

## 奈良県内河川におけるPFOS及びPFOAの環境実態調査（2021年度）

浦西克維・城山二郎

Environmental Survey of Perfluorinated Organic Compounds in the Rivers of Nara Prefecture

URANISHI Katsushige and SHIROYAMA Jirou

## 緒言

ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）等の有機フッ素化合物（PFCs）は撥水・撥油性、熱化学的安定性といった物性を示すことから、撥水撥油剤、界面活性剤、半導体用反射防止剤、金属メッキ処理剤、水成膜泡消火剤、殺虫剤及び、調理用器具のコーティング剤等の幅広い用途で使用されている。PFCsには炭素鎖の長さが異なる複数の同族体が存在し、その物性は炭素鎖の長さで大きく異なる。炭素数が8のPFOSは、その有害性や蓄積性等から、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（以下「POPs条約」という）の第4回締約国会議（2009年5月4日～5月8日に開催）で附属書Bへの追加掲載が決定され、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律施行令の改正（2010年4月1日施行）により第一種特定化学物質に指定された。また、PFOAは、POPs条約の第9回締約国会議（2019年4月29日～5月10日に開催）において、附属書A（廃絶）に追加されることが決定した。これを受けて、国内では、2020年4月に厚生労働省がPFOS及びPFOAを水道水質基準の水質管理目標設定項目に位置づけ、PFOS及びPFOAの合計値として暫定目標値50 ng/Lを設定したほか、環境省も同年5月にPFOS及びPFOAを人の健康の保護に関する環境基準の要監視項目として、指針値（暫定）として0.00005 mg/L（50 ng/L）以下と設定したところである。

PFOS及びPFOAの国内環境実態については、2000年代前半以降から数多く報告<sup>1-5)</sup>されている。国内河川・湖沼79カ所を対象とした調査では、近畿地方の汚染レベルが高く、特にPFOAの高濃度汚染実態が報告<sup>6)</sup>されているほか、近畿地方の住民の血液中PFOS及びPFOA濃度が他地域住民に比べて高いとの報告<sup>2)</sup>もある。また、地方環境研究所等による調査により、2010年代前半には奈良県を含め近畿地方におけるPFOS及びPFOAの環境汚染実態が明らかとなった<sup>3-7)</sup>。これら調査から

数年後に環境省による令和元年度PFOS及びPFOA全国存在状況把握調査<sup>8)</sup>が実施された。その結果、調査を実施した171地点（河川106地点、地下水46地点他）中、13都府県の37地点において、指針値（暫定）の超過が確認され、奈良県内の河川でも指針値（暫定）の超過が確認された。

そこで本報では、県内におけるPFOS及びPFOAの環境実態を把握するため、県内の河川環境基準点を中心とした調査を実施したので報告する。

## 方法

## 1. 調査対象・時期

2021年11月～12月に採取した大和川水系16地点、紀の川水系4地点、淀川水系13地点の水試料（計32箇所）を対象とした。

## 2. 測定対象物質

表1に示すPFOS及びPFOAを対象とした。

## 3. 試薬及び標準品

アセトニトリル、メタノール及び超純水はPFOS/PFOA分析用を、酢酸アンモニウム溶液はLC-MS分析用（全て富士フイルム和光純薬社製）を用いた。また、標準液として富士フイルム和光純薬社製PFOS標準液（100 µg/mL）及び、PFOA標準液（100 µg/mL）を用いた。内部標準物質（サロゲート）はCambridge Isotope Laboratories社製 同位体ラベル化PFOS/PFOA混合標準液（2,000 ng/mL）を用いた。

## 4. 装置、器具

固相抽出カラムは、Waters HLB Plusを用いた。本固相抽出カラムは、メタノール、超純水各5 mLを順次吸引注入して活性化、洗浄した後、使用した。

LC-MS/MSはWaters社製ACQUITY UPLC及びXevo TQ MSを使用した。

## 5. 分析方法

図1に分析フローの概略を示す。試料200 mLを200 mLトールビーカーに取り、サロゲート混合液（1 µg/

表1 測定対象物質

	RT (min)	MRM (m/z)	Collision Energy (eV)
PFOS	6.5	499 > 80	39
	6.5	499 > 99	38
PFOS- <sup>13</sup> C <sub>8</sub>	6.5	507 > 80	39
	6.5	507 > 99	39
PFOA	5.8	413 > 369	10
	5.8	413 > 169	19
PFOA- <sup>13</sup> C <sub>8</sub>	5.8	421 > 376	10
	5.8	421 > 172	10

※灰色セルが定量イオン，白色セルが定性イオン

表2 LC-MS/MS 分析条件

LC-MS/MS	
LC system	Acquity UPLC system (Waters)
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm, 2.1 × 100 mm
Mobile Phase	A: Acetonitrile B: 10 mM Ammonium acetate (aq)
Percentage of mobile phase B	95% (0 min) → 95% (2.0 min) → 5% (7.0 min) → 5% (12 min) → 95% (12.1 min) → 95% (17 min)
Flow Rate	0.3 mL/min
Column Temp	40 °C
Injection Volume	2 μL
MS/MS system	Xevo TQ MS (Waters)
Ionization mode	ESI-Negative
Capillary voltage	2.0 kV (Positive, Negative)
Source temperature	120 °C
Desolvation Temp	450 °C
Desolvation gas	Nitrogen, 1200 L/hr

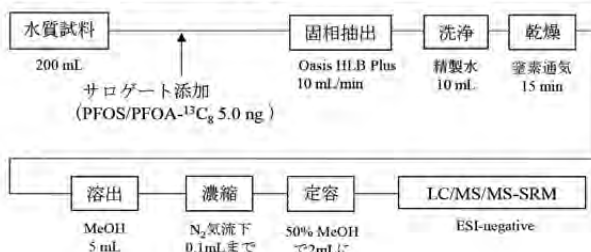


図1 分析法のフローチャート

mL) 50 μLを添加した。次に、ローラーポンプを用いて流速10~20 mL/minで試料を固相抽出カラムに通水させた。試料通水後、10 mLの超純水で固相抽出カラムを洗浄した。その後、固相抽出カラム内の水分を除去するため、遠心分離 (3,000 rpmで10分程度) 及び、窒素ガスの通気を15分程度おこなった。乾燥させた固相抽出カラムにメタノール5 mLを緩やかに流下させ、目盛付き試験管に溶出させた。溶出液に窒素ガスを緩やかに吹き付け、メタノールが0.1 mL程度残るまで濃縮した後、メタノール/水 (1:1 v/v) を加えて正確に1 mLに定容し、試験溶液とした。試験溶液は、LC-MS/MSを用いて表1, 2に示す条件で分析し、内部標準法で

定量した。PFOS及びPFOAは炭素鎖が直鎖状に結合したもの (以下「直鎖体」という) の他に、炭素鎖が分岐した構造異性体 (以下「分岐異性体」という) が存在する。試料中の直鎖体と分岐異性体の検出ピークを明確に分離することが困難であったため、直鎖体と分岐異性体の感度は同等であると仮定し、直鎖体の標準品で作成した検量線を用いて、分岐異性体を含めたPFOS及びPFOA濃度を求めた。PFOS及びPFOAの定量下限値はそれぞれ2.5 ng/Lとした。

## 6. 分析法の妥当性確認

超純水200 mLに各標準液 (10 ng/mL) 50 μL及び、同位体ラベル化PFOS/PFOA混合標準液 (1,000 ng/mL) 50 μLを添加し、模擬試料とした。模擬試料による添加回収試験 (試行回数3回) を実施し、回収率の平均値から分析法の妥当性確認を実施した。

## 7. PFOS/PFOA検出状況の集計

各試料中のPFOS及びPFOA検出状況について、過去の検出値<sup>3,8)</sup>を含めて集計した。

## 結果と考察

### 1. 分析法の妥当性確認結果

PFOS 及び PFOA の添加回収試験結果は 107%、106% と良好な値を示し、分析方法の精度に問題がないことが確認された。

### 2. PFOS/PFOAの検出状況

地点別の PFOS/PFOA 検出結果を表3に示す。PFOSは大和川水系では15地点中12地点、淀川水系では13地点中2地点で検出し、その濃度分布はそれぞれND~10.3 ng/L, 3.1~4.1 ng/Lであった。紀の川水系4地点からはPFOSは検出されなかった。一方、PFOAは大和川水系では全15地点、紀の川水系では4地点中2地点、淀川水系では13地点中11地点で検出し、その濃度分布はそれぞれ11.0~102 ng/L, 2.9~4.8 ng/L, 3.5~43.4 ng/Lであった。各水系別平均濃度 (PFOS/PFOA; 単位 ng/L) を算出したところ、大和川水系 (5.0/29)、紀の川水系 (2.5/3.2)、淀川水系 (2.7/11) であり、両物質とも大和川水系における検出濃度が一般的に高い傾向にあることが判明した。一般的にPFOS, PFOAは幅広い用途で用いられている物質であり、人為的影響の大きい地点で検出することが想定される。大和川水系は奈良県人口の約89%が生活を営む大和平野地域の中心に位置していることから、他の水

表3 PFOS/PFOAの地点別検出状況(単位:ng/L)

地点名	河川・湖沼名	本調査(2021)			環境省調査(2019)			荒堀ら(2011)			
		PFOS	PFOA	PFOS +PFOA	PFOS	PFOA	PFOS +PFOA	PFOS	PFOA	PFOS +PFOA	
大和川水系	初瀬取入口	大和川	<2.5	11.0	13.5						
	みどり橋	布留川	<2.5	13.5	16.0						
	布留川流末	布留川	4.6	25.7	30.3						
	秋篠川流末	秋篠川	6.0	24.6	30.6			6.0	45.0	51.0	
	神道橋	飛鳥川	<2.5	17.5	20.0						
	曾我川橋	曾我川	3.7	59.7	<b>63.3</b>						
	吐田橋	寺川	6.4	25.4	31.7			<1	39.0	40.0	
	保田橋	飛鳥川	4.6	26.0	30.6			3.0	56.0	59.0	
	枯木橋	葛城川	4.8	21.1	25.9						
	里合橋	高田川	6.9	18.4	25.3						
	岡崎川流末	岡崎川	10.3	31.5	41.8	3.4	22.9	26.3			
	芝	富雄川	5.2	96.9	<b>102</b>	1.9	62.5	<b>64.4</b>	2.0	110	112
	弋鳥橋	富雄川	4.7	24.4	29.0				6.0	32.0	38.0
	竜田大橋	竜田川	4.6	26.8	31.4						
だるま橋	葛下川	5.9	26.4	32.4							
紀の川水系	檜井不動橋	紀の川	<2.5	<2.5	<5.0				<1	<1	<2.0
	秋野川流末	秋野川	<2.5	4.8	7.3						
	丹生川流末	丹生川	<2.5	2.9	5.4						
	大迫ダム湖ダムサイト	大迫ダム湖	<2.5	<2.5	<5.0				<1	<1	<2.0
淀川水系	新大東橋	宇陀川	<2.5	4.5	7.0						
	中山川流末	中山川	<2.5	37.0	39.5						
	笠間川(宇)流末	笠間川(宇)	<2.5	8.3	10.8						
	岩脇橋	芳野川	<2.5	<2.5	<5.0						
	木綿橋	芳野川	<2.5	5.5	8.0						
	宇賀志川流末	宇賀志川	<2.5	3.5	6.0						
	和田井堰	四郷川	<2.5	4.3	6.8						
	岩崎橋	四郷川	<2.5	5.2	7.7						
	母里川流末	母里川	4.1	11.4	15.5						
	天満川流末	天満川	3.1	7.1	10.2						
	島谷取水口	室生川	<2.5	<2.5	<5.0						
笠間川(木)流末	笠間川(木)	<2.5	43.4	45.9							
金比羅橋	遅瀬川	<2.5	10.4	12.9							

※PFOS+PFOAは、検出値が定量下限値未満の場合、定量下限値の数値を測定値とみなして算出。PFOS+PFOA欄における太字は指針値(暫定)を超過した値を示す。

系と比較して人為的な汚染が特に多い地域と考えられる。一方、紀の川水系及び、淀川水系は工場・事業場等が少ない中山間地域の割合が多く、河川水量に対する汚染負荷量が少ないことが水系別平均濃度の違いに反映されたと考えられた。2011年度の調査<sup>3)</sup>においても、紀の川、新宮川といった山間地域を流れる河川中のPFOS及びPFOA濃度は不検出もしくは、ごく低濃度の検出に留まっていたが、富雄川(大和川水系)の芝ではPFOAが110ng/Lと高い濃度を検出した。芝は2019年の調査<sup>8)</sup>で62.5ng/L、本調査で96.9ng/L検出しており、PFOA単体で指針値(暫定)を超過する状態が長期間にわたって継続していた可能性がある。芝については、地点周辺における詳細調査を実施し、汚染源の特定を含めた調査を今後実施していく必要がある。

また、本調査において、新たに曾我川橋のPFOA濃度が単体で指針値(暫定)を超過していたことが明らかとなった。本地点については、過去の調査データが存在しないため、汚染が長期間にわたるかは不明であるが、芝と同様、今後も継続的な調査を実施し、その発生源等の環境実態についても調査をする必要がある。

なお、2011年度の調査<sup>3)</sup>において、秋野川流末、保田橋はPFOS及びPFOA濃度の指針値(暫定)50ng/Lを超過していたが、今回の調査では指針値(暫定)未満であった。

#### まとめ

2020年5月に同年5月に人の健康の保護に関する要監視項目として、指針値(暫定)が設定されたPFOS及びPFOAの環境実態調査をおこなった。その結果、

人為的な汚染が特に多いと考えられる大和川水系において、PFOS 及び PFOA は比較的高濃度で検出し、16 地点中 3 地点で指針値（暫定）の超過が確認された。うち 1 地点は、2011 年、2019 年の調査においても、PFOA 単体で指針値（暫定）を超過する濃度が検出されており、長期間にわたり汚染が継続していた可能性が明らかとなった。今後、芝については、地点周辺における詳細調査を実施し、汚染源の特定を含めた調査を今後実施していく必要があると考えられる。また、本調査において、指針値（暫定）を超過することが明らかとなった曾我川橋についても芝と同様、今後も継続的な調査を実施し、その発生源等の環境実態についても調査をする必要がある。

#### 参考文献

- 1) Saito N., Harada K., Inoue K., et al: *Journal of Occupational Health*, 46, 49-59 (2004)
- 2) Harada K., Saito N., Inoue K., et al : *Journal of Occupational Health*, 46, 141-147 (2004)
- 3) 荒堀康史, 浅野勝佳, 兎本文昭: 奈良県保健環境研究センター年報, 46, 46-55 (2012)
- 4) 荒堀康史, 浅野勝佳, 兎本文昭: 奈良県保健環境研究センター年報, 47, 45-48 (2013)
- 5) 津田泰三, 井上亜紀子, 居川俊弘, 他: 環境化学, 20(3), 259-263 (2010)
- 6) 上堀美智子, 清水武憲, 大山浩: 全国環境研会誌, 36(1), 44-51 (2011)
- 7) 竹峰秀祐, 吉田光方子, 松村千里, 他: 兵庫県環境研究センター紀要 (研究報告等), 1, 12-19 (2010)
- 8) 環境省: 令和元年度PFOS及びPFOA全国存在状況把握調査の結果について (2019), <https://www.env.go.jp/press/108091.html>  
2021年12月1日閲覧

## ゴルフ場排水中の農薬検出状況について（令和元年～3年度）

浦西克維・浦西洋輔・辻本真弓・城山二郎

### Environmental Survey of Pesticides in Waste Water at Golf Course

URANISHI Katsushige・URANISHI Yosuke・TSUJIMOTO Mayumi and SHIROYAMA Jirou

#### 緒言

ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁及び水域の生活環境動植物の被害を未然に防止するため、ゴルフ場から排出される農薬の実態を把握し、ゴルフ場に対して適切な指導を行う必要がある。

環境省は、ゴルフ場における農薬使用の適正化を推進し、水質汚濁の防止を図る観点から、平成2年5月に、ゴルフ場の排水の水質汚濁に係る上限としての水濁指針値を定め、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針」を策定した。平成29年3月には、水濁指針値に加え、生態系保全の観点から水産動植物被害の防止のための水産指針値を新たに定め、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止及び水産動植物被害の防止に係る指導指針」を策定した。その後、平成30年の農薬取締法改正に係る令和2年4月1日施行内容を踏まえ、令和2年3月に「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止及び水域の生活環境動植物の被害防止に係る指導指針」（令和2年3月27日環水大土発第2003271号 各都道府県知事宛 環境省水・大気環境局長通知）（以下「指導指針」）を定めている。また、奈良県ではゴルフ場における農薬の安全使用及び環境保全のため、「奈良県ゴルフ場農薬使用指導要綱」を定め監視を行っているところである。

「指導指針」における指導対象農薬は、2021年10月26日現在、水濁指針値344農薬、水産指針値448農薬（重複あり）と年々増加しており、より多くの農薬を同時分析できる体制の整備が急務となっている。当センターでもこれまでLC-MS/MSによる一斉分析法の開発<sup>1)</sup>等に取り組んできた。

そこで、ゴルフ場における農薬使用実態を把握し、効率的な農薬分析体制を構築するため、上記分析法を用いて、直近3年のゴルフ場排水中の農薬検出状況について取りまとめたので、報告する。

#### 方法

#### 1. 調査対象・時期

令和元年～3年度の9月に奈良市を除く奈良県内ゴルフ場の排水口または調整池から採取した水試料（年11箇所ずつ3年間）を対象とした。

#### 2. 測定対象農薬

測定対象農薬は、奈良県内の各ゴルフ場の散布計画表に記載されている農薬及びその代謝物を中心に、表1に示す既報りで検討済のLC-MS/MS 40項目とした。

#### 3. 試薬

アセトニトリルは残留農薬・PCB試験用、メタノール、酢酸アンモニウム溶液はLC-MS分析用（以上、富士フイルム和光純薬社製）、また農薬標準品は、関東化学社製 農薬混合標準液65（ゴルフ場農薬LC/MS対象43種混合）を用いた。上記農薬混合標準液はメタノールで適宜希釈・調製の上、使用した。精製水は、メルク社製Milli-Q Referenceで作製した超純水を用いた。

#### 4. 装置、器具

固相抽出カラムは、別途GC-MS/MS項目の検査を実施する都合から、既報りとは異なるGL Sciences社製のInert-Sep PLS-2（270 mg, 6 cc, 以後、PLS-2という）を用いた。本固相抽出カラムは、アセトニトリル、精製水各6 mLを順次吸引注入して活性化、洗浄した後、使用した。なお、固相抽出カラム変更に伴う分析法の妥当性確認については後で述べる。

LC-MS/MSはWates社製ACQUITY UPLC及びXevo TQ MSを使用した。

#### 5. 分析方法

試料 1,000 mLを塩酸でpH3.5にした後、ローラーポンプを用いて流速5～10 mL/minで試料をPLS-2に通水させた。10 mLの超純水でPLS-2を洗浄した後、遠心分離機を用いて、15分3,000回転で固相カラム中の水分の大部分を除去した。さらに、PLS-2に窒素ガスを通気し、固相カートリッジ内の水分を完全に除去した。次に、PLS-2にアセトニトリル10 mLを緩やかに流下させ、目盛り付き遠沈管に溶出させた。溶出液に窒素ガスを緩

表1 調査対象農薬、添加回収結果および指針値

農薬名	R.T. (min)	検出法	プリカーサーイオン>プロダクトイオン		回収率平均 (超純水)	回収率平均 (排水)	定量 下限値 <sup>※</sup> μg/L	水濁 指針値	水産 指針値
			定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)					
アセタミプリド	3.59	ESI+	223.09> 126.02	223.09 > 56.00	109%	75%	5	1.8 mg/L	0.057 mg/L
アゾキシストロビン	8.03	ESI+	404.22> 372.01	404.22 > 328.97	112%	79%	1	4.7 mg/L	0.28 mg/L
インキサチオン	10.06	ESI+	314.09> 104.95	314.09> 96.85	96%	69%	1	0.08 mg/L	-
インプロチオタン	8.54	ESI+	291.09> 230.96	291.09> 188.92	125%	78%	5	2.6 mg/L	9.2 mg/L
イミダクロプリド	3.16	ESI+	256.09> 175.05	256.09> 209.09	123%	75%	1	1.5 mg/L	85 mg/L
エトキシスルフロ	5.43	ESI+	399.15> 260.99	399.15> 218.03	159%	69%	1	1.4 mg/L	3 mg/L
オキサジクロメホン	10.56	ESI+	376.09> 190.07	376.09> 161.04	104%	81%	1	0.24 mg/L	8.3 mg/L
カフェンストール	8.83	ESI+	351.22> 99.95	351.22> 71.97	116%	78%	1	0.07 mg/L	0.02 mg/L
グミルロン	8.8	ESI+	303.13> 184.97	303.13> 124.95	123%	79%	1	0.2 mg/L	0.9 mg/L
クロチアニジン	3.24	ESI+	250.03> 168.93	250.03> 131.91	126%	71%	5	2.5 mg/L	0.028 mg/L
シクロスルファミロン	6.86	ESI+	422.15> 260.98	422.15> 218.02	135%	74%	1	0.8 mg/L	0.035 mg/L
ジチオピル	10.42	ESI+	402.15> 354.02	402.15> 272.00	88%	51%	1	0.095 mg/L	0.56 mg/L
シデュロン-1,2	8.0, 8.2	ESI+	233.15> 137.02	233.15> 93.97	76%	79%	5	-	-
ジフェノコナゾール	10.26	ESI+	406.15> 251.03	408.15> 253.03	99%	77%	1	0.25 mg/L	0.75 mg/L
シプロコナゾール-1,2	9.0, 8.6	ESI+	292.15> 69.96	292.15> 124.95	118%	76%	5	0.3 mg/L	-
シマジン	5.57	ESI+	202.15> 124.0	202.15> 95.99	113%	75%	1	0.03 mg/L	1.7 mg/L
シメコナゾール	9.16	ESI+	294.15> 70.02	294.15> 73.01	127%	72%	10	0.22 mg/L	14 mg/L
ダイアジノン	9.93	ESI+	305.15> 168.99	305.15> 153.01	75%	76%	5	0.05 mg/L	0.00077 mg/L
チアメキサム	2.69	ESI+	292.03> 210.96	292.03> 181.01	115%	76%	1	0.47 mg/L	0.035 mg/L
チフルザミド	9.37	ESI+	528.90> 148.00	528.90> 167.94	131%	80%	1	0.37 mg/L	1.4 mg/L
テトラコナゾール	9.21	ESI+	372.15> 158.99	372.15 > 70	127%	80%	10	0.1 mg/L	2.8 mg/L
テブコナゾール	9.81	ESI+	308.22> 69.96	310.22> 69.96	123%	87%	1	0.77 mg/L	2.6 mg/L
テブフェノジド	9.57	ESI+	353.28> 133.06	353.28> 297.16	115%	77%	1	0.42 mg/L	0.83 mg/L
テルブカルブ	10.34	ESI+	278.15 > 166.04	278.15> 108.98	97%	76%	5	-	-
トリクロピル	8.49	ESI-	253.96> 227.96	253.96> 229.96	117%	95%	1	0.06 mg/L	-
トリフルミゾール	10.48	ESI+	346.15> 278.00	348.15> 280.00	138%	63%	1	0.39 mg/L	0.86 mg/L
ハロスルフロメチル	4.61	ESI+	435.09> 182.03	435.09> 82.94	160%	61%	1	2.6 mg/L	0.05 mg/L
ピリプチカルブ	10.81	ESI+	331.23> 181.01	331.23> 108.00	69%	52%	5	0.23 mg/L	0.1 mg/L
ブタミホス	10.08	ESI+	333.16> 180.02	333.16> 95.93	107%	72%	1	0.2 mg/L	0.62 mg/L
フラザスルフロ	3.60	ESI+	408.15> 182.02	408.15> 82.94	184%	45%	1	0.3 mg/L	0.17 mg/L
フルトラニル	8.53	ESI+	324.16> 262.07	324.16> 242.04	116%	82%	1	2.3 mg/L	3.1 mg/L
プロピコナゾール	9.93	ESI+	342.15> 158.92	344.15> 160.92	131%	79%	1	0.5 mg/L	5.6 mg/L
プロピザミド	8.49	ESI+	256.09> 189.99	258.09> 191.99	116%	75%	5	0.5 mg/L	-
ベンシクロン	10.21	ESI+	329.22> 125.02	329.22> 89.11	118%	80%	1	1.4 mg/L	1 mg/L
ベンスリド	9.61	ESI+	398.15> 158.00	398.15> 76.97	111%	71%	1	-	-
ベンディメタリン	8.53	ESI+	282.16> 130.01	282.16> 242.03	116%	79%	1	3.1 mg/L	0.14 mg/L
ボスカリド	8.38	ESI+	343.06> 307.08	343.06> 139.96	126%	81%	5	1.1 mg/L	5 mg/L
メコプロップ	5.58	ESI-	212.96> 140.93	214.96> 142.93	169%	39%	10	0.47 mg/L	81 mg/L
メタラキシル	7.18	ESI+	280.23> 220.10	280.23> 192.10	109%	87%	1	0.58 mg/L	95 mg/L
メプロニル	8.57	ESI+	270.23> 119.04	270.23> 90.99	123%	79%	1	1 mg/L	4.2 mg/L

※試料を200倍濃縮した最終検液を測定した際の定量下限値。水試料に対する定量下限値に換算する場合は数値を200で除すること。

やかに吹き付け、正確に2 mLに濃縮した後、0.2 mLをバイアルに分取し、0.3 mLアセトニトリルを加えてC-MS/MS試験溶液とした(200倍濃縮液)。各検液中に懸濁物がある場合は親水性PTFEメンブランフィルター(東洋ろ紙社製DISMIC-13HP 0.20 μm)でろ過した。得られた検液を表1に示す保持時間、イオンによりLC-

MS/MSで定量をおこなった。残り1.8 mLはHPLC用試験溶液、GC-MS用試験溶液として利用したが、本報の目的から外れるため詳細は割愛する。

なお、令和元年、2年度に採取した水試料については、既報りに基づきWaters社製のOasis HLB(200 mg, 6 cc)を用い、アセトン、精製水各5 mLを順次吸引注

入して活性化、洗浄した後、試料前処理に利用した。

## 6. 分析法の妥当性確認

超純水1,000 mLに各農薬混合標準液を添加したものを模擬試料とした添加回収試験（試行回数3回）を実施し、回収率の平均値から分析法の妥当性確認を実施した。模擬試料には、農薬混合標準液65（10 mg/L）を超純水1,000 mLに0.1 µg分添加（メタノールで10倍希釈したものを100 µL添加）した。一方、実際の排水試料中には多種多様な夾雑物が高濃度で含まれているため、超純水では回収率が良好であっても、試料夾雑物（マトリックス）の影響を受け、目的物質の回収率が変動する可能性に留意する必要がある。LC-MS/MS測定では試料夾雑物からイオン化阻害を受け、見かけ上の回収率が減少する現象が報告されている<sup>2)</sup>。そこで、試料夾雑物による前処理工程およびイオン化阻害の影響を確認するため、ゴルフ場排水に上記農薬を同濃度添加した試料による添加回収試験（試行回数3回）を別途実施した。

## 7. 農薬検出状況の集計

表1の農薬40項目を対象に、各試料中の農薬検出状況について集計した。集計結果を表1に示す定量下限値に統一するため、令和元年度および2年度の検出状況については、測定データの再解析を実施した。検出した農薬については、用途別（殺菌剤15種、殺虫剤6種、除草剤19種）に分類し検出状況を集計した。

### 結果と考察

#### 1. 分析法の妥当性結果

LC-MS/MS 項目の添加回収試験結果を表1に示す。超純水試料による添加回収試験では、ピリプチカルブが69%だった以外、全ての項目が70%以上の回収率を示した。しかし、約半数の項目が回収率120%を超過していた。ゴルフ場排水試料では、回収率が100%を超過する項目はなく、メコプロップ39%をはじめとした8項目が回収率70%に満たなかった。既報<sup>1)</sup>において、河川水試料を用いた添加回収試験を実施し、試料夾雑物の影響により、添加回収率が70~120%を外れる項目が存在したことが報告されている。両試料の添加回収率の違いから、今回用いた試験法及びゴルフ場排水試料についても、夾雑物によるイオン化阻害の影響はあったと判断されるが、2/3以上の項目が回収率70~120%と良好であり、70%未満の回収率であった項目も農薬検出の有無を判定及び、検出濃度レベルを把

握するためのスクリーニング法として活用可能と判断された。以降では、過去3年間の農薬検出状況について議論を進める。

## 2. 農薬検出状況

検出された農薬数について用途別に集計したものを表2に示す。全農薬の検出頻度は24%と一定値で推移しており、ゴルフ場での使用頻度が高い農薬を継続して検査できていることが明らかとなった。用途別の検出頻度では、いずれの年度でも殺菌剤が最も高く、次いで殺虫剤で、除草剤は最も低い値で推移した。殺菌剤は35-37%と一定の水準で検出したが、殺虫剤、除草剤については年度間で検出頻度にばらつきがみられた。この要因として、殺菌剤は芝生を病原菌の病害から保護するため、定期的に散布される薬剤と考えられる。一方、殺虫剤、除草剤についてはその年の気候により雑草、害虫の発生量・時期が一定しないため、散布量・時期は年により変動する可能性が高い。このような散布条件の違いが年ごとの検出頻度が変動する一因と推測された。

表2 年度・用途別の農薬検出頻度（括弧は該当件数）

地点/ 区分	2019 [11]	2020 [11]	2021 [11]	2019 -2021 [33]
殺菌剤 [15]	37% (61/165)	35% (58/165)	36% (60/165)	36% (179/495)
殺虫剤 [6]	24% (16/66)	21% (14/66)	29% (19/66)	24% (49/198)
除草剤 [19]	15% (32/209)	17% (35/209)	12% (26/209)	15% (93/209)
<b>全体</b> [40]	<b>24%</b> (109/440)	<b>24%</b> (107/440)	<b>24%</b> (105/440)	<b>24%</b> (321/1320)

次に農薬別検出状況を集計した結果を表3に示す。殺菌剤で最も検出頻度が高かったのは、チフルザミドで97%と33地点中32地点で検出した。次いで、メタラキシルが73%（24/33）、ペンシクロンは61%（20/33）と続いた。一方、ジフェノコナゾール、シメコナゾール、メプロニルは1地点のみで検出した。トリフルミゾールは今回の調査では検出しなかった。チフルザミドは、紀の川水系を対象に2018年5~12月に実施した調査でも毎月検出<sup>1)</sup>している。この理由として、成分が土壌に蓄積しやすく<sup>3)</sup>、暗所かつ水中では安定して

表3 農薬別検出状況

区分	農薬名	検出頻度	検出濃度範囲 (平均値) μg/L		指針値 超過数
殺菌剤	アノキシストロビン	48% (16/33)	ND -	0.91 0.25	0
	イソプロチオラン	30% (10/33)	ND -	0.14 0.050	0
	ジフェノコナゾール	3% (1/33)	ND -	0.10 0.10	0
	シプロコナゾール	36% (12/33)	ND -	0.53 0.16	0
	シメコナゾール	3% (1/33)	ND -	0.051 0.051	0
	チフルザミド	97% (32/33)	ND -	6.0 1.4	0
	デトラコナゾール	24% (8/33)	ND -	0.17 0.073	0
	テブコナゾール	48% (16/33)	ND -	0.19 0.047	0
	フルトラニル	55% (18/33)	ND -	0.20 0.053	0
	プロピコナゾール	30% (10/33)	ND -	0.30 0.053	0
	ベンシクロン	61% (20/33)	ND -	6.5 0.51	0
	ボスカリド	30% (10/33)	ND -	0.15 0.051	0
	メタラキシル	73% (24/33)	ND -	0.13 0.049	0
	メブコニル	3% (1/33)	ND -	0.010 0.010	0
殺虫剤	イミダクロプリド	12% (4/33)	ND -	0.034 0.022	0
	クロチアニジン	88% (29/33)	ND -	170 0.23	0
除草剤	チアメトキサム	48% (16/33)	ND -	0.35 0.062	0
	エトキシスルフロ	3% (1/33)	ND -	0.010 0.011	0
	オキサジクロメゲン	27% (9/33)	ND -	0.065 0.031	0
	カフエントロール	3% (1/33)	ND -	0.0090 0.0090	0
	グメルロン	12% (4/33)	ND -	0.14 0.046	0
	シクロスルファミロン	12% (4/33)	ND -	0.057 0.021	0
	ジチオビル	18% (6/33)	ND -	0.088 0.035	0
	シデュロン	9% (3/33)	ND -	0.035 0.030	0
	シマジ	55% (18/33)	ND -	0.033 0.021	0
	テルブカルブ	18% (6/33)	ND -	0.24 0.10	0
	トリクロビル	12% (4/33)	ND -	0.10 0.071	0
	ハロスルフロメチル	6% (2/33)	ND -	0.031 0.019	0
	プロピザミド	36% (12/33)	ND -	0.090 0.049	0
	ペンディメタリン	70% (23/33)	ND -	0.22 0.049	0

存在する性状を有している<sup>4)</sup>ことが報告<sup>5)</sup>されている。このことから、当該年度に散布されていなくても地中等に残留した成分が継続して流出し、結果として検出頻度が高くなった可能性がある。

殺虫剤で最も検出頻度が高かったのは、クロチアニジンで88%と33地点中29地点で検出した。次いで、チアメトキサムが48% (16/33)、イミダクロプリドが12% (4/33)と続いた。イソキサチオン、ダイアジノン、テブフェノジドは検出しなかった。クロチアニジンはチアメトキサムの代謝物であり、紀の川水系の調査でも5、6、9～12月に検出<sup>1)</sup>している。チアメトキサムは、田植え前および稲収穫前の使用が推奨<sup>2)</sup>される等、一般的によく使用されている農薬成分であり、ゴルフ場でも殺虫剤としてよく利用されていると考えられた。

除草剤で最も検出頻度が高かったのは、ペンディメタリンで70%と33地点中23地点で検出した。次いで、シマジが55% (18/33)、プロピザミドが36% (12/33)と続いた。アセタミプリド、ピリブチカルブ、フラザ

スルフロ、ブタミホス、ベンスリド、メコプロップは検出しなかった。

なお、今回の調査においては、水濁指針値、水産指針値(表1)を超過した農薬は検出されなかった。

ゴルフ場排水中の農薬検出は、散布農薬の分解性、土壌吸着性、水溶解性等の化学的性質や、周辺地形、気象条件、散布量・時期・方法等にも影響される。本報では、過去3年毎年9月に採取した水試料を利用し、県下のゴルフ場における散布農薬の傾向の一部分を把握できたと考えられるが、全容を把握するには試料採取時期および地点を積み重ね、データの精査・解析を継続することが必要である。

### まとめ

既報<sup>1)</sup>で分析法を確立した40物質について、県内のゴルフ場の排水試料を用いてLC-MS/MSによる多成分同時分析をおこない、農薬検出状況を取りまとめた。その結果、検出した農薬全てが水濁指針値、水産指針値未満であり、ただちに周辺環境への影響はないものと判断された。ただし、指針値未満ではあるがごく微量の農薬が排水中からは検出されており、今後も定期モニタリングを継続し、ゴルフ場から排出される農薬の実態を把握し、農薬の適正使用の指導を推進することが必要と考えられる。また、指導対象農薬が年々、増加していることから、より多くの農薬を同時分析できる検査体制を整備していくことも必要である。

### 参考文献

- 1) 浦西洋輔, 浦西克維, 山下浩一: 奈良県景観・環境総合センター研究報告, 6, 15-20 (2018)
- 2) 四ノ宮美保: 環境化学, 26(4), 191-201 (2016)
- 3) 日産化学工業株式会社: イカルガ®35SC製品紹介
- 4) 食品安全委員会: 農薬評価書「チフルザミド(第2版)」, (2016)
- 5) 日本植物防疫協会: 農薬適用一覧表, (2004年版)



LC-MS/MSによる環境水中のシプロフロキサシン分析法検討

浦西洋輔・辻本真弓・浦西克維・城山二郎

Examination of Analytical Method of Ciprofloxacin in Environmental Water by LC-MS/MS

URANISHI Yosuke・TSUJIMOTO Mayumi・URANISHI Katsushige and SHIROYAMA Jirou

緒言

化学物質は、農薬や医薬品、石油加工製品等をはじめ多種多様な形で生産・使用されており、我々の生活に欠かせないものとなっている。一方、化学物質によるヒトや生態系への悪影響も懸念されており、適切なリスク管理が求められている。そのため、環境経由の曝露による健康影響に対しては、水質汚濁防止法や農薬取締法、化学物質審査規制法等により、環境中への化学物質の放出が健康被害を発生させないように適正な管理がおこなわれている。一方、規制の対象となっていない化学物質も数多く存在し、医薬品類をはじめとした生活由来化学物質（PPCPs: Pharmaceutical and Personal Care Products）はその一つである。

近年、環境中でのPPCPsの検出事例が顕在化している<sup>1)</sup>。PPCPsの有効成分として用いられる化学物質は、本来の目的による使用や廃棄にともない環境中へと排出される。PPCPsは特定の生理活性を持つよう設計されているため、環境中の残存量が微量であっても生態系へ影響を及ぼす可能性がある。

PPCPsの一つであるシプロフロキサシン（図1）は、フルオロキノロン系抗菌薬であり、グラム陰性菌と一部のグラム陽性菌を標的とする<sup>2)</sup>。国内におけるシプロフロキサシン処方数量は、NDBオープンデータ<sup>3)</sup>を用いて算出したところ全国：1026 kg、奈良県：12 kg程度と推計されるが、その大部分は体内で完全に代謝されず排出されると考えられるため<sup>4)</sup>、下水や処理排水等を通じて環境中に流入する可能性がある。環境中に流入したシプロフロキサシンは抗生物質耐性菌（ARB）や抗生物質耐性遺伝子（ARG）の出現と拡散の原因となっており<sup>5)</sup>、環境水中に残留するシプロフロキサシンの動態を把握することは、人の健康や水生生物保護の観点から言っても非常に重要である。しかしながら、シプロフロキサシンの環境水中の分析法は公に定められておらず、統一された手法で国内環境中の動態把握することは難しい。今回、環境省委託事業「化学物質環境実

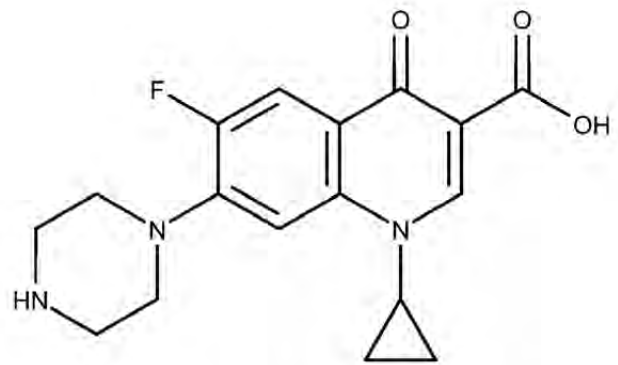


図1 シプロフロキサシンの構造

態調査委託業務（分析法開発調査）として、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）による水環境中のシプロフロキサシン分析法の開発を行ったので報告する。

方法

1. 試薬

シプロフロキサシン塩酸塩一水和物（以下、シプロフロキサシン）標準品は富士フィルム和光純薬(株)製（98%以上）、シプロフロキサシン-d8 塩酸塩一水和物（以下、シプロフロキサシン-d8）は Honeywell 製を用いた。各標準物質をそれぞれメタノールに溶解し 1,000 µg/mL の標準原液とした。検量線作成には、シプロフロキサシン標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.02 µg/L～20 µg/L の検量線用混合標準液を作製した。なお、シプロフロキサシンはガラス壁面や金属壁面に吸着することや、光分解性が報告されているため<sup>6)</sup>、褐色 PP 容器にて調整・保存を行った。

メタノールは、移動相の調製には富士フィルム和光純薬工業(株)製（LC/MS 用）を、標準液の調製や試料の前処理及び試験液の調製等には富士フィルム和光純薬工業(株)製（残留農薬、PCB 試験用）を用いた。ギ酸及

び精製水は富士フイルム和光純薬工業（株）製（LC/MS用）を、水酸化ナトリウムは富士フイルム和光純薬（株）製（試薬特級）を、10 mol/l 酢酸アンモニウム溶液は（株）ニッポンジーン製を用いた。

## 2. 器具、装置

LC用カラムは、Waters製 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) (以下, BEH C18), Waters製 ACQUITY UPLC HSS C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) (以下, HSS C18), Waters製 CORTECS C18+ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) (以下, CORTECS C18+), Waters製 Atlantis PREMIER BEH C18 AX (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) (以下, PRE BEH C18 AX), Waters製 ACQUITY Premier HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) (以下, PRE HSS T3) を用いた。固相カートリッジはWaters製 Oasis HLB Plus (225 mg) (以下, HLB) を使用した。

LC-MS/MSはWaters製ACQUITY UPLC-Xevo TQ MSを使用した。

## 3. 測定条件の検討

### 1) 移動相条件の検討

移動相については、以下の検討を実施した。

- ①有機溶媒の種類（メタノール又はアセトニトリル）
- ②緩衝液の種類（25 mmol/L ギ酸アンモニウム又は25 mmol/L 酢酸アンモニウム）
- ③酸及び緩衝液の濃度（0.06%～0.1%・5 mmol/L～25 mmol/L）

各条件について1.0 μg/Lの標準液の測定を行い、ピーク形状、ピーク感度を比較した。LC-MS/MSのSRM条件を表1に示す。

### 2) LC用カラムの検討

LC用カラムについては、BEH C18, HSS C18, CORTECS C18+, PRE BEH C18 AX 及び PRE HSS T3 の5種類のカラムを用いて検討を行った。1) にて最適化した移動相条件にて1.0 μg/Lの標準液（溶媒：水/メタノール=50/50）の測定を行い、ピーク形状が良好であったものについては、さらに試験液の溶媒のメタノール比率を変化させ（10～100%）、ピーク形状を比較した。

### 3) 検量線の作成及び装置検出下限（IDL）の算出

1)～2) の検討によって最適化した測定条件を用いて標準液の測定を行い、検量線の作成及び装置検出下限（IDL）を算出した。検量線用標準液は、標準原液をメタノールで適宜希釈し0.02 ng/mL～20 ng/mLを調製した。各濃度の検量線用標準液には、サロゲート内標準としてシプロフロキサシン-d<sub>8</sub>をそれぞれ1.0 ng/mLになるように添加した。IDLは、化学物質環境実態調査実施の手引き<sup>10)</sup>（以下、手引き）に従い、検量線の最低濃度である0.02 ng/mLを7回繰り返し測定し算出した。

### 4) 前処理条件の検討

試料の前処理は食品分析における試験法<sup>11)</sup>を参考に次のとおり実施した。試料100 mLにサロゲート内標準液（0.1 μg/mL, メタノール溶液）を100 μL添加した後、pHを調整する場合はギ酸、アンモニア水又は水酸化ナトリウム水溶液で調整し、十分に混和した。この溶液を固相カートリッジ（HLB）に10 mL/min程度の流速で通水、固相カートリッジを精製水10 mLで洗浄し、窒素ガスを15分間程度通気、固相中の水分を除去した。その後、0.2%ギ酸含有メタノール10 mLを用いて溶出したものを試験液とした。

### 5) 検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL）の算出

1～4) の検討により決定した分析法を用い、添加回収試験を実施し、本分析法におけるMDL及びMQLを算出した。試験には高マトリックス試料（類型C相当の河川水）にシプロフロキサシンを0.03 μg/L添加した試料を用いた。併せて、標準添加をしていない試料（無添加試料）についても並行して試験を実施し、シプロフロキサシンに由来するピークの有無について確認を行った。MDL及びMQLの算出は手引きに従った。

### 6) 保存性試験

検体を直ちに分析できない場合の試料水中のシプロフロキサシンの保存性を確認するため、保存性試験を下記の通り実施した。

まず精製水を用いて対象物質の光分解性を確認した。精製水100 mLに、シプロフロキサシンを0.05 μg/L添加した後、暗条件では容器をアルミホイルで包み20°Cの恒温器内で、明条件では室温（10～20°C）で1時間及び7日間保管し、固相抽出等の前処理を行った後、濃度を測定した。次に試料水の保存性確認を実施した。河川水及び海水試料100 mLにシプロフロキサシンを河川水の場合は0.05 μg/L、海水の場合は0.1 μg/L添加した後、7日間暗所で冷蔵保存し、固相抽出等の前処理を行った後、濃度を測定した。

表1 LC-MS/MSのSRM条件

		プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	コリジョン エネルギー (eV)
シプロフロキサシン	(定量用)	331.9	230.8	34
	(確認用)	331.9	313.9	22
シプロフロキサシン-d <sub>8</sub>	(定量用)	339.9	234.8	34
	(確認用)	339.9	248.8	24

## 結果と考察

### 1. 移動相条件の検討

移動相検討結果のクロマトグラムを図2に示す。有機溶媒にアセトニトリル、酸として0.1%ギ酸を用いた場合、ピークは検出されなかった。そこで、有機溶媒にメタノール、酸として0.1%ギ酸、緩衝液として25 mmol/L ギ酸アンモニウム又は25 mmol/L 酢酸アンモニウムを用いて検討を行った。結果、0.1%ギ酸のみよりも、0.1%ギ酸に25 mmol/L 酢酸アンモニウムを加えた移動相の方が、ピーク形状が良好であった。また、緩衝液として25 mmol/L ギ酸アンモニウムを用いた場合には、ピークは検出されなかった。次に、移動相のギ酸・酢酸アンモニウム濃度（以下、酸濃度）をそれぞれ、0.1%・25 mmol/L、0.06%・15 mmol/L、0.02%・5 mmol/L と変化させ測定を行った。結果、酸濃度が0.02%・5 mmol/L の場合明らかに目的物質の感度が低下し、0.1%・25 mmol/L が最も感度が良かった。

以上の結果より本分析法における移動相は、有機溶媒にメタノールを用い、酸及び緩衝液として0.1%ギ酸及び25 mmol/L 酢酸アンモニウムを添加することとした。

### 2. LC 条件の検討

シプロフロキサシン：1.0 µg/L（溶媒：水/メタノール=50/50）における、各LC用カラム別クロマトグラムを図3に示す。CORTECS C18+及びPRE BEH C18 AXを用いた場合、ピーク形状のテーリングが認められた。一方、BEH C18、HSS C18 及び PRE HSS T3 を用いた場合にはピークのテーリングは見られなかった。

そこでBEH C18、HSS C18 及び PRE HSS T3 を用い、試験液の溶媒のメタノール比率を変化させ（10~100%）

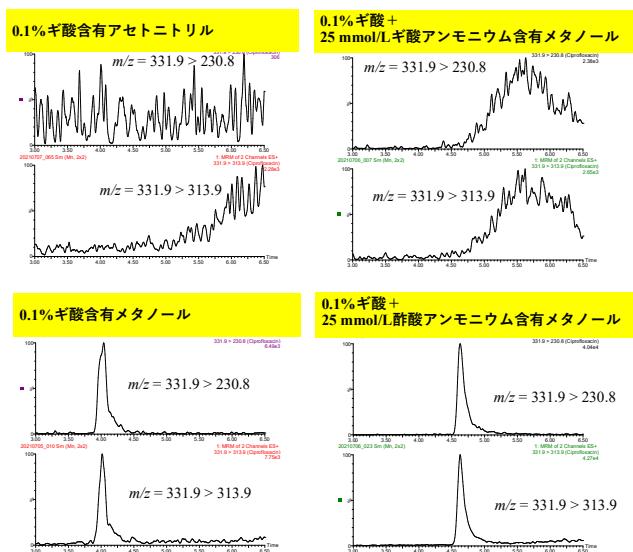


図2 移動相別の対象物質のクロマトグラム  
（シプロフロキサシン：1.0 µg/L）

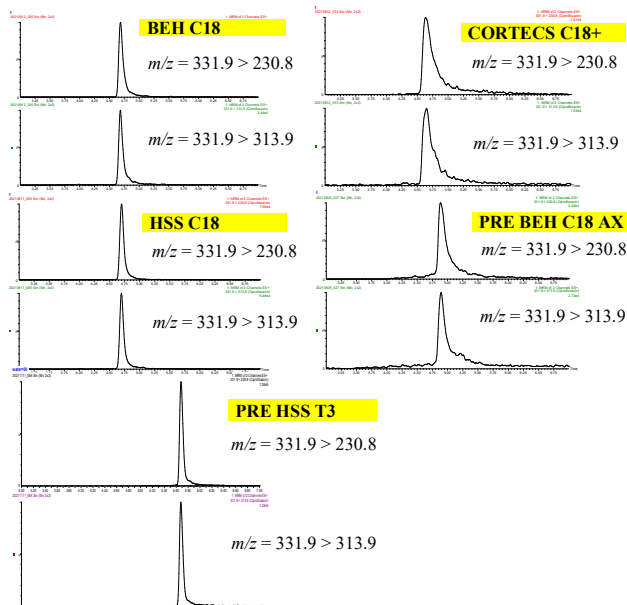


図3 LC用カラム別の対象物質のクロマトグラム  
（シプロフロキサシン：1.0 µg/L、溶媒：メタノール/水=50/50）

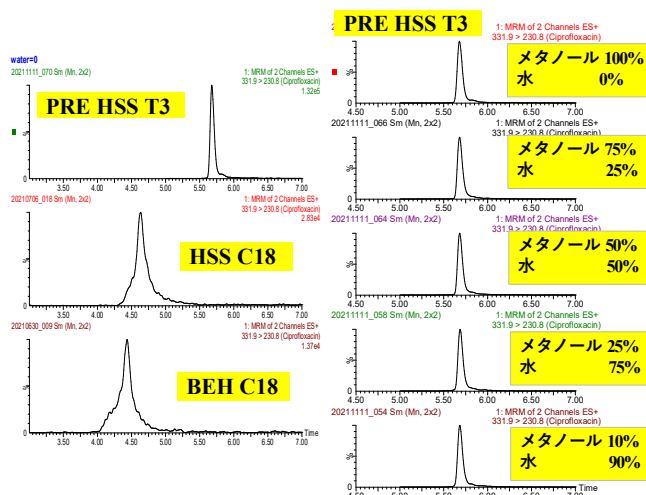


図4 シプロフロキサシン：1.0 µg/L のクロマトグラム  
左図：メタノール100%溶媒におけるLCカラム別のクロマトグラム  
右図：PRE HSS T3における溶媒のメタノール比率別のクロマトグラム

表2 LC/MS/MS 測定条件

LC-MS/MS	Acquity UPLC system (Waters)
LC system	Waters ACQUITY Premier HSS T3
カラム	Φ2.1 mm × 100 mm, particle size 1.8 µm
移動相	A: 0.1%ギ酸 + 25mmol/L酢酸アンモニウムメタノール B: 0.1%ギ酸 + 25mmol/L酢酸アンモニウム水溶液
グラジエント条件	0 → 2 min A: B = 0: 100 2 → 4 min A:0 → 35, B: 100 → 65 linear gradient 4 → 6 min A:35 → 80, B: 65 → 20 linear gradient 6 → 8 min A:80 → 100, B: 20 → 0 linear gradient 8 → 10 min A: B = 100: 0
流速	0.3 mL/min
カラム温度	40 °C
注入溶媒	メタノール
注入量	5 µL
MS/MS system	Xevo TQ MS (Waters)
イオンモード	ESI-Positive
キャピラリー電圧	0.5 kV
ソース温度	150 °C
脱溶媒温度	600 °C
脱溶媒ガス	Nitrogen, 1000 L/hr

ピーク形状の比較を行った。結果を図4に示す。溶媒のメタノール比率が100%の場合、BEH C18、HSS C18ではピークにリーディングが見られたが、PRE HSS T3では見られなかった(図4左図)。次に、PRE HSS T3を用いて溶媒のメタノール比率を100%~10%まで変えて測定したところ、溶媒のメタノール比率を変えても溶媒効果は見られず(図4右図)、感度に関しても大きな差は見られなかった。

よって、容器への吸着や操作性の観点から本分析法における試験液の溶媒はメタノール100%とし、LC用カラムはPRE HSS T3を用いることとした。

### 3. 検量線の作成及び装置検出下限 (IDL) の算出

以上、1)~2)の検討によって最適化した測定条件を表2に示す。本条件にて測定を行い、検量線を作成したところ、低濃度(0.02~1.0 µg/L)及び高濃度(1.0~20 µg/L)において、それぞれ相関係数0.9997及び0.9991であり、良好な直線性を示した。またシプロフロキサシンのIDLを算出した結果、IDL:0.033 pg(試料換算値:0.00066 µg/L)であった。

## 4. 前処理条件の検討

### 4.1 精製水を用いた添加回収試験結果

厚生労働省の試験法<sup>10)</sup>においては、固相カートリッジへ分析試料を負荷する際、アンモニア水を用いてpH調整を行っている。そこで本検討においてもアンモニア水を用い、精製水をpH10に調整して添加回収試験を実施した。結果、シプロフロキサシン原体(以下、原体)に比べサロゲートの回収率が20%近く低い結果となった(表3)。そこで、より塩基性にpHを調整することを目的に水酸化ナトリウム水溶液を用いて精製水のpHをpH11に調整し添加回収試験を実施した。結果、水酸化ナトリウム水溶液を用いて試料のpHをpH11に調整した場合、原体及びサロゲート共に108~121%と良好な添加回収率を示した。

よって、本分析法における試料のpH調整は水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH11とすることとした。

### 4.2 河川水を用いた添加回収試験結果

4.1で定めた前処理法に従い、県内C類型河川水を用いて添加回収試験を実施した。県内C類型河川11カ所を調査した結果、サロゲート回収率が50%程度の地点(以下、地点A)が確認された(表4)。本結果は、手引き記載のサロゲート回収率の目安(50~120%)内であり、測定法としては規定の範囲内と判定されるが、低回収率の原因究明のため以下の検討を実施した。

#### 4.2.1 検液内に残存するマトリックスの影響確認

四ノ宮<sup>12)</sup>は、LC/MS法では共溶出する試料由来成分によ

ってイオン化の抑制や促進が観測されると述べており、地点Aの試料はマトリックスによるイオン化抑制を受けたのではないかと考えた。そこで、地点Aの無添加試料を4.1で定めた前処理方法に従い抽出し、その試験液にシプロフロキサシン標準液(1.0 µg/mL、メタノール溶液)を加え測定を行った。結果マトリックス添加標準液の濃度は、添加濃度の93%であり、マトリックスの影響により目的物質がイオン化抑制され、回収率が低下したわけではないことを確認した。

#### 4.2.2 固相カートリッジへの保持確認

厚生労働省の試験法<sup>10)</sup>では、担体充填量150 mgのMAXミニカラムを用いた場合、シプロフロキサシン等の極性の高い分析対象化合物がカラムに保持されず回収率が低下し、500 mgの担体充填量のカラムを用いた際には、実試料(はちみつ)を用いた場合においても良好な回収率が得られたと報告している。そのため、地点A試料においても担体充填量が回収率に影響を及ぼしたのではないかと仮定し、以下の検討を行った。4.1で定めた前処理法に従い、地点A河川水を用いて添加回収試験を実施した際、固相カートリッジへ通水した後の試料を回収し、目的物質の濃度を測定した。結果、通過液から目的物質は回収されず、固相カートリッジ内に目的物質が保持されていると推定された。

#### 4.2.3 固相カートリッジからの溶出確認

4.2.2の結果から、固相カートリッジ内に目的物質が保持されているのであれば、固相カートリッジからの溶出工程が不十分ではないかと仮定し、以下の検討を行った。4.1で定めた前処理法に従い、地点A河川水を用いて添加回収試験を実施した際、通水・洗浄後の溶出工程において、①0.2%ギ酸メタノール10 mL⇒②0.2%ギ酸メタノール10 mL⇒③メタノール/アセトニトリル/ギ酸(20/75/5)10 mLの順に溶出液を回収し、目的物質の濃度を測定した。結果、①の溶出液のみ目的物質が検出され、②③の溶出液からは目的物質が検出されなかった。このことから、固相カートリッジからの目的物質の溶出は0.2%ギ酸メタノール10 mLで問題無いことを確認した。

表3 精製水添加回収試験結果

精製水 (NH <sub>4</sub> でpH10)			精製水 (NaOHでpH11)		
補正後 回収率	絶対 回収率	サロゲート 回収率	補正後 回収率	絶対 回収率	サロゲート 回収率
129%	86%	66%	91%	108%	121%
125%	85%	67%	108%	116%	109%

表4 河川別添加回収試験結果(サロゲート)

	C類型1	C類型2	C類型3	C類型4	C類型5	C類型6	C類型7	C類型8	C類型9	C類型10	C類型11
サロゲート 回収率	53%	93%	99%	103%	99%	81%	92%	54%	97%	84%	79%

今回の検討結果からは、河川水を用いた添加回収試験の際、特定の地点において添加回収率が著しく低下する原因は判明しなかった。そのため、河川水によっては目的物質の回収率が著しく低下すること、しかし、原体とサロゲートの添加回収率が同程度であることから、シプロフロキサシンの定量はサロゲート内標準物質によって適正に補正できることが判明した。

以上の検討から確定した分析法のフローチャートを図5に示す。

### 5. 検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) の算出

確定した分析法を用いて添加回収試験を実施し、MDL及びMQLを算出した結果、本法におけるシプロフロキサシンのMDLは0.00056 µg/L、MQLは0.0014 µg/Lであった。また、シプロフロキサシンの回収率は107% (サロゲート回収率96%)、CVは4.5%であり、再現性良くシプロフロキサシンを回収することができた。Tell<sup>13)</sup>によると、シプロフロキサシンの環境中の予測無影響濃度 (PNEC-ENVs)は0.57 µg/L、最小阻害濃度に基づくPNEC (PNEC-MICs, MICsとは24時間培養した後与えられた菌株の目に見える増殖を100%阻害する抗生物質の最低濃度を言う)は0.06 µg/Lと算出されており、本法はPNEC以下の濃度レベルで環境中のシプロフロキサシンを定量可能であると判断された。

### 6. 保存性試験

保存性試験の結果を表5に示す。精製水を用いた光分解

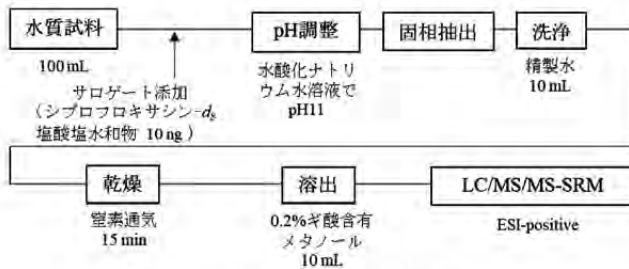


図5 分析法のフローチャート

性確認試験の結果、暗所であれば分解性は認められなかったが、明所では残存率が低下しており、暗所に保存する必要性が認められた。河川水及び海水を用いた保存性試験結果においては、河川水、海水、標準液全ての対象物質において保存性は良好であった。

以上の結果から、試料については7日間の冷蔵保存が可能であるが、暗所での保存が必要であると判明した。

### まとめ

環境水中に含まれるシプロフロキサシンの高感度分析法を開発するにあたり、分析条件等について詳細な検討を行った。その結果、分析の際には試料にサロゲート内標準を添加し、固相カートリッジに通水する前に水酸化ナトリウムを用いてpH11に調整する必要があること、試料の保存は暗所にて行う必要があることが判明した。また、算出したMQLの結果から、本法PNEC以下の濃度レベルで環境中のシプロフロキサシンを定量可能であると判断された。

今後は、本法を用いて県内河川におけるシプロフロキサシンの存在実態を明らかにする予定である。

### 参考文献

- 1) 西野貴裕, 加藤みか, 宮沢佳隆, 他: 環境化学, 30, 37-56(2020)
- 2) Y.Yanga, Y.S.Ok, K.-H.Kim., et al: *Science of the Total Environment*, 596-597, 303-320(2017)
- 3) C.Ferreiro, I. Gómez-Motos, J.I.Lombraña, et al: *Sustainability*, 12(2), 725(2020)
- 4) H.-J.Lee, K.Kadokami, J.E.Oh., *Science of the Total Environment*, 713, 136508(2020)
- 5) W.T.Jiang, P.H.Chang, Y.S.Wang, et al: *Journal of Hazardous Materials*, 250-251, 362-369(2013)
- 6) 厚生労働省: 第6回NDBオープンデータ, <https://www.>

表5 保存性試験結果

試料	試験数	調整濃度 (µg/L)	検出濃度 (µg/L) (残存率(%))*					
			1時間放置後	当日	7日後		14日後	
					暗所	明所		
精製水	2	0.05	0.050 (100)	-	0.048 (97)	<b>0.027 (53)</b>	-	
河川水	試料	3	0.05	-	0.050 (100)	0.048 (96)	-	-
	試験液	3	-	-	-	-	-	0.050 (100)
海水	試料	3	0.1	-	0.10 (106)	0.10 (104)	-	-
	試験液	3	-	-	-	-	-	0.10 (101)

\*残存率(%): 調整濃度に対する検出濃度の割合

mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000177221\_00010.html (2022年5月31日閲覧)

- 7) Z.Li., H.Hong., L.Liao., et al: *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **88**(1), 339-344(2011)
- 8) H.Wang., C.Hu., L.Liu., et al: *Journal of Hazardous Materials*, **339**, 174-181(2017)
- 9) 佐々木珠生, 松木司, 小中ゆかり, 他: 広島市衛研年報, **35**, 31-38(2016)
- 10) 環境省環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成27年度版)
- 11) 平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、

飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」別添, エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、フルメキン及びマルボフロキサシン試験法 (畜水産物: はちみつの場合)

- 12) 四ノ宮美保: 環境化学, **26** (4), 191-201(2016)
- 13) J.Tell., D.J.Caldwell., A.Haner., et al: *Integr. Environ. Assess. Manage.*, **15**(3), 312-319(2019)

