

SPME-GC/MSによる水中のジチオカーバメート系農薬の分析

高垣敬司 大和田千香子 新田祐子 青野眞 武智拓郎 井上博雄*¹

Analysis of Dithiocarbamate Fungicides in Environmental Water
by GC/MS using Solid-Phase Microextraction

Keiji TAKAGAKI, Chikako OWADA, Yuko NITTA, Makoto AONO, Takuro TAKECHI, Hiroo INOUE*¹

In this study we developed a rapid and sensitive method for the determination of dithiocarbamate fungicides (mancozeb, maneb and polycarbamate) in environmental water samples with solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography / mass spectrometry (GC / MS).

Dithiocarbamate fungicides were transmethylated under alkaline conditions . Their products were extracted with SPME. A polyacrylate coated fiber was used to investigate the optimal experimental procedures. The target compounds were then desorbed by heating the fiber in a GC insert. The determination was carried out by GC / MS.

The linearity of the working curves were obtained in the concentration range from 0.3 µg/l to 10.0 µg/l for all compounds. The recovery ratio of fungicide residues spiked into water samples were shown more than 84.2 %. In addition, their coefficient of variation (relative standard deviation) ranged from 5.12 to 8.74 %. Therefore we think determination of dithiocarbamate fungicides in environmental water using SPME and GC / MS is a reliable method.

Keywords : SPME, GC / MS, Dithiocarbamates, DMDC, EBDC

はじめに

近年、ジチオカーバメート系農薬は、野菜、果樹用の殺菌剤として広く使用されており、その使用量の増加に伴い、水道水質管理目標設定項目の農薬類にポリカーバメートが追加され、分析法については厚生労働省健康局水道課長通知(平成15年10月10日付健水発第1010001号、以下「課長通知」)により示された。

人がジチオカーバメート系農薬を体内に取り込む可能性があるのは、食物や飲用水由来と考えられる。現在のところ、ジチオカーバメート系農薬については人の体内へ

の吸収に関する報告は見られないが、水と酸素がある状態では容易にエチレンチオウレア(ETU)に分解される。

分解生成物であるETUは消化器から急速に吸収され、甲状腺の過形成を誘導することで甲状腺腫瘍を発生させることが知られており、国際癌研究機構(IARC)によって発癌物質(b)に分類されている。

当所では、農薬混入水道水による健康危機発生時の迅速検査体制の確立を目的として、県内の農薬使用実態に基づき、水道水源に流入するおそれのある農薬類の選定を行い、系統別で分析法を検討しているところである。

しかし、その使用量の多さに関わらず、ジチオカーバメート系農薬の分析は、アルカリ分解で生成するジメチルジ

チオカーバメート(DMDC),もしくはエチレンビスジチオカーバメート(EBDC)をヨウ化メチルによりメチル化した後,溶媒抽出及び固相抽出によってクリーンアップを行った試料を,高速液体クロマトグラフを用いて定量する方法が示されているため,分別定量ができず感度が低く,抽出時における乾固・溶媒転溶の際に酸化分解等の影響を受けやすいため回収率も悪く困難である.

そこで今回,溶媒を使用しないため環境調和性においても長所を有している固相マイクロ抽出(SPME)法¹⁻²⁾で前処理を行い,検出器として選択性に優れているガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)を用いてメチル化体を測定することにより,簡便で迅速,かつ高感度な分析法を検討したので報告する.

材料と方法

1 検討対象農薬

平成15~19農薬年度の農薬要覧³⁾を資料として集計した県内殺菌剤使用量調査(表1)をもとに,使用量で上位に入るマンゼブ,マンネブ,ポリカーバメートを検討対象とした.各農薬の構造式を図1に示した.ジネブについては平成17年12月13日付けで失効しているため検討からは除外した.

2 試薬

各農薬の標準品,DMDC-Meは和光純薬工業(株)残留農薬試験用,EBDC-Meは林純薬工業(株)標準品,その他の試薬は和光純薬工業(株)特級品を使用した.

農薬の標準溶液は,L-システイン塩酸塩,エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)各10gを精製水160mlに加えて12N-NaOHでpHを9.6~10に調整後,200mlにメスアップした溶液を調製し,この溶液で標準品を溶解,定容し作製した.

3 装置

SPMEファイバーアセンブリーは,320℃までの高温使用が可能で,分子量80~300程度の反揮発性化合物を中心に幅広く使用でき,高い抽出率を示す85µmポリアクリレート(PA)(SUPELCO製)を使用した⁴⁻⁸⁾.

SPMEユニットは,SPMEファイバーアセンブリーをSPMEホルダー(SUPELCO製)に取り付け使用した.

試料抽出には,4mlセブタム付きバイアル瓶(日本ウォーターズ株式会社製),SPMEサンプリングスタンド(SUPELCO製),3mm i.d×10mmのPTFE製攪拌子(ベルアート社製)及びマグネチックスターラーマグネスターMG-5(柴田科学株式会社製)を使用した.

測定には,6890Nガスクロマトグラフ装置(GC)(Agilent

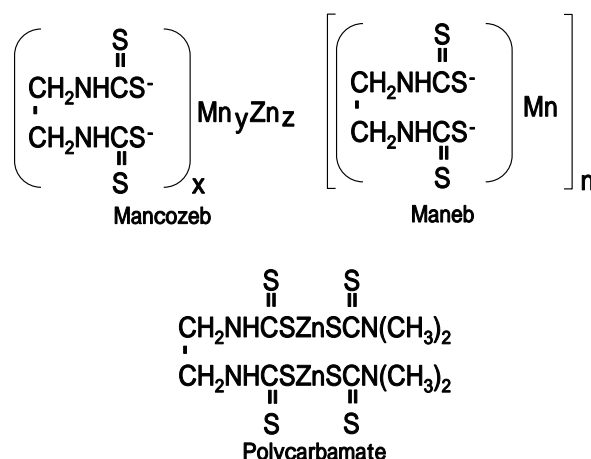


図1 検討対象農薬の構造式

表1 県内殺菌剤使用量調査表

| 順位 | 原体名 | 出荷量(kg) |
|----|------------|---------|
| 1 | マンゼブ | 1337747 |
| 2 | マンネブ | 510350 |
| 3 | ダゾメット | 187768 |
| 4 | 銅 | 121727 |
| 5 | 硫黄 | 112691 |
| 6 | チオファネートメチル | 74050 |
| 7 | クレソキシムメチル | 32237 |
| 8 | フサライド | 29658 |
| 9 | ベノミル | 25690 |
| 10 | IBP | 24284 |
| 11 | ピロキロン | 21567 |
| 12 | ホセチル | 16538 |
| 13 | ポリカーバメート | 14600 |
| 14 | イミノクタジン酢酸塩 | 14573 |
| 15 | イプロジオン | 12890 |
| 16 | フェリムゾン | 12809 |
| 17 | プロベナゾール | 12424 |
| 18 | ジネブ | 11808 |
| 19 | TPN | 11773 |
| 20 | ジチアノン | 11692 |

Technologies製)及び質量分析計(MS)JMS-GCmate(日本電子株式会社製)を使用した.

カラムは,SLB-5MS長さ30m×内径0.25mm,膜厚0.25µm(SUPELCO製)を使用した.

インサートは内径0.75mmのSPME用インレットライナー(SUPELCO製)を使用した.

なお,SPMEファイバーは注入口温度300℃のGCで2時間コンディショニングを行ったものを使用した.

4 測定条件

GC条件は,キャリアーガスの高純度ヘリウムを0.7ml/minの一定流量とし,オープン温度を60℃(1分間保持)100℃(15秒/分)300℃(7秒/分,1分間保持)で

昇温した。

脱離は、注入口温度を260 に保ち、パルス圧力30.0psi、パルス時間2分間、パージ流量20.0ml/min、パージ開始時間1.9分のパルススプリットレス方式を使用した。

MS条件は、インターフェイス温度250、イオン源温度230、EI法(70eV)、分解能1000、イオン化電流300μA、検出器電圧450V、イオン選択検出法を使用した。

測定した質量電荷比(m/z)については、DMDC-Meの定量用に88、確認用に135、EBDC-Meの定量用に144、確認用に72を使用した。

5 前処理

本検討のアルカリ分解までの前処理については「課長通知」に示されているポリカーバメートの試験法を参考とし、メチル化についてはヨウ化メチルを直接添加後、5分間の攪拌を行った。

SPMEによる抽出以降の手順については、スクリー式バイアル瓶に攪拌子を入れ、塩化ナトリウム0.5g及び試料4mlをそれぞれ分取し、PTFEセプタム及び穴あきキャップで密栓した。

次に、バイアル瓶をSPMEサンプリングスタンドを用いてマグネチックスターラー上に固定し、SPMEホルダーの針長調節用ガイド/深さゲージの目盛りを28mmに調節後、ファイバーを収納した状態で貫通させ、マグネチックスターラーで攪拌を行いながら、プランジャーを押し下げ、ファイバーを試料中に露出させた。

30分間放置後、プランジャーを戻して針内にファイバーを収納し、SPME針をバイアル瓶より引き抜き、SPMEホルダーの針長調節用ガイド/深さゲージの目盛りを35mmに調節し、ファイバーを収納したままSPME針をGCセプタムに貫通させた。その後、プランジャーを押し下げ、ファイバーを260 に温度設定した注入口内に露出し2分間放置した。

抽出及び脱離した後、試料および添加試薬由来の夾雑物質がファイバーに残存し完全に脱離できていない場合、次の抽出操作に影響を与えるため、すべてのファイバーの汚れを完全に除去する必要がある。そこで脱離後、精製水4mlで5分間洗浄し、注入口温度300 のGCで5分間乾燥し、次の分析に使用した。

分析フローを図2に示した。

結果及び考察

分析条件の最適化を行うため、前処理の際に、アルカリ

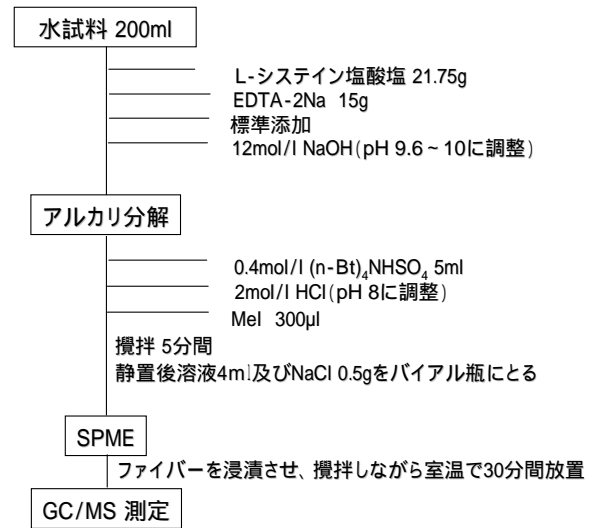


図2 分析フローチャート

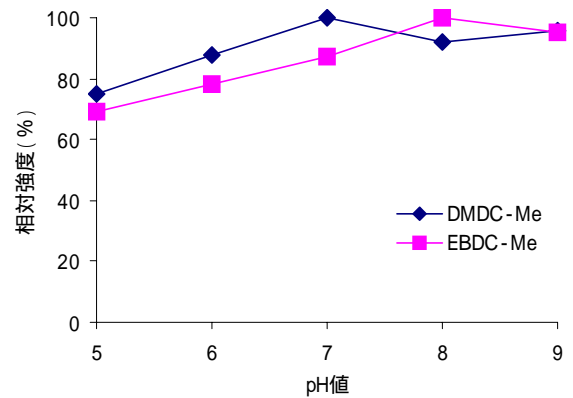


図3 抽出操作時における pH の検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を 100%として算出)

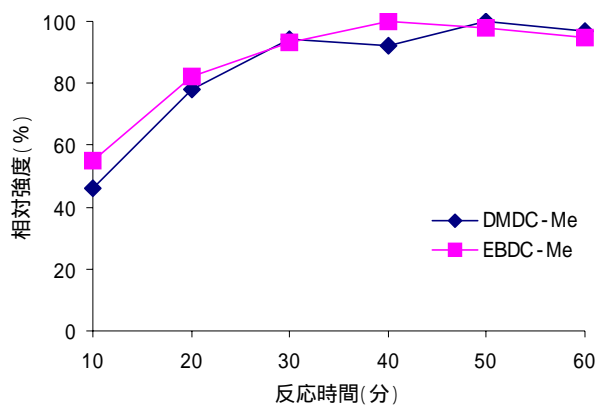


図4 誘導体化における反応時間の検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を 100%として算出)

分解によってDMDC、EBDC双方を生成するポリカーバメートを標準溶液として用い試験を行った。

1 抽出操作時における pH の検討

溶液の pH は抽出操作の方法に関わらず抽出効率等

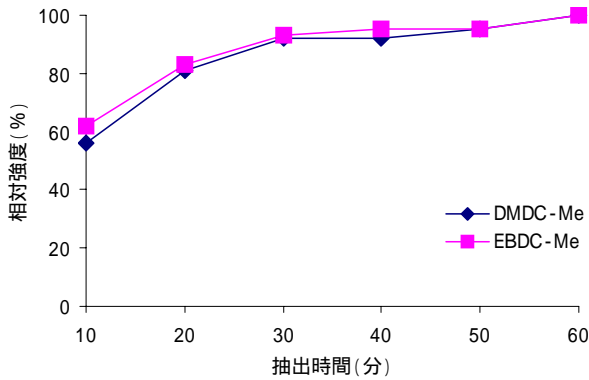


図5 SPMEによる抽出時間の検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を100%として算出)

に影響を及ぼす。また、EDTA-2NaはpHが低いと析出するため、pH5～9の範囲で変化させ、得られた結果を図3に示した。

DMDC-Meは、pH7で最も感度が良好であったが、pH7以上において顕著な差はなかった。EBDC-Meは、pH8で最も感度が良好であった。

以上から、抽出操作時のpH値は8とした。

2 誘導体化における反応時間の検討

DMDCおよびEBDCが完全にメチル化されるまでに抽出操作を終了することは、回収率等の低下の原因となる。そのため、誘導体化における反応時間を10～60分の範囲で変化させ、得られた結果を図4に示した。

DMDC、EBDCともに誘導体化試薬添加後30分でほぼ反応が完結していると推測されることから、反応時間は30分とした。

3 SPME 抽出条件の検討

SPMEによる抽出は分配係数に則った物質の試料溶媒からファイバー液相への移動を利用しているため、この分配が平衡に至る移動時間がSPMEでの抽出時間といえる。良好な感度及び再現性を得るには、速やかに分配平衡に達することが必要であるため、撪拌を行い浸漬時間を10～60分の範囲で変化させ、得られた結果を図5に示した。

DMDC-Me、EBDC-MeともにSPMEファイバーを浸漬後30分以上において抽出効果に顕著な変化がなかった。これは、平衡が近づくに従い単位時間当たりの移動量は小さくなるためと考えられる。実際の操作では、平衡に至るまでの急激な濃度増加の時間が経過した時点で抽出終了することが一般的であり、GC/MSの一回の分析に要する時間を考慮した上で、浸漬時間は30分とした。

4 脱離条件の検討

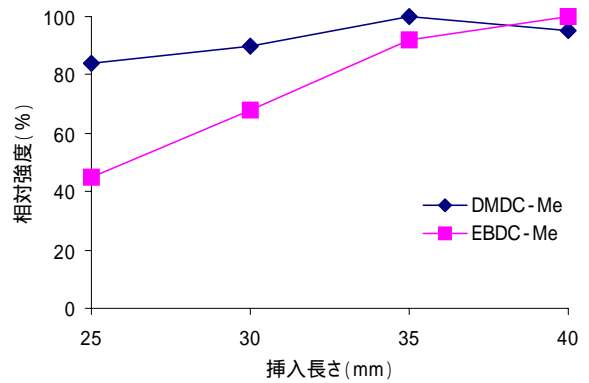


図6 注入口への挿入長さの検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を100%として算出)

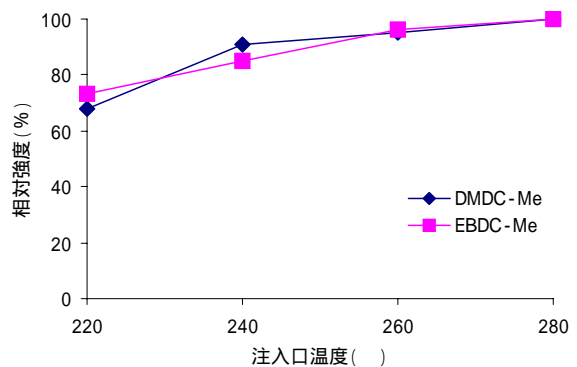


図7 注入口温度の検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を100%として算出)

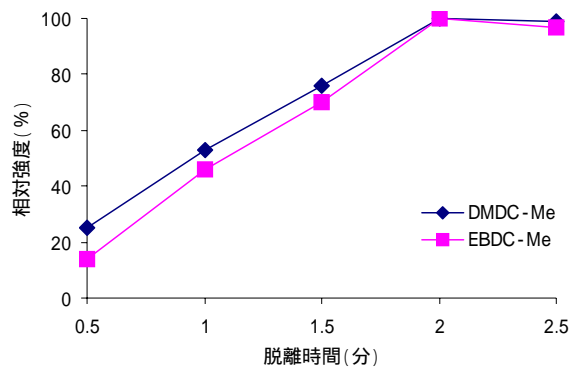


図8 脱離時間の検討

(相対強度は各条件における測定値の最大値を100%として算出)

SPME法で良好な再現性を得るためには、分析対象物質がSPMEファイバーから、注入口において速やかに脱離することが必要であるため、注入口内のファイバーの位置、注入口の温度及び脱離時間の最適条件を検討した。

(1) 注入口への挿入長さ

脱離時の注入口への挿入長さを25～40mmの範囲で

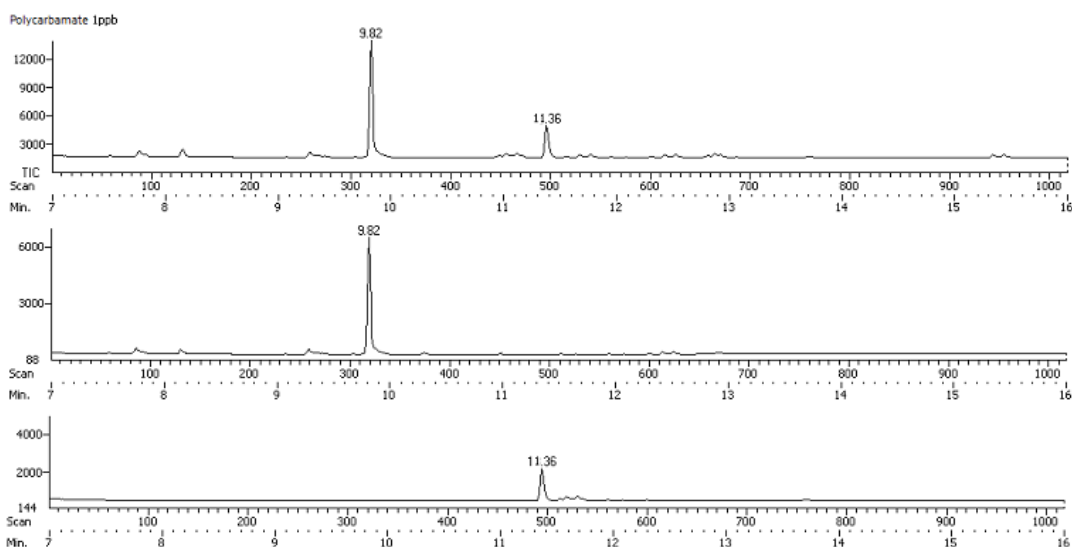


図9 ポリカーバメートの標準溶液を用いて測定した際に得られたクロマトグラム
(上段:TIC 中段:DMDC-Me 下段:EMDC-Me)

表2 各農薬の検量線及び定量下限値(n = 3)

| 原体名 | 定量化合物 | 濃度範囲 ($\mu\text{g/l}$) | 検量線 | | 定量下限値 ($\mu\text{g/l}$) |
|----------|---------|-----------------------------|----------|--------|------------------------------|
| | | | 傾き | 相関係数 | |
| マンゼブ | EBDC-Me | 0.3 ~ 10.0 | 5385.313 | 0.9967 | 0.264 |
| マンネブ | EBDC-Me | 0.3 ~ 10.0 | 5787.123 | 0.9980 | 0.240 |
| ポリカーバメート | DMDC-Me | 0.3 ~ 10.0 | 20985.36 | 0.9993 | 0.088 |

表3 実試料への添加回収試験(n = 5)

| 原体名 | 添加濃度 ($\mu\text{g/l}$) | 測定値($\mu\text{g/l}$) | | 回収率(%) | | 変動係数(%) | |
|----------|-----------------------------|------------------------|-------|--------|------|---------|------|
| | | 表流水 | 地下水 | 表流水 | 地下水 | 表流水 | 地下水 |
| マンゼブ | 1.0 | 0.870 | 0.842 | 87.0 | 84.2 | 6.43 | 8.74 |
| マンネブ | 1.0 | 0.940 | 0.897 | 94.0 | 89.7 | 5.98 | 5.12 |
| ポリカーバメート | 1.0 | 0.968 | 0.964 | 96.8 | 96.4 | 5.90 | 6.05 |

変化させ、得られた結果を図6に示した。

DMDC-Meは、挿入長さが35mmの時に最も感度が良好であったが、挿入長さ30mm以上における感度差は微小であった。EBDC-Meは、挿入長さが40mmの時に最も感度が良好であったが、挿入長さ35mm以上における感度差は微小であった。DMDC-Me、EBDC-Meともに、注入口への挿入長さの増加に伴い面積の増加がみられ、挿入長さ35mm以上ではほぼ一定であった。これは、注入口の温度分布差のため、注入口付近では温度が低く、脱離の効率が低下し、保持時間からPAとの吸着能が高いと推測できるEBDC-Meほど、その影響が顕著なためと考えられた。

以上から、挿入長さは35mmとした。

(2) 注入口温度

脱離時の注入口温度を220 ~ 280 の範囲で変化させ得られた結果を図7に示した。

DMDC-Meは、注入口温度が280 の時に最も感度が良好であったが、240 以上における感度差は微小であった。EBDC-Meは、注入口温度が280 の時に最も感度が良好であったが、260 以上における感度差は微小であった。

以上から、注入口温度は260 とした。

(3) 脱離時間

脱離時間を0.5 ~ 2.5分の範囲で変化させ、得られた結果を図8に示した。

DMDC-Me、EBDC-Meともにページ時間2分以上でほぼ一定であり、脱離が完結していると推測されることから、脱離時間は2分とした。

条件の最適化を行って測定した結果,得られたクロマトグラムを図9に示した.保持時間,m/zともDMDC-Me,EBDC-Me標準溶液を測定したものと一致していた.

5 定量精度の確認

精製水に各農薬の標準品を段階的に添加し,図2のフローに従い測定を行い,検量線を作成し定量下限値(10)を求めた結果を表2に示した.

各農薬とも0.3~10.0 $\mu\text{g/l}$ の範囲で良好な直線性が得られた.定量下限値はポリカーバメートが0.088 $\mu\text{g/l}$,マンゼブが0.264 $\mu\text{g/l}$,マンネブが0.240 $\mu\text{g/l}$ であった.ポリカーバメートと比較して,マンゼブ及びマンネブの定量精度が低いのは,定量化合物に設定しているEMDC-Meの低濃度域における感度が低いためと考えられる.なお,ポリカーバメートの分析においては,定量下限値が水道法における目標値(0.03mg/l)の1/100値(0.0003mg/l)を満足していた.

6 環境試料への適用

本法の実試料への適用と再現性を検討するため,愛媛県中予地区A町の表流水及び同B市の地下水をサンプルとして添加回収試験を行い,得られた結果を表3に示した.

全てのサンプルにおいて,検討対象農薬の検出はなく,添加回収試験については各農薬とも回収率84.2~96.8%,変動係数8.74%未満と良好であった.しかし,今回用いたサンプルは,夾雑物質をほとんど含まない水道原水であったため,今後はより夾雑物質が多く含まれている試料について検討が必要であり,また,ファイバーの連続使用が原因と思われる感度の低下が見られ,水試料を用いたことに起因するファイバー液相の膨張,あるいは誘

導体化剤の液相への不可逆的な反応等による損傷の可能性が推測できることから,ファイバーの使用回数についても検討していく必要が示唆された.

まとめ

PAファイバーを用いたSPME-GC/MS法によるジチオカーバメート系農薬の分析法を検討したところ,溶媒抽出における乾固・転溶作業や,固相によるクリーンアップが不要となり,本法が選択性,感度,再現性及び迅速性において優れた方法であることが示唆された.

文献

- 1) SPMEガイド,第2版,シグマアルドリッチジャパン(株)スペルコ事業部
- 2) Arthur C. L. et al. : Anal. Chem. ,62,2145, (1990)
- 3) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課,植物防疫課 監修:農薬要覧,社団法人日本植物防疫協会(2004-2008)
- 4) Boyd - Boland A. A. et al. : Analyst, 121, 929 - 937 (1996)
- 5) Beltran J. et al. : J. Chromatogr. A, 808, 257 - 263 (1998)
- 6) Valor I. et al. : J. Chromatogr. A, 767, 95 - 203 (1997)
- 7) Magdic S. et al. : J. Chromatogr. A, 736, 219 - 228 (1996)
- 8) Prosen H. et al. : Trends Anal. Chem. , 18, 272 - 282 (1999)