

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550064

研究課題名(和文) 精密質量解析に基づいた、標準物質が入手困難な農薬変化体の半定量方法の開発

研究課題名(英文) Detection of environmental transformation products without standard chemical reagent

研究代表者

高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)

鹿児島大学・理工学域工学系・准教授

研究者番号：40274740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計および液体クロマトグラフ-三連四重極型質量分析計を用いて、標準試薬を購入できない環境変化体を高感度分析するための技術を開発した。実験室内において、購入した未変化体(農薬)の水溶液にクセノンランプ光を照射して環境変化体を生成させた。生成したクルードな環境変化体を標準試薬の代わりに用いて、三連四重極型質量分析計の測定条件を定めた。定めた測定条件を用いて環境サンプル中の変化体を標準試薬を用いずに検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Using a liquid chromatograph-high resolution mass spectrometer (LC-MS) and a liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS), we have developed a new technique to detect environmental transformation products (TPs) without any standard chemical reagent. A purchased reagent was irradiated with a Xe lamp to produce the TPs. The produced TPs were not purified and used as a crude sample. The crude sample was injected to LC-MS/MS to determine selected reaction monitoring (SRM) conditions. By using the determined SRM conditions, unreported TPs were successfully detected from actual environmental samples.

研究分野：環境質量分析

キーワード：環境変化体 農薬 LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

現代の農業において農薬の使用は必要不可欠と考えられており、多種多様な農薬が世界各国で継続的使用されている。定められた使用方法で使用されている限り、検討した範囲内の悪影響は生じないことが確認されているが、使用状況が想定外な場合や、特殊な自然環境が影響した場合などで悪影響が生じることがある。このため、様々な農薬を対象に、世界各国から水環境中の農薬濃度の環境モニタリング結果が継続的に報告されている。

一般的に、農薬は、環境中に意図的に散布することによって機能を果たす。意図的な散布が前提であるため、他の化学物質と安全性に対する考え方が異なる。例えば、農薬の安全性評価時には、植物中での主要な代謝産物の安全性評価なども実施されている。また、農薬は、環境や生物体中で分解、代謝されやすく設計されており、河川水などの水環境中への残留性が低くなっている。このため、河川水中の農薬濃度を測定した多くの文献においては、ppb オーダーの濃度以下で検出されることが多い。このように、農薬の環境安全性は厳重に管理されていると考えてよい。

しかし、環境中に散布された農薬は、ただちに水や二酸化炭素などの最終分解物まで分解されるとは限らず、加水分解物や光分解物などの環境変化体が生ずる可能性がある。たとえば、米国において、河川水中のアセトクロルおよびその変化体であるアセトクロルオキサニリド酸の濃度を測定した結果、中央値を比較すると変化体の方が138倍高濃度と報告されている。その他にも、米国において、33種類の農薬の総濃度とそれらの変化体の総濃度を測定した結果、変化体の方が100倍程度高濃度の場合が報告されている。

以前、実環境中の農薬およびその環境変化体の濃度を予備調査した結果、変化体が農薬よりも高濃度で検出される場合が認められた。このため、日本においても、農薬に加えて、変化体の環境モニタリングを実施することが重要と考えられる。

環境中の変化体を高感度分析するためには、三連四重極型質量分析を用いるのが適切であるが、三連四重極型質量分析による分析を実施するには、分析種の標準試薬が必要である。しかし、以前調査した548物質の変化体のうち、市販が確認されたのは172物質に過ぎず、多くの変化体の標準試薬は入手が困難であった。さらに、農薬水溶液に模擬太陽光を照射して生成した変化体を網羅的に探索すると、報告例を発見できない未知変化体が数多く検出される場合がある。

以上のように、農薬の環境変化体の多くは標準試薬の入手が困難であり、三連四重極型質量分析計を用いて環境モニタリングするためには、標準試薬の合成・精製が必要となる。標準試薬の合成・精製には、コスト、労

力、時間を必要とするが、合成・精製した標準試薬を用いて環境モニタリングをした結果、検出率が低い物質があると予想され、研究効率が低いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的を、液体クロマトグラフ - 三連四重極型質量分析による環境変化体の高感度検出を、標準試薬を用いず可能とする技術を開発することとした。この検討を、殺虫剤ジノテフランをモデル物質として実施した。さらに、開発した技術で実環境サンプル中のジノテフラン未知環境変化体を検出できることを確認した。

本技術が確立されれば、環境中からの検出頻度・推定検出濃度が高い変化体を優先的に合成することができるため、研究効率が向上すると期待される。

また本技術は、農薬の環境変化体に限らず、化成品の変化体など、混合物として標準物質が得られる場合に有効であり、応用範囲が広いと期待される。

3. 研究の方法

3.1 光照射サンプルの調製

ジノテフラン(残留農薬試験用、和光)を超純水に溶解し、1 mMの水溶液を調製した。調製した水溶液を石英セルに入れ、ロングパスフィルターWG295を透過したクセノンショートアークランプ光を照射して光照射サンプルを得た。同時に、ジノテフランを加えていないブランクサンプルを調製して、同様に光照射実験を実施した。光照射実験は、光強度50.1~51.8 W/m²(波長280~800 nm)、温度19.1~22.7 で52時間実施した。

3.2 未知環境変化体の探索

調製した光照射サンプル中に含まれる未知環境変化体を、高分解能・高質量精度LC-MS(LC-20AD-LTQ Orbitrap XL, 島津、Thermo Fisher Scientific)を用いて探索した。その際、LCの固定相にODSカラムであるL-column 2 ODS(2.1×75 mm, 2 μm、化学物質評価研究機構)、移動相Aに0.05 v/v%のギ酸を含む水、移動相Bに0.05 v/v%のギ酸を含むメタノールを用いた。分析は、isocratic測定で実施され、2% B, total flow rate 0.4 mL/minとした。分離された分析種は、設定質量分解能を10万、イオン化方法をelectrospray ionization (ESI)法、イオン化モードをpositive ion mode、lock massをm/z391.28429(diisooctyl phthalate)として探索された。

3.3 選択反応モニタリング条件の検討

探索により発見された未知変化体の選択反応モニタリング(SRM)条件を、高感度LC-MS/MS(UltiMate DGP-3600SD-TSQ Quantiva, Thermo Fisher Scientific)を用いて検討した。イオン化方法をESI法、イオ

ン化モードを positive ion mode とし、collision gas には、アルゴンを用いた。検討する際、3.2に示した固定相、移動相および分離条件を用いることにより、分析種のカラム保持時間 (RT) を、LC/MS を用いた測定と LC-MS/MS を用いた測定で一致するようにした。LC/MS による分析で、それぞれの分析種の付加イオンの種類と RT が特定されているため、これらの付加イオンの m/z と RT をもとにして SRM 条件を検討した。サンプルの注入体積は、1 μL とした。

3.4 実環境サンプルへの適用

検討した SRM 条件を用いて、実環境サンプル中のジノテフラン未知環境変化体を検出できることを確認した。実環境サンプルは、有人ヘリコプターによるジノテフラン航空散布が実施された地域の河川水、水田に隣接する、シラン処理したガラス瓶に入れて密栓し、遮光して実験室に搬送した。搬送後、直ちに GF フィルターでろ過し、SPE カートリッジ (Sep-Pak PS2, Sep-Pak AC-2、日本ウォーターズ) を用いて 100 倍に濃縮した。濃縮したサンプルは -20 の冷凍庫でシラン処理したネジロバイアル瓶に入れて密栓して保存し、分析に供した。

4. 研究成果

4.1 未知環境変化体の探索

光照射したサンプルに含まれる未知変化体を高分解能・高質量精度 LC-MS で探索した結果、数多くの未知変化体が発見された。発見された未知変化体の中には、分子量がジノテフランの 2 倍以上であり、ジノテフラン 2 分子が会合して生成したと考えられる物質が数多く含まれていた。本研究においては、ジノテフランの濃度を、実環境より 1 万倍程度以上高濃度な 1 mM として光照射実験を実施した。このため、実環境中で生成しにくいと予想されるジノテフランの 2 倍以上の分子量の変化体が発見されたと考えられる。本研究で開発した技術の有効性を確認するために、本技術を実環境試料に適用する必要があると考え、以下の検討ではジノテフランの分子量より 50 Da 大きい 252 Da 以下の変化体に限定した。また、ジノテフランのトキシコフォアを保存している可能性が高い分子として、 $\text{C}_7\text{N}_3\text{O}_3$ 以上の原子数で構成されている物質に限定した。

多種類の付加イオンが観察され、分子式を

表1 決定されたSRM条件

番号	分子式	precursor [m/z]	RT [min]	RFレンズ[V]	定量イオン [m/z]	定量イオンのCE [V]	確認イオン [m/z]	確認イオンのCE [V]
変化体1	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$	219	0.9	34	188	17	142	20
変化体2	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$	219	1.1	32	114	20	100	17
変化体3	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$	219	1.4	28	114	15	-	-
変化体4	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$	219	1.7	26	173	10	87	20

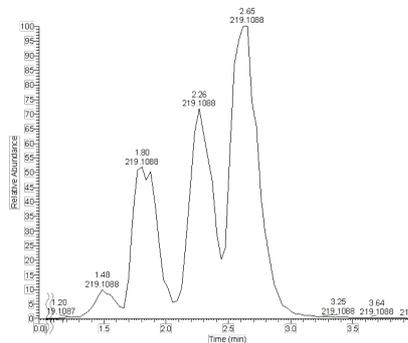


図1 高分解能・高質量精度LC-MSで発見された未知変化体のEICの例

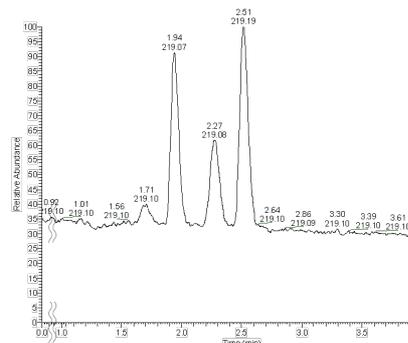


図2 高感度LC-MS/MSにより測定された未知変化体のSIMクロマトグラムの例 (holdup time補正: +0.8 min)

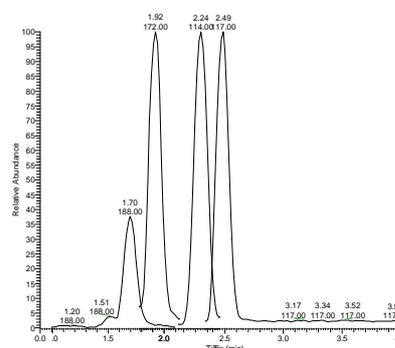


図3 標準試薬を用いずに決定されたSRM条件による未知環境変化体のSRMクロマトグラムの例

決定できた物質の中から、報告例を発見できない $[M+H]^+ = 219.1088$ 、分子式 $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ の物質を発見した。このため、標準物質が入手困難な物質のモデル物質として、この物質に着目して以下の検討を実施した。この物質については、異性体が 3 物質 (以下、未知変化体 1~4) 発見された。光照射時間 16 時間のサンプルを例として、発見された未知変化体 1~4 の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を図 1 に示す。未知変化体 1~4 のカラム RT は、それぞれ 1.48 分、1.80 分、2.26 分、および

2.65分であった。

4.2 選択反応モニタリング条件の検討

未知変化体 1~4 について、LC-MS/MS を用いた測定においても、同一の m/z と同一の RT でクロマトグラムピークが得られるか否かを検討した。検討は、LC-MS/MS を用いた SIM 法により実施した。実験に用いる機器が異なると、配管の長さなどが異なるために holdup time が異なり、同一物質を同一条件で測定しても RT が異なる。このため、機器による holdup time の違いを補正する必要がある。本実験では、既知物質の RT を LC-MS と LC-MS/MS の両方で測定し、その RT の差に基づいて 0.8 分間の補正を行った。この補正を実施した結果、図 2 に示すクロマトグラムが得られ、LC-MS を用いた測定と LC-MS/MS を用いた測定とで、ほぼ同じ結果が得られることが確認された。

未知変化体 1~4 の precursor ion の m/z と RT が確認されたので、LC-MS/MS を用いて、RF レンズの電圧、collision energy (CE)、product ion を検討し、SRM 条件を定めた。その結果を表 1 に示す。決定した SRM 条件を用いて SRM クロマトグラムを取得したところ、図 3 に示すクロマトグラムを得ることができ、決定された SRM 条件が正しいことが確認された。なお、図 1 および 2 の実験における RT と図 3 の実験における RT に誤差が認められる。この誤差は、実験日の違いに伴う移動相組成の誤差に由来すると考えられる。

4.3 実環境サンプルへの適用

実環境サンプルに適用した例を図 4 に示す。図 4 に示したように、標準試薬を用いずに実環境試料中に含まれる構造が未知な環境変化体を検出することに成功した。なお、図 1~3 の実験における RT と図 4 の実験における RT に誤差が認められる。この誤差は、実験日の違いに伴う移動相組成の誤差に由来すると考えられる。

得られたピーク面積から未知変化体の環境中濃度を算出するためには、未知物質の標準試薬を用いて検量線を作成する必要がある。しかし、本研究では、標準試薬の入手が困難な変化体を検討対象としており、検量線を作成することができない。そこで、変化体の出発物質である農薬の検量線を用いて、環境中の推定濃度を求めた。その結果、図 4 のピーク面積から推定される未知変化体の環境中濃度は 0.8~50 ppt であった。

分析種により LC/MS による感度が大きく異なるために一概には言えないが、一般的には、サブ ppt オーダーの有機性環境汚染物質の測定には高感度分析が可能な LC-MS/MS が必要になることが多い。本研究で採取した実環境サンプル中の未知変化体の濃度も、LC-MS では感度不足で測定困難な可能性が高い。そのようなサンプルを対象にして、高感度・高選択性の測定が実施できたことは意義深い。

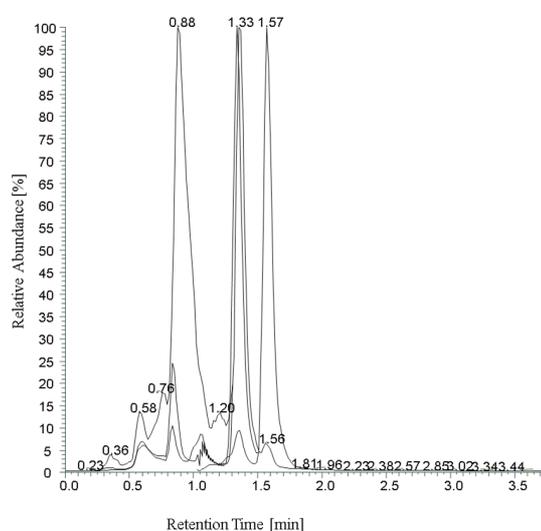


図4 本研究で開発した技術を実環境サンプルに適用した例

5. 主な発表論文等

(学会発表)(計5件)

橋本 扶美、北之園 龍介、有島 由紀子、高梨 啓和、中島 常憲、大木 章、上田 岳彦、門川 淳一、石川 英律、宮本 信一、イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定、第 50 回日本水環境学会年会、2016 年 3 月 16~18 日、アスティとくしま(徳島県・徳島市)

橋本 扶美、北之園 龍介、有島 由紀子、高梨 啓和、中島 常憲、大木 章、上田 岳彦、門川 淳一、石川 英律、宮本 信一、イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水からの検出、日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会、2016 年 2 月 27 日、佐賀大学本庄キャンパス(佐賀県・佐賀市)

Fumi HASHIMOTO, Hirokazu TAKANASHI, Ryusuke KITANOSONO, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takehiko UEDA, Jun-ichi KADOKAWA, Hidenori ISHIKAWA and Nobukazu MIYAMOTO, Unknown exploring of pesticide transformation products in water environments (PTPWs), Proc. the 24th Korea-Japan Symposium on Water Environment 2015, Seoul(Korea), Oct., 18-20., 2015.

橋本 扶美、高梨 啓和、中島 常憲、大木 章、上田 岳彦、門川 淳一、石川 英律、宮本 信一、ネオニコチノイド系農薬 imidacloprid とその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定、第 18 回日本水環境学会シンポジウム、2015 年 9 月 14~15 日、信州大学長野(工学)キャンパス(長野県・長野市)

橋本 扶美、有島 由紀子、高梨 啓和、中島 常憲、大木 章、上田 岳彦、門川 淳一、石川 英律、宮本 信一、農薬環境変化体の環境モニタリング~親農薬と変

化体のリスク比較～、環境科学会 2015 年
会、2015 年 9 月 7～8 日、大阪大学吹田キ
ャンパス（大阪府・吹田市）

6．研究組織

(1)研究代表者

高梨 啓和 （TAKANASHI, Hirokazu）
鹿児島大学・学術研究院・理工学域工学
系・准教授
研究者番号：40274740