

## 水中フィプロニルの固相抽出-GC/MS法による 高感度分析法の開発に関する研究

川元達彦\* 矢野美穂 英保次郎

### Development of a Highly Sensitive Method for Analysis of Fipronil in Water by Solid Phase Extraction and GC/MS Methods

Tatsuhiko KAWAMOTO\*, Miho YANO and Jiro EIHO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of  
Public Health and Environmental 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, Fipronil, in water by solid phase extraction and GC/MS methods. In order to evaluate the analytical method, we conducted recovery experiments from distilled water, tap water and river water samples using a PS-2 column. The recovery rate was greater than 90% and the coefficient of variance was under 3%. The determination limit by this method was 0.003 $\mu$ 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 Fipronil is over a range from ND to 0.017 $\mu$ g/L. However, the detection of Fipronil in water sources was a significantly high rate of 40%.

#### I はじめに

2004年4月に改正・施行された水道法水道水質基準<sup>1, 2)</sup>において、農薬類は水質管理目標設定項目として101項目の目標値が設定<sup>3)</sup>され、農薬の毒性を総合的に評価しうる総農薬方式が初めて水道水の水質基準に導入された。一方、水質基準の逐次改正方式の考え方のもと、2006年8月には第5回厚生科学審議会生活環境水道部会において、新しい農薬フィプロニル（殺虫剤、目標値案0.0005mg/L）の追加が審議され、2008年より新規項目として設定されることとなった。この農薬は毒性が強い

ものの、水道水中で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例は殆ど認められない。

我々は、既に多くの農薬類について、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・低減化策を明らかにし、兵庫県の水道水の安全確保対策に寄与してきた<sup>4-6)</sup>。本研究では、新たに規制項目となるフィプロニルについて、我々が開発した固相抽出-TPI (Temperature Programmable Inlet) オンカラム注入-GC/MS法<sup>4-6)</sup>を適用した結果、良好な成績が得られたので報告する。

また、基準改正に先駆けて水道水の安全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<sup>7, 8)</sup>に基づいた監視地点におけるフィプロニルの測定結果についても併せて報告する。

水質環境部

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究センター

水質環境部 川元達彦

## II 材料と方法

### 1. 試料

1) 農薬: Fig. 1 に示す構造式を有するフィプロニルを分析対象とした。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, 各種実験に必要な標準溶液を調製した。内部標準物質9-プ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, 実験に必要な内部標準溶液として調製した。

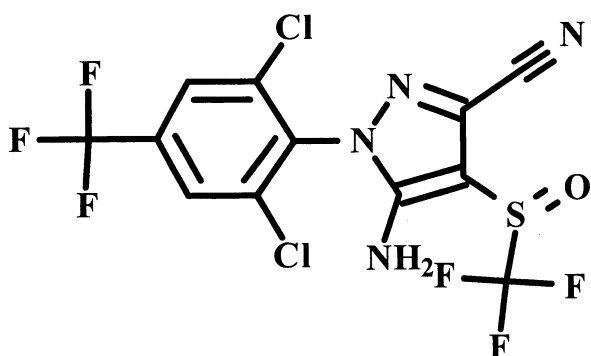


Fig. 1 Chemical structure of Fipronil  
MW: 437.2, C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>OS, logPow: 4,  
ADI: 0.0002mg

- 2) 精製水: 水道水をAuto Still (Yamato WG220) で加熱蒸留した後, Milli-Q SP TOC (Millipore社製) で精製したものをを用いた。
- 3) 水道水は県立健康環境科学研究所センターの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1Lに10mg添加) 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, 神戸市内のA区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: 残留農薬用の無水硫酸ナトリウム (和光純薬社製) は電気炉で500℃, 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) を用いた。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<sup>9)</sup> に準拠して分析した。

2. 装置: 農薬の抽出装置はVac Elut SPS 24 (Varian社製) を用いて, 抽出操作を行った。質量分析計付ガスクロマトグラフはFinnigan社製のイオントラップ型GCQを用いた。

3. 水中フィプロニルの固相抽出-TPIオンカラム注入-GC/MS分析

水中農薬の固相抽出は既報<sup>10)</sup> に従って行った。固相抽出法の概略をFig. 2 に示し, その概要を以下に示した。

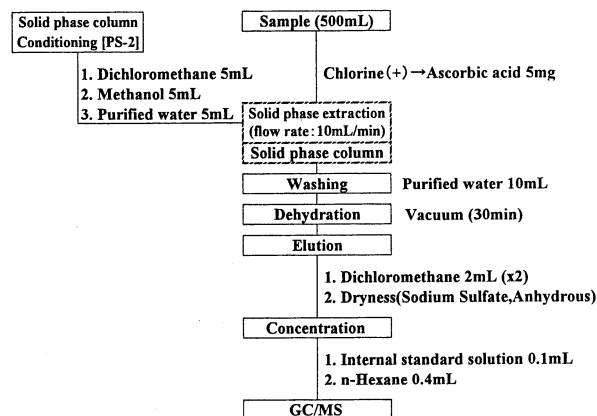


Fig. 2 Analytical procedures for Fipronil

試料水500mL (フィプロニルとして0.005, 0.05, 0.5 μg/Lを含むように精製水, 水道水, 河川水に標準溶液を添加) を固相抽出カラム (PS-2, Waters社製) に流速10mL/min以下で通水した。PS-2カラムは窒素パージにて30分間乾燥させた後, ジクロロメタン (2 mL, 2回) により農薬を溶出させた。2回の抽出液を合わせて, 無水硫酸ナトリウムにより脱水後, 窒素ガス気流下にて1 mLまで濃縮した。その後, n-ヘキサンに転溶後, 窒素気流下にて濃縮後, 内部標準物質9-プロモアントラセン0.1mL (1 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, 0.003~0.500mg/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, フィプロニルに特徴的なイオン (m/z367, 369, 371) を選択 (選択的検出法, SIM法) し, 内部標準物質でMSの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実験の平均回収率と変動係数は, 3回の繰り返し実験により求めた。

Table 1 GC/MS operation conditions

<b>【GC】</b>
Injection method: TPI on column injection
Injection temp.: 40°C (1min) -80°C/min-240°C(42min)-80°C/min-320°C(2.5min)
Coolant: liquid CO <sub>2</sub>
Oven temp.: 40°C(4min)-20°C/min-180°C-2°C/min-200°C(5min)-2°C/min-240°C-20°C/min-320°C
Carrier gas: Helium, 40cm/sec(EPC)
Column:DB-5ms(film thickness: 0.1μm, l: 30m, i.d.: 0.25mm)
<b>【MS】</b>
Ion source temp.: EI; 200°C,
Transferline temp.: 275°C
Emission current: 285μA
Ionization volt: 70eV
Mass range: 50-500(m/z)

#### 4. 水道原水中のフィプロニル含有量調査

兵庫県水道水質管理計画<sup>8)</sup>に基づいた水質監視地点のうち、監視14地点および関連1地点の計15地点(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,2007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・溶出し,濃縮液に内部標準物質0.1μgを添加し,正確にn-ヘキサンで0.5mLとしたものを分析用検液とした。

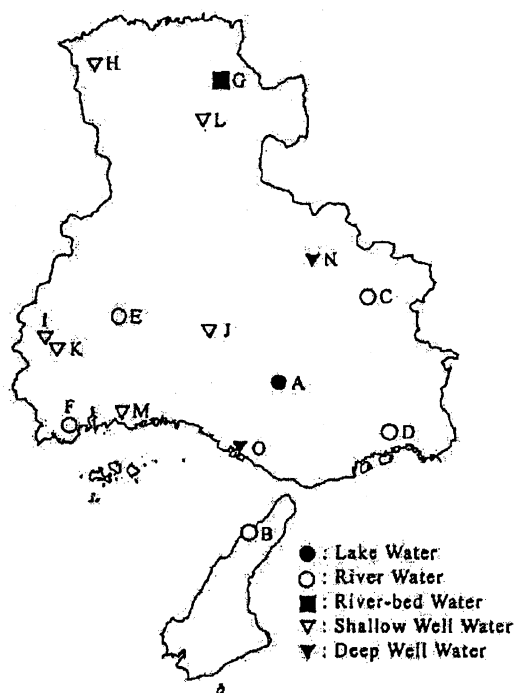


Fig. 3 Location of sampling points

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,フィプロニルに特徴的なイオン(m/z367, 369, 371)を選んで,SIM法による測定を行った。

### III 結果および考察

#### 1. 固相抽出-TPIオンカラム注入-GC/MS法によるフィプロニルの分析法の条件設定について

##### 1) 固相抽出カラムによる前処理法の検討

今回,水中フィプロニルの抽出・精製を目的とした固相カラムとして,他の農薬類と一斉分析<sup>4-6)</sup>に加えることを目的としたため,ポリスチレンジビニルベンゼン共重合体のPS-2カラムを用いて検討した。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フィプロニル0.5μg/Lとなるように添加して回収率を検討した結果,平均回収率(n=3)として,それぞれ98.4, 98.7, 101.6, 96.4%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,本実験結果から,原水のpH調整の必要性は認められず,採水した試料水を直接,固相抽出カラムに供与し,フィプロニルの濃縮・精製操作を実施できることが分かった。

##### 2) 分析条件等の検討

農薬の熱に対する安定性を考慮して,TPIオンカラム注入法を採用した。すなわち,ガスクロ注入口で不安定なトリクロロホンやメチルダイムロンなど水道水として規制されている多くの農薬と共に,効率的にフィプロニルを一斉に分析することが必要であるため,TPIオンカラム注入法を用いた<sup>4-6)</sup>。今回,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,フィプロニル標準溶液(0.5mg/L)を注入し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にフィプロニルと内部標準物質9-ブromoアントラセンのトータルイオンクロマトグラムを示したが,ピーク形状や分離は良好であった。また, Fig. 5にフィプロニルのマススペクトルを示した。フィプロニルのEI(電子衝撃)法による分子イオンピークは殆ど認められず,ピラゾール骨格の4位に結合したトリフルオロメチルスルフィニル基内の[-SO-CF<sub>3</sub>]のうち,CF<sub>3</sub>結合が切断された[M-CF<sub>3</sub>]<sup>+</sup>であるm/z367, 369, 371(同位体)の特徴的なイオンが認められ,m/z367は最も強いイオン強度として認められた。マ

トリックスが多い試料の場合、このイオンが定量イオンとして特に有効であることを確認できた。

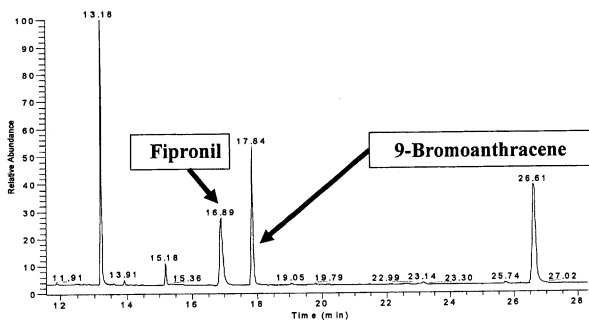


Fig. 4 Total ion chromatogram of Fipronil and 9-Bromoanthracene

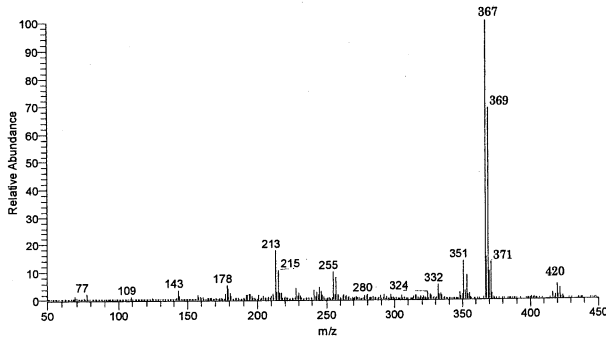


Fig. 5 Mass spectrum of Fipronil  
quantitative ion: m/z367, 369, 371

以上の検討結果から得られたフィプロニルのモニターイオン、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Table 2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1.0000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 Fipronil measurement

monitor ion (m/z)	Retention time (min)	Regression curve *	Correlation coeff.
367, 369, 371	16.89	y=690.83x-2080.1	1.0000

\* : Conc. 0.003-0.500mg/L(7 points: 0, 0.003, 0.005, 0.010, 0.05, 0.100, 0.500mg/L)

以上のことから、TPIオンカラム注入法がフィプロニルの分析に対しても、有効な分析方法であることが示された。

### 3) 添加回収実験

固相抽出-GC/MSの一斉分析による水中農薬の定量性および再現性を把握するため、試料水(蒸留水, 水道水, 河川水)を使った場合の回収率とその変動係数を求めた。

蒸留水, 水道水および水道原水(河川水) 500mLに農薬標準溶液0.0025 $\mu$ g, 0.025 $\mu$ g, 0.25 $\mu$ gを添加した

試料水を用いて、添加回収実験を行った。それらの回収率と変動係数の結果をTable 3に示す。

Table 3 Recoveries of Fipronil in water

Conc. ( $\mu$ g/L)	Dist. water		Tap water		River water	
	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
0.005	99.2	1.0	96.7	1.3	90.8	2.8
0.05	99.3	2.1	96.5	1.5	96.3	0.9
0.5	101.6	1.4	101.2	2.4	101.6	2.9

Dist. water : pH7.0, SS ; <1.0mg/L, n=3

Tap water : pH6.9, SS ; <1.0mg/L, n=3

River water : pH6.9, SS ; 3.2mg/L, n=3

R(%): recovery, CV(%): coefficient of variation

蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.005 $\mu$ g/L添加した時の回収率の範囲は、90.8~99.2%であり、変動係数の範囲は1.0~2.8%であった。

また、蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.05 $\mu$ g/L添加した時の回収率の範囲は、96.3~99.3%であり、変動係数の範囲は0.9~2.1%であった。

さらに、蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.5 $\mu$ g/L添加した時の回収率の範囲は、101.2~101.6%であり、変動係数の範囲は1.4~2.9%であった。

このように、検討を行ったすべての試料水へ添加したフィプロニルの回収率は90%以上と良好であった。また、変動係数は3%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、フィプロニルは目標値0.5 $\mu$ g/Lの1/100の0.005 $\mu$ 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。本分析条件によるフィプロニルの定量下限は0.003 $\mu$ 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フィプロニルは全く含まれていないことも確認している。

一方、水道水中におけるフィプロニルの安定性実験として、残留塩素0.5mg/Lを含有する水道水にフィプロニルの目標値0.5 $\mu$ g/Lを添加し、30分間反応させた結果、32.5% (n=3)まで速やかに分解した。フィプロニルは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<sup>10)</sup>。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の進行することが推測される。

本研究結果から、フィプロニルは水道水中塩素で比較的容易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. 水道原水中のフィプロニル調査

兵庫県下の15ヶ所の水道原水について、フィプロニル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0.017 $\mu\text{g/L}$ が検出された。この濃度は水道水の目標値0.5 $\mu\text{g/L}$ の約3.5%のレベルであり、比較的低濃度レベルであった。しかし、全体の検出率は6/15(40%)と極めて高い値を示し、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検出されていることが分かった。

Table 4 Concentration levels of Fipronil in various water sources

Water sources	Concentration( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a)</sup>	Frequency
River water	N.D.	4/5
	0.004	
	0.005	
	0.012	
	0.017	
Lake water	N.D.	0/1
River bed water	N.D.	0/1
Shallow well	N.D.	2/6
	N.D.	
	N.D.	
	0.004	
	0.004	
Deep well	N.D.	0/2
	N.D.	
Total	N.D.-0.017	6/15

Sampling date : June 19, 2007

\* : Determination limit: 0.003 $\mu\text{g/L}$

以上、本研究結果から、原水中におけるフィプロニルの検出濃度は規制値と比べて低濃度レベルにあったが、検出率は極めて高く、注意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フィプロニルについて、固相抽出-TPI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. 水中フィプロニルの固相抽出カラムとして、ポリマー系のPS-2カラムを検討した結果、良好な抽出が可能であり、pH3.0~9.0の幅広い範囲においても抽出効率

に影響しないことも分かった。

2. さまざまな試料水(蒸留水、水道水、河川水)を用いて、フィプロニルの添加回収実験を行ったところ、回収率は90%以上と良好な結果が得られた。また、変動係数も3%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。本法によるフィプロニルの定量下限値は0.003 $\mu\text{g/L}$ であり、目標値0.5 $\mu\text{g/L}$ の1/100まで十分定量可能であった。また、本法を適用することで、他の農薬類との一斉分析が可能であることも分かった。

3. 本法を兵庫県水道水質管理計画に基づいた監視14地点および関連1地点の合計15地点の水道原水中フィプロニルの濃度調査に適用した結果、N.D.~0.017 $\mu\text{g/L}$ 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40%(15検体中6検体で検出)と極めて高く、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兵庫県健康生活部生活衛生課ならびに各市町水道事業所の皆様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」, 2003年5月30日, 厚生労働省令第101号
- 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」2003年10月10日, 健水発第1010001号
- 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」2003年10月10日, 健水発第1010004号
- 4) 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**, 1605-1610 (2003)
- 5) Kawamoto, T., Makihata, N., Tsuji, 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**, 401-411 (1999)
- 6) 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 on-column injection. *J. Chromatogr. A*, **1074**, 155-161 (2005)
- 7) 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, 2004年1月22日, 健水発第0122002号
- 8) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 「兵庫県水道水質管理計画」, 1994年3月策定(第1次), 2005年9月策定(第2次)
- 9) 日本水道協会編: 上水試験方法2001年版, P107-114, P119-120, P247-257, 日本水道協会出版, 東京(2001)
- 10) 川元達彦, 巻幡希子: 水道水質基準に新しく規制されたゴルフ場使用農薬の同時分析法の検討. 兵庫衛研年報, **34**, 176-183 (1999)
- 11) 新井崇子, 鎌田素之, 島崎大, 浅見真理, 相澤貴子: 農業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**, 437-444 (2005)