

LC/MS を用いたチウラムの測定方法の検討

Study of analysis of Thiuram by LC/MS

松井 利夫

Toshio MATSUI

LC/MSによる環境水中のチウラムの簡易な測定方法の確立を目的とした。イオン化法(ESI法)による感度を検討し、コーン電圧などの最適条件、機器検出感度、変動係数などを求めた。その結果、イオン化はESI(正イオンモード)での最適コーン電圧は15V(アセトニトリル:水=50:50)であった。蒸留水または河川水を液液抽出した試料、もしくは固相抽出後アセトニトリル溶出した試料を本法で分析した結果、液液抽出の回収率は95%、固相抽出の回収率は85%であり、装置検出下限値は $0.2 \mu\text{g/L}$ で、400倍濃縮した場合の検出下限値は、 $0.0005 \mu\text{g/L}$ であった。河川水に応用したところ、全て不検出($0.0028 \mu\text{g/L}$ 以下)であった。

1 はじめに

チウラムはジチオカルバメート系の殺菌剤で、チオベンカルブやシマジンチなどと同様に水質汚濁に係わる環境基準項目(環境基準 チウラム: 0.006mg/L)に含まれ、忌避剤、ゴムの加硫促進剤としても用いられる。

近年、LC/MS(液体クロマトグラフィー/質量分析計)による分析¹⁾²⁾³⁾は、難揮発性、高極性、熱不安定化合物を分析対象とし、有機金属、フェノキシ酢酸やカルバメート農薬などの極性化合物の分析に適していることがわかった。

従来のチウラムなどの農薬の分析⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾にはHPLC(UV)などが主に用いられてきたが、排水・廃水などを液液もしくは固相抽出した試験液には未知の不純物を含み、着色していることから、分析に支障をきたしたが、最近、LC/MSを用いたチウラムを含む農薬分析⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾などの分析例が多数報告されるようになり、汎用性が高く、簡便で、高感度微量分析法として、環境科学分野での応用範囲が広がっている。

しかしながら、機種による測定条件の違いやGC/MSと異なり、最適測定条件の設定も容易でないこと、さらには、データベース化も進んでいないといった短所も知られている。

そこで、化学物質の分析条件をどのようにして決定したらよいかを考えるため、代表的な農薬であるチウラムを対象物質として、LC/MSの最適分析条件の検討を行った。

2 実験方法

2.1 対象化学物質と溶媒等の試薬

チウラム(Thiuram: Tetramethyl thioperoxy dicarbonamide, Tetramethylthiuram disulfide, $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$, MW=240.4)は和光純薬工業社製を、アセトニトリル、アセトン、ジクロロメタン、ヘキサン、酢酸エチルなどの有機溶媒は、関東化学社製(LC/MS用もしくは同等品)を用いた。また、固相抽出は、GLサイエンスPLS-3を使用した。

2.2 使用機器とその操作条件

LC/MSの本体(測定機器)は、WATERSのHPLC本体(2695) separation module alliance、検出器、2996 Photodiode array detector、micromassZQ2000(質量検出器)である。

LCでの分離条件の検討、並びに、MSにおけるイオン化(ESI法またはAPCI法)を用い、コーン電圧などの最適条件を求め、カラム(ポリメタクリル系中極性ゲル)を用い、SIMで定量した。表1にLCおよびMSの測定条件を示す。

表1 LC/MSによるチウラムの測定条件

HPLC	カラム	GOLF-Pak HR($3 \mu\text{m}$) 2.0 × 150mm (Waters)
	移動相	H_2O : アセトニトリル = 50 : 50
	流速	0.2-0.5ml/min
	注入量	10-20 μl
	MS	
MS	イオン化法	ESI(Positive)
	モニターイオン(m/z)	= 241
	コーン電圧	15 volt
	Capillary voltage	3.5kV
	Desolvation gas	N_2 350 L/h
	Cone gas	50 L/h
	Desolvation gas temp	350 $^{\circ}\text{C}$
	Ion source temp	100 $^{\circ}\text{C}$

2. 3 前処理操作

(1) 液液抽出法

水試料(100m l)を有機溶媒にジクロロメタン[もしくはヘキサン-酢酸エチル混合液(1:1)]を用いて、抽出し、脱水後、濃縮(1m l)とした。(図1)

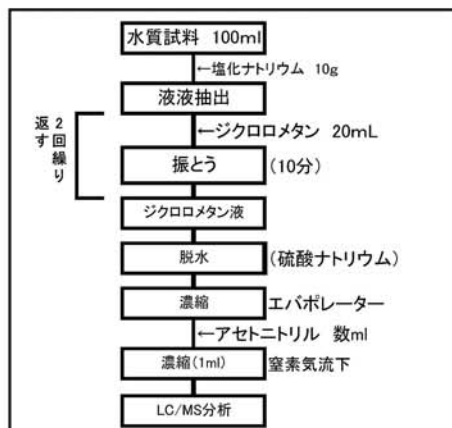


図1 液・液抽出操作

(2) 固相抽出法

固相抽出条件は、水試料(400m l)にEDTA-2Naを加え、pH3.5とした後、コンディショニング済の固相に10-20ml/minで通水し、遠心分離後、窒素気流下で十分に乾燥し、アセトニトリル5mlで溶出後、濃縮(1ml)した。(図2)

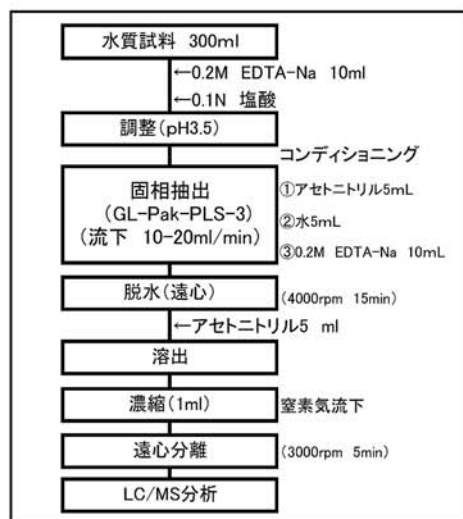


図2 固相抽出操作

2. 4 測定機器感度および回収率、変動係数

検量線を作成し、低濃度域の標準液を7回測定し、変動係数を求め、IDLおよびMDLを算出し、次に精製水に標準液を添加し、液液抽出による添加回収試験、再現性試験を行った。

2. 5 水質試料(河川水)の定量分析

水質試料として、本県内の河川・湖沼を用い、

水中のチウラムを定量分析した。

3 結果と考察

LC/MSにおけるマススペクトルを観察するには、シリンジで直接標準液をMS部(プローブ)に注入する「インフュージョン」法と、分析用カラムを接続しないで、LC本体注入部から標準液を移動相とともに流す「フローインジェクション」法がある。

本実験では、API(大気圧イオン化法)のうち、ESI(エレクトロスプレーイオン化法)およびAPCI(大気圧化学イオン化法)におけるチウラムのイオン化をみたところ、ESI(positive)のみでイオン化し、測定できたが、APCI(positive, negative)およびESI(negative)ではイオン化せず、分析できなかった。このことから、チウラムは移動相で電離しやすい化合物と考えられた。

以下に、ESI(positiveイオンモード)での分析検討結果を示す。

3. 1 マススペクトルとコーン電圧の検討

(1) マススペクトルについて

チウラム標準液(アセトニトリル中)を「フローインジェクション」法にて、移動相の組成を水-アセトニトリル系または水-メタノール系とし、流速0.2ml/minとし、コーン電圧を変可させて、感度とマススペクトルを観察した。

この結果、アセトニトリル100%では、感度が極端に低く、殆ど検出されなかった。アセトニトリル割合を下げると感度は上昇したが、マススペクトルに大きな変化は認められなかった。マススペクトルから、241.0(m/z)に強いピークが認められたので、これをモニターイオンとした。図3に最適条件におけるマススペクトルを示した。

移動相を噴霧し、その霧滴からイオン種を電氣的に引き抜く方法(ESIモード)で、プロトン付加イオンの擬分子イオン[M+1]の241.0のm/zが観察されたことから、プロトン付加しやすいことがわかった。一般に、アミノ基などの官能基を持つとプロトンが付加しやすくなり、[M+1]が生成するといわれ

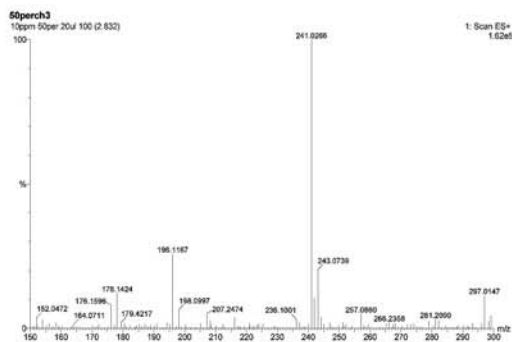


図3 チウラムのマススペクトル(ESI(+))

ているので、この場合も、チウラムの2級アミンが関係していると示唆された。

(2) コーン電圧と移動相溶媒の関係

イオン化は、コーン電圧(もしくはドリフト電圧)に強く影響される。つまり、生成イオンをMS部に引き込む電圧(イオン化電圧)が低いと引く込みが弱くなって、感度が低下し、逆に高いとイオンのフラグメンテーション(但し、ESIでは起こりにくいといわれている)が起こり、感度が低くなる。ESIでのイオン化は、噴霧された移動相の液滴を熱することで、その表面積を小さくし、イオン蒸発を促進させることが必要であるので、霧化での温度条件も重要であるが、本実験では、デフォルト値である350℃(Desolvation 温度)を採用した。

ところで、LC/MSの分析条件を検討する場合、事前にLCでの分離条件をある程度把握しておく必要がある。これまでの検討結果から、移動相の有機溶媒はメタノールもしくはアセトニトリルと水との混合溶媒とした。

ESI(positive)で、241.0 (m/z: モニターイオン)が最も強くなるような条件を水-アセトニトリル系および水-メタノール系における溶媒系で検討したところ、アセトニトリル100%では、殆ど検出されなかったが、メタノール100%ではかなりの感度が認められた。このことは、メタノールがプロトン付加しやすい溶媒であることで、説明できる。

いずれの溶媒系でも、コーン電圧が10-15Vのとき概ね最大感度となり、有機溶媒の組成比が下がるに伴い、増感効果が認められた。これらの結果を図

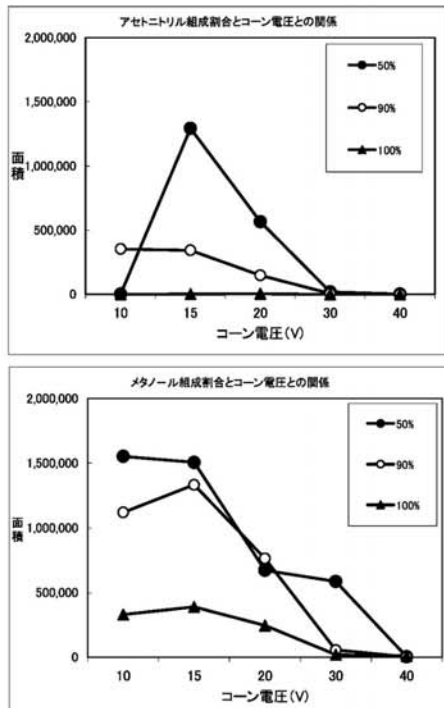


図4 溶媒とコーン電圧との関係

4に示した。分析条件は10mg/L 10ul 注入であった。

以上の結果から、LC分離での溶媒組成比をアセトニトリル:水=50:50とし、コーン電圧は15Vを最適分析条件とした。その他のMS条件について、イオン生成に必要な電圧の「キャピラリー電圧」はデフォルト値3.5 kVとし、ソースブロックを過熱することで、溶媒の蒸発を促進させる「ソース温度」はデフォルト値150℃とした。脱溶媒ガス流量と温度は、デフォルト値のN2:50、350ml/H、350℃としたが、この温度は移動相組成と流量で変化するが、流量が多いときや水が多いときは温度を高くすることが一般的であると言われている。

3. 2 LC分離条件の検討

移動相(アセトニトリル系、メタノール系)の違いとチウラムの溶出時間との関係を調べた。

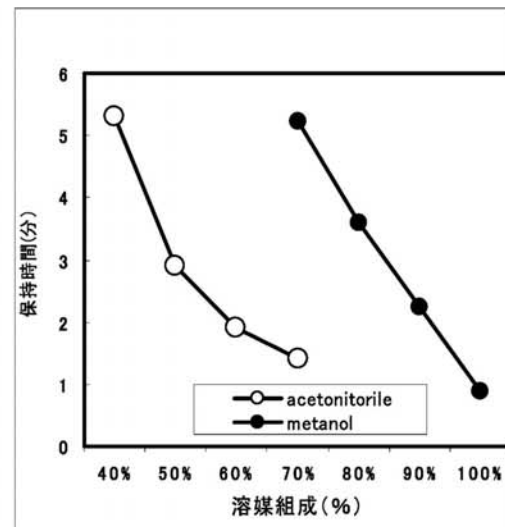


図5 溶媒組成と保持時間との関係

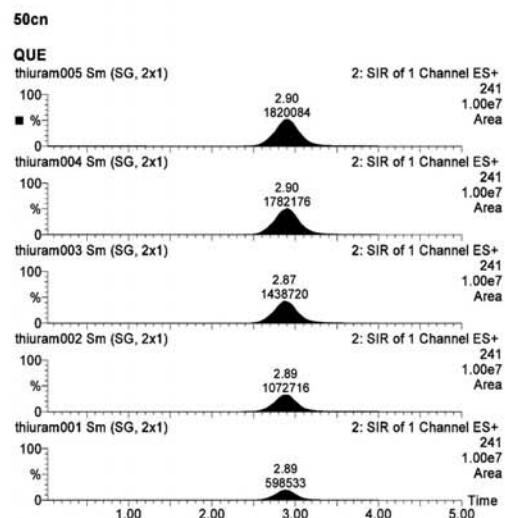


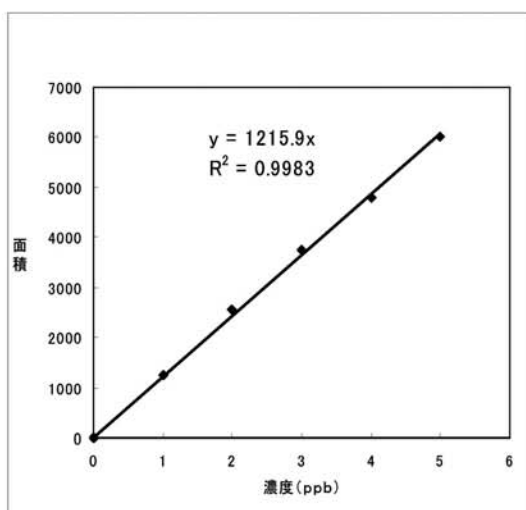
図6 標準系列(10-50 μg/L)のクロマトグラム

アセトニトリル：水＝50：50の混合溶媒での保持時間は、約2.9分であった。(図5)この条件での標準系列(10～50mg/L)の代表的なクロマトグラムを図6に示した。

3.3 回収率、検量線、感度、検出下限の検討

液液抽出操作で、精製水100mlに標準液を濃度0.1mg/Lになるように添加し、ジクロロメタンもしくはヘキサン-酢酸エチル混液での抽出操作後の回収率は95%、変動係数は、3.7%であった。固相抽出¹³⁾¹⁴⁾による回収率は85%、変動係数は4.9%であった。

検量線を作成した。検量線範囲は、2～200 μ g/Lであった。図7に示した。また、低濃度0.04 μ g/Lを6回繰り返し測定した結果、変動係数は3.7%であった。



また、1 μ g/L 注入量10 μ Lの繰り返し精度(7回)のCV(%)は、7.8%であった。このことから、1 μ g/L $\times$ 0.078% $\times$ 3倍＝0.2 μ g/L(機器検出限界IDL)であった。定量下限値は0.8 μ g/Lであった。また、400倍濃縮における操作定量下限は、0.0005 μ g/Lであった。

また、LC/MSとHPLC(UV、PDA)における定量感度の比較を試みたところ、0.04 μ g/L標準液を5 μ L注入した場合のそれぞれの面積は、約51,887,000であり、概ね1,400倍の感度の差が確認された。

3.4 水試料(河川、湖沼)のチウラム調査

河川・湖沼水を400倍濃縮した場合は、0.0028 μ g/Lの検出下限値となり、河川水調査やゴルフ場農薬調査において、環境基準が0.006 μ g/Lであることから、十分に測定可能あることが確認できた。

図1のmethodに従って、調査したところ、すべての検体で不検出であった。

4 まとめ

LC/MSによる環境水中のチウラムの簡易な測定方法の確立を目的とした。イオン化法は、ESI

(positive)でのみ感度があり、コーン電圧などの最適条件の検討し、その結果、最適コーン電圧は15V(アセトニトリル：水＝50：50)であった。

精製水または河川水を液液抽出した試料、もしくは固相抽出後アセトニトリル溶出した試料を本法で適用した結果、蒸留水での回収率は98%であり、機器検出下限値が0.2 μ g/L、400倍濃縮した場合の検出下限値は、0.0005 μ g/Lであった。

また、排水などの汚れら検体で、液液抽出や固相抽出後のアセトニトリル液が着色していた場合などでは、本法では分析可能であった。

参考文献

- 1) LC/MS研究会：LC/MSの環境化学分析への応用、全国公害研会誌、25(3)、2-28、2000.
- 2) LC/MSを用いた化学物質分析法開発マニュアル環境庁環境保健部環境安全課、(2000)
- 3) 田辺顕子、川田邦明：環境水中の農薬および関連化合物の分析、全国環境研会誌、28(4)、17-22、2003.
- 4) 環境水質分析マニュアル：環境省水質保全局、平成5年.
- 5) 農薬の環境残留実態調査分析法(水質編) 環境庁水質保全局 土壌農薬課p17-21、平成10年.
- 6) JIS K 0128(2000) 用水・排水中の農薬試験方法、123-125.
- 7) 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、環境庁水質保全局長通知、平成2年5月.
- 8) 近藤秀治：LC/MSによる化学物質分析方法の基礎的検討、北海道環境科学研究センター所報、28、2001、118-120、2001.
- 9) 滝埜昌彦、代島茂樹、山口憲治、他：液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法による河川水中農薬の一斉分析、Bunseki KAGAKU(分析化学)、309-317、2001.
- 10) Waters LC/MS application notes：AMDJ007.
- 11) 中原優子：LC/MSによるゴルフ場農薬の一斉分析方法の検討、熊本県保健環境科学研究所報、32、p77-80、2002.
- 12) 中原優子：LC/MSによるゴルフ場農薬の一斉分析方法の検討(第2報)、熊本県保健環境科学研究所報、33、p87-90、2003.
- 13) Tanabe, A. Mitobe, H., Kawata, K., et al: New monitoring system for ninety pesticides and related compounds in river water by solid phase extraction with determination by gas chromatography/mass spectrometry. J AOAC int 83, 61-77 2000.
- 14) Tanabe, A. Mitobe, H., Kawata, K., et al: Seasonal and spatial studies on pesticide residues in surface water of the Shinano river in Japan. J. Agri. Food Chem., 49, 3847-3852, 2001.