

報 文

固相抽出/液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による
環境水中のカルベンダジムとチアベンダゾールの分析方法沖田 智^{®*}, 石井 善昭*, 尹 順子*Determination of carbendazim and thiabendazole in environmental water
samples using solid-phase extraction and LC/electrospray MS/MS

Satoshi OKITA, Yoshiaki ISHII and Sun-Ja YUN*

*The Institute of Basic Environmental Research, Environmental Control Center Co., Ltd., 323-1, Shimo-ongata-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0154

(Received 27 September 2000, Accepted 22 November 2000)

Carbendazim (MBC) and thiabendazole (TBZ) in environmental water samples were simultaneously determined by a liquid chromatograph/tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization interface (LC/ESI-MS/MS). A simple and rapid sample pretreatment procedure using solid-phase extraction was developed to minimize the ion-suppression effect and to enrich analyte compounds. Both MBC and TBZ were quantitatively retained on a solid-phase extraction cartridge (Oasis HLB). The cartridge was washed with 3 ml of a 30 vol% methanol solution and then with 3 ml of water, and subsequently dried under a vacuum. MBC and TBZ retained on the cartridge were recovered by elution with 4 ml of ethyl acetate. The eluate was taken to dryness under a nitrogen stream before being re-dissolved in 1 ml of a water/methanol (1 : 1) solution. The solution was analyzed by LC/ESI-MS/MS. The results of analyses of spiked MBC and TBZ in aqueous solution demonstrate the applicability of the proposed method to environmental aqueous solutions, such as river water and the discharge of sewage treatment plant (DSTP). Detection limits of 0.32 ng/l for MBC and 0.93 ng/l for TBZ in river water, and 5.6 ng/l for MBC and 4.9 ng/l for TBZ in DSTP have been achieved. The results of overall recovery tests showed that the recovery of deuterated MBC-*d*₃, the spiked internal standard, was 85.4%, and that the relative standard deviation (RSD) was 11%. The recoveries of MBC for river water spiked at 5 ng/l and 50 ng/l were 102% and 104%, and for DSTP spiked at 250 ng/l was 106%, respectively, and their RSD ranged from 1.9% to 3.4%. The recoveries and RSD of TBZ ranged from 78.9% to 136%, and from 1.8% to 4.8%, respectively.

Keywords : carbendazim; thiabendazole; LC/ESI-MS/MS; river water; discharge of sewage treatment plant.

1 はじめに

ベンゾイミダゾール系農薬のカルベンダジム (MBC) 及びチアベンダゾール (TBZ) は、殺菌や防かび用の農薬として使用される以外にも、抗菌防かびを目的として、塗料・プラスチック・繊維・紙製品等に広く使用されている¹⁾。抗菌防かび加工を施した商品は、1996 年の病原性大

腸菌 O-157 による集団食中毒の全国規模での頻発を機に、家庭用品で急激に増加しており¹⁾、それらに含まれる薬剤が環境中に放出される化学物質の供給源となりつつあることが予想される。したがって、MBC 及び TBZ の都市域での環境水中の挙動を解明することは、抗菌防かび加工の家庭用品を発生源の一つとしている化学物質のモデルとして重要であると考えられる。

また、MBC は、同じベンゾイミダゾール系農薬のベノミルやチオファネートメチルからも、分解により生成する

* (株)環境管理センター環境基礎研究所: 192-0154 東京都八王子市下恩方町 323-1

ことが知られている²⁾。日本国内におけるこれらの原体の1998年度出荷量(農薬要覧より算出, 単位はトン又はキロリットル)は, ペノミル 190, チオファネートメチル 551, MBC 0.2, TBZ 6.8 であり, MBC 自体の出荷量はわずかであるが, MBC を生成する可能性のあるペノミルとチオファネートメチルを合計すると, 出荷量としてはアセフェートと並び, 上位に位置づけられる。したがって, 日本国内における主要な農薬の一つとしても MBC について調査することは重要であると判断される。

しかし, 従来の実態調査を目的とした分析法では, 検出下限濃度が高いために検出事例が少なく³⁾, その環境水中での濃度分布は明らかではなかった。また, 湖水中で 25 ppt の MBC を検出可能としている報告⁴⁾では, 妨害成分の除去に免疫アフィニティーカラムを使用している点で, 環境分析における一般的分析手法とはなりにくいと考えられる。

そこで, 本研究では環境水中の MBC と TBZ のモニタリングを目的として, 市販の固相カートリッジによる簡便な試料前処理と, 液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法(LC/ESI-MS/MS)を組み合わせた ng/l レベルの分析法を開発し, 河川水及び下水処理場放流水に適用して良好な結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

実験に使用した標準品は, TBZ 食品添加物試験用純度 99.9%, MBC 残留農薬試験用純度 98.0% の 2 種(和光純薬製)を使用した。内標準物質は, 重水素安定同位体標識の MBC-*d*₃(純度 99.6%, 林純薬製)を用いた。

その他の試薬は残留農薬試験用メタノール 1000, 残留農薬試験用酢酸エチル 1000, 酢酸及び酢酸アンモニウムは特級試薬(いずれも和光純薬製)を用いた。

標準品及び内標準物質は個々に精ひょうし, メタノールに溶解して 500 mg/l (但し, 内標準物質のみ 50 mg/l)の標準原液を調製した。混合標準溶液は, 標準原液をメタノールで適宜希釈混合し調製した。

1 mM 酢酸アンモニウム-酢酸(1:1)水溶液は, 2 mM 酢酸アンモニウムと 2 mM 酢酸を 1:1 の割合で混合して調製した。

ESI 用シースガス及びオグジラリーガスは高純度液体窒素から発生させた窒素を使用した。

試料の濃縮と精製には, Oasis HLB (3 cc 60 mg, Waters 製)固相カートリッジを使用した。

2.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフには HP1100 (Hewlett Packard

製)を用い, 分離カラムには Capcell Pak C₁₈ UG120 (150 mm × 2 mm i.d. 5 µm, 資生堂製), ガードカラムには同シリーズの 10 mm × 2 mm i.d. 5 µm を使用した。

移動相は, 溶離液 A: メタノール, B: 蒸留水を用い, 流量 0.2 ml/min で 50% A を初期移動相とし, リニアグラジエントを用いて 10 分後の溶離液組成を 100% A とした。カラム恒温槽は 40℃ に設定し, ポストカラムでシリンジポンプにより 1 mM 酢酸アンモニウム-酢酸(1:1)水溶液を 2 µl/min で添加した。試料注入量は 5 µl とした。

トリプルステージ質量分析計には ESI イオン源を装着した TSQ7000 (Thermo Quest 製)を用い, シースガス圧 80 psi, オグジラリーガス流量 40 unit (16 l/min 相当), 正イオンモード, スプレー電圧 4.5 kV, 加熱キャピラリー温度 350℃, 衝突ガスはアルゴン 2 mTorr, 選択反応検出法(SRM)で測定し, 得られたピーク面積から内標準法により定量を行った。SRM 条件は, 前駆イオンとして TBZ が *m/z* 202, MBC が *m/z* 192, MBC-*d*₃ が *m/z* 195 を選択し, 衝突電圧及びモニターイオンとして, TBZ は 30 eV で *m/z* 175 を, MBC と MBC-*d*₃ は共に 20 eV で *m/z* 160 を選択した。

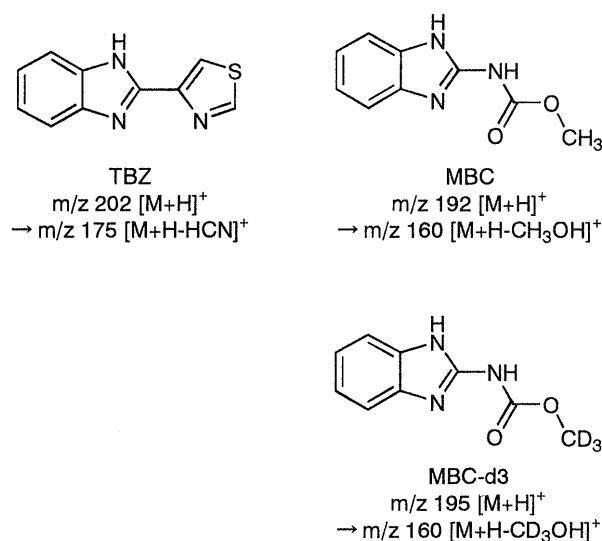
2.3 試料の濃縮と精製

固相カートリッジによる試料濃縮操作は, 酢酸エチル 3 ml, メタノール 3 ml 及び蒸留水 3 ml でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジで行った。100 ml の河川水及び 20 ml の下水処理場放流水を, 蒸留水で希釈して 100 ml とした水試料それぞれに 20 ng/ml の内標準溶液 0.5 ml を添加かくはん後, カートリッジに毎分約 5 ml で通水した。

このカートリッジを 30% メタノール 3 ml で洗浄し, 次に蒸留水 3 ml で洗浄した。カートリッジを通気脱水後, 酢酸エチル 4 ml で溶出させ, 窒素ガス気流下で溶媒を除去した。これを初期移動相 1 ml で完全に溶解し, このうちの 5 µl を測定に供した。

2.4 添加回収試験用試料

環境水による添加回収試験には, 多摩川上流の羽村堰と下流の丸子橋で採水した河川水, 多摩川に流入する下水処理場放流水を用いた。これらをガラス繊維汙紙(GF/C, Whatman 製)で汙過し, 添加試料として羽村堰試料には 5, 丸子橋試料には 50, 下水処理場放流水には 250 ng/l となるように混合標準を添加した。羽村堰と丸子橋の河川水は 100 ml, 下水処理場放流水は 20 ml を 2.3 の操作に供した。

Fig. 1 Chemical structures of TBZ, MBC and MBC-d₃

3 結果及び考察

3.1 質量スペクトル測定条件の検討

2.2 に記した測定条件でのイオン化では, TBZ と MBC どちらの化合物においても $(2M+H)^+$ と判断されるイオンも確認されたが, $(M+H)^+$ が主要な生成イオンであった. $(M+H)^+$ の生成は, 移動相をそのままイオン源へ導入するよりも, ポストカラムで酢酸アンモニウム-酢酸 (1:1) 水溶液を 2 μ l/min で添加したときに増加したので, 感度向上のためにこれを加えることとした.

タンデム質量分析を行う際の前駆イオンには, $(M+H)^+$ に該当する TBZ では m/z 202 を, MBC では m/z 192 を, また MBC-d₃ は m/z 195 を選択した. Fig. 1 に TBZ と MBC 及び MBC-d₃ の構造式を示した.

次に前駆イオンを 15 ~ 40 eV の電圧で衝突させ, 最適なフラグメントイオンが得られる電圧を検討した. TBZ は 30 eV で得られた m/z 175 を, MBC と MBC-d₃ は共に 20 eV で得られた m/z 160 をモニターイオンに選択した.

3.2 HPLC 分離カラムの選択

MBC 及び TBZ は塩基性化合物なのでカラムとの相互作用が強く, 通常はリン酸カリウム⁵⁾などを添加した移動相が用いられている. また, TBZ では炭酸アンモニウム含有の塩基性移動相でピーク形状を改善した分離例⁶⁾がある.

しかし, LC/MS のイオン源に不揮発性の塩類を導入することは, イオンの取り込み口である加熱キャピラリーに塩が析出し, 物理的にイオンの進行を妨害するので好ましくない. また, 移動相に含まれる電解質の濃度は, 希薄なほど分析対象物の感度が良い⁷⁾という報告例もある.

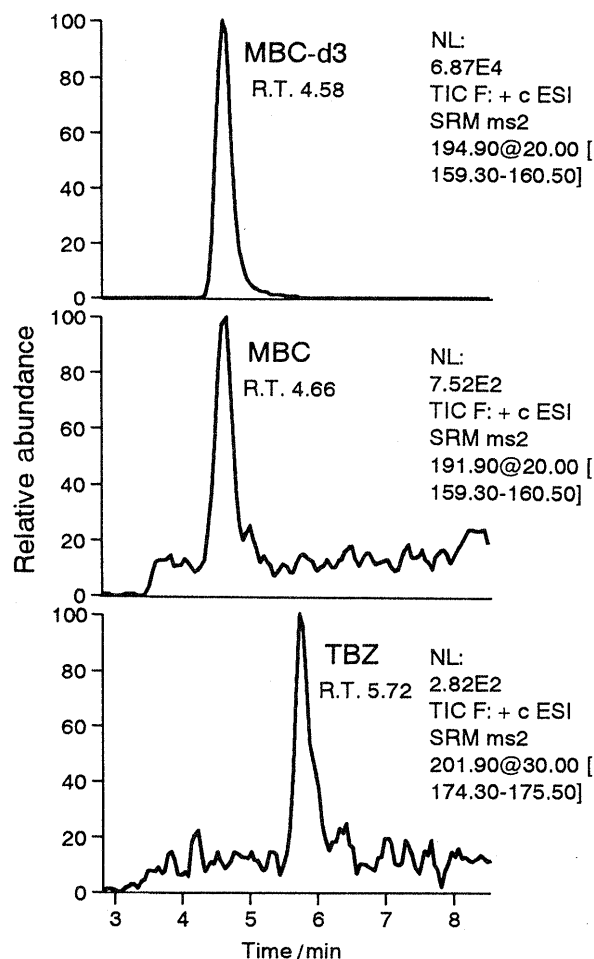


Fig. 2 SRM chromatograms of MBC and TBZ standards solution by LC/ESI-MS/MS

Concentration: 0.1 ng ml⁻¹

したがって, LC/MS のイオン化を最適な条件で実行するために, 水とメタノールのみを移動相として, この条件で良好なピーク形状が得られるカラムを Capcell Pak C₁₈ UG120, Symmetry Shield RP18, Zorbax 300SB-C₁₈, Capcell Pak Ph UG120, Zorbax Bonus-RP から選択した.

2.2 に示した移動相の条件では, すべてのカラムでピークのテイリングが観察された. 特に TBZ はキレート化合物なので, 充填剤中の金属不純物に起因する吸着によって考えられる大きなテイリングを示すカラムもあったが, Capcell Pak C₁₈ UG120 で比較的良好なピーク形状が得られた. この充填剤は, シリカゲル上にポリマー被膜を形成することにより, 配位結合に影響する金属不純物や残存シラノール基の影響が低減されているため⁸⁾, 今回適用した移動相においても, テイリングの小さい良好なピーク形状が得られたと考えられる.

このカラムによる 0.1 ng/ml 標準溶液 5 μ l 注入時の SRM クロマトグラムを Fig. 2 に示した. この条件下で, 両化合物共に 0.1 から 20 ng/ml の範囲で $r^2 = 0.999$ と良

Table 1 Recoveries of MBC and TBZ from distilled water with various solvents

Analyte	Recovery, % (Spiking of 50 ng each)			
	Methanol	Acetonitrile	Ethyl acetate	Dichloro methane
MBC	89	85	84	80
TBZ	87	83	78	81

好な検量線が得られた。

3.3 クリーンアップの検討

LC/MSによる測定は、一般に試料マトリックスによるイオン化効率への影響が大きい⁹⁾。試料マトリックスなどによる感度変動の対処法としては、安定同位体による内標準補正が最も効果的であるが、すべての化合物について安定同位体を手に入れることは実際には困難である。今回はMBC-*d*₈についてのみ入手できたので、TBZについてもこれを用いて補正することとした。今回対象としたMBCとTBZは、環境水の粗抽出液において標準溶液と比較して最大で添加濃度の40%まで感度が低下し、イオン化抑制によると判断される影響が強く見られた。また、2物質間で感度の低下率は若干異なっており、カラムからの溶出時間の差によるマトリックス成分の違いや、イオン化への影響の差などがその原因として考えられた。

そこで、イオン化抑制による感度低下を低減し、MBCとTBZでイオン化抑制の影響に大きな差が生じないように、試料マトリックスをできるだけ除去できるクリーンアップ法を検討した。

混合標準溶液を添加した蒸留水を試料に用い、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジクロロメタンの4種類を溶出溶媒として行った、固相カートリッジからの添加回収試験結果をTable 1に示した。すべての溶媒において溶出液量4 mlで、回収率が78～89%とほぼ同様となることが確認された。

試料マトリックスによるイオン化抑制効果が最小の溶出溶媒を選択するために、マトリックス効果が大きいと考えられ、かつMBCとTBZの両方が検出された下水処理場放流水を試料として各溶出液の測定を行った。ジクロロメタンにより溶出された面積値を100とした場合の相対%をFig. 3に示した。

この結果、酢酸エチルとジクロロメタンが、メタノールとアセトニトリルに比較して面積比で20%以上高く、試料マトリックスの影響を低減できることが分かった。環境負荷の面を考慮し、酢酸エチルを溶出溶媒に選択した。なお、この結果が固相抽出操作での回収率の低下によるものでないことは、各溶媒による溶出液に標準溶液の添加を行

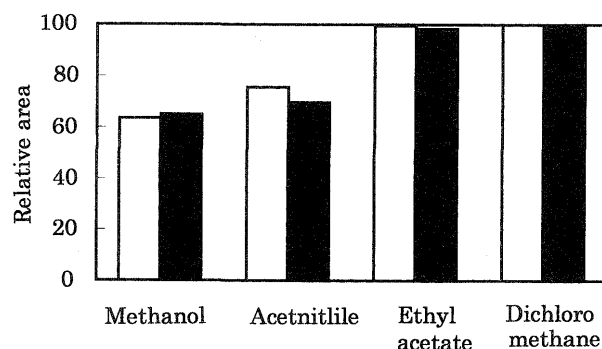


Fig. 3 Relative area of MBC and TBZ from discharge of sewage treatment plant with various solvents

□: MBC; ■: TBZ

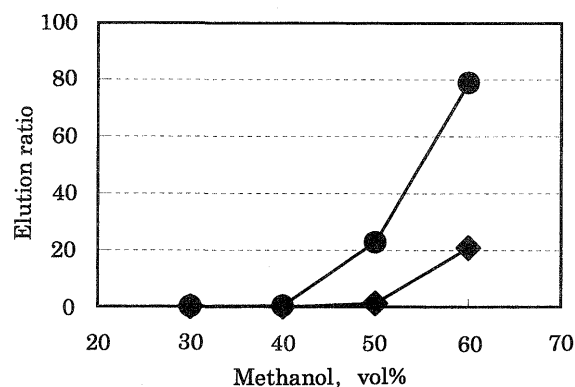


Fig. 4 Elution curve of MBC and TBZ with water-methanol solvents (elute with 3 ml)

●: MBC; ◆: TBZ

い測定した結果、同程度の面積値の減少があったことによって確認した。

次に、メタノール水溶液による試料マトリックス中の色素など、親水性成分の低減効果を検討するために、メタノール水溶液を固相カートリッジの洗浄溶媒とし、目的物質を溶出しない最大メタノール含有量の確認を行った。Fig. 4に、MBC及びTBZを負荷したカートリッジを、30～60 vol% メタノール水溶液3 mlで洗浄したときの溶出率を、負荷量を100として示した。この結果から、洗浄溶媒を30 vol% メタノール水溶液に決定した。

実試料において、メタノール水溶液洗浄に続いて酢酸エチル溶出を行ったところ、褐色の成分の溶出が見られ、測定に影響を及ぼす可能性が考えられた。水とメタノール、酢酸エチルの3液混合系による目的成分以外の溶出を避けるために、メタノール水溶液洗浄後に水による洗浄を行うこととした。この簡単なメタノール水溶液洗浄・水洗浄・酢酸エチル溶出によって、実試料においてほとんど着色のない抽出液を得ることができた。

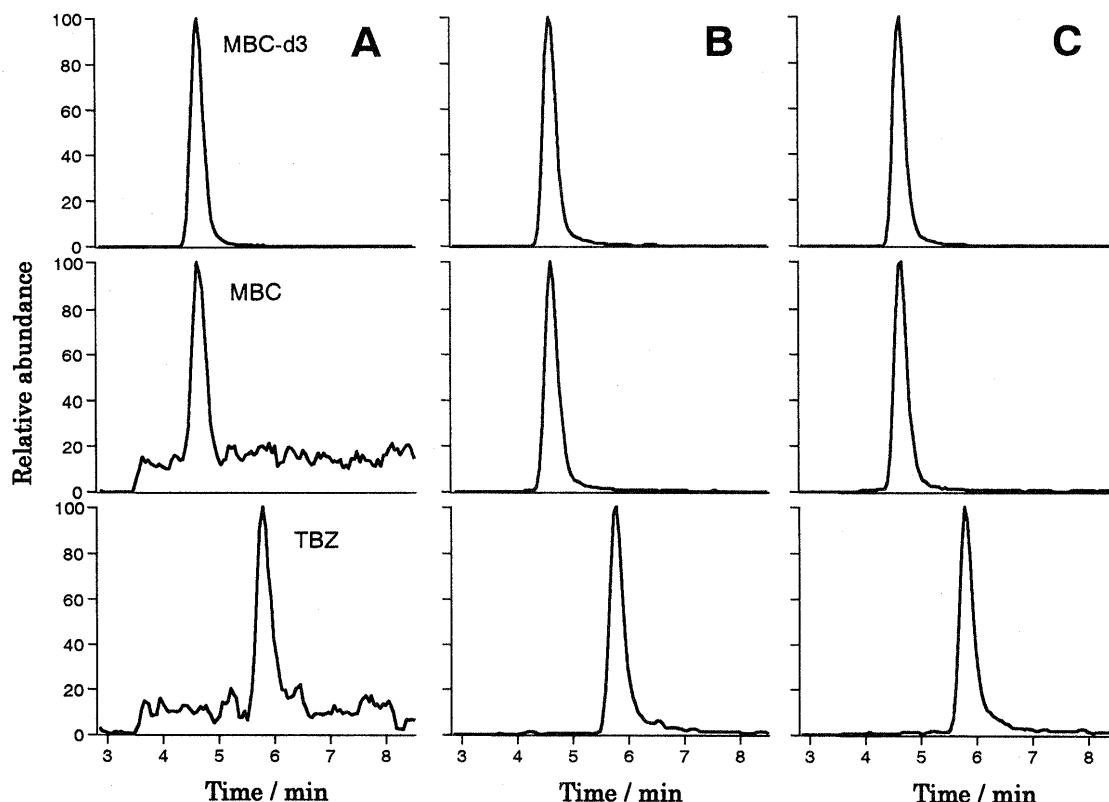


Fig. 5 SRM chromatograms of MBC and TBZ in river water and discharge of sewage treatment plant (DSTP) by LC/ESI-MS/MS

A: Hamura; B: Maruko; C: DSTP (non-spiked samples)

Table 2 Recoveries of MBC and TBZ from spiked river water and discharge of sewage treatment plant

Analyte	Sample name	Sample blank/ng l ⁻¹	Spiked/ng l ⁻¹	Found/ng l ⁻¹	Recovery, %	RSD, % ^{a)}
MBC	Hamura	1.08	5	6.18	102	3.4
	Maruko	98.5	50	150	104	3.3
	DSTP ^{b)}	208	250	473	106	1.9
TBZ	Hamura	1.49	5	5.43	78.9	4.1
	Maruko	38.8	50	107	136	4.8
	DSTP ^{b)}	104	250	404	120	1.8

a) $n = 5$; b) DSTP: discharge of sewage treatment plant

3・4 添加回収試験

2・3 の操作に従い処理を行った 2・4 の未添加試料の SRM クロマトグラムを Fig. 5 に示した。河川水及び下水処理場放流水のいずれにおいても定量の妨害となるピークは見られなかった。また、MBC- d_3 の面積値から求めた絶対回収率と相対標準偏差 (RSD) は、羽村堰が 82.0%, 9.0%, 丸子橋 79.1%, 8.1%, 下水処理場放流水 95.1%, 6.3% と、マトリックスによるイオン化抑制の影響を大幅に低減できた。

MBC- d_3 を内標準物質とし MBC と TBZ の値を補正して、添加回収率を求めた結果を Table 2 に示した。なお、対象化合物が未添加試料において検出されたので、添加試

料の測定値から未添加試料の値を差し引いて回収率を計算した。添加濃度が 5, 50, 250 ng/l と 3 段階の濃度の回収試験において、MBC では回収率 102~106%, RSD は 1.9~3.4% と良好な結果が得られた。

一方、TBZ の回収率は添加濃度 5 ng/l で 78.9%, 50 ng/l で 136%, 250 ng/l で 120% と高濃度でやや過大な結果となった。これは RSD が 1.8~4.8% と小さいことから、測定誤差ではなく、MBC と TBZ のマトリックスと共存する場合の挙動の違いによる結果と推測された。TBZ は MBC よりもイオン化抑制の影響が小さく、MBC- d_3 を用いると過剰補正になってしまったとも推測されたが、絶対検量線による定量結果においても 62.4~121% と内標

Table 3 Method detection limits (MDL)

Analyte	MLD/ng l ⁻¹	
	River water	DSTP ^{a)}
MBC	0.32	5.6
TBZ	0.93	4.9

a) DSTP: discharge of sewage treatment plant

準法と同様の結果となったことから、別の原因があると推測された。絶対検量線による結果においても、100%を超える回収率となった原因としては、標準溶液の注入時には無限にテイリングして面積値にカウントされなかった部分、実試料の注入時にはマトリックスが吸着部位をマスキングすることによりテイリングが減少し、ピークとしてカウントされるようになるために、結果として面積値が大きくなったためと推測された。今後、TBZの定量性向上のためには、TBZの安定同位体の市販が待たれると同時に、この点について検討を行うことも必要である。

添加回収実験の結果を用いて、実試料の標準偏差の3倍を検出限界値 (MDL) として計算した結果を Table 3 に示した。MDL は、河川水で MBC が 0.32 ng/l, TBZ が 0.93 ng/l, 下水処理場放流水で MBC が 5.6 ng/l, TBZ が 4.9 ng/l であった。

環境水における MBC と TBZ の定量に固相濃縮と LC/ESI-MS/MS を用いて、20～100 ml の試料から ng/l レベ

ルの分析を簡便に精度良く行うことができた。本法は、下水処理場放流水を含めた河川全域での濃度分布を明らかにするための、有用な測定法になりうるものと考えられる。

(2000 年 6 月, 日本環境化学会第 9 回環境化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 弓削 治, 横山 浩, 坂上吉一: “抗菌のすべて”, (1997), (繊維社).
- 2) “*Metabolic Pathways of Agrochemicals Part 2: Insecticides and Fungicides*”, Edited by T. R. Roberts, D. H. Hutson, P. J. Jewess, P. W. Lee, P. H. Nicholls, J. R. Plimmer, p. 1105 (1999), (The Royal Society of Chemistry, Cambridge).
- 3) 東京都環境局: 平成 10 年度東京都河川・内湾の内分泌かく乱化学物質環境汚染状況調査結果 (概要), <http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/mizu/kansi/horumon/kekka1998.htm>.
- 4) K. A. Bean, J. D. Henion: *J. Chromatogr. A*, **791**, 119 (1997).
- 5) 環境庁水質保全局: “農薬等の環境残留実態調査分析法”, p. 51 (2000), (大蔵省印刷局).
- 6) 雨宮 敬, 酒井正美, 森 謙一郎, 鈴木助治, 風間成孔: 東京衛研年報, **35**, 133 (1984).
- 7) 滝埜昌彦, 山上 仰, 代島茂樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 555 (1997).
- 8) Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata: *J. Chromatogr.*, **481**, 147 (1989).
- 9) R. L. Foltz, R. W. Edom: *J. Mass Spectrom. Soc. Jap.*, **46**, 235 (1998).

要 旨

環境水中のカルベンダジム (MBC) とチアベンダゾール (TBZ) を LC/ESI-MS/MS により定量する方法を開発した。逆相系固相カートリッジを用いて濃縮した試料粗抽出溶液の測定において、マトリックス効果による感度低下が認められたので試料前処理法について検討した。その結果、試料濃縮後のカートリッジを 30 vol% メタノール水溶液と水で洗浄した後に酢酸エチルで溶出することで、内標準物質として添加した MBC-*d*₅ の回収率 85.4%, 相対標準偏差 (RSD) 11% と、試料マトリックスによるイオン化抑制の影響を軽減できた。この前処理法を用いた環境水での添加回収試験を行い、MBC の回収率は河川水への 5 ng/l と 50 ng/l の添加で 102% と 104%, 下水処理場放流水への 250 ng/l の添加で 106%, RSD は 1.9～3.4% と良好な結果を得た。同じく TBZ の回収率は 78.9～136%, RSD は 1.8～4.8% であった。検出限界を実試料の標準偏差の 3 倍としたときの値は、河川水で MBC が 0.32, TBZ が 0.93, 下水処理場放流水で MBC が 5.6, TBZ が 4.9 ng/l であった。