

## LC/ICP/MSによる水道水中における 有機リン系農薬の分析法の開発

宮本紫織 福田正幸 新田祐子 大倉敏裕

Development of a Method for Determining Organic Phosphorus Pesticides in Water by  
Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry(LC/ICP/MS)

Shiori MIYAMOTO, Masayuki FUKUDA, Yuko NITTA, Toshihiro OHKURA

Since glyphosate is used as a herbicide all over the world and mass-produced in Japan, it has become one of the complementary items set as the drinking water quality standards in Japan. The compound has so far been determined using derivatization-HPLC methods, which require rather complicated analytical procedures.

In the present study, we have developed a simple and rapid method for determining organic phosphorus pesticides in water by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry(LC/ICP/MS) . By using this method, we could separate five organic phosphorous pesticides including glyphosate and its main metabolite aminomethyl phosphonic acid(AMPA), glufosinate and its main metabolite 3-(methylphosphinico) propionic acid(MPPA) and fosetyl. Phosphorus(<sup>31</sup>P) in these compounds was measured as <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup> generated by the reaction with oxygen, which enabled high sensitivity measurements. The calibration curves for the compounds were linear within a range of 0.2-50mg/L or 0.02-10mg/L ( $r > 0.999$ ). The recovery rates of the compounds from river water and groundwater samples were higher than 91.6%, and the relative standard deviation were less than 3.8%, suggesting that the method described in this study is useful for the brief and simultaneous determination of organic phosphorus pesticides.

Keywords : LC/ICP/MS, Glyphosate, AMPA, Glufosinate, MPPA, Fosetyl, organic phosphorus pesticide

### はじめに

平成15年の水道法水質基準の改正により、農薬は新たに水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目に位置づけられ、現在102種類の農薬が対象となっている。そのうち、イオン解離性農薬であるグリホサート(GLYP)は、非選択性の茎葉吸収型除草剤であり、比較的安全性が高いことから世界中で使用されており、我国で最も生産量の多い農薬である。また、その使用量は、農

薬の総使用量が年々減少しているにもかかわらず、平成14年以降増加傾向にあり、その出荷量は平成22年において約1万5千tとなっている(図1)<sup>1)</sup>。

その分析方法については、GLYPが紫外外部吸収や蛍光を有さないため、誘導体化HPLC法<sup>2-6)</sup>、誘導体化GC/MS法<sup>7,8)</sup>、イオンクロマトグラフ(IC)法<sup>9,10)</sup>が報告されている。しかし、誘導体化HPLC法及び誘導体化GC/MS法は誘導体化作業や濃縮操作が繁雑であり、IC法はGLYPの分解物を測定できないという問題点がある。また、近年、水溶性物質に有用であるLC/MS法<sup>11)</sup>による分析

法が報告されているが、GLYPは両性イオン化合物であるためエレクトロスプレーイオン化法(ESI)、大気圧化学イオン化法(APCI)共にイオン化が非常に困難であることから、大量注入若しくは固相カラムによる濃縮操作が必要である。そこで、健康危機発生時の対応のために、より簡便で迅速な分析法の開発が望まれている。

今回、我々は、有機リン系農薬の分子中に含まれるリン(P)に着目し、PO<sup>+</sup>を定量イオンとした液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析(LC/ICP/MS)法を開発し、直接注入による簡易・迅速な分析が可能となったので報告する。

また、当所では、水質管理目標設定項目に加え県内繁用農薬の分析法の検討開発にも努めていることから、GLYPに加え有機リン系農薬であるグルホシネート(GLUF)及びホセチルの同時測定に、本方法を応用したので併せて報告する。

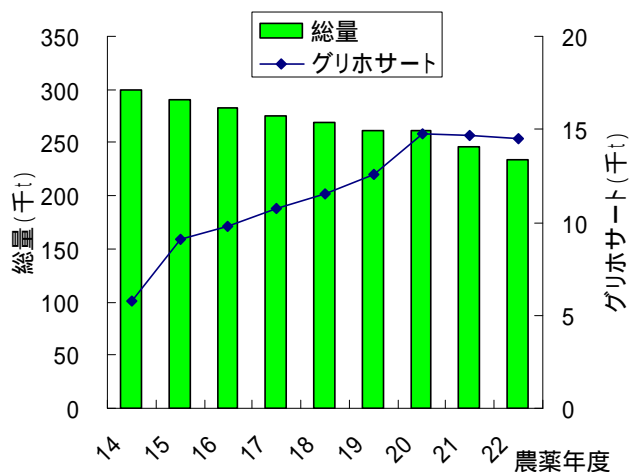


図1 全国の農薬出荷量及びグリホサート出荷量

表1 測定条件

【LC】	
カラム	IonPac AS12A (4.0×200mm)
移動相	0.1% (v/v)ギ酸 (0.135% (v/v)ギ酸) <sup>※1</sup>
カラム温度	40℃
流速	0.8ml/L
注入量	20μL (100μL) <sup>※1</sup>
【ICP-MS】	
プラズマ出力	1600W
プラズマガス流量	18.0L/min
ネブライザーガス流量	1.14L/min
セルガス量	0.8ml/min
モニター質量数	m/z=47 ( <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>+</sup> )
測定モード	DRC(リアクションガス:O <sub>2</sub> )

※1:リン酸イオン濃度が高い、もしくは低濃度測定の場合

## 材料と方法

### 1 装置

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695 (Waters社製)を、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)はNexION300X (PerkinElmer社製)を用いた。

### 2 測定条件

測定条件を表1に示す。

### 3 試薬

GLYP標準品、アミノメチルリン酸(AMPA)標準品、GLUF標準品、3-(メチルホスフィニコ)プロピオン酸(MPPA)標準品、ホセチル標準品は残留農薬分析用(和光純薬工業株式会社)を使用した。ギ酸は生化学試験用(ナカライテクス株式会社)を使用した。ろ過には0.45μmのメンブランフィルターを使用した。標準液は、精秤したGLYP, AMPA, GLUF, MPPA, ホセチル標準品10mgを精製水でそれぞれ別のメスフラスコ10mlに定容し、標準原液(1mg/ml)を調製後、精製水で適宜希釈し混合標準液を調製した。なお、GLYP, AMPA, GLUF, MPPA, ホセチルの構造式については、図2に示す。

### 4 実験操作

試料液は、必要に応じて0.45μmのメンブランフィルターでろ過したものを使用した。

## 結果及び考察

### 1 LC/ICP/MS測定条件の検討

当所で水道水水質検査に使用しているICP-MS (NexION300X)は、セルにガスを送り込むことにより、コリジョンモード及びリアクションモードでの測定が可能である。今回測定対象とした<sup>31</sup>P<sup>+</sup>は、そのままでは溶離液中

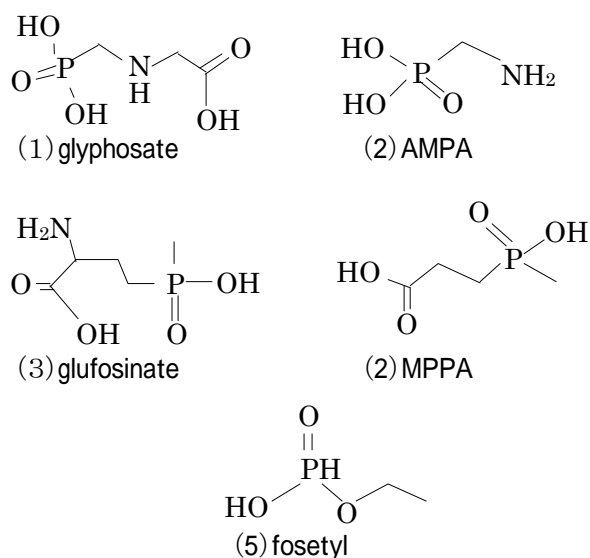


図2 分析農薬等の構造式

又は大気中の窒素元素の酸化物 $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ のスペクトル干渉によりベースラインが上昇して測定が困難であったため、リアクションガスとして酸素を用い、 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ として測定することとした。

(1) LCの検討

イオン交換カラムとして5種のカラム (IonPac AS11, AS11-HC, AS12A, AS14A, AS18) で検討を行った。その結果, AS11-HC及びAS11ではGLYPのピークがテーリングし, 溶離液条件を変更しても良好なピークが得られなかった。またAS14Aでは, 溶離液の条件を変更してもGLYPとMPPAのピークを完全に分離することはできなかった。AS18では, 各物質を良好に分離することができたが, ホセチルの溶出に40分以上を要し, 迅速な分析法としては適当でなかった。一方, AS12Aカラムでは, 低濃度のギ酸で良好な分離が得られピーク形状も良好であったため, 今回はAS12Aカラムでさらに測定条件の検討を行った。

GLYPは, pKaが4種存在し(図3), その挙動は複雑である。予備実験で, 移動相のpHが大きいとピークがテーリングし測定が困難であったため, GLYPの酸性基を少なくするためpHを小さくする必要があることが分かった。そこ

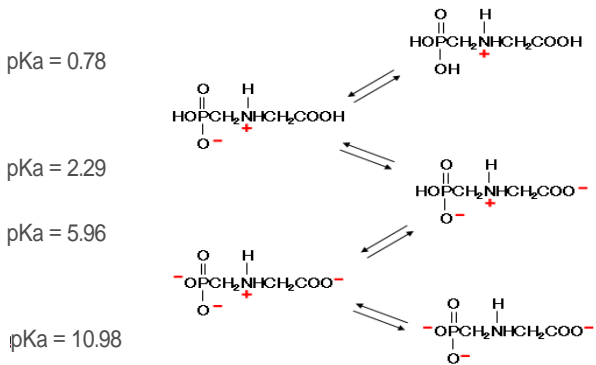


図3 グリホサートのpKa

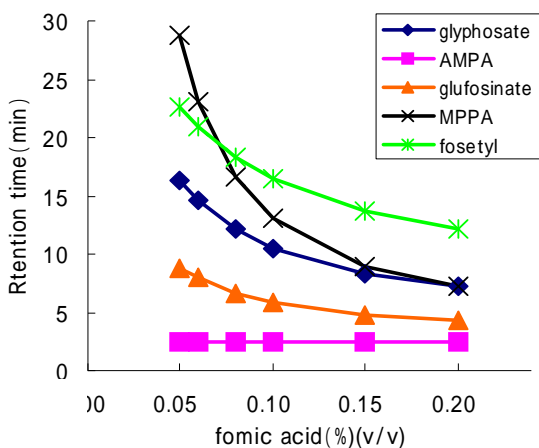


図4 溶離液中のギ酸濃度と溶出時間の関係

で溶離液にはギ酸を用いて検討することとした。図4に溶離液中のギ酸濃度を変化させたときの溶出時間の結果を示す。各物質ともギ酸濃度が高くなるに従い早く溶出した。MPPAについては, 他の4物質に比べギ酸濃度の変化に対する溶出時間の変化の割合が大きくなっている。一般的にイオン交換カラムによる分離では, 溶離液濃度の対数と保持時間の対数は直線関係にあり, その傾きはイオンの価数に比例する<sup>12)</sup>が, MPPAは図4に示す移動相の条件下において2価の陰イオンとなっているため, 他の物質と異なる挙動を示していると思われた。これらのことから, すべての物質が良好に分離するギ酸濃度0.1%を溶離液とした。

(2) 検量線及び定量限界

5種類の標準物質について0.2~2.0及び1~50mg/Lの範囲で検量線を作成した。その結果を図5に示す。それぞれの物質について相関係数は0.999以上であり, 良好な直線性を示した。なお, S/N=10による定量下限値は0.2mg/Lであった。

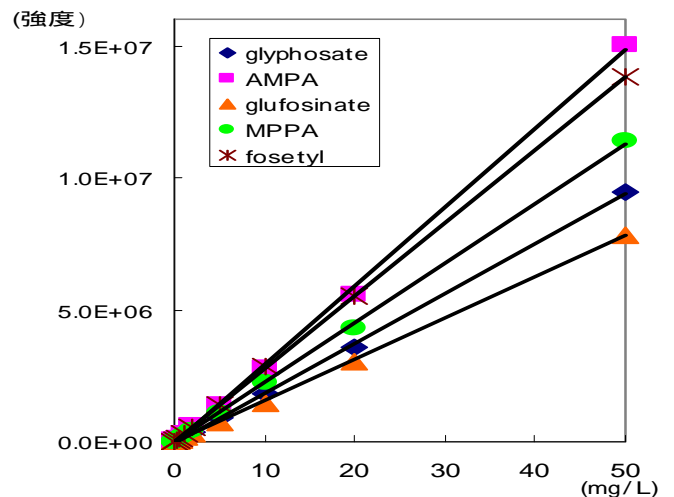
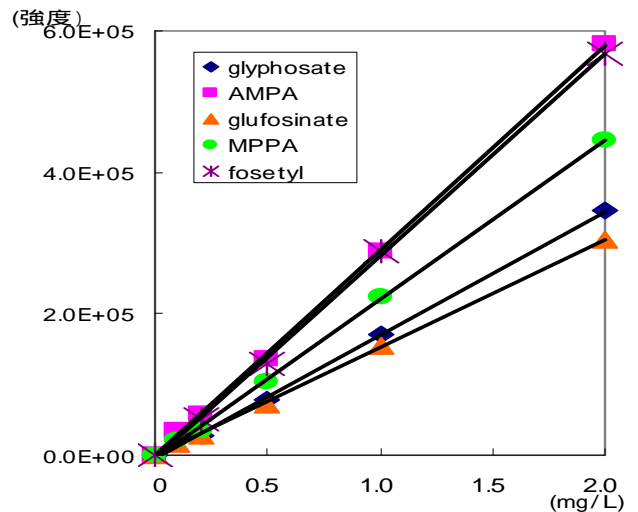


図5 各標準物質の検量線

(上段:0.2~2.0mg/L, 下段:1~50mg/L)

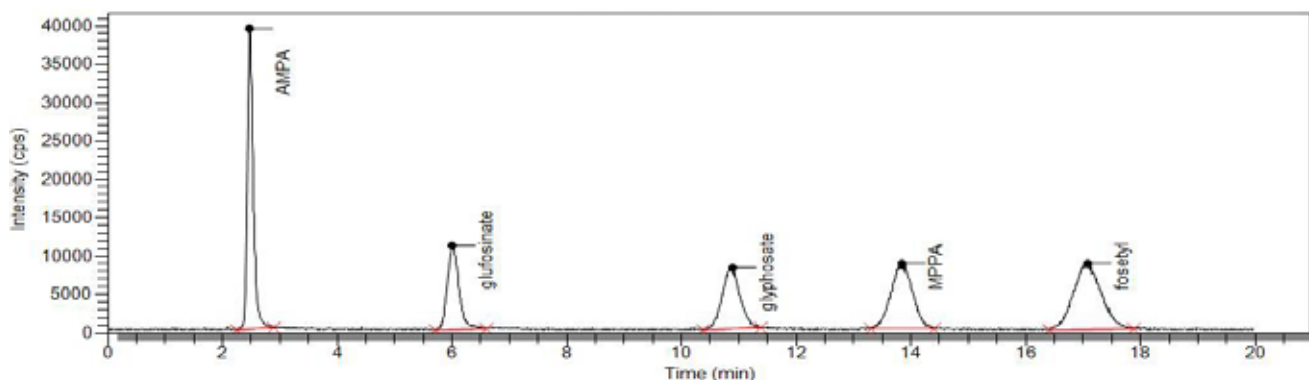


図6 混合標準液(1.0mg/L)のクロマトグラム

表2 添加回収結果

農薬名	添加量 (mg/L)	地下水		河川水	
		回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
グリホサート	1.0	96.9	1.8	91.6	2.6
AMPA	1.0	98.0	2.1	101.0	2.5
グルホシネート	1.0	92.5	2.0	92.1	3.8
MPPA	1.0	96.3	3.2	97.2	1.6
ホセチル	1.0	96.2	3.3	93.9	2.9
(n=6)					

農薬名	添加量 (mg/L)	地下水		河川水	
		回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
グリホサート	10.0	94.8	2.1	94.3	1.9
AMPA	10.0	100.9	1.5	95.8	1.5
グルホシネート	10.0	97.1	2.3	97.3	1.9
MPPA	10.0	99.9	1.7	98.2	1.5
ホセチル	10.0	99.0	1.3	97.2	1.4
(n=6)					

### (3) 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため、水道水の原水を想定し地下水及び河川水(石手川上流水)に添加量として1.0及び10mg/Lとなるよう標準液を添加して測定し、回収率及び相対標準偏差を求めた。そのクロマトグラムを図6に、添加回収実験の結果を表2に示す。その結果、1.0mg/L添加では、回収率91.6~101.0%、相対標準偏差1.6~3.8%、10mg/L添加では、回収率94.3~100.9%、相対標準偏差1.3~2.3%と良好な結果を示した。

### 2 水質管理を目的とした低濃度における分析法

ここまでの検討結果により、GLYPを含む有機リン系農薬等5種類について0.2~50mg/Lの範囲で迅速な定量が可能となり、緊急時対応に有効であることが確認できた。

しかし、水質管理目標設定項目と位置づけられている農薬は、総農薬方式を採用しているため、目標値の1/100の濃度を定量下限値とすることが求められている。このため、水質管理目標設定項目に位置づけられているGLYP及びホセチルについては、定量下限値を

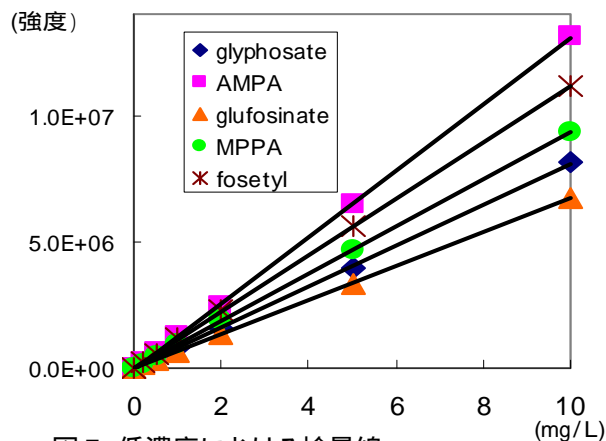
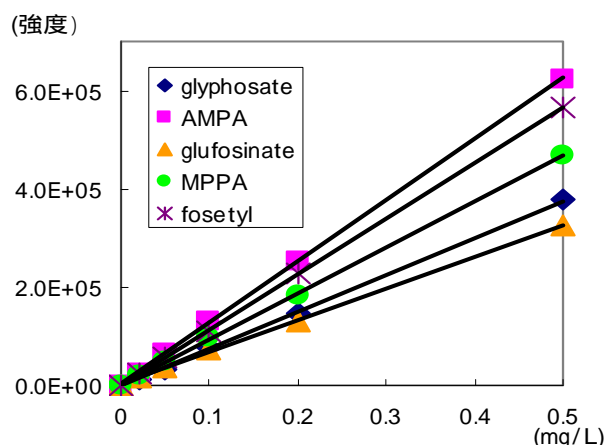


図7 低濃度における検量線

(上段:0.02~0.5mg/L, 下段:0.2~10mg/L)

0.02mg/Lとする必要がある。

そこで、さらに低濃度域における分析法を検討した。

#### (1) LC条件の検討

表1の測定条件のうち、注入量を100μLとし測定した結果、0.02mg/Lの濃度についてS/N=10以上の感度が得られたため、注入量は100μLとした。

次に、地下水に各物質を0.2mg/L添加したものを100μL注入し測定した結果、MPPAのピークの後に小さなピークが現れ完全に分離することができなかった。このピークは

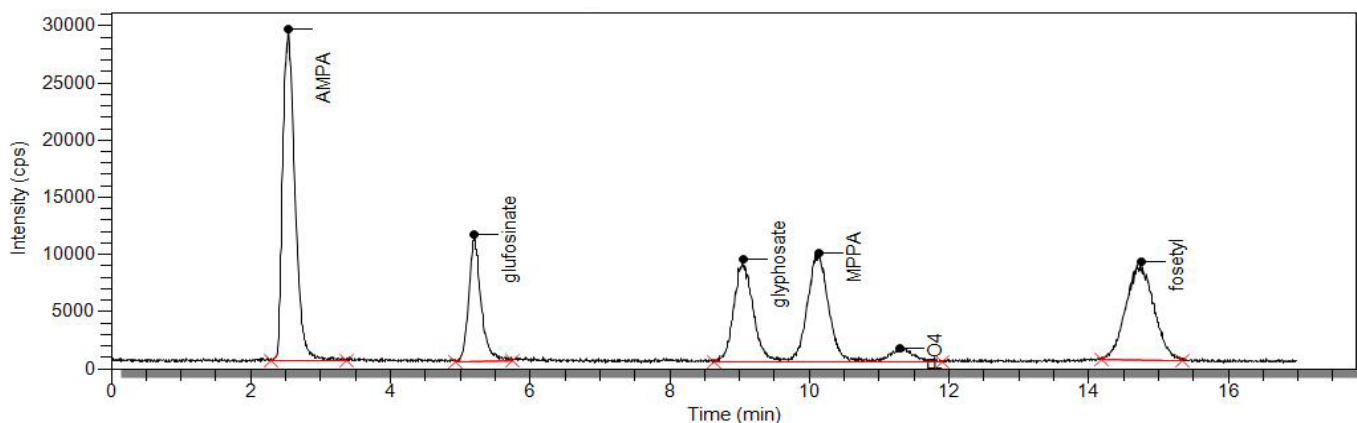


図8 地下水のクロマトグラム (混合標準液 0.2mg/L添加)

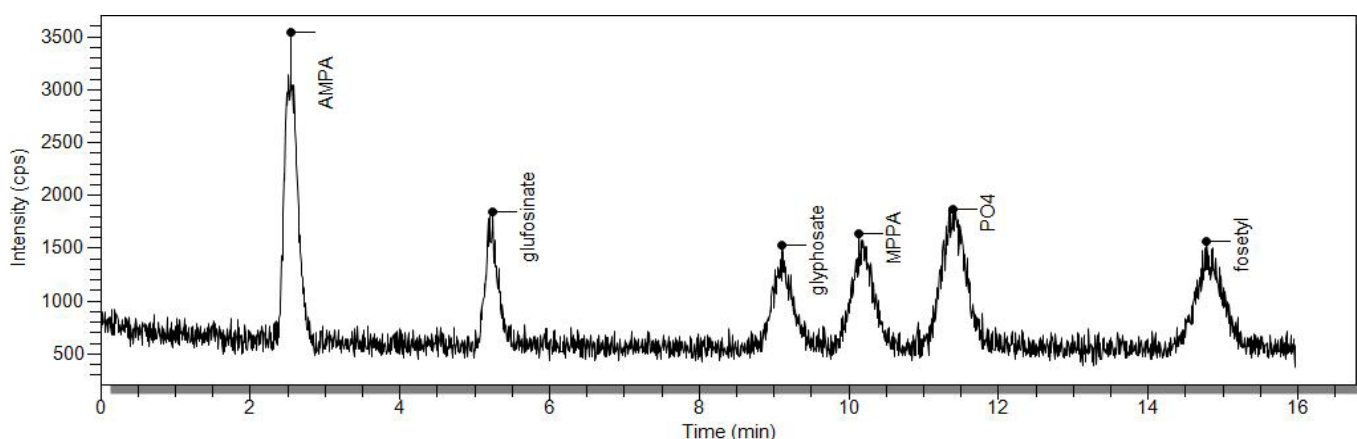


図9 混合標準液(0.02mg/L)及びリン酸イオン 0.02mg/Lのクロマトグラム

表3 添加回収結果

農薬名	添加量 (mg/L)	地下水		河川水	
		回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
グリホサート	0.2	109.0	2.5	102.8	2.8
AMPA	0.2	101.4	2.0	96.5	2.7
グルホシネート	0.2	93.1	1.8	101.2	0.8
MPPA	0.2	99.5	2.9	97.2	1.1
ホセチル	0.2	103.0	3.2	101.5	1.2

(n=6)

自然界にも微量存在するリン酸イオンであることが分かった。そこで、移動相のギ酸濃度を0.135%もしくは0.09%とすることにより、完全にMPPAのピークと分離することができた。以上のこと及び分析時間を短縮するため、溶離液中のギ酸濃度は0.135%とした。

### (2) 検量線及び定量限界

5種類のそれぞれの物質について0.02から10mg/Lの範囲で検量線を作成した。その結果を図7に示す。それぞれの物質について相関係数は0.999以上であり、良好な直線性を示した。なお、試験の再現性を確認するため、0.02mg/Lの標準溶液を6回繰り返し測定したところ、5物質の相対標準偏差は1.7~13.2%と20%以内であり良好な結果を示した。

### (3) 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため、水道水の原水を想定し地下水及び河川水(石手川上流水)に添加量として0.2mg/Lとなるよう標準液を添加して測定し、回収率及び相対標準偏差を求めた。そのクロマトグラムを図8に、添加回収実験の結果を表3に示す。その結果、回収率93.1~109.0%、相対標準偏差0.8~3.2%と良好な結果を示した。なお、定量下限値のクロマトグラムは図9に示す。

以上のことから、今回新たに開発した方法は実試料に対して精度及び再現性よく適用できることが明らかとなった。GLYPのように高極性で紫外吸収がなく、また両性イオンであるためLC/MS分析において用いられるESIやAPCIによるイオン化が困難である物質については、通常、誘導体化又は濃縮操作を行う必要があった。これらの問題を解決するため、イオン交換カラムを用いてLC/ICP/MSによる検討を行った結果、従来法に比べ簡易迅速に行うことができた。今後、水質管理や緊急時対応等で有効に活用できると考える。

## まとめ

水道水中の有機リン系農薬及びその分解物(GLYP, AMPA, GLUF, MPPA, ホセチル)の分析法として、イオン交換カラムを用いたLC/ICP/MS法による分析法を検討した結果、次のことが明らかとなった。

- 1 イオン交換カラムを用いたLC/ICP/MSにより、GLYPのような紫外外部吸収がなく両性イオンである物質を感度良く測定することが可能となった。
- 2 リアクションモードで酸素を付加し、 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ を定量イオンとすることにより高感度な分析が可能であった。
- 3 本法により作成した検量線は、注入量20 $\mu\text{L}$ では0.2～50mg/L,注入量100 $\mu\text{L}$ では0.02～10mg/Lの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。
- 4 地下水及び河川水に標準品を添加し、本法により定量したところ、回収率は91.6～109.0%, 相対標準偏差0.8～3.8%と良好な結果を示した。
- 5 GLYPについては、通知法にある誘導体化等の複雑な操作を必要とせず、ろ過後直接注入することによる分析が可能であった。
- 6 GLYP及びホセチルについては、目標値の1/100の濃度まで定量が可能であった。

## 文献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修：農薬要覧，日本植物防疫協会（2004～2011）
- 2) 大野智也佳 ほか：食衛誌，40，75-79(1999)
- 3) 高橋邦彦 ほか：食衛誌，42，304-308(2001)
- 4) 天川映子 ほか：東京健康安全研究センター年報，57，235-238(2006)
- 5) 吉岡千尋 ほか：分析化学，55，177-184(2006)
- 6) 中西希代子 ほか：千葉県衛生研究所年報，57，39-43(2008)
- 7) 大谷仁己 ほか：水環境学会誌，20，108-111(1997)
- 8) 渡辺貞夫：食衛誌，45，38-43(2004)
- 9) 木野善夫：和歌山県衛生研究所年報，13，42-45(2001)
- 10) 中岡加陽子 ほか：和歌山県衛生研究所年報，56，41-45(2010)
- 11) 環境部門：京都市衛生公害研究所年報，74(2007)
- 12) 金井豊：地質調査所月報，38，587-600(1987)