

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
「水道水質検査における対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定の
農薬類の分析法開発」
分担研究報告書

ジチオカルバメート系農薬の分析法開発

-誘導体化-SPE-LC/MS/MS法-

研究分担者	鈴木俊也	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部
研究協力者	木下輝昭	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部
	小杉有希	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部

研究要旨

本研究では、水道水の管理目標設定項目である対象農薬リスト掲載農薬のうち、標準検査法未設定のジチオカルバメート系農薬 7 種類（チウラム、ポリカーバメート、マンゼブ、マンネブ、ジラム、ジネブ及びプロピネブ）の分析法を開発することを目的とした。これら農薬の一部については、GC/MS、LC/UV あるいは LC/MS/MS による分析法が既に報告されている。ここでは、アルカリ分解で生成するジチオカルバメートを硫酸ジメチルでメチル誘導体化し、固相抽出で濃縮後、LC/MS/MS で分離定量する方法について検討した。また、平成 25 年 10 月から「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」（厚生労働省、2012）が適用されたことにより、機器分析による全ての水道水質検査において、分析精度がガイドラインの目標を満たすかどうかを確認する必要がある。そこで、本研究では、同ガイドラインに従った妥当性評価を実施した。

ジチオカルバメート系農薬をアルカリ分解して生成するジチオカルバメートの硫酸ジメチルによる誘導体化物ジメチルジチオカルバミン酸メチル（DMDC-Me）、エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（EBDC-Me）及びプロピレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（PBDC-Me）を用いて、LC/MS/MS の至適分析条件を確立した。その分析条件下における DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me 定量下限値は、それぞれ 0.005、0.001 及び 0.001 mg/L であった。検量線については、DMDC-Me が 0.005-1.0、EBDC-Me が 0.001-1.0 及び PBDC-Me が 0.001-1.0 mg/L の範囲で、それぞれ r^2 が 0.999、0.999 及び 0.999 と良好な結果であった。厚生労働省では、水道水中のジチオカルバメート系農薬の評価は二硫化炭素の総量で行うこととしており、その目標値は、評価値が最小であるジラムから求めた 0.005 mg/L としている。今回検討した方法では、ジラムの目標値付近での添加回収率及び精度ともに低く、妥当性評価の目標を満たすことができなかった。

本法では、EBDC-Me や PBDC-Me を生成するジチオカルバメート系農薬を目標値の 1/10 まで測定することが可能であった。しかし、DMDC-Me を生成するジチオカルバメート系農薬、特にジラムについては、目標値付近の濃度においても精度良く測定することができなかった。

A. 研究目的

本研究では、水道水の管理目標設定項目である対象農薬リスト掲載農薬のうち、標準検査法未設定のジチオカルバメート系農薬7種類（チウラム、ポリカーバメート、マンゼブ、マンネブ、ジラム、ジネブ及びプロピネブ）の分析法を開発することを目的とした。これら農薬の一部については、GC/MS、LC/UV あるいは LC/MS/MS による分析法が既に報告されている。ここでは、アルカリ分解で生成するジチオカルバメートを硫酸ジメチルでメチル誘導体化し、固相抽出で濃縮後、LC/MS/MS で分離定量する方法について検討した。また、平成 25 年 10 月から「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」(厚生労働省、2012)が適用されたことにより、機器分析による全ての水道水質検査において、分析精度がガイドラインの目標を満たすかどうかを確認する必要がある。そこで、本研究では、同ガイドラインに従った妥当性評価を実施した。

B. 研究方法

1. 標準品・試薬・器具

(1) 精製水

水道水をミリ-Q SP standard (Millipore 製) により精製したものを使用した。

(2) アセトニトリル

高速液体クロマトグラフ用を使用した。

(3) 農薬標準品

ジチオカルバメート系農薬7種類（チウラム、ポリカーバメート、マンゼブ、マンネブ、ジラム、ジネブ及びプロピネブ）は、市販の農薬標準品（純度 70-98%）を用いた（表 1）。また、アルカリ分解後の硫酸ジメチル処理により生成するメチル誘導体化物のジメチルジチオカルバミン酸メチル（DMDC-Me）は和光純薬工業から、エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（EBDC-Me）及びプロピレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（PBDC-Me）は林純薬工業から購入した。

(4) EDTA - システイン溶液

EDTA ニナトリウム 15 g 及び L-システイン塩酸 10 g を採り、精製水 50 ml に懸濁し、40%水酸化ナトリウム溶液で pH10 付近に調整し、全量 100 ml とした。

(5) 固相カラム

固相カラムは Bond Elute-ENV (200 mg、3 ml、Agilent-Technologies 製) を使用した。

(6) 試験管

ポリプロピレン製 (30~50 ml) のもの

(7) オートサンプラー用サンプル瓶

ガラス製 (1.5 ml、スクリューキャップ) のもの

2. 農薬混合標準液の調製

各農薬の標準品 10 mg を秤量してメスフラスコに採り、EDTA-システイン溶液で 10 ml に定容して標準原液を調製した(各 1000 mg/L)。また、各標準原液の適量をメスフラスコに採り、EDTA-システイン溶液の 10 倍希釈液で、適宜希釈して農薬混合標準液を調製して試験に用いた。

3. 検量線用混合標準原液の調製

DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me のそれぞれ 10 mg を秤量してメスフラスコに採り、アセトニトリルで 10 ml に定容して各標準原液を調製した(各 1000 mg/L)。また、各標準原液の 1 ml をメスフラスコに採り、アセトニトリルを加えて 100 ml にし、検量線用混合標準原液(各 10 mg/L)を調製した。

4. 水試料

水道水を洗浄済みのガラス瓶に採取した。水道水(残留塩素濃度約 0.2 0.5 mg/L)の場合には、試料 1 L につき、脱塩素処理剤としてアスコルビン酸ナトリウムを 10 mg 添加した。

5. 試験溶液の調製

水試料 20 ml をポリプロピレン製の試験管に採り、EDTA-システイン溶液 2 ml を添加し、室温で 20 分間静置した。その後、塩酸(1+10) 1.9 ml を加えて pH7 付近とし、硫酸ジメチル 40 μ L を加え、直ちに激しく混和し、室温で 20 分間静置した。その後、固相カラム(アセトニトリル、精製水の順でコンディショニングしたもの)に通水速度 3~4 ml/min で通し、精製水 3 ml で洗浄後、アセトニトリル 2 ml で溶出し、精製水で 2 ml としたものを試験溶液とした。

6. 分析条件の最適化

LC/MS/MS は、Waters UPLC-Xevo TQ MSD を用い、DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の分析条件の最適化を行った。すなわち、検量線用混合標準原液 10 mg/L を用いて、APCI (ESCI) イオン化法のスキャンモードにより各農薬のマスペクトルを測定し、最も強度の強いイオンを MRM モードにおけるプリカーサイオンとして選択した。ついで、選択したプリカーサイオンから得られるプロダクトイオンのスキャンを行い、最も強度の強いイオンを定量イオンとして、2 番目に強度の強いイオンを確認(定性)イオンとして選択した。

7. 分析法の妥当性評価

7.1 検量線の作成

検量線用混合標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、4 つ以上の検量線用混合標準液を調製し、LC/MS/MS 分析を行い、検量線用混合標準液中の DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の濃度とそれぞれのプロダクトイオンのピーク面積を用いて検量線を作成した。

7.2 空試験

精製水を一定量とり、上記 5 試験溶液の調製と同様に操作して DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の濃度を求めた。

7.3 添加回収率及び併行精度

添加回収率は、農薬を添加した水試料から得られた試験溶液中の DMDC-Me、EBDC-Me 又は PBDC-Me のプロダクトイオンのピーク面積から、農薬を添加していない水試料から得られた試験溶液中の DMDC-Me、EBDC-Me 又は PBDC-Me のプロダクトイオンのピーク面積を差し引いた後、7.1 検量線の作成により作成した検量線より求めた濃度を添加濃度で除すことにより算出した。なお、各農薬の濃度と測定化合物の濃度の換算表を表 1 に示す。

表 1 . ジチオカルバメート系農薬の濃度と測定化合物の濃度の換算表

No	1	2	3	4	5	6	7
ジチオカルバメート	チウラム	ポリカーバ メート	マンコゼブ	マンネブ	ジラム	ジネブ	プロピネブ
純度	0.98	0.95	0.82	0.85	0.99	0.70	0.70
分子量 (g)	240	581	265	265	306	276	290
モル換算値 (mol)							
Zn	0	2	1	0	1	1	1
Mn	0	0	1	1	0	0	0
DMDC-Me	2	2	0	0	2	0	0
EBDC-Me	0	1	1	1	0	1	0
PBDC-Me	0	0	0	0	0	0	1
CS ₂	2	4	2	2	2	2	2
重量換算値 (g)							
Zn(65)	0	131	65	0	65	65	65
Mn(55)	0	0	55	55	0	0	0
DMDC-Me(135)	270	270	0	0	270	0	0
EBDC-Me(240)	0	240	240	240	0	240	0
PBDC-Me(254)	0	0	0	0	0	0	254
CS ₂ (76)	152	305	152	152	152	152	152
農薬濃度 (μg/L)							
	10	10	10	10	10	10	10
測定化合物の濃度 (μg/L)*							
Zn	0.0	2.3	2.5	0.0	2.1	2.4	2.3
Mn	0.0	0.0	2.1	2.1	0.0	0.0	0.0
DMDC-Me	11.2	4.6	0.0	0.0	8.8	0.0	0.0
EBDC-Me	0.0	4.1	9.0	9.0	0.0	8.7	0.0
PBDC-Me	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.8
CS ₂	6.3	5.2	5.7	5.7	5.0	5.5	5.3

*農薬濃度10 μg/Lの時の値 (農薬濃度 × 重量換算値 ÷ 分子量)

C . 結果と考察

1. 分析条件の最適化

DMDC-Me は、ESI ではイオン化されず、APCI(ESCI)のポジティブモードでイオン化された。EBDC-Me 及び PBDC-Me は、ESI 及び APCI(ESCI)の両モードでイオン化されたが、APCI(ESCI)ネガティブモードが最も感度が高かった。

最適化により決定した測定対象化合物の LC/MS/MS の分析条件を表 2 及び 3 に示す。また、農薬の濃度が 0.01 mg/L の混合標準液 (2 μL 注入) の LC/MS/MS クロマトグラムを図 1 及び 2 に示す。本分析条件下、いずれの化合物についても良好なピーク形状と分離が可能であった。

DMDC-Me の感度が比較的 low だったことから、注入量を 4~10 μL に増やしたが、対象 3 物質

ともにピーク形状が悪化した。この現象は、他の UPLC カラムを用いた場合にも同様な結果であった。

表 2. LC/MS/MS 一斉分析条件

項目	設定値
カラム	HSSC18 (2.0 mm I.D. × 50 mm、 粒径 1.7 μm、 Waters)
移動相 A	メタノール
移動相 B	水
グラジエント条件	移動相 A30% (0 - 1 min) - リニアグラジエント - 移動相 A100% (1 - 10 min) - 移動相 A100% (10 - 15 min)
LC	
流速	0.20 ml/min
カラム温度	40
サンプルクーラー温度	10
注入量	2 μL
イオン化法	APCI (ESCi) 法
キャピラリー電圧	2 kV
コロナ電圧	3 kV
MS	
エキストラクター	3 V
イオン源温度	150
脱溶媒ガス流量	650 L/hr
脱溶媒温度	450
データ取り込み時間	0.04 sec

表 3. LC/MS/MS 一斉分析条件

測定対象化合物	イオン化法	保持時間 (min)	定量イオン (m/z)*	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)
DMDC-Me	APCI+	4.9	136> 88	15	10
EBDC-Me	APCI+	5.6	241>134, 193	15	15
	APCI-				
PBDC-Me	APCI+	6.0	255>207, 131	15	10
	APCI-				

*: プリカーサイオン > プロダクトイオンの順に記載した。

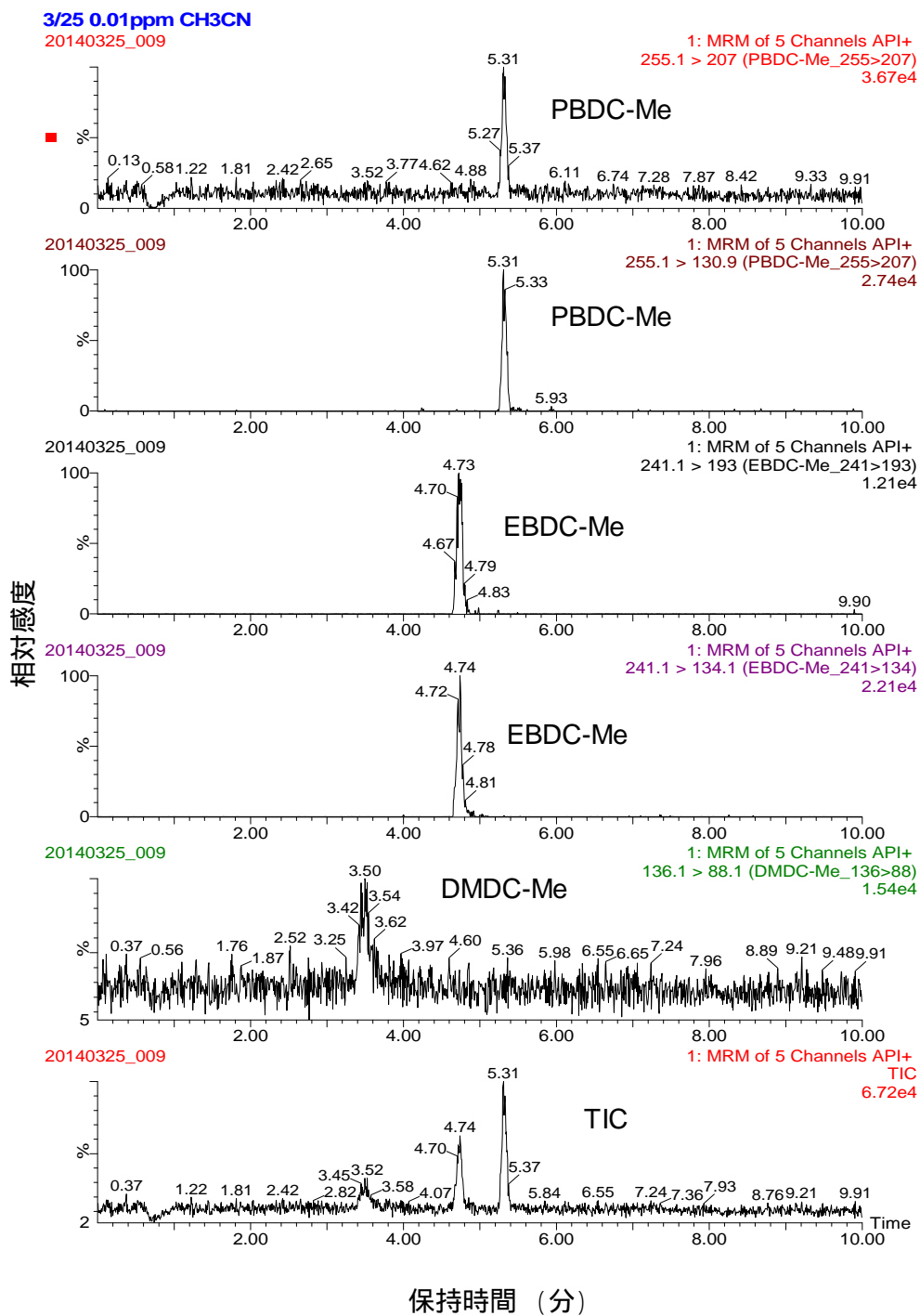


図1. DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の LC/MS/MS クロマトグラム
イオン化法：APCI+、濃度：0.01 mg/L

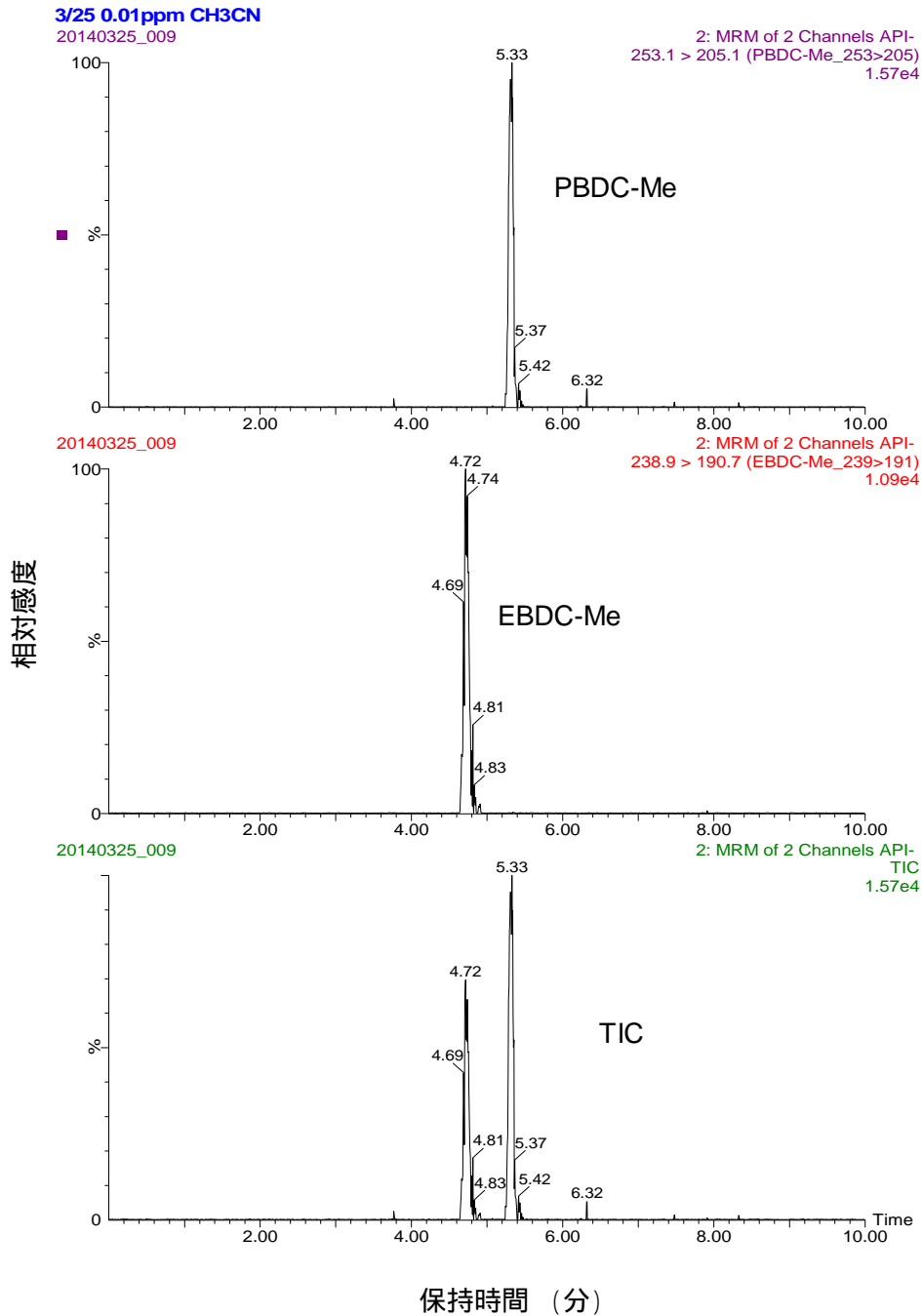


図2. DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の LC/MS/MS クロマトグラム
イオン化法：APCI-、濃度：0.01 mg/L

2. 分析法の妥当性評価

2.1 検量線及び定量下限値

DMDC-Me (0.005-1.000 mg/L)、EBDC-Me (0.001-1.000 mg/L) 及び PBDC-Me (0.001-1.000 mg/L) の検量線をそれぞれ図3、4及び5に示す。いずれの化合物についても検量線の直線性及び再現

性は良好であった。検量線用ブランクからは対象農薬に相当する保持時間にピークは認められなかった。

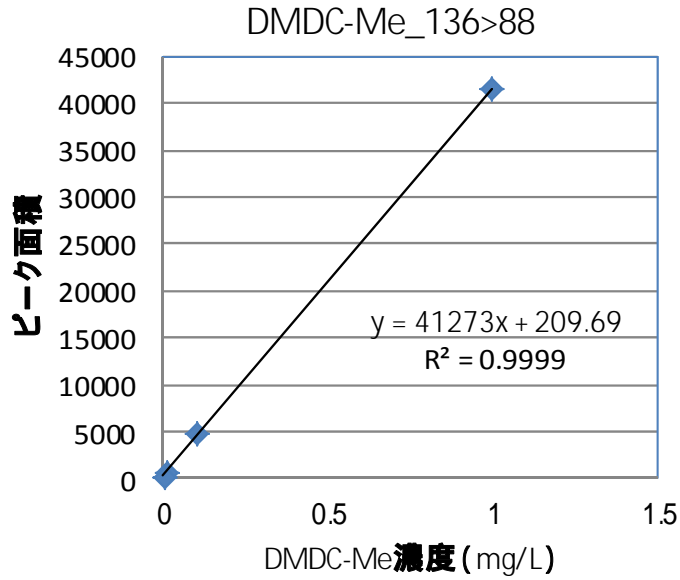


図3. DMDC-Meの検量線
(濃度範囲: 0.005-1 mg/L)

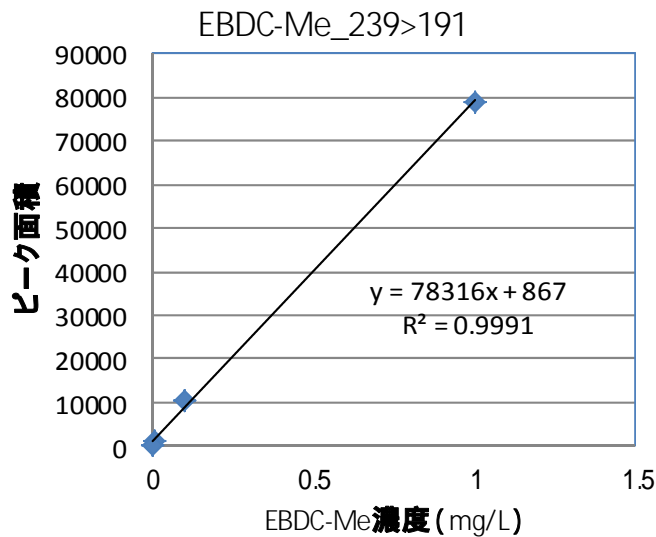


図4. EBDC-Meの検量線
(濃度範囲: 0.001-1 mg/L)

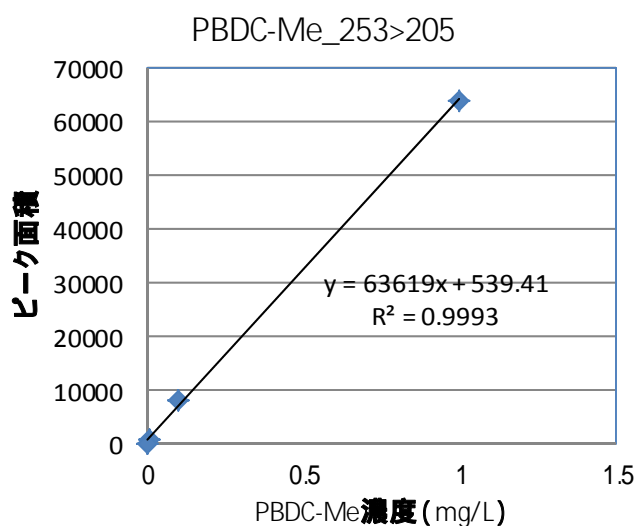


図5. PBDC-Me の検量線
(濃度範囲：0.001-1 mg/L)

2.2 空試験及び定量下限値の評価

空試験用水試料である精製水を用いて試験溶液を調製した場合、クロマトグラム上に DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me に相当するピークは認められなかった。そこで、DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の目標値付近 0.01 mg/L を用いた繰返し分析したところ、定量下限値は、DMDC-Me は 0.005 mg/L、EBDC-Me 及び PBDC-Me は 0.001 mg/L であった。

2.3 添加回収試験結果の評価

ジチオカルバメート系農薬のそれぞれを目標値付近の濃度で水道水に添加して、添加回収率（真度）及び併行精度（RSD）を調べた（表4）。本法では DMDC-Me を生成する農薬の回収率が比較的低かった。特に、ジラムの添加回収率及び併行精度は、47%及び 28%と劣っていた。一方、EBDC-Me や PBDC-Me を生成する農薬の添加回収率及び併行精度は、水道水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標をほぼ満たすことがわかった。しかし、本法ではいずれのジチオカルバメート系農薬も目標値の 1/100 は測定不可能であった。

D. 結論

厚生労働省では、水道水中のジチオカルバメート系農薬の評価は二硫化炭素の総量で行うこととしており、その目標値は、評価値が最小であるジラムから求めた 0.005 mg/L としている。今回検討した方法では、ジラムの目標値付近での添加回収率及び精度ともに低く、妥当性評価の目標を満たすことができなかった。

本法では、EBDC-Me や PBDC-Me を生成するジチオカルバメート系農薬を目標値の 1/10 まで測定できることが示唆されたが、DMDC-Me を生成するジチオカルバメート系農薬、特にジラムについては、目標値付近の濃度においても精度良く測定することができなかった。

表4. 水道水中のジチオカルバメート系農薬の添加回収試験結果

農薬名	誘導體化 生成物	添加濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
チウラム	DBDC-Me	10	67	64	61	90	75	71	16
ポリカーバメート	DBDC-Me	10	61	61	93	75	67	71	19
	EBDC-Me		82	92	95	86	110	93	12
マンコゼブ	EBDC-Me	10	65	90	80	86	87	82	13
マンネブ	EBDC-Me	10	80	67	73	70	70	72	7
ジラム	DBDC-Me	10	47	24	51	55	57	47	28
ジネブ	EBDC-Me	10	79	79	82	99	91	86	10
プロピネブ	PBDC-Me	10	77	76	68	75	85	76	8

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

厚生労働省（2012）水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて。厚生労働省水道課長通知、健水発 0906 第 1 号、平成 24 年 9 月 6 日。

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/houreijijimuren/dl/120906-1.pdf>

衛生試験法・注解 2010 日本薬学会

巴山 忠、LC-MS/MS による環境負荷化学物質の分析に関する研究、福岡大学薬学集報 8、84-99、2008 .