

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

ピラクロニル，フェリムゾンの分析法開発

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ピラクロニルおよびフェリムゾンの分析法開発を行った。これら 2 農薬は、いずれも LC/MS あるいは LC/MS/MS による分析が可能であると考えられたため、厚生労働省から通知されている別添方法 20（LC/MS あるいは LC/MS/MS による一斉分析法）との同時分析が適用できるかどうかについて検討した。

標準溶液を用いた条件検討の結果、別添方法 20 とほぼ同一の分析条件において、いずれも良好なピーク形状と分離が得られ、目標値の 1/100 以下の濃度においても定量可能であった。

また、アスコルビン酸ナトリウムおよび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 となるように標準溶液を添加した試料を用いて妥当性評価を行ったところ、ピラクロニルについては、いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度においてガイドラインの回収率の目標（70～120%）と、併行精度の目標（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。

フェリムゾンについては、アスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理した試料からはピークが全く検出されなかったことから、アスコルビン酸ナトリウムとの反応により分解したものと考えられた。チオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理した試料においては、目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度においてガイドラインの回収率の目標（70～120%）と併行精度の目標（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、ピラクロニルとフェリムゾンのどちらも、LC カラムの選択やグラジエント条件の検討を十分に行えば、別添方法 20 に記載された他の農薬との LC/MS/MS 一斉分析が可能と考えられる。しかし、フェリムゾンについては、アスコルビン酸ナトリウムによる分解が示唆されたため、分析法の妥当性評価を行う際には、チオ硫酸ナトリウム等の分解反応が起きない他の脱塩素処理剤を用いて分析を行う必要がある。

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ピラクロニルおよびフェリムゾンの分析法を開発することを目的とした。これら2農薬は、いずれもLC/MSあるいはLC/MS/MSによる分析が可能であると考えられたため、厚生労働省から通知されている別添方法20(LC/MSあるいはLC/MS/MSによる一斉分析法)との同時分析が適用できるかどうかについて検討した。

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」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

ピラクロニルは、ピラゾリルピラゾール環を有する除草剤である。フェリムゾンは、菌類の菌糸生育及び孢子形成を阻害することにより殺菌活性を有する殺菌剤である。なお、フェリムゾンには光学異性体(E体およびZ体)が存在し、厚生労働省が定める食品中の残留農薬等の基準(厚生労働省,2007)においては、フェリムゾンはE体とZ体の和として定義されているため、本研究ではフェリムゾンEとフェリムゾンZの両方を対象とした。

ピラクロニルおよびフェリムゾンの基本的情報をそれぞれ表1および表2に示す。

表1. ピラクロニルの基本的情報(環境省2007より引用)

化学名	1-(3-クロロ-4,5,6,7-テトラヒドロピラゾロ[1,5- <i>b</i>]ピリジン-2-イル)-5-[メチル(プロパ-2-イニル)アミノ]ピラゾール-4-カルボニトリル
分子式	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₆
分子量	314.78
CAS NO.	158353-15-2
外観	白色固体・無臭(20℃)
融点	93.1~94.6
沸点	263 付近からの熱分解により測定不能(窒素置換,2.33 kPa)
蒸気圧	1.9×10 ⁻⁷ Pa(25℃,外挿)
水溶解度	5.01×10 ⁴ μg/L(20℃)
土壌吸着係数	K _{oc} = 161~362(25℃)
オクタノール/水分配係数	logP _{ow} = 2.18(25℃)
密度	1.325 g/cm ³ (20℃)
加水分解性(半減期)	1年以上(pH4,25℃),1年以上(pH7,25℃) 1年以上(pH9,25℃),安定(pH1.2,37℃)
水中光分解性(半減期)	320日(緩衝液),42日(自然水)

表 2. フェリムゾンの基本的情報（環境省 2010 より引用）

化学名	(Z)-2'-メチルアセトフェノン=4,6-ジメチルピリミジン-2-イル ヒドラジン
分子式	C ₁₅ H ₁₈ N ₄
分子量	254.34
CAS NO.	89269-64-7
外観	白色粉末，無臭
融点	173.9
沸点	昇華するため測定不能
蒸気圧	4.12×10 ⁻⁶ Pa (20)
水溶解度	2.1×10 ⁵ µg/L (20)
土壌吸着係数	K _F ^{ads} _{OC} = 380 ~ 8,100 (23)
オクタノール/水分配係数	logP _{ow} = 2.9 (25)
密度	0.66 g/cm ³ (20)
加水分解性（半減期）	6.2 時間 (pH1.2, 25) , 2.3 日 (pH3, 25) 12.5 日 (pH5, 25) , 188 日 (pH7, 25) 8.6 年 (pH9, 25) , 10 ヶ月 (自然水, 25)
水中光分解性（半減期）	<0.29 時間 (緩衝液、pH9) , <4.6 時間 (滅菌自然水) (44 W/m ² , 360 ~ 480 nm)

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) 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。

(3) 酢酸アンモニウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(4) アスコルビン酸ナトリウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(5) 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。

(6) 農薬混合標準原液

ピラクロニルおよびフェリムゾンの標準品は，和光純薬工業(株)の残留農薬分析用の規格品を使用した。ただし，フェリムゾンについては，フェリムゾン（E 体）とフェリムゾン（Z 体）の標準品がそれぞれ別に販売されているため，両方の標準品を使用

した。

3. 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，メタノールで 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 100 μ L をメスフラスコに採り，10 mL に定容して各農薬の標準液を調製した（各 10 mg/L）。

ピラクロニル標準液（10 mg/L）の 100 μ L，フェリムゾン E 標準液（10 mg/L）の 250 μ L，フェリムゾン Z 標準液（10 mg/L）の 250 μ L をメスフラスコに採り，メタノールを加えて 10 mL に定容して混合標準液を調製した。この混合標準液には，ピラクロニルを 0.1 mg/L，フェリムゾンを 0.5 mg/L（フェリムゾン E：0.05 mg/L，フェリムゾン Z：0.05 mg/L）ずつ含む。この混合標準液を適宜希釈して試験に用いた。

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。別添方法 20 の対象農薬との一斉分析を可能とするため，過去に別添方法 20 の対象農薬の分析法を検討した際の分析条件（小林ら，2014a；2014b）と同条件で分析を行ったが，グラジエント条件のみ若干の変更を行った。

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

洗浄済みのガラス瓶に水道水 500 mL を採取し，脱塩素処理剤を 20 mg 添加した後，よく攪拌した。脱塩素処理剤による分解等の影響について知見を得るため，脱塩素処理剤はアスコルビン酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムそれぞれを使用し，試験結果を比較した。アスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理した水道水およびチオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理した水道水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、よく撈拌した後で、それぞれ1回ずつ（合計5回）分析操作を行った。

5.2 LC/MS/MS 分析

最適化した分析条件を用いて、検査試料水（高濃度および低濃度）および空試験用試料水の100 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。

5.3 検量線の作成

農薬混合標準溶液を精製水に添加し、各農薬につき5つの検量線用の標準液を調製した。また、農薬混合標準液未添加の精製水を、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5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、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

ID	農薬名称	目標値 (mg/L)	添加濃度 低 (µg/L)	添加濃度 高 (µg/L)	検量線の範囲 (µg/L)				
					1	2	3	4	5
対74	ピラクロニル	0.01	0.1	1	0.05	0.1	0.3	1	2
対83	フェリムゾン	0.05	0.5	5	0.25	0.5	1.5	5	10

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全農薬共通のLC/MS/MS一斉分析条件および各農薬の個別のLC/MS/MS一斉分析条件を表4および表5に示す。また、精製水で希釈した1 µg/Lの混合標準液（100 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。いずれの農薬についても良好なピーク形状と分離が得られたが、フェリムゾンについては、E体とZ体のピークが完全に分離しなかったため、2つのピーク面積を併せて1つのピークとして定量した。

表 4. LC/MS/MS 一斉分析条件

項目	設定値
カラム	Shim-pack FC-ODS (2.0 mm I.D. ×150 mm, 粒径 3μm, 島津製作所)
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B	5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
LC グラジエント条件	B5% (0 min) – B45% (4 min) – B75% (24–27 min) – B5% (27.1–40 min)
流速	0.20 mL/min
カラム温度	40°C
サンプルクーラー温度	5°C
注入量	100 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	イオン化法	保持時間 (min)	定量イオン (<i>m/z</i>)*	確認イオン (<i>m/z</i>)*
対 74	ピラクロニル	ESI+	15.60	315.10 > 169.00	315.10 > 241.00
対 83	フェリムゾン	ESI+	21.06	255.00 > 91.10	255.00 > 132.00

*: プリカーサイオン > プロダクトイオンの順に記載した。

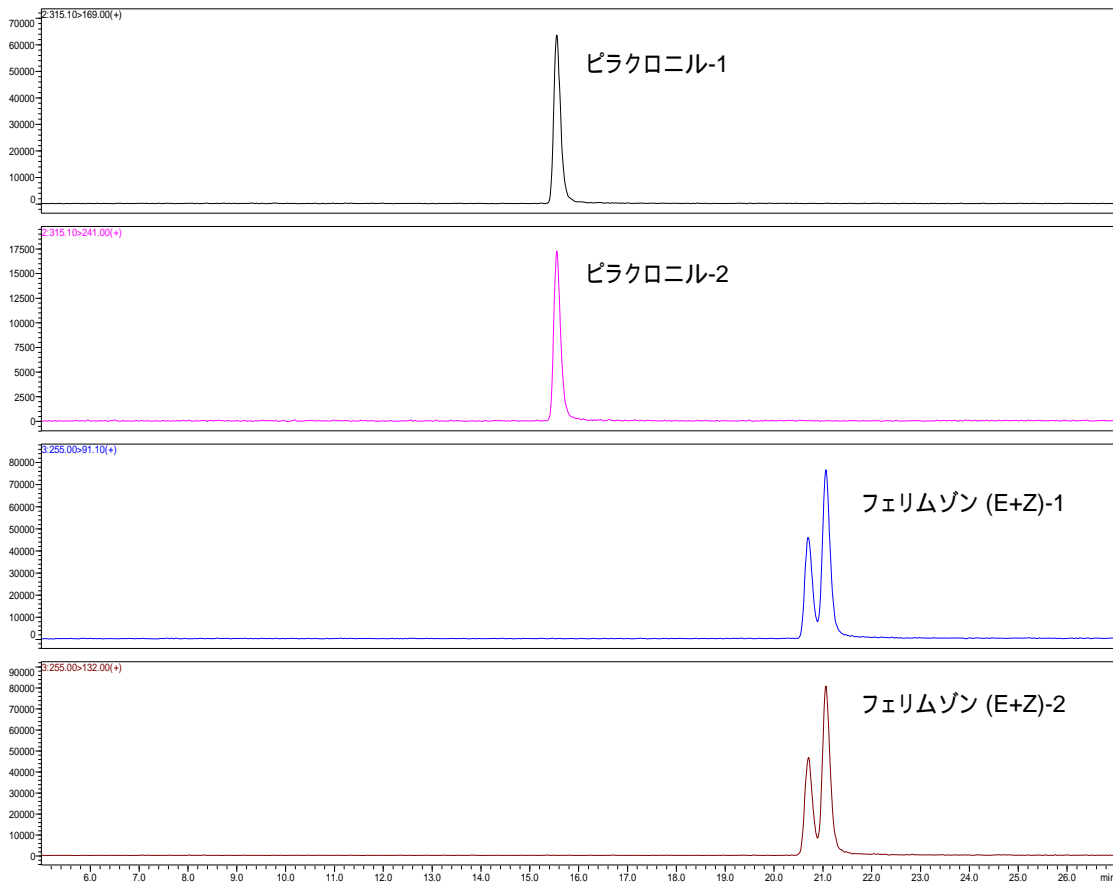


図1. ピラクロニルおよびフェリムゾン (E+Z) の LC/MS/MS クロマトグラム

2. 分析法の妥当性評価

2.1 検量線の評価

ピラクロニルおよびフェリムゾン (E+Z) 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直線性および再現性は良好であり、検量線の最低濃度 (低濃度添加試料中の各農薬の 1/2 の濃度, すなわち目標値の 1/200 の濃度) においてもピークの定量を行うことができた。

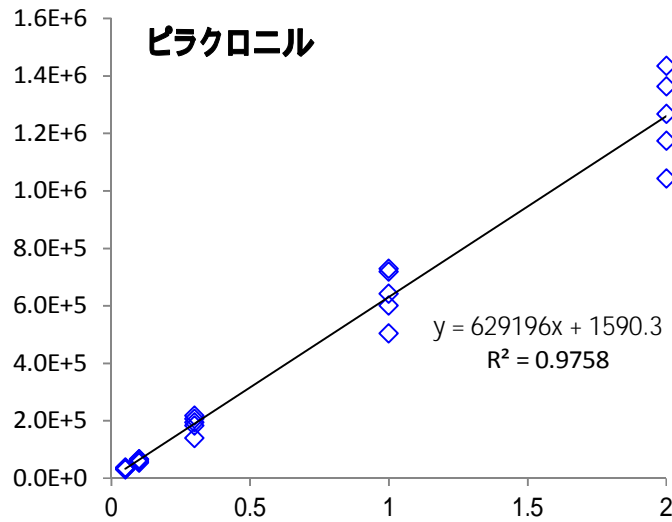


図2. ピラクロニルの検量線

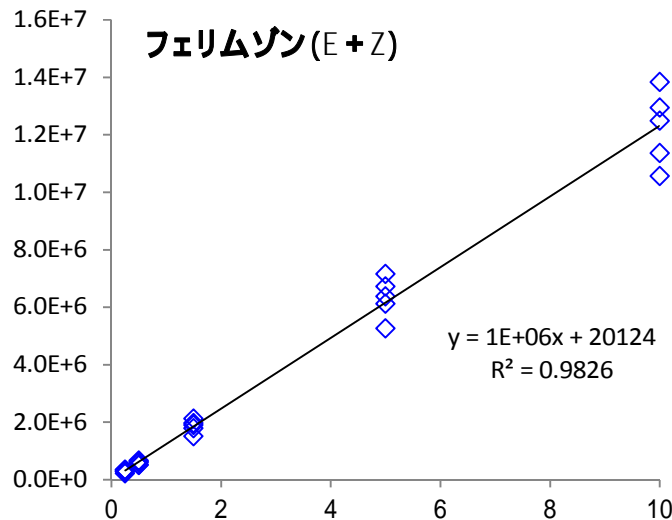


図3. フェリムゾン (E+Z) の検量線

2.2 添加回収試験結果の評価

アスコルビン酸ナトリウム脱塩水道水およびチオ硫酸ナトリウム脱塩水道水における各農薬の高濃度・低濃度添加試料の試験結果を表6～表9に示す。

ピラクロニルについては、いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、目標値の1/10および1/100の添加濃度において良好な回収率が得られ、平均値だけでなく、5回の繰り返し試験における全ての回収率が、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。

フェリムゾンについては、アスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理した試料からはピークが全く検出されなかった(表6および表7)ことから、アスコルビン酸ナトリウムとの反応により分解したものと考えられた。チオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理し

た試料においては、目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度において良好な回収率が得られ、平均値だけでなく、5 回の繰り返し試験における全ての回収率が、妥当性評価ガイドラインの目標（70～120%）を満たした（表 8 および表 9）。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. アスコルビン酸 Na 脱塩水道水（高濃度添加試料）の試験結果

ID	農薬名	添加濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)					平均	RSD _r (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 74	ピラクロニル	1	110	98	108	95	91	100	8
対 83	フェリムゾン	5	-	-	-	-	-	-	-

フェリムゾンについては、ピークが検出されなかった。

表 7. アスコルビン酸 Na 脱塩水道水（低濃度添加試料）の試験結果

ID	農薬名	添加濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)					平均	RSD _r (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 74	ピラクロニル	0.1	105	92	101	90	86	95	8
対 83	フェリムゾン	0.5	-	-	-	-	-	-	-

フェリムゾンについては、ピークが検出されなかった。

表 8. チオ硫酸 Na 脱塩水道水（高濃度添加試料）の試験結果

ID	農薬名	添加濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)					平均	RSD _r (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 74	ピラクロニル	1	109	103	102	88	92	99	9
対 83	フェリムゾン	5	106	106	100	90	89	98	8

表 9. チオ硫酸 Na 脱塩水道水（低濃度添加試料）の試験結果

ID	農薬名	添加濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)					平均	RSD _r (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 74	ピラクロニル	0.1	105	97	97	84	85	94	10
対 83	フェリムゾン	0.5	103	98	94	86	82	93	9

D. 結論

ピラクロニルおよびフェリムゾンについて、厚生労働省から通知されている別添方法 20（LC/MS あるいは LC/MS/MS による一斉分析法）との同時分析が適用できるかどうかについて検討した。

標準溶液を用いた LC/MS/MS 分析条件検討の結果、別添方法 20 とほぼ同一の分析

条件において、いずれも良好なピーク形状と分離が得られ、目標値の 1/100 以下の濃度においても定量可能であった。

また、アスコルビン酸ナトリウムおよび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 となるように標準溶液を添加した試料を用いて妥当性評価を行ったところ、ピラクロニルについては、いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度においてガイドラインの回収率の目標（70～120%）と、併行精度の目標（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。

フェリムゾンについては、アスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理した試料からはピークが全く検出されなかったことから、アスコルビン酸ナトリウムとの反応により分解したものと考えられた。チオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理した試料においては、目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度においてガイドラインの回収率の目標（70～120%）と併行精度の目標（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、ピラクロニルとフェリムゾンのどちらも、LC カラムの選択やグラジエント条件の検討を十分に行えば、別添方法 20 に記載された他の農薬との LC/MS/MS 一斉分析が可能と考えられる。しかし、フェリムゾンについては、アスコルビン酸ナトリウムによる分解が示唆されたため、分析法の妥当性評価を行う際には、チオ硫酸ナトリウム等の分解反応が起きない他の脱塩素処理剤を用いて分析を行う必要がある。

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

環境省 (2007) 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
ピラクロニル．平成 19 年 4 月 18 日．

http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/h02_pyraclonil.pdf

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
フェリムゾン．平成 22 年 3 月 3 日．

http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/h31_ferimzone.pdf

厚生労働省 (2007) 食品衛生法等の一部を改正する法律による改正後の食品衛生法第
11 条第 3 項の施行に伴う関係法令の整備について．厚生労働省医薬食品局食品安
全部長，食安発第 1129001 号，平成 17 年 11 月 29 日 (最終改正：平成 19 年 5 月 31
日)．

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu2/dl/051129-4.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>

小林憲弘，久保田領志，田原麻衣子，杉本直樹，塚本多矩，五十嵐良明 (2014a) 水道
水中の農薬類の LC/MS/MS 一斉分析法の開発．環境科学会誌，27(1), 3–19.

小林憲弘，久保田領志，高玲華，安藤正典，五十嵐良明 (2014b) 液体クロマトグラフ
ィータンデム質量分析 (LC/MS/MS) による水道水中農薬類の一斉分析法の妥当性
評価．水道協会雑誌，83(4), 3–14.