

質量分析計付高速液体クロマトグラフを用いたゴルフ場排水中のイミノクタジン3酢酸塩の分析法

中川和子¹, 吉川俊一¹, 大石次郎¹, 寺井洋一¹

Determination of iminoctadine triacetate in waste water from golf course by liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometric (LC/ESI-MS)

Kazuko NAKAGAWA, Shunichi YOSHIKAWA, Jiro OISHI, Youichi TERAJ

Abstract : A simple method of analysis iminoctadine triacetate analysis in waste waters from golf courses was developed. To achieve satisfactory identification and determination by LC/ESI-MS analysis, four kinds of analytical columns including both reverse phase and normal phase were examined.

Among these, the reverse phase column having long chain alkyl groups (Divelosile C30UG-3) gave a satisfactory separation of iminoctadine triacetate on the chromatography. The condition using ODS column in combination with a mobile phase containing ion pair reagent gave the most excellent separation, but had the disadvantage of instability in the retention time of iminoctadine triacetate.

The analytical condition using normal phase column was inappropriate because it gave a broad peak of iminoctadine triacetate with high tailing factor.

In the pretreatment process, WCX short column was chosen to extract iminoctadine triacetate from waste waters, which does not need to add HCl in the eluate solution as other short column (e.g. CBA column) does. By the method using WCX column in the pretreatment process as well as Divelosile C30UG-3 column in LC/ESI-MS analysis, the recovery percentage of spiked iminoctadine triacetate in waste waters ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) was determined to be 93% in average. The quantification limit of iminoctadine triacetate was $0.0004 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ in water samples.

key Words : イミノクタジン3酢酸塩 iminoctadine triacetate, エレクトロスプレーイオン化質量分析計付高速液体クロマトグラフ liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometric (LC/ESI-MS), ゴルフ場排水 waste waters from golf course

I はじめに

イミノクタジン3酢酸塩 (Fig.1) は菌体の脂質生合成系を阻害するグアニジン系殺菌剤であり、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁防止法に係る暫定指導指針」¹⁾に基づき暫定指針値が設定されている。同暫定指導指針に記載されているイミノクタジン3酢酸塩の分析法によれば、試料水から液々抽出した後、弱陽イオン交換ミニカラムで精製し、ポストカラム反応槽付き高速液体クロマトグラフでイオンペア剤を含む移動相を用いて分離し、蛍光検出器で定量している。しかし、前処理操作が2段階で煩雑であり、さらにポストカラム反応装置が必要である。この方式による分析条件について、栃木県保健環境センター²⁾は、ポストカラム反応槽とHPLC条件の検討を、伊吹ら³⁾、高尾ら⁴⁾は、それに加えて前処理における固相抽出条件の検討結果を報告している。しかし、目的物質同定の信頼性の点では質量分析計による分析が望ましいと言え

る。

一方、大野⁵⁾はイミノクタジン3酢酸塩を逆相系固相カラムで抽出し、ODS系カラムを使用しLC-MS/MSで測定している。しかし、イミノクタジン3酢酸塩は極性の高い物質でありODS系カラムによる測定は、一般的に難点があると考えられる。そこで私達は各種の異なった特性をもつカラムと移動相によるイミノクタジン3酢酸塩のクロマトグラムを検討し、良好な分離精度及び十分な定量下限値を確保するLC-MS分析法を見出した。さらに、試料水からの抽出、クリーンアップについても簡便な方法を検討したので以下に報告する。

II 実験方法

1. 試料

京都市内一ゴルフ場からの排水 (イミノクタジン3酢酸塩及びイミダクロプリドが検出されないことを確認したもの)

2. 試薬及び標準品

¹ 京都市衛生公害研究所 環境部門

- 1) イミノクタジン 3 酢酸塩標準品：和光純薬工業（株）製残留農薬試験用農薬標準品をメタノールに溶かし 350 mg・l⁻¹としたものを標準原液とし、適宜希釈して標準溶液として用いた。
- 2) イミダクロプリド標準品：和光純薬工業（株）製残留農薬試験用農薬標準品をメタノールに溶かし1000mg・l⁻¹としたものを内部標準物質として用いた。
- 3) オアシスWCX：日本ウォーターズ・リミテッド製（150mg）。イミノクタジン 3 酢酸塩の抽出、クリーンアップ用カラムとして用いた。
- 4) メタノール及び蒸留水：ナカライテスク製残留農薬分析用（濃縮 5000）又は高速液体クロマトグラフ用を用いた。
- 5) ギ酸：ナカライテスク製特級
- 6) 20mM リン酸緩衝液：リン酸 1 カリウム（ナカライテスク製特級）2.713g を蒸留水 1000ml に溶かした溶液 400ml に 0.1mol/l 水酸化ナトリウム（ナカライテスク製特級）溶液を 7 ml 加えて pH 7 に調製した。
- 7) 0.45 μm PTFE フィルター：
DISMIC-13HP（LC-MS 試験液調製用フィルター）

3. 装置

高速液体クロマトグラフ（HPLC）：（株）島津製作所製 LC-10ADvp 型ポンプ，
同 SCL-10Avp 型システムコントローラー，
同 CTO-10Acvp 型恒温槽，
同 SIL-10ADvp オートサンプラーにより構成されたものを使用した。

質量分析計：（株）島津製作所製 QP-2010 型

4. HPLC及びMS測定条件

1) HPLC測定条件

ガードカラム：Develosil C30-UG

2.0 × 10mm（野村化学製）

分析カラム：Develosil C30-UG-3

2.0 × 35mm（野村化学製）

カラム温度：40℃

移動相及びグラジェント溶出条件

A液：0.2%ギ酸水溶液（pH3に調製）

B液：メタノール

B液 10%の初期状態 1分保持後、10分で97%までB液濃度を上げる。

流速：0.2ml・min⁻¹

注入量：5 μl

2) MS条件

イオン化モード：ESIポジティブモード，プローブ電圧4kV

ネブライザーガス流量：1.5 ml・min⁻¹

CDL温度：250℃ CDL電圧：25 V

定量は内部標準法でおこなった。

5. 試験溶液調製法

100ml のゴルフ場排水を 0.1 %ギ酸を用いて、pH7 に調製し、あらかじめメタノール 5 ml と 20mM リン酸緩衝液（pH7）5 ml でコンディショニングしたWCXカラムに通水（5 ml・min⁻¹）した。カラムを 20mM リン酸緩衝液 5 ml で洗浄後、緩衝液を完全に流出させ、溶出液（10 %ギ酸アセトニトリル/10 %ギ酸メタノール溶液 8 : 2）20ml で溶出し、40℃で窒素パージ，乾固する。0.2 %ギ酸（pH3）/メタノール 9 : 1 2 ml を加え溶解し、内部標準物質としてイミダクロプリド 100mg・l⁻¹を 0.05ml 添加し 0.45 μm PTFE フィルターでろ過したものを LC-MS 試験溶液とする。

III 結果と考察

1. モニターイオン，参照イオンの確認

イミノクタジン 3 酢酸塩標準溶液 1 mg・l⁻¹を用いて質量分析計によるインヒュージョン測定を行った結果、以下に示すプロトン化分子イオンピークと多価プロトン化分子イオンピークを確認した。

$$(M+H)^+ = 356.5 \quad (M+2H)^{2+}/2 = 178.9$$

$$(M+3H)^{3+}/3 = 119.6$$

イミノクタジン 3 酢酸塩の定量用モニターイオンには 178.9 を用い、356.5、119.6 は参照イオンとした。また、内部標準物質イミダクロプリドのモニターイオンは、 $(M+H)^+ = 256.2$ を用いた。

2. HPLC条件の検討

最適なイミノクタジン 3 酢酸塩のクロマトグラムを得るため Table 1 に示す各種の分離カラムと移動相の条件を検討した。

条件 I では、一般的な ODS カラム（ODS-SR-5 関東化学製）を用いて、移動相のアセトニトリル比率を 10 %～80 % の範囲で変化させてイミノクタジン 3 酢酸塩の溶出挙動を見た。イミノクタジン 3 酢酸塩は、アセトニトリル濃度 20 % 以下では、溶出が認められず、アセトニトリル濃度 25～80 % の範囲でいずれも、ブロードなピークがホールドアップボリューム付近（1.3分）に現れた（Fig.2-a）。ピークのテーリング係数は、4.1 となり適正值とされている 0.6～1.5⁶⁾ の範囲から大きく外れ、かつ保持時間が短かすぎることから、イミノクタジン 3 酢酸塩の定量法としては不適切な条件と考えられた。

条件 II は、ODS系カラム (C18Xterra) を使用し、移動相に LC-MS 用イオンペア試薬であるヘプタフルオロ-n-酪酸を添加する条件である。ピークの形状はシャープであり、テーリング係数は 1.0 で適正值であり、検討した 4 つの分析条件 (Table 1) で最も良好であった (Fig. 2-b)。しかし、この条件で分析を継続すると、保持時間が短くなる (1 ヶ月間で半分に減少) 現象が起こるため、使用に適さなかった。この理由として、カラム充填剤であるシリカゲルのアルキル鎖の切断、もしくは、アルキル鎖にイオンペア剤が絡みつき、イミノクタジン 3 酢酸塩が保持されにくくなるものと推測される。

実際、HPLC-MS 装置全体の洗浄後、チューニングを行いネガティブモードのマスマスペクトルを測定したところ (Fig.3)、ヘプタフルオロ-n-酪酸の分子イオンである (M-H)⁻ = 213 が強く表れ、さらに、ヘプタフルオロ-n-酪酸のダイマーイオン (2×M-H)⁻ = 427 が、ベースピークとなり、本来ベースピークとなるべき (ラフィノース+ギ酸-H)⁻ = 549 のピーク強度が、著しく低下することを確認した。

条件 III では、親水性相互作用カラム (HILIC) と呼ばれる順相カラムの一種を使用した。これは、イオンに解離しているような高極性物質でも、高い有機溶媒濃度でカラムに保持することができるとされており (商品カタログより) その結果、検出感度が上昇すると期待されている。このカラムを用いたイミノクタジン 3 酢酸塩のピーク (Fig. 2-c) の保持時間は、良好な再現性を示したが、ピークのテーリング係数は 1.8 であり、形状もブロードなピークであった。ピーク形状改善のために、イソクラティック条件でメタノール/0.1 %ギ酸水溶液 = 1 : 1 移動相において、ギ酸水溶液の pH をアンモニア水を用いて各レベルに調製し、保持時間とピーク形状を検討したところ pH 4 で保持時間が最低となり、U字型保持挙動を示した (Fig.4)。次に、同条件でギ酸水溶液の pH を一定 (pH 3 と pH 4) としたものそれぞれについて、メタノール濃度を変化させてみると、この場合も、保持時間は U字型に変化した (Fig.5)。Fig.4, Fig.5 に示される保持時間極小値の左右のクロマトグラムでは、それぞれ逆相的、順相的な機構が働いていると推定できる。しかし、以上のような pH とメタノール濃度の調節によっても、ピーク形状の改善は認められず、さらに、グラジエント条件で分析してもピーク形状は、改善されなかったため HILIC カラムは不相当と判断した。

条件IVで使用したカラム (Divelossil C30-UG-3) は、長鎖のアルキル基を結合したカラムであり、移動相としてギ

酸/メタノールを使用した。ピークのテーリング係数は 1.1 で適正範囲内であり、保持時間の再現性も良好であった (Fig.2-d)。逆相系の一種であるにもかかわらずこのカラムがイミノクタジン 3 酢酸塩のような高極性物質を保持できる理由としては、アルキル鎖が長く立体障害を起こしやすいためその結合密度が低く⁷⁾、シリカ表面のシロキサン構造の影響が大きくなり、極性物質でも保持される機構が働くためと考えられた。

以上の検討の結果、ピークの再現性、テーリング係数、移動相による汚染の有無を考慮して、最終的に条件IVのカラム (Divelossil C30-UG-3) とギ酸/メタノール系の移動相を採用した。

3. イミノクタジン 3 酢酸塩抽出方法の検討

1) 前処理用ミニカラム

2 種類の弱陽イオン交換ミニカラムについて試料水の抽出、クリーンアップを同時に行うための検討を行った。なお固相抽出にはウォーターズ製エキストラクションマニホールドを使用した。

(1) ボンドエルトMEGABE-CBAカラム (リアン製 1 g) の検討 (以下CBAカラム) 抽出とクリーンアップは Fig.6 に従って行った。

(2) オアシスWCXの検討 (以下WCXカラム) 抽出とクリーンアップは 2.5 試験溶液調整法に従って行った。溶出液は Table 2 に示す 3 種類について検討した。

2) 各前処理用ミニカラムによるイミノクタジン 3 酢酸塩の溶出挙動

イミノクタジン 3 酢酸塩添加蒸留水液濃度 (0.2 mg·l⁻¹) 50mlについて各前処理用ミニカラムで溶出分画を確認した。

Fig.7 に示したとおり、CBAカラムでは 0 ~ 10ml の溶出分画に、WCXカラムでは、① 2 %ギ酸メタノールで 10 ~ 30ml、② 2 %ギ酸アセトニトリル/2 %ギ酸メタノール溶液 8 : 2 で 0 ~ 20ml、③ 10 %ギ酸アセトニトリル/10 %ギ酸メタノール溶液 8 : 2 で 0 ~ 20ml に溶出液量の範囲に溶出されることを確認した。

CBAカラムを用いる条件では、最初の 0 ~ 10ml に溶出し、添加回収率も良好な結果であった (0.01mg·l⁻¹濃度の試料水 200mlについて 82.5%)。窒素パージで乾固する際の塩酸の室内への揮散が著しく、作業環境の面で問題があり、さらに窒素パージ機器を腐食する問題があった。

3) WCXカラムによるイミノクタジン 3 酢酸塩の回収率 WCXカラムを用いて、イミノクタジン 3 酢酸塩添加蒸留水 (0.01mg·l⁻¹) 200mlについて上記に示した溶出液各① ~ ③を用いて添加回収実験を行った。前処理操作は

5. 試験溶液調製法に従った。Table 2に示すように、回収率は③ 10 %ギ酸アセトニトリル/10 %ギ酸メタノール溶液8 : 2の条件で最も高い結果であった。WCXカラムは逆相と弱陽イオン交換との複合カラムであるため、アセトニトリル比率が高く、低い pH の条件が最も高い回収率を与えると思われる。

10 %ギ酸アセトニトリル/10 %ギ酸メタノール溶液8 : 2を溶出液とする条件で添加回収率についてさらに検討した結果を Table 3に示した。ゴルフ場排水に添加した場合、通水量を100mlとした場合では $0.01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の濃度(暫定指導指針値の5分の1)で高い回収率(93.1 %)を与え、 $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の濃度でも良好な回収率(71.5 %)を示した。しかし、通水量が200mlになると回収率が低下した(57.8 %)。蒸留水へ添加した場合、200mlの通水量でも高い回収率(85.6 %)を与えることから、排水中の夾雑物がイオン交換機能を妨げるのではないかと考えられる。WCXカラムを使用する前処理操作は、作業環境の面で問題が無く、またカラムがポリマー基材であるため乾燥に強いことを含め、イミノクタジン3酢酸塩分析の前処理として優れていると考えられる。

4. 検出限界値と検量線

イミノクタジン3酢酸塩の検量線は Fig.8 に示すように良好な直線性を示した。試料水中濃度 $0.001\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でイミノクタジン3酢酸塩を4回分析し、検出限界値を求めた結果は、試料水中濃度 $0.0001\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。また定量下限値は $0.0004\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Table 4) であり暫定指針値の20分の1であった。

IV イミノクタジン3酢酸塩分析の問題点

イミノクタジン3酢酸塩のような強塩基性の極性物質はHPLCのオートサンプラーのニードル外壁や、ローターシールへ吸着されやすいためクロスコンタミネーションがおこりやすい⁸⁾とされるが、実際、蒸留水などからも検出されることがあった。この対策としてニードルを白金処理(イナート化)したものを使用することが望ましく、また頻繁にバルブ洗浄する必要がある。

V まとめ

イミノクタジン3酢酸塩の質量分析計LC-MSによる分析と固相抽出を使用した前処理法について検討した。

1) 一般的なODSカラムを使用した分析方法では、カラ

ムのホールドアップボリューム付近にブロードなピークのイミノクタジン3酢酸塩が溶出し、良好なクロマトグラムを得ることができなかった。

- 2) イオンペアー剤を使用したODSカラムでは、ピーク形状は最も優れていたが、使用して1ヶ月経過すると、保持時間が小さくなるため分析法としては使用できなかった。
- 3) 親水性相互作用カラム(HILIC)は、ピークのテーリングが著しいため分析法としては問題があった。
- 4) C30逆相カラムと0.2%ギ酸(pH3調製)水溶液/メタノール(1:9)の移動相を用いた分析条件では保持時間の再現性、ピーク形状も良好であった。
- 5) 前処理に使用するミニカラムの内CBAカラムは良好な回収率であるが、塩酸による作業環境への悪影響があり、採用できなかった。WCXカラムと10%ギ酸アセトニトリル/10%ギ酸メタノール混液の系が前処理操作として最適であると考えられる。
- 6) 本法における定量下限値は $0.0004\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

VI 参考文献

- 1) 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(環水土第77号水質保全局長通知)
- 2) 栃木県保健環境センター水環境部: ゴルフ場暫定指導指針対象農薬に新たに追加された10項目の分析法の検討についてイミノクタジン3酢酸塩の固相抽出による分析の検討, 栃木県保健環境センター年報, 128-135(2003)
- 3) 伊吹幸代, 梅林清志, 兎本文昭, 青木喜也: イミノクタジン3酢酸塩の固相抽出による分析の検討, 奈良県保健環境研究センター年報, (37), 85-89(2001)
- 4) 高尾仁士, 石川英樹, 鈴木佳代子: イミノクタジン3酢酸塩のポストカラム反応蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフによる分析法の検討, 香川県環境保健研究センター所報, (3), 141-144(2004)
- 5) 大野ちづ子: ゴルフ場農薬の液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による測定について, 環境化学, 14, 649-660(2004)
- 6) Shimadzu: テーリング係数と分離度について, LC talk, 37, 4-5(1996)
- 7) 液体クロマト研究懇談会液クロ龍の巻, pp.37, (株)筑波出版会, 茨城(2001)
- 8) Shimadzu: オートサンプラーにおけるコンタミネーションの抑制, LC talk, 59, 4-5(2005)
- 9) 最新農薬データブック97年版ソフトサイエンス社

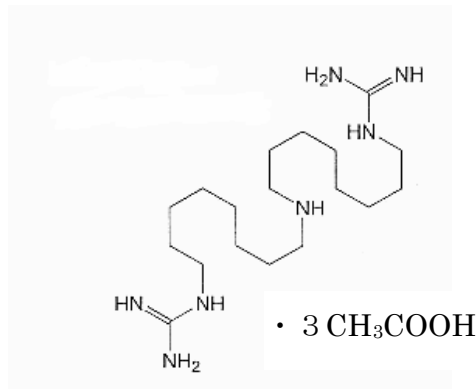


Fig.1 Structure of iminoctidine triacetate

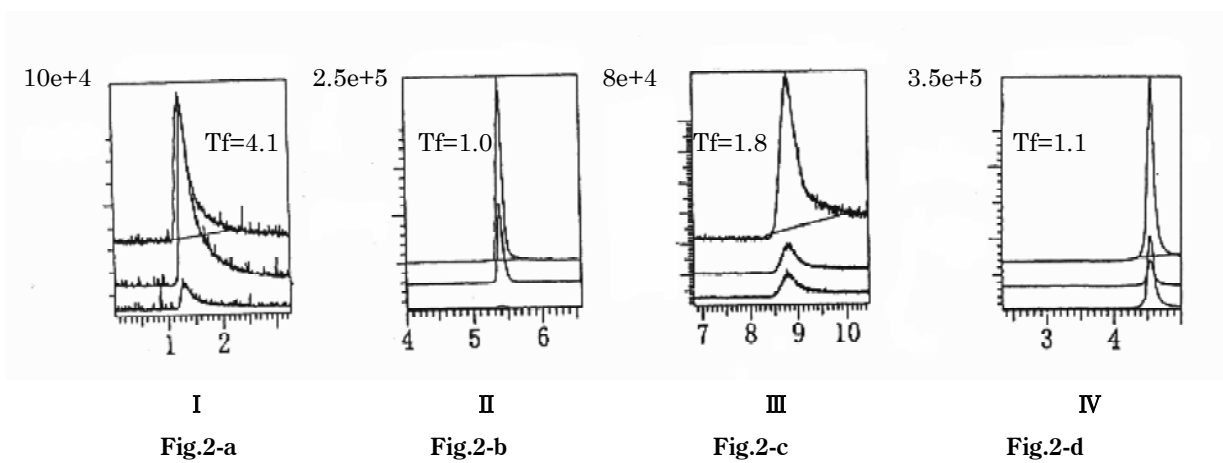
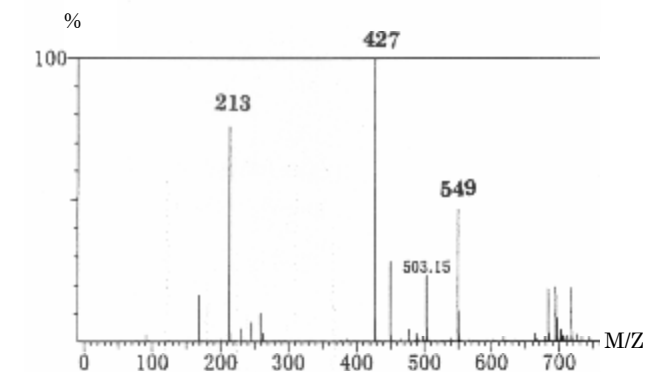


Fig.2 The chromatograms of iminoctidine triacetate by each of analytical columns and mobile phases shown in Table 1
Tf : tailing factor



213: (Heptafluorobutyric Acid-H) 427: (Heptafluorobutyric Acid×2 -H)
503: (Raffinose-H) 549: (Raffinose+holmnic acid-H)

Fig.3 MS spectrum of Raffinose
(i.e.: the standard substance for the tuning of HPLC)

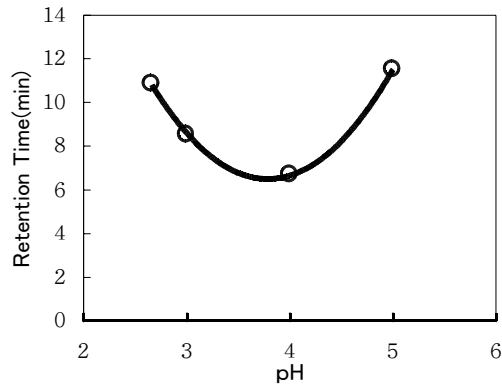


Fig.4 The effect of pH of mobile phase on the retention time of the iminoctadine triacetate. The analytical column is ZIC HILIC

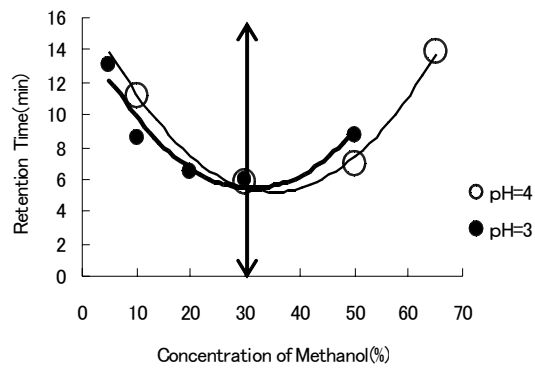
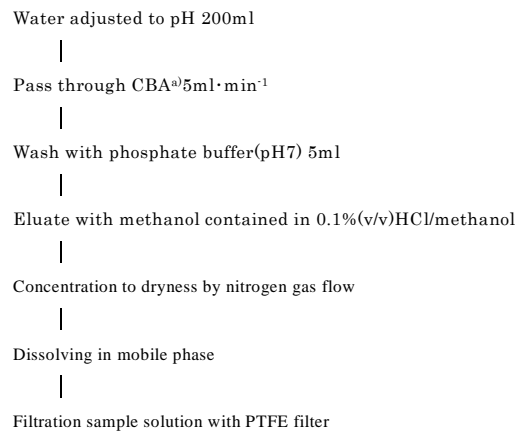


Fig.5 The effect of methanol concentration in the mobile phase on the retention time of the iminoctadine triacetate. pH values of the mobile phase are 3 and 4.



^{a)} washed with 5ml of methanol followed by 5ml of phosphate buffer

Fig.6 The scheme of the sample treatment procedure using CBA column

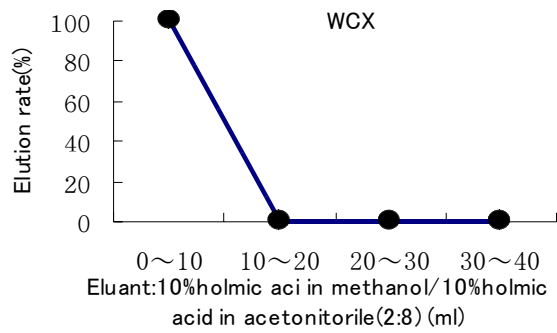
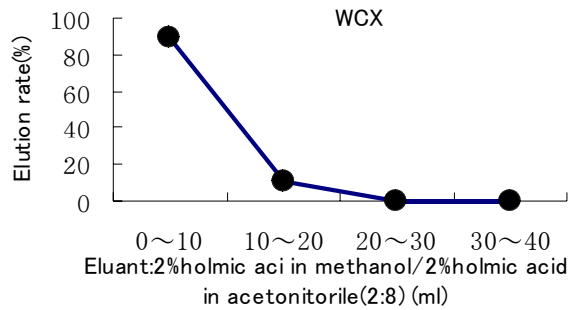
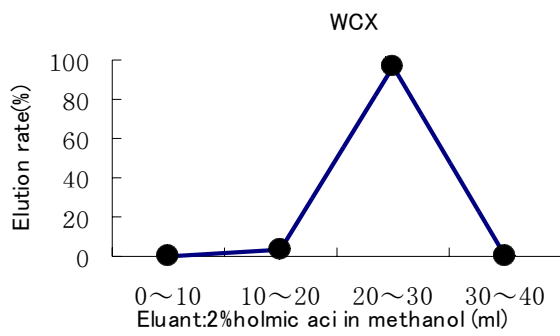
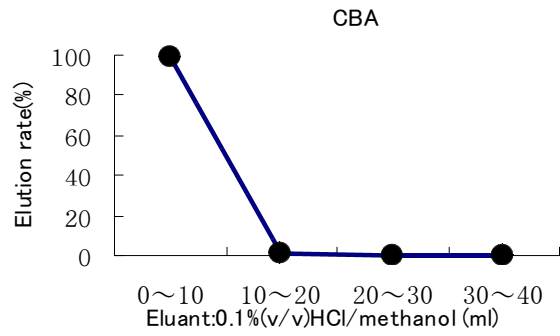


Fig.7 The elution profiles of iminoctadine triacetate from pretreatment column. column

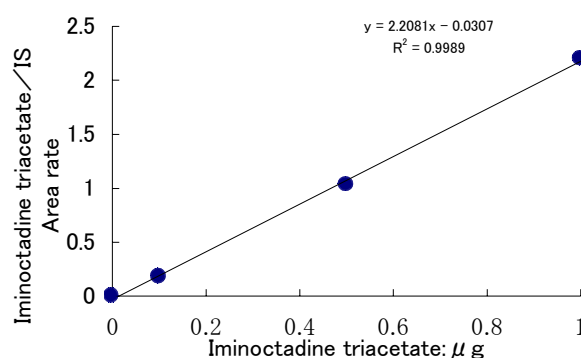


Fig.8 The Calibration curve of iminoctadine triacetate

Table 1 Analytical columns and mobile phases of the LC-MS analysis of iminoctadine triacetate

Condition	Maker	Column	Size(mm)	Mobile phase
I	Nomura	ODS-SR-5	2.0 \times 150	acetonitrile water (0.1 % holmic acid)
II	Waters	C18Xterra	2.1 \times 30	methanol water (0.5 mM heptafluorobutyric acid)
III	Sequent	ZIC-HILIC	2.1 \times 150	methanol water (0.1 % holmic acid , pH 3)
IV	Nomura	DivelosiC30UG-3	2.0 \times 35	methanol water (0.2 % holmic acid , pH 3)

Table 2 The recovery(%) of iminoctadine triacetate spiked to distilled water at the level $0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Eluate	Recovery (%) \pm S.D. (n=4)
① 2%holmic acid in methanol	2.2 \pm 0.9
② 2%holmic acid in methanol /2%holmic acid in acetonitrile(2:8)	57.7 \pm 3.4
③ 10%holmic acid in methanol /10%holmic acid in acetonitrile(2:8)	85.6 \pm 4.4

Table 3 Recoveries of iminoctadine triacetate spiked to the waste water from golf course

Column	spiked	Amount	Recovery \pm S.D.*	
	μ g	ml	%	n=4
WCX	2	200	57.8 \pm 7.7	
	4	100	96.2 \pm 8.0	
	1	100	93.1 \pm 6.8	
	0.5	100	71.5 \pm 8.2	

* S.D.:standard deviation

Table 4 The limits of detection and quantification for iminoctadine triacetate

Average (μ g) (n=4)	0.0868
S.D.(σ)	0.0022
CV (%)	2.56
Limit of detection($3 \times \sigma$)	0.0001*
Limit of quantification ($10 \times \sigma$)	0.0004*

*Concentration in sample

