

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

プロチオホスの分析法開発

研究分担者	川元 達彦	兵庫県立健康生活科学研究所	健康科学部
研究協力者	矢野 美穂	兵庫県立健康生活科学研究所	健康科学部

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プロチオホスは、標準検査法が未設定であり、本農薬の分析法の開発を目的とした。

プロチオホスは、予備検討において、GC/MS 装置で検出できるが、水溶解度が低い性質を持つため、実験器具等に吸着しやすく、良好な回収率を得ることが課題となっている。そこで、固相抽出過程での実験器具への吸着の低減化法について検討し、回収率の向上を図るとともに、GC/MS による分析条件の最適化を行った。

前処理過程である固相抽出条件の検討の結果、試料 500 mL に対して塩酸を添加して pH を酸性 (pH = 3.0) にすることで、固相カラムはポリマー系のジビニルベンゼン共重合体に N - ビニルピロリドンを導入した固相カラムを適用することで、固相カラムに吸着したプロチオホスは、ジクロロメタンなどの有機溶媒によって容易に脱離し、回収率は 80% 以上と良好な結果を示すことが分かった。なお、中性 (pH = 7.0) の水試料に、同様の固相カラム及び溶出条件では、回収率は 50% 前後と低いこと、ガラス器具等に一部が吸着していることを確認した。また、精製水を用いた空試験において、プロチオホスは全く検出されないことも確認した。

固相抽出-GC/MS 測定条件の最適化の結果、目標値 4 $\mu\text{g/L}$ の 1/100 のプロチオホス濃度 (0.04 $\mu\text{g/L}$) の繰り返し測定における SN 比は良好であった。

さらに、分析法の妥当性を評価するため、脱塩素処理後の水道水にプロチオホスの目標値の 1/100 濃度 (0.04 $\mu\text{g/L}$) となるように添加した試料を用いて、5 回の繰り返し試験を実施したところ、妥当性評価ガイドラインの目標を満たす回収率 (真度) (70 ~ 120%) と併行精度 (<30%) が得られた。

以上のことから、水道水中のプロチオホス分析については、脱塩素処理後、塩酸を加えて pH を 3.0 に調整し、ポリマー系の固相カラムで濃縮・精製を行い GC/MS 法で測定することで、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プロチオホスは、標準検査法が未設定であり、本農薬の分析法の開発を目的とした。

プロチオホスは、予備検討において、GC/MS 装置で検出できることが分かっているが、水溶解度が低い性質を持つため、実験器具に吸着しやすく、良好な回収率を得ることが課題となっている。そこで、固相抽出過程での実験器具への吸着の低減化法について検討し、回収率の向上を図るとともに、GC/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、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

プロチオホスは、野菜、果樹用の殺虫剤として広く使用されており、使用量が多い。化学的には有機リン系農薬に分類され、脂溶性が高い物質である（表1）。

平成 25 年 4 月に通知された農薬類の分類見直しにおいて、120 農薬がリストアップされたが、プロチオホスの目標値は 0.004mg/L として設定されている。

表 1. プロチオホスの物理化学的性質等の概要

農薬名	CAS No.	分子式	分子量	目標値 (mg/L)	沸点 ()	logPow
プロチオホス	34643-46-4	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂	345.2	0.004	125-128	5.67

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

(2) メタノール

和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用（5,000 倍）の規格品を使用した。

(3) ジクロロメタン

和光純薬工業(株)製の残留農薬分析用（5,000 倍）の規格品を使用した。

(4) アセトン

和光純薬工業(株)製の残留農薬分析用（5,000 倍）の規格品を使用した。

(5) アスコルビン酸ナトリウム

関東化学(株)製の特級品を使用した。

(6) 1mol/L 塩酸水溶液

濃塩酸は和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。この濃塩酸を用いて、精製水で希釈を行い、1mol/L 水溶液を調製した。

(7) 9-ブロモアントラセン内部標準品

関東化学(株)製の9-ブロモアントラセン内部標準原液(1 mg/mL)を使用した。

(8) プロチオホス標準品

和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

3. 標準液の調製

3.1. 内部標準液の調製

内部標準原液(9-ブロモフルオロベンゼン濃度 1000 mg/L)の1 mLをホールピペットで100 mLメスフラスコに採り、ジクロロメタンで100倍に薄めたもの。

この溶液1 mLには、9-ブロモアントラセンを0.01 mg含む。

3.2. 検量線用標準液の調製

プロチオホス 100 mgを100 mLメスフラスコに採り、ジクロロメタンに溶かして100 mLとした。この溶液1 mLにはプロチオホス1 mgが含まれる。この溶液1 mLを100 mLメスフラスコに採り、ジクロロメタンで100倍に薄めたものを標準原液とした。この溶液1 mLにはプロチオホス0.01 mgが含まれる。この標準溶液をジクロロメタンで順次希釈し、0.001 ~ 0.5 mg/Lの濃度範囲の検量線用標準液を調製した。

3.3. 添加回収試験用標準液の調製

プロチオホス標準品の1 mgを秤量して100 mLメスフラスコに採り、少量のアセトンで溶解し、メタノールで定容して10 mg/Lの標準原液を調製した。

標準原液(10 mg/L)の1 mLを10 mLメスフラスコに採り、メタノールで定容として1 mg/Lの標準液を調製した。

4. 分析条件の最適化

水中プロチオホスの前処理法として、固相カラムの種類(Waters社製のPS-2及びHLB)とpH(pH1~9)との関連性について、それぞれ500 mLの精製水を用いて検討を行った。また、GC/MSによるプロチオホスの測定条件の最適化を行った。

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脱塩素後の水道水を

用いた添加回収試験を 5 回行い、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検討した。

5.1. 妥当性評価のための添加試料の調製

プロチオホスのメタノール標準液 10 mg/L 及び 1mg/L の 20 μ L を、それぞれ別々の脱塩素処理後の水道水 500mL (水道水 1 L に対しアスコルビン酸ナトリウム 10 mg を添加) に添加した。それぞれの添加試料は、プロチオホスの目標値の 1/10 及び 1/100 濃度である 0.4 μ g/L, 0.04 μ g/L を含む。

なお、上記の試料調製には、兵庫県神戸市内の水道水を使用した。

5.2. 試料の前処理

上記で調製した添加試料を、予めジクロロメタン、メタノール、精製水でコンディショニングした固相カラム (Waters 社製 HLB) に、通水速度 10mL/min 以下で通水を行った。通水後、固相カラムに精製水 20mL を通して洗浄し、10 分間、高純度窒素ガスにより脱水・乾燥を行い、ジクロロメタン 6mL で溶出を行った。その後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水を行い、高純度窒素ガスを吹き付けて約 0.2mL まで濃縮し、内部標準液 9-プロモアントラセン 5 μ L 添加し、ジクロロメタンで 0.5mL としたものを試験液とした。

なお、精製水を用いて上記と同様に操作したものを空試験用の試料水とした。

5.3. GC/MS 測定

検査試料水および空試験用の試料水について、最適化を行った GC/MS 測定条件において測定を行い、プロチオホスと内部標準液 9-プロモアントラセンのフラグメントイオンのピーク面積の比を求め、下記の操作で作成した検量線を用いて検査試料水中のプロチオホス濃度を求めた。そして、検査試料水中の各農薬の濃度を算出し、添加濃度に対する割合を回収率とした。

5.4. 検量線の作成

GC/MS 測定装置用の 2 mL バイアルに 3.2 で調製した検量線作成用標準液をホールピペットで 0.5mL 採取し、内部標準液 9-プロモアントラセンをそれぞれ 5 μ L 添加した。プロチオホスと 9-プロモアントラセンのフラグメントイオンのピーク面積を求め、検量線を作成した。

C. 結果と考察

1. 分析条件の最適化

1.1. 適切な固相カラムについて

プロチオホスを一定量添加した精製水 (0.4 μ g/L, pH7.0) を用いて、2 種類の固相カラムの回収率及び変動係数を求めた結果を表 2 に示す。

固相カラム PS-2 はスチレンジビニルベンゼン共重合体の樹脂を充填しているが、

HLBはジビニルベンゼン共重合体にN-ビニルピロリドンを導入した樹脂を充填している。2種類の固相カラムを比較検討した結果、変動係数には大きな差は認められなかったが、回収率はHLB固相カラムの方が約7%程度、良好であったのでHLBカラムを用いることとした。

なお、試料瓶の内壁をアセトンとジクロロメタンで洗浄し、GC/MS分析を行ったところ、最高値として、添加濃度の約10%に相当するプロチオホスが検出され、ガラス管壁への吸着が認められた。

表2. 2種類の固相カラムからの回収率と変動係数 (pH7.0, n=5)

	回収率 (%)	変動係数 (%)
Waters PS-2	47.5	4.0
Waters HLB	54.6	5.4

1.2. 適切な pH について

プロチオホスを一定量添加した精製水 (0.4 μ g/L) を用いて、pH を 1~9 の範囲で調製した試料水の回収率及び変動係数を求めた結果を表 3 に示す。

固相カラムは HLB としたが、pH3 付近で最も高い回収率を示すことが分かった。また、いずれの試料水においても変動係数は 10% 未満と良好な結果であった。

なお、試料瓶 (pH3) の内壁をアセトンとジクロロメタンで洗浄し、GC/MS 分析を行ったところ、最高値として、添加濃度の 1~2% に相当するプロチオホスが検出され、1.1 の実験結果と比較して僅かな吸着量であった。

表3. pH (1~9) と回収率, 変動係数の関係 (HLB, n=5)

	回収率 (%)	変動係数 (%)
pH 1	70.0	7.1
pH 3	80.7	7.0
pH 5	65.7	3.2
pH 7	53.9	2.7
pH 9	51.3	3.0

1.3. GC/MS 測定条件の最適化

分析条件の最適化により決定した GC/MS 分析条件を表 4 に示す。また、プロチオホス 9-プロモアントラセンの SCAN 測定による MS スペクトルの結果を図 1 に示す。この図から、プロチオホスの定量イオンの m/z は 267、定性イオンの m/z は 281 を選択した。また、9-プロモアントラセンの定量イオンの m/z は 258 を選択した。

表 4. GC/MS 測定条件

GC/MS 装置条件	
機種	Quantum GC (サーモフィッシャーサイエンティフィック)
注入口温度	200
注入法	スプリットレス法
カラム	DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W 社)
昇温条件	40 (3min) 25 /min 125 10 /min 280 (8.1min)
カラムガス流量	1.0 mL/min
AUX 温度	250
イオン化法	EI 法
モニターイオン (m/z)	プロチオホス: 267 (定量イオン), 281 (確認イオン) 9-プロモアントラセン (内部標準物質): 258

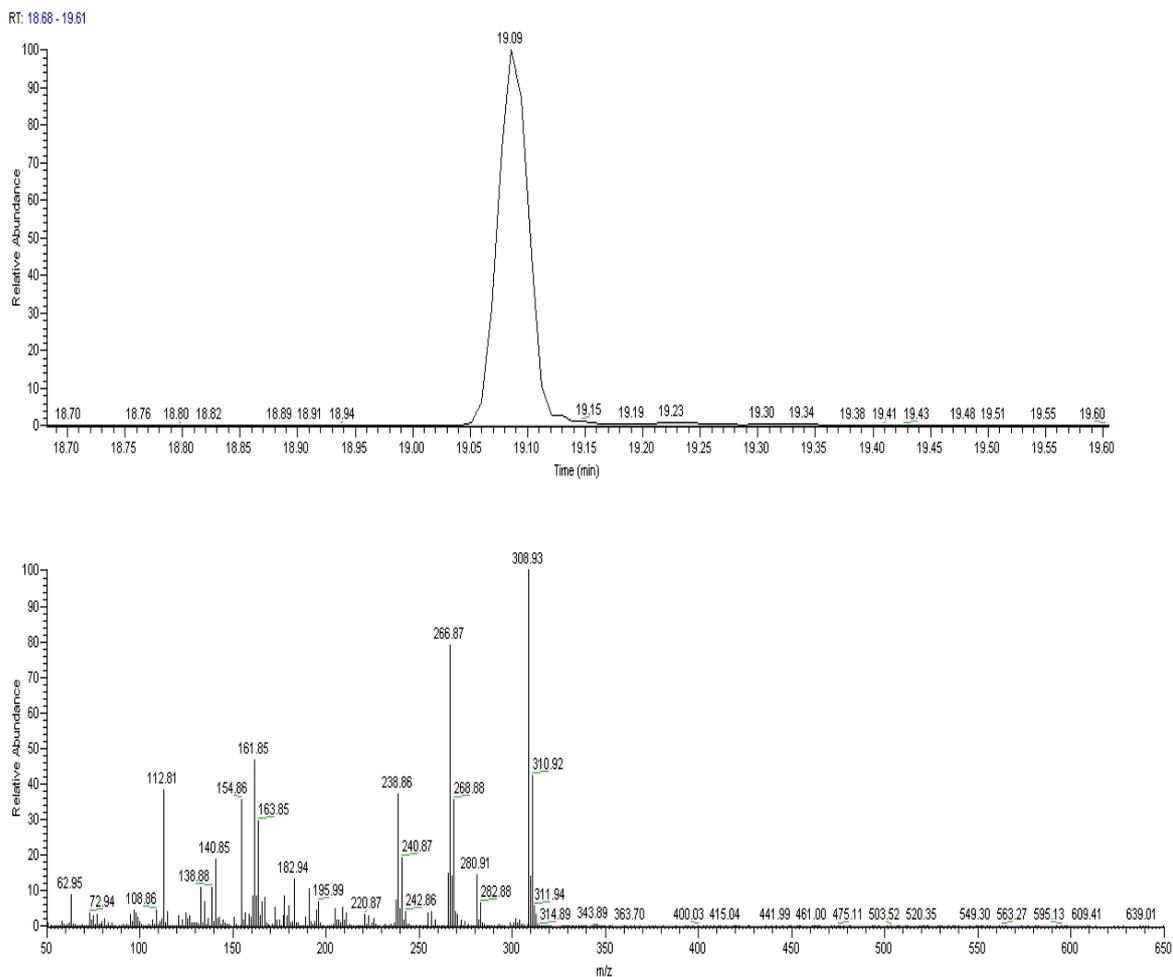


図 1. プロチオホスの検出ピークと MS スペクトル

RT: 18.12 - 20.31

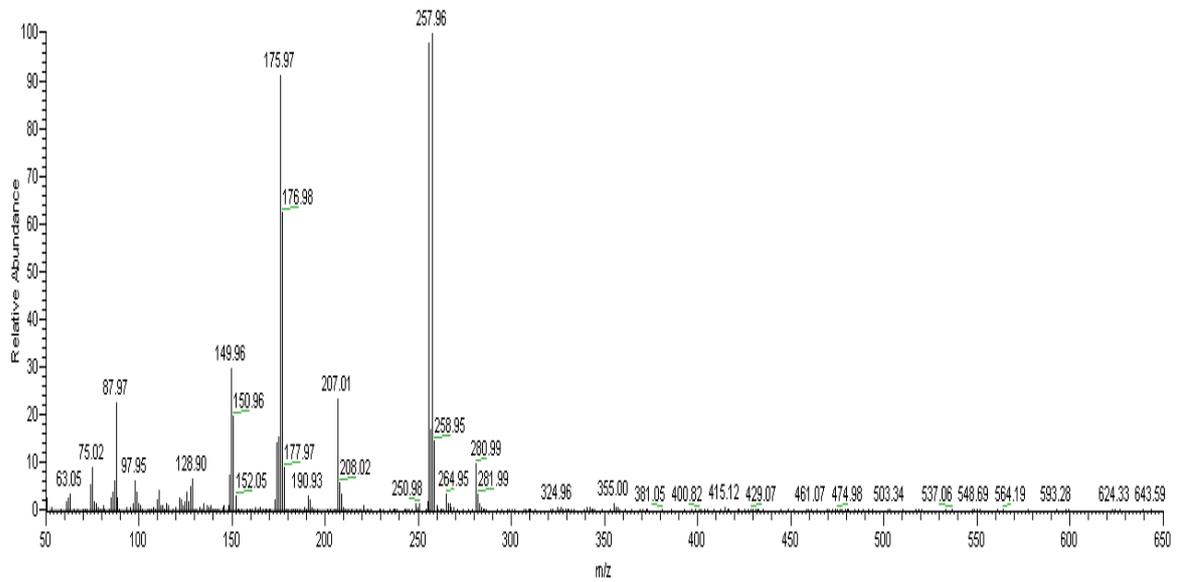
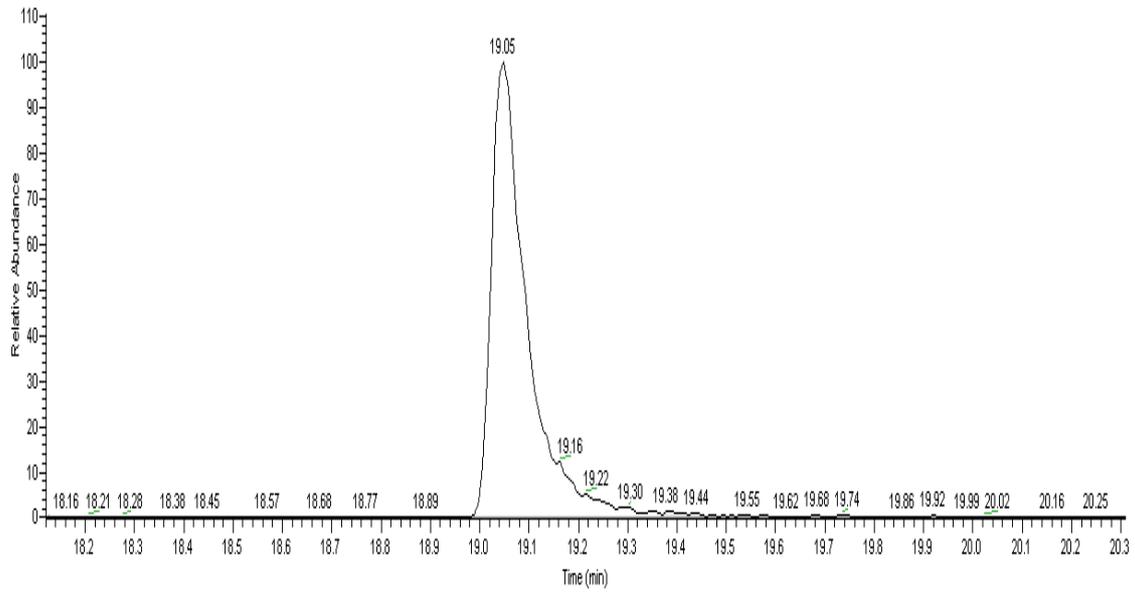


図 2. 内部標準液 9-プロモアントラセンの検出ピークと MS スペクトル

2. 分析法の妥当性評価

2.1. 検量線の評価

プロチオホスの検量線（濃度範囲：1.0～500 µg/L）を図 3 に示す．重相関係数（ r^2 ）が 0.99995 であったことから，この濃度範囲において，適切な直線性が得られたものと判断した．

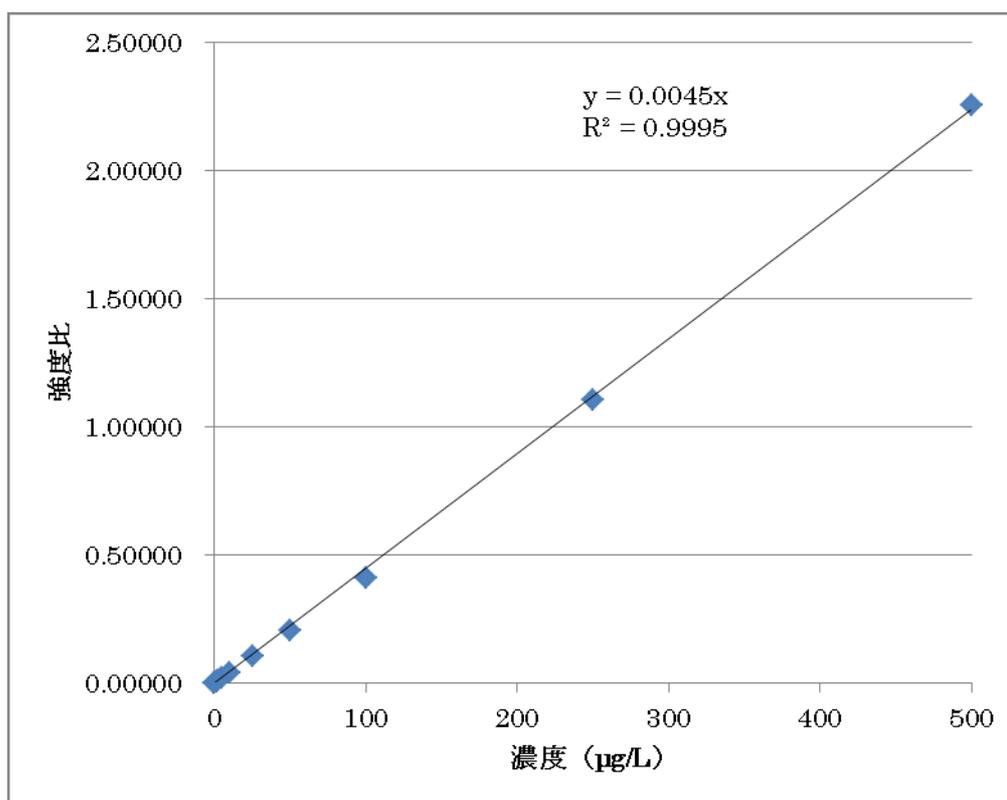


図 3. プロチオホスの検量線（濃度範囲 1.0～500 µg/L）

2.2. 水道水添加回収試験結果の評価

脱塩素処理後の水道水にプロチオホスを目標値の 1/10 濃度（0.4µg/L），1/100 濃度（0.04µg/L）を添加して pH を 3.0 に調整した試料水について，妥当性評価を行った結果を表 5 に示す．

上記の濃度で 5 回の繰り返し試験を実施したが，回収率はそれぞれ 96.1%，90.2% であった．また，併行精度はそれぞれ 8.6%，7.0% であった．

以上，いずれの試験においても妥当性評価ガイドラインの目標を満たす回収率（70～120%）と併行精度 RSD_r （<30%）が得られた．

なお，空試験を 5 回繰り返して行ったが，該当するピークは全く認められないことを確認した．

表 5. プロチオホスの水道水添加回収試験結果

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
0.4 µg/L の回収率	107.3	100.7	95.8	90.2	86.5	96.1	8.6
0.04µg/L の回収率	97.6	96.1	87.9	85.4	83.9	90.2	7.0

D. 結論

プロチオホスは、予備検討において、GC/MS 装置で検出できることが分かっているが、水溶解度が低い性質を持つため、実験器具に吸着しやすく、良好な回収率を得ることが難しい。そこで、固相抽出過程での実験器具への吸着の低減化法について検討し、回収率の向上を図るとともに、GC/MS による分析条件の最適化を行った。

前処理過程である固相抽出条件の検討の結果、試料 500 mL に対して塩酸を添加して pH を酸性 (pH = 3.0) にすることで、固相カラムはポリマー系のジビニルベンゼン共重合体に N - ビニルピロリドンを導入した固相カラムを適用することで、固相カラムに吸着したプロチオホスは、ジクロロメタンなどの有機溶媒によって容易に脱離し、回収率は 80% 以上と良好な結果を示すことが分かった。なお、中性 (pH = 7.0) の水試料に、同様の固相カラムと溶出条件では、回収率は 50% 前後と低い結果であること、ガラス器具等に一部が吸着していることを確認した。また、精製水を用いた空試験において、プロチオホスは全く検出されないことも確認した。

固相抽出-GC/MS 測定条件の最適化の結果、目標値 4 µg/L の 1/100 のプロチオホス濃度 (0.04 µg/L) の繰り返し測定における SN 比は良好であった。さらに、分析法の妥当性を評価するため、脱塩素処理後の水道水にプロチオホスの目標値の 1/100 濃度 (0.04 µg/L) となるように添加した試料を用いて、5 回の繰り返し試験を実施したところ、妥当性評価ガイドラインの目標を満たす回収率 (真度) (70 ~ 120%) と併行精度 (<30%) が得られた。

以上のことから、水道水中のプロチオホス分析については、脱塩素処理後、塩酸を加えて pH を 3.0 に調整し、ポリマー系のジビニルベンゼン共重合体に N - ビニルピロリドンを導入した固相カラムで濃縮・精製を行い、GC/MS 法で測定することで、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

宮澤長次郎，上岡雅子，腰岡政二編，最新 農薬データブック第3版，p344，ソフトサイエンス社，東京（1997）

厚生労働省 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について．別添2 農薬類（水質管理目標設定項目15）の対象農薬リスト．厚生労働省健康局長通知．平成15年10月10日付健発第1010004号（一部改正 平成23年1月28日健発0128第2号）．

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/suidouhou/tuuchi/dl/10.pdf>

厚生労働省 今後の検討対象農薬リスト 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会 資料3-8．

<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/02/s0203-3i.html>

厚生労働省 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>

厚生労働省 「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について」の一部改正について．別添2 農薬類（水質管理目標設定項目15）の対象農薬リスト．厚生労働省健康局長通知．平成25年3月28日付健発0328第7号．

http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/130328-kijun-bess_i.pdf

厚生労働省 農薬類の分類の見直しについて．厚生労働省健康局水道課長通知．平成25年3月28日付健水発0328第4～7号．

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/jimuren/dl/130328-3.pdf>