

[ノート]

水中プロチオホスの溶媒抽出-PTV-GC/MS 法による 高感度分析法の開発

川元 達彦* 矢野 美穂 上村 育代 稲田 忠明

Development of a Highly Sensitive Method for Analysis of prothiofos in Water by Solvent Extraction and PTV-GC/MS Methods

Tatsuhiko KAWAMOTO*, Miho YANO, Ikuyo KAMIMURA and Tadaaki INADA

*Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We have established a highly sensitive method for analyzing the concentration of a newly regulated agricultural chemical, prothiofos, in water by solvent extraction and PTV-GC/MS methods. In order to evaluate the analytical method, we conducted recovery experiments from distilled water, dechlorinated tap water and river water samples using a dichloromethane. The recovery rate was greater than 95% and the coefficient of variance was under 4%. The determination limit by this method was 0.01 μ g/L. Furthermore, we conducted a water-quality test using this method for water samples collected from 15 monitoring points in the Hyogo Prefecture. The results indicated that the concentrations of prothiofos is over a range from N.D. to 0.04 μ g/L. However, the detection of prothiofos in water sources was a significantly high rate of 33%.

I はじめに

2003年、厚生労働省は大幅な水道水質基準改正¹⁾を行い、水質管理目標設定項目の102農薬に、それぞれ目標値を定め、規制の評価方法として総農薬方式を日本の水道水分野に初めて導入¹⁻³⁾した。この結果、農薬毎に設定された目標値の1/100濃度を定量することが求められることとなった。さらに、2013年、厚生労働省は農薬類の分類の見直しを行い、農薬の検出状況や出荷量、ADI（1日許容摂取量）の見直し状況等を踏まえて120農薬に改正⁴⁾した。この結果、有機リン系農薬プロチオホス（目標値：4 μ g/L）が新たに測定対象農薬となった。しかしながら、この農薬は脂溶性が高いこと、吸着性が強いことから、測定困難物質の一つとなっている。すなわち、水中の微量分析法や水源における実態および挙動に関する報告は殆ど認められない。

著者らは、既に多種類の農薬について、高感度な多成分一斉分析法を開発し、水道原水中の実態把握および浄水処理過程における除去挙動を明らかにし、兵庫県の水道水の安全性確保対策に寄与してきた^{5,7)}。本研究では、新規規制対象項目となったプロチオホスについて、著者らがこれまでに開発・確立したTPIオンカラム注入-GC/MS法^{5,7)}を基本とし、分析条件等をPTV（Programmed Temperature Vaporizer）オンカラム注入-GC/MS法⁸⁾に適用した結果、良好な成績が得られたので報告する。また、水道水の安全性確保対策に資するため、本分析法を用いて兵庫県水道水質管理計画^{9,10)}に基づいた監視地点におけるプロチオホスの調査結果についても併せて報告する。

II 材料と方法

1. 試料

1) 農薬：分析対象としたプロチオホスの構造式を Fig.1 に示した。標準原液は標準品の粉末 10.0mg（和光純薬工業社製、純度 98%以上）をアセトンで全量を 10mL とし、1,000mg/L 溶液を調製した後に、さらにアセトン

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康生活科学研究健康科学研究センター

健康科学部 川元 達彦

で希釈して 100mg/L の標準原液を調製した。この標準原液をアセトンまたは n-ヘキサンで適宜希釈し、各種試験に必要な標準溶液を調製した。内部標準物質 9-ブロモアントラセンは市販の 100mg/L の n-ヘキサン溶液（関東化学社製）を用い、n-ヘキサンで適宜希釈し、試験に必要な内部標準溶液として調製した。

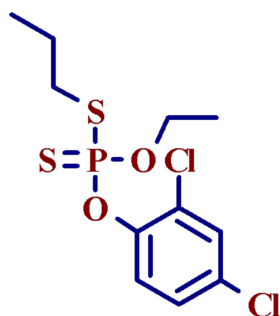


Fig.1 Chemical structure of Prothiofos

$C_{11}H_{15}Cl_2O_2PS_2$, MW:345.2, logPow: 5.67

2) 精製水: 水道水を逆浸透膜 Elix 装置 (Millipore 社製) でろ過後, Milli-Q Advantage 装置 (Millipore 社製) で再精製したものを用いた。

3) 水道水は県立健康生活科学研究所の 3 階給水栓水より採取し, アスコルビン酸ナトリウム (水道水 1 L に 10mg) で脱塩素したものを実験に供した。

4) 水道原水としての河川水は神戸市兵庫区内の河川より採取した。

5) アスコルビン酸ナトリウム (和光純薬社製)。

6) 硫酸 (1 + 1): 水銀分析用 (関東化学社製)。

7) 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験用の無水硫酸ナトリウム (和光純薬社製) は電気炉で 500°C, 5 時間乾燥した後, 使用時までデシケーターにて保存した。

8) 有機溶媒: ジクロロメタン, アセトンおよび n-ヘキサンは残留農薬試験用 5,000 (和光純薬社製) を, その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

9) pH, 浮遊物質 (SS) および残留塩素: 精製水, 水道水および水道原水 (河川水) について, 上水試験方法¹⁾に準拠して分析した。

2. 装置: 質量分析計付ガスクロマトグラフは ThermoFischer Scientific 社製タンデム四重極型 TSQ Quantum GC を用いた。

3. 水中プロチオホスの溶媒抽出・PTV オンカラム注入ー GC/MS 分析

水中農薬の溶媒抽出法は既報⁷⁾に従って行ったが, その概略を Fig.2 に示し, 概要を以下に示した。

Sample (500mL)	
	1. Chlorine (+) → Ascorbic acid 5mg 2. Sulfuric acid (pH3.0)
Solvent phase extraction	
Dichloromethane 50mL (x2)	
Sodium Chloride 100 g	
Organic layer	
Washing	Purified water 50mL
Dehydration	Sodium Sulfate, Anhydrous
Concentration	
	1. Hexane 0.5mL 2. Internal standard solution 0.01mL
GC/MS-SIM	

Fig.2 Analytical procedures for Prothiofos

試料水 500mL (プロチオホスを 0.04, 0.4, 4 μg/L とする様に精製水, 脱塩素した水道水, 河川水に添加し, 硫酸で pH3.0 に調製したもの) をジクロロメタン 50mL, 塩化ナトリウム 100g を添加し, 10 分間振とうする抽出操作を行った。更に, 有機相を分取し, 水相についてはジクロロメタン 50mL を添加し, 同様の操作を繰り返した。これら 2 回の抽出液を合わせて, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 窒素ガス気流下にて 0.5mL まで濃縮した。その後, n-ヘキサンに転溶後, 再び窒素気流下にて濃縮し, 内部標準物質 9-ブロモアントラセン 0.01mL (10 μg/mL) を添加し, 正確に 0.5mL としたものを分析用検液とした。

GC/MS 測定条件については Table 1 に示した。

農薬分析のための検量線作成 (濃度範囲: 0, 1~500 μg/L) および定量にあたっては, フルスキャンで取り込んだイオンの中から, プロチオホスに特徴的なイオン (m/z267, 309) を選択 (選択的検出法: SIM 法) し, 内部標準物質 (m/z256) で MS 感度を補正して測定を行った。

本法における農薬の添加回収試験の平均回収率と変動係数は 5 回の繰り返し試験により求めた。

Table 1 GC/MS operation conditions

<p>[GC] Injection method: PTV on column injection Injection temp.: 40°C (0.05min) - 10°C/min - 280°C (10min) Coolant: liquid CO₂ Oven temp.: 40°C (3min) - 25°C/min - 125°C - 10°C/min - 280°C (8.1min) Carrier gas: Helium, 40cm/sec (EPC) Column: DB-5ms (film thickness: 0.1 μm, l: 30m, i.d.: 0.25mm)</p> <p>[MS] Ion source temp.: EI: 200°C, Transferline temp.: 280°C Emission current: 285 μA Ionization volt: 70eV Mass range: 50-650(m/z)</p>

4. 水道原水中のプロチオホス含有量調査

兵庫県水道水質管理計画¹⁰⁾に基づいた水質監視 15 地点等 (水源種別: 湖沼水 1 地点, 河川水 5 地点, 伏流水 1 地点, 浅井戸 6 地点, 深井戸 2 地点) (Fig.3) について, 2012 年 6 月 19 日に採水した試料を用いた. 各地点の原水 500mL を試料として, 3. の方法に従って農薬を抽出し, 濃縮液に内部標準物質 0.1 μg を添加し, 正確に n-ヘキサンで 0.5mL としたものを分析時まで凍結保存 (-40°C) して分析用検液とした.

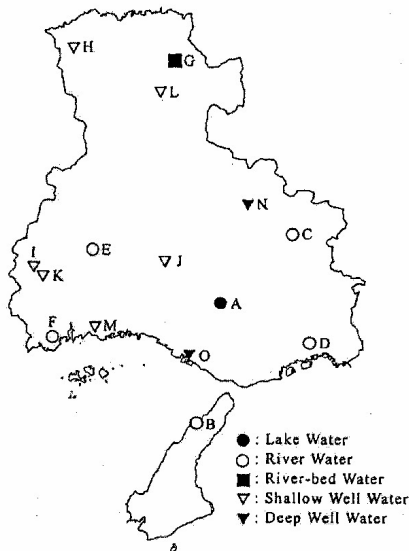


Fig. 3 Location of sampling points in Hyogo Prefecture

なお, 測定対象物質の検索はフルスキャンによるトータルイオンクロマトグラム上で得られたピークのマスパターン (標準物質の保持時間の ± 10 秒以内, Signal/Noise (S/N) 比 10 以上のピーク) により行い, ライブラリーとの相同性が 80% 以上の場合を測定物質として同定した. 定量はフルスキャンで取り込んだイオンの中から, プロチオホスに特徴的なイオン (m/z 267, 309) を選んで, SIM 法による測定を行った.

III 結果および考察

1. 溶媒抽出-PTV オンカラム注入-GC/MS 法によるプロチオホスの分析法の条件設定について

1) 溶媒抽出法による前処理法の検討

今回, 水中プロチオホスの抽出溶媒として, 他の農薬類と一斉分析⁴⁾に加えることを目的としたため, ジクロロメタンを用いて検討した. また, 採水試料によっては pH が酸性~アルカリ性の範囲に変動することが十分に想定されるため, pH3.0, 5.0, 7.0, 9.0 に変化させた水溶液にプロチオホス 0.4 $\mu\text{g/L}$ となるように添加して回収率を検討した. その結果, 平均回収率 ($n=3$) として,

それぞれ 99.8, 98.0, 97.4, 95.2% と良好な結果を示した. 兵庫県下の水道原水は河川水, 湖沼水, 浅井戸, 深井戸, 伏流水と多岐にわたっているが, 本試験の結果から, 試料水は pH3.0 に調整して抽出することとした.

2) 分析条件等の検討

農薬の熱分解を抑制する目的から PTV オンカラム注入法を採用した. すなわち, ガスクロ注入口の熱に不安定なトリクロロホンやメチルダイロンなど水道水規制農薬と共に, 効率的にプロチオホスを一斉に分析することが可能であるため, PTV オンカラム注入法を用いた⁵⁻⁸⁾. 今回は結果を示していないが, 注入口温度を 50°C ~ 300°C までの範囲設定において, プロチオホス標準溶液 (40 $\mu\text{g/L}$) を注入して熱分解物の検索を行ったが, 熱分解物は全く認められなかった.

Fig.4-1 にプロチオホスのトータルイオンクロマトグラムとマススペクトルを示した. また, Fig.4-2 に内部標準物質 9-ブromoアントラセンのトータルイオンクロマトグラムとマススペクトルを示した. 両者のクロマトグラムの結果から, プロチオホスと 9-ブromoアントラセンのピーク形状および分離は良好であった.

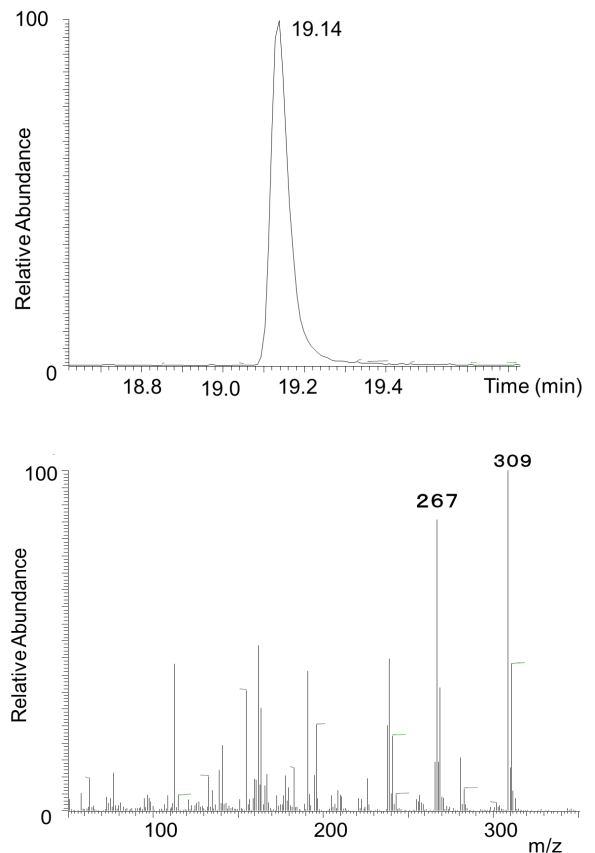


Fig.4-1 Total ion chromatogram and mass spectrum of Prothiofos quantitative ion: m/z 267, 309

一方、マススペクトル (EI : 電子衝撃法) では、プロチオホスの分子イオンピークは認められなかったが、ベンゼン骨格でエーテル結合した炭素の4位に結合した塩素が脱離した $[C_{11}H_{15}ClO_2PS_2]^+$ である $m/z309$ と $[S-C_3H_7]$ が脱離した $m/z267$ が特徴的なイオンとして認められ、特に $m/z309$ は最も強いイオン (強度) として認められた。また、9-プロモアントラセンの平均分子量は 257.1 であり、このうち同位体の $m/z256$ を定量イオンとした。

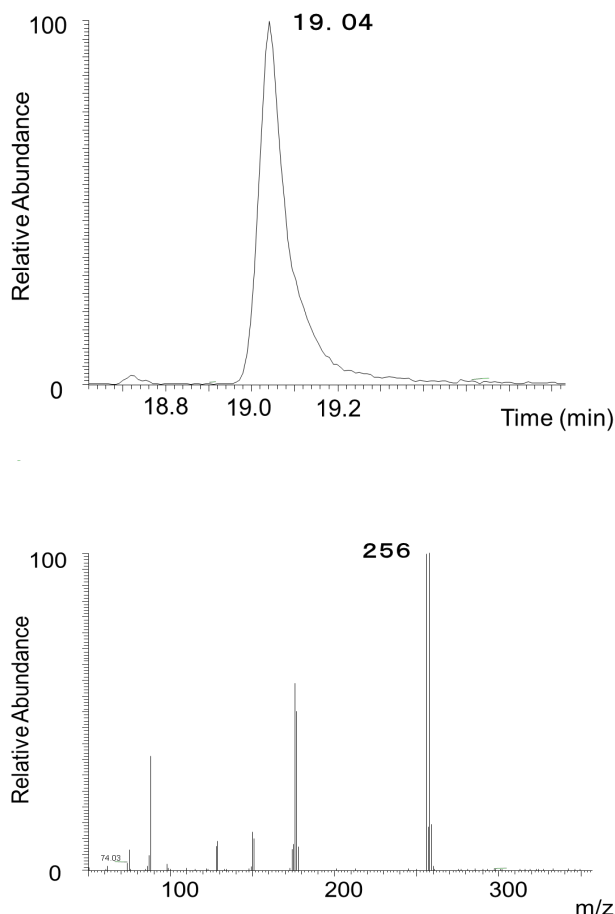


Fig. 4-2 Total ion chromatogram and mass spectrum of 9-Bromoanthracene quantitative ion: $m/z256$

以上の検討結果から得られたプロチオホスのモニターイオン、保持時間、検量線の直線回帰式および相関係数の分析パラメーターを Table2 にまとめて示した。農薬濃度とピーク面積との相関係数は 1.000 と高い値を示し、濃度応答性の直線性が極めて良好であることを認めた。

Table 2 Various parameters of Prothiofos measurement

Monitor ion(m/z)	Retention time(min)	Regression curve*	Correlation coeff.(r)
267, 309	19.14	$y=0.0047x$	1.000

*: Conc. 1—500 $\mu g/L$ (9 points: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu g/L$)

また、PTV オンカラム注入法がプロチオホスの分析に対しても、有効な分析方法であることが示された。

3) 添加回収試験

溶媒抽出-PTV-GC/MS によるプロチオホスの定量性および再現性を把握するため、試料水 500mL (精製水、脱塩素した水道水、河川水) に農薬標準溶液 0.04, 0.4, 4 $\mu g/L$ を添加して回収率とその変動係数を求めた。それらの回収率と変動係数の結果を Table3 に示す。

Table 3 Recoveries of Prothiofos in water

Conc.($\mu g/L$)	Dist. water		Tap water		River water	
	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
0.04	99.5	1.3	97.3	2.2	95.1	3.3
0.4	99.6	1.9	98.9	1.9	98.3	2.6
4	100.1	1.0	101.0	1.9	100.9	2.5

Dist. water: pH7.1, SS: <1.0mg/L, n=5
Tap water: pH6.8, SS: <1.0mg/L, n=5
River water: pH6.9, SS: 3.5mg/L, n=5
R(%): recovery, CV(%): coefficient of variation

精製水、脱塩素した水道水および河川水にプロチオホス 0.04 $\mu g/L$ 添加した時の回収率の範囲は、95.1~99.5%、変動係数の範囲は 1.3~3.3%であった。

また、精製水、脱塩素した水道水および河川水にプロチオホス 0.4 $\mu g/L$ 添加した時の回収率の範囲は、98.3~99.6%、変動係数の範囲は 1.9~2.6%であった。

さらに、精製水、脱塩素した水道水および河川水にプロチオホス 4 $\mu g/L$ 添加した時の回収率の範囲は、100.1~101.0%、変動係数の範囲は 1.0~2.5%であった。

このように、検討を行ったすべてのプロチオホス添加試料水の回収率は 95%以上と良好であった。また、変動係数は 4%未満と良好な再現性を示した。

このことから、実際のサンプルである水道水、河川水に含有する水質成分による妨害はなく、定量可能であることが明らかとなった。また、プロチオホスは目標値 4 $\mu g/L$ の 1/100 の 0.04 $\mu g/L$ であっても、内部標準物質を用いることで分析の精度は高められ、極めて高感度に分析可能であることが認められた。本分析条件によるプロチオホスの定量下限値は 0.01 $\mu g/L$ (S/N=10) であった。なお、添加回収実験に用いた試料水にはプロチオホスは全く含まれていないことも確認している。

4) 塩素による分解試験

水道水中におけるプロチオホスの安定性試験として、残留塩素 0.5mg/L を含有する水道水にプロチオホス (目標値 4 $\mu g/L$) を添加し、6 時間反応させた結果、経時的に分解することが分かった。プロチオホスは Fig.1 に示す様に分子中に硫黄元素 (S) を含んでいる構造である。また、S 基を有する農薬は一般的に塩素によって分解されやすいことが報告されている^{12,13}。塩素に対する詳細

な分解メカニズムは未だ明らかにされていないが、ひとつにはS基と塩素との反応によって分解が進行するものと推測される。

本研究結果から、プロチオホスは水道水中塩素で経時的に分解することが判明し、分析操作上、脱塩素操作は不可欠であることが明らかとなった。

2. 水道原水中のプロチオホス調査

兵庫県下の水質監視 15 地点等の水道原水について、プロチオホスの含有量調査を行った結果を Table 4 に示す。水道原水から最高値 0.04 $\mu\text{g/L}$ が検出された。この濃度は水道水の目標値 4 $\mu\text{g/L}$ の 1/100 の濃度レベルにあり、比較的低濃度レベルであった。しかし、全体の検出率は 5/15 (33%) と高い値を示し、水源別では特に河川水で多く検出され、また地下水の浅井戸においても僅かに検出されていることが分かった。

Table 4 Concentration levels of Prothiofos in various water sources

Water sources	Concentration($\mu\text{g/L}$) ^{a)}	Frequency
River water	N.D.	4/5
	0.02	
	0.03	
	0.04	
	0.02	
Lake water	N.D.	0/1
River bed water	N.D.	0/1
Shallow well	N.D.	1/6
	N.D.	
	N.D.	
	N.D.	
	0.01	
Deep well	N.D.	0/2
	N.D.	
	N.D.	
Total	N.D.-0.04	5/15

Sampling date: June 19, 2012
 *: Determination limit: 0.01 $\mu\text{g/L}$

以上、本研究結果から、水道原水中におけるプロチオホスの検出濃度は規制値と比べて低濃度レベルにあったが、検出率は高く、監視を要する農薬であることが明らかとなった。今後とも、行政、水道事業所、試験研究機関が一体となり、浄水処理過程における挙動調査など詳細な研究を進めることが必要であると考えられる。

IV 要 旨

新規規制農薬であるプロチオホスについて、溶媒抽出-PTV オンカラム注入-GC/MS 法による分析法の測定条件の検討および実態調査に関する研究を行った結果、以下の知見が得られた。

1. 水中プロチオホスの溶媒抽出法として、ジクロロメ

タンを検討した結果、良好な抽出効率であり、pH3.0~9.0 の範囲では酸性側において抽出効率は良好であることも分かった。

2. さまざまな試料水（精製水、脱塩素した水道水、河川水）を用いて、プロチオホスの添加回収試験を行ったところ、回収率は 95%以上と良好な結果が得られた。また、変動係数も 4%未満と再現性の高い結果であることが認められた。これらのことから、本分析法の有用性が示され、ここに高感度な分析法が確立された。本法によるプロチオホスの定量下限値は 0.01 $\mu\text{g/L}$ であり、目標値 4 $\mu\text{g/L}$ の 1/400 まで十分定量可能であった。

3. 本法を兵庫県水道水質管理計画に基づいた監視 15 地点等の水道原水中プロチオホスの濃度調査に適用した結果、N.D.~0.04 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲で検出され、目標値に比して低濃度レベルにあることが分かった。しかし、検出率は 33% (15 検体中 5 検体で検出) と高く、注視すべき農薬であることを認めた。今後は、広範囲な実態調査および詳細な浄水処理過程における挙動調査を行うことが必要であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、試料水の採取にご協力をいただきました県生活衛生課、健康福祉事務所ならびに各市町水道事業所の関係各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：水質基準に関する省令.平成15年5月30日、厚生労働省令第101号 (2003)
- 2) 厚生労働省健康局水道課長通知: 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.平成15年10月10日(2003)、健水発第1010001号 (最終改正平成22年2月17日) (2010)
- 3) 厚生労働省健康局長通知: 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について.平成15年10月10日、健水発第1010004号 (2003)
- 4) 厚生労働省健康局長通知: 農薬類の分類の見直しについて.平成25年3月28日、健水発0328第4号 (2013)
- 5) Kawamoto, T. and Makihata, N.,: Development of a simultaneous analysis method for carbofuran and its three derivative pesticides in water by GC/MS with temperature programmable inlet

- on-column injection. *Anal. Sci.*, **19**(2), 1605-1610 (2003)
- 6) Kawamoto, T., Makihata, N., Tsiji, H. and Teranishi, K.: Annual variation in the concentration levels and frequency of detection of pesticides in water sources in Hyogo Prefecture. *J. Health Sci.*, **45**(6), 401-411 (1999)
- 7) Kawamoto, T, Yano, M., and Makihata, N.: Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet injection. *J. Chromatogr. A*, **1074**, 155-161 (2005)
- 8) 川元達彦, 矢野美穂, 三橋隆夫: 水中農薬の固相抽出-PTV-GC/MS/MS法による高感度分析法に関する研究. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **2**, 32-39 (2011)
- 9) 厚生労働省健康局水道課長通知: 「水道水質管理計画の策定にあたっての留意事項について」の一部改正について. 平成18年1月22日, 健水発第0122002号 (2006)
- 10) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 兵庫県水道水質管理計画. 平成17年9月策定(第2次) (2005)
- 11) 日本水道協会編: 上水試験方法 2011年版, P76-83, P92-95, P216-226, 日本水道協会出版, 東京 (2011)
- 12) 新井崇子, 鎌田素之, 島崎大, 浅見真理, 相澤貴子: 農薬の分子構造別の塩素分解性に関する研究. 水環境学会誌, **28**(7), 437-444 (2005)
- 13) 鴨志田公洋, 小坂浩司, 浅見真理, 相澤貴子: 塩素処理における有機リン系農薬の類型別反応性とオキソン体への変換について. 水環境学会誌, **30**(3), 145-154 (2007)

[平成27年5月29日受理]