

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

平成 25 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 憲弘

国立医薬品食品衛生研究所

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

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

小林憲弘-----1

II. 分担研究報告

1. カルタップの分析法開発

高木総吉-----11

2. グルホシネートの分析法開発

鈴木俊也-----23

3. ジチオカルバメート系農薬の分析法開発 - 塩酸分解-HS-GC/MS 法 -

小林憲弘-----39

4. ジチオカルバメート系農薬の分析法開発 - 誘導體化-GC/MS 法 -

高木総吉-----59

5. ジチオカルバメート系農薬の分析法開発 - 誘導體化-SPE-LC/MS/MS 法 -

鈴木俊也-----79

6. ダゾメット，メタム（カーバム）の分析法開発

小林憲弘-----91

7. パラコート，ジクワットの分析法開発

小林憲弘-----105

8. ピラクロニル，フェリムゾンの分析法開発

小林憲弘-----117

9. プロチオホスの分析法開発

川元達彦-----129

I. 総括研究報告

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）
総括研究報告書

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

研究代表者 小林憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

研究要旨

水道原水から検出される可能性が高い農薬であるとして、平成 25 年 4 月に厚生労働省によって水質管理目標設定項目の対象農薬リストに掲載された 120 農薬のうち、10 農薬については標準検査法が設定されていない。これらの農薬を検査する場合は、各検査機関が独自に検査方法を確立し、妥当性評価を行うこととなっているが、現実にはそのような検討および妥当性評価は極めて困難であることから、検査方法の確立は進んでおらず、全国的に農薬類の検査に支障が生じているのが現状である。

本研究では、国立医薬品食品衛生研究所と、地方衛生研究所の中でも特に高い分析技術を有する東京都健康安全研究センター、兵庫県立健康生活科学研究所（健康科学研究センター）、および大阪府立公衆衛生研究所との連携によって、これら 10 農薬のうち加水分解によって水中から速やかに消失するジチアノンを除く 9 農薬（カルタップ、グルホシネート、ジチオカルバメート系農薬、ダゾメット、メタム（カーバム）、パラコート、ピラクロニル、フェリムゾン、およびプロチオホス）の分析法を個別に開発するとともに、分析マニュアルを策定した。

カルタップについては、その分解物であるネライストキシンを LC-MS/MS により直接定量することが有用であった。この方法は、カルタップの類縁化合物であるベンシルタップとチオシクラムの影響を受けることなくカルタップ濃度を評価できると考えられた。

グルホシネートについては、FMOC-LC/MS/MS では目標値の 1/100 の濃度まで、DI-LC/MS/MS では目標値の 1/10 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。

ジチオカルバメート系農薬については、塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を HS-GC/MS により測定することで、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。また、ヨウ化メチルで誘導体化後、誘導体化物を GC/MS により測定する方法では、目標値の 1/10 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。誘導体化後、LC/MS/MS により測定する方法では、EBDC-Me や PBDC-Me を生成するジチオカー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。

ダゾメットおよびメタム（カーバム）については、加熱分解して生成した MITC を PT-GC/MS により測定することで、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。

パラコート（およびジクワット）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．

ピラクロニルおよびフェリムゾンについては，どちらの農薬も 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た．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ことが分かった．

プロチオホスについては，脱塩素処理後に塩酸を加えて 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．

本研究の成果は，厚生労働省の水道水質検査法検討会に提出することを予定しており，標準検査法設定の基礎資料となるものである．また，標準検査法の設定により，全国の水道事業者等，登録検査機関，衛生研究所等において，必要な農薬の実態調査を行うことができるようになり，我が国の水道水質管理と水道の安全確保に大きく貢献できると考える．

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
川元達彦	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部
高木総吉	大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

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
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
矢野美穂	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部
小泉義彦	大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
吉田 仁	大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
古川浩司	一般財団法人 三重県環境保全 事業団
阿部晃文	川崎市上下水道局 水管理 センター 水道水質課
平林達也	大阪市水道局水質試験所

A. 研究目的

農薬類は、水道水質管理上留意すべき項目として水道法第4条の規定に基づく水質基準を補完する水質管理目標設定項目に該当しており、水道事業者等がその地域の使用状況を勘案して検査対象農薬を適切に選択することとなっている。

水道水中の農薬類の検査については、水道原水から検出される可能性が高い農薬リスト

(以下、「対象農薬リスト」という)と、これに該当する農薬の標準検査法がそれぞれ「水質基準に関する省令の制定および水道法施行規則の一部改正等について」(平成15年10月10日付健発第1010004号厚生労働省健康局長通知)および「水質基準に関する省令の制定および水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」(平成15年10月10日付健水発第1010001号厚生労働省健康局水道課長通知)に示されており、リスト掲載農薬を対象に、水道原水および浄水中の存在状況の実態把握が行われているが、農薬類の使用実態の変化に対応するため、厚生労働省によって農薬類の分類見直しが行われ、2013年4月に対象農薬リストが大幅に変更された。

水質管理目標設定項目については、通常は国が標準検査方法を定めるが、農薬類の一部には標準検査方法がないものがある。標準検査法のない農薬を測定する場合には、全国の水道事業者等、登録検査機関、衛生研究所等の検査機関が独自に検査方法を確立し、厚生労働省が策定したガイドラインに基づく妥当性評価を行うこととなっている。

見直し後の対象農薬リスト(120農薬)に新たに掲載されている農薬(33農薬)の多く(23農薬)については、国立医薬品食品衛生研究所において開発したガスクロマトグラフィ質量分析(GCMS)および液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LCMS/MS)による一斉分析法が標準検査法として採用されており、これによる一斉分析が可能であるが、新たに対象農薬リストに掲載された農薬のうち10農薬については、基本的には一斉分析ではなく個別分析が必要であること、前処理や分析条件が複雑な物質が多く含まれていることから、未だ精度の高い分析法が開発されておらず、現時点において標準検査法が設定されていない。

現状では、標準検査法のない物質を測定す

る場合には、検査機関が独自に検査方法を確立し妥当性評価を行うこととなっている。しかしながら、現実には、これらの物質の検査方法について独自検討とそれに基づく妥当性評価を行うことは極めて困難である。また、水道水においては食品等と比較して極めて低い濃度まで定量が求められることから、食品等に含まれるこれらの農薬類の分析法をそのまま用いることはできない。さらに、農薬メーカー等から、これらの農薬の水中での分解や分解物への変化率についての十分な情報が公開されていない。このようなことから、結果として、これらの農薬類の測定ができず、支障が生じているのが実態である。

そこで本研究では、国立医薬品食品衛生研究所と、地方衛生研究所の中でも特に高い分析技術を有する東京都健康安全研究センター、兵庫県立健康生活科学研究所（健康科学研究センター）および大阪府立公衆衛生研究所との連携によって、これら 10 農薬のうち加水分解によって水中から速やかに消失するジチアノンを除く 9 農薬（カルタップ、グルホシネート、ジチオカルバメート系農薬、ダゾメット、メタム（カーバム）、パラコート、ピラクロニル、フェリムゾン、およびプロチオホス）の分析法を個別に開発するとともに、分析マニュアルを策定することを目的とした。

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

本研究で対象とした 9 農薬の分析法開発に関する研究方法を手法別に以下に記述する。

1. カルタップの分析法開発（高木）

カルタップの分解物であるネライストキシンを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）により直接定量する方法を開発した。水道水への添加回収試験を行い、実験条件下におけるカルタップからネライストキシンへの変化率を評価するとともに、LC/MS/MS を用いたネライストキシンの分析条件の最適化を行った。

2. グルホシネートの分析法開発（鈴木）

クロロギ酸 9-フルオレニルメチル（FMOC）で誘導体化後、LC/MS/MS 法で分析する方法（FMOC-LC/MS/MS）と、イオン交換カラムを使用し、誘導体化せずに LC/MS/MS で分析する方法（DI-LC/MS/MS）について検討した。また、両方法共に、グルホシネートと同系統の除草剤であるグリホサートおよびその代謝物のアミノメチルリン酸（AMPA）が同時に分析可能かどうかについても調べた。

3. ジチオカルバメート系農薬の分析法開発

ジチオカルバメート系農薬（ジネブ、ジラム、チウラム、プロピネブ、ポリカーバメート、マンゼブ（マンコゼブ）、およびマンネブ）については、濃塩酸を加えて加熱分解して発生した二硫化炭素をヘッドスペース-GC/MS を用いて測定する方法（小林）、前処理による誘導体化後に GC/MS（高木）あるいは LC/MS/MS（鈴木）を用いて測定する方法の 3 つの分析法を開発した。各分析法の詳細を以下に示す。

3-1. 塩酸分解-HS-GC/MS 法（小林）

ジチオカルバメート系農薬はいずれも塩酸中で分解して二硫化炭素が発生する特性を持つため、ジチオカルバメート系農薬に濃塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を、ヘッドスペース（HS）-GC/MS を用いて測定する方法を検討した。

3-2. 誘導体化-GC/MS 法 (高木)

ジチオカルバメート系農薬はそのまま GC/MS で測定することはできないが、誘導体化物を GC/MS で測定することができる。そこで本研究では、ジチオカルバメート系農薬をヨウ化メチルでメチル化し、誘導体化物を GC/MS を用いて測定する方法を検討した。

3-3. 誘導体化-SPE-LC/MS/MS 法 (鈴木)

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。

4. ダゾメット, メタム(カーバム)の分析法開発 (小林)

ダゾメットおよびメタムはいずれも、水と反応して速やかにメチルイソチオシアネート (MITC) に分解することが知られている。そこで本研究では、ダゾメットおよびメタムを MITC に分解した後、ページ・トラップ (PT) -GC/MS により MITC の濃度を測定し、測定値をダゾメットあるいはメタムの濃度に換算する方法を検討した。

5. パラコート(およびジクワット)の分析法開発 (小林)

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。

6. ピラクロニル, フェリムゾンの分析法開発 (小林)

ピラクロニルおよびフェリムゾンの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。

7. プロチオホスの分析法開発 (川元)

プロチオホスは、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。

C. 結果と考察

1. カルタップの分析法開発 (高木)

カルタップの類縁化合物であるベンスルタップとチオシクラムは、本法ではネライストキシンに分解されなかった。そのため、本法で得られたネライストキシン濃度はカルタップ由来と判断できると考えられた。カルタップの目標値である 0.3mg/L の 1/100 である 0.003 mg/L に対応するネライストキシン濃度 0.0019 mg/L で水道水試料および河川水試料を対象に妥当性試験を実施したところ、真度、併行精度および室内精度のいずれも良好な結果を示した。

2. グルホシネートの分析法開発 (鈴木)

FMOC-LC/MS/MS の場合には、グルホシネートの定量下限値は目標値の 1/100 に相当する濃度 0.0002 mg/L を精度良く分析することが可能であった。また、本法により、グリホサートおよび AMPA も目標値の 1/100 値を十

分に測定することが可能であった。本法は、添加回収率（真度）および併行精度ともに、水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。また、グルホシネートの FMOC 誘導体は、ODS 系の固相カラムに吸着させることにより、濃縮可能であることがわかった。

DI-LC/MS/MS の場合には、グルホシネートの定量下限値は目標値の 1/10 に相当する濃度 0.002 mg/L で、1/100 値を精度良く測定することができなかった。一方、グリホサートおよび AMPA は目標値の 1/100 値を十分に測定することが可能であった。本法は、添加回収率（真度）および併行精度ともに、水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。

3. ジチオカルバメート系農薬の分析法開発

3-1. 塩酸分解-HS-GC/MS 法（小林）

前処理条件の検討の結果、試料 10 mL に対して 10 μ L の塩酸添加が最適であると判断した。ただし、濃塩酸を加えると二硫化炭素のピーク付近に妨害ピークが出現し、同定の際には注意が必要であることが分かった。また、精製水を用いた試験においても二硫化炭素が発生することから、空試験における二硫化炭素濃度を確認することが必要であることが分かった。

HS-GC/MS 測定条件の最適化の結果、目標値の 1/100 の二硫化炭素濃度（0.05 μ g/L）の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに、分析法の妥当性を評価するため、ジチオカルバメート系農薬に該当する 7 農薬を各目標値の 1/100 以下の濃度（0.1 μ g/L）となるように水道水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、いずれの農薬を添加した場合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（<30%）が得られた。

3-2. 誘導体化-GC/MS 法（高木）

誘導体化物の GC/MS 測定条件を検討した結果、高極性カラムを用いると良好なピーク形状と分離が得られた。

前処理条件を検討した結果、誘導体化前にアルカリ分解をした場合、ジネブ、チウラム、プロピネブ、ポリカーバメート、マンゼブおよびマンネブにおいて誘導体化率が減少することがわかった。また、窒素吹き付けによる濃縮時に、キパーとしてトリエチレングリコールを添加すると、抽出液を効率よく 10 倍濃縮できることがわかった。

7 種類の農薬の妥当性評価を水道水と河川水を用いて実施した。目標値（プロピネブは ADI より算出）の 1/10 添加濃度において、真度の目標（70～120%）と、併行精度の目標（<25%）を満たした。また、プロピネブは、目標値の 1/100 添加濃度において、真度の目標（70～120%）と、併行精度の目標（<30%）を満たした。

3-3. 誘導体化-SPE-LC/MS/MS 法（鈴木）

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）およ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 および PBDC-Me 定量下限値は、それぞれ 0.005、0.001 および 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 および PBDC-Me が 0.001-1.0 mg/L の範囲で、それぞれ r^2 が 0.999、0.999 および 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および精度ともに低く、妥当性評価の目標を満たすことができなかった。

4. ダゾメット、メタム(カーバム)の分析法開発(小林)

前処理条件の検討の結果、80 の恒温槽で 60 分間の加熱が最適であると判断した。また、PT-GC/MS 測定条件の検討の結果、ダゾメットおよびメタムの目標値の 1/100 に相当する濃度よりも低い MITC 濃度 (0.02 µg/L) の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに、分析法の妥当性を評価するため、ダゾメットおよびメタムを各目標値の 1/100 の濃度(それぞれ 0.06 および 0.05 µg/L)となるように水道水に添加した試料を用いて 5 回の繰り返し試験をそれぞれ 2 回実施したところ、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 (<30%) が得られた。なお、MITC の検量線の直線性が確保できる濃度範囲は、0.02~0.5 µg/L であると評価した。

5. パラコート(およびジクワット)の分析法開発(小林)

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 µg/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。

6. ピラクロニル、フェリムゾンの分析法開発(小林)

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。

7. プロチオホスの分析法開発 (川元)

固相抽出過程である前処理条件の検討の結果、試料 500 mL に対して塩酸を添加して pH を酸性 (pH=3.0) に傾けること、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、同様の固相カラムを適用した条件下では、回収率は 50% 前後未満と低い結果を示すこと、ガラス製器具等に一部は吸着していることを確認した。

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、プロチオホスの目標値の 1/100 濃度 (0.04 µg/L) となるように脱塩素処理後の水道水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。

D. 結論

本研究では、国立医薬品食品衛生研究所と、地方衛生研究所の中でも特に高い分析技術を有する東京都健康安全研究センター、兵庫県立健康生活科学研究所 (健康科学研究センター) および大阪府立公衆衛生研究所との連携によって、これら 10 農薬のうち加水分解によって水中から速やかに消失するジチアノンを除く 9 農薬 (カルタップ、グルホシネート、ジチオカルバメート系農薬、ダゾメット、メタム (カーバム) パラコート、ピラクロニル、

フェリムゾン、およびプロチオホス) の分析法を個別に開発するとともに、分析マニュアルを策定した。

カルタップについては、その分解物であるネライストキシンを LC-MS/MS により直接定量することが有用であった。この方法は、カルタップの類縁化合物であるベンスルタップとチオシクロラムの影響を受けることなくカルタップ濃度を評価できると考えられた。

グルホシネートについては、FMOC-LC/MS/MS では目標値の 1/100 の濃度まで、DI-LC/MS/MS では目標値の 1/10 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。

ジチオカルバメート系農薬については、塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を HS-GC/MS により測定することで、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。また、ヨウ化メチルで誘導体化後、誘導体化合物を GC/MS により測定する方法では、目標値の 1/10 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。誘導体化後、LC/MS/MS により測定する方法では、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。

ダゾメットおよびメタム (カーバム) については、加熱分解して生成した MITC を PT-GC/MS により測定することで、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。

パラコート (およびジクワット) 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。

ピラクロニルおよびフェリムゾンについては、どちらの農薬も 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た。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ことが分かった。

プロチオホスについては、脱塩素処理後に塩酸を加えて 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。

本研究の成果は、厚生労働省の水道水質検査法検討会に提出することを予定しており、標準検査法設定の基礎資料となるものである。また、標準検査法の設定により、全国の水道事業者等、登録検査機関、衛生研究所等において、必要な農薬の実態調査を行うことができるようになり、我が国の水道水質管理と水道の安全確保に大きく貢献できると考える。

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

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

II. 分担研究報告

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

カルタップの分析法開発

研究分担者	高木総吉	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
研究協力者	吉田 仁	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
研究分担者	小泉義彦	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課

研究要旨

対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のカルタップの分析法開発を行った。水試料中のカルタップ分析方法として、カルタップの分解物であるネライストキシンを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）により直接定量する方法を開発した。カルタップの類縁化合物であるベンスルタップとチオシクラムは、本法ではネライストキシんに分解されなかった。そのため、本法で得られたネライストキシン濃度はカルタップ由来と判断できると考えられた。カルタップの目標値である 0.3mg/L の 1/100 である 0.003 mg/L に対応するネライストキシン濃度 0.0019 mg/L で水道水試料および河川水試料を対象に妥当性試験を実施したところ、真度、併行精度および室内精度のいずれも良好な結果を示した。

A. 研究目的

本研究では、対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のカルタップの分析法を開発することを目的とした。水試料中のカルタップ分析方法として、カルタップの分解物であるネライストキシンを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) により直接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」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. 対象物質

カルタップは昆虫体内で活性体のネライストキシンに変化し、中枢神経節においてアセチルコリン受容体と結合し、神経伝達を遮断することにより殺虫作用を示す(日本植物防疫協会, 2011)。カルタップの類縁化合物としてベンスルタップおよびチオシクラムが農薬登録を受けている。カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの基本的情報をそれぞれ表 1~3 に示す(日本植物防疫協会, 2011)。

表 1. カルタップの基本的情報

化学名	1,3-ビス (カルバモイルチオ) -2- (N,N-ジメチルアミノ) プロパン塩酸塩
分子式	C ₇ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ S ₂
分子量	273.8
CAS NO.	15263-52-2
外観・臭気	白色粉末, 無臭
融点	187.8
沸点	-
蒸気圧	2.5 × 10 ⁻⁵ Pa (25)
水溶解度	約 200 g/L (25)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	測定不能
密度	-
安定性	熱: 150 以下で安定。加水分解性: 酸性で安定, 中性およびアルカリ性で分解

表 2. ベンスタップの基本的情報

化学名	S,S'-2-ジメチルアミノトリメチレン=ジ (ベンゼンチオ スルホナート)
分子式	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ S ₄
分子量	431.6
CAS NO.	17606-31-4
外観・臭気	類白色結晶性粉末
融点	83 ~ 84
沸点	-
蒸気圧	< 1 × 10 ⁻⁵ Pa (20 °C)
水溶解度	0.448 mg/L (25 °C)
土壌吸着係数	-
オクタノール/水分配係数	log Pow = 2.28 (25 °C)
密度	-
安定性	熱: 150 °C 以下で安定。加水分解性: 酸性で安定, 中性 およびアルカリ性で不安定

表 3. チオシクラムの基本的情報

化学名	5-ジメチルアミノ-1,2,3-トリチアンシュウ酸塩
分子式	C ₇ H ₁₃ NO ₄ S ₃
分子量	271.4
CAS NO.	31895-22-4
外観	白色粉末
融点	131.6 ± 0.5 °C (分解)
沸点	融解時に分解するため測定不能
蒸気圧	6.2 × 10 ⁻⁷ Pa (25 °C)
水溶解度	16.4 g/L (20 °C, pH6.8)
土壌吸着係数	K _{oc} = 292 ~ 739 (25 °C)
オクタノール/水分配係数	log Pow = - 0.0706 (23 °C)
密度	-
安定性	熱: 50 °C まで安定。加水分解性: 安定 (pH4) 92 日 (pH7), 安定 (pH9)

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

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

(2) アセトニトリル, メタノールおよびギ酸

和光純薬工業 (株) 製の LC/MS 用の規格品を使用した。

- (3) アンモニア水
関東化学（株）製の鹿1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) カルタップ塩酸塩
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。
- (6) ベンスルタップ
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。
- (7) ネライストキシンしゅう酸塩
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。
- (8) チオシクラムしゅう酸塩
Sigma-Aldrich 社製の製品を使用した。

3. 標準原液の調製

ネライストキシンしゅう酸塩を一定量を正確に秤量し、ネライストキシンとして 500 mg/L になるようにメタノールを加えて標準原液を調製した。カルタップ塩酸塩を一定量正確に秤量し、カルタップとして 500 mg/L になるように 1%ギ酸メタノールを加えて標準原液を調製した。ベンスルタップの一定量を正確に秤量し、500 mg/L になるように 1%ギ酸アセトニトリルを加えて調製した。チオシクラムしゅう酸塩の一定量を正確に秤量し、チオシクラムとして 500 mg/L になるように 1%ギ酸メタノールを加えて標準原液を調製した。

4. 標準系列の作成

検量線は、化合物ごとに調製した標準系列を測定して作成した。ネライストキシンは、メタノールで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0.0005 mg/L に調製したものをを使用した。なお、ネライストキシンの妥当性評価の際の標準系列は、0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0.0005 mg/L とした。カルタップおよびチオシクラムは、1%ギ酸メタノールで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/L に調製したものをを使用した。ベンスルタップは、1%ギ酸アセトニトリルで 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/L に調製したものをを使用した。ネライストキシンは、精製水に希釈した標準系列とメタノールに希釈した標準系列の感度が同等であったことを確認した上で安定性の高いメタノールを希釈溶媒として採用した。ベンスルタップおよびチオシクラムは、精製水で調製した標準系列と 1%ギ酸アセトニトリルもしくは 1%ギ酸メタノールで調製した標準系列の感度が同等であったことを確認した上で安定性の高い 1%

ギ酸アセトニトリルおよび 1%ギ酸メタノールを希釈溶媒として採用した。カルタップは、精製水で調製すると即時に分解したため 1%ギ酸メタノールを希釈溶媒として採用した。

5. 分析条件の最適化

調製したネライストキシシ、カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの標準液を用いて LC-MS/MS (API-3000, AB Sciex) 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最も強度の強いイオンを SRM 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選択した。そして、各農薬のモニターイオンを決定後、LC-MS/MS の分析条件を検討した。その結果を表 3 に示す。

表 3. LC-MS/MS 分析条件

HPLC 装置条件	
機種	Agilent 1100 (アジレント)
カラム	Ascentis Si (2.1 mm × 150 mm, 5μm) (Supelco)
移動相	0.1%ギ酸溶液：アセトニトリル = 40：60
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40
サンプルクーラー温度	4
注入量	2 μL
MS/MS 装置条件	
機種	API-3000 (AB Sciex)
イオン化法	ESI-Positive
測定モード	SRM
イオン化法	EI 法
モニターイオン (m/z)	ネライストキシシ：150 > 105 カルタップ：238 > 73 ベンスルタップ：432 > 105 チオシクラム：182 > 137

6. カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水中における安定性の確認

カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの水中での安定性を明らかにするために、以下の方法で確認した。化合物ごとに精製水 50 mL を用意し、カルタップ、ベンスルタップもしくはチオシクラムの 500 mg/L 標準原液を 0.1 mL 添加して 1.0 mg/L 水溶液とした。添加直後から 1 時間ごとに 48 時間の連続測定を実施し、ネライストキシシ、カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラム濃度を定量した。定量した値をモル換算した後、ネライストキシシとの比を算出した。

7. ベンスルタップおよびチオシクロラムのpH変動時におけるネライストキシン生成量

水試料中においてベンスルタップもしくは、チオシクロラムがネライストキシンへ変化してしまうと、カルタップの分析方法としてネライストキシンを測定することが困難になることが予想されたため、以下の方法で確認した。水道法は、pH の基準値を 5.8 以上 8.6 以下と定めている。そこで 0.1% アンモニア添加精製水にギ酸を加えて pH5, 6, 7, 8, 9 の水溶液を調製した。化合物ごとに pH 調整済み水溶液を用意し、ベンスルタップもしくはチオシクロラムの 500 mg/L 標準原液を 0.1 mL を添加して 1.0 mg/L 水溶液を調製し、0, 18, 24, 48 時間後のネライストキシン量を定量してベンスルタップおよびチオシクロラムとのモル比を算出した。

8. ネライストキシンの装置の検出下限値、装置の定量下限値および妥当性評価

ネライストキシンの装置の検出下限値 (IDL) および装置の定量下限値 (IQL) を検量線の最低濃度である 0.0005 mg/L 溶液の標準偏差から算出した (環境省, 2009)。

妥当性試験において、浄水には当所に給水されている水道水を、原水として大阪府の大規模水道水源である淀川の河川水を使用した。ネライストキシンおよびカルタップの分子量はそれぞれ 149 および 237 である。そのため、ネライストキシンからカルタップへの換算係数は、1.59 となる。ネライストキシンの添加濃度は、カルタップの目標値である 0.3 mg/L の 1/100 である 0.0030 mg/L を 1.59 で除して 0.0019 mg/L とした。浄水はアスコルビン酸ナトリウムで残留塩素を消去した後に、原水はガラスフィルターで浮遊物質をろ過した後にネライストキシンを添加した。この添加試料を最適化した分析条件を用いて、検査試料水および空試験用試料水の 2 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添加試料中の各農薬の濃度を求めた。厚生労働省の示す妥当性ガイドラインに則り (厚生労働省 2012)、真度と併行精度および室内精度として相対標準偏差 (RSD) を求めた。妥当性評価では、2 人がそれぞれ 1 日 1 回 2 並行で 3 日間実施した。真度および RSD は (1) および (2) から算出した。

$$\text{真度}(\%) = (C - C_0) / C_{ad} \times 100 \quad (1)$$

C : 添加試料中濃度

C₀ : 無添加試料中濃度

C_{ad} : 添加濃度

$$\text{RSD}(\%) = \text{SD} / \text{Av} \times 100 \quad (2)$$

SD : 標準偏差

Av : 平均値

表 4 に、検査試料水におけるネライストキシンの添加濃度と、検量線の濃度範囲についてまとめた。

表 4. ネライストキシンの添加濃度と検量線範囲との関係

名称	目標値 (mg/L)*	添加濃度 (mg/L)	検量線の範囲 (mg/L)				
			1	2	3	4	5
ネライストキシン	0.19	0.0019	0.0005	0.001	0.002	0.005	0.01

*カルタップの目標値0.3mg/Lから算出した。

C. 結果と考察

1. カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における安定性の確認

カルタップ、ベンスルタップおよびカルタップの水中における動態を明らかにすることを目的に、カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における安定性を算出した結果を図 1 に示した。

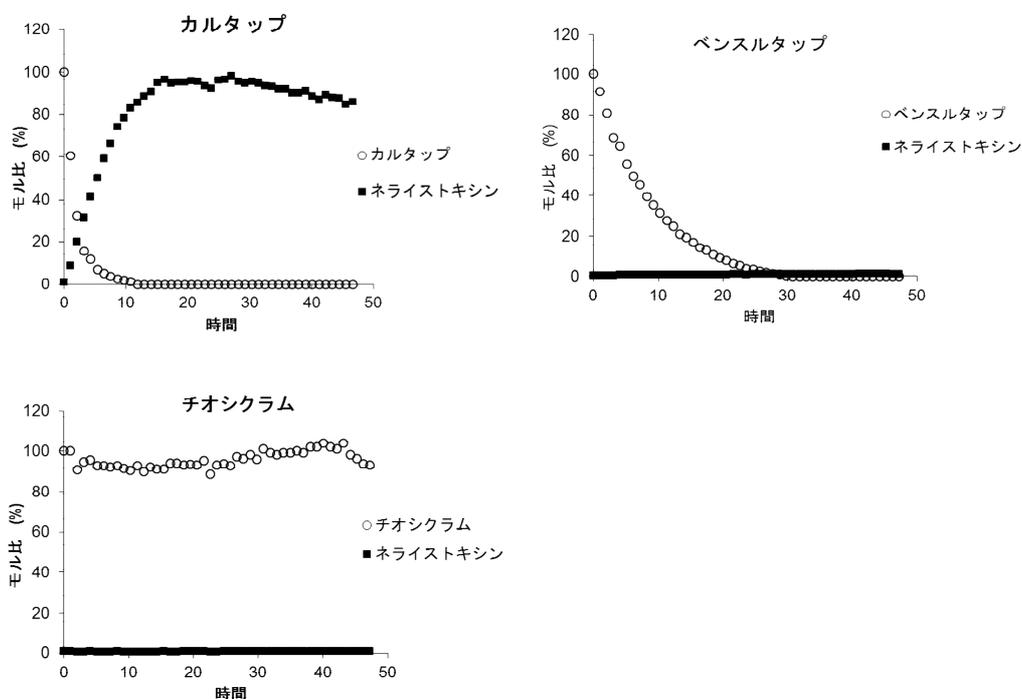


図 1. カルタップ、ベンスルタップおよびチオシクラムの精製水における分解の挙動

カルタップは、継時的に濃度が減少し、12 時間で添加量の 1% 未満に減少した。一方、ネライストキシン濃度は増加し、14 時間でほぼすべてのカルタップがネライストキシニンに分解された。ベンスルタップは、継時的に濃度が減少し、29 時間で 1% 未満に減少したが、カルタップと異なりネライストキシン濃度は増加しなかった。チオシクラムは、48 時間経過しても 93% が残存し、ネライストキシン濃度は、増加しなかった。

カルタップは、対象農薬リスト掲載農薬、ベンスルタップおよびチオシクラムはそ

の他農薬に分類されている．そのため，アルカリ分解で3種の農薬すべてをネライストキシンとして分析する食品分野の方法（厚生労働省，2005）よりも，カルタップをベンスルタップおよびチオシクラムとは別に評価できる分析法が有用と考える．本研究の結果より，検水をアルカリ分解することなく，直接 LC-MS/MS で測定してネライストキシンをカルタップの代替として定量することにより，カルタップのみを評価することが可能と考えられた．

2. ベンスルタップおよびチオシクラムの pH 変動時におけるネライストキシン生成

水道水の pH は 5.8 以上 8.6 以下と定めており，その変動内でベンスルタップもしくはチオシクラムからネライストキシンが生成されるとカルタップの正確な評価が困難となる．そこで，pH5，6，7，8，9 におけるベンスルタップおよびチオシクラムからのネライストキシン生成量を算出し，図 2 に示した．

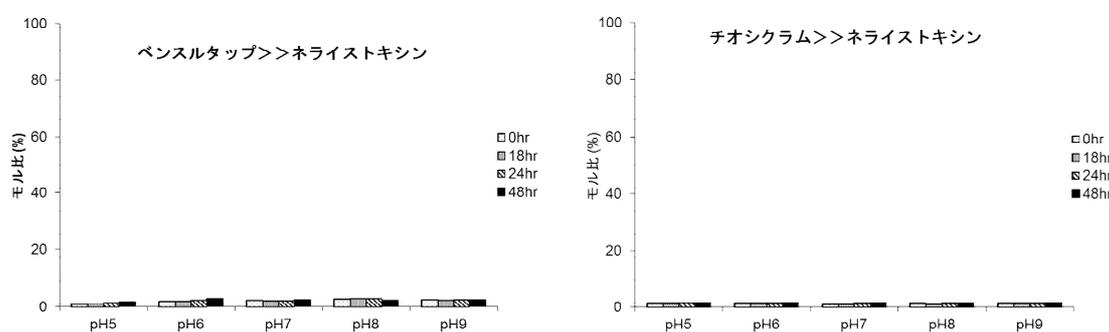


図 2. ベンスルタップおよびチオシクラムの pH 変動時におけるネライストキシンの生成割合

その結果，pH5 から 9 の間で 48 時間経過してもベンスルタップもしくはチオシクラムからネライストキシンは，ほとんど生成されなかった．したがって，ベンスルタップとチオシクラムは水道水中の pH ではネライストキシン量に影響を与えないことが確認できたため，水道水から検出されたネライストキシンは，カルタップ由来と判断できると考えられた．

3. 分析法の妥当性評価

本研究では水道水中のカルタップの検査方法として，ネライストキシンの LC-MS/MS による直接定量が適当と考え，ネライストキシンの妥当性試験を実施した．はじめに，ネライストキシンの IDL および IQL を算出したところ，IDL が 0.000032 mg/L，IQL が 0.000087 mg/L となった．この値は，カルタップの目標値の 1/100 である 0.003 mg/L に対応するネライストキシン濃度 0.0019 mg/L と比べて十分に低い値となった．ネライストキシンのクロマトグラムを図 3 に，妥当性試験の結果を表 5 に示した．

浄水試料における真度および室内精度はそれぞれ 81.9% および 3.6% となった．原水試料における真度および室内精度はそれぞれ 88.2% および 2.3% となった．浄水，

原水試料ともにガイドラインの基準を満たしたため、本分析法は、水道水および水道原水中カルタップ検査として有用と考えられた。

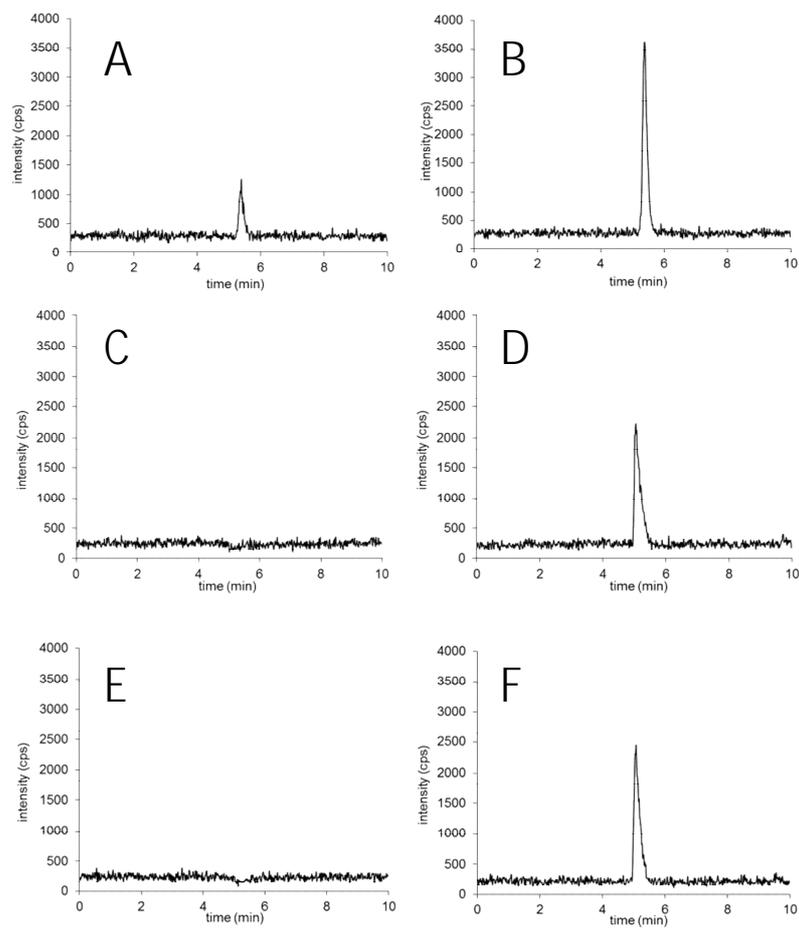


図3. ネライストキシンのクロマトグラム A;標準 0.0005 mg/L B;標準 0.0019 mg/L , C ;水道水 , D ;標準 0.0019 mg/L 添加水道水 , E ;河川水 , F;標準 0.0019 mg/L 添加水道原水 .

表 5. ネライストキシンの妥当性試験結果

	真度 (%) 作業者A					
	精製水	水道水 ¹⁾	河川水 ²⁾	精製水	水道水 ¹⁾	河川水 ²⁾
	92.6	88.4	88.4	97.9	80.5	86.8
	98.9	82.1	88.9	100.5	82.1	90.5
	105.3	83.2	85.3	106.8	85.3	87.4

	真度 (%) 作業者B					
	精製水	水道水 ¹⁾	河川水 ²⁾	精製水	水道水 ¹⁾	河川水 ²⁾
	102.1	78.9	88.9	100.5	78.4	89.5
	103.2	85.3	91.6	100.5	82.1	87.4
	98.9	81.6	84.7	93.7	82.6	88.9

	作業者A		作業者B		真度 (%)	室内精度 (%)
	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)		
精製水	101.1	5.1	99.8	3.3	100.1	4.2
水道水 ¹⁾	82.9	4.2	81.5	3.1	81.9	3.6
河川水 ²⁾	88.3	2.0	88.5	2.6	88.2	2.3

¹⁾ アスコルビン酸ナトリウムで残留塩素を消去したものを使用した

²⁾ フィルターろ過したものを使用した

水道水のネライストキシン分析の留意点として、ネライストキシンは残留塩素やアスコルビン酸ナトリウムにより継時的に分解されることがわかった。残留塩素の消去を行っていない水道水にネライストキシンを添加したところ、2 時間でピークが消失した。水道水におけるネライストキシンの妥当性試験を実施する際には、残留塩素をあらかじめ定量的に消去した後、速やかに試験を実施することが重要であった。

D. 結論

水試料中のカルタップ検査方法として、その分解物であるネライストキシンを LC-MS/MS により直接定量することが有用であった。本方法は、カルタップの類縁化合物であるベンズルタップとチオシクロラムの影響を受けることなくカルタップ濃度を評価できると考えられた。

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

環境省 (2009) 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版).

厚生労働省 (2005) 食品に残留する農薬、試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法、食安発第 0124 第 1 号 (平成 17 年 1 月 24 日).

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、健水発 0906 第 1 号 (平成 24 年 9 月 6 日).

日本植物防疫協会 (2011) 農薬ハンドブック 2011 年版.

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

グルホシネートの分析法開発

誘導体化 - 液体クロマトグラフ - 質量分析計による一斉分析法及び
液体クロマトグラフ - 質量分析計による一斉分析法

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	平林達也	大阪市水道局水質試験所	
	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

対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のグルホシネートの分析法開発を行った。クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) で誘導体化後、LC/MS/MS 法で分析する方法 (FMOC-LC/MS/MS) とイオン交換カラムを使用し、誘導体化せずに LC/MS/MS で分析する方法 (DI-LC/MS/MS) について検討した。また、両方法共に、グルホシネートと同系統の除草剤であるグリホサート及びその代謝物のアミノメチルリン酸 (AMPA) が同時に分析可能かどうかについても調べた。

FMOC-LC/MS/MS の場合には、グルホシネートの定量下限値は目標値の 1/100 に相当する濃度 0.0002 mg/L を精度良く分析することが可能であった。また、本法により、グリホサート及び AMPA も目標値の 1/100 値を十分に測定することが可能であった。本法は、添加回収率 (真度) 及び併行精度ともに、水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。また、グルホシネートの FMOC 誘導体は、ODS 系の固相カラムに吸着させることにより、濃縮可能であることがわかった。

DI-LC/MS/MS の場合には、グルホシネートの定量下限値は目標値の 1/10 に相当する濃度 0.002 mg/L で、1/100 値を精度良く測定することができなかった。一方、グリホサート及び AMPA は目標値の 1/100 値を十分に測定することが可能であった。本法は、添加回収率 (真度) 及び併行精度ともに、水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。

以上のことから、FMOC-LC/MS/MS 及び DI-LC/MS/MS は標準検査法になり得るものと考えられるが、本法を標準検査法とするためには、今後、室間精度等のバリデーションを実施し、妥当性や汎用性について評価する必要がある。

A . 研究目的

本研究では、対象農薬リスト掲載農薬のうち標準検査法未設定のグルホシネートの分析法を開発することを目的とした。この農薬の分析法については、既にGC/MS、LC/MSあるいはLC/MS/MSによる分析が報告されているが、ここでは、クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) で誘導体化後、LC/MS/MS 法で分析する方法 (FMOC-LC/MS/MS) とイオン交換カラムを使用し、誘導体化せずに LC/MS/MS で分析する方法 (DI-LC/MS/MS) について検討した。なお、FMOC 誘導体化を用いる方法の場合には、固相抽出 (SPE) による濃縮法についても検討した。また、両方法共に、グルホシネートと同系統の除草剤であるグリホサート及びその代謝物のアミノメチルホスホン酸 (AMPA) が同時に分析可能かどうかについても調べた。

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. 対象物質

グルホシネートは、アミノ酸系の除草剤で、その作用機序は、植物のアミノ酸合成阻害である。本農薬の性状等を表 1 に示した。なお、グルホシネートの代謝物として、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA) や N-アセチル-L グルホシネート (NAG) が知られているが、本研究では、グルホシネートのみを対象とした。

表 1. グルホシネートの基本的情報と各物性値^{*1}

化学名	(±)-2-アミノ-4-(ヒドロキシメチルホスフィニル)ブタノアート
分子式	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₄ P
分子量	198.2
CAS NO.	77182-82-2
外観	白色結晶粉末
融点	215-218
沸点	熱分解のため測定不能
蒸気圧	< 3.1 × 10 ⁻⁵ (50)
水溶解度	> 500 g/L (20)
土壌吸着係数	102 - 788 (25)
オクタノール/水分配係数	-4.01 (25、pH7)
密度	1.32 g/cm ³ (23)
加水分解性 (半減期)	30 日間以上 (25、暗所)
水中光分解性 (半減期)	95 日、北緯 35° (東京) の春期太陽光換算で 3 年以上 (1200 日)

*1 農林水産消費安全技術センターより引用 (2012 年 7 月 24 日現在)

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/glufosinate/>

2. 標準品・試薬・器具

2.1 Fmoc-LC/MS/MS

(1) 精製水

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

(2) アセトニトリル

液体クロマトグラフ用のもの

(3) 農薬標準品

グルホシネートアンモニウム及び AMPA はシグマアルドリッチ、グリホサート及び Fmoc は和光純薬製のもの

(4) その他の試薬

アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、塩化アンモニウム、ギ酸及びチオ硫酸ナトリウムは特級品のもの

(5) 5%ホウ酸溶液

4 ホウ酸ナトリウム 5 g を精製水に溶かして 100 ml としたもの

(6) 2%リン酸 (v/v)

(7) Fmoc 溶液

Fmoc 0.1 g をアセトニトリルに溶かして 100 ml としたもの

(8) 固相カラム

Inert Sep C18 (200 mg、3 ml、GL サイエンス製)、Bond Elute-ENV (200 mg、3 ml、Agilent-Technologies 製) 及び Sep-Pak Vac C18 (200 mg、3 cc、Waters 製) のもの

(9) 試験管

ポリプロピレン製 (15 ml) のもの

(10) 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

2.2 DI-LC/MS/MS

(1) 精製水

水道水を Elix UV 10 で精製後、Milli-Q Gradient (Merck Millipore 製) により精製したもの

(2) ギ酸

LC/MS/MS 用（和光純薬工業製）のもの

(3) 農薬標準品

グルホシネートアンモニウム、グリホサート及び AMPA は和光純薬工業製のもの

(4) 脱塩素処理剤

アスコルビン酸ナトリウムは特級品のもの

(5) 使用器具

メスフラスコはガラス製のもの

(6) オートサンプラー用サンプル瓶

ガラス製（1.5 ml、スクリュウキャップ）のもの

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、精製水で 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、精製水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。

4. 水試料

FMOC-LC/MS/MS の場合には、水道水、地下水及び水道原水（河川水）を洗浄済みのポリエチレン瓶に採取したものを用いた。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。なお、脱塩素処理剤による分析への影響を調べるため、アスコルビン酸ナトリウムの他に、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムまたは塩化アンモニウムを使用した。

DI-LC/MS/MS の場合には、水道原水及び水道水（残留塩素濃度約 0.4 - 0.5 mg/L）を洗浄済みのガラス瓶に採取し、実験に用いた。

5. 試験溶液の調製

FMOC-LC/MS/MS の場合には、水試料 10 ml をポリプロピレン製の試験管に採り、5% ほう酸溶液 0.5 ml、FMOC 溶液 1.0 ml を加え、よく攪拌した後、50 °C で 20 分間加温した後、室温に冷却し、2% リン酸を 0.6 ml 加え、これを試験溶液とした。

DI-LC/MS/MS の場合には、水道原水はメンブランフィルター（孔径 0.22 μm、PTFE 製）でろ過したものを、水道水はアスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理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、FMOC-LC/MS/MS の場合には Waters 2695 Separation module-Ultima PT（ジャスコインターナショナル）及び Waters UPLC-Xevo TQMSD を、DI-LC/MS/MS の場合には LC/MS8030Plus（島津製作所）を用い、それぞれの分析条件の最適化を行った。すなわち、農薬の混合溶液を用いて、スキャンモードにより各農薬の ESI ネガティブイオンモードのマススペ

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. SPE 条件の検討

FMOC-LC/MS/MS の場合には、試験溶液（農薬濃度 0.1 mg/L）100 ml を調製し、そのうちの 10 ml ずつを一つの固相カラムに負荷し、溶出液 10 画分を得た。各画分中の農薬の濃度を測定することにより、各農薬の破荷量を求めた。一方、SPE からの農薬の FMOC 誘導体の溶出条件については、試験溶液（農薬濃度 0.1 mg/L）20 ml を負荷した固相カラムを調製し、溶出液をアセトニトリル - 5mM 酢酸アンモニウム溶液（1.5 ml）とし、アセトニトリルの濃度を変えることにより、溶出液中のアセトニトリルの至適濃度を求めた。

8. 分析法の妥当性評価

8.1 検量線の作成

農薬混合標準液を精製水に添加し、4 つ以上の検量線用標準液を調製した。また、検量線用ブランクとして、農薬混合標準液を未添加の精製水を用いた。検量線用標準液及び検量線ブランクは、上記 4 試験溶液の調製と同様に操作した後、LC/MS/MS 分析を行い、農薬の濃度と検量線用標準液中の農薬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。

8.2 空試験

精製水を一定量とり、上記 4 試験溶液の調製と同様に操作して農薬の濃度を求めた。

8.3 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農薬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農薬のプロダクトイオンのピーク面積を差し引いた後、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。

C. 結果と考察

1. 分析条件の最適化

1.1 FMOC-LC/MS/MS

最適化により決定した対象農薬の FMOC 誘導体の 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 0.001 mg/L の混合標準液（20 μ L 注入）の LC/MS/MS クロマトグラムを図 1 に示す。本分析条件下、いずれの農薬についても良好なピーク形状と分離が可能であった。

カラム充填剤の粒径と対象農薬の FMOC 誘導体の分離について、粒径 5 μ m のカラム用の移動相の条件で、粒径 2 μ m 未満のカラムを用いて分析した場合、グルホシネート-FMOC 誘導体の分離は良好であったが、グリホサート及び AMPA の FMOC 誘導体のピークはテーリングが認められ、良好な分離ができなかった。対象農薬の FMOC 誘導体の一斉分析に際しては、酢酸アンモニウム-アセトニトリル（またはメタノール）を移動相とした場合には、粒径が 5 μ m 程度のカラ

ムを使用した方が良いと考えられる。

表2. FMOC-LC/MS/MS 一斉分析条件

項目	設定値
カラム	Capcell Pak C18 (2.0 mm I.D. × 150 mm、 粒径 5 μm、 資生堂)
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B	アセトニトリル
グラジエント条件	移動相 B20% (0 - 5 min) - リニアグラジエント - 移動相 B90% (15 - 20 min) - 移動相 B20% (20.1 - 29 min)
LC	
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	20 μL
イオン化法	ESI 法 (ネガティブイオンモード)
プローブ電圧	-2.5 kV (ESI ネガティブ)
MS	
ネブライザーガス流量	540 L/hr
コーンガス流量	83 L/hr
脱溶媒部度	400 °C
イオン源温度	120 °C
データ取り込み時間	0.1 sec

表3. FMOC-LC/MS/MS 一斉分析条件

ID	農薬名	保持時間 (min)	定量イオン (<i>m/z</i>)*	確認イオン (<i>m/z</i>)*	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)
対 37	グルホシネート	6.0	402>108	402>206	40	10
対 36	グリホサート	3.8	390>168	390>150	40	10
対 36	AMPA	12.5	332>110	332>136	40	5

*: プリカーサイオン > プロダクトイオンの順に記載した。

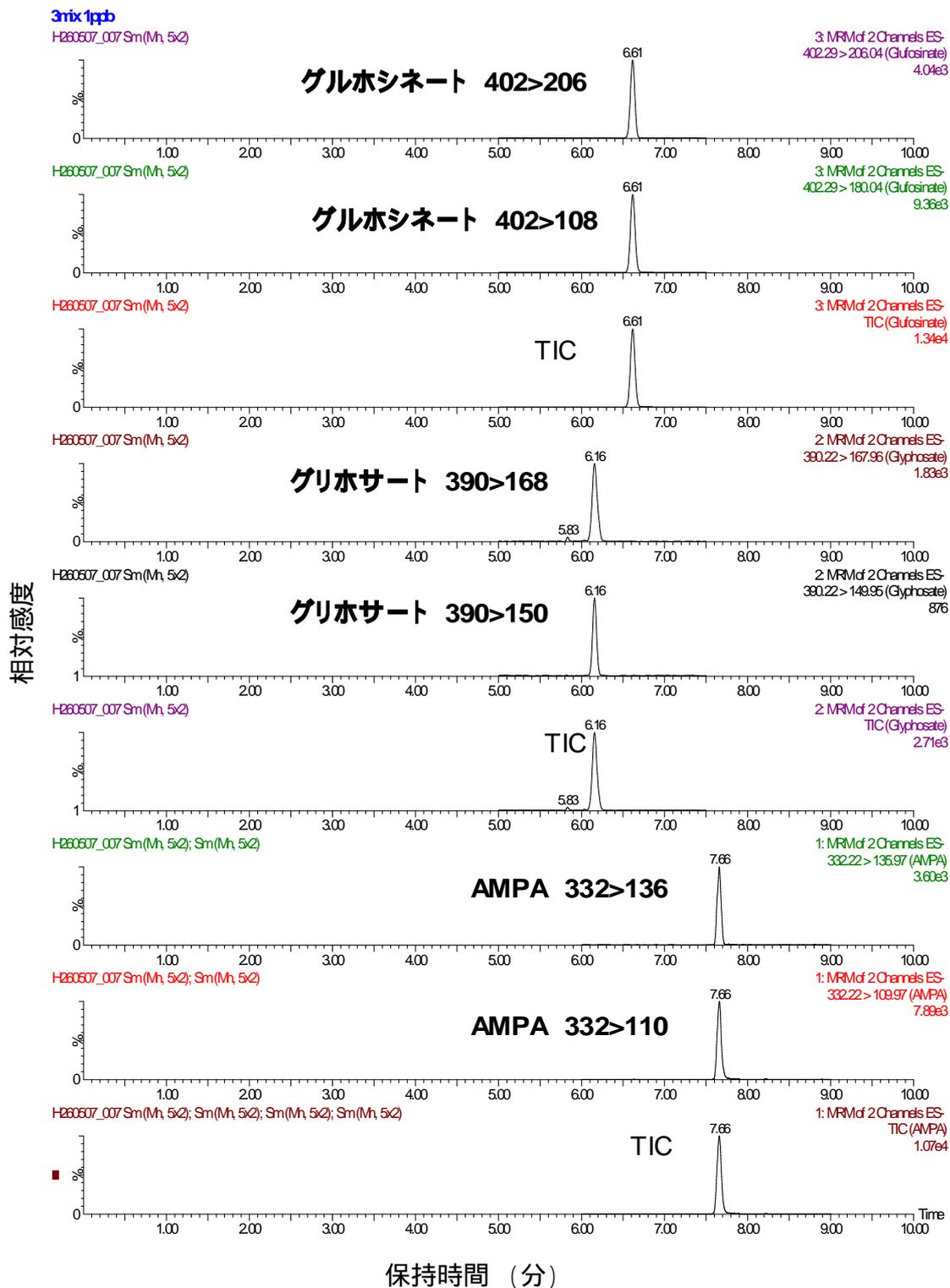


図1. グルホシネート、グリホサート及び AMPA の FOMC 誘導体の LC/MS/MS クロマトグラム

農薬濃度 : 0.001 mg/L , 注入量 : 20 μ L

1.2 DI-LC/MS/MS

最適化により決定した対象農薬の LC/MS/MS の分析条件を表 4 及び 5 に示す。また、精製水で希釈したグルホシネート (0.002 µg/L)、グリホサート (0.020 µg/L) 及び AMPA (0.010 µg/L) の混合標準液 (注入量 50 µL) の LC/MS/MS クロマトグラムを図 2 に示す。本分析条件下、いずれの農薬についても良好なピーク形状と分離が可能であった。

表 4. DI-LC/MS/MS 一斉分析条件

項目	設定値
カラム	Ion Pac AS19 (2.0 mm I.D. × 250 mm、サーモフィッシャーサイエンティフィック)
移動相	0.5%ギ酸
LC 流速	0.30 ml/min
カラム温度	40 °C
サンプルクーラー温度	4 °C
注入量	グルホシネート 50 µL、その他 5 µL
イオン化法	ESI 法 (ネガティブイオンモード)
プローブ電圧	-3.5 kV (ESI ネガティブ)
MS ネブライザーガス流量	1.5 ml/min
ドラインガス流量	10 L/min
DL 温度	250 °C
ホートブロック源温度	400 °C

表 5. DI-LC/MS/MS 一斉分析条件

ID	農薬名	保持時間 (min)	プリカーサ イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
対 37	グルホシネート	4.35	180.10	63.15	17	37	23
対 36	グリホサート	10.25	168.00	63.05	29	24	23
対 36	AMPA	2.28	110.00	62.95	23	22	23

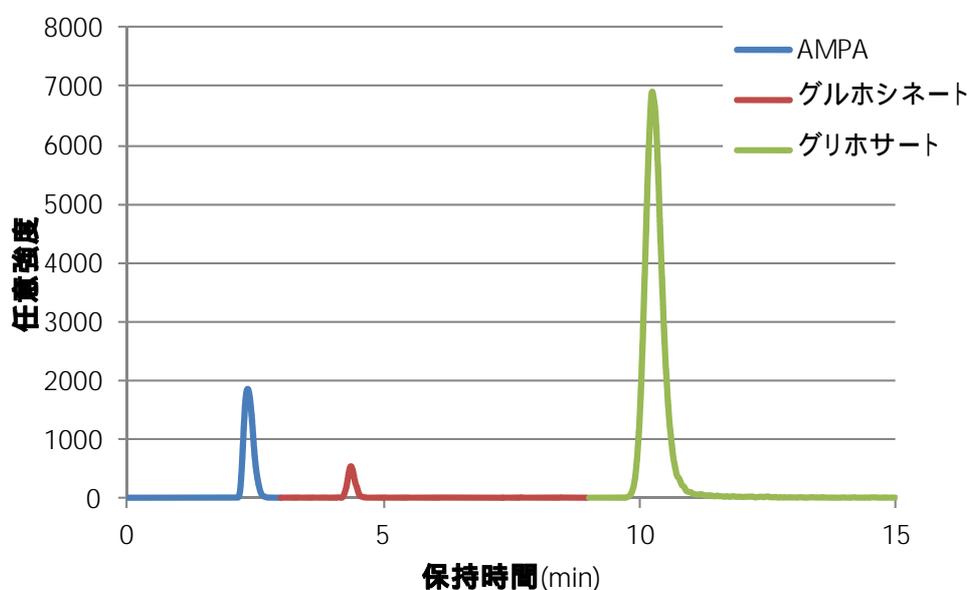


図2. グルホシネート (0.002 mg/L)、グリホサート (0.020 mg/L) 及び AMPA (0.010 mg/L) の LC/MS/MS クロマトグラム (注入量 50 μ L)

2. 分析法の妥当性評価

2.1 検量線及び定量下限値

2.1.1 FMOC-LC/MS/MS

グルホシネート、グリホサート及び AMPA の検量線をそれぞれ図 3、4 及び 5 に示す。いずれの農薬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。

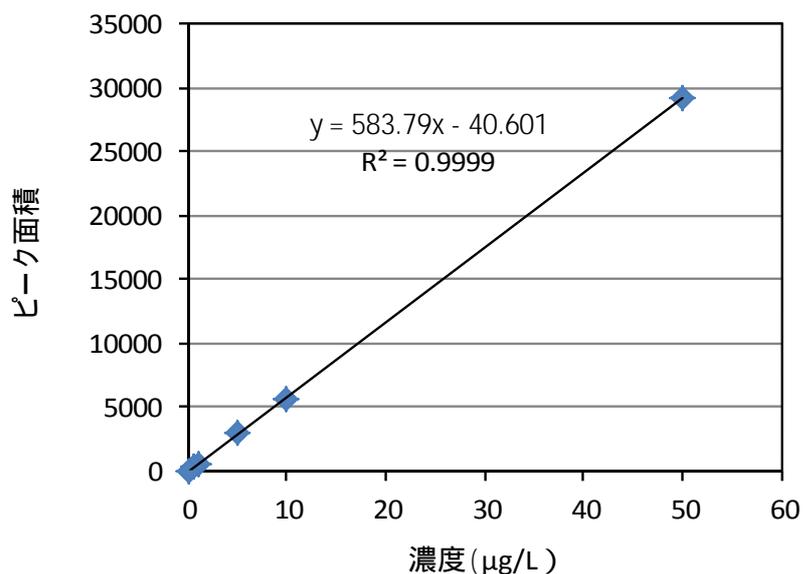


図3. グルホシネートの FMOC 誘導体の検量線
検量線範囲: 0.1-50 μ g/L

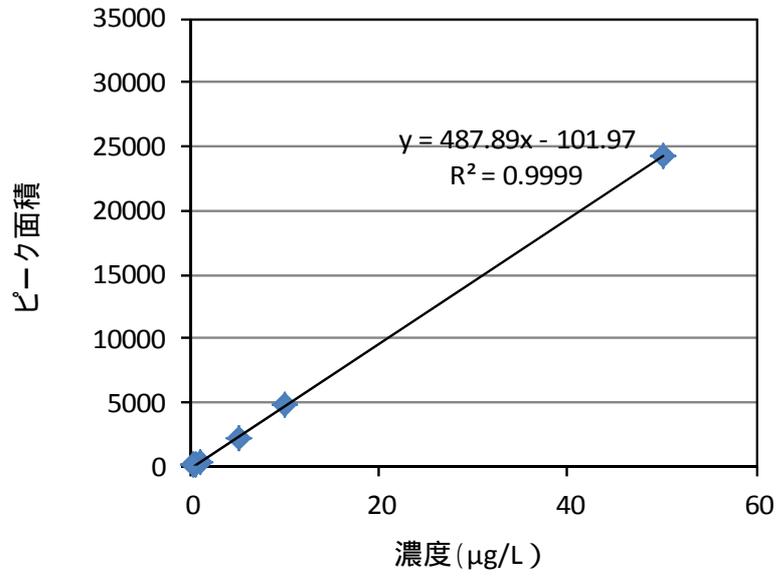


図4. グリホサートのFMOC誘導体の検量線
検量線範囲：1-50 µg/L

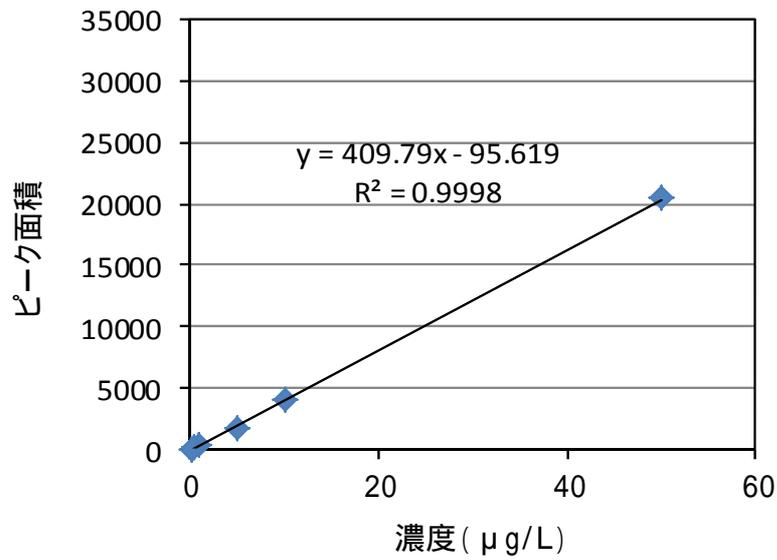


図5. AMPAのFMOC誘導体の検量線
検量線範囲：1-50 µg/L

2.1.1 DI-LC/MS/MS

グルホシネート、グリホサート及び AMPA の検量線をそれぞれ図 6、7 及び 8 に示す。いずれの農薬についても検量線の直線性及び再現性は良好であった。

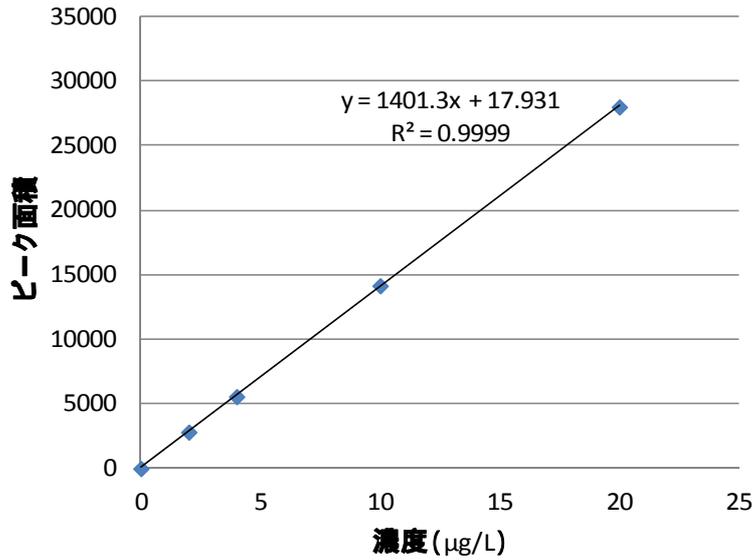


図 6. グルホシネートの検量線

検量線範囲：2-20 µg/L

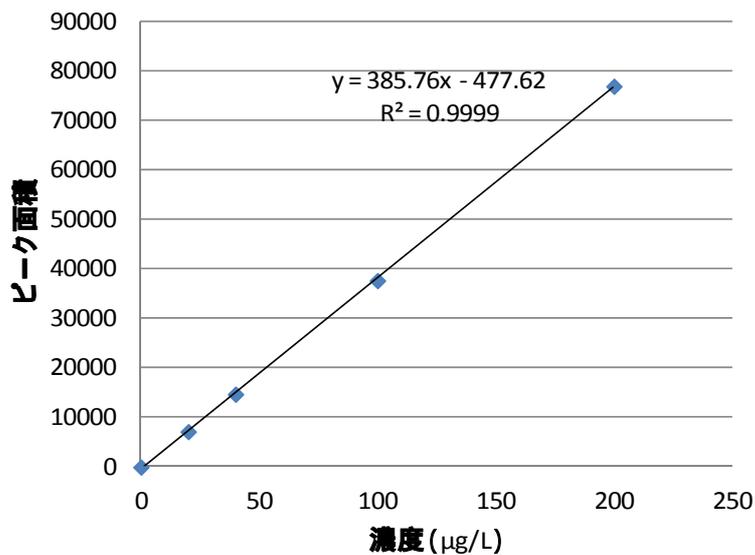


図 7. グリホサートの検量線

検量線範囲：20-200 µg/L

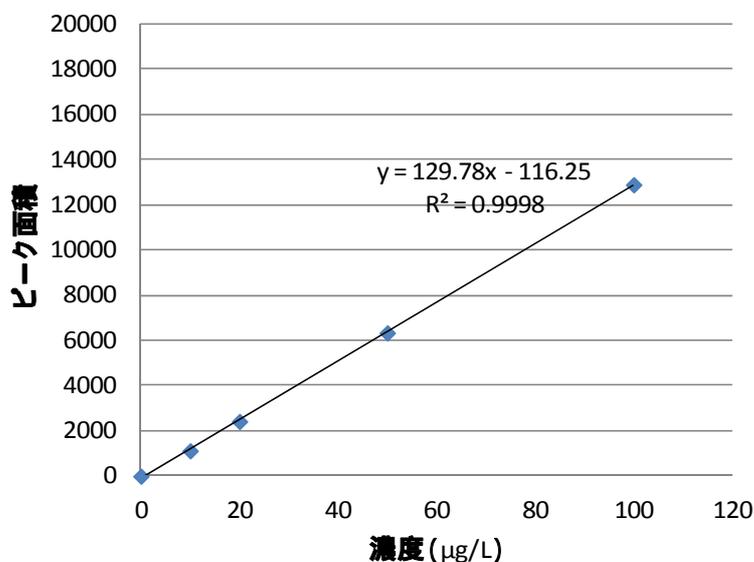


図 8. AMPA の検量線
検量線範囲 : 10-100 µg/L

2.2 空試験及び定量下限値の評価

2.2.1 FMOC-LC/MS/MS

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グルホシネートに相当するピークは認められなかった。そこで、グルホシネートの目標値の 1/100 値である 0.002 mg/L を用いた繰返し分析したところ、変動係数が 20%未満であったことから、グルホシネートの定量下限値を 0.0002 mg/L とした。また、グリホサート及び APMA の場合も、クロマトグラム上にそれぞれの農薬に相当するピークは認められず、グルホシネートに準じて定量下限値を求めたところ、それぞれ 0.001 及び 0.001 mg/L であった。

2.2.2 DI-LC/MS/MS

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グルホシネート、グリホサート及び APMA に相当するピークは認められなかった。そこで、グルホシネートは目標値の 1/10 値である 0.002 mg/L、グリホサートは目標値の 1/100 値である 0.02 mg/L、APMA は目標値の 1/200 値である 0.01 mg/L、を用いた繰返し分析により定量下限値を求めた。その結果、グルホシネート、グリホサート及び APMA の定量下限値は、それぞれ 0.002、0.02 及び 0.01 mg/L であった。

2.3 添加回収試験結果の評価

2.3.1 FMOC-LC/MS/MS

分析系に及ぼす水道水中に含まれる残留塩素の影響について検討した。残留塩素を含む水道水を水試料に用いて、添加濃度 0.01 mg/L で回収試験を行ったところ、いずれの農薬も検出されなかった。そこで、残留塩素除去剤のアスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、

塩化アンモニウム及びチオ硫酸ナトリウムについて検討した。その結果、アスコルビン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムは濃度範囲 1-100 mg/L で影響がないことがわかった。したがって、水道水の場合には、水試料 1 L につき、アスコルビン酸ナトリウムを 10 mg 添加することとした。

水道水、地下水及び水道原水を用いて添加回収率（真度）及び併行精度（RSD）を調べた（表 6 - 8）。いずれの水試料の場合にも、対象農薬の添加回収率及び併行精度は、それぞれ 86 - 118% 及び 2 - 14% と良好な結果が得られた。これらの結果は、水道水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。

表 6. FMOC-LC/MS/MS による水道水の添加回収試験結果

ID	農薬名	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 37	グルホシネート	0.002	84	83	91	87	85	86	4
対 36	グリホサート	0.010	100	101	106	104	103	103	2
対 36	AMPA	0.010	85	92	98	84	84	89	7

表 7. FMOC-LC/MS/MS による水道原水の添加回収試験結果

ID	農薬名	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 37	グルホシネート	0.002	89	90	87	82	81	86	4
対 36	グリホサート	0.010	109	119	124	121	119	118	5
対 36	AMPA	0.010	87	94	97	95	95	94	4

表 8. FMOC-LC/MS/MS による地下水の添加回収試験結果

ID	農薬名	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 37	グルホシネート	0.002	109	92	95	95	103	99	7
対 36	グリホサート	0.010	92	94	115	94	77	94	14
対 36	AMPA	0.010	105	97	87	94	93	95	7

2.3.2 DI-LC/MS/MS

グルホシネート、グリホサート及び AMPA の 3 物質ともに、測定感度を最大限得る目的で装置の最大注入量 50 μ L とした。しかし、AMPA の実試料（水道水及び水道原水）での添加回収試験において、回収率（真度）が低下する現象が確認された。この原因としては、水道水及び水道原水中に AMPA のイオン化を抑制する物質（もしくは AMPA よりイオン化しやすい物質）が存在することによるマトリックス効果が考えられた。そこで、実試料を 10 倍希釈したもの（す

なわち、水道水及び水道原水中の AMPA の初期濃度が設定濃度の 10 倍のものを作成し、精製水を用いて 10 倍希釈することで最終濃度を設定濃度にしたもの) について確認した結果、AMPA において真度の改善が認められた。これらのことから、グリホシネートの分析に際しては注入量を 50 μ L、グリホサートと AMPA の場合には注入量を注入量 5 μ L にすることとした。

水道水及び水道原水に対して各成分の定量下限値相当の濃度になるように添加し、回収試験を行った結果、回収率(真度)及び併行精度(RSD)ともに、妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。

表 9. DI-LC/MS/MS による水道水の添加回収試験結果

ID	農薬名	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 37	グリホシネート	0.002	85	96	87	83	82	87	6
対 36	グリホサート	0.020	112	107	104	113	113	110	4
対 36	AMPA	0.010	94	95	92	93	100	95	3

表 10. DI-LC/MS/MS による水道原水の添加回収試験結果

ID	農薬名	添加濃度 (mg/L)	回収率 (%)					平均	RSD (%)
			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5		
対 37	グリホシネート	0.002	78	88	91	88	98	89	8
対 36	グリホサート	0.020	113	112	112	112	113	112	1
対 36	AMPA	0.010	81	86	94	103	82	89	10

3. SPE による定量下限値の低減

本研究で用いた LC/MS/MS 装置の場合には、FMOC-LC/MS/MS 法でグリホシネートを目標値の 1/100 まで分析可能であった。しかし、その他の LC/MS/MS や LC/MS 装置の場合には、感度不足で目標値の 1/100 を測定できないこともあり得る。そこで、FMOC 誘導体化により得られた試験溶液を固相カラムにより濃縮する方法について検討した。農薬の FMOC 誘導体は、ODS 系の分離カラムで分析可能であることから、固相カラムも ODS 系のものを用いることとした。

市販の固相カラム Bond Elute-ENV (200 mg) を用いた場合、グリホシネート及び AMPA の FMOC 誘導体は、試験溶液を 100 ml を通過させても、固相カラムから溶出しなかった。しかし、グリホサートの FMOC 誘導体は 20~100 ml の各画分から検出された(図 3)。したがって、3 農薬を一斉分析するためには、試験溶液の負荷量は 20 ml が最適であった。一方、固相カラムからの溶出溶媒については、5mM 酢酸アンモニウム中のアセトニトリルの濃度が 40%の時に、各農薬の FMOC 誘導体の濃度が高い結果が得られた(図 4)。なお、固相カラム Inert Sep C18 (200 mg) 及び Sep-Pak Vac C18 (200 mg) を用いた場合にも、同様な結果であった。

以上のことから、グリホシネートを目標値の 1/100 値まで測定出来ない場合には、試験溶液

20 ml を ODS 系の SPE カラム (200 mg) に負荷し、Fmoc 誘導体はアセトニトリル-5mM 酢酸アンモニウム (40 : 60、 v/v) 1.5 ml で溶出後、5 mM 酢酸アンモニウムで 2.0 ml に定容することとした。

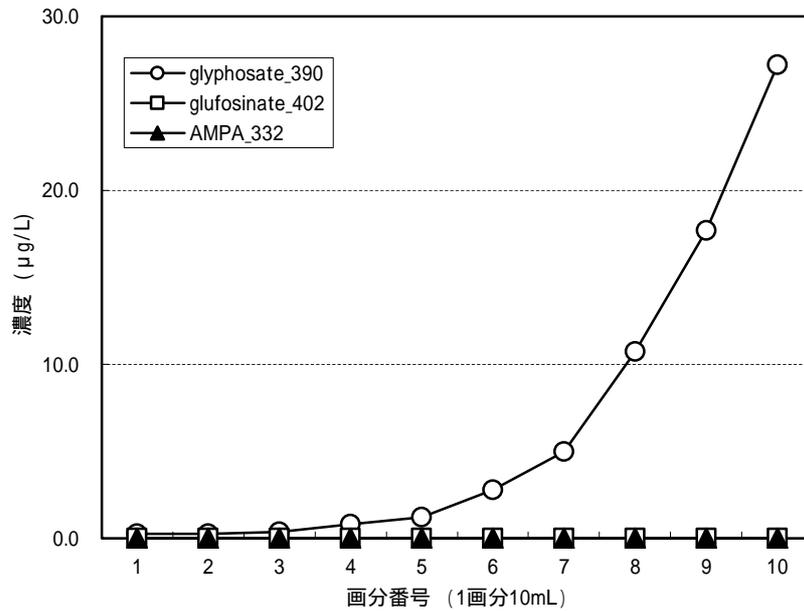


図 3 . 固相カラムからの農薬の Fmoc 誘導体の破過パターン
 1 画分: 試験溶液 10 ml、 農薬濃度:0.1 mg/L、 SPE:ODS 200 mg

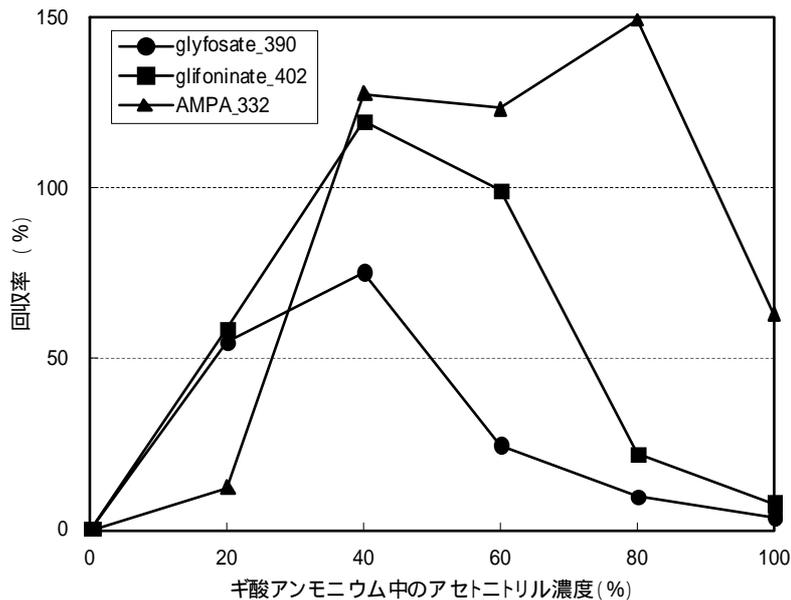


図 4 . 固相カラムからの農薬の Fmoc 誘導体の溶出に及ぼすアセトニトリル濃度の影響
 溶出液量:1.5 ml、 農薬の負荷量:0.1 mg/L を 20 ml、 SPE:ODS 200 mg

D. 結論

FMOG-LC/MS/MS の場合、グルホシネートの定量下限値は目標値の 1/100 である 0.0002 mg/L を精度良く測定することが可能であった。グリホサートと AMPA の定量下限値は 0.001 mg/L で、目標値の 1/100 である 0.02 mg/L を十分に測定することが可能であった。

DI-LC/MS/MS の場合、グルホシネートの定量下限値は 0.002 mg/L で目標値の 1/100 を測定することができなかったが、グリホサート及び AMPA の定量下限値はそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/L で、目標値の 1/100 を十分に測定することが可能であった。また、保持時間が短い AMPA については、水試料中のマトリックスが感度に影響を及ぼすことから、定量に際し注意が必要であった。

両方法ともに、水道水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たす方法であったことから、標準検査法になり得るものと考えられる。本法を標準検査法とするためには、今後、室間精度等のバリデーションを実施し、妥当性や汎用性について評価する必要がある。

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

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>

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
-塩酸分解-HS-GC/MS法-

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
	古川浩司	一般財団法人	三重県環境保全事業団

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ジチオカルバメート系農薬（ジネブ，ジラム，チウラム，プロピネブ，ポリカーバメート，マンゼブ（マンコゼブ），およびマンネブ）の分析法を開発することを目的とした。

ジチオカルバメート系農薬はいずれも塩酸中で分解して二硫化炭素が発生する特性を持つ。そこで本研究では，ジチオカルバメート系農薬に濃塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を，ヘッドスペース（HS）-GC/MS を用いて測定する方法を検討した。

前処理条件の検討の結果，試料 10 mL に対して 10 μ L の塩酸添加が最適であると判断した。ただし，濃塩酸を加えると二硫化炭素のピーク付近に妨害ピークが出現し，同定の際には注意が必要であることが分かった。また，精製水を用いた試験においても二硫化炭素が発生することから，空試験における二硫化炭素濃度を確認することが必要であることが分かった。

HS-GC/MS 測定条件の最適化の結果，目標値の 1/100 の二硫化炭素濃度（0.05 μ g/L）の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに，分析法の妥当性を評価するため，ジチオカルバメート系農薬に該当する 7 農薬を各目標値の 1/100 以下の濃度（0.1 μ g/L）となるように水道水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，いずれの農薬を添加した場合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（<30%）が得られた。

以上のことから，水道水中のジチオカルバメート系農薬の分析については，塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を HS-GC/MS により測定することで，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が標準検査法が未だ設定されていないジチオカルバメート系農薬の分析法を開発することを目的とした。

ジチオカルバメート系農薬はいずれも塩酸中で分解して二硫化炭素が発生する特性を持つ。そこで本研究では、ジチオカルバメート系農薬に濃塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を、ヘッドスペース(HS)-GC/MSを用いて測定する方法を検討した。

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, 2012a), 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

ジチオカルバメート系農薬は、野菜、果樹用の殺虫・殺菌剤として広く使用されており、使用量が多い。化学的にはジチオカルバミン酸イオン NH_2CS_2 およびその H を炭化水素基などで置換したジチオカルバメート錯体に分類され、 Zn^{2+} や Mn^{2+} を含んだ錯体であり、重合体も含まれている(厚生労働省, 2012b)。

水質管理目標設定項目におけるジチオカルバメート系農薬には、表1に示す7物質が含まれている(厚生労働省, 2013a)。そのうちプロピネブを除く6物質については、平成15年に目標値が設定されており(厚生労働省, 2003a; 2003b)、食品安全委員会による評価は行われていない。

平成25年4月に通知された農薬類の分類見直し(厚生労働省, 2013b)において、ジチオカルバメート系農薬の目標値は、食品残留農薬基準と同様に、生成する二硫化炭素に換算した値の総和として定められた(厚生労働省, 2012a; 2013a)。各物質から生成する二硫化炭素と各物質のモル比と、各物質の目標値に相当する二硫化炭素換算値は表1に示す通りであり、その最小値はジラムの目標値から求められる 0.005 mg/L であることから、これがジチオカルバメート系農薬の目標値として定められている。

表1. ジチオカルバメート系農薬の概要

農薬名	CAS No.	分子式	分子量	目標値 (mg/L)	CS ₂ モル比 (mol/mol)	CS ₂ 換算値 (mg/L)
ジネブ	12122-67-7	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$	275.8	0.01	2	0.006
ジラム	137-30-4	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$	305.8	0.01	2	0.005
チウラム	137-26-8	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$	240.4	0.02	2	0.01
プロピネブ	12071-83-9	$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$	289.8	未設定	2	-
ポリカーバメート	64440-88-6	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}_8\text{Zn}_2$	581.6	0.03	4	0.02
マンゼブ(マンコゼブ)	8018-1-7	$(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{MnS}_4)_x(\text{Zn})_y$	265.3	0.02	2	0.01
マンネブ	12427-38-2	$\text{C}_4\text{H}_6\text{MnN}_2\text{S}_4$	265.3	0.01	2	0.006

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

(2) メタノール

関東化学(株)製の残留農薬試験用(5000倍)の規格品を使用した。

(3) エチレンジアミン四酢酸ナトリウム

同仁化学研究所社製の製品を使用した。

(4) 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。

(5) L-システイン塩酸塩

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(6) 濃塩酸

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(7) 塩化ナトリウム

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。

(8) 二硫化炭素

関東化学(株)製の分光分析用の規格品を使用した。

(9) フルオロベンゼン標準品

関東化学(株)製の内部標準混合原液(1 mg/mL)を使用した。
(フルオロベンゼン及び4-ブロモフルオロベンゼンを含む)

(10) ジネブ標準品

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。

(11) ジラム標準品

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。

(12) チウラム標準品

関東化学(株)製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

(13) プロピネブ標準品

GmbH社製の製品を使用した。

(14) ポリカーバメート標準品

Fluka 社製の製品を使用した。

(15) マンゼブ (マンコゼブ) 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。

(16) マンネブ標準品

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. 標準液の調整

3.1. 内部標準液の調製

内部標準原液(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 10 mL メスフラスコに採り,メタノールを加えて定容した(この溶液を内部標準液 A とする)。内部標準液 A には,フルオロベンゼンを 100 mg/L 含む。

内部標準液 A の 1 mL をホールピペットで 10 mL メスフラスコに採り,メタノールを加えて定容した(この溶液を内部標準液 B とする)。内部標準液 B には,フルオロベンゼンを 10 mg/L 含む。

3.2. 検量線用標準液の調製

二硫化炭素(比重 1.261)の 0.8 mL をマイクロピペットで 100 mL メスフラスコに採り,メタノールを加えて定容した(二硫化炭素濃度 10000 mg/L)。この原液をメタノールで順次希釈し,0.25 ~ 50 mg/L の濃度範囲の検量線用標準液を調製した(図 1)。

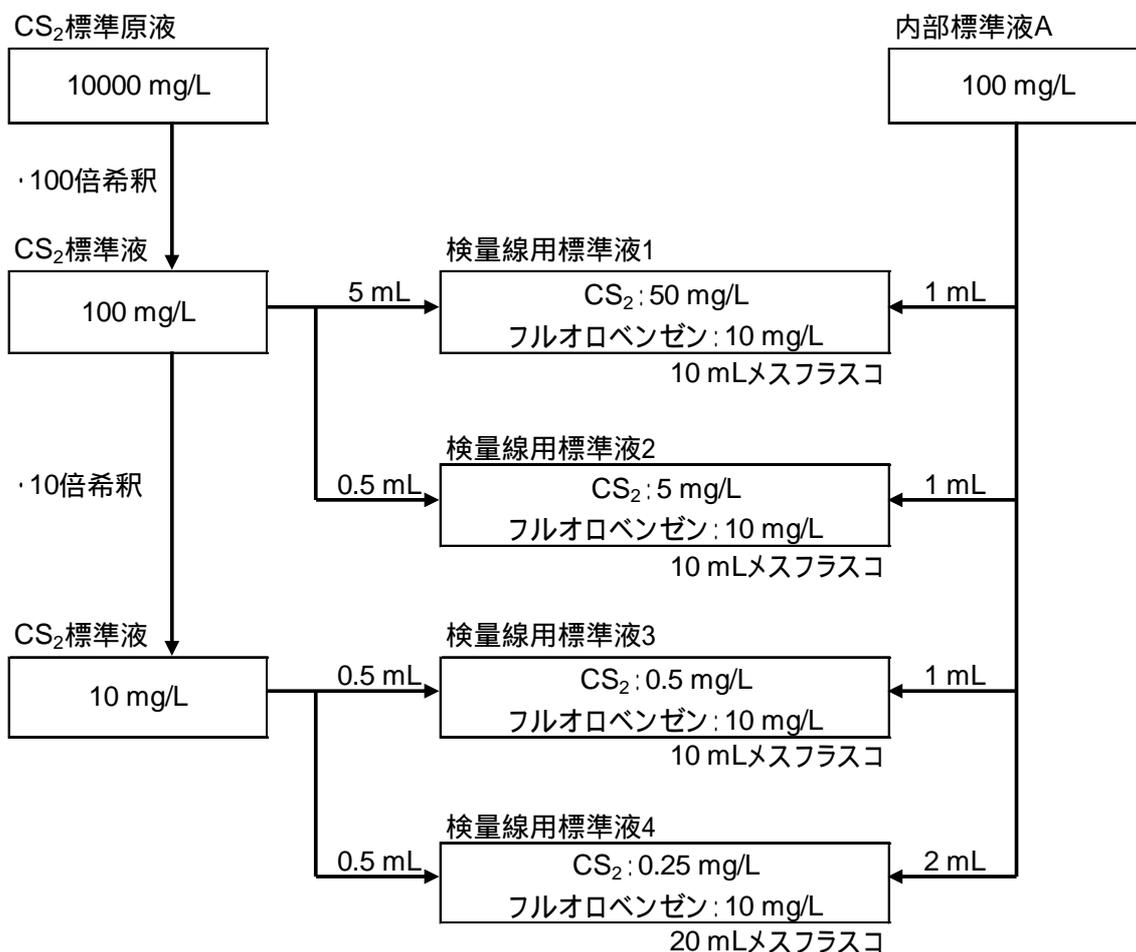


図 1. 検量線用 CS₂ 標準液の調整フロー

3.3. 添加回収試験用標準液の調製

各農薬の標準品の 1 mg を秤量して 100 mL メスフラスコに採り，5%L-システイン-5%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 溶液で定容して 10 mg/L の標準原液を調製した。

標準原液 (10 mg/L) の 1 mL を 100 mL メスフラスコに採り，5%L-システイン-5%EDTA 溶液で定容して 0.1 mg/L の標準液を調製した。この標準液 (0.1 mg/L) の 2.5 mL を 25 mL メスフラスコに採り，5%L-システイン-5%EDTA 溶液で定容して 0.01 mg/L の標準液を調製した。

なお，5%L-システイン-5%EDTA 溶液は，L-システインの塩酸塩 2.5 g と EDTA の 2.5 g を，精製水 500 mL に溶解し，5M 水酸化ナトリウム溶液で pH を約 10 に調製したものをを用いた。

4. 分析条件の最適化

ジチオカルバメート系農薬の二硫化炭素への分解反応における最適な塩酸添加量を把握するため，ポリカーバメートを一定濃度添加した精製水を用いて検討を行った。また，HS-GC/MS による二硫化炭素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水道水を用いた添加回収試験を各農薬とも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確認した。

5.1. 添加試料の調製

各農薬の標準液(0.01 mg/L)の100 µLをそれぞれ別々のヘッドスペース測定装置用の20 mLバイアルに採り、脱塩素処理をした水道水(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)で10 mLに定容した。この添加試料は、各農薬をそれぞれの目標値の1/100以下の濃度である0.1 µg/L含む。

なお、上記の試料調製には、三重県津市河芸町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に、予め塩化ナトリウム3 gを添加した後、濃塩酸をマイクロピペットで10 µL添加し、内部標準液Bをマイクロシリンジで2 µL添加して密栓した。

次に、密栓したバイアルを予め100℃に加熱した恒温槽に入れ、1時間加熱したものを検査試料水とした。

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。

5.2. HS-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HS-GC/MS測定条件において測定を行い、二硫化炭素と内部標準物質のフルオロベンゼ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二硫化炭素濃度を求めた。

ここから空試験の二硫化炭素濃度を差し引いた後で、表2に示す換算係数を用い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。

表2. 二硫化炭素濃度から各農薬濃度への換算係数

農薬名	分子式	分子量	CS ₂ モル比 (mol/mol)	換算係数
ジネブ	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn	275.8	2	1.81
ジラム	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn	305.8	2	2.01
チウラム	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄	240.4	2	1.58
プロピネブ	C ₅ H ₈ N ₂ S ₄ Zn	289.8	2	1.90
ポリカーバメート	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ S ₈ Zn ₂	581.6	4	1.91
マンゼブ(マンコゼブ)	(C ₄ H ₆ N ₂ MnS ₄) _x (Zn) _y	265.3	2	1.74
マンネブ	C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄	265.3	2	1.74

5.3. 検量線の作成

ヘッドスペース測定装置用の 20 mL バイアルに精製水を 10 mL 採り，3.2 で調製した検量線作成用標準液 1~4 をマイクロシリンジでそれぞれ 2 μ L 添加した．この時，各バイアル中の二硫化炭素濃度はそれぞれ 10，1.0，0.1，0.05 μ g/L となる．これを検査試料水と同様に操作して，二硫化炭素とフルオロベンゼ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. 適切な塩酸添加量について

ポリカーバメートを一定量添加した試料水の前処理において，添加した濃塩酸の量と二硫化炭素およびフルオロベンゼンの強度ならびに強度比との関係を図 2 に示す．濃塩酸の添加量が 5 μ L 以上であれば，二硫化炭素の強度および二硫化炭素とフルオロベンゼンの強度比はほぼ一定の値と示したことから，濃塩酸を 5 μ L 以上添加することが必要と考えられる．

また，アスコルビン酸ナトリウムを添加した水道水に 10 μ L および 50 μ L 相当の濃塩酸を加えた場合の pH の変化を表 3 に示す．ヘッドスペース装置への負荷の低減のため，試料水の pH は 2 以上あることが望ましいことから，濃塩酸の添加量は 10 μ L 以下にする必要があると考えられる．

以上より，本分析法において，濃塩酸の適切な添加量は 10 μ L と判断された．

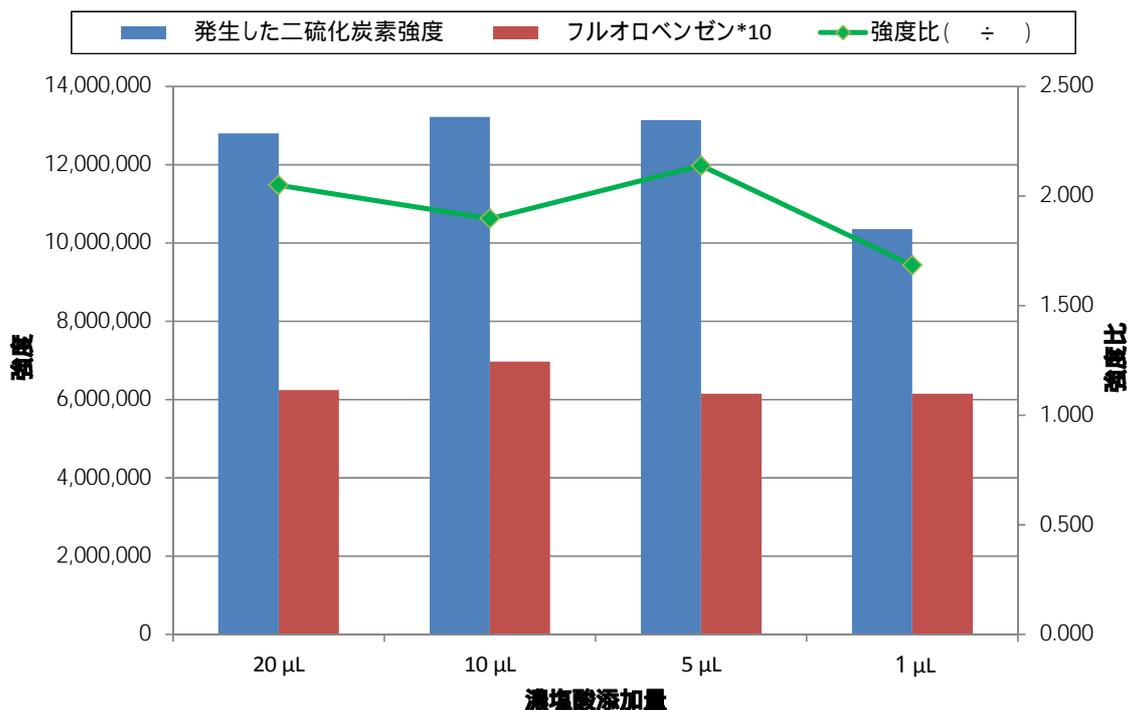


図 2. 濃塩酸の添加量と二硫化炭素の強度・強度比との関係

表 3. 濃塩酸を添加した水道水の pH 測定結果

濃塩酸の添加量	pH
水道水 100 mL に対し濃塩酸 100 μ L 添加 (本分析法では濃塩酸 10 μ L 添加に相当)	2.0
水道水 100 mL に対し濃塩酸 500 μ L 添加 (本分析法では濃塩酸 50 μ L 添加に相当)	1.3

1.2. HS-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 HS-GC/MS 分析条件を表 4 に示す。また、二硫化炭素の SCAN 測定による MS スペクトルおよびライブラリー検索の結果を図 3 に示す。この図から、定量イオンの m/z は 76、定性イオンの m/z は 78 (あるいは 44) を選択した。

表 4. HS-GC/MS 測定条件

HS 装置条件	
機種	G1888 (アジレント)
オープン温度	50
ループ温度	100
トランスファーライン 温度	150
バイアル平衡時間	20 min
圧カタイム	0.2 min
サンプルループサイズ	3 mL
バイアル圧力	10 psi
GC/MS 装置条件	
機種	5973iGC/MS (アジレント)
注入口温度	200
注入法	スプリット法 (スプリット比 5:1)
カラム	AQUATIC-2 (60 m \times 0.25 mm \times 1.40 μ m, ジーエルサイエンス)
昇温条件	40 (15min) 15 /min 140 20 /min 250 (8min)
カラム流量	1.2 mL/min
AUX 温度	250
イオン化法	EI 法
モニターイオン (m/z)	二硫化炭素: 76 (定量イオン), 78 or 44 (確認イオン) フルオロベンゼン (内部標準物質): 96

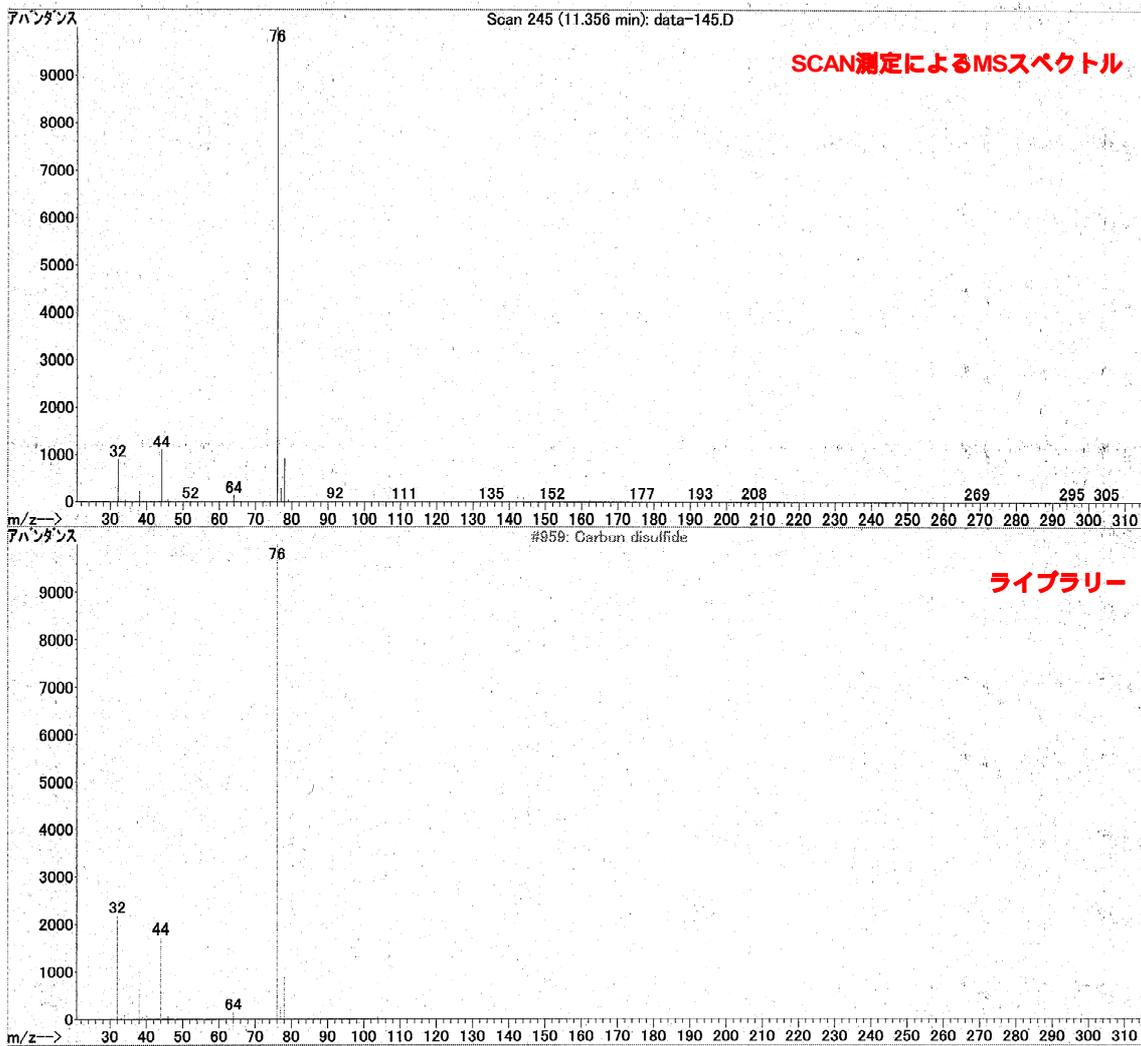


図 3. 二硫化炭素の MS スペクトルとライブラリー検索結果

2. 分析法の妥当性評価

2.1. 空試験結果の評価

精製水に濃塩酸を加えた試料水の HS-GC/MS 測定クロマトグラムを図 4 に示す。濃塩酸を加えると、二硫化炭素のピーク付近に妨害ピークが出現することがわかった。したがって、本分析法では同定の際に注意が必要である。

また、精製水に塩化ナトリウム 3 g と濃塩酸を加えた試料水の測定クロマトグラムを図 5 に示す。試料から二硫化炭素のピークが検出されたことから、本分析法の試験操作においては、ジチオカルバメート系農薬の分解以外からも二硫化炭素が発生することがわかった。したがって、本分析法では、空試験における二硫化炭素濃度を確認することが必要である。

空試験を 5 回繰り返し行った結果を表 5 に示す。空試験における二硫化炭素濃度の平均値は 0.0076 $\mu\text{g/L}$ であり、ジチオカルバメート系農薬の目標値(二硫化炭素として 0.005 mg/L) の 1/100 の濃度である 0.05 $\mu\text{g/L}$ の 1/3 以下と良好な結果が得られた。

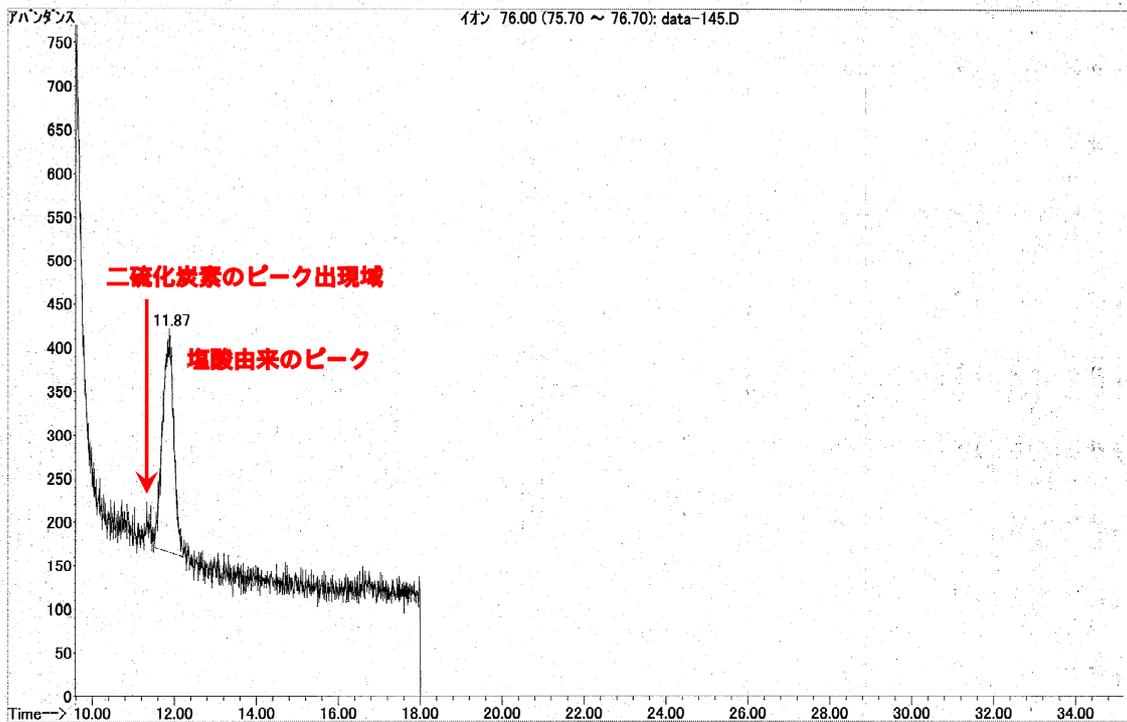


図 4. 精製水に塩酸を試料の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

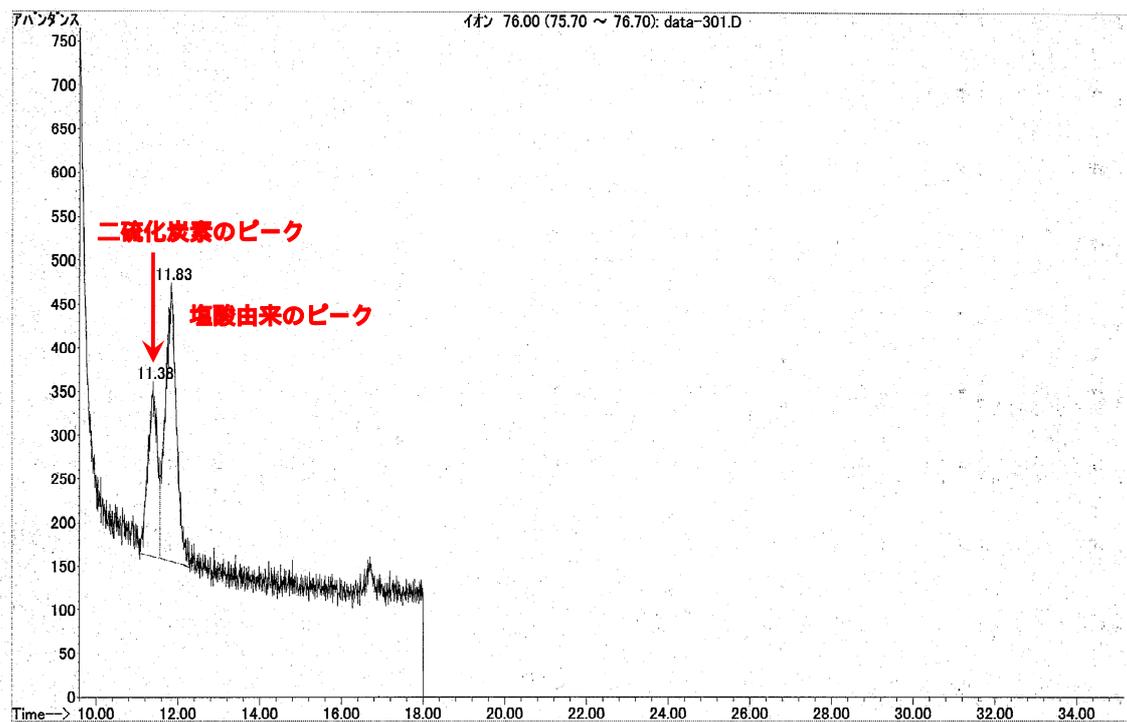


図 5. 精製水に NaCl を 3 g と塩酸を加えた試料の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

表 5. 空試験の結果

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
測定値 (μg/L)	0.006	0.009	0.008	0.007	0.008	0.0076	15

2.1. 検量線の評価

二硫化炭素検量線（濃度範囲：0.05 ~ 10 μg/L）を図 6 に示す．重相関係数 (r^2) が 0.99998 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．

また，検量線の最低濃度である 0.05 μg/L の濃度の二硫化炭素標準液を HS-GC/MS で測定したクロマトグラムを図 7 に示す．SN 比に問題はなく，5 回の繰り返し測定における併行精度 (RSD_r) は 4.0% と良好な結果が得られた．

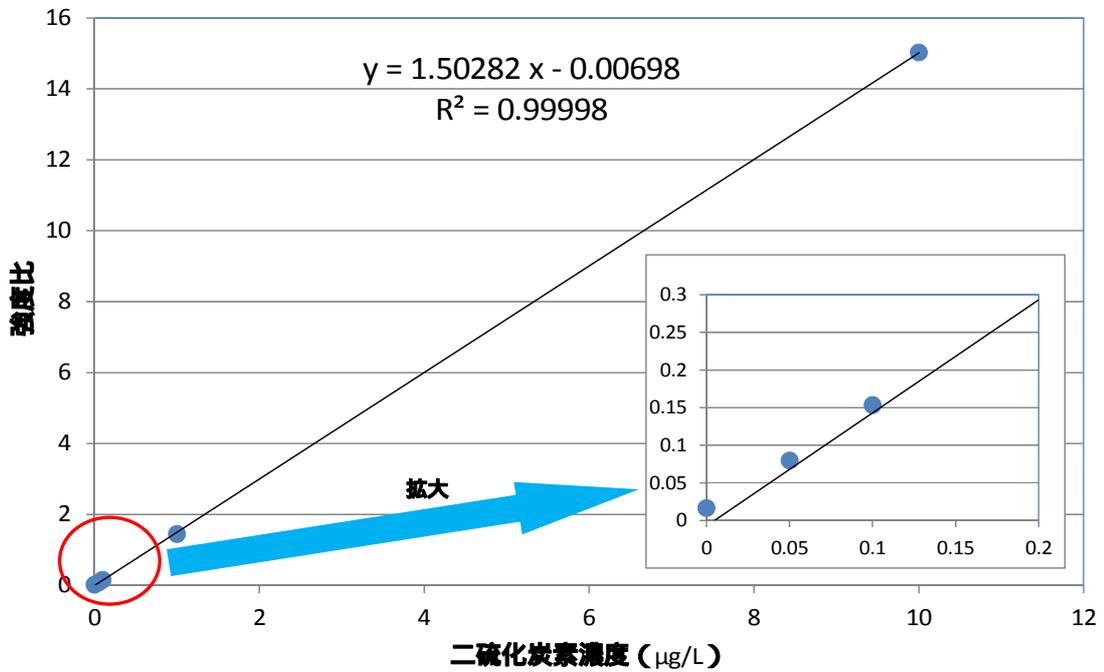


図 6. 二硫化炭素の検量線（濃度範囲 0.05 ~ 10 μg/L）

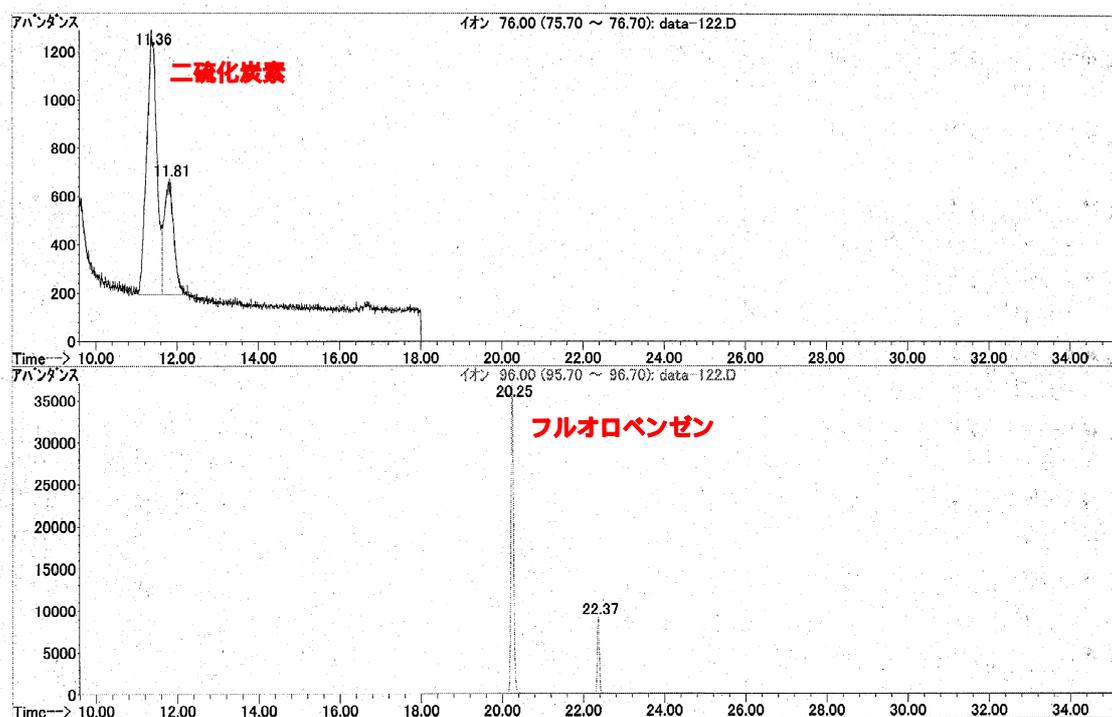


図 7. 定量下限値付近の濃度 (0.05 µg/L) の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

2.3. 水道水添加回収試験結果の評価

各農薬の水道水添加回収試験の結果をそれぞれ表 6～12 に示す。また、空試験および各農薬の添加回収試験における HS-GC/MS 測定クロマトグラムをそれぞれ図 8～15 に示す。

各農薬とも目標値の 1/100 以下の添加濃度において 5 回の繰り返し試験を実施したが、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 RSD_r (<30%) が得られた。

表 6. ジネブ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 (%)
CS ₂ 濃度 (µg/L)	0.05	0.056	0.05	0.057	0.046	0.052	
ジネブ換算濃度 (µg/L)	0.091	0.101	0.091	0.103	0.083	0.094	8.9
回収率 (%)	90.5	101.4	90.5	103.2	83.3	93.8	

表 7. ジラム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 (%)
CS ₂ 濃度 (µg/L)	0.059	0.051	0.057	0.054	0.059	0.056	
ジラム換算濃度 (µg/L)	0.119	0.103	0.115	0.109	0.119	0.113	6.2
回収率 (%)	118.6	102.5	114.6	108.5	118.6	112.6	

表 8. チウラム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 (%)
CS ₂ 濃度 (μg/L)	0.046	0.054	0.054	0.046	0.043	0.049	
チウラム換算濃度 (μg/L)	0.073	0.085	0.085	0.073	0.068	0.077	10.5
回収率 (%)	72.7	85.3	85.3	72.7	67.9	76.8	

表 9. プロピネブ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 (%)
CS ₂ 濃度 (μg/L)	0.040	0.055	0.051	0.051	0.059	0.051	
プロピネブ換算濃度(μg/L)	0.076	0.105	0.097	0.097	0.112	0.097	13.8
回収率 (%)	76.0	104.5	96.9	96.9	112.1	97.3	

表 10. ポリカーバメート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 (%)
CS ₂ 濃度 (μg/L)	0.061	0.061	0.049	0.069	0.064	0.061	
ポリカーバメート換算濃度 (μg/L)	0.117	0.117	0.094	0.132	0.122	0.116	12.1
回収率 (%)	116.5	116.5	93.6	131.8	122.2	116.1	

表 11. マンゼブ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 (%)
CS ₂ 濃度 (μg/L)	0.055	0.053	0.048	0.043	0.048	0.050	
マンゼブ換算濃度 (μg/L)	0.096	0.092	0.084	0.075	0.084	0.086	9.6
回収率 (%)	95.7	92.2	83.5	74.8	83.5	86.0	

表 12. マンネブ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 (%)
CS ₂ 濃度 (μg/L)	0.058	0.048	0.057	0.063	0.074	0.060	
マンネブ換算濃度 (μg/L)	0.101	0.084	0.099	0.110	0.129	0.104	15.9
回収率 (%)	100.9	83.5	99.2	109.6	128.8	104.4	

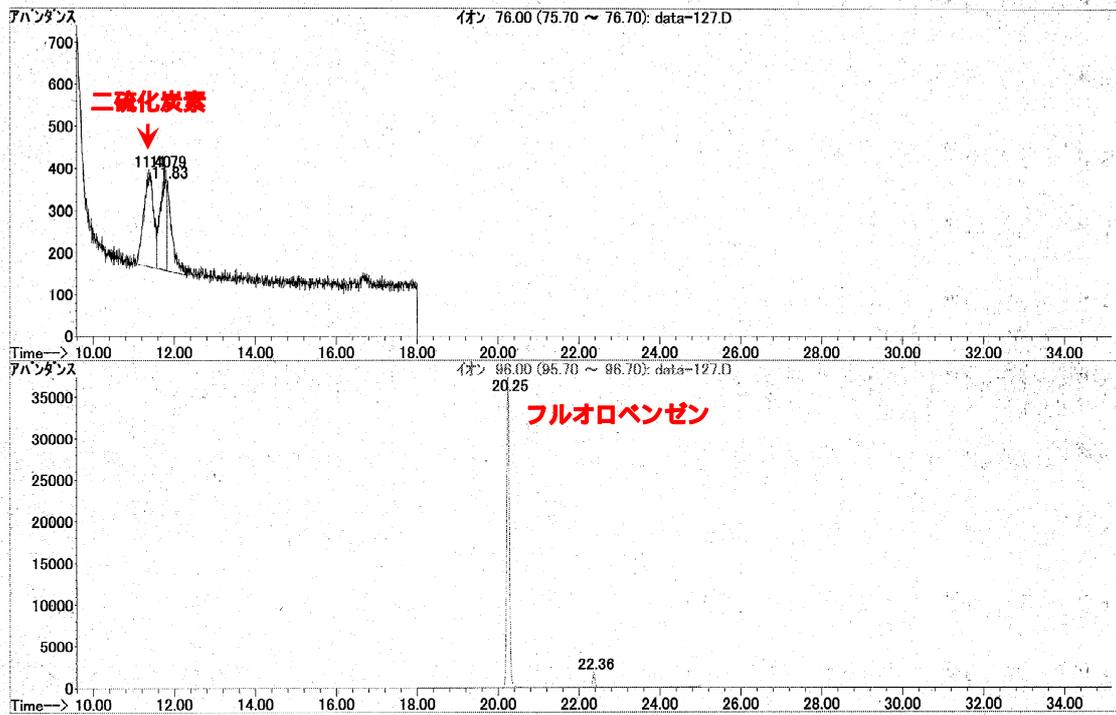


図 8. 空試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

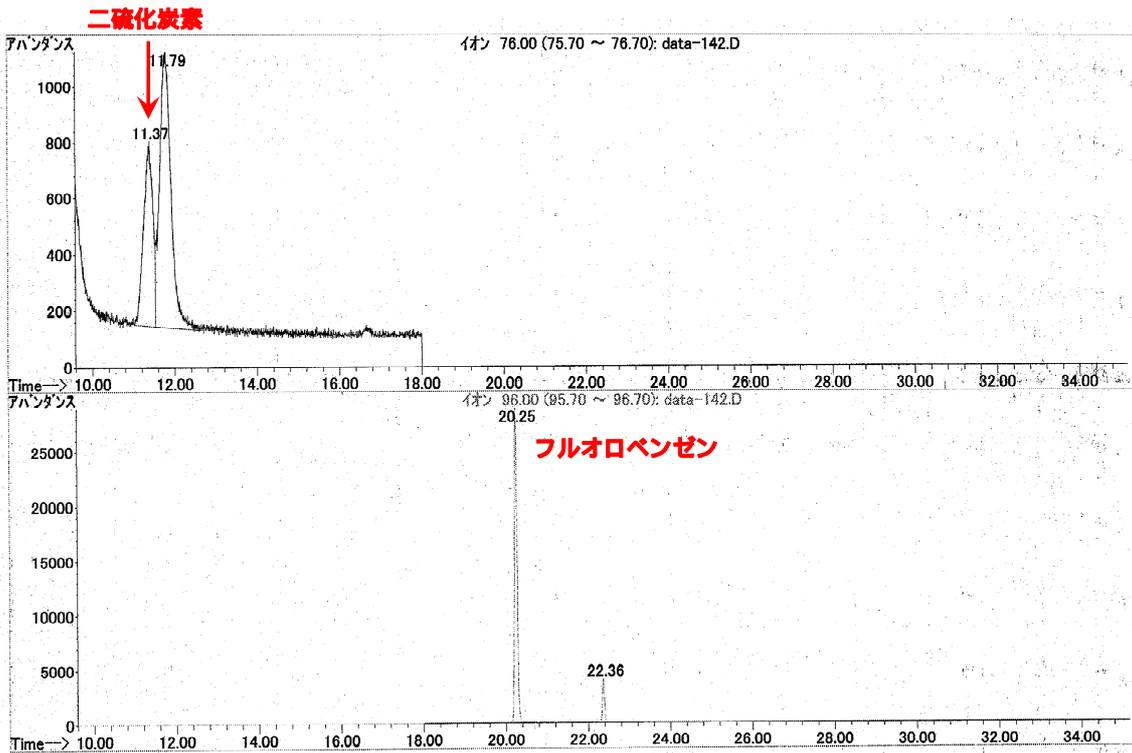


図 9. ジネブの水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

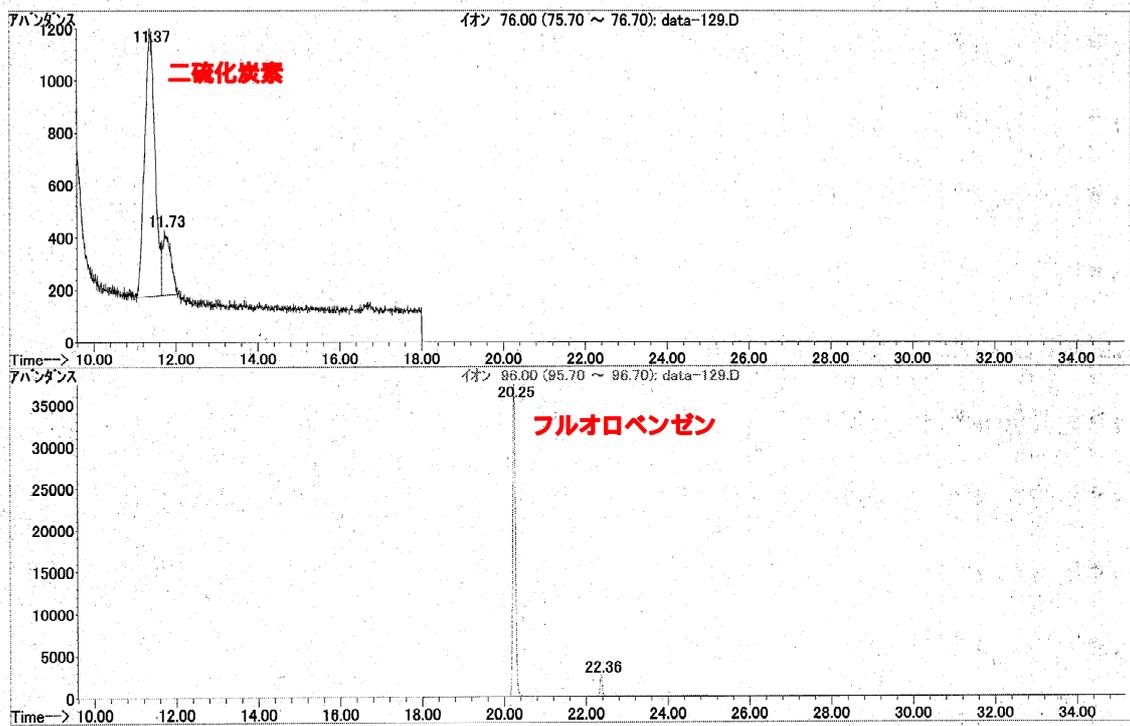


図 10. ジラムの水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

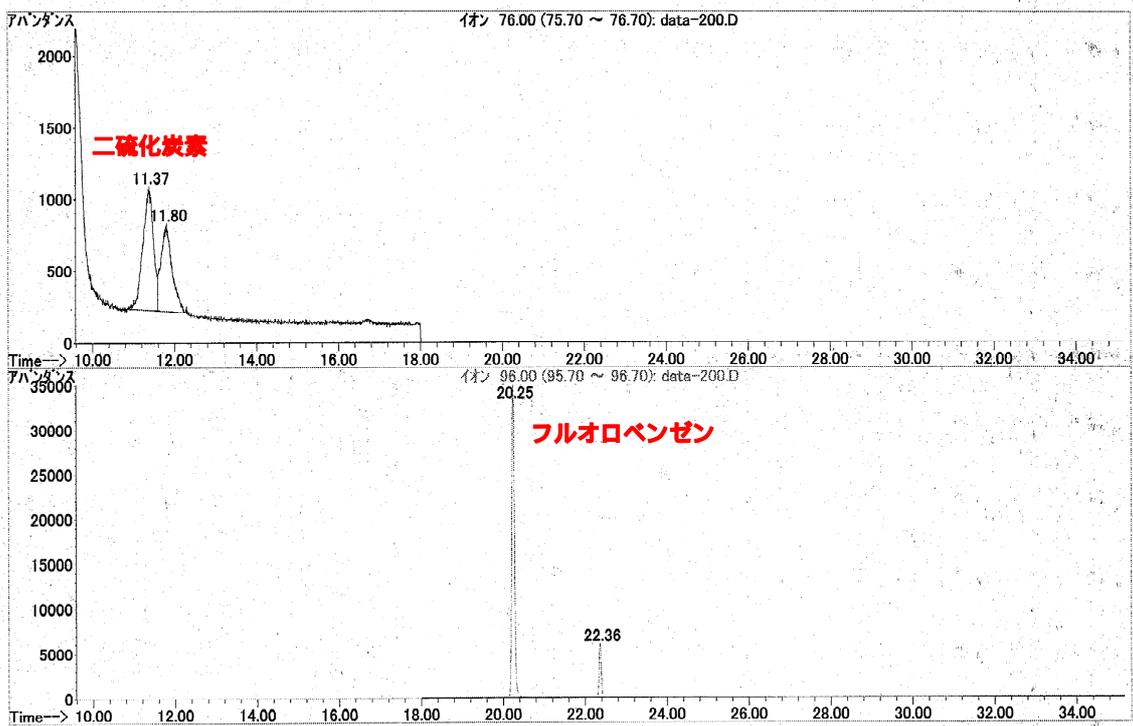


図 11. チウラムの水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

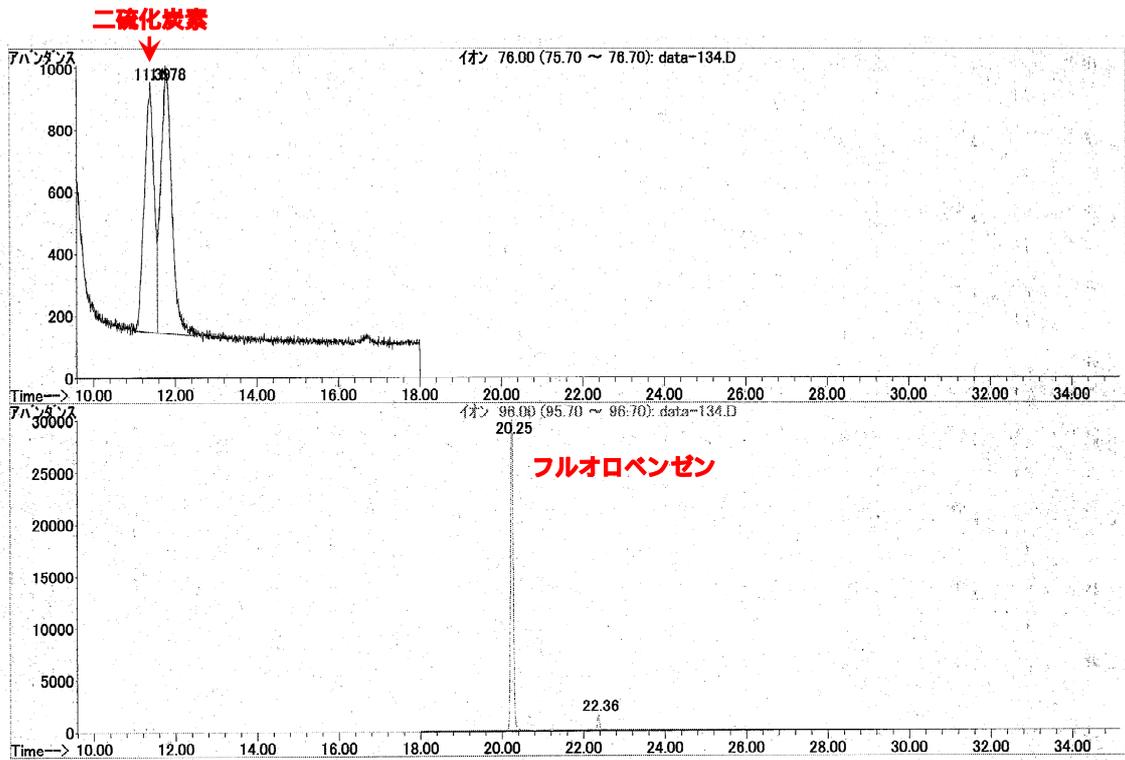


図 12. プロピレングリコールの水水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

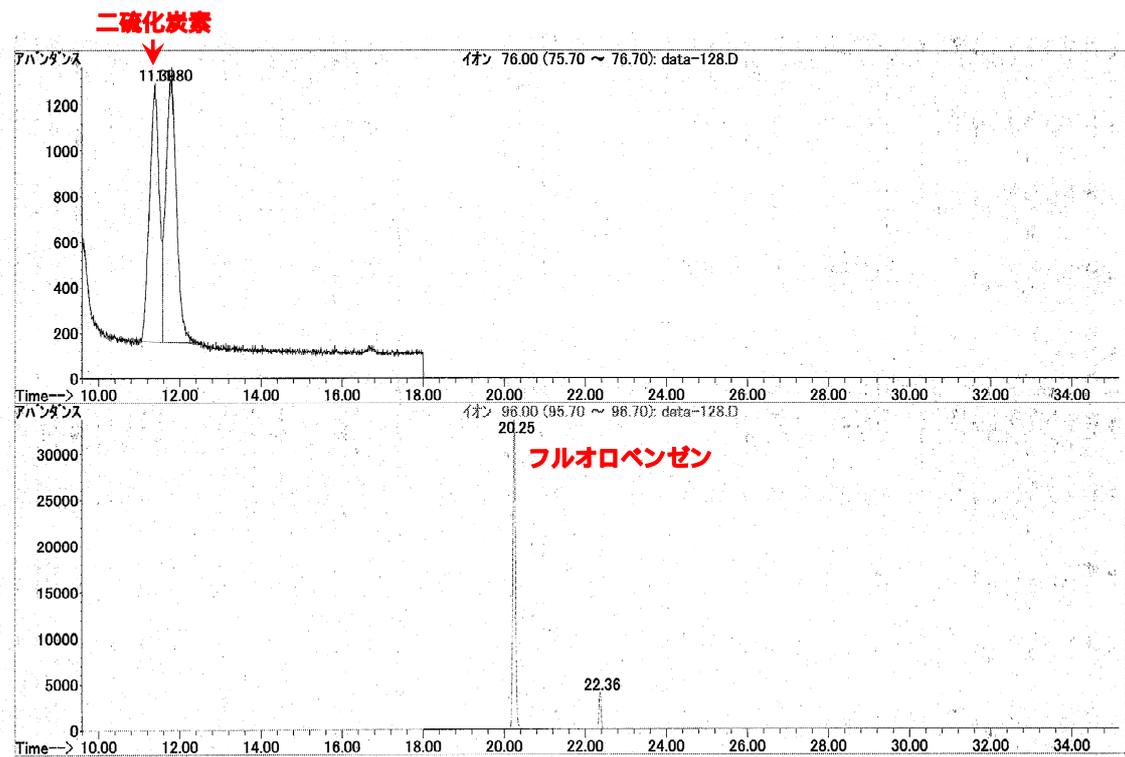


図 13. ポリカーバメートの水水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

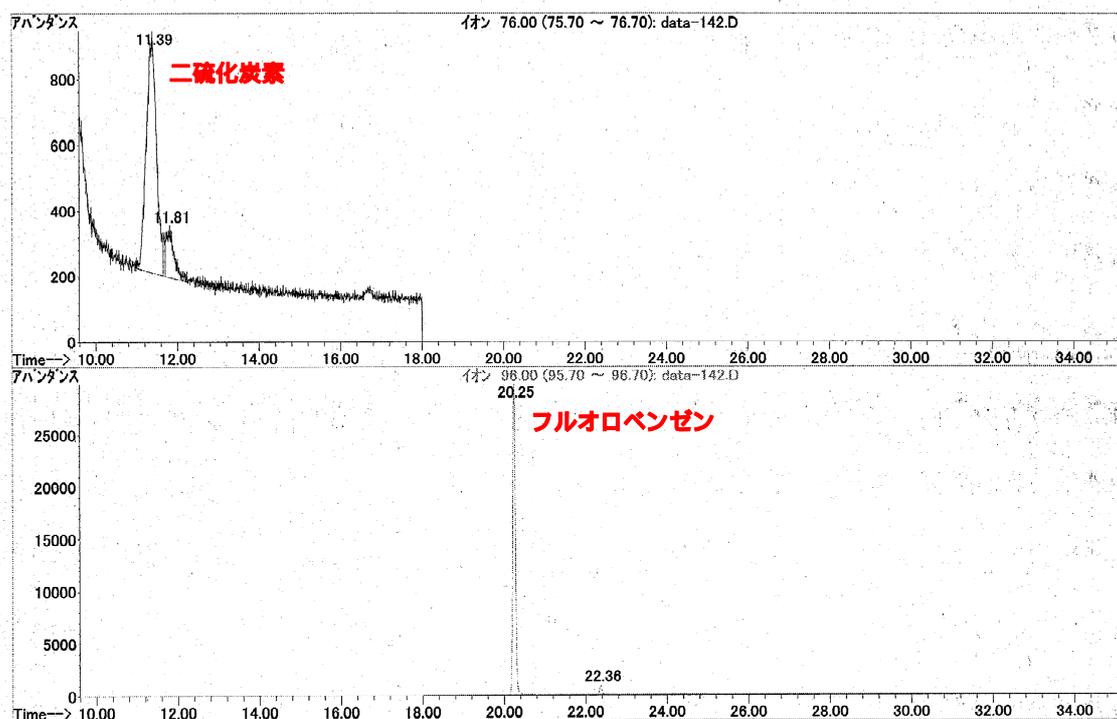


図 14. マンゼブの水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

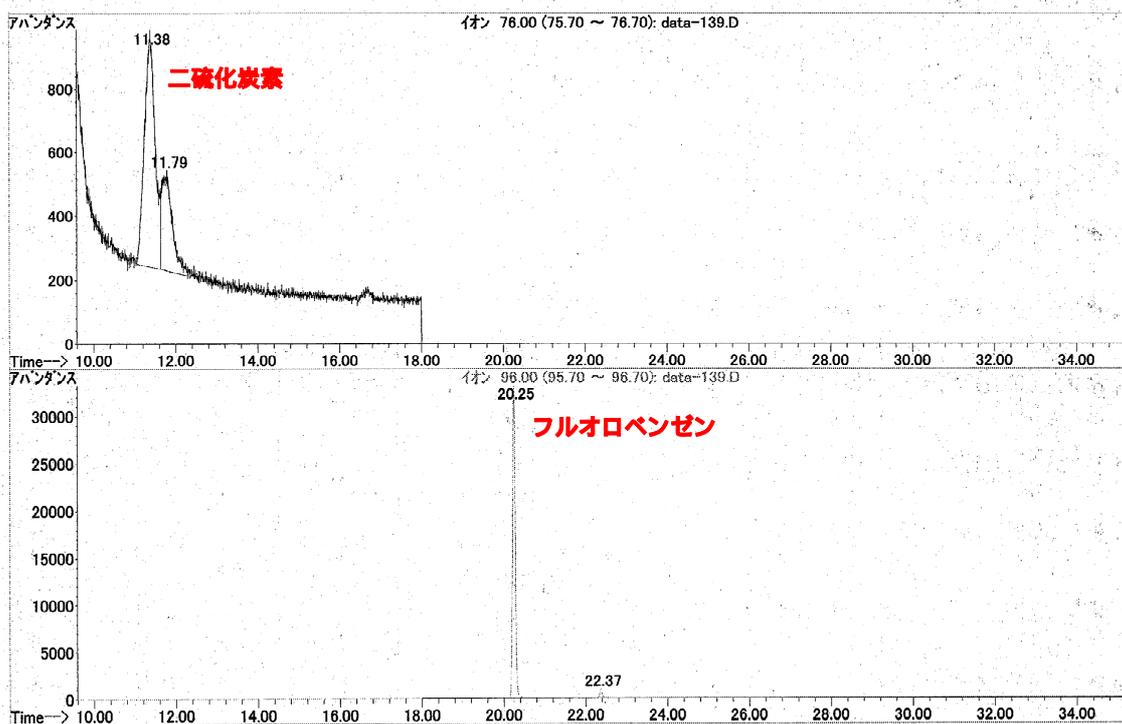


図 15. マンネブの水道水添加回収試験の HS-GC/MS 測定クロマトグラム

D. 結論

ジチオカルバメート系農薬（ジネブ、ジラム、チウラム、プロピネブ、ポリカーバメート、マンゼブ（マンコゼブ）、およびマンネブ）に濃塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を、ヘッドスペース（HS）-GC/MS を用いて測定する方法を検討した。

前処理条件の検討の結果、試料 10 mL に対して 10 μ L の塩酸添加が最適であると判断した。ただし、濃塩酸を加えると二硫化炭素のピーク付近に妨害ピークが出現し、同定の際には注意が必要であることが分かった。また、精製水を用いた試験においても二硫化炭素が発生することから、空試験における二硫化炭素濃度を確認することが必要であることが分かった。

HS-GC/MS 測定条件の最適化の結果、目標値の 1/100 の二硫化炭素濃度（0.05 μ g/L）の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに、分析法の妥当性を評価するため、ジチオカルバメート系農薬に該当する 7 農薬を各目標値の 1/100 以下の濃度（0.1 μ g/L）となるように水道水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、いずれの農薬を添加した場合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（<30%）が得られた。

以上のことから、水道水中のジチオカルバメート系農薬の分析については、塩酸を加えて加熱分解し発生した二硫化炭素を HS-GC/MS により測定することで、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

厚生労働省 (2003a) 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 (2003b) 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 (2012a) 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 (2012b) ジチオカルバメート系農薬の目標値について．平成 24 年度第 2 回水質基準逐次改正検討会．資料 2 補足 2

<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002y0iy-att/2r9852000002y0vp.pdf>

厚生労働省 (2013a) 「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-bessi.pdf>

厚生労働省 (2013b) 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>

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-GC/MS 法-

研究分担者	高木総吉	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
研究協力者	小泉義彦	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課
	吉田 仁	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課

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ジチオカルバメート系農薬（ジネブ，ジラム，チウラム，プロピネブ，ポリカーバメート，マンゼブ（マンコゼブ），およびマンネブ）の分析法を開発することを目的とした。

ジチオカルバメート系農薬はそのまま GC/MS で測定することはできないが，誘導体化物を GC/MS で測定することができる。そこで本研究では，ジチオカルバメート系農薬をヨウ化メチルでメチル化し，誘導体化物を GC/MS を用いて測定する方法を検討した。

誘導体化物の GC/MS 測定条件を検討した結果，高極性カラムを用いると良好なピーク形状と分離が得られた。

前処理条件を検討した結果，誘導体化前にアルカリ分解をした場合，ジネブ，チウラム，プロピネブ，ポリカーバメート，マンゼブ及びマンネブにおいて誘導体化率が減少することがわかった。また，窒素吹き付けによる濃縮時に，キーパーとしてトリエチレングリコールを添加すると，抽出液を効率よく 10 倍濃縮できることがわかった。

7 種類の農薬の妥当性評価を水道水と河川水を用いて実施した。目標値（プロピネブは ADI より算出）の 1/10 添加濃度において，真度の目標（70～120%）と，併行精度の目標（< 25%）を満たした。また，プロピネブは，目標値の 1/100 添加濃度において，真度の目標（70～120%）と，併行精度の目標（< 30%）を満たした。

以上のことから，水道水中のジチオカルバメート系農薬の分析については，ヨウ化メチルで誘導体化後，誘導体化物を GC/MS により測定することで，目標値の 1/10 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設定されていないジチオカルバメート系農薬の分析法を開発することを目的とした。対象とするジラム，ジネブ，チウラム，プロピネブ，ポリカーバメート，マンゼブ及びマンネブの 7 種類の農薬は，いずれもポリカーバメートの分析方法の一つである溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法による分析が可能であると考えられたため，一斉分析が適用できるか検討した。

B. 研究方法

1. 対象物質の基本的情報

ジチオカルバメート系農薬は，野菜，果樹用の殺虫殺菌剤として広く使用されており，使用量が多い農薬である（社団法人日本植物防疫協会，2011）。ジチオカルバメート系農薬は，ジチオカルバミン酸イオン（ NH_2CS_2^- ）及びその H を炭化水素基などで置換したジチオカルバメート錯体に分類され， Zn^{2+} や Mn^{2+} を含んだ錯体で，重合体も含まれる。ジチオカルバメート系農薬で，本研究での検討対象農薬は，ジネブ，ジラム，チウラム，プロピネブ，ポリカーバメート，マンゼブ（マンコゼブ）及びマンネブの 7 物質である。各農薬の基本的情報を表 1～7 に示した（社団法人日本植物防疫協会，2011）。

表 1. ジネブの基本的情報

化学名	Zinc ethylenbis (dithiocarbamate) (polymeric)
分子式	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$
分子量	275.76
CAS NO.	12122-67-7
外観・臭気	-
融点	157（分解）
沸点	-
蒸気圧	-
水溶解度	10 mg/L
土壌吸着係数	-
オクタノール/水分配係数	-
加水分解性（半減期）	-
水中光分解性（半減期）	-

表 2. ジラムの基本的情報

化学名	zinc bis (dimethyldithiocarbamate)
分子式	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn
分子量	305.8
CAS NO.	137-30-4
外観・臭気	白色粉末，無臭
融点	252.0 ~ 254.0
沸点	-
蒸気圧	< 1 × 10 ⁻³ mPa
水溶解度	0.033 g/L (20)
土壌吸着係数	-
オクタノール/水分配係数	log Pow = 1.23 (20)
加水分解性 (半減期)	1 年以上 (pH5), 約 350 日 (pH7), 約 17 日 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	-

表 3. チウラムの基本的情報

化学名	bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide, tetramethylthiuram disulfide
分子式	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄
分子量	240.4
CAS NO.	137-26-8
外観・臭気	白色結晶性粉末，無臭
融点	154.8 ~ 157.9
沸点	-
蒸気圧	2.3 mPa (25)
水溶解度	0.01 g/L (20)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	log Pow = 1.79 (pH6.3, 25)
加水分解性 (半減期)	1 年以上 (pH5), 約 82 日 (pH7), 約 12 日 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	-

表 4. プロピネブの基本的情報

化学名	polymeric zinc propylenebis (dithiocarbamate)
分子式	(C ₅ H ₈ N ₂ S ₄ Zn) _n
分子量	(289.8) _n
CAS NO.	12071-83-9(モノマー), 9016-72-2(ホモポリマー)
外観・臭気	白色結晶性個体, 無臭
融点	150 以上で分解
沸点	測定不能
蒸気圧	< 1.6 × 10 ⁻⁴ Pa (25)
水溶解度	0.01 g/L (20)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	log Pow = -0.26 (20)
加水分解性 (半減期)	1 日 (pH4), 約 1 日 (pH7), > 2~5 日 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	-

表 5. ポリカーバメートの基本的情報

化学名	bis (dimethyldithiocarbamoyl) zinc ethylene bis (dithiocarbamate)
分子式	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ S ₈ Zn ₂
分子量	581.5
CAS NO.	64440-88-6
外観・臭気	類白色粉末, かすかな硫黄臭
融点	185 (分解)
沸点	-
蒸気圧	-
水溶解度	5.05 mg/L (20)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	log Pow = 1.52 (pH6.9, 22)
加水分解性 (半減期)	240 日 (pH5), 42 日 (pH7), 6 日 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	約 11 日 (pH7.5, 25)

表 6. マンゼブ (マンコゼブ) 基本的情報

化学名	manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt
分子式	$(C_4H_6N_2S_4Mn)_x \cdot (C_4H_6N_2S_4Zn)_y$
分子量	265.3
CAS NO.	8018-01-7
外観・臭気	類白色粉末, かすかな硫黄臭
融点	190 (分解)
沸点	-
蒸気圧	$< 1.33 \times 10^{-2}$ mPa (20)
水溶解度	6 ± 3 mg/L (25)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	$\log Pow = 1.20$ (20)
密度	-
加水分解性 (半減期)	30.6 時間 (pH5), 54.6 時間 (pH7), 15.9 時間 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	分解速く半減期測定不能

表 7. マンネブの基本的情報

化学名	manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric)
分子式	$(C_4H_6MnN_2S_4)_n$
分子量	$(265.3)_n$
CAS NO.	12427-38-2
外観・臭気	淡黄色粉末, かすかな硫黄臭
融点	測定不能 (130 で分解)
沸点	測定不能
蒸気圧	測定不能
水溶解度	251 mg/L (20)
土壌吸着係数	測定不能
オクタノール/水分配係数	$\log Pow = 1.53$ (pH7.5, 20)
密度	-
加水分解性 (半減期)	30 時間 (pH5), 32 時間 (pH7), 18 時間 (pH9)
水中光分解性 (半減期)	2 時間 (25)

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

(2) ヘキサン

和光純薬工業 (株) 製の残留農薬・PCB 試験用 (5000 倍濃縮) 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・PCB 試験用（5000 倍濃縮）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・PCB 試験用（5000 倍濃縮）の規格品を使用した。

(5) ジメチルスルホキシド(DMSO)

和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。

(6) トリエチレングリコール（3,6-ジオキサ-1,8-オクタジオール）

和光純薬工業（株）製の 1 級品を使用した。

(7) L(+)-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。

(8) L-システイン塩酸塩一水和物

和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。

(9) エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム塩・三水和物

同仁化学研究所社製の製品を使用した。

(10) 硫酸水素テトラブチルアンモニウム

和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。

(11) 50%(W/V)水酸化ナトリウム溶液

和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。

(12) ヨードメタン（よう化メチル）

和光純薬工業（株）製の特級品を使用した。

(13) 硫酸ナトリウム（無水）

和光純薬工業（株）製の残留農薬・PCB 試験用の規格品を使用した。

(14) ジネブ

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。

(15) ジラム

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。

(16) チウラム

和光純薬工業（株）製の TraceSure の規格品を使用した。

(17) プロピネブ

Dr. Ehrenstorfer GmbH 社製の製品を使用した。

(18) ポリカーバメート

関東化学（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

(19) マンゼブ

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。

(20) マンネブ

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。

(21) ジメチルジチオカルバミン酸メチル（DMDC-Me）

和光純薬工業（株）製の TraceSure の規格品を使用した。

(22) エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル（EBDC-Me）

林純薬工業（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

(23) プロピレンビスジチオカルバメートジメチル（PBDC-Me）

林純薬工業（株）製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

(24) アントラセン-d₁₀

和光純薬工業（株）製の製品を使用した。

3. 試薬の調製

3.1. 標準原液の調製

チウラム，ポリカーバメート，マンゼブ，マンネブ，ジネブ及びプロピネブは，10 mg を採り，DMSO で 20 mL に定容した。また，ジラムは 10 mg を採り，アセトンで 100 mL に定容した。

3.2. 前処理用試薬の調製

(1) 1mol/L EDTA 溶液

エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム塩・三水和物 412.3 g を精製水 800 mL に懸濁し，50 w/v% 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.4 に調整した後，精製水で 1000 mL に定容した。

(2) 2.5 mol/L L-システイン溶液

L-システイン塩酸塩・一水和物 78.8 g を精製水に溶解し，200 mL に定容した．

(3) 0.4 mol/L 硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液

硫酸水素テトラブチルアンモニウム 27.2 g を精製水に溶解し，200 mL に定容した．

(4) 内部標準原液

アントラセン-d₁₀ 5 mg を採り，アセトンで 10 mL に定容した．

(5) 内部標準溶液

内部標準原液を 0.5 mL 採り，アセトンで 10 mL に定容した．これを 0.5 mL 採り，ジクロロメタン及びヘキサン混液（75：25）で 50 mL に定容した．

(6) 0.1 mol/L よう化メチル含有ジクロロメタン及びヘキサン混液（75：25）

よう化メチル 1.25 mL 及び内部標準溶液 4 mL を採り，ジクロロメタン及びヘキサン混液（75：25）で 200 mL に定容した．

4. 分析方法

ジチオカーバメート系農薬の分析方法は溶媒抽出-誘導体化-GC/MS 法とした．すなわち，水中で金属が外れた各農薬を硫酸水素テトラブチルアンモニウムをイオンペアとしてジクロロメタン及びヘキサン混液で抽出し，ヨウ化メチルでメチル化して誘導体化物を GC/MS で測定する方法とした．メチル化により，ジラム，チウラム及びポリカーバメートからは DMDC-Me が，ジネブ，ポリカーバメート，マンゼブ及びマンネブからは EBDC-Me が，プロピネブからは PBDC-Me が生成される．各農薬がメチル化された際の誘導体化物とモル比を表 8 に示した．

試料量は 100 mL とし，残留塩素が存在する時はアスコルビン酸ナトリウムを添加して消去した．2.5 mol/L L-システイン溶液 5 mL と 1 mol/L EDTA 溶液 10 mL 及び 0.4 mol/L 硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 5 mL を加えた後，50 v/v% 水酸化ナトリウム溶液で pH 値を 7.5 に調整した．0.1 mol/L よう化メチル含有ジクロロメタン及びヘキサン混液（75：25）5 mL を加え，振盪機を用いて 10 分間激しく振り混ぜ，1 時間静置後，有機溶媒層を分取した．水層には，新たにジクロロメタン及びヘキサン混液（45：55）5 mL を加え，10～20 秒間振り混ぜ，10 分間静置後，有機溶媒層を先の有機溶媒層に合わせた．分取した有機溶媒層に水が存在していた場合は，1000 rpm で 10 分間遠心分離を行い，分離した水層を取り除いた．ジクロロメタン及びヘキサン混液（45：55）を加えて 10 mL にした後，硫酸ナトリウム（無水）を加えて振盪し静置した．上澄み液 5 mL にキーパーを 5 μL 添加して，窒素ガスを緩やかに吹き付けて 0.5 mL とし，これを試験溶液とした．分析

方法の概略を図 1 に示した。

表 8. 各農薬 1 モルから生成する物質

農薬名	生成物	生成モル数
チウラム	DMDC-Me	2
ポリカーバメート	DMDC-Me	2
	EBDC-Me	1
マンゼブ	EBDC-Me	1
マンネブ	EBDC-Me	1
ジラム	DMDC-Me	2
ジネブ	EBDC-Me	1
プロピネブ	PBDC-Me	1

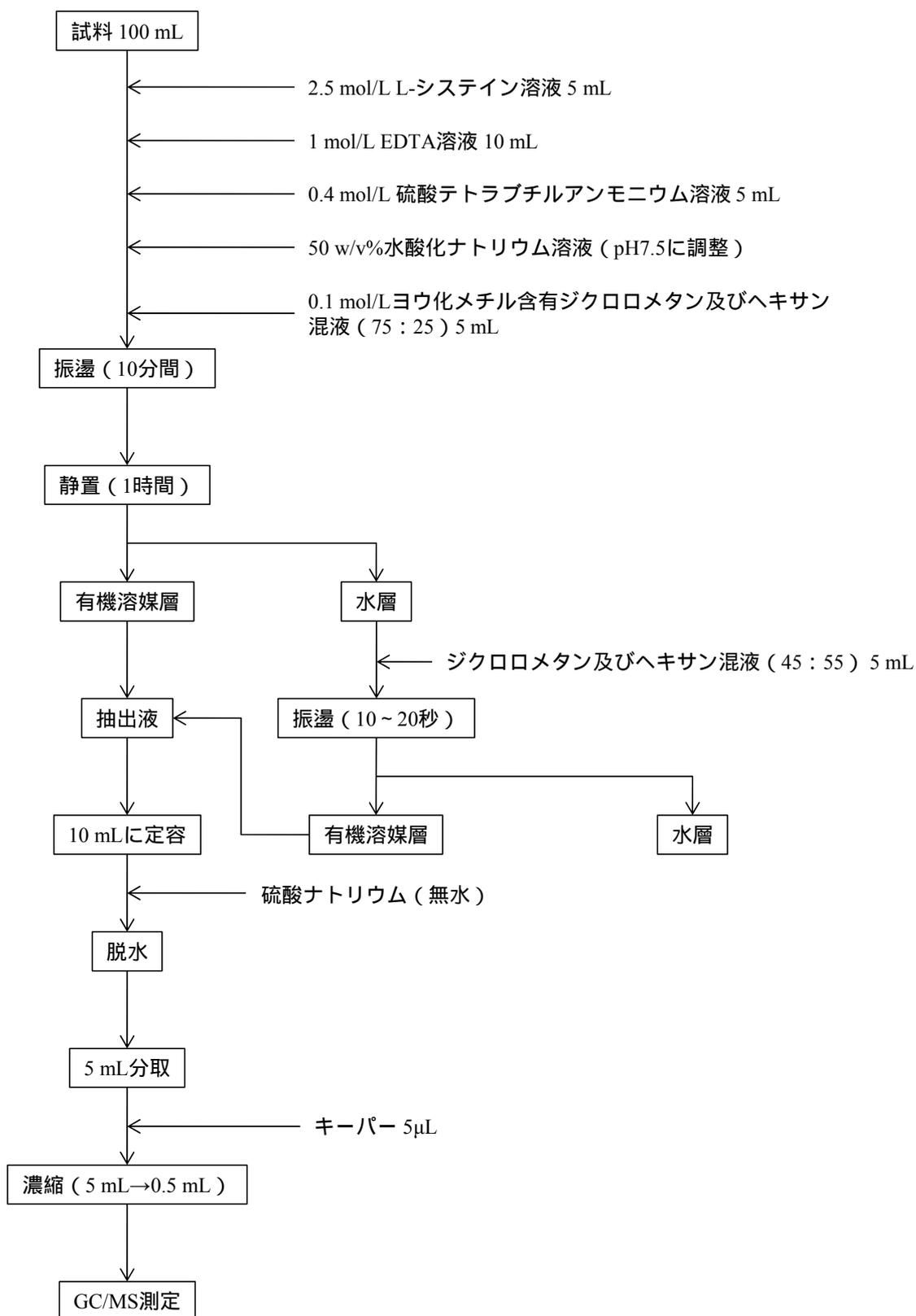


図 1. 分析方法の概略

5. 分析条件の最適化

5-1. GC カラムの検討

誘導体化物の分離カラムは微極性及び高極性カラムの2種類を検討した。表9に検討に用いたキャピラリーカラムを示した。また、GC/MSの測定条件を表10に示した。

表9. 検討したキャピラリーカラム

極性	名称	規格	液相
微極性	DB-5ms (アジレント)	30m×0.25mm×0.25μm	95%ポリメチルシリルシロキサン
高極性	VF-23ms (アジレント)	30m×0.25mm×0.25μm	高シアノプロピルフェニルジメチルポリシロキサン

表10. GC/MS 測定条件

GC 装置条件			
機種	7890N (アジレント)		
注入口温度	200		
昇温条件	60 (5min)	20 /min	130 (0min)
		30 /min	250 (5min)
注入量	2 μL		
MS 装置条件			
機種	JMS-Q1050GC (日本電子)		
イオン化室温度	230		
イオン化電圧	70 eV		
イオン化法	EI 法		
モニターイオン (m/z)	DMDC-Me : 135 (定量イオン), 88 (確認イオン) EBDC-Me : 114 (定量イオン), 72 (確認イオン) PBDC-Me : 158 (定量イオン), 86 (確認イオン) アントラセン-d ₁₀ (内部標準物質): 188		

5-2. 窒素吹き付けによる濃縮の検討

誘導体化物が抽出液を濃縮した時に揮散し、回収率が低下する可能性が考えられた。これはポリエチレングリコールをキーパーとして添加することで防ぐことが可能であると考えられた。そこで、本分析に最適なキーパーの検討を行った。キーパーとして、表11に示した物質を検討した。

DMDC-Me、EBDC-Me及びPBDC-Me各0.005 mg/L混合標準溶液10 mLに対し、1000 mg/Lに調製したキーパーのアセトン溶液を10 μL添加した。窒素ガスを毎分2Lの流量で吹き付け、ドライヤーの冷風を当てながら10倍まで濃縮した。濃縮後、シリンジスパイクとして4-クロロフェニル-フェニル-d₅-エーテルを一定量添加し、GC/MSで分析した。

表 11. 検討したキーパー

化合物名	分子量 (M)
ジエチレングリコール	106.12
トリエチレングリコール	150.17
テトラエチレングリコール	194.23
ポリエチレングリコール 200	180~220 (平均)
ポリエチレングリコール 300	300 (平均)
ポリエチレングリコール 400	360~400 (平均)
ポリエチレングリコール 600	560~640 (平均)

5-3. 誘導体化率の検討

チウラム，ポリカーバメート，マンゼブ，マンネブ，ジラム，ジネブ及びポリカーバメートを添加した試料をヨウ化メチルで誘導体化し，各誘導体化物を定量して各農薬の誘導体化率を調べた。試料は精製水，水道水及び河川水 100 mL とし，各農薬は 0.01mg/L になるように添加した。定量は各誘導体化物の標準溶液を用いて検量線を作製して行った。誘導体化率は DMDC-Me，EBDC-Me 及び PBDC-Me の生成量を理論値（表 8）と比較して算出した。

5-4. アルカリ分解の検討

ポリカーバメートの標準検査法では誘導体化の前にアルカリ分解を行うことになっている（厚生労働省，2003）。しかし，マンネブとマンゼブは pH9 での加水分解半減期がそれぞれ 18 時間と 15.9 時間になっており（社団法人日本植物防疫協会，2011），非常に不安定であることが考えられた。そこで EBDC-Me が生成されるマンネブ，マンゼブ，ジネブ及びポリカーバメートについて，水道水を試料として pH9，10 および 11 でアルカリ分解を行った後，5-3 と同様に操作し，誘導体化率からアルカリ分解に最適な pH を調べた。また，7 種類の農薬について，得られた最適 pH でアルカリ分解した場合と，アルカリ分解なしの場合で誘導体化率を比較し，アルカリ分解の有効性を調べた。

5-5. 分析精度の確認

最適化された分析方法の精度を確認するために，実試料に各農薬を目標値の 1/10 または 1/100 になるように添加し，真度と併行精度を求めた（厚生労働省，2012）。実試料は当所に給水されている水道水と淀川河川水を使用した。プロピネブの目標値は現在設定されていないため，ADI (0.007 mg/kg-body weight/day) (国立医薬品食品衛生研究所，2014) を用いて，体重 50 kg の人が一日 2 L 水道水を飲むとし，水道水の寄与率 10% として算出された 0.02 mg/L とした。

検量線作成用の標準系列は水道水または河川水に標準溶液を段階的に添加し，試験試料と同様に操作したものを使用した。

C. 研究結果及び考察

1-1. モニターイオン

誘導体化物の標準溶液を GC/MS 測定した時のマススペクトルを図 2 に示した。DMDC-Me からは $m/z = 88, 135$, EBDC-Me からは $m/z = 72, 144$, PBDC-Me からは $m/z = 86, 158$ のイオンが強く確認された。それぞれ m/z の大きい方から定量イオン、確認イオンをとした。

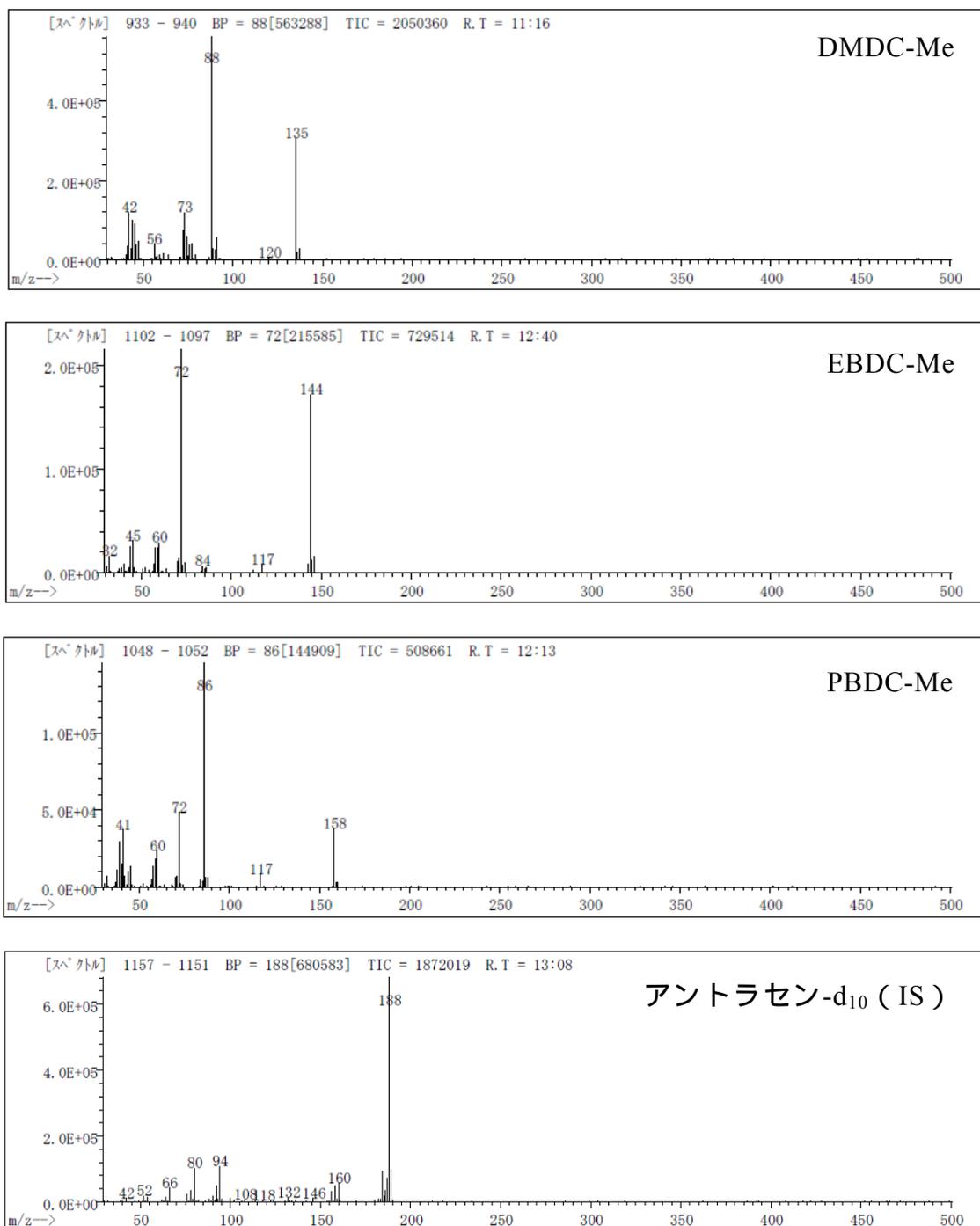
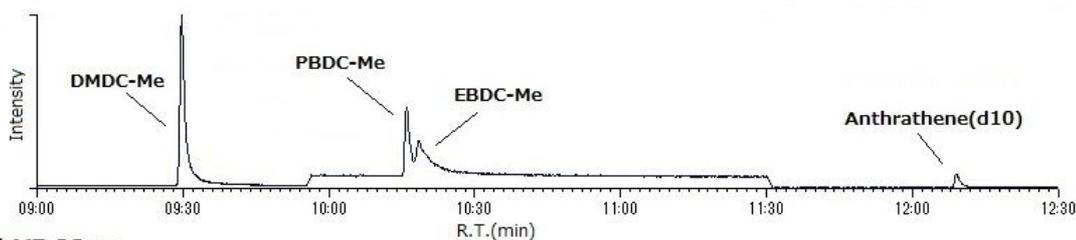


図 2. 各誘導体化物のマススペクトル

1-2. 分析カラム

図 3 に 2 種類のキャピラリーカラムを用いた場合のクロマトグラムを示した。微極性カラムである DB-5ms では、DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me 全般にピークがブロードであり、EBDC-Me 及び PBDC-Me の保持時間が近く完全に分離しなかった。一方、高極性カラムである VF-23ms では、ピーク形状及び分離も良好であった。以上のことから、高極性カラム (VF-23ms) が適すると考えられた。

(1) DB-5ms



(2) VF-23ms

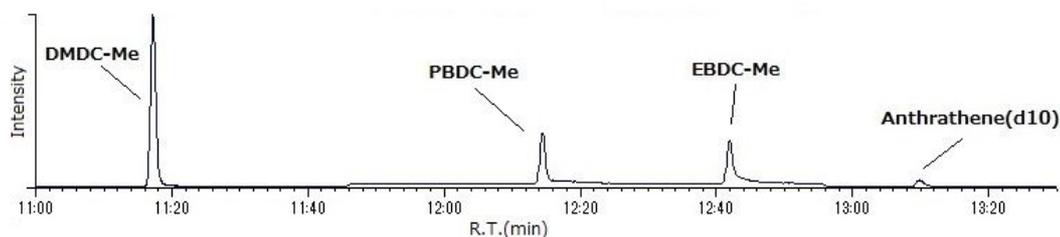


図 3. クロマトグラム (SIM)

上段：DB-5MS，下段：VF-23MS，濃度：0.05 mg/L

1-2. キーパーの検討

キーパーを添加せずに 10 倍濃縮すると残存率は DMDC-Me で約 90%であったが、EBDC-Me で約 40%、PBDC-Me で約 60%であり、そのまま濃縮した場合、2 種類の誘導体化物は揮散することが明らかとなった (図 4)。一方、キーパーを添加した場合には、全ての誘導体化物で残存率は 80%以上あり、いずれのキーパーも揮散を防ぐ効果が認められた。検討したキーパーの中では、トリエチレングリコールを使用した場合、全ての誘導体化物で 90%以上残存し、一番効果が高かった。これらのことから、トリエチレングリコールをキーパーとして添加し、窒素吹き付けにより 10 倍濃縮するが可能であった。

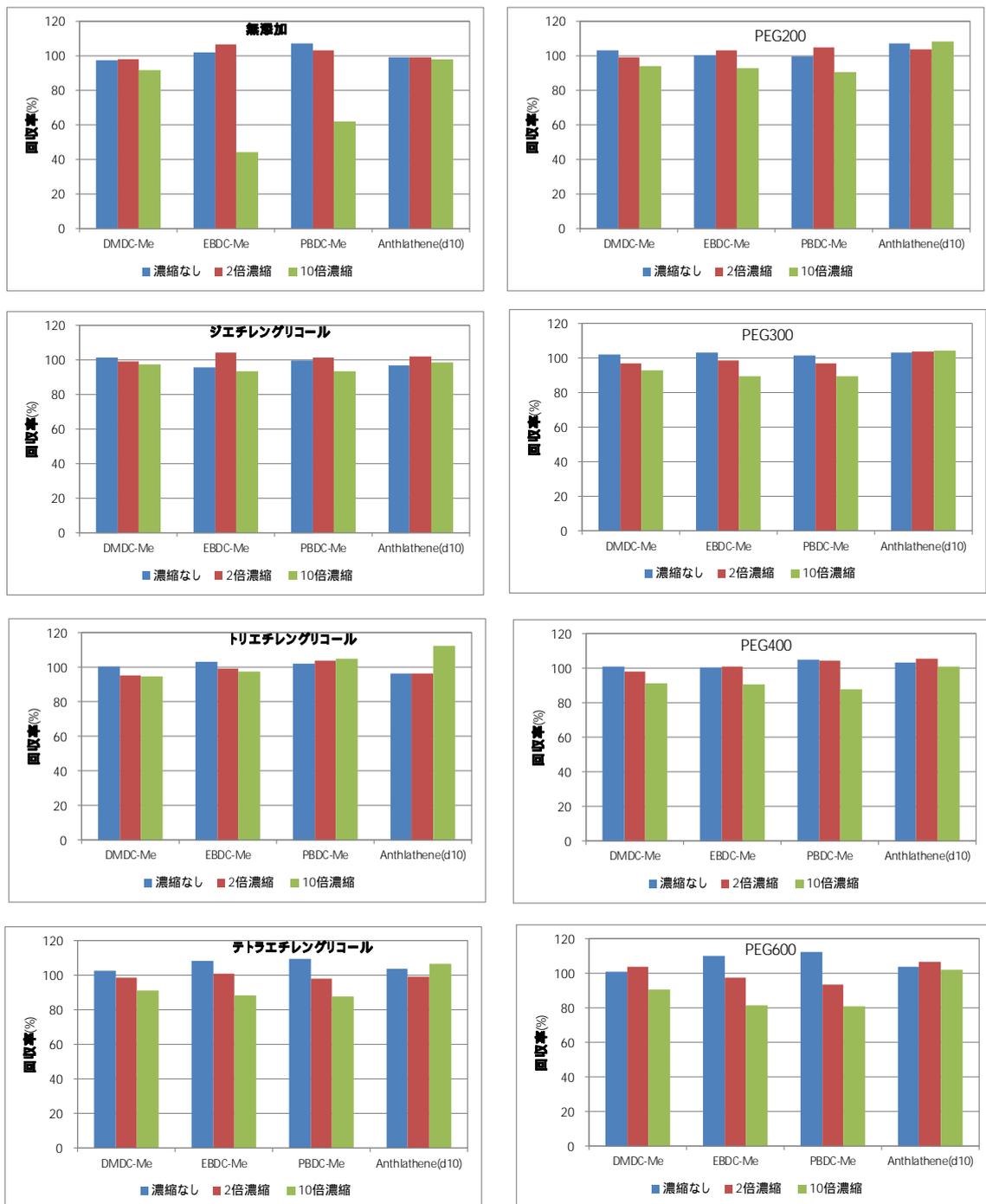


図 4. 窒素吹き付け濃縮におけるキーパーの効果

1-4. 誘導体化率

各農薬の誘導体化率を表 12 に示した。誘導体化率は 0.7 ~ 57.8% であり、全般に悪いことがわかった。特に、マンゼブとマンネブについては誘導体化率約 1% と非常に低い結果となった。このことから、検量線用の標準物質として市販の誘導体化体物を使用した場合、正確な定量値が求められないことがわかった。したがっ

て、水試料に農薬標準液を段階的に添加し、試料同様に前処理したものを検量線作成用の標準系列とする必要があることがわかった。

また、ポリカーバメート及びジラムでは、精製水に添加したものは、水道水及び河川水に添加したものに比べて非常に悪い誘導体化率であった。水道水と河川水では同等の誘導体化率であることから有機物の影響ではなく、イオン成分の影響が考えられた。ジチオカルバメート系農薬は、有機層に抽出するために、イオンペア試薬（硫酸水素テトラブチルアンモニウム）を添加する。イオン成分はこの抽出段階に影響するものと推察された。このことから、検量線作成に用いる水には、精製水ではなく、水道水が適することがわかった。

表 12. 各農薬の誘導体化率

農 薬 名	誘導体化物	誘導体化率（％）		
		精製水	水道水	河川水
ジネブ	EBDC-Me	22.1	14.6	22.1
ジラム	DMDC-Me	7.3	57.3	49.5
チウラム	DMDC-Me	33.9	42.0	51.6
ポリカーバメート	DMDC-Me	5.4	51.4	41.8
	EBDC-Me	51.2	53.0	44.2
プロピネブ	PBDC-Me	45.5	27.8	39.9
マンゼブ	EBDC-Me	0.7	0.8	1.3
マンネブ	EBDC-Me	0.7	0.8	1.1

(n = 3)

1-5. アルカリ分解の検討

pH9, 10 及び 11 でアルカリ分解を行った場合の誘導体化率を表 13 に示した。誘導体化率は 16.2~27.7%であり、検討した pH のうち、マンゼブ、マンネブ及びジネブでは pH10 が最も適していた。以上のことから、アルカリ分解の最適 pH は 10 とした。

表 13. アルカリ分解を行った場合の誘導体化率

農 薬 名	誘導体化率（％）		
	pH9	pH10	pH11
ジネブ	17.7±1.2	18.5±0.4	16.2±1.7
ポリカーバメート*	27.1±1.6	27.7±0.7	17.4±15.1
マンゼブ	16.3±0.6	17.5±2.1	16.4±2.0
マンネブ	17.3±0.2	20.4±2.4	17.1±1.4

平均値±標準偏差 (n=3)

* : EBDC-Me で算出

pH10でアルカリ分解した時とアルカリ分解しなかった時の誘導体化率の違いを表14に示した。ジラムはアルカリ分解をした方が高い誘導体化率が得られたが、他の農薬ではアルカリ分解を行わない方が誘導体化率は高かった。アルカリ分解は金属部分で分子を加水分解するために行うが、ジラム以外の農薬では、それ以上の分解が生じると考えられた。水質試料を一斉分析する場合、アルカリ分解はしない方がよいことがわかった。

表 14. アルカリ分解の有無による誘導体化率の違い

アルカリ分解	誘導体化率 (%)					
	DMDC-Me		EBDC-Me		PBDC-Me	
	有	無	有	無	有	無
ジネブ			19.7±0.8	40.8±0.3		
ジラム	100.0±4.7	35.2±1.6				
チウラム	57.0±1.5	90.0±2.9				
プロピネブ					33.7±3.4	53.7±7.7
ポリカーバメート	32.4±1.5	68.2±1.5	41.5±1.4	48.4±1.9		
マンゼブ			9.4±0.1	13.5±0.1		
マンネブ			9.5±0.3	14.8±0.4		

平均値±標準偏差 (n=3)

1-6. 分析精度の確認

水道水及び河川水に目標値の 1/100 及び 1/10 になるように農薬を添加した時の妥当性評価の結果をそれぞれ表 15, 16 に示した。

目標値の 1/10 を添加した場合、妥当性試験のガイドライン(厚生労働省, 2012)に示された目標である『真度: 70~120(%), 併行精度(RSD%): <25』で評価すると、すべての農薬で基準を満たし、精度よく定量できることがわかった。

しかし、目標値の 1/100 を添加した場合、妥当性試験ガイドラインに示された精度の目標である『真度: 70~120(%), 併行精度(RSD%): <30』で評価すると、プロピネブ以外は目標を満たせず、本分析方法である誘導体化-GC/MS 法では目標値の 1/100 を精度よく定量することはできなかった。

表 15. 妥当性評価の結果（目標値の 1/10）

農 薬 名	添加濃度 (mg/L)	水道水		河川水	
		真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
ジネブ	0.001	111.5	13.0	116.3	18.0
ジラム	0.001	81.9	21.4	96.8	9.31
チウラム	0.002	101.8	19.2	105.1	13.4
プロピネブ	0.002	103.2	9.5	108.8	2.4
ポリカーバメート	0.003	114.7	18.5	103.8	18.0
マンゼブ	0.002	92.5	6.6	100.3	11.6
マンネブ	0.001	71.8	8.9	91.0	19.1

(n=5)

表 16. 妥当性評価の結果（目標値の 1/100）

農 薬 名	添加濃度 (mg/L)	水道水		河川水	
		真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
ジネブ	0.0001	56.1	33.7	98.0	20.5
ジラム	0.0001	124.3	74.7	96.4	148.5
チウラム	0.0002	150.9	66.5	72.8	35.0
プロピネブ	0.0002	80.7	12.3	107.4	24.0
ポリカーバメート	0.0003	102.1	108.9	11.3	667.2
マンゼブ	0.0002	96.5	36.3	107.0	30.4
マンネブ	0.0001	106.1	50.9	127.8	16.1

(n=5)

1-7. 目標値への換算

本分析法は複数の農薬から同一の誘導体化物が生成されるため、誘導体化物から各農薬を区別することはできない。しかし、3つのグループ（DMDC-Meグループ：ジラム，チウラムおよびポリカーバメート，EBDC-Meグループ：ジネブ、ポリカーバメート，マンゼブ及びマンネブ，PBDC-Meグループ：プロピネブ）の区別することは可能である。したがって、定量値を評価はグループ毎に目標値の低い農薬に換算して評価することが安全であると考えられる。すなわち、DMDC-Meはジラムとして、EBDC-Meはマンネブ（ジネブと同じ目標値だが、マンネブの誘導体化率の方が低いため）、PBDC-Meはプロピネブとして定量し、評価することを提案する。

また、水道におけるジチオカーバメート系農薬の目標値は二硫化炭素（CS₂）として設定されているため、得られた定量値をCS₂に換算するためには次のように行う。まずジラム，マンネブ及びプロピネブの濃度を次の式から誘導体化物の濃

度に換算する。

$$\begin{aligned} \text{DMDC-Me (mg/L)} &= \text{ジラム (mg/L)} \times 0.88 \\ \text{EBDC-Me (mg/L)} &= \text{マンネブ (mg/L)} \times 0.94 \\ \text{PBDC-Me (mg/L)} &= \text{プロピネブ (mg/L)} \times 0.88 \end{aligned}$$

そして、誘導体化物の濃度から次の式を用いて CS₂ 濃度に換算する。

$$\text{CS}_2 \text{ (mg/L)} = \text{DMDC-Me (mg/L)} \times 0.56 + \text{EBDC-Me (mg/L)} \times 0.63 + \text{PBDC-Me (mg/L)} \times 0.60$$

D. 結論

ジチオカルバメート系農薬の分析に溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法による一斉分析が適用できるか検討した。前処理条件の検討の結果、キーパーとしてトリエチレングリコールを添加すると、窒素吹き付けにより 10 倍濃縮できることがわかった。また、アルカリ分解を行わない方が、誘導体化率が高いことがわかった。水道水及び河川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、農薬ごとに 5 回の繰り返し試験を実施したところ、ジネブ、ジラム、チウラム、ポリカーバメート、マンゼブ及びマンネブにおいては、目標値の 1/10 に相当する濃度で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 (< 25%) が得られた。プロピネブにおいては、目標値の 1/100 に相当する濃度で回収率 (70 ~ 120%) と併行精度 (< 30%) の目標を満たす結果が得られた。

本法で測定する DMDC-Me は目標値の最も小さいジラム、EBDC-Me はマンネブ、PBDC-Me はプロピネブとして定量し、換算式でジチオカルバメート系農薬の CS₂ としての濃度を算出することができた。

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

社団法人日本植物防疫協会 (2011) 農薬ハンドブック 2011 年版 .

厚生労働省健康局水道課 (2003) 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並びに水道水質管理における留意事項について . 別添 4 健水発第 1010001 号 (平成 15 年 10 月 10 日) .

厚生労働省健康局水道課長 (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 . 健水発 0906 第 1 号 (平成 24 年 9 月 6 日) .

国立医薬品食品衛生研究所データベース (2014) .

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。

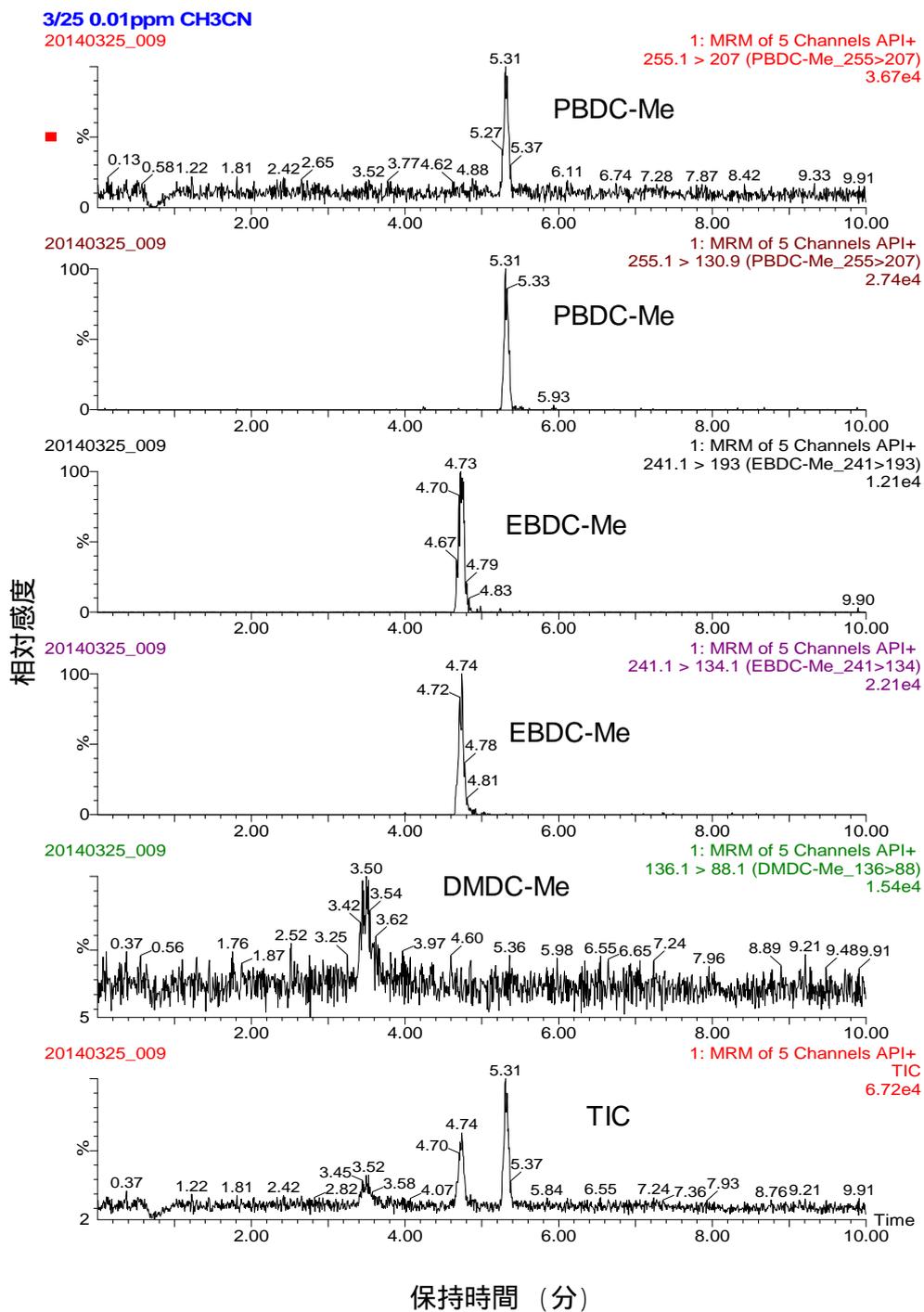


図1. DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の LC/MS/MS クロマトグラム
イオン化法：APCI+、濃度：0.01 mg/L

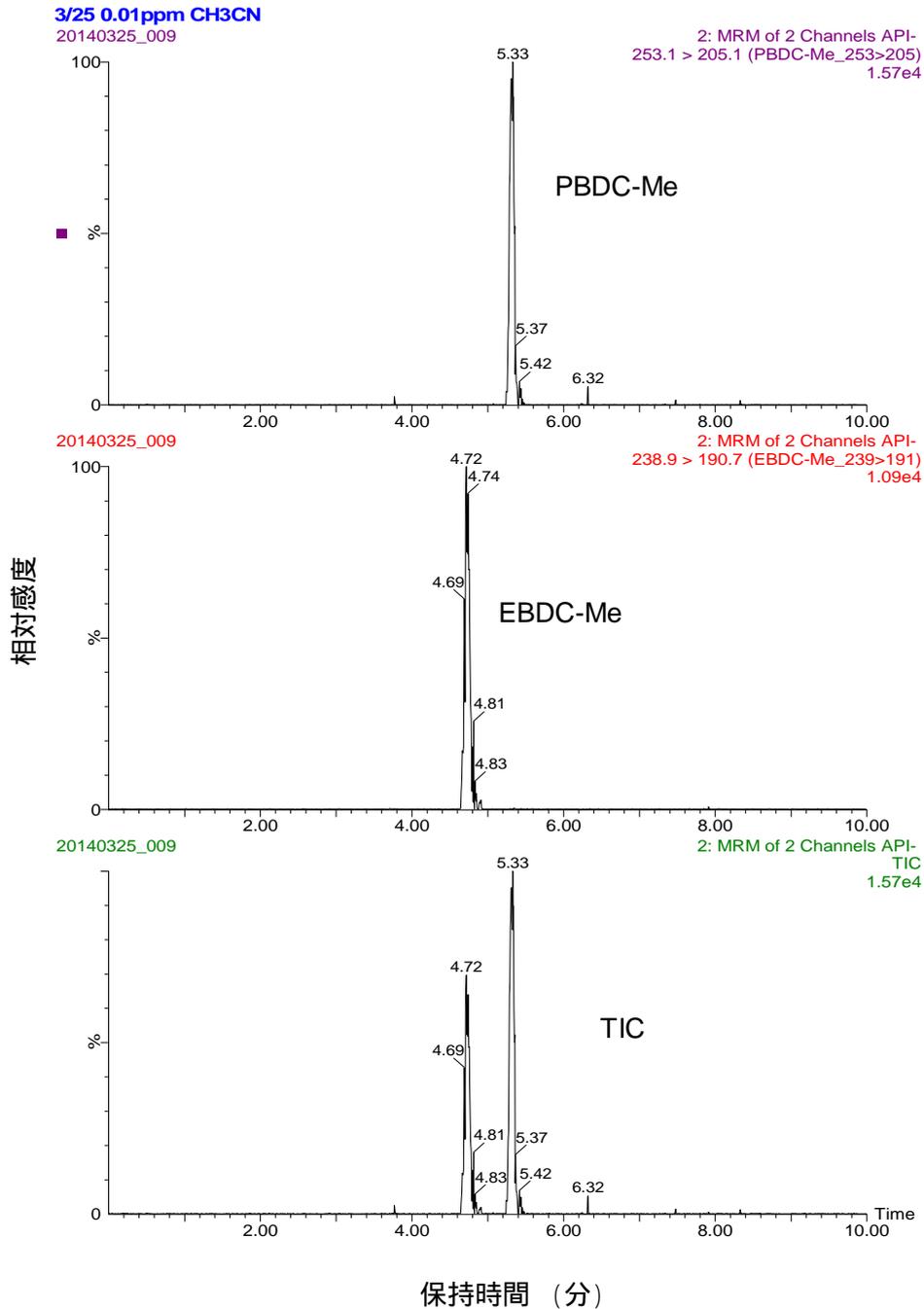


図2. DMDC-Me、EBDC-Me 及び PBDC-Me の LC/MS/MS クロマトグラム
イオン化法：APCI-、濃度：0.01 mg/L

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。

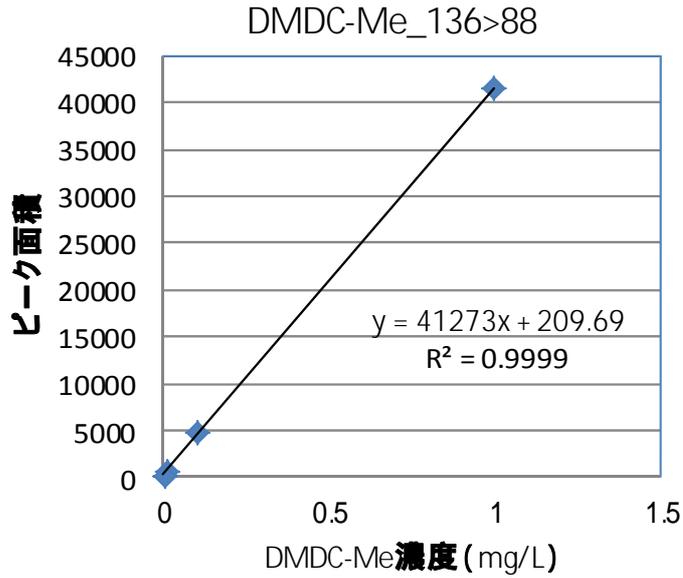


図3. DMDC-Meの検量線
(濃度範囲: 0.005-1 mg/L)

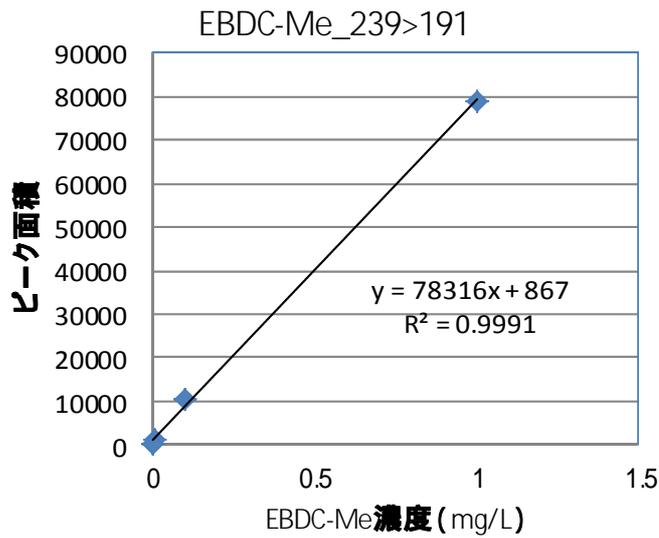


図4. EBDC-Meの検量線
(濃度範囲: 0.001-1 mg/L)

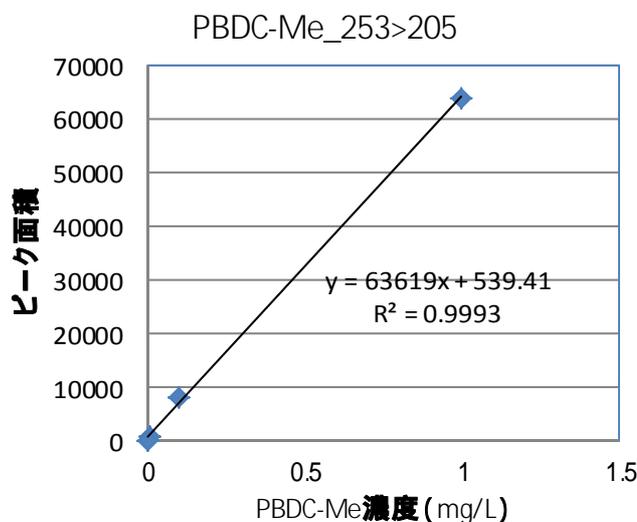


図5. PBDC-Me の検量線
(濃度範囲：0.001-1 mg/L)

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/hourei/jimuren/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 .

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

ダゾメット，メタム（カーバム）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
	古川浩司	一般財団法人	三重県環境保全事業団
	阿部晃文	川崎市上下水道局	水管理センター 水道水質課

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ダゾメットおよびメタム（カーバム）の分析法を開発することを目的とした。

ダゾメットおよびメタムはいずれも、水と反応して速やかにメチルイソチオシアネート（MITC）に分解することが知られている。そこで本研究では、ダゾメットおよびメタムを MITC に分解した後、パージ・トラップ（PT）-GC/MS により MITC の濃度を測定し、測定値をダゾメットあるいはメタムの濃度に換算する方法を検討した。

前処理条件の検討の結果、80 の恒温槽で 60 分間の加熱が最適であると判断した。また、PT-GC/MS 測定条件の検討の結果、ダゾメットおよびメタムの目標値の 1/100 に相当する濃度よりも低い MITC 濃度（0.02 $\mu\text{g/L}$ ）の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに、分析法の妥当性を評価するため、ダゾメットおよびメタムを各目標値の 1/100 の濃度（それぞれ 0.06 および 0.05 $\mu\text{g/L}$ ）となるように水道水に添加した試料を用いて 5 回の繰り返し試験をそれぞれ 2 回実施したところ、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（<30%）が得られた。なお、MITC の検量線の直線性が確保できる濃度範囲は、0.02～0.5 $\mu\text{g/L}$ であると評価した。

以上のことから、水道水中のダゾメットおよびメタム（カーバム）の分析については、加熱分解して生成した MITC を PT-GC/MS により測定することで、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ダゾメットおよびメタム（カーバム）の分析法を開発することを目的とした。

ダゾメットおよびメタムはいずれも、水と反応して速やかにメチルイソチオシアネート（MITC）に分解することが知られている。そこで本研究では、ダゾメットおよびメタムを MITC に分解した後、パージ・トラップ (PT)-GC/MS により MITC の濃度を測定し、測定値をダゾメットあるいはメタムの濃度に換算する方法を検討した。

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

本研究の対象物質であるダゾメットおよびメタム（カーバム）、およびその共通の分解物であるメチルイソチオシアネート（MITC）の基本的情報を以下に示す。

ダゾメットおよびメタムにはそれぞれ個別の目標値が定められているが、MITC には定められていない。そこで、水道水質検査においては MITC の測定値をダゾメットあるいはメタムの濃度に換算して評価する必要がある。

1.1. ダゾメット

用途：殺菌剤，防かび剤，防汚剤，殺虫剤，防虫剤，除草剤など

分子式： $C_5H_{10}N_2S_2$

分子量：162.3

目標値：6 $\mu\text{g/L}$

備考：速やかにメチルイソチオシアネートに分解する。

1.2. メタム

使用用途：土壌中の病原菌，害虫，線虫及び雑草種子など

分子式： $C_2H_4NNaS_2$

分子量：129.18

目標値：10 $\mu\text{g/L}$

備考：速やかにメチルイソチオシアネートに分解する。

1.3. メチルイソチオシアネート（MITC）

使用用途：土壌中の病原菌，害虫，線虫および雑草種子など
(土壌中で気化・ガス体となって拡散する)。

分子式： C_2H_3NS

分子量：73.1

2. 標準品・試薬

(1) 精製水

(2) メタノール

関東化学(株)製の残留農薬試験用(5000倍)の規格品を使用した。

(3) アセトン

和光純薬(株)製の残留農薬試験用(5000倍)の規格品を使用した。

(4) 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。

(5) メチルイソチオシアネート標準品

和光純薬(株)製の残留農薬試験用の規格品を使用した。

(6) ダゾメット標準品

GmbH 社製の製品を使用した。

(7) メタム標準品

Fluka 社製の製品を使用した。

(8) フルオロベンゼン標準品

関東化学(株)製の内部標準混合原液(1 mg/mL)を使用した。
(フルオロベンゼン及び4-ブロモフルオロベンゼンを含む)

3. 標準液の調整

3.1. 内部標準液の調製

内部標準原液(フルオロベンゼン 1000 mg/L) 1 mL をホールピペットで 10 mL メスフラスコに採取し、メタノールで定容した(100 mg/L)。この 1 mL をホールピペットで 25 mL のメスフラスコに採取し、メタノールで定容した(この溶液を内部標準液 A とする)。内部標準液 A には、フルオロベンゼンを 4 mg/L 含む。

内部標準液 A の 1 mL をホールピペットで 10 mL のメスフラスコに採取し、メタノールで定容した(この溶液を内部標準液 B とする)。内部標準液 B には、フルオロベンゼンを 0.4 mg/L 含む。

3.2. 検量線用標準液の調製

MITC 標準品 100 mg を秤量して 100 mL メスフラスコに採り、メタノールで定容して MITC 標準原液を調製した(1000 mg/L)。これをメタノールで順次希釈し、0.1~2.5 mg/L の濃度範囲の検量線用標準液を調製した(図 1)。

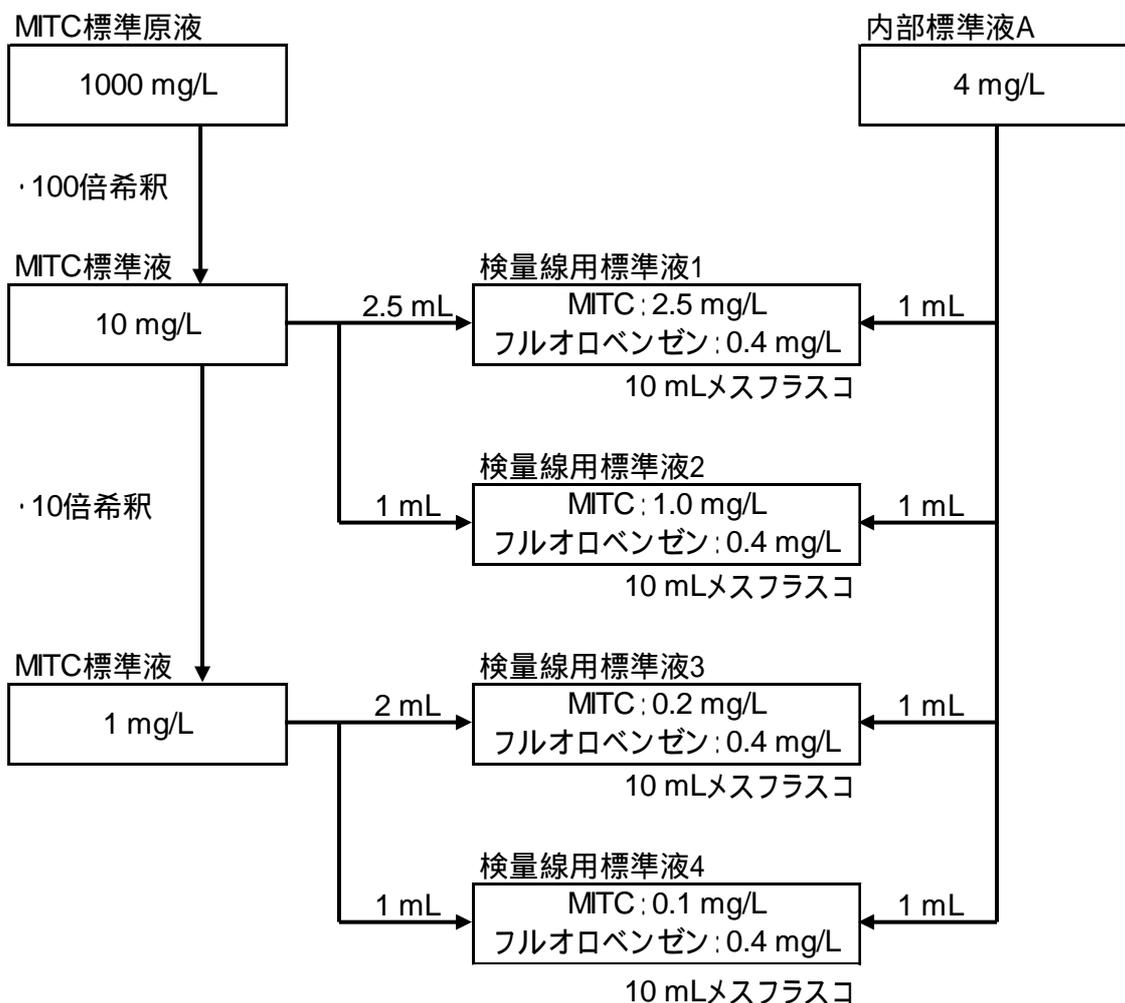


図 1. 検量線用 MITC 標準液の調整フロー

3.3. 添加回収試験用標準液の調製

ダゾメット標準品の 10 mg を秤量して 100 mL メスフラスコに採り，アセトンで定容してダゾメット標準原液を調製した(100 mg/L)。メタム標準品の 10 mg を秤量して 100 mL メスフラスコに採り，精製水で定容してメタム標準原液を調製した(100 mg/L)。これらの標準原液を適宜希釈して試験に用いた。なお，メタムについては，メタノールで調製すると回収率が低下する現象がみられたため，メタノール中では速やかに分解すると考えられる。

4. 分析条件の最適化

ダゾメットおよびメタムの熱分解による MITC への変換の最適時間を検討するため，ダゾメットおよびメタムを一定濃度添加した精製水を 80 の恒温槽で 0～120 分の範囲で加熱し，PT-GC/MS による MITC の測定強度の違いについて検討した。

また，PT-GC/MS による MITC 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

ダゾメット添加試料は、0.01 mg/L のダゾメット標準液 3 mL を 500 mL メスフラスコに採り、脱塩素処理をした水道水（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）で 500 mL にメスアップして調製した。この添加試料は、ダゾメットを目標値の 1/100 の濃度である 0.06 µg/L 含む。

メタム添加試料は、0.01 mg/L の濃度の標準液の 2.5 mL を 500 mL メスフラスコに採り、脱塩素処理をした水道水（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）で 500 mL にメスアップして調製した。この添加試料は、メタムを目標値の 1/200 の濃度である 0.05 µg/L 含む。

なお、上記の試料調製には、三重県津市河芸町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、パージ&トラップ装置用のねじ口瓶に水道水を満水となるように採り、内部標準液 B をマイクロシリンジで 8.6 µL 添加して密栓した。次に、ねじ口瓶を予め 80 °C に加熱した恒温槽に入れ、1 時間加熱した後、室温で 30 分静置したものを検査試料水とした。

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。

5.2. PT-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 PT-GC/MS 測定条件において測定を行い、MITC と内部標準物質のフルオロベンゼ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 MITC 濃度を求めた。

ここから空試験の MITC 濃度を差し引いた後で、ダゾメットに換算する場合は 2.22 を、メタムに換算する場合は 1.77 を乗じて、検査試料水中のダゾメットあるいはメタムの濃度を算出し、添加濃度に対する割合を回収率とした。

5.3. 検量線の作成

パージ&トラップ装置用のねじ口瓶に精製水を満水となるように採り、3.2 で調製した検量線用標準液 1~4 をマイクロシリンジでそれぞれ 8.6 µL ずつ添加した。この時、各ねじ口瓶中の MITC 濃度はそれぞれ 0.5, 0.2, 0.04, 0.02 µg/L となる。これを、検査試料水と同様の条件で PT-GC/MS 測定を行い、MITC とフルオロベンゼ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. 加熱時間の最適化

80 の恒温槽での加熱時間に対する MITC の測定強度を図 2 に示した。ダゾメット、メタム添加時ともに、加熱時間が長くなるにつれ強度が増加する傾向が見られたが、60 分以降ではほぼ一定となった。長時間加熱を続けた場合、MITC の分解のおそれがあることから、60 分の加熱時間が最適であると判断した。

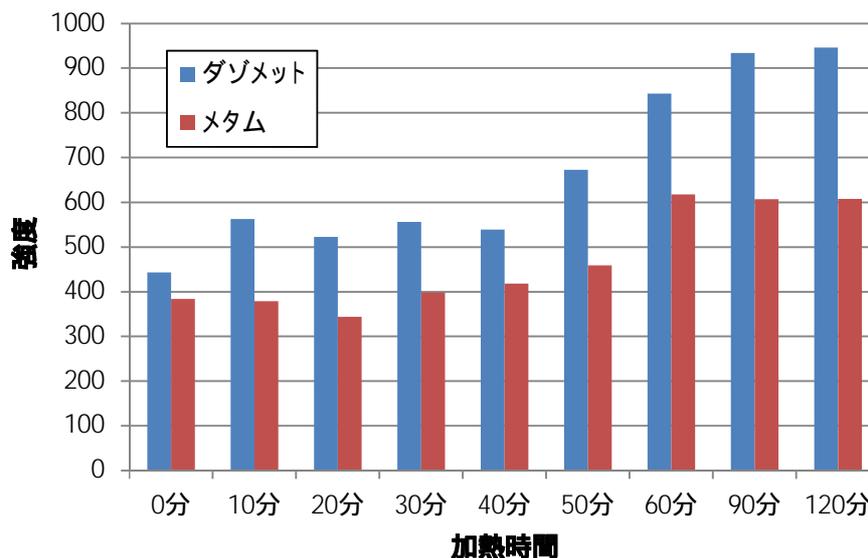


図 2. 加熱時間と MITC の強度との関係

1.2. PT-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 PT-GC/MS の分析条件を表 1 に示す。また、検量線の最低濃度であり、定量下限値付近である $0.02 \mu\text{g/L}$ の濃度の MITC 標準液を PT-GC/MS で測定したクロマトグラムを図 3 に示す。SN 比に問題はなく、妨害ピーク等もみられなかった。また、5 回の繰り返し測定における併行精度 (RSD_r) は 4.14% と良好な結果が得られた。

表 1. PT-GC/MS 測定条件

PT 装置条件	
機種	4000J (ジーエルサイエンス)
サンプル量	20 mL
トラップ管	Tenax
パージガス	He
パージ時間	11 min
ライン温度	150
トラップ管加熱温度	225
GC/MS 装置条件	
機種	5973iGC/MS (アジレント)
カラム	AQUATIC-2(60 m×0.25 mm×1.40 μm ,ジーエルサイエンス)
昇温条件	40 (15min) 15 /min 140 20 /min 250 (8min)
AUX 温度	250
イオン化法	EI 法
モニターイオン (m/z)	MITC : 73 (定量イオン), 72 (確認イオン) フルオロベンゼン (内部標準物質): 96

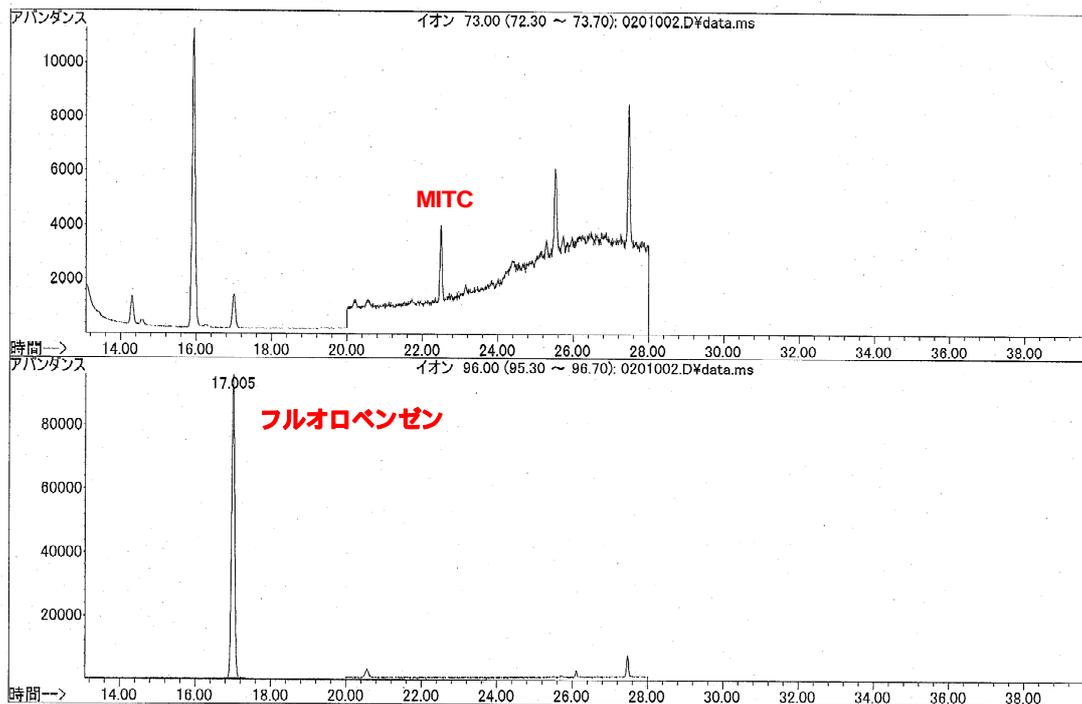


図 3. 定量下限値付近の濃度 (0.02 μg/L) の PT-GC/MS 測定クロマトグラム

2. 分析法の妥当性評価

2.1. 検量線の評価

MITC の濃度範囲が 0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$ である場合と 0.02 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ である場合の検量線をそれぞれ図 4 および図 5 に示す。MITC の濃度範囲が 0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$ の場合、重相関係数 (r^2) が 0.9997 であり、検量線の直線性が確保できた。一方、MITC の濃度範囲が 0.02 ~ 1 $\mu\text{g/L}$ の場合、 r^2 は 0.996 と高い値であったが、0.02 $\mu\text{g/L}$ の測定点が検量線から少し外れており、直線性が得られなかった。

以上のことから、MITC の検量線が高い直線性を得られる濃度範囲は、0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$ と判断し、この範囲内で MITC の測定を行うこととした。

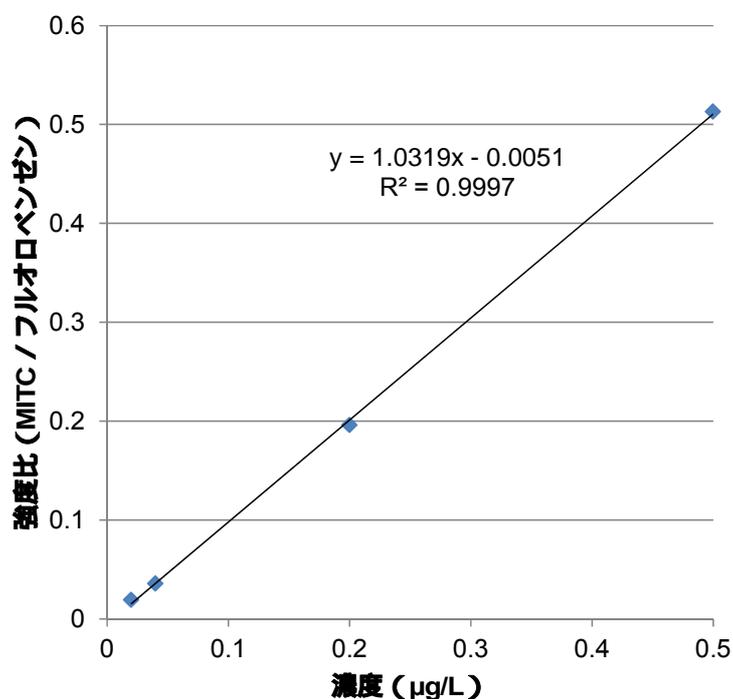


図 4. MITC の検量線 (濃度範囲 0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$)

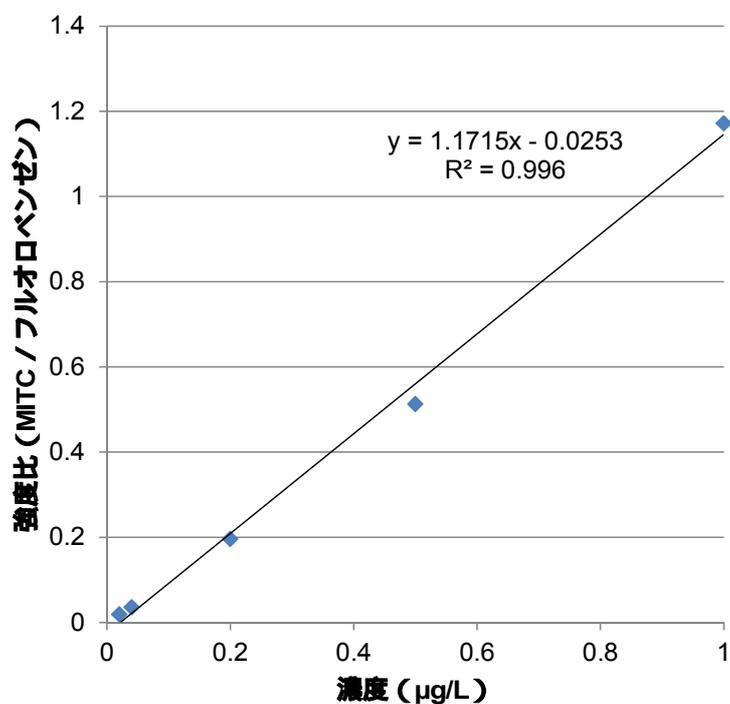


図 5. MITC の検量線 (濃度範囲 0.02 ~ 1 μg/L)

2.2. 水道水添加回収試験結果の評価

ダゾメットおよびメタムの水道水添加回収試験の結果をそれぞれ表 2 ~ 表 5 に示す。また、空試験、ダゾメット、およびメタムの添加回収試験における PT-GC/MS の測定クロマトグラムをそれぞれ図 6 ~ 図 8 に示す。

ダゾメット、メタムともに目標値の 1/100 以下の添加濃度において 5 回の繰り返し試験をそれぞれ 2 回実施したが、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 RSD_r (<30%) が得られた。

また、空試験において MITC のピークは検出されず (図 6)、ダゾメット、メタムの添加回収試験において夾雑成分の影響を受けていないことも確認できた (図 7 および図 8)。

表 2. ダゾメットの水道水添加回収試験結果 1

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
MITC 濃度 (μg/L)	0.032	0.037	0.031	0.031	0.031	0.032	
ダゾメット換算濃度(μg/L)	0.071	0.082	0.069	0.069	0.069	0.071	8.0
回収率 (%)	118.4	136.9	114.7	114.7	114.7	119.9	

表 3. ダゾメットの水道水添加回収試験結果 2

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
MITC 濃度 (μg/L)	0.025	0.023	0.023	0.023	0.024	0.024	
ダゾメット換算濃度(μg/L)	0.056	0.051	0.051	0.051	0.053	0.052	3.8
回収率 (%)	92.5	85.1	85.1	85.1	88.8	87.3	

表 4. メタムの水道水添加回収試験結果 1

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
MITC 濃度 (μg/L)	0.021	0.023	0.022	0.020	0.021	0.021	
メタム換算濃度 (μg/L)	0.037	0.041	0.039	0.035	0.037	0.038	5.3
回収率 (%)	74.3	81.4	77.9	70.8	74.3	75.8	

表 5. メタムの水道水添加回収試験結果 2

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均	RSD _r (%)
MITC 濃度 (μg/L)	0.026	0.023	0.027	0.025	0.025	0.025	
メタム換算濃度 (μg/L)	0.046	0.041	0.048	0.044	0.044	0.045	5.9
回収率 (%)	92.0	81.4	95.6	88.5	88.5	89.2	

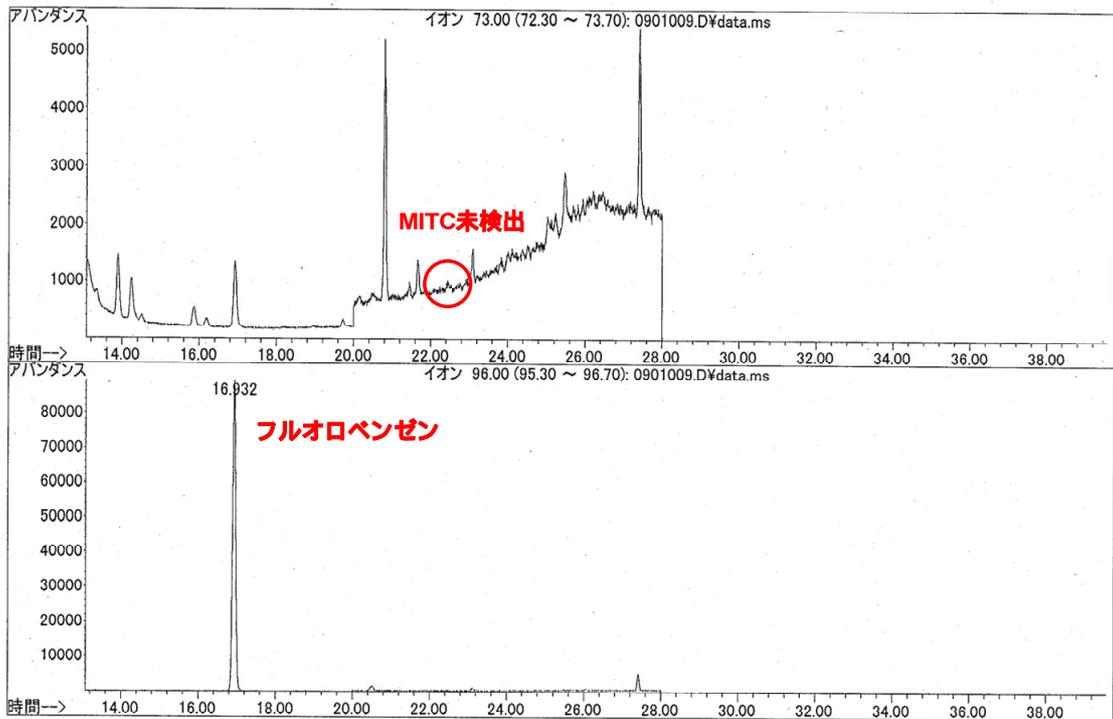


図 6. 空試験 (水道水) の PT-GC/MS 測定クロマトグラム

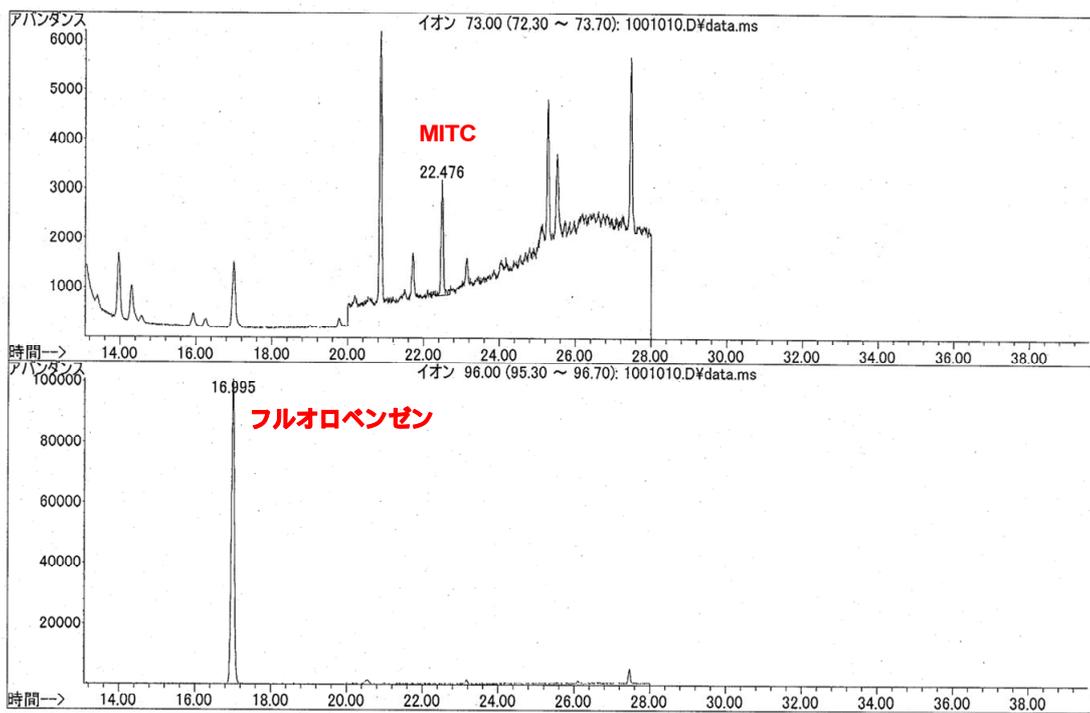


図 7. ダゾメットの水道水添加回収試験の PT-GC/MS 測定クロマトグラム

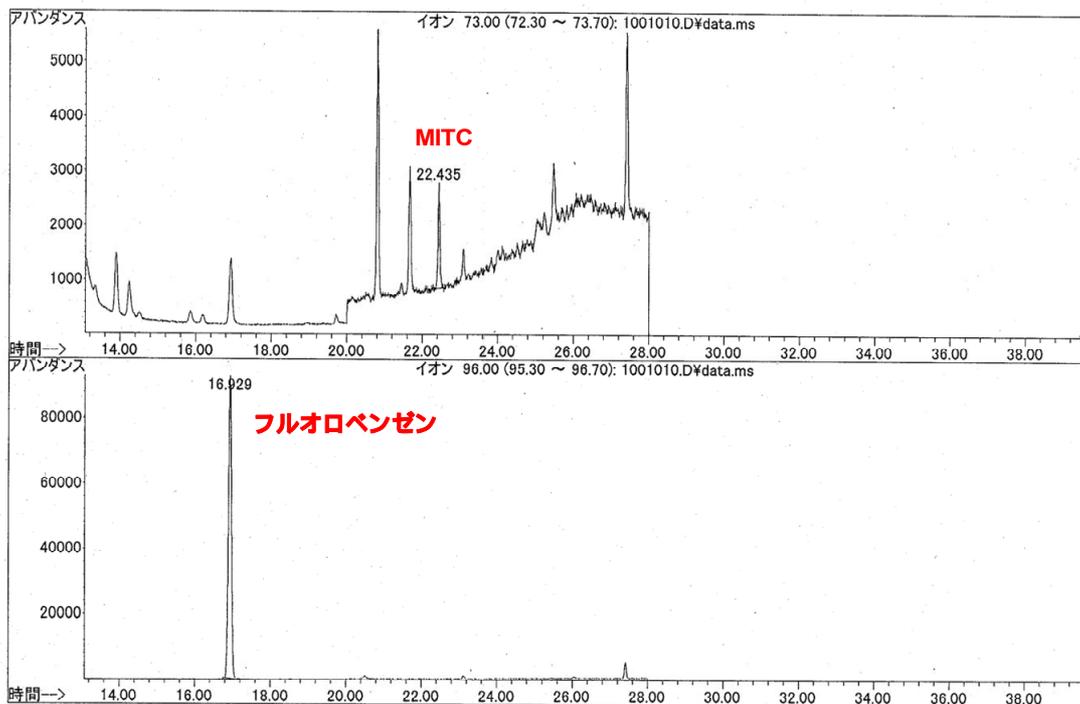


図 8. メタムの水道水添加回収試験の PT-GC/MS 測定クロマトグラム

D. 結論

ダゾメットおよびメタムを MITC に分解した後，パージ&トラップ (PT)-GC/MS により MITC の濃度を測定し，測定値をダゾメットあるいはメタムの濃度に換算する方法を検討した。

前処理条件の検討の結果，80 の恒温槽で 60 分間の加熱が最適であると判断した。また，PT-GC/MS 測定条件の検討の結果，ダゾメットおよびメタムの目標値の 1/100 に相当する濃度よりも低い MITC 濃度 (0.02 $\mu\text{g/L}$) の繰り返し測定における SN 比および併行精度は良好であった。

さらに，ダゾメットおよびメタムを目標値の 1/100 に相当する濃度を添加した試料を用いて 5 回の繰り返し試験をそれぞれ 2 回実施したところ，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 (<30%) が得られた。なお，MITC の検量線の直線性が確保できる濃度範囲は，0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$ であると評価した。

以上のことから，水道水中のダゾメットおよびメタム (カーバム) の分析については，加熱分解して生成した MITC を PT-GC/MS により測定することで，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

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>

野田寧：クロマトグラフィー/質量分析法による食用塩中の残留農薬等の分析法に関する研究．横浜国立大学，平成 22 年 9 月 30 日，博士(工学)，甲第 1308 号．

<http://hdl.handle.net/10131/7490>

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。

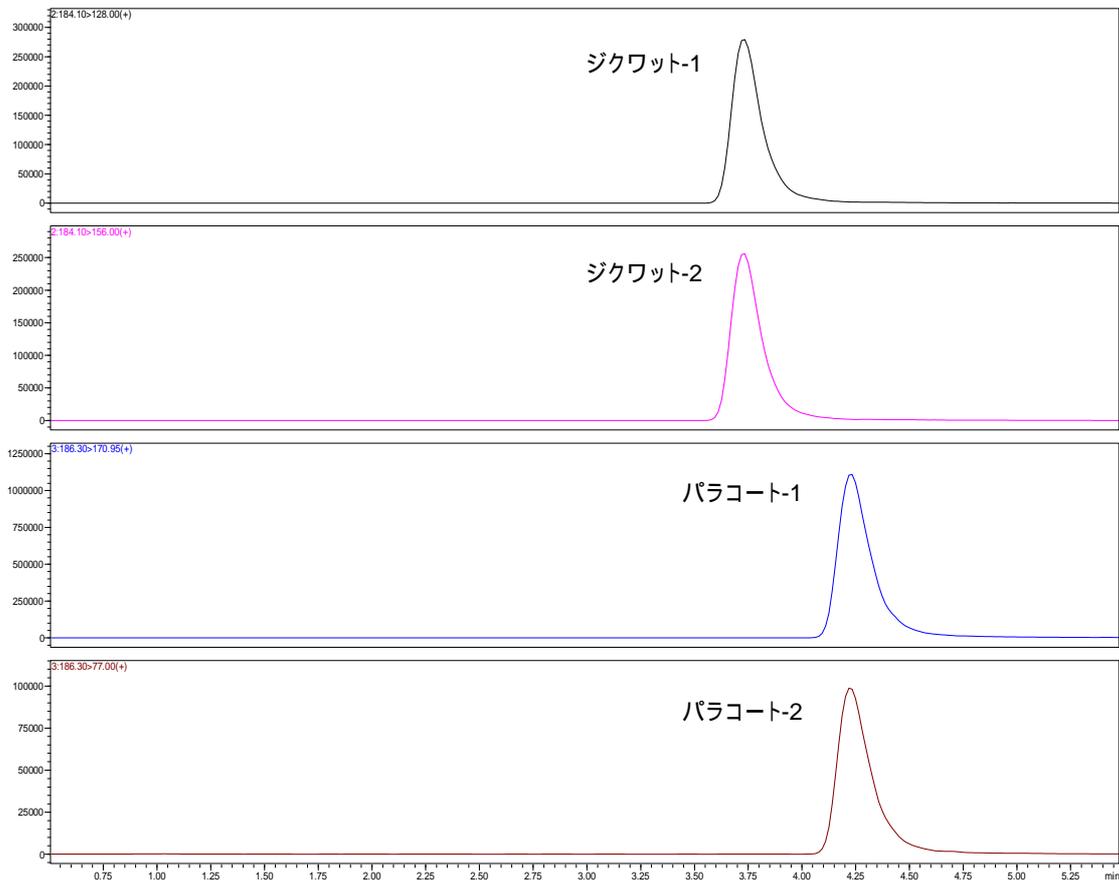


図1. ジクワットおよびパラコートのLC/MS/MS クロマトグラム

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、 $1 \sim 50 \mu\text{g/L}$ 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、 $1 \sim 10 \mu\text{g/L}$ 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、 $1 \sim 50 \mu\text{g/L}$ 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、 $1 \sim 10 \mu\text{g/L}$ の濃度範囲に限定した検量線を用いた。

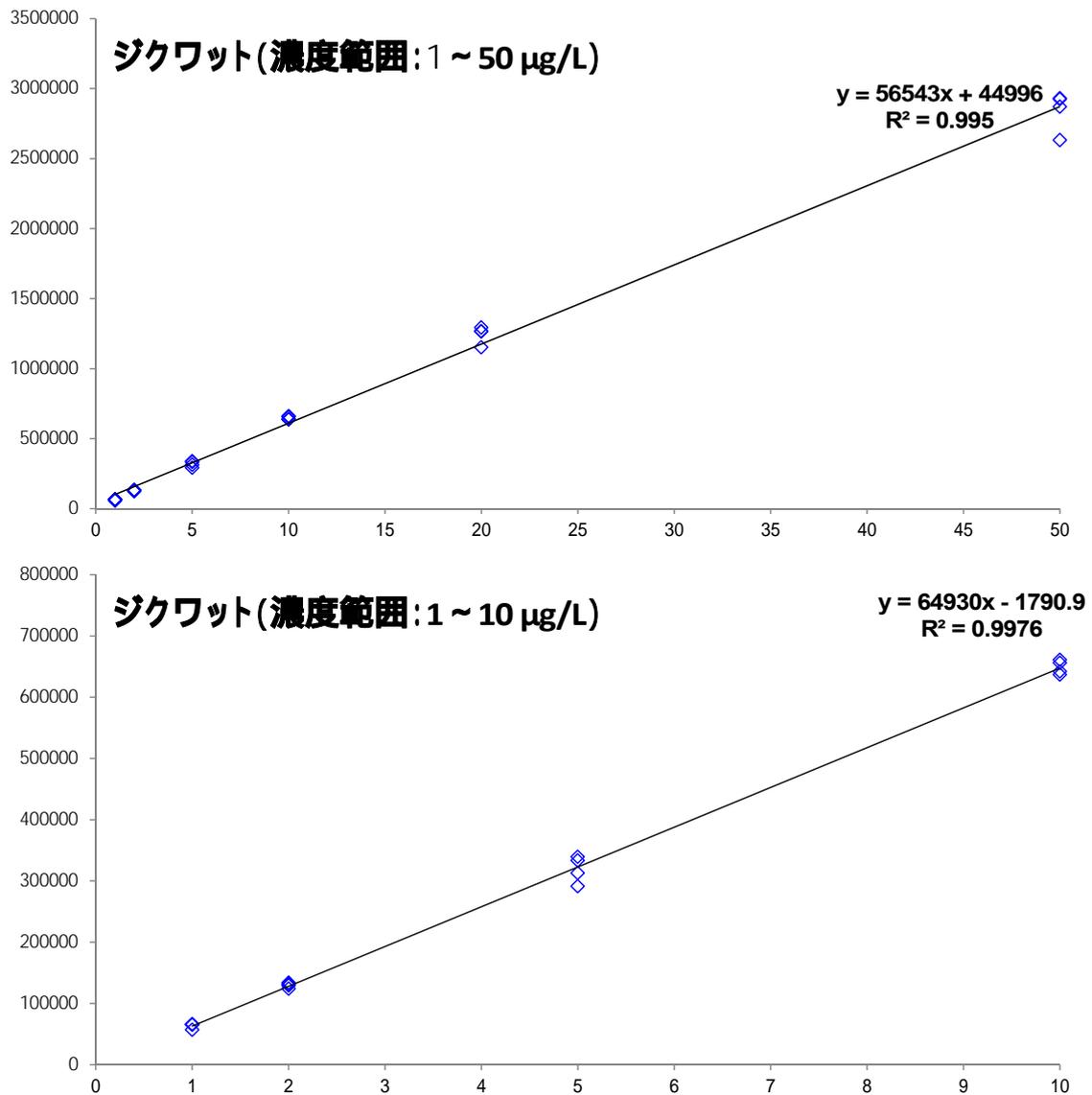


図2. ジクワットの検量線
(上: 濃度範囲 1 ~ 50 µg/L, 下: 濃度範囲 1 ~ 10 µg/L)

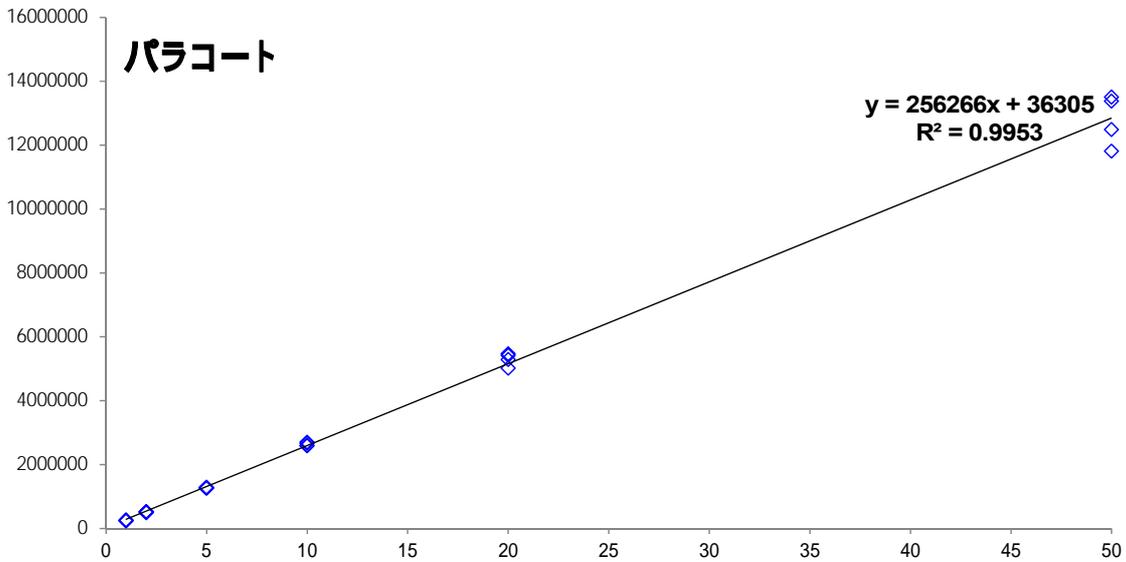


図 3. パラコートの検量線

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>

**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。

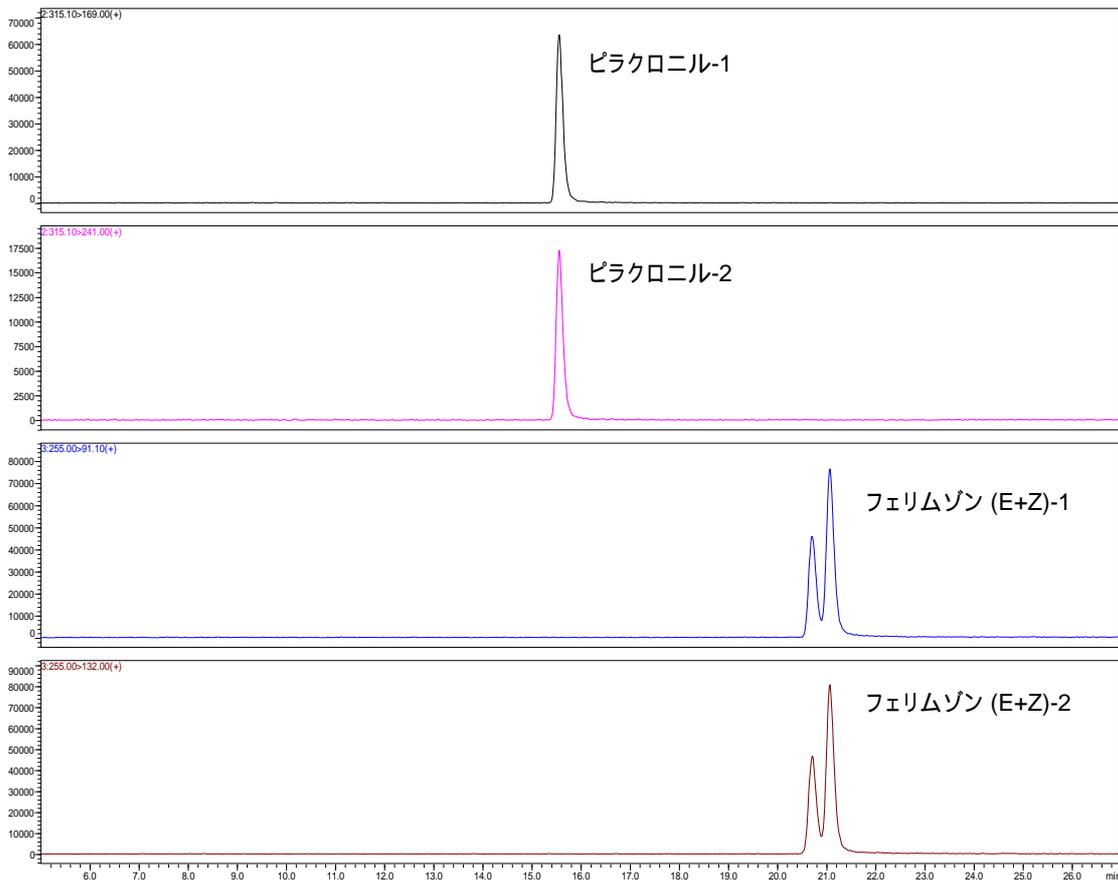


図1. ピラクロニルおよびフェリムゾン (E+Z) の LC/MS/MS クロマトグラム

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。

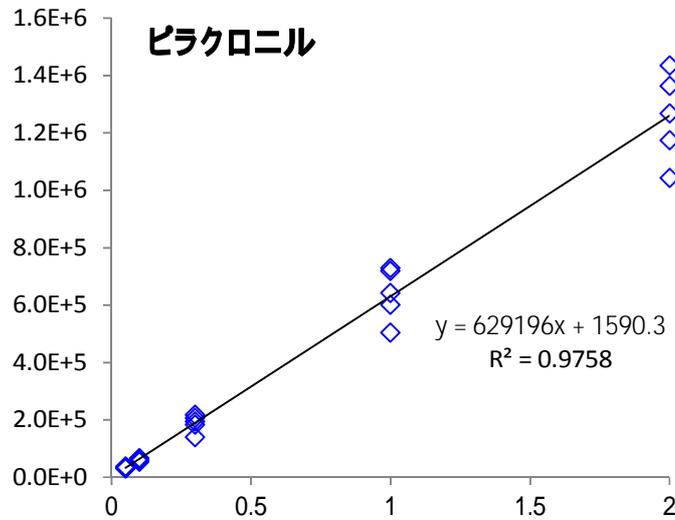


図 2. ピラクロニルの検量線

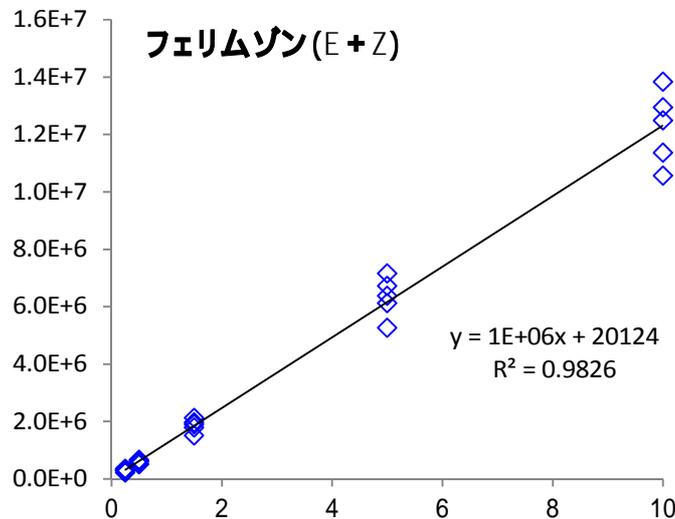


図 3. フェリムゾン (E+Z) の検量線

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.

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 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

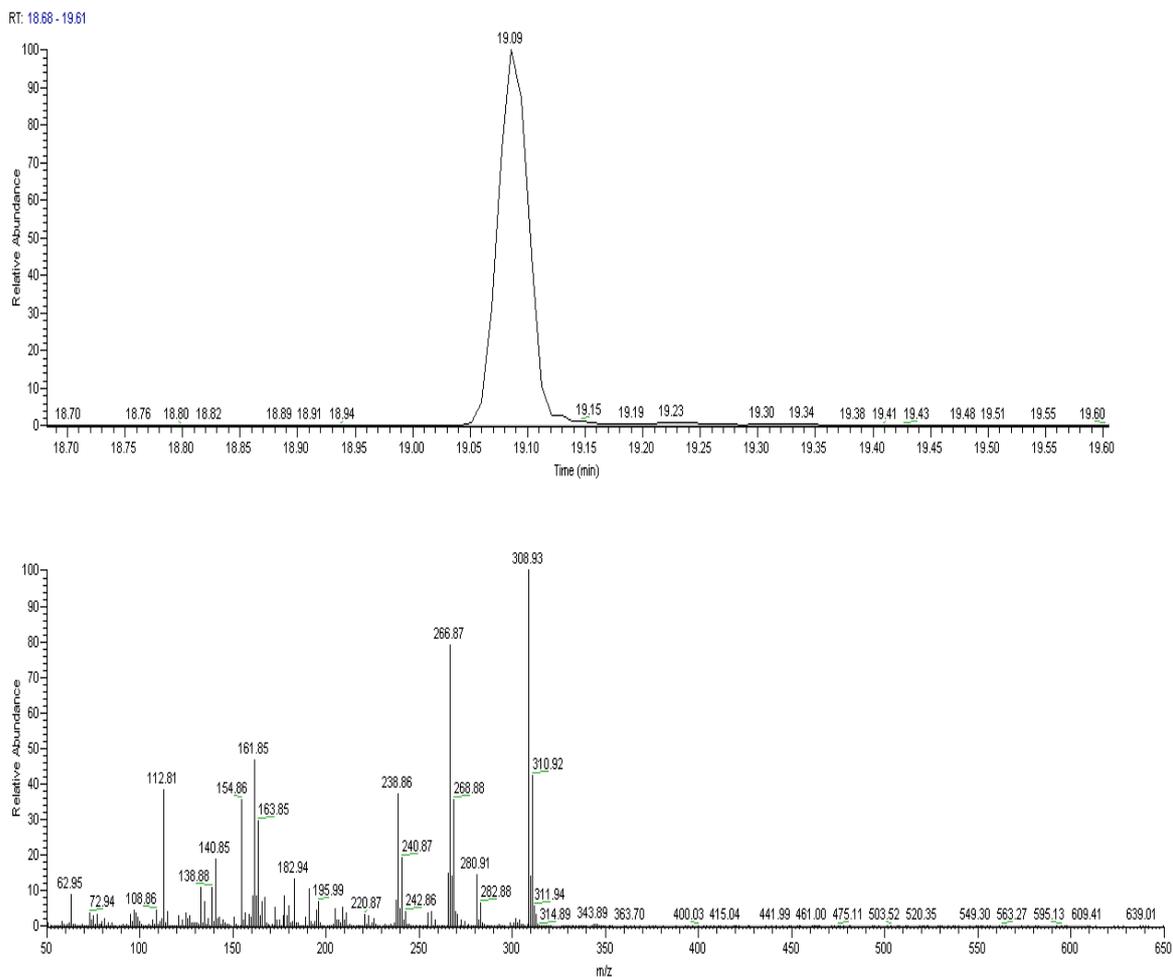


図 1. プロチオホスの検出ピークと MS スペクトル

RT: 18.12 - 20.31

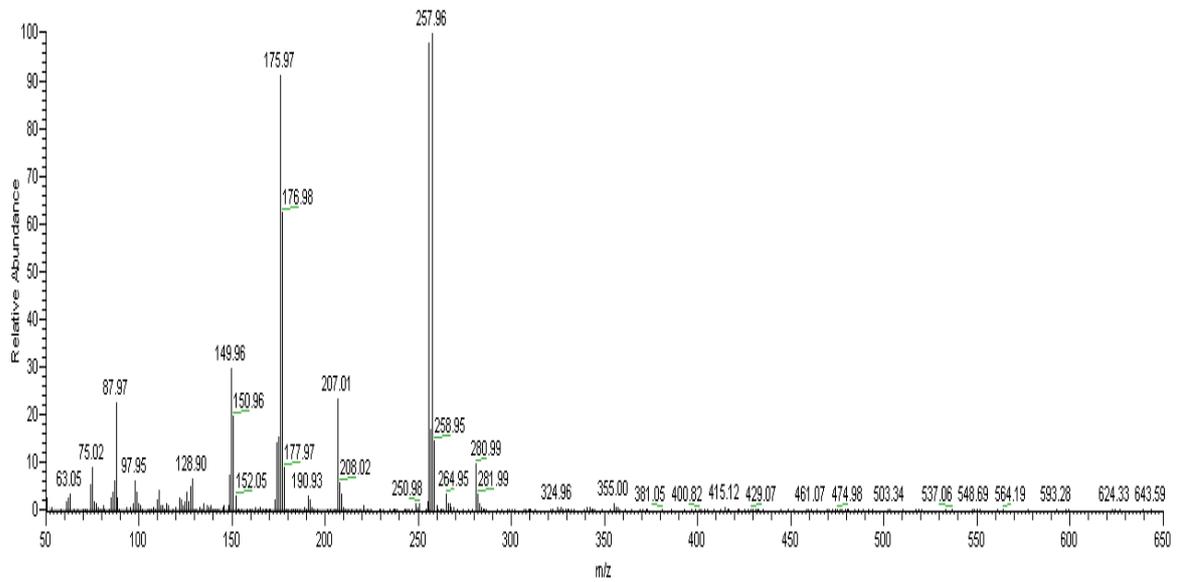
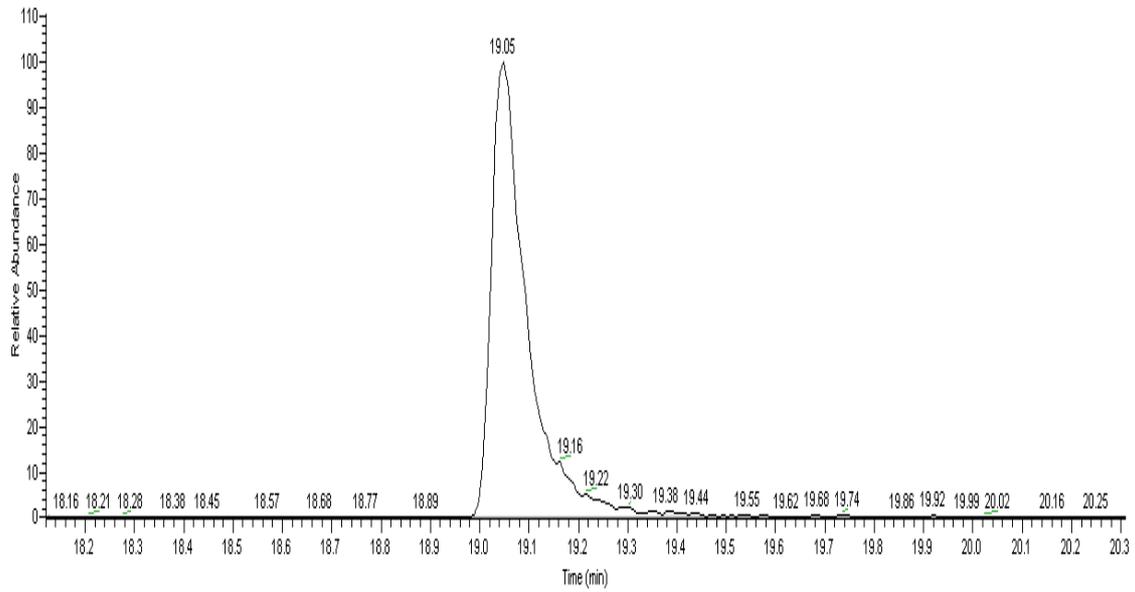


図 2. 内部標準液 9-プロモアントラセンの検出ピークと MS スペクトル

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．

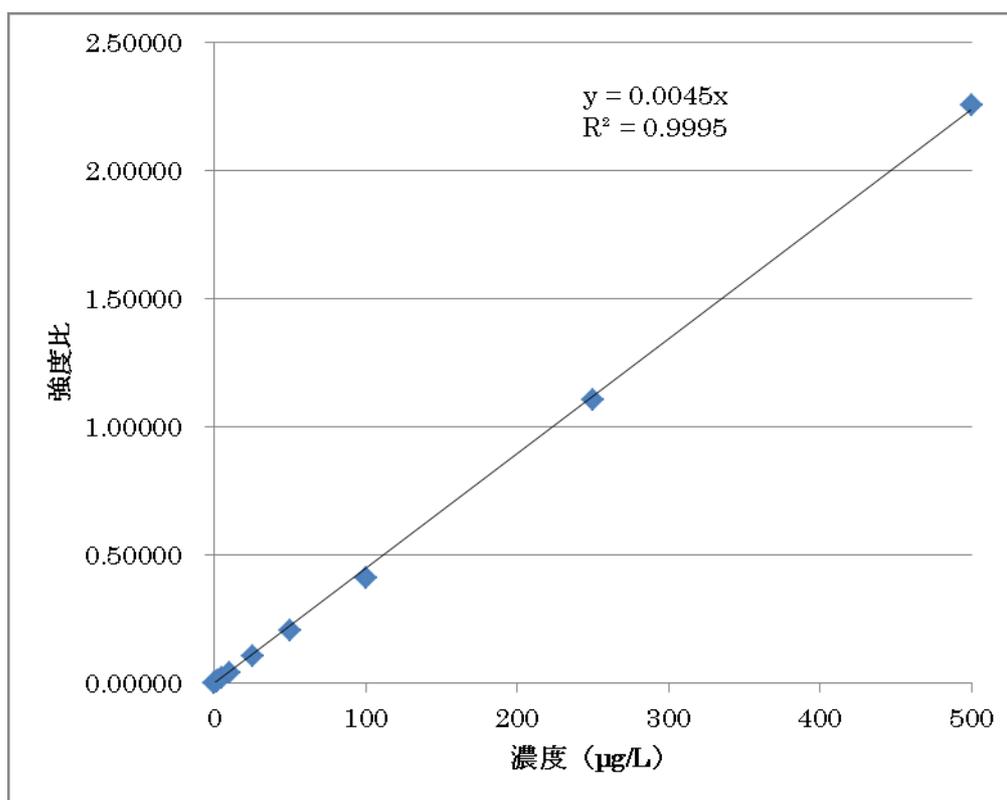


図 3. プロチオホスの検量線（濃度範囲 1.0～500 µg/L）

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>

成果物の刊行に関する一覧表

該当なし