

LC-MSMSによる水道原水中農薬検査法の検討

望月映希 鶴田芙美

Analysis of pesticides in raw water by LC-MSMS

Eiki MOCHIZUKI and Fumi THURUDA

キーワード：管理目標設定項目、水道原水、直接注入法

水道水質の維持・向上は、県民の安全安心な生活のために欠かせない要素である。それを脅かす水質悪化や万一の水質汚染事故に備え、県では毎年「水質監視実施計画」を策定し、各水道事業者と協力して水道原水、水道水の監視を行っている。

その計画に従い当所では、監視地点の水道原水について、管理目標設定項目の内、農薬類の検査を行っている。

管理目標設定項目の農薬類は現在115種類が掲げられているが、これらは全項目を検査することが義務付けられたものではなく、必要性に応じて検査をすることとなっている。山梨県では、県内農薬流通量から検査を行う項目を3年に一度選定し、検査対象項目としている。

これまで水道原水の農薬検査の一部項目では、前処理として固相抽出を行いLC-MSMSに注入していたが、その検査に用いているLC-MSMSが更新され測定感度が大幅に向上したことから、妥当性を確認したうえで通知¹⁾の別添方法20の2 (以下、20-2) に検査法を変更することとした。

管理目標設定項目の検査は必ずしも標準検査法に則る必要はなく、「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」²⁾に基づき検査の妥当性さえ確認できていれば、ほかの検査法を用いてもよいこととなっている。20-2の適用の無いオキシシン銅、チウラム、プロベナゾールの3項目についても20-2で妥当性評価に適合すれば、山梨県の検査対象項目では、固相抽出法による検査を省略し、検査時間を短縮できる。

このことから、上記3項目について分析条件の検討を行い妥当性を評価したところ、基準に適合した。

しかし、チウラムにおいて真度が低い値となったため、真度不良の改善に向けての検討を行ったところ、若干の知見を得たのでここに報告する。

調査方法

1 20-2分析条件および妥当性評価

(1) 試料

模擬試料として河川水（富士川水系笛吹川）を用いた。模擬試料では今回検討した農薬類は不検出であった。

(2) 試薬及び資材

試薬：富士フィルム和光純薬株式会社製オキシシン銅標準品、同社製66種農薬混合標準液 水質-1-2、同社製15種農薬混合標準液 水質-2、同社製28種農薬混合標準液 水質-3、同社製63種農薬混合標準液 水質-4、関東化学株式会社製アセトニトリル（残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)）、同社製メタノール（残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)）、同社製アセトン（残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)）及び同社製塩酸（特級）を用いた。

資材：フィルターは東洋濾紙株式会社製DISMIC-13HP 045ANを、ガラスバイアルはアジレントテクノロジー株式会社製5183-4428を、ポリプロピレン（以下、PP）製バイアルはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製C4013-11を用いた。

(3) 試料調製

オキシシン銅を10 mg量り、溶けるまで徐々に塩酸を加え、溶けた液にアセトニトリルを加えて正確に10 mLとし、これをオキシシン銅標準原液（1 mg/mL）とした。オキシシン銅標準原液0.3 mLを取り、精製水を加えて100 mLとし（3 mg/L）、この液1 mLを取り、精製水を加えて10 mLとし（0.3 mg/L）、この液0.1 mLを取り、模擬試料を加えて100 mLとした。これをディスポーシングに取りフィルターでろ過し、初液を捨て、次の液をオキシシン銅妥当性評価用検液（0.3 µg/L）としてガラスバイアルに充填した。

水質-3を1 mL取り、アセトニトリルを加えて20 mLとし、これを水質-3希釈液（1 mg/mL）とした。水質-3希釈液を2 mL取り、精製水を加えて10 mLとし（0.2 mg/L）、この液を0.1 mL取り、模擬試料を加えて100 mLとした。以下オキシシン銅と同様にろ過してチウラム妥当性評価用検液（0.2 µg/L）を調製し、PP製バイアルに充填した。

水質-3希釈液を3 mL取り、精製水を加えて10 mLとし（0.3 mg/L）、以下チウラムと同様に処理してプロベナゾール妥当性評価用検液（0.3 µg/L）を調製し、PP製バイアルに充填した。

(4) 検量線用標準液調製

オキシシン銅標準液を精製水で希釈し0.1, 0.2, 0.5, 1 µg/Lの4段階に希釈したオキシシン銅標準系列をガラスバ

表1 分析条件

LC条件			
分析用カラム: Atlantis dC18 3 μ m 2.1mmI.D. x 150mm			
移動相A液: 精製水			
移動相B液: 120 mmol/L 塩酸水溶液			
移動相C液: メタノール			
グラジエント条件:	min	B液%	C液%
	0.0	5	5
	2.0	5	40
	15.0	1	95
	22.0	1	95
	22.1	5	5
	35.0	5	5
流速: 0.2 mL/min			
カラム温度: 40°C			
注入量: 50 μ L			
イオン化条件			
イオン化法: ESI(+)			
インターフェース温度: 200°C			
脱溶媒温度: 355°C			
DL温度: 100°C			
ネブライザーガス流量: 3.00 L/min			
ヒーティングガス流量: 10 L/min			
ヒートブロック温度: 350°C			
ドラインガス流量: 10 L/min			
MSパラメーター			
化合物名:	m/z	Q1 Pre Bias	CE, Q3 Pre Bias
オキシシン銅	146.00>101.15,	-13,	-31, -19
	146.00>118.10,	-13,	-24, -21
	146.00>128.15,	-13,	-27, -24
チウラム	241.05> 88.15,	-15,	-22, -17
	241.05>120.10,	-15,	-17, -22
	241.05>195.95,	-15,	- 8, -21
プロベナゾール	224.00>195.90,	-24,	-14, -20
	224.10> 41.15,	-16,	-15, -16
	224.10> 39.15,	-15,	-44, -15

表2 検査結果

化合物名 添加濃度 選択性	検量線 キャリア オーバー	各検量点定量濃度(μ g/L)				各添加試料定量濃度			
		検量線真度(%)・検量線精度(RSD%)				検査員識別記号: 各定量濃度(μ g/L)			
		検量点1 0.1 μ g/L	検量点2 0.2 μ g/L	検量点3 0.5 μ g/L	検量点4 1 μ g/L	真:真度(%)	併:併行精度(RSD%)	室:室内精度(RSD%)	
オキシシン銅 0.3 μ g/L 妨害無し	面積値は 最小検量点の 31.77%	0.0951	0.1898	0.4876	0.9953	A:0.3118	A:0.3153	B:0.3022	B:0.3105
		0.1022	0.1962	0.4956	1.006	C:0.3110	C:0.3095	D:0.3033	D:0.3128
		0.0884	0.1823	0.4659	0.9282	E:0.3302	E:0.3296	F:0.3152	F:0.3264
		95.2・7.264	94.70・3.677	96.61・3.182	97.65・4.317	真:104.9%	併:1.586%	室:3.065%	
チウラム 0.2 μ g/L 妨害無し	ピーク無	0.1141	0.1841	0.4364	1.065	A:0.1483	A:0.1392	B:0.1467	B:0.1380
		0.1098	0.1832	0.4788	1.028	C:0.1545	C:0.1332	D:0.1386	D:0.1566
		0.1104	0.1888	0.4510	1.050	E:0.1444	E:0.1301	F:0.1350	F:0.1278
		111.5・2.094	92.67・1.623	91.08・4.740	104.8・1.786	真:70.52%	併:7.069%	室:6.468%	
プロベナゾール 0.3 μ g/L 妨害無し	ピーク無	0.1014	0.1966	0.5010	1.001	A:0.2955	A:0.2958	B:0.2895	B:0.2974
		0.1009	0.1967	0.5056	0.9969	C:0.2766	C:0.2823	D:0.2883	D:0.2474
		0.1044	0.2102	0.4198	1.066	E:0.2660	E:0.2695	F:0.2760	F:0.2747
		102.2・1.858	100.6・3.891	95.09・10.15	102.1・3.778	真:93.30%	併:4.352%	室:5.338%	

イアルに充填し、オキシシン銅の検量線作成に用いた。

水質-3希釈液を精製水で希釈し0.1, 0.2, 0.5, 1 μ g/Lの4段階に希釈した水質-3標準系列をPP製バイアルに充填し、チウラム及びプロベナゾールの検量線作成に用いた。

(5) 装置及び分析条件

株式会社島津製作所製LC40-LCMS-8050を用いた。

分析条件を表1に示した。

これらの条件で検量線各濃度点を3回。検液を検査員6人、各2併行で計12回検査し、妥当性評価を行った。

2 真度不良の改善に向けての検討

水質-1-2、水質-2、水質-3及び水質-4を各250 μ L取り、模擬試料を加えて50 mLとした(0.1 mg/L)。

この液と模擬試料を容積比1:1混和した液、同様にメタノールと混和した液、同様にアセトニトリルと混和した液、同様にアセトンと混和した液を調製した。各混和液をディスポジシングに取りフィルターでろ過し、初液を捨て、次の液をそれぞれ模擬試料液、メタノール混液、アセトン混液、アセトニトリル混液とした。これら有機溶媒は、吸着又は微生物による分解を抑える目的で添加した。

また、バイアルの素材の差による吸着の差を明らかにするため、模擬試料液をPP製バイアル、ガラスバイアルに充填し、それぞれ模擬試料液PP、模擬試料液ガラスとした。その他の液は全てPP製バイアルに充填した。

これらを10°Cに保たれたサンプルクーラー内に保管し、妥当性評価と同条件で各試料を順番に分析し、それを11回繰り返した。なお、今回条件では同一試料の分析間隔は3.56時間となった。

結果と考察

1 妥当性評価

結果を表2に示した。

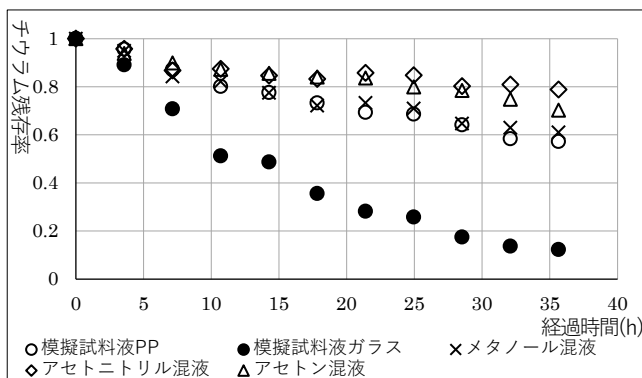


図1 チウラム残存率

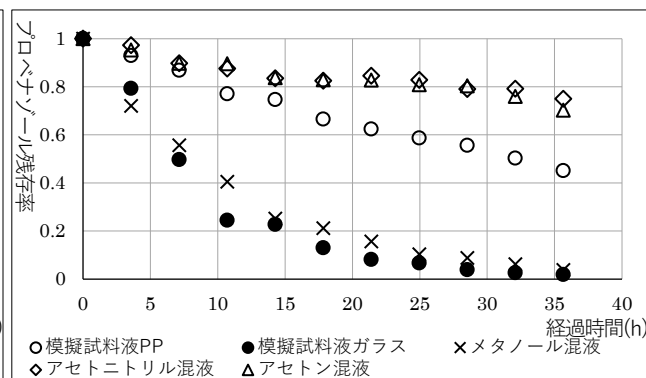


図2 プロベナゾール残存率

妥当性評価ガイドラインにおいて、農薬類を通知¹⁾以外の方法で検査する場合の妥当性評価適合基準は、検量線最大検量点測定直後に測定した空試験のシグナル値が検量線最低検量点を下回ること（検量線キャリーオーバー）。各検量点を3回以上分析したときの定量濃度の平均値が調製濃度の80～120%（検量線真度）、相対標準偏差（RSD%）が20%以下（検量線精度）であること。分析種を含まない試料水を検査した際、定量を妨害するピークがないこと（選択性）。定量下限濃度の分析種を添加した試料を5回以上検査したとき定量濃度の平均値が添加濃度の70～130%であること（真度）、自由度4以上の併行精度（RSD%）が30%以下であること、自由度4以上の室内精度（RSD%）が35%以下であることと定められている。

今回、いずれの項目も妥当性評価基準に適合した。ただし、チウラムの添加試料真度が70.52%と、基準内であるものの低い値となった。

チウラムは、安定性が低く、水中で分解しやすいことが指摘されており³⁾、環境水中での挙動は予測困難な部分が大いといわれている⁴⁾。

また、20-2分析条件の検討中、ガラスバイアルを用いて分析を行った際にチウラムとプロベナゾールの分析値が安定しないことがあった。

このことから、今回チウラムの真度が低かった原因は検査中、特に検液をバイアルに充填した後に起こった分解や吸着により、試料内のチウラムの残存率が低くなることによると考えた。また、プロベナゾールも同じ理由で残存率が低くなることと考えると考えた。

2 真度不良の改善に向けての検討

面積値を初回の面積値で除したものを残存率として、チウラム及びプロベナゾールの残存率図1及び2に、その他農薬類の最終的な残存率の一部を表3に示した。

(1) 容器材質による影響

模擬試料液PPに比べ、模擬試料液ガラスではチウラム、プロベナゾールのいずれも明確に残存率が低下した。

チウラム及びプロベナゾールはいずれも通知¹⁾の別添方法18のみが標準検査法として示されており、その中で採水容器は精製水及びアセトンで洗浄したガラス瓶に採

表3 各農薬 35.6 時間後残存率

化合物名	模擬試料液 PP	模擬試料液 ガラス	アセトニトリル 混液
MCPA	0.835	0.849	0.845
アトラジン	0.449	0.483	0.498
イソキサチオン	0.305	0.368	0.368
イソキサチオンオキソン	0.576	0.595	0.616
クロルピリホス	0.190	0.359	0.364
クロルピリホスオキソン	0.503	0.523	0.524
シアナジン	0.702	0.757	0.748
ジチオピル	0.817	0.774	0.802
シマジン	0.477	0.510	0.505
ダイアジノン	0.663	0.723	0.717
ダイアジノンオキソン	0.451	0.479	0.486
トリクロピル	0.696	1.009	0.978
ピラゾリネート	0.795	0.470	0.777
フィプロニル	0.969	0.959	0.964
フェントロチオンオキソン	0.391	0.421	0.434
フェントラザミド	0.828	0.806	0.780
プロフェジン	0.657	0.640	0.628
ベンゾフェナップ	0.921	0.787	0.817
メコプロップ(MCPP)	0.886	0.887	0.859
メチダチオン(DMTP)	0.652	0.681	0.700
メフェナセット	0.705	0.720	0.723
モリネート	0.760	0.831	0.853

取することとなっている。しかし、今回の検討では、試料採取容器に比べて、水の体積に対するガラスとの接触面積が大きいこと。農薬濃度が一般的な試料に比べ高いこと。検討に用いた模擬試料が、標準検査法で想定している水道水ではなく、当県の検査対象に合わせて水道原水であるため微生物が残存していることなどから、単純に比較できないことに注意を要する。

このほか、ピラゾリネート、ベンゾフェナップにおいて模擬試料液ガラスで残存率の低下が認められた。イソキサチオン、クロルピリホス、トリクロピルでは反対に模擬試料液PPで残存率の低下が認められた。

(2) 有機溶媒添加による影響

チウラム、プロベナゾールのいずれにおいても、アセトニトリル混液、次いでアセトン混液で模擬試料液PPに比べ残存率の低下が抑えられた。

しかし、メタノール混液はチウラムでは模擬試料液PPとの差が認められず、プロベナゾールにおいては模擬試料液ガラスと同程度に残存率が低下した。

模擬試料液ガラスに比べ模擬試料液PPで残存率の低下が認められたイソキサチオン、クロルピリホス、トリクロピルでは、アセトニトリルの添加により、残存率がガラスバイアルと同等に回復した。

ベンゾフェナップにおいてアセトニトリル混液は、模擬試料液PPに比べ残存率の低下が認められた。しかし、模擬試料液ガラスより残存率が高く、低下したといえ35.6時間後残存率は0.8170と検査に大きな支障が出るほど低くはないと考えられる。このことから、アセトニトリルの添加によるベンゾフェナップ残存率低下のデメリットより、他の農薬成分の残存率の向上によるメリットの方が大きいと考えられた。

今回の検討の条件では、アセトニトリルを添加しPPバイアルを用いた条件が一斉分析に適していることが明らかになった。

今後さらに検討を進めていけば、より真度及び精度の高い一斉検査法につながる可能性がある。

まとめ

検査条件の最適化により、オキシシン銅、チウラム、プロベナゾールにおいて20-2の検査法で妥当性適合となり、検査時間を短縮できた。

バイアル中の安定性の悪いチウラムなどの農薬について、PP製バイアルを用い、試料にアセトニトリルを添加することでバイアル内での残存率に向上が認められたことから、検討を進めればより真度の良い検査法を確立できる可能性がある。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課：水質管理目標設定項目の検査方法, 平成15年10月10日付, 健水発第1010001号別添4 最終改正令和5年3月24日
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長：水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン, 平成24年9月6日付, 健水発0906第1号別添 最終改正平成29年10月18日
- 3) 三好益美：チウラムの分解性と固相抽出カラムを用いた前処理法の検討, 香川県環境保健研究センター所報, 7, 118-121 (2008)
- 4) 松井利夫：チウラムの分解性の検討, 全国環境研会誌, 32, 2, 7-11 (2007)