

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

パラコート、ジクワットの分析法開発

研究分担者	小林憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
研究協力者	五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
	久保田領志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部

研究要旨

水道水質検査の対象農薬リストに掲載されているが標準検査法が未だ設定されていないパラコートの分析法を開発した。パラコートは高極性で水溶解度が高いため、水道水中の農薬分析で通常用いられる逆相分配による固相抽出および分析が困難な物質である。また、ジクワットも同様の性質を持ち、現行のジクワットの標準検査法では、農薬類の検査で原則達成すべき定量下限値（目標値の 1/100）が得られない。そこで、これらの物質の塩基性に着目し、弱陽イオン交換基と逆相の二つの保持能を併せ持つミックスモード固相を使用した前処理法による回収率の評価および LC/MS/MS による分析条件の最適化を行った。

標準溶液を用いた LC/MS/MS 分析条件の検討の結果、ジクワット・パラコートともに良好なピーク形状と分離が得られ、検量線の決定係数 r^2 は 0.995 以上と高い値を示した。また、50 倍の濃縮倍率を考慮した目標値の 1/100 の濃度（2.5 $\mu\text{g/L}$ ）以下の低濃度の標準溶液の測定においても、ピーク定量を行うことができ、繰り返し測定の再現性も良好であった。

また、チオ硫酸ナトリウムを用いて脱塩素処理した水道水に、各農薬の目標値の 1/10 および 1/100 の濃度となるように標準溶液を添加した試料を用いて分析法の妥当性評価を行ったところ、いずれの農薬も、目標値の 1/10 および 1/100 の両方の添加濃度の検査試料水の試験において良好な回収率が得られ、平均値のみならず 5 回の繰り返し試験における回収率が全てガイドラインの目標（70～120%）を満たした。また、併行精度についても、添加濃度によらず良好な結果が得られ、ガイドラインの目標（目標値の 1/10 の濃度では < 25%、目標値の 1/100 の濃度では < 30%）を満たした。

以上のことから、ジクワットおよびパラコートについては、ミックスモード固相を使用した前処理法および LC/MS/MS による分析を行うことで、いずれも目標値の 1/100 以下の濃度まで精度の高い分析が可能であることが示された。

A. 研究目的

水道水質検査の対象農薬リストに掲載されているが標準検査法が未だ設定されていないパラコート分析法を開発することを目的とした。パラコートは高極性で水溶解度が高いため、水道水中の農薬分析で通常用いられる逆相分配による固相抽出および分析が困難な物質である。また、ジクワットも同様の性質を持ち、現行のジクワットの標準検査法では、農薬類の検査で原則達成すべき定量下限値（目標値の 1/100）が得られない。そこで、これらの物質の塩基性に着目し、弱陽イオン交換基と逆相の二つの保持能を併せ持つミックスモード固相を使用した前処理法による回収率の評価および LC/MS/MS による分析条件の最適化を行った。

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」が適用されたことにより(厚生労働省 2012) 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で定められた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、ガイドラインに従って、開発した分析法の妥当性を評価した。

B. 研究方法

1. 対象物質の基本的情報

ジクワットおよびパラコートはピピリジニウム系に分類される非選択型除草剤で、土壌に散布されると活性を失い作物を枯らしにくくまた安価であることから広く使用されている。前述したように、両農薬はいずれも水道水質管理目標設定項目における対象農薬リスト掲載農薬類に該当しており、両農薬の目標値は 0.005 mg/L である。

ジクワットおよびパラコートの基本的情報をそれぞれ表 1 および表 2 に示す。

表 1. ジクワットの基本的情報 (ICSC 2001 より引用)

化学名	1,1'-エチレン-2,2'-ピピリジニウムジプロミド
分子式	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ Br ₂
分子量	344.1
CAS NO.	85-00-7
外観	無色または黄色結晶
融点	335 で分解
蒸気圧	0.0001 Pa
水溶解度	70 g/100 ml (20)
オクタノール/水分配係数	LogP _{ow} = -4.6 (20)
密度	1.2 g/cm ³ (25)

表 2. パラコートの基本的情報（環境省 2010 より引用）

化学名	1,1'-ジメチル-4,4'-ピピリジニウムジクロリド
分子式	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂
分子量	257.2
CAS NO.	1910-42-5
外観	白色固体，無臭
融点	約 340 で分解
沸点	340 で分解のため測定不能
蒸気圧	<10 ⁻⁵ Pa (25)
水溶解度	6.2 × 10 ⁸ μg/L (pH5.2, pH7.2, および pH9.2, 20)
土壌吸着係数	強吸着性のため測定不能
オクタノール/水分配係数	logP _{ow} = -4.5 (20)
密度	1.55 g/cm ³ (25)
加水分解性（半減期）	30 日以上(pH5, 7, および 9, 25 , および 40)
水中光分解性（半減期）	32 日(東京春季太陽光換算 102 日)

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

ミリ-Q SP standard (Millipore 製) により精製して得られたものを使用した。

(2) チオ硫酸ナトリウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(3) メタノール

関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。

(4) アセトニトリル

和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。

(5) ギ酸 (99 v/v%)

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(6) ギ酸アンモニウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(7) ジクワット標準品

和光純薬工業(株)の残留農薬分析用の規格品（ジクワットジブロミドー水和物，C₁₂H₁₂Br₂N₂・H₂O）を使用した。

(8) パラコート標準品

和光純薬工業(株)の残留農薬分析用の規格品 ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$) を使用した。

3. 標準液および試薬の調製

ジクワットジプロミド水和物 ($C_{12}H_{12}Br_2N_2 \cdot H_2O$, 分子量 362.06) 19.7 mg をポリプロピレン製メスフラスコに採り, 精製水を加えて 10 mL に定容してジクワット標準原液 (ジクワットイオンとして 1000 mg/L) を調製した。また, パラコート標準品 ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$, 分子量 257.16) 13.8 mg をポリプロピレン製メスフラスコに採り, 精製水を加えて 10 mL に定容してパラコート標準原液 (パラコートイオンとして 1000 mg/L) を調製した。次に, 各農薬の標準原液 100 μ L を同じポリプロピレン製メスフラスコに採り, 精製水を加えて 10 mL に定容して, ジクワット・パラコート混合標準液 (各 10 mg/L) を調製した。この混合標準液を, ポリプロピレン製メスフラスコを用いて適宜希釈して試験に用いた。なお, ジクワットおよびパラコートは, 強吸着性を持つためガラス製の器具を用いるとその壁面に吸着して回収率が著しく低下することが知られているため, 両農薬を含む溶液が接触する器具は全てポリプロピレン製のものを使用した。

また, ギ酸アンモニウム 9.45 g を 900 mL の精製水で溶解し, ギ酸 (5.6 mL) で pH 3.6 に調整後, 精製水を加えて 1000 mL に定容し, LC/MS/MS の移動相として用いる pH3.6 ギ酸アンモニウム酸緩衝液(0.15 mol/L)を調製した。

4. 分析条件の最適化

調製した各農薬の標準液および混合標準液を用いて LC/MS/MS (Shimadzu Prominence UFLC - LCMS 8030 plus, 島津製作所) の分析条件の検討を行った。最初に, 各農薬の個別標準液を用いて, スキャンモードにより各農薬の ESI ポジティブイオンおよびネガティブイオンモード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。次に, 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。スキャンモードによる分析で, 最も強度の強いイオンが一つに絞れなかった場合は, 複数のプリカーサイオンでプロダクトイオンスキャンを行い, 最も強度の強いプロダクトイオンを定量イオンとして選択した。

各農薬のモニターイオンを決定後, 混合標準溶液を用いて LC/MS/MS 一斉分析条件を検討した。

5. 分析法の妥当性評価

開発した分析法の妥当性を評価するため, 以下の手順に従って水道水を用いた添加回収試験を行い, 試験結果がガイドラインの目標を満たすかどうかについて確認した。

5.1 添加試料の調製

洗浄済みのポリプロピレン製容器に水道水 500 mL を採取し, チオ硫酸ナトリウム

を 10 mg 添加した後、よく攪拌した。この 50 mL に、農薬混合標準液を目標値の 1/10 および 1/100 の濃度となるように添加したものを検査試料水とした（添加濃度については表 3 を参照）。また、農薬混合標準液未添加の脱塩素処理済み水道水を、空試験用の試料水として別途用意した。各濃度の添加試料および空試験の検査試料は 5 つずつ調製し、よく攪拌した後で、以下の前処理および分析操作を行った。

5.2 試料の前処理

固相カラム Oasis WCX (60 mg/3cc, 30 μm, Waters) にメタノール 3 mL および精製水 3 mL を順次注入してカラムのコンディショニングを行った。次に、検査試料水を毎分 2~3 mL の流量で固相カラムに流した後、精製水 3 mL およびメタノール 1 mL を流してカラムを洗浄した。次いで、固相カラムの上端からアセトニトリル/ギ酸 (90:10) 混合液 2.5 mL を緩やかに流し、ポリプロピレン製の試験管に採った。試験管の溶出液に窒素ガスを緩やかに吹き付けて 0.2 mL 以下に濃縮した後、アセトニトリル/ギ酸 (90:10) 混合液を加えて 1 mL とし、これを試験溶液とした。

5.3 LC/MS/MS 分析

最適化した分析条件を用いて、試験溶液（高濃度および低濃度）および空試験用試料水の 20 μL を LC/MS/MS に注入し、各農薬のピーク面積および S/N 比を求めた。各農薬の添加試料中のモニターイオンのピーク面積から、空試験試料中のピーク面積を差し引いた後、作成した検量線を用いて検査試料水中の各農薬の濃度を求めた。

5.4 検量線の作成

農薬混合標準液の一定量をポリプロピレン製 10 mL メスフラスコに採り、アセトニトリル/ギ酸 (90:10) 混合液で定容して 1, 2, 5, 10, 20, および 50 μg/L の 6 段階の検量線用標準液を調製した。また、調製に用いたアセトニトリル/ギ酸 (90:10) 混合液を、検量線のブランク標準液として別途用意した。検量線用標準液および検量線ブランクは、検査試料水と同様に LC/MS/MS 分析を行い、各農薬の検量線用標準液中のフラグメントイオンのピーク面積から検量線ブランク中のピーク面積を差し引いた後、検量線を作成した。検量線用標準液は 4 回の繰り返し測定を行い、再現性および直線性を確認した。

表 3 に、各農薬の目標値と、試験溶液検査試料水における各農薬の添加濃度および検量線の濃度範囲についてまとめた。

表 3. 各農薬の添加濃度と検量線範囲との関係

農薬名称	目標値 (mg/L)	検水中の添加濃度(μg/L)		試験溶液中の濃度(μg/L)		検量線用標準液中の濃度(μg/L)					
		低	高	低	高	1	2	3	4	5	6
ジクワット	0.005	0.05	0.5	2.5	25	1	2	5	10	20	50
パラコート	0.005	0.05	0.5	2.5	25	1	2	5	10	20	50

C. 結果と考察

1. 分析条件の最適化

最適化により決定した LC/MS/MS 一斉分析条件（表 4）および各農薬の保持時間とモニターイオン（表 5）を以下に示す。また、精製水で希釈した 50 µg/L の混合標準液（20 µg/L 注入）の LC/MS/MS 一斉分析クロマトグラムを図 1 に示す。ジクワット・パラコートともに良好なピーク形状と分離が得られた。

表 4. LC/MS/MS 分析条件

項目	設定値
カラム	Atlantis HILIC Silica (2.1 mm I.D. ×100 mm, 粒径 3µm, Waters)
移動相	アセトニトリルと pH3.6 ギ酸アンモニウム緩衝液を (50/50) に混合したもの
LC	
流速	0.40 mL/min
カラム温度	35°C
サンプルクーラー温度	5°C
注入量	20 µL
MS	
イオン化法	ESI 法 (ポジティブイオンモード)
プローブ電圧	+4.5 kV
ネブライザーガス流量	1.5 L/min
ドラインガス流量	10 L/min
脱溶媒部(DL)温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C

表 5. 各農薬の LC/MS/MS 分析条件

ID	農薬名	保持時間 (min)	定量イオン (m/z)*	確認イオン (m/z)*
対 67	ジクワット	3.666	184.10 > 128.00	184.10 > 156.00
対 72	パラコート	4.173	186.30 > 170.95	186.30 > 77.00

*: プリカーサイオン > プロダクトイオンの順に記載した。

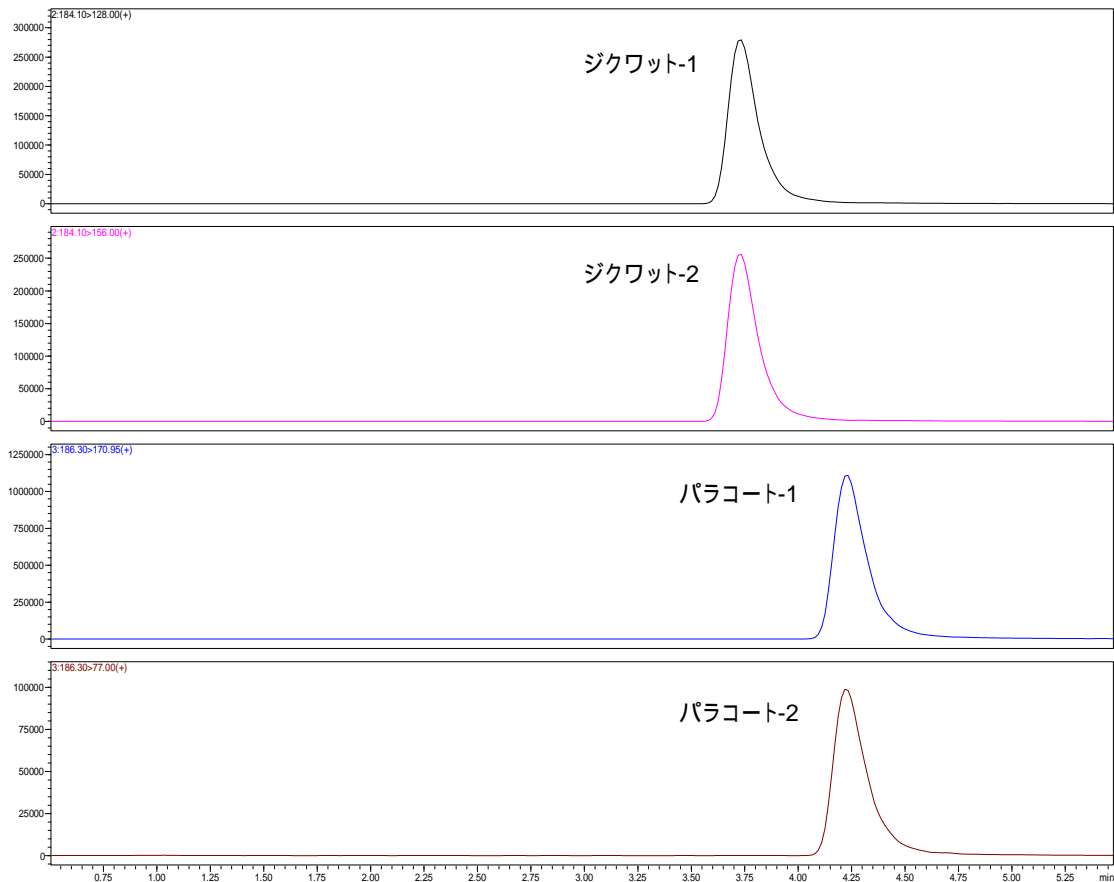


図1. ジクワットおよびパラコートのLC/MS/MS クロマトグラム

2. 分析法の妥当性評価

2.1 検量線の評価

ジクワットおよびパラコートの検量線をそれぞれ図2および図3に示す。いずれの農薬についても、検量線の決定係数 r^2 は 0.995 以上と高い値を示した。また、50 倍の濃縮倍率を考慮した目標値の 1/100 の濃度 (2.5 $\mu\text{g/L}$) 以下の低濃度の標準溶液の測定においても、ジクワット・パラコート共にピークの定量を行うことができ、繰り返し測定の再現性も良好であった。

ただし、ジクワットの検量線については、パラコートの検量線と比べて、直線性が若干悪く、1 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲で 1 本の検量線を引いた場合、特に 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液の測定結果と検量線とのずれが大きかった (図2上)。一方、1 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲に限定して検量線を作成すると、1 および 2 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液の測定結果と検量線とのずれはほとんどなくなった (図2下)。このことから、ジクワットの検量線については、1 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ の範囲では直線性が悪くなるものと判断し、0.05 $\mu\text{g/L}$ の濃度の添加試料 (前処理において 50 倍濃縮されるため試料溶液としては 2.5 $\mu\text{g/L}$ に相当) の定量を行う際には、1 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲に限定した検量線を用いた。

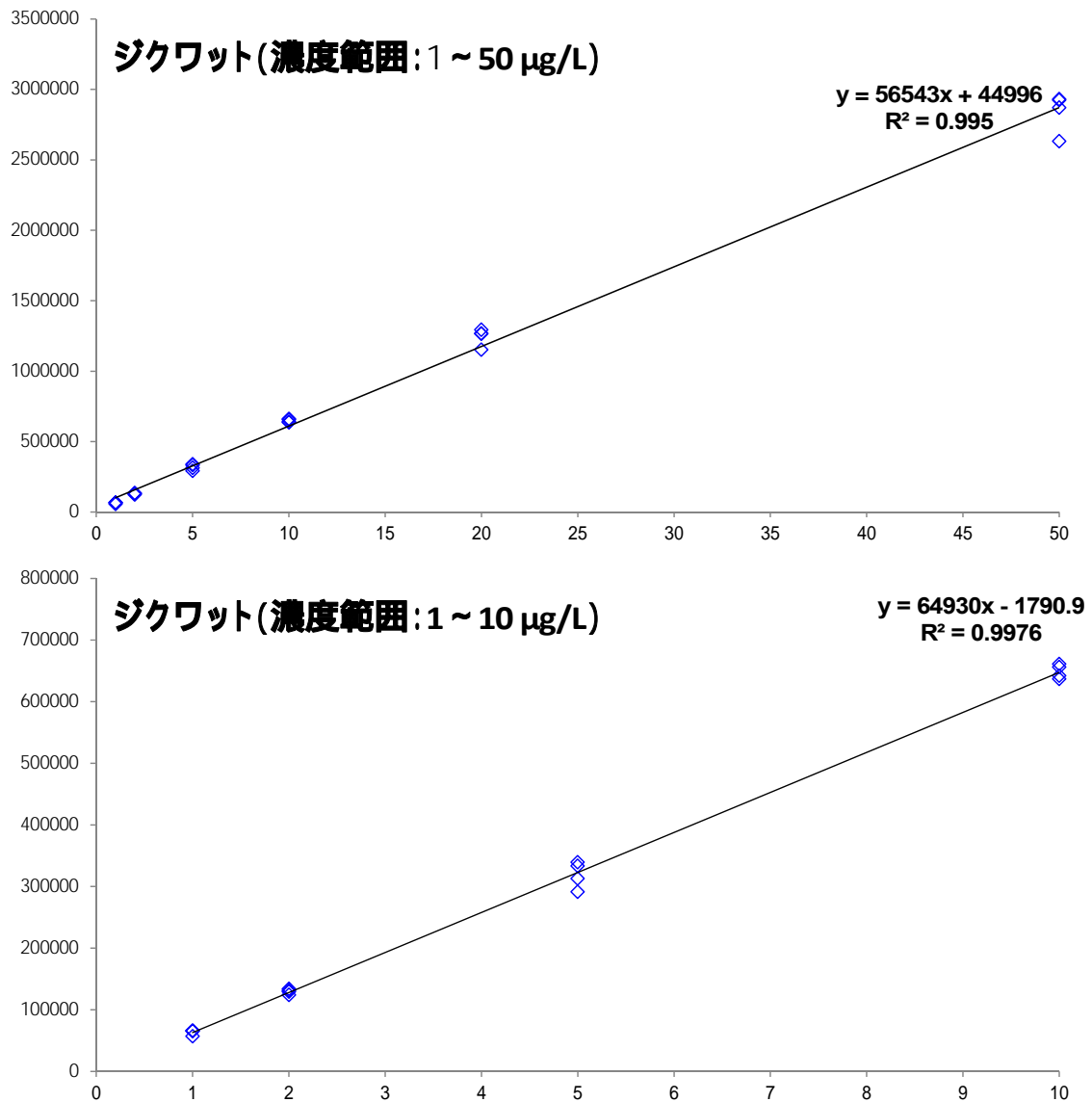


図2. ジクワットの検量線
(上: 濃度範囲 1 ~ 50 µg/L , 下: 濃度範囲 1 ~ 10 µg/L)

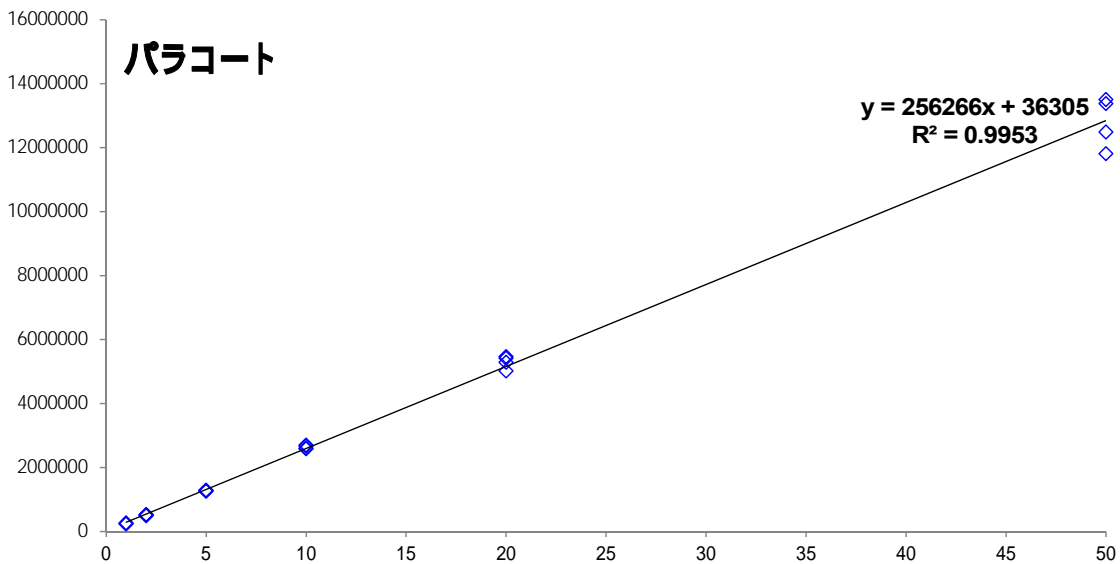


図 3. パラコートの検量線

2.2 添加回収試験結果の評価

ジクワットおよびパラコートの水道水添加回収試験の結果をそれぞれ表 6 および表 7 に示す。

いずれの農薬も、目標値の 1/10 および 1/100 の両方の添加濃度の検査試料水の試験において良好な回収率が得られ、平均値のみならず 5 回の繰り返し試験における回収率が全てガイドラインの目標（70～120%）を満たした。また、併行精度についても、添加濃度によらず良好な結果が得られ、ガイドラインの目標（目標値の 1/10 の濃度では < 25%、目標値の 1/100 の濃度では < 30%）を満たした。

表 6. ジクワットの水道水添加回収試験結果

添加濃度(μg/L)	回収率 (%)					RSD _r (%)	
	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
0.5	92	96	89	94	95	93	3
0.05	91	87	87	89	89	88	2

表 7. パラコートの水道水添加回収試験結果

添加濃度(μg/L)	回収率 (%)					RSD _r (%)	
	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
0.5	91	96	92	100	99	96	4
0.05	87	85	82	85	88	86	3

D. 結論

水道水質検査の対象農薬リストに掲載されているが標準検査法が未だ設定されて

いないパラコートの実験法を開発した。パラコートは高極性で水溶解度が高いため、水道水中の農薬分析で通常用いられる逆相分配による固相抽出および分析が困難な物質である。また、ジクワットも同様の性質を持ち、現行のジクワットの標準検査法では、農薬類の検査で原則達成すべき定量下限値（目標値の 1/100）が得られない。ジクワットおよびパラコートについて、弱陽イオン交換基と逆相の二つの保持能を併せ持つミックスモード固相を使用した前処理法による回収率の評価および LC/MS/MS による分析条件の最適化を行った。

標準溶液を用いた LC/MS/MS 分析条件の検討の結果、ジクワット・パラコートともに良好なピーク形状と分離が得られ、検量線の決定係数 r^2 は 0.995 以上と高い値を示した。また、50 倍の濃縮倍率を考慮した目標値の 1/100 の濃度（2.5 $\mu\text{g/L}$ ）以下の低濃度の標準溶液の測定においても、ピーク定量を行うことができ、繰り返し測定の再現性も良好であった。

また、チオ硫酸ナトリウムを用いて脱塩素処理した水道水に、各農薬の目標値の 1/10 および 1/100 の濃度となるように標準溶液を添加した試料を用いて分析法の妥当性評価を行ったところ、いずれの農薬も、目標値の 1/10 および 1/100 の両方の添加濃度の検査試料水の試験において良好な回収率が得られ、平均値のみならず 5 回の繰り返し試験における回収率が全てガイドラインの目標（70～120%）を満たした。また、併行精度についても、添加濃度によらず良好な結果が得られ、ガイドラインの目標（目標値の 1/10 の濃度では < 25%、目標値の 1/100 の濃度では < 30%）を満たした。

以上のことから、ジクワットおよびパラコートについては、ミックスモード固相を使用した前処理法および LC/MS/MS による分析を行うことで、いずれも目標値の 1/100 以下の濃度まで精度の高い分析が可能であることが示された。

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

ICSS (2001) 国際化学物質安全性カード ジクワットジプロミド .

<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss1363c.html>

環境省 (2010) 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料
パラコートジクロリド (パラコート). 平成 22 年 2 月 1 日 .

http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/h28_paraquat%20dichloride.pdf

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/hourei/jimuren/dl/120906-1.pdf>