

[ノート]

底質中におけるベノミルの分析法

吉田 光方¹ 森口 祐三¹ 松村 千里¹ 中野 武¹

¹ 兵庫県環境研究センター 安全科学科 (〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27)

Analysis of the Benomyl in Sediment Samples

Mihoko YOSHIDA¹ and Yuzo MORIGUCHI¹, Chisato MATSUMURA¹, Takeshi NAKANO¹

¹ Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Environmental Sciences,
3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan

Analytical method using solvent extraction, solid-phase adsorption and LC/MS/MS-SRM for determination of benomyl in sediment has been established. 10ng MBC-*d*₃ is added as surrogate standard substance. Quantity of benomyl is determined referring MBC standard calibration curve because benomyl is hydrolyzed and converted to MBC. The recovery rate from benomyl additive sediment samples is 104%, and the method detection limit (MDL) is 0.32ng / g-dry, and method quantitation limit (MQL) is 0.83ng / g-dry. These experimental results are considered to be applicable for environmental sediment sample.

はじめに

近年、農薬は食料の安定生産のために不可欠なものとなり農耕地はもちろんのこと、病害虫駆除や景観維持の目的で、家庭内、山林や公園、ゴルフ場等あらゆる場所で散布されている。日本では平成 15 年 10 月～平成 16 年 9 月における国内での農薬出荷額は 3,603 億円、出荷数量は 283 千 t であり、そのなかで兵庫県は 57 億円、3,843 t を占めていた¹⁾。

また平成 16 年 9 月末時点において登録されている農薬は、殺虫剤 1,424 件、殺菌剤 1,093 件、除草剤 1,379 件を含む合計 4,781 件と膨大な数であり、その使用により環境中に広く拡散し、人体への影響が懸念されている。加えて環境ホルモンや POPs をはじめとする微量有害物質に農薬の占める割合は高く、「平成 10 年度環境ホルモン緊急全国一斉調査」の結果を踏まえ実施された「平成

12 年度農薬の環境動態調査」²⁾では、調査対象とした 9 物質のうち、水質から 7 物質、底質から 4 物質、水性生物(魚類)から 3 物質が検出される結果となった。なかでも水質調査結果で最も検出率の高かったカルベンダジム(以下 MBC と記す)は、殺菌剤として使用されるベノミルやチオファネートメチルが環境中で加水分解を受け生成される物質である。

この殺菌剤ベノミルは、正式名称が N-[1-(N-n-ブチルカルバモイル)-1H-2-ベンゾイミダゾリル]カルバミン酸メチル、魚毒性が B 類、PRTR 法では第 1 種指定化学物質に、水道水質管理目標設定項目では 0.02mg/L の基準が定められている農薬である。また、ベノミルは浸透性があり、土壌吸着係数は 1,910³⁾であることから、環境中での拡散過程で、土壌への移行や食物連鎖での生物濃縮も懸念される⁴⁾。

そこで、本研究ではベノミルの環境底質中での

存在状況を把握することを目的として、MBC を定量することで底質におけるベノミルの分析法を確立し、底質試料の分析を行ったので、その結果を報告する。

方法

1. 分析対象物質

ベノミル及びその分解物であり、環境中での分析対象とする MBC の構造式を Fig.1, 物理的性状を Table1 に示す。

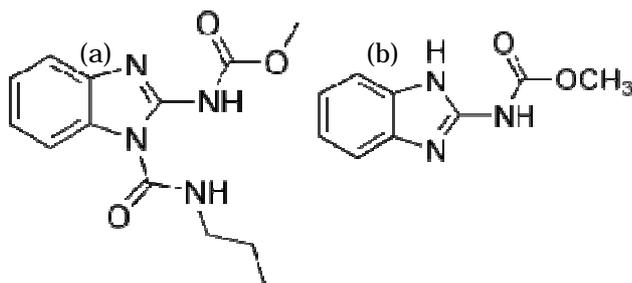


Fig.1 Benomyl(a) and MBC(b) structural formula

Table1 Physical property of Benomyl and MBC

	Benomyl	MBC
molecular formula	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
molecular weight	290.3	191.2
melting point ()	140	307 - 312
vapor pressure (mmHg)	3.70E-09 (25)	-
aqueous solubility (mg/L)	3.8 (20)	28 (pH4) 8 (pH7) (20)
log Pow	2.12	1.49
soil adsorption constant	1910	-

2. 試料及び試薬

分析法の検討に使用した底質は、姫路沖で 2006 年から 2007 年の秋季に採取した後、湿泥の状態を冷蔵保存していたものを試料として用いた。含水率は概ね 50%程度であった。

採取方法については、環境省編集「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁵⁾における「試料の採取方法」及び「試料採取にあたっての留意事項」に従った。

ベノミル及び MBC の標準品は、和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を、サロゲート物質には、MBC の同位体である林純薬工業(株)製のカルベンダジム-d₃ (以下 MBC-d₃ と記す)を用いた。

アセトン、アセトニトリル、メタノールなどの有機溶剤は、残留農薬試験・PCB 分析用 (5000 倍濃縮) の高純度のものを、その他塩酸などの試薬は、試薬特級もしくは残留農薬試験・PCB 分析用を用い、いずれも被験物質の測定を妨害しないことを確認した。

また、底質試料の抽出液の調製には、固相カートリッジ (Waters 製 PS-2) を使用した。

3. 分析手法及び前処理法

3.1 底質資料の前処理法

湿泥試料 20 g (含水率; 50%として乾泥量換算 10g 相当) を遠沈管に分取し、MBC-d₃ を 10ng 添加し、1 mol/L 塩酸 0.5mL 加えた後、アセトン 50mL を加え、超音波、振とうを各 10 分行い溶媒抽出を行う。3000rpm で遠心分離後、アセトンを分取し、再度アセトン 50mL を加え同様の操作を行った後、分取した有機層をアセトン臭がなくなるまで、5mL 以下に濃縮する。

3.2 試料溶液の調製

濃縮したアセトンを精製水 500mL に加え混合し、PS-2 カートリッジに流速 15mL / 分で吸着させる。カートリッジに窒素ガスを約 20 分通気乾燥後、メタノールで溶出し、ターボバップで約 1mL に濃縮する。PS-2 カートリッジは、予めメタノール、精製水でコンディショニングを行っておく。

3.3 標準溶液の調製及び検量線の作成

標準物質及びサロゲート物質 MBC-d₃ をそれぞれ 10 mg 正確にはかり取りアセトニトリルで 10 mL とし、1000 µg/mL の標準原液を作成する (冷蔵保存標準原液とする)。以下、適宜メタノールで希釈し、内標準を添加して低濃度標準液を調製する。

本報告の検量線は、MBC 標準液を濃度範囲 1 ~ 100 ng/mL, 内標準 MBC-d₃ 10 ng/mL に調製した標準液を用い作成した。

3.4 定量及び濃度の算出方法

試料液 10 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質 MBC のピーク面積と内標物質 (サロゲート) MBC-d₃ のピーク面積比から求めた検量線により試料液中濃度を算出する。MS の検出には、SRM (Selected reaction monitoring) で特定のプレカーサーイオンから生成するプロダクトイオンのみを検出する

方法を用い、バックグラウンドノイズの低下による高感度分析を行った。

ベノミルは、環境中では加水分解を受け、そのほとんどが MBC として存在する⁶⁾。そのため、本報告において、ベノミルの濃度は、MBC の定量値を 1.52 倍(ベノミルの分子量を MBC の分子量で除した値)してベノミル濃度に換算する⁷⁾⁻¹¹⁾。

3.5 高速液体クロマトグラフ質量分析

分析には、LC; Agilent 1100, MS; Thermo LCQ の高速液体クロマトグラフ質量分析装置を使用し

Table2 Analytical condition for Benomyl and MBC with LC/MS/MS

LC condition			
Instrument	Agilent 1100		
Column	Ascentis C18 (Supelco 15 cm × 2.1 mm, 3 μm)		
Mobile Phase	A: Methanol		B: Purified water
Gradient	0	7 min	A: 60 85 % B: 40 15 %
	7	20 min	A: 85 85 % B: 15 15 %
	20	22 min	A: 85 60 % B: 15 40 %
	22	30 min	A: 60 60 % B: 40 40 %
Flow rate	0.2mL/min		
Column temp.	40		
Injection volume	10μL		
MSMS condition			
Instrument	Thermo LCQ		
Ionization Mode	ESI-positive		
Source temp.	260		
Cappillary voltage	8 V		
Relative Collision Energy	30 %		
	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	
Compound name			
Benomyl	291	192	
MBC	192	160	
MBC- <i>d</i> ₃	195	160	

た。カラムは、Supelco 社の Ascentis C18(長さ 15 cm 内径 2.1 mm, 3 μm)を使用した。その他測定条件は、Table2 に示す。

結果および考察

1. 標準物質の SRM クロマトグラム

Fig.2-1 にベノミル Fig.2-2 に MBC の標準物質の SRM クロマトグラムを示す。いずれも標準物質 20ng/mL, 内部標準物質 MBC-*d*₃10ng/mL のメタノール溶液を用いた。

ベノミル 20ng/mL は調製後すぐに測定すると、ベノミルのピークに加え、分解された MBC ピークが確認されるが、時間経過するにつれ、ベノミルのピークは確認できなくなり、全てが分解物の MBC のピークとして検出された。ベノミル 2ng/mL 程度の低濃度の標準物質では調製後すぐに測定しても、ベノミルのピークは検出されなかった。

MBC 20ng/mL の SRM クロマトグラムは、ベノミルのピークはみられず、MBC ピークのみが確認された。以上のことから、ベノミルの定量は MBC の検量線を作成して MBC の測定値を 1.52 倍してベノミル換算値とする方法とし、環境中で分解しきれずに存在するベノミルについては、SRM でピークを確認することとした。

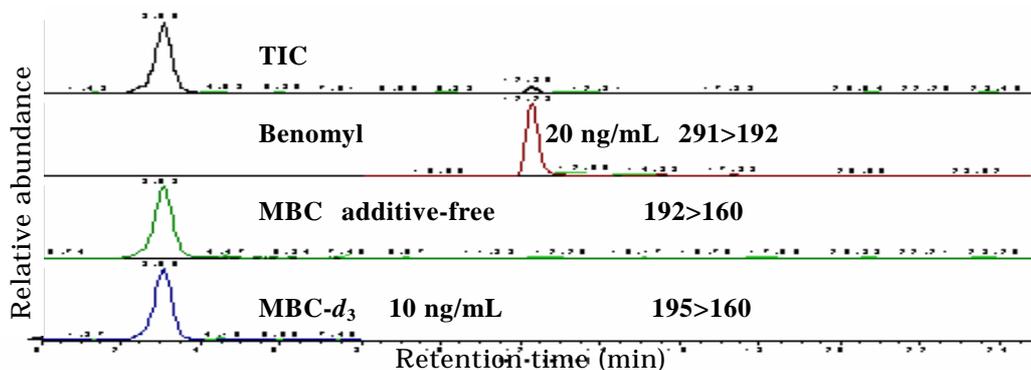


Fig.2-1 SRM chromatogram of Benomyl standard

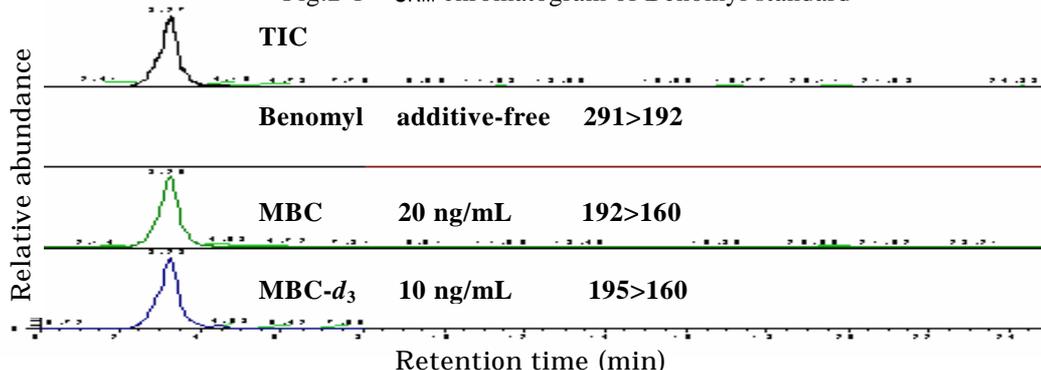


Fig.2-2 SRM chromatogram of MBC standard

2. 検出下限値及び定量下限値

前章の3.3.3の方法により、内部標準物質 MBC- d_3 との面積比から作成した検量線の一例を Fig.3 に示す。

検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) は、環境省編集「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁵⁾に従い、底質 10g(乾燥量換算)にベノミル 10ng を添加して MBC 標準の検量線で測定し、ベノミル濃度に換算することにより求めた。

その結果、MDL:0.32ng/g-dry MQL:0.83ng/g-dry の値が得られた。

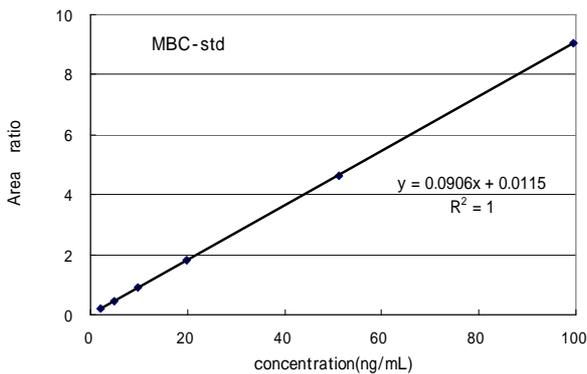


Fig.3 Standard curve of MBC

3. 添加回収試験

ベノミル 10ng を底質 10g (乾燥量換算) に同じように添加した7つのサンプルを 3.1 3.2 の方

法により調整、分析を行い、回収率及び変動係数を求めた。その結果、ベノミルの回収率は 104%、変動係数は 6.6%と良好な値が得られた。

4. 環境試料への適用

姫路沖底質のベノミル測定結果を Fig.4-1 に示す。この SRM クロマトグラムの試験溶液には、測定時に内部標準物質 MBC- d_3 以外の添加物質はなかったが、分析対象物質の MBC が標準物質と同じ保持時間に検出され、ベノミルに換算し 0.52 ng/g が検出された。一方、ベノミルの保持時間にピークは検出されなかった。

底質 10g にベノミルを 1000ng 添加し上記の環境試料と同様の操作を行った測定結果を Fig.4-2 に示す。この SRM クロマトグラムの試験溶液には、Fig.4-1 と同等の MBC が存在するが、それに加えてベノミルから分解された MBC が上乘せされたピークが検出された。一方で、添加したベノミルは保持時間にピークは検出されず、全てが MBC に分解されたものと考えられた。

結論

本法において、溶媒抽出、固相吸着を用い底質中に存在するベノミルの微量分析を行う手法の検討を行い、以下の結果を得た。

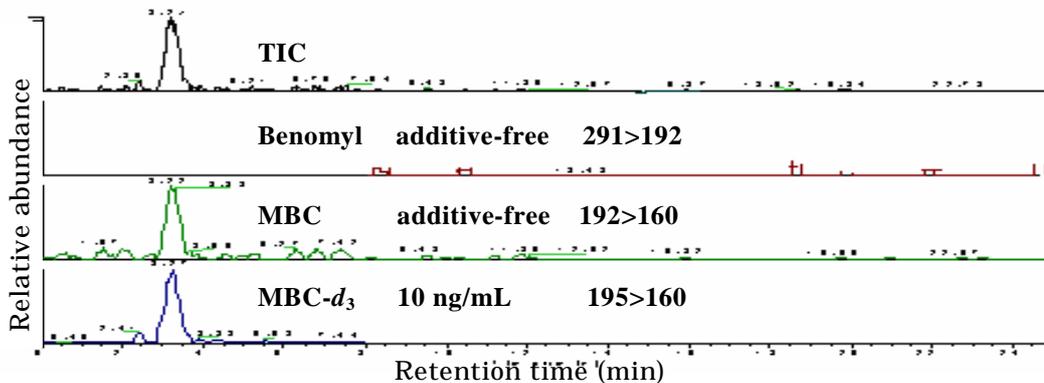


Fig.4-1 SRM chromatogram of sediment

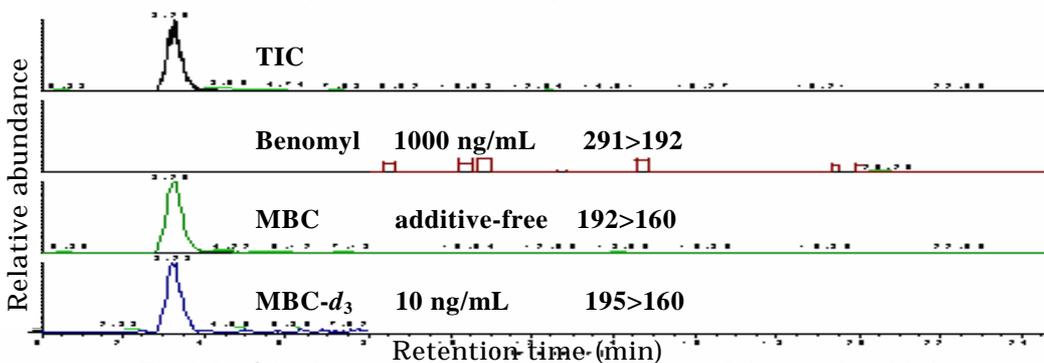


Fig.4-2 SRM chromatogram of sediment 1000ng/mL benomyl - added

ベノミル及びMBCは、メタノール、精製水のグラジエントにより、3.3分及び12.2分の保持時間でピークは良好に分離され、本法で示した測定条件で分析可能であることが確認された。

ベノミルの定量には、その分解物であるMBCの検量線を用い、MBCの定量値をベノミルの分子量をMBCの分子量で除した値；1.52倍してベノミル濃度に換算した。

底質試料の分析には内部標準物質MBC- d_3 を添加し、標準物質との面積比から濃度を算出した。その結果、MDLは0.32ng/g-dry、MQLは0.83ng/g-dryと環境試料へ適用可能な低濃度レベルが得られた。

底質試料にベノミル10ng添加した回収試験（底質試料濃度1 μ g/kg-dry）では、回収率104%、変動係数6.6%であった。

環境底質試料を分析したSRMクロマトグラムには、夾雑物の影響は見られず0.52 ng/g-dryのベノミルが検出された。

以上の結果から、MBCから換算する底質試料のベノミルの分析法を確立し、環境試料でのベノミルを定量した。

本法では、ベノミルが分解されMBCになることを前提として分析法を確立したため、分解しきれず残存するベノミルについてはピークの確認は保持時間によって行うが、定量については未検討である。また、MBCの由来までは突き止められないため、検出されたMBCは全てベノミル由来として全量をベノミルに換算する手法としている点の注意が必要である。

文 献

- 1) 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-2005-、p1-3、132-139、206-209、263-275、470、日本植物防疫協会、東京(2005)
- 2) 環境省環境管理局水環境部土壌環境課農薬環境管理室：平成12年度農薬の環境動態調査の結果について
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1302/mat03.pdf> (参照 2009.10.1)
- 3) 鍬塚昭三・山本広基著：土壌中における農薬の挙動 農薬の吸着と移動,土と農薬(社), 日本植物防疫協会発行, pp87 (1998)
- 4) SISLER H D :Biodegradation of agricultural fungicides, 323-355, PB Rep. , USA Univ. Maryland(1982)
- 5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き(平成17年度版) 平成18年3月(2006)
- 6) SINGH R P, BRINDLE I D :Kinetic study of the decomposition of methyl [1-(butylcarbamoyl)-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate(benomyl) to methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate(MBC). J Agric Food Chem , 38(8), 1758-1762 (1990)
- 7) 平生進吾, 渡辺正敏：LC/MSによるベノミルの分析法検討 . 名古屋市環境科学研究所報, 38, 47-51(2009)
- 8) 渡辺正敏ら：LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究(40) . 第18回環境化学討論会講演要旨集, 822-823(2009)
- 9) 酒井奈穂子, 高野伊知郎：HPLCによる農産物中のカルベンダジム,チオファネートメチル及びベノミルの分析 . 東京都健康安全研究センター研究年報, 56, 157-160(2006)
- 10) 古川浩司, 河野一之：LC/MSを用いた内分泌攪乱化学物質分析法の検討-メソミル・ベノミルの同時一斉分析法 . 三重県環境保全事業団研究報告, 9, 101-105(2003)
- 11) 上村仁, 節田節子：LC-MS/MSを用いた水中のベノミルの高感度分析 . 神奈川県衛生研究所研究報告, 29, 36-38(1999)