な分解を防ぐ還元剤としての役割を果たしていると考えられる。これに関連して、前述の固相カラムの酸処理において、硫酸、硝酸よりも塩酸処理の効果が大きかったことも、塩酸の還元作用が影響している可能性がある。このことから、試料へのSL-A、アスコルビン酸のそれぞれの添加量によるTM及びTEの回収率の変化を調べた。その結果、図14、15に示すとおり、どちらも添加量の増加に伴いTM及びTEの回収率が向上し、充填量150~200mgの固相カラムでも十分な回収率を得ることができた。

しかし、この方法を用いた場合、同図に示したとおり還元剤存在下で分解されるチウラムのような農薬は、添加量が増えるほど回収率が低下してしまう。この分解を防止するため、添加する還元剤は分解作用がより小さいSL-Aが適していると言える。また、SL-A添加によるチウラムの分解抑制策を検討した結果、図16~18に示すとおり、SL-Aに加えてEDTA-2Naを添加することで、チウラムの分解を抑制したまま、TM及びTEの回収率を向上させることができた。EDTA-2Na及びSL-Aの添加量は図14、15のデータより、試料100mlあたり0.5gずつの添加が適量であると推測されるが、図16~18に示すとおり、TM及びTEの分解量やSL-A添加によるチウラムの分解量は使用する固相カラムの種類により増減するため、添加量の最適化をあらかじめ試験しておくことが望ましいと考えられる。

以上を踏まえ、多成分同時分析法を図19に示すフローの通りに変更することで、TM及びTEの定量に適用できることがわかった。

### まとめ

固相カラムを使用した多成分同時分析法で起きるTM及びTEの分解や回収率の低下の原因と改善策を検討した。その結果、TM及びTEの分解は主に溶出液の濃縮中と固相カラム通水中に起きていることがわかった。改善策として、溶出液を濃縮せずに定容すること、試料にEDTA-2NaとSL-Aを添加することで十分な回収率を得られることがわかり、この手法により多成分同時分析法をTM及びTEの定量に適用できることがわかった。

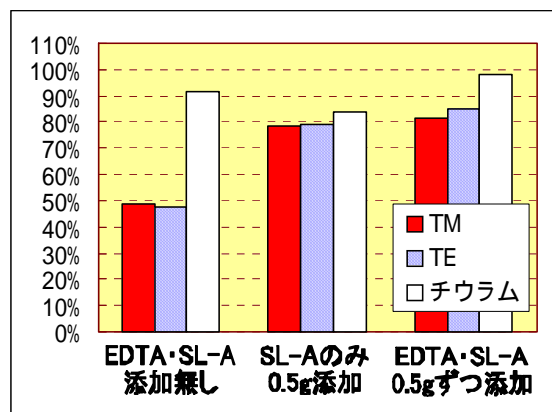


図16 EDTA及びSL-A添加によるTM及びTE、チウラム回収率の変化 (A社製固相カラム a 充填量 200mg)

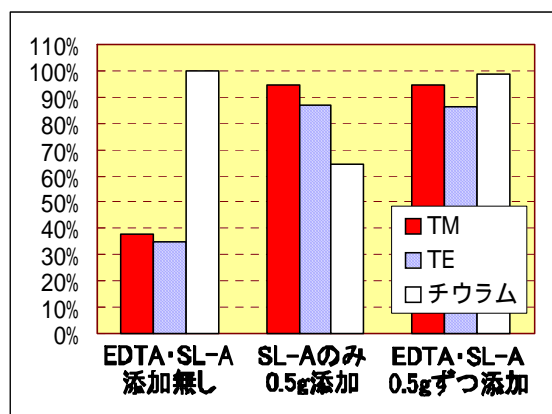


図17 EDTA及びSL-A添加によるTM及びTE、チウラム回収率の変化 (A社製固相カラム b 充填量 200mg)

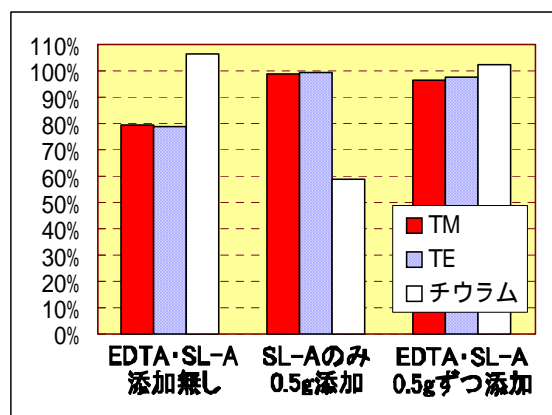


図18 EDTA及びSL-A添加によるTM及びTE、チウラム回収率の変化 (B社製固相カラム c 充填量 150mg)

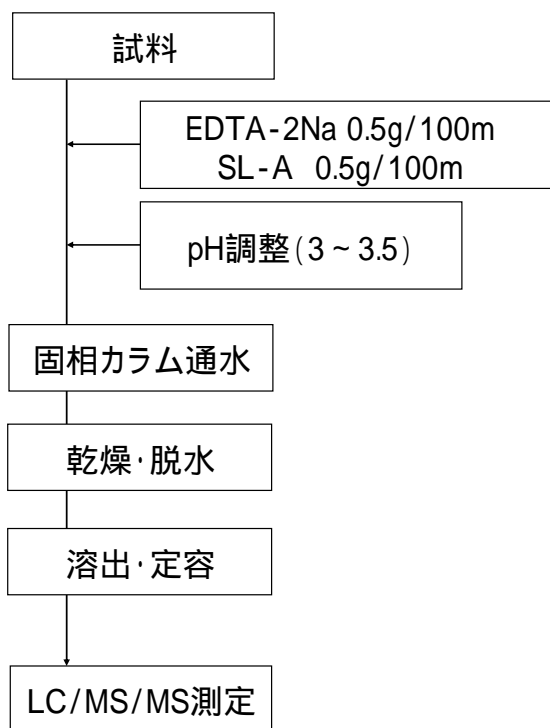


図 19 TM 及び TE を含む多成分同時分析フロー

#### 文献

- 1) M. Nakamura, Y. Furumi, F. Watanabe, K. Mizukoshi, M. Taniguchi, S. Nemoto : *Food Hyg. Saf. Sci.*, **52**, 148-155 (2010).
- 2) 化学物質と環境 平成 18 年度化学物質実態調査報告書, 795-809 (2006) .
- 3) Y. Soeda, S. Kosaka , T. Noguchi : *Agric. Biol. Chem.* **36**, 931 (1972).
- 4) 厚生労働省健康局水道課長通知, 健水発第 1010001 号, 平成 15 年 10 月 10 日付