

ジチオりん酸 O,O-ジメチル-S-1,2-ビス (エトキシカルボニル) エチル
(別名マラチオン) の測定・分析手法に関する検討結果報告書

令和 2 年 2 月 27 日

測定手法等検討分科会

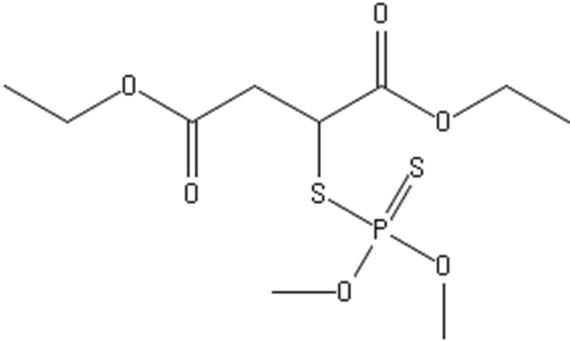
目次

1. はじめに.....	1
2. 文献調査.....	2
3. 捕集および分析条件.....	2
3-1. 試薬及び捕集管.....	2
3-2. 分析条件.....	2
3-3. 捕集管の選定.....	3
3-4. 脱着溶媒の選定.....	4
3-5. 試料の調製.....	4
4. ブランク.....	4
5. 破過.....	5
6. 脱着率.....	5
7. クロマトグラム.....	7
8. 検量線.....	7
9. 検出下限および定量下限.....	8
10. 添加回収率（通気試験）.....	9
11. 保存性.....	9
12. まとめ.....	10
13. 検討機関.....	10
14. 参考文献.....	10
（別紙）ジチオリン酸 O,O-ジメチル-S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル標準測定分析法（別名マ ラチオン）.....	1

1. はじめに

ジチオリン酸 O,O-ジメチル-S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチルの物理化学的性状を示した(表1)。

表1 ジチオリン酸 O,O-ジメチル-S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチルの物理化学的性状

CAS No.	121-75-5	
別名	マラソン マラチオン ジメチルジカルベトキシエチルジチオホスフェート	
用途	農薬(殺虫剤)	
構造式	 <chem>C10H19O6PS2</chem>	
分子量	330.36	
物性	比重	1.23 (25°C/4°C)
	沸点	156~157°C (0.093 kPa)
	融点	2.85°C
	蒸気圧	3.38×10 ⁻⁶ mmHg (25°C)
	形状	液体 (20°C、1 気圧)
許容濃度等	日本産業衛生学会	10 mg/m ³
	OSHA	PEL : 15 mg/m ³
	NIOSH	REL : 10 mg/m ³
	ACGIH	TLV-TWA : 1 mg/m ³

ジチオリン酸 O,O-ジメチル-S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル(別名マラチオン、マラソン。以下、マラチオンとする)は、有機リン系の殺虫剤であり、その作用機構はアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害し、正常な神経伝達機能を阻害することにより殺虫活性を示すものと考えられている。

人の健康に対する有害性については、眼に対する重篤な損傷性/眼刺激性(区分2B)、皮膚感作性(区分1)、生殖細胞変異原性(区分2)、発がん性(区分1B)、特定標的臓器毒性(単回ばく露)(区分1(神経系))及び特定標的臓器毒性(反復ばく露)(区分1(神経系))となっており、アレルギー性皮膚反応を起こすおそれや眼刺激、また、遺伝

性疾患のおそれの疑い、発がんのおそれ、神経系の障害長期にわたる、又は反復ばく露による神経系の障害などの危険有害性が喚起されている。

気中濃度として、ACGIH の TLV-TWA 1 mg/m³ を暫定二次評価値 (E) とし、1/1000E から 2E の範囲における捕集および分析方法について検討を行った。

2. 文献調査

現在、マラチオンの測定およびその分析方法に関する公定法として、NIOSH Manual of Analytical methods(NMAM)5600, OSHA Sampling Analytical Methods 62 が示されている。いずれの方法においても、捕集については、ろ過捕集+固体捕集の複合型捕集管を採用しており、ろ紙として、石英ろ紙、また固体捕集剤として、2層の XAD-2 を使用した、OVS-2 チューブ (SKC 社製) が使われている。採取量としては、吸引流量 0.2~1 L/min で、最大 60 L までとなっている。測定は、ガスクロマトグラフで行い、検出器は FPD 検出器を採用している。

3. 捕集および分析条件

3-1. 試薬及び捕集管

本調査に使用した試薬を以下に示す。

マラソン (マラチオン) 標準物質：富士フィルム和光純薬株式会社 純度 98.4 %

マラチオン-d6 (ジメチル-d6) : CDN ISOTOPES 純度 99.3 %

メタノール：富士フィルム和光純薬株式会社 LC/MS 用

アセトニトリル：富士フィルム和光純薬株式会社 LC/MS 用

ギ酸：富士フィルム和光純薬株式会社 LC/MS 用

1 M 酢酸アンモニウム溶液：関東科学株式会社 HPLC 用

NOBIAS RP-SG1WA：株式会社日立ハイテクサイエンス

3-2. 分析条件

NIOSH 及び OSHA の試験法では、GC-FPD 法が採用されている。そこで、GC/MS 法での分析を検討したが、1/1000E から 2E までのレンジの検量線を作成することが、困難であったため、LC/MS/MS による分析を行うこととした。表 2 に測定条件を示す。

表 2 LC/MS/MS 条件

HPLC 条件

装置	株式会社島津製作所 Nexera XR		
カラム	GLサイエンス株式会社 InertSustain C18 HP 3 μm 2.1×150 mm		
カラム温度	40°C		
移動相	A : 0.1 %ギ酸、B : 5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液		
流速	0.2 mL/min		
グラジエント 条件	Time (min)	A %	B %
	0	95	5
	10	0	100
	15	0	100
	15.1	95	5
	22	Stop	
注入量	0.5 μL		

MS 条件

装置	株式会社 AB SCIEX QTRAP4500							
イオン化法	ESI Positive							
イオン源条件	イオンソース	Turbo Spray						
	カーテンガス	25unit						
	コリジョンガス	10unit						
	イオンスプレー電圧	5500V						
	温度	350°C						
	イオンソースガス 1	70unit						
	イオンソースガス 1	60unit						
MRM 条件		Q1	Q3	Time	DP	EP	CE	CXP
	定量用	331.0	127.1	50msec	10V	10V	9V	6V
	確認用	331.0	99.1	50msec	44V	10V	31V	6V
	内部標準	337.0	127.0	50msec	61V	10V	15V	10V

3-3. 捕集管の選定

NIOSH 及び OSHA の試験法では、ろ過捕集+固体捕集の複合型捕集管である OVS-2 チューブ (SKC 社製) が使われている。今回、国産品での供給を考慮し、ガラスろ紙 (ホウ珪酸ガラス繊維、φ12 mm) と充填剤 1 層 (ジビニルベンゼン/メタクリレート共重合体、440 mg) の一体型サンプラーである、株式会社日立ハイテクサイエンス製 NOBIAS RP-SG1WA での検討を行った。

3-4. 脱着溶媒の選定

NIOSH の試験法では、90%トルエン/10%アセトン混液、OSHA の試験法では、トルエン（または、トリブチルりん酸添加トルエン）が使われている。LC/MS/MS での測定のため、溶媒としてアセトニトリルが適当と考えられたため、順方向及び逆方向溶出を検討した。

3-5. 試料の調製

0.2 L/min の速度で吸引を行った捕集管について、ガラスシリンジを用いて、およそ 1 mL/min の速度で脱着溶媒を 10 mL 通液し、10 mL ガラス遠沈管に受けた。調製した試料液に内標準物質として、1 µg/mL のマラチオン-d6 を 100 µL 添加・混合し、孔径 0.2 µm のメンブランフィルターでろ過したものを、LC/MS/MS により測定を行った。

4. ブランク

アセトニトリルおよび捕集管のブランクの確認を行ったところ、定量用トランジションの保持時間に妨害ピークは認められなかったが、確認用トランジションについて、保持時間 12.0 分のターゲットピークに対し、11.9 分位のところに、妨害ピークが認められた。しかしながら、ピーク分離はされており、また、確認用トランジションでもあるため、定量性に問題はないものと考えられた。

アセトニトリルのクロマトグラムを図 1 に、未捕集の捕集管を 3-5. 試料の調製に従い、処理を行ったもののクロマトグラムを図 2 に示す。

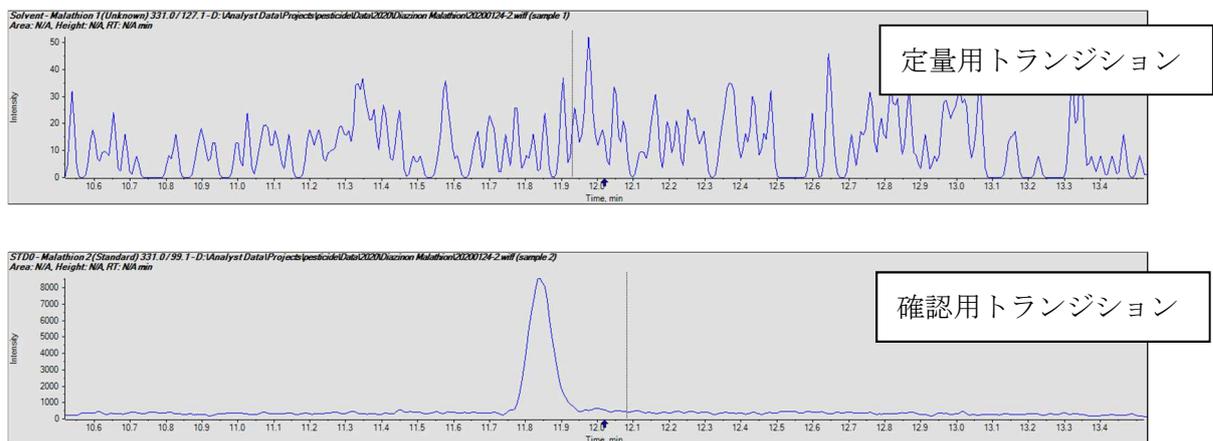


図 1 アセトニトリルのクロマトグラム

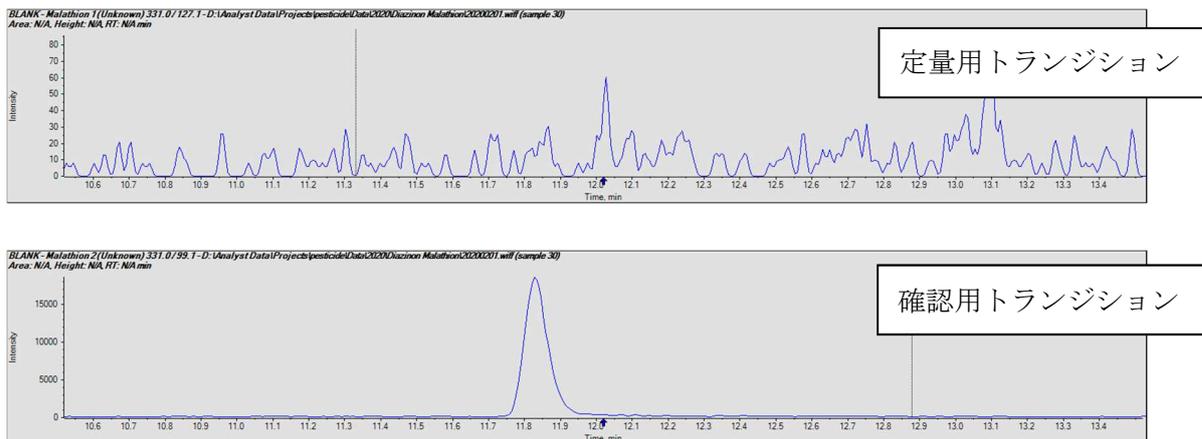


図2 捕集管ブランクのクロマトグラム

5. 破過

今回の検討で使用する捕集管について、アセトンで調整した標準液を 96 μg (2E 相当) 添加し、上流側に標準液を添加した捕集管 (1 段目)、下流側に未添加の捕集管 (2 段目) を直列に接続したのについて、0.2 mL/min で 4 時間室内空気を通気した。その後、1 段目及び 2 段目をそれぞれ 3 - 5. 試料の調製に従い、処理を行い、回収率を求めた。結果を表 3 に示す。2 段目について、痕跡量のピークが検出されたが、定量結果として実数値にはならず、一本の捕集管で十分に捕集できるものと考えられた。

表3 破過試験結果

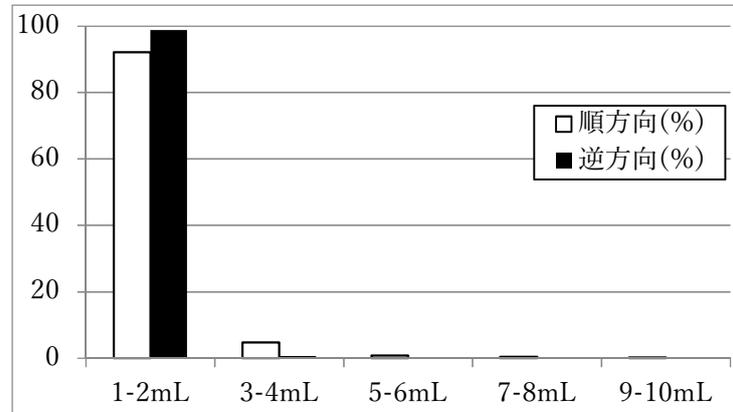
添加量 (μg)	回収率 (%)			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
1 段目 96 (2E 相当)	97.8	95.0	96.3	1.3	1.4
2 段目 0	0	0	0	0	-
破過率 (%)	0	0	0	-	-

6. 脱着率

脱着率試験は、1/1000~2E の室内空気を 0.2 L/min で 4 時間吸引した時に、サンプラーに捕集される絶対量 (捕集率 : 1 で算出) を算出し、その範囲の量となるように溶媒で調製した標準液を捕集管のフィルター部に添加した。実際の気中濃度換算値は 0.001~2 mg/m^3 の範囲となる。(10 分間測定では、0.024~48 mg/m^3 となる。)

順方向及び逆方向溶出について、検討した。アセトンで調整した標準液を捕集管に、96 μg (2E 相当) 添加後直ちに、0.2 L/min で 5 分間室内空気を吸引 (20.1°C、20% (R.H.)) させ、冷蔵庫 (4°C) で一晩保管したものをアセトニトリル 10 mL で溶出した。溶出液は

2 mL ずつ分取し、分画試験を行った。結果を図 3 に示す。結果として 10 mL の溶出量においては、どちらの方法でも、問題ないものと考えられたが、若干逆方向が良いと思われたため、逆方向での溶出を採用した。



	1-2mL	3-4mL	5-6mL	7-8mL	9-10mL
順方向 (%)	92.2	4.8	0.8	0.4	0.2
逆方向 (%)	98.7	0.6	0.2	0.2	0.2

図 3 分画試験結果

アセトンで調整した標準液を 5 本ずつ捕集管に、0.048 μg (0.001E 相当)、0.48 μg (0.01E 相当)、96 μg (2E 相当) 添加後直ちに、0.2 L/min で 5 分間室内空気を吸引 (22.1°C、31 % (R.H.)) させ、冷蔵庫 (4°C) で一晩保管したものを 3-5. 試料の調製に従い処理を行った。結果を表 3~6 に示す。

表 4 脱着率試験結果（脱着溶媒：アセトニトリル（逆方向））

添加量 (μg)	脱着率 (%)			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0.048 (0.001E 相当)	104.0	92.2	96.1	4.6	4.8
0.48 (0.01E 相当)	102.9	90.2	98.7	5.0	5.0
96 (2E 相当)	101.9	92.2	97.2	4.2	4.3

7. クロマトグラム

標準液（48 ng/mL（0.01E 相当））のクロマトグラムの例を図 4 に示す。

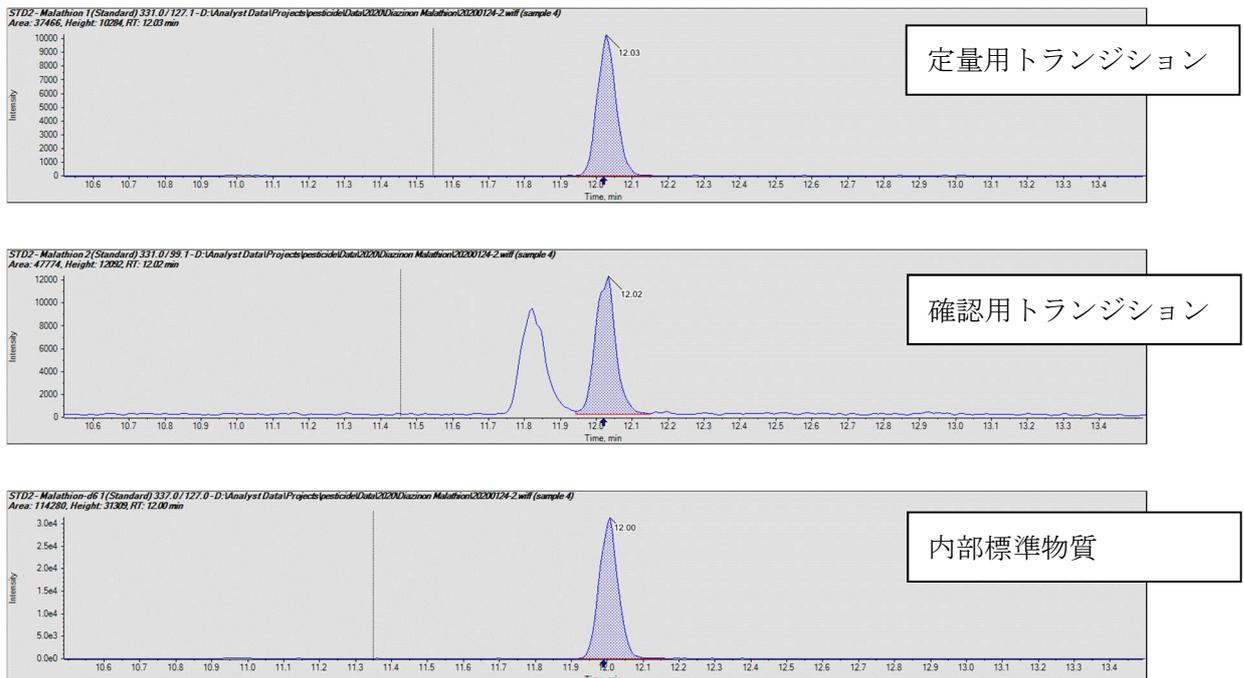


図 4 標準液のクロマトグラム

8. 検量線

標準液をアセトニトリルで希釈、4.8、48、480、2400、4800、9600 ng/mL の 6 段階の標準系列を調製し、検量線の直線性について確認を行ったが、高濃度域で面積値の低下が見られた（図 5）。原因として、標準液の濃度が高く、イオンサプレッションを起こしていることが考えられたため、内標準法での測定の検討を行った。内部標準物質として、マラチオン-d6 を選定し、各標準液に 10 ng/mL 相当量となるように添加したものを使用して、検量線を作成した。その結果、良好な直線性（相関係数（ r ）0.999 以上）が得られた（図 6）。

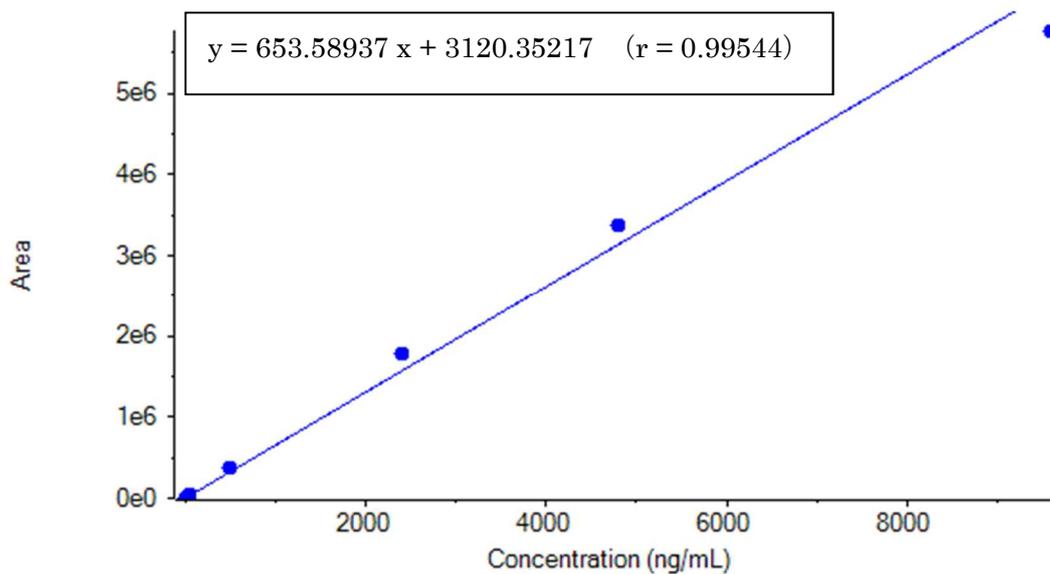


図5 マラチオンの検量線（絶対検量線法）

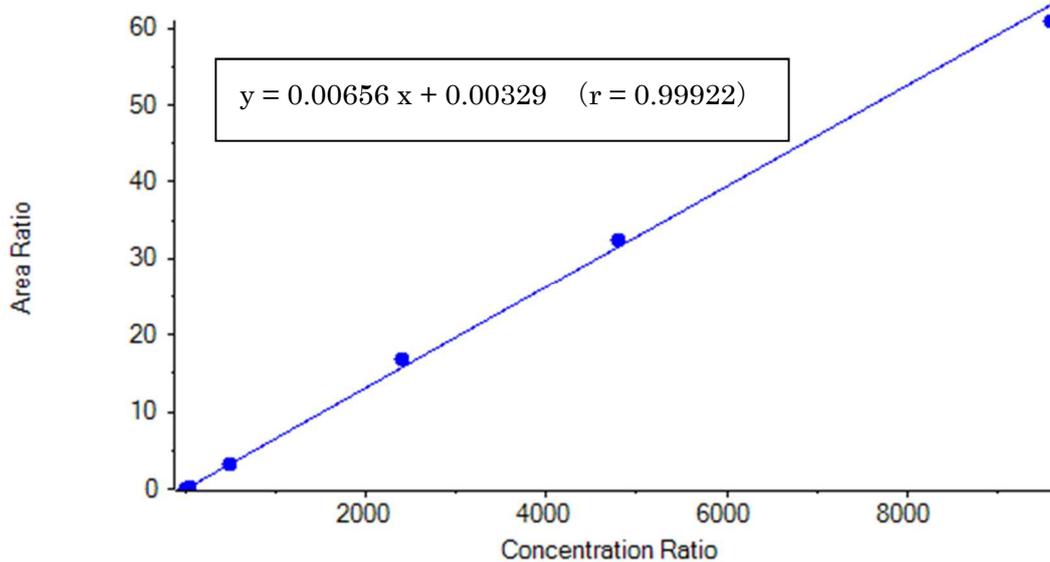


図6 マラチオンの検量線（内標準法）

9. 検出下限および定量下限

検量線作成で調製した混合標準溶液の最低濃度 4.8 ng/mL (0.2 L/min で 4 時間測定した場合；気中濃度 0.001 mg/m³、1/1000E に相当) を 5 サンプル分析し、その標準偏差 (SD) を算出した。得られた標準偏差から、次式より検出下限および定量下限を求めた。

$$\text{検出下限 (ng/mL)} = 3\text{SD} \qquad \text{定量下限 (ng/mL)} = 10\text{SD}$$

その結果、検出下限および定量下限は表 5 に示すとおりとなった。

表 5 検出下限値と定量下限値の算出値

	検出下限値 (3SD)	定量下限値 (10SD)
溶液濃度 (ng/mL)	0.82	2.7
48 L 採気時の気中濃度 (mg/m ³)	0.00017	0.00057

検量線最低濃度である 4.8 ng/mL の標準液のクロマトグラムを図 7 に示す。計算で求めた検出下限値 (3SD) 及び定量下限値 (10SD) は、それぞれ 4.8 ng/mL の約 1/6 と 1/2 程度であり、クロマトグラムから、十分な感度を有していると考えられる。

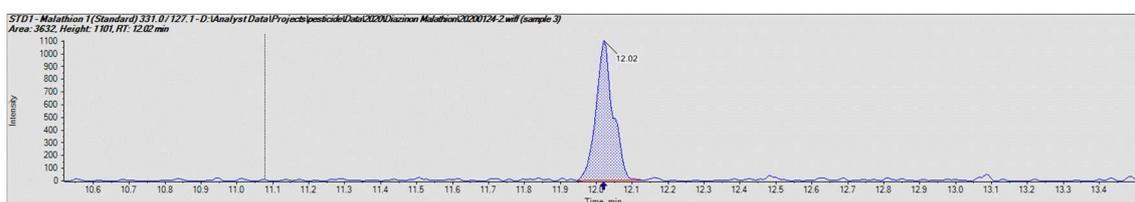


図 7 標準液のクロマトグラム (4.8ng/mL)

10. 添加回収率 (通気試験)

アセトンで調整した標準液を 5 本ずつ捕集管に、0.048 µg (0.001E 相当)、0.48 µg (0.01E 相当)、96 µg (2E 相当) 添加後、直ちに 0.2 L/min で 240 分間室内空気を吸引 (20.0~20.1°C, 20% (R.H.)) した。その後、脱着・分析を行い、回収率を求めた。結果を表 6 に示す。平均回収率は、90 % 以上であり、良好な結果となった。

表 6 添加回収率 (通気試験) 結果

添加量 (µg)	回収率 (%)			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0.048 (0.001E 相当)	105.3	84.3	96.0	7.6	7.9
0.48 (0.01E 相当)	104.2	91.2	98.9	5.4	5.4
96 (2E 相当)	97.8	95.0	96.3	1.3	1.4

11. 保存性

アセトンで調整した標準液を 3 本ずつ捕集管に、0.048 µg (0.001E 相当)、96 µg (2E 相当) 添加後、直ちに 0.2 L/min で 240 分間室内空気を吸引 (18.6~20.1°C, 20~21% (R.H.)) した。これらのサンプルを 0、1、3、5 日、冷蔵庫 (4°C) で保管したものを脱着・分析を行い、回収率を求めた。結果を表 7、8 に示す。0.001E 及び 2E の濃度において、5 日間保存しても 90% 以上の回収率であり、5 日間の保存が可能と考えられる。

表 7 保存試験（添加量 0.048 µg (0.001E 相当)）結果

保存日数	回収率 (%)			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0 日後	103.3	90.1	94.9	7.3	7.7
1 日後	97.5	90.9	94.9	3.5	3.7
3 日後	97.8	90.2	93.2	4.0	4.3
5 日後	98.5	90.6	93.6	4.3	4.5

表 8 保存試験（添加量 96 µg (2E 相当)）結果

保存日数	回収率 (%)			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0 日後	94.1	92.0	93.2	1.1	1.1
1 日後	100.3	97.5	98.7	1.4	1.5
3 日後	96.0	93.9	95.0	1.1	1.1
5 日後	101.4	98.9	100.4	1.3	1.3

1 2. まとめ

本検討の結果、本法は個人ばく露濃度測定手法として、暫定二次評価値 (E) を ACGIH の TLV-TWA 1 mg/m³ とした 1/1000E から 2E の濃度範囲を分析する場合、冷蔵 (4℃) による保存日数が 5 日以内であれば、安定した分析ができる手法であることを確認した。

1 3. 検討機関

環境未来株式会社 総合検査センター (長野県松本市和田 4010-5)

1 4. 参考文献

- 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート
<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/121-75-5.html>
- NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) 5th Edition ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES, METHOD:5600, Issue 2 <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-151/pdfs/methods/5600.pdf>
- Occupational Safety and Health Administration Sampling and Analytical Methods, Method no.62
<https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org062/org062.html>
- 環境省 水質汚濁に係る農薬登録基準 水質汚濁に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 マラチオン (馬拉松ン)
http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/odaku_kijun/rv/malathion.pdf

