

## LC/TOF MS を活用した農薬による河川水プロファイリング

環境衛生課 大窪かおり 草場潤一  
 医薬品課 原口那津美 八ヶ代一郎  
 環境センター 龍尾一俊 松尾彩水

キーワード：プロファイリング LC/TOF MS 農薬 事故

### 1 はじめに

公共用水域における魚へい死等の水質事故時には、原因物質を迅速に特定することが求められるが、実際は現場調査で原因物質を特定することが困難で、原因究明に至らないケースも多い。衛生薬業センターでは、精密質量の測定が可能な LC/TOF MS を農薬等のスクリーニングに活用し、水質事故時には環境センターと連携して GC/MS では測定が困難な物質の検索を行ってきた。しかし、河川水や生物のような環境試料は複雑な成分から構成されており、測定時のデータ量が膨大になるため、原因物質の特定に必要な情報を迅速に得るのに多大な労力を要する。そこで、大量かつ複雑なデータを一定のパラメータによって整理しその傾向を知ることが原因物質の検索に有用であると考え、多変量解析の手法を用いて環境試料への適用の可能性について検討した<sup>1)</sup>。

### 2 方法

#### ① 試料

過去5年間に魚へい死事故が複数回発生した A 川水系において、本川の A 川 4 地点及び支川の B 川 2 地点 (図 1) で、4 月・6 月・9 月・11 月の平常時に採取した河川水を対象試料とした。

地点 1・2 は B 川 (支川) で、B 川は別の河川と A 川の運河のような位置関係のため地点 1 は必ずしも地点 2 の上流側と言えない特徴がある。地点 3～6 は A 川 (本川) で、地点 6 が最上流、地点 3 が最下流 (感潮域) で、地点 4～6



図1 調査地点

はそれぞれ支川からの流入がある。4月採水時のみ地点 3 は満潮で海水が混じる状態であった。また、B 川は地点 3 よりも下流で合流しているため、それぞれの河川の流入は互いに影響しない。周辺環境はいずれも農地と住宅地が混在し、地点 1～4 は平野部、地点 5、6 は山間部となっている。

#### ② 前処理と測定

測定用試料は、固相抽出により 500 倍に濃縮後アセトニトリルに転溶し、各試料につき LC/TOF MS を用いて 3 回ずつ繰り返しスキャン測定を行った。測定条件は表 1 に示すとおりである。

#### ③ 添加試験

4 月に採取した地点 1 及び地点 4 の試料に対して、農薬混合標準液 (関東化学 60 : ポジティブモード測定対象 25 物質) を希釈して 10ng/mL 相当となるように添加し、無添加の対照試料と同様に測定し

た。

表1 測定条件

LC : Agilent 1200EL		MS : Agilent 6540 Q-TOF	
カラム	ZORBAX Eclipse C18	イオンソース	AJS-ESI
	2.1x100mm(粒子径 3.5 μm)	イオン化モード	positive
移動相	A : 5mM 酢酸アンモニウム/水	キャピラリー電圧	3500V
	B : 5mM 酢酸アンモニウム/MeOH	フラグメンター電圧	120V
グラジエント条件	A95:B5(0分)-A5:B95(30-45分)	SCAN 範囲(m/z)	90-1500

#### ④ 解析方法

Agilent 社製 Mass Hunter Qualitative analysis for LC/MS (B04.00) を用いて、各試料のスクリーンデータから強度 20,000 以上の条件でピーク抽出し、質量誤差 5ppm 以下かつ 0.0025Da 以下でデータベースと一致するピークを絞り込んだ。これらに対して当所で作成した農薬等精密質量データベース(約 750 物質収録)を用いて化合物検索を行った。次にデータベースと一致したピークに対して、Agilent 社製多変量解析ソフト Mass Profiler Professional を用いて多変量解析を行った。

### 3 結果と考察

#### ① データベース検索

各月・地点で検索一致した物質数を表2に示す。B川の地点1では、4月と11月に一致した物質は少なく、6月と9月はそれより多かった。地点2は11月も6・9月と同程度の物質数であった。地点1・2とも水田からの流入等の影響が考えられた。A川(地点3~6)は検索で一致した物質数は4~9月で大きな変動はなく、11月は減少傾向であった。

表2 各地点の月別データベース検索一致数

地点	4月	6月	9月	11月
1	11	28	32	7
2	11	27	23	24
3	28	21	17	8
4	20	16	14	9
5	21	欠測	18	9
6	17	17	18	9

#### ② 主成分分析

試料間で統計的有意差のある物質については、各試料グループにおいて3回繰り返しで100%出現する物質を対象に絞り込み、次に変動係数が25%以下になる物質を抽出した。主成分分析による4・9月の2Dスコアプロットを図2に示す。第一・第二主成分の合計寄与率はいずれも70%以上で、これらによりグループ間の差異が概ね決定されていた。第一主成分は水系ごとに大きく2つのグループに分かれており、A川とB川のプロファイルが大きく異なることを示している。

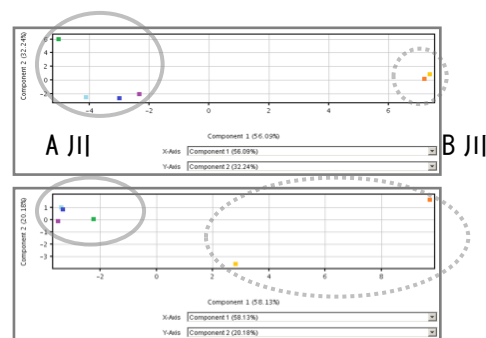


図2 4月(上),9月(下)の2Dスコアプロット

#### ③ クラスタ分析

主成分分析と同様のフィルタリングを行った後、月ごと及び地点ごとにクラスター分析を行った。(図3,4)

図中の濃色で表示されている領域が高い応答を示した物質である。9月の結果(図3)から地点別に見ると、高い応答を示す物質がA川とB川で明確に異なっており、水系ごとに分類できることが示された。また

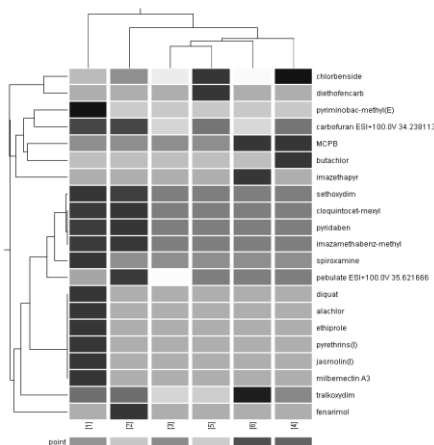


図3 9月のクラスターツリー

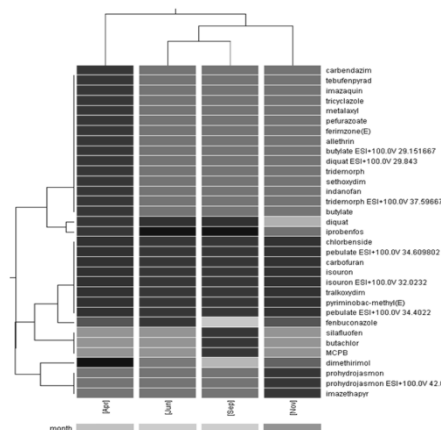


図4 地点4のクラスターツリー

地点4の結果(図4)から季節変動に着目すると、水系によらず季節ごとに特徴的に存在している物質があることが示された。このことから、同一水系でも地点ごとに特徴的な物質が存在し、事故時に採水地点を選定する際には支川の流入等を考慮する必要があることが示唆された。特に4月と6・9月では大きく異なり、周辺の農地等で使用される農薬の変遷が反映されたものとなっていると推察される。

④ 添加試験

対照試料と添加試料でVolcanoプロットを用いて2群間の比較を行った。(図5) 添加した農薬でポジティブモードでの測定が可能な25物質のうち、16物質は平均値の差及び強度の有意差のいずれも大きいことが確認された。

この結果から、対照試料と添加試料の間で差のある物質がppbレベルの試料濃度でも見つけることが可能であると考えられ、水質事故発生の際にはできるだけ発生地点に近くかつ原因物質の影響の少ない試料を採取することの重要性が改めて示された。

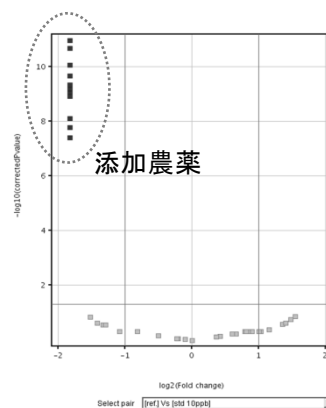


図5 Volcanoプロットによる2群間比較

4 まとめ

LC/TOF MS で測定した河川水試料に多変量解析を適用してプロファイリングを行った。主成分分析により二つの水系で地点及び季節ごとの特徴をグループ化した。クラスター分析では各々の地点及び季節に特徴的な物質を容易に把握することが可能となった。しかし、特徴的に出現する物質は水系・季節とも変化し、平常時のデータが異常時にバックグラウンドデータとして使えるとは限らず、本解析法は事故発生の際に対照地点でのサンプリングを適切に行うことにより、原因物質を迅速に把握することが期待できる。

5 文献

1) 河川水中農薬類の濃度モニタリングへの多変量解析の適用, アジレントテクノロジーアプリケーションノート