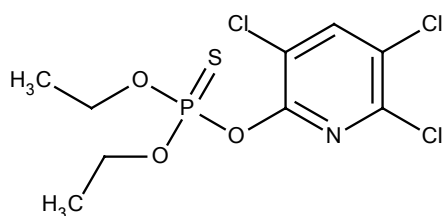


チオりん酸 **O,O-ジエチル-O-(3,5,6-トリクロロ-2-ピリジル)**
O,O-Diethyl- O -(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate

別名：クロルピリホス Chlorpyrifos

IUPAC 名：Diethoxy-sulfanylidene-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)oxy-phosphorane

【対象物質の構造】



CAS 番号：2921-88-2

分子式：C₉H₁₁Cl₃NO₃PS

【物理化学的性状】

分子量	沸点 (°C)	融点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
350.6	160	42.2～43	0.4(23 °C)	4.96～5.27

文献：神奈川県環境科学センター kis-net

【毒性、用途】

毒性情報：魚毒性分類 C、ラット 経気道吸入 LD₅₀ 78 mg/kg

用途：農薬（殺虫剤）、シロアリ防除剤

文献：神奈川県環境科学センター kis-net

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水試料 500 mL にサロゲート（クロルピリホス- d_{10} ）を添加して、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を固相カートリッジに通水してクロルピリホスを濃縮し、脱水後ヘキサンで溶出する。ろ紙は乾燥後ヘキサンで洗浄し、ろ紙洗浄液と固相溶出液を合わせたものを、メタノールに転溶し、1 mL に定容して試験液とし、LC/MS/MS-SRM 法 (ESI-positive) で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

クロルピリホス	: Sigma-Aldrich 製
クロルピリホス- d_{10}	: 林純薬工業製 残留農薬試験用
メタノール	: LC/MS 用
無水硫酸ナトリウム	: 残留農薬試験用
精製水	: 残留農薬試験用
	: 超純水製造システム (MilliQ Gradient - A10、ミリポア製) により製造された水

【器具】

固相カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak PS2 Plus
脱水用ぼう硝カートリッジ	: Waters 製 Sep-Pak Dry
ガラスろ過器	: 柴田科学製 SPC フィルターホルダー、 SPC ガラスフィルターベース、SPC 保存びん
ガラス繊維ろ紙	: ワットマン製 GMF-150
コンセンレーター	: Waters 製 Concentrator Plus
目盛付受器	: ジーエルサイエンス製 GL-SPE 濃縮管 10 mL (注 1)
注射筒	: 10 mL
ビーカー	: 100 mL

【試薬の安定性・毒性】

難分解性、中濃縮性の蓄積性があるため、ばく露されないよう取り扱いに注意する。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 21 年 3 月）に従う。

【採取試料の前処理及び試験液の調製】

水試料 500 mL を量り取り、サロゲート溶液（クロルピリホス- d_{10} 1.0 ng/ μ L メタノール溶液）を 2.0 μ L 添加して混合し、予め洗浄したガラス繊維ろ紙（注 2）をセットしたろ過器でろ過する。ろ液を予めコンディショニングした PS2 カートリッジ（注 3）に 20 mL/min で通水し、クロルピリホスを濃縮する。精製水 10 mL でカートリッジを洗浄し、窒素ガスで乾燥する。脱水用ぼう硝カートリッジ（Sep-Pak-Dry）を PS2 カートリッジに接続し、ヘキサン 4 mL でバックフラッシュ法により、PS2 から Sep-Pak Dry を通してクロルピリホスを溶出する（注 4）。

ろ紙は 15 分程度空気を引いて乾燥後、ビーカーに取り、ヘキサン 5 mL で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを水分が無くなるまで加えて（注 5）、洗浄液を先の固相溶出液と合わせる。

合わせた固相溶出液を窒素ガスで 0.1 mL 程度まで濃縮し（注 6）、メタノール 1 mL を加え、1 mL の目盛り線まで濃縮して、定容し試料液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い前述の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【標準液の調製】

〔標準原液〕

クロルピリホス 10.0 mg を精秤しメタノールを加えて正確に 100 mL とし、0.100 mg/mL の標準原液を調製する。

〔サロゲート物質原液〕

クロルピリホス- d_{10} 5.0 mg を精秤しメタノールを加えて正確に 100 mL とし、0.050 mg/mL のサロゲート物質原液を調製する。

〔サロゲート物質溶液〕

先に作成したサロゲート物質原液より 1.0 mL を分取し、メスフラスコを用いてメタノールで 50 mL とし、1.0 ng/ μ L のサロゲート物質溶液を調製する。

【検量線用標準液】

先に作成した標準原液をメタノールで順次希釈し、0.0200～10.0 ng/mL の検量線作成用標準液を調製する。各溶液にはサロゲート物質溶液を 2.0 ng/mL となるよう添加する。

【測定】

〔装置条件〕

〔LC 条件〕

機種 : Waters Alliance 2695
カラム : Mightysil RP-18 MS、150×2.0 mm (5 μm) 関東化学製
移動相 : A:0.1%ギ酸水溶液 B:メタノール
0- 2分 A=60, B=40 →A=0, B=100 linear gradient
2-15分 A=0, B=100
15-25分 A=60, B=40
流量 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 40 °C
注入量 : 20 μL

〔MS条件〕

機種 : Waters Quattro micro
イオン源温度 : 100 °C
脱離ガス温度 : 350 °C
脱離ガス流量 : 1000 L/hr
コーンガス流量 : 50 L/hr
イオン化法 : ESI+
クロルピリホス定量用 プレカーサーイオン : 351.8
クロルピリホス定量用 プロダクトイオン : 199.9
クロルピリホス確認用 プレカーサーイオン : 349.8
クロルピリホス確認用 プロダクトイオン : 96.8
クロルピリホス-*d*₁₀ プレカーサーイオン : 359.9
クロルピリホス-*d*₁₀ プロダクトイオン : 199.1
キャピラリー電圧 : 2.0 kV
コーン電圧 : 20 V
コリジョン電圧 : 20 V

〔検量線〕

検量線用標準液 20.0 μL を LC/MS/MS に注入し、対象物質のサロゲートに対する相対ピーク面積と濃度比から検量線を作成する。

〔定量〕

試料液 20.0 μL を LC/MS/MS に導入して分析する。得られた対象物質のピーク面積をサロゲート物質のピーク面積で割った比から、検量線を基にして、対象物質濃度をサロゲート物質濃度で割った比(*R*)を求める。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C (ng/L)は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q/V$$

R ：検量線から求めた対象物質濃度をサロゲート物質濃度で割った比

Q ：試料中に添加したサロゲートの量 (ng)

(=添加するサロゲートの濃度 (ng/μL) × 添加するサロゲートの容量 (μL))

V ：試料水量(L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 2.0 \text{ (ng)}$$

(= 添加するサロゲートの濃度 (1.00 ng/μL) × 添加したサロゲートの容量 (2.0 μL))

$$V = 0.500 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 4 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限値 (IDL)〕 (注 7)

本分析に用いた LC/MS/MS (Waters Quattro Micro) の IDL を表 1 に示す。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
クロルピリホス	0.0064	0.500	1.0	0.013

〔測定方法の検出下限値 (MDL)及び定量下限値 (MQL)〕 (注 8)

本測定方法における MDL び MQL を表 2 に示す。

表 2 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	検出下限値 (ng/L)	定量下限値 (ng/L)
クロルピリホス	0.500	1.0	0.015	0.038

注 解

- (注 1) ここで示す製品は実際に使用した商品を掲げたが、これらを推奨するわけではなく、これらと同等以上の品質、性能のものを用いても問題ない。今回使用したものは特注品で、10 mL の透明擦りを使用したか、2 mL までの目盛は正確であるが、それ以上の目盛は精度がない。
- (注 2) ろ紙のコンディショニングは 300 mL 程度の精製水で洗浄して水滴が落ちなくなるまで空気を吸引する。
- (注 3) 固相は予め重量を測定し、ヘキサン 10 mL、メタノール 10 mL、精製水 30 mL でコンディショニングを行う。固相の洗浄が悪いと金属成分等により回収率が低下する。
- (注 4) 固相に残存する水分が回収率に大きく影響を及ぼすので、固相は最初に測定した重量になるまで窒素ガスで乾燥し、さらに Sep-Pak Dry を接続して溶出する。固相の乾燥は 40 °C 程度まで加温しても良い。
- (注 5) 無水硫酸ナトリウムの量は、無水硫酸ナトリウムがビーカーの中で動く程度まで加える。
- (注 6) 濃縮は 30 °C 以下で濃縮する。
- (注 7) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」（平成 21 年 3 月）に従って、表 3 のとおり算出した。

表 3 IDL の算出結果

物質名	クロルピリホス
試料量(L)	0.500
最終液量(mL)	1.0
注入液濃度(ng/mL)	0.020
装置注入量(μL)	20.0
結果 1 (ng/mL)	0.0165
結果 2(ng/mL)	0.0195
結果 3(ng/mL)	0.0161
結果 4(ng/mL)	0.0179
結果 5(ng/mL)	0.0192
結果 6(ng/mL)	0.0159
結果 7(ng/mL)	0.0155
平均値(ng/mL)	0.0172
標準偏差(ng/mL)	0.00164
IDL(ng/mL) *	0.0064
IDL 試料換算値(ng/L)	0.013
S/N 比	12
CV(%)	9.5

* IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

(注 8) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)により、表 4 のとおり算出した。

河川水から対象物質が IDL 値の 5 倍以内ではあるが検出されたため、標準品を添加せずに MDL、MQL を算出した。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	クロルピリホス
試料	河川水
試料量(L)	0.500
標準添加量 (ng)	0
試料換算濃度 (ng/L)	0
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0
装置注入量 (μL)	20.0
操作ブランク平均 (ng/L) * ¹	ND
無添加平均 (ng/L) * ²	0.0293
結果 1 (ng/L)	0.0310
結果 2 (ng/L)	0.0300
結果 3 (ng/L)	0.0314
結果 4 (ng/L)	0.0353
結果 5 (ng/L)	0.0254
結果 6 (ng/L)	0.0248
結果 7 (ng/L)	0.0268
平均値 (ng/L)	0.0293
標準偏差 (ng/L)	0.00378
MDL (ng/L) * ³	0.015
MQL (ng/L) * ⁴	0.038
サロゲート回収率(%)	55.3
S/N 比	4.9
CV(%)	12.9
要求感度 (ng/L)	0.1

*1: 操作ブランク平均: 試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値 (n = 7)

*2: 無添加平均: MDL 算出用試料に標準を添加してない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 7)

*3: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

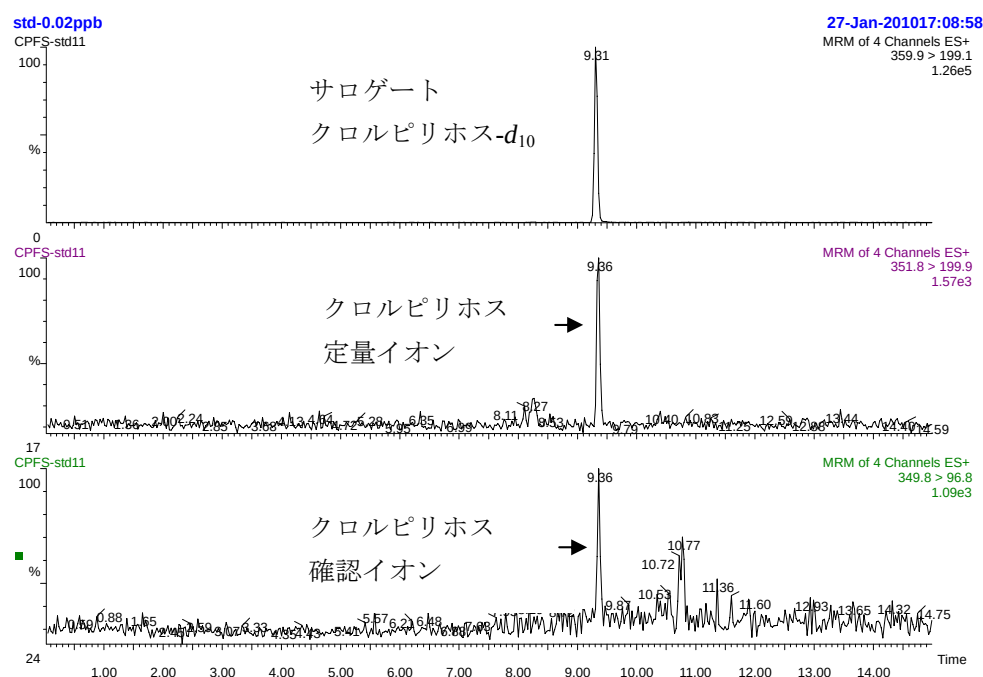


図 1 標準物質 (IDL 測定) クロマトグラム

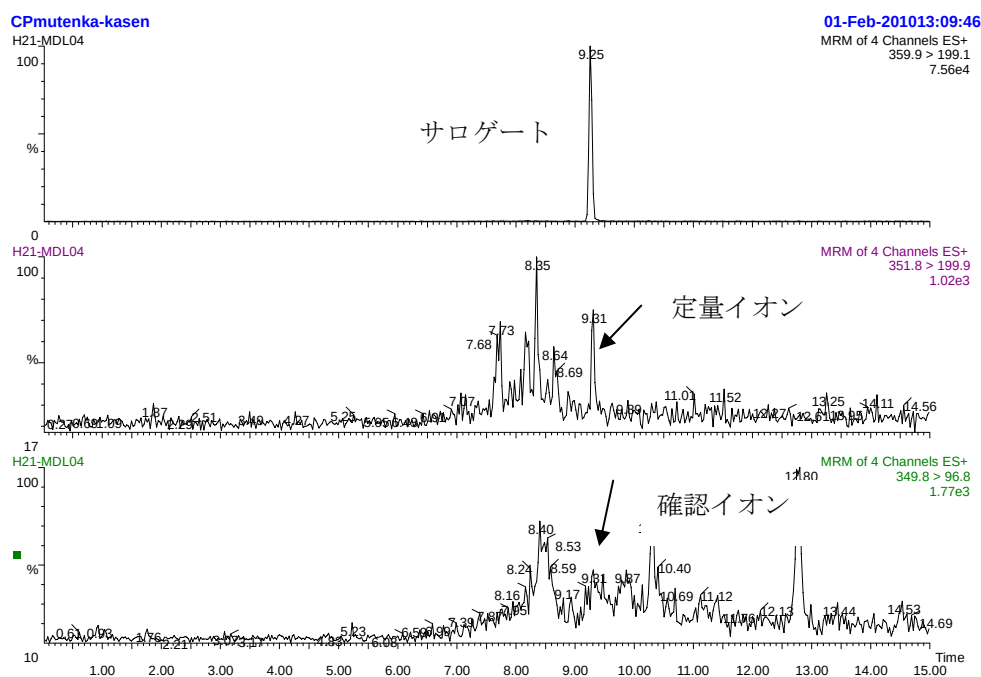


図 2 MDL 試験試料のクロマトグラム (河川無添加試料)

§ 2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

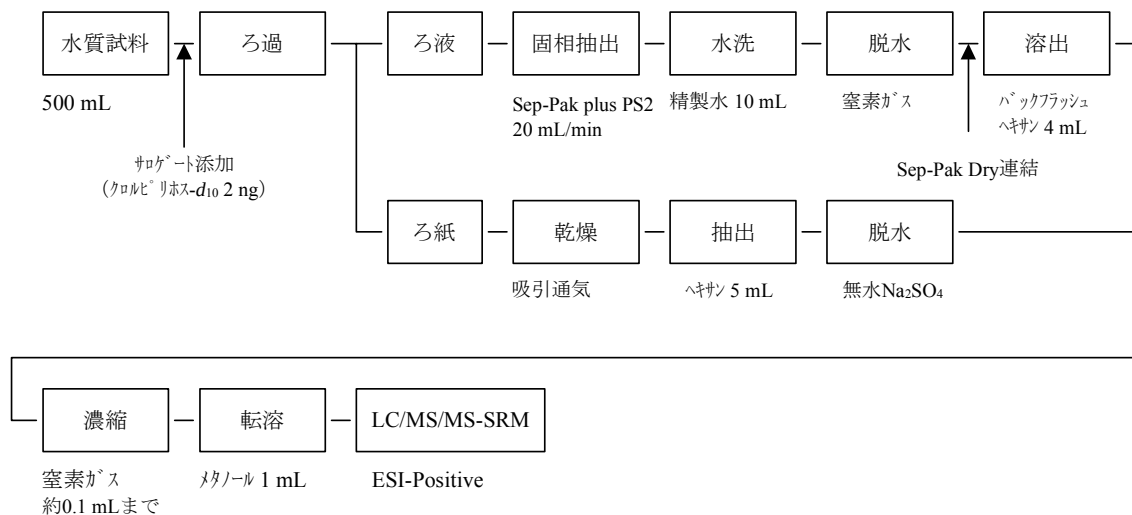
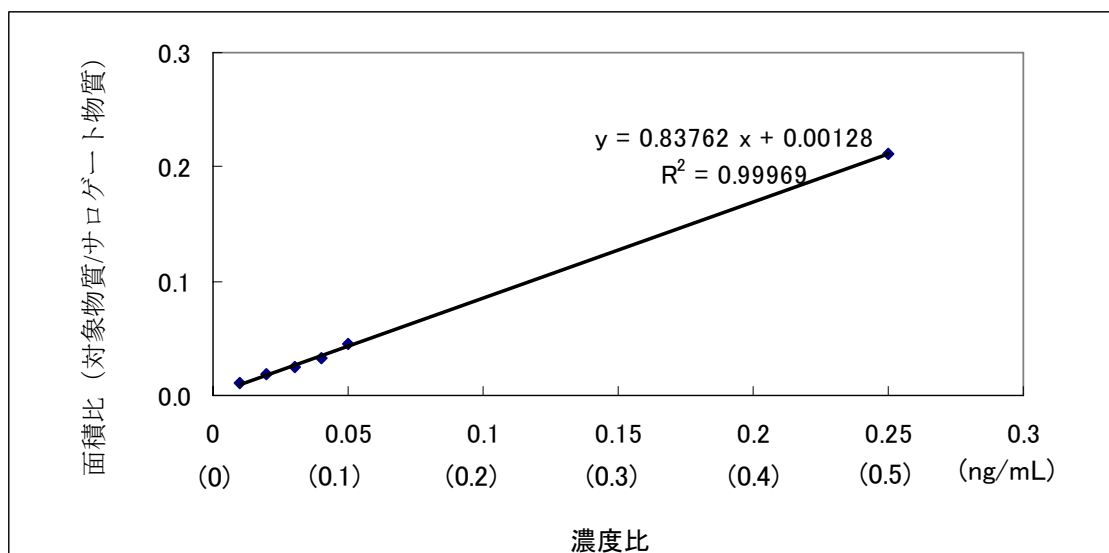


図 3 分析法のフローチャート

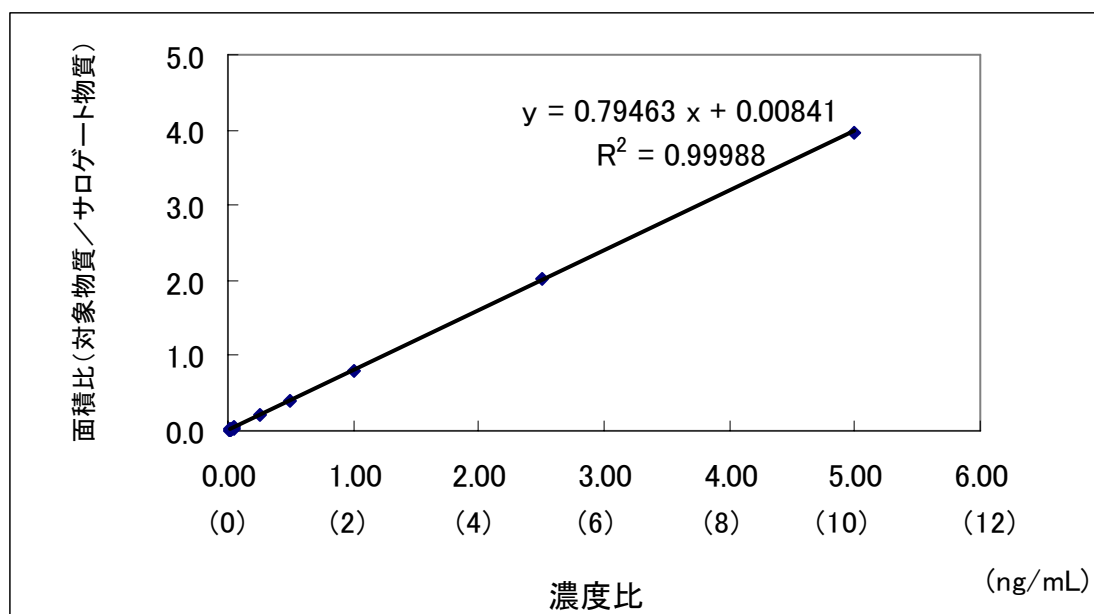
〔検量線〕

検量線を次に示す。



(括弧内の数値は標準液濃度。サロゲート物質濃度=2.0 ng/mL)

図 4 低濃度域検量線 (0.0200~0.500 ng/mL)



(括弧内の数値は標準液濃度。サロゲート物質濃度 = 2.0 ng/mL)

図 5 高濃度域検量線 (0.0200~10.0 ng/mL)

表 5 検量線作成用データ一覧

標準試料濃度 (単位 : ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)	相対感度係数 (RRF) (Cis/Cs)*(As/Ais)
	調査物質 (As)	サロゲート物質 (Ais)		
	【クロルピリホス】 (m/z = 351.8 > 199.9)	【クロルピリホス-d ₁₀ 】 (m/z = 359.9 > 199.1)		
0.02	96.05	9361.2	0.01026	1.026
0.04	247.3	13084.3	0.01890	0.945
0.06	282.1	11010.4	0.02562	0.854
0.08	412.5	12668.4	0.03256	0.814
0.1	548.2	12282.2	0.04463	0.893
0.5	2716.6	12890.4	0.21075	0.843
1	5356.2	13119.9	0.4083	0.817
2	10771.6	13289.7	0.8105	0.811
5	26204.6	12911.1	2.0296	0.812
10	48409.8	12217.1	3.9625	0.792
相対感度係数の相対標準偏差 (%)				7.4

※サロゲート物質濃度 : 2.0 ng/mL (Cis)

〔標準物質のマスペクトル〕

クロルピリホスのマスペクトルを図 6、図 7、図 8 に示す。

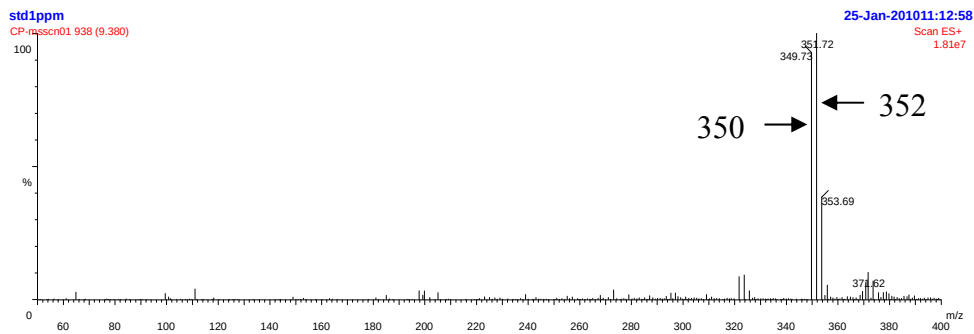


図 6 クロルピリホス (プレカーサーイオン)

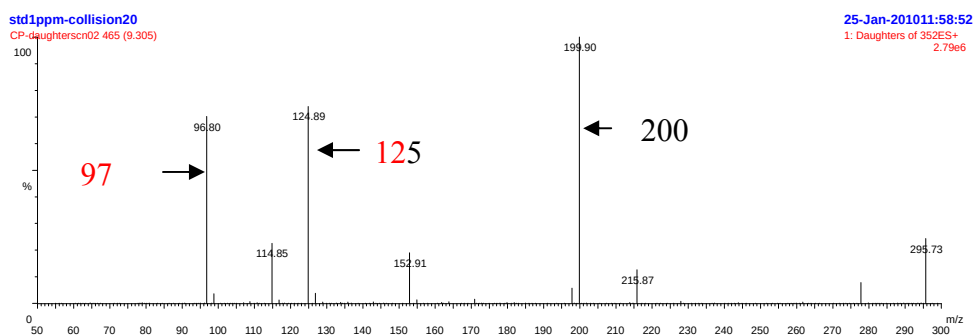


図 7 クロルピリホス (プレカーサーイオン 352 に対するプロダクトイオン)

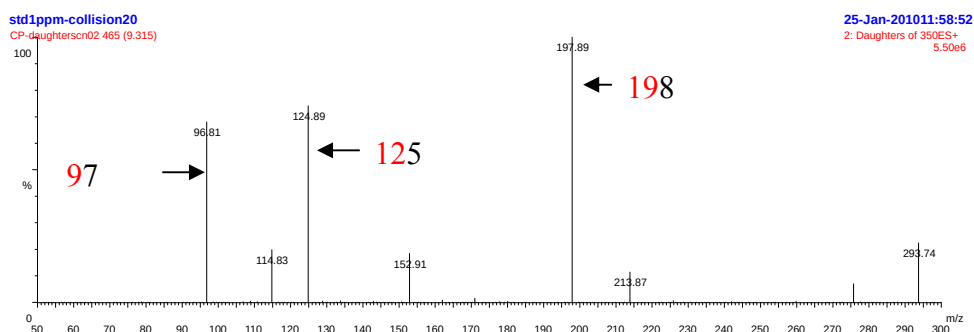


図 8 クロルピリホス (プレカーサーイオン 350 に対するプロダクトイオン)

〔操作ブランク〕

操作ブランク試験のクロマトグラムを図 9 に示す。

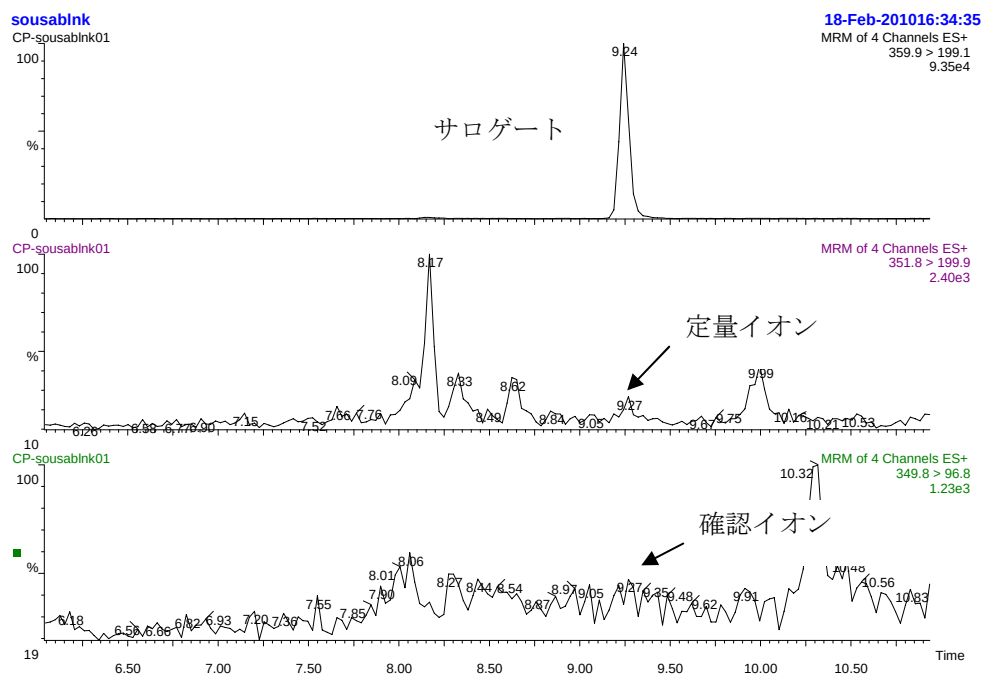


図 9 操作ブランク試験クロマトグラム

〔添加回収試験〕

河川水（新町川、B 類型）、海水（小松島港、B 類型）への標準物質添加回収実験結果を表 6 に示す。

表 6 添加回収試験結果

試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	検体 数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	サロゲート 回収率(%)	変動係数 (%)
河川水	0.5	無添加	7	0.029		55.3	12.9
	0.5	0.2	5	0.45	106.2	57.2	5.6
海水	0.5	無添加	3	0.025		63.3	8.4
	0.5	0.2	5	0.41	96.9	62.5	6.9

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング結果を表 7 に示す。

表 7 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 (ng/mL)	1 時間後の残存率 (%)	7 日後の残存率 (%)	
			暗所	明所
5	0.05	100	100	-
7	0.05	100	100	94
9	0.05	100	93	-

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表 8 に示す。

河川水、海水の保存性試験は各試料 500 mL に 0.1 ng のクロルピリホスを添加し、7 日後にサロゲートを添加して測定した。

粗抽出液の保存性試験は、添加回収試験の試料（500 mL に 0.2 ng 添加した試料の固相抽出液）を冷蔵保存し、14 日後に測定した。

表 8 保存性試験結果

試料名		初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)		
			7 日間	14 日間	1 ヶ月
河川水	試料	0.0002	100		
	粗抽出液	0.2		105	
海水	試料	0.0002	100		
	粗抽出液	0.2		113	
標準溶液	MDL の 10 倍程度	0.1			100
	検量線最高濃度	10			100

〔定量イオン選定検討〕

$[M+H]^+$ である $m/z = 350$ をプレカーサーイオンとする最大のプロダクトイオン $m/z = 198$ を定量イオンとすると、図 10 のように、常に後ろにピークが現れるため、塩素の同位体である $m/z = 352$ をプレカーサーイオンとする $m/z = 200$ のプロダクトイオンを定量イオンとした。

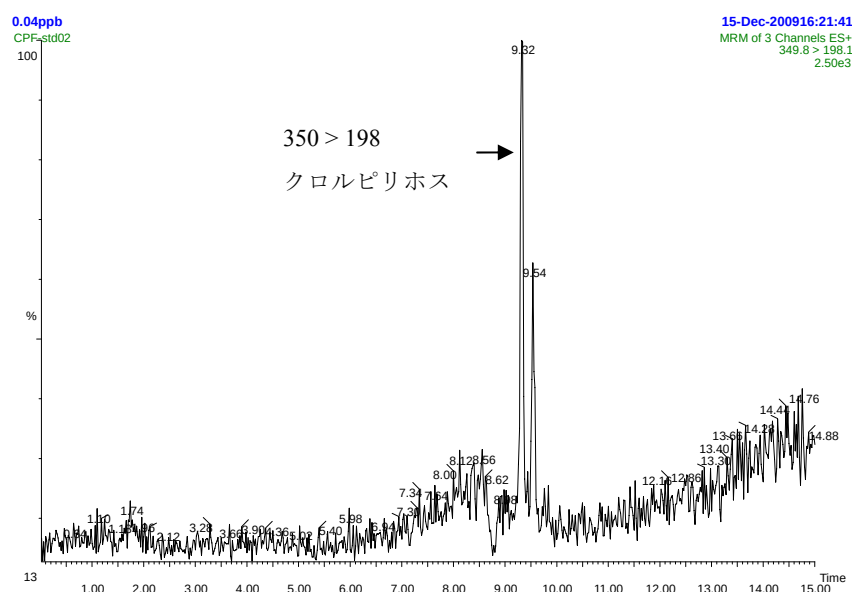


図 10 350 > 198 のクロルピリホスクロマトグラム

〔固相の水分検討〕

固相は前処理前に重量を測定し、通水後に元の重量になるまで窒素ガスで脱水するが、高湿度時は重量測定前にカートリッジに水分を含んでいる場合があり、重量測定のみでは完全脱水ができていない場合があるので、固相カートリッジに脱水用のカートリッジを接続して溶出すると、サロゲートの回収率が大幅に上昇した。

表 9 Sep-Pak Dry の効果

	Sep-Pak Dry なし	Sep-Pak Dry あり
河川水サロゲート回収率 (%) (n=5)	36.6	57.2

〔固相抽出液のイオン化阻害〕

サロゲートの回収率がやや悪いが、メタノールのみにはサロゲートを添加した場合と比較して、精製水 500 mL と河川水 500 mL を採取試料の前処理及び試験液の調製に従って（サロゲートは添加しない）得られた固相抽出液に、後でサロゲートを添加した場合のサロゲート検出率を測定した結果が表 10 である。この結果は、固相抽出液によりサロゲートがイオン化阻害を受けたものと考えられる。

表 6 の河川水と海水の添加回収試験のサロゲート回収率を表 10 のサロゲート回収率で除して補正すると、それぞれ 79.6%、86.9%となる。すなわち、サロゲート回収率が悪い原因はイオン化阻害によるもので、固相からは 80%程度回収されていることが判明した。

表 10 固相抽出液のイオン化阻害

試料	サロゲート検出率 (%)
メタノール(n=2)	100
精製水固相抽出液 (n=2)	82.1
河川水固相抽出液 (n=2)	71.9

〔固相の検討〕

固相 8 種類について、精製水を用いて、操作blank濃度とサロゲート回収率を求めた。

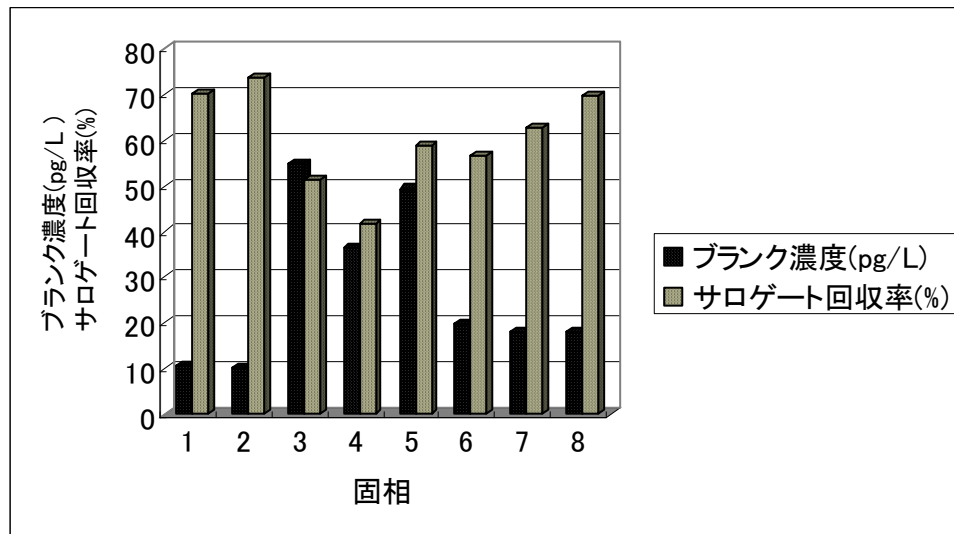


図 11 固相の操作blank値とサロゲート回収率

固相

- 1 : PS2 Waters 製
- 2 : PLS-3 ジーエルサイエンス製
- 3 : RP-1 ジーエルサイエンス製
- 4 : PS@Liq 昭和電工製
- 5 : RP-SG1 日立ハイテクノロジーズ製
- 6 : C18 Waters 製
- 7 : OASIS-HLB Waters 製
- 8 : Bond Elut Plexa バリアンテクノロジーズ製

この結果、2 の固相が最適であると考えられるが、河川水での試験では、サロゲート回収率は、1 の固相がやや良かったので1 の PS2 を使用した。

〔通水時 pH〕

通水時の最適 pH を検討するために、精製水 500 mL の pH を 5 から 9 まで調整し、クロルピリホスを 1 ng 添加し、試験溶液の調製に従い測定して絶対回収率を求めた。その結果が図 12 であり、pH 6～8 での通水が回収率は高かった。

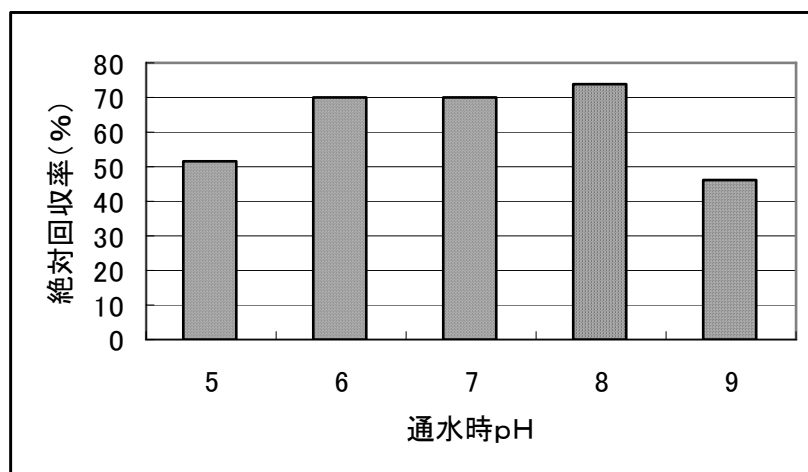


図 12 通水時 pH による回収率の変化

〔固相からの溶出パターン〕

精製水 500 mL にクロルピリホスを 1 ng 添加し、通水、脱水した固相カートリッジを、バックフラッシュ法により 1mL ずつヘキサンで溶出したパターンを図 13 に示す。

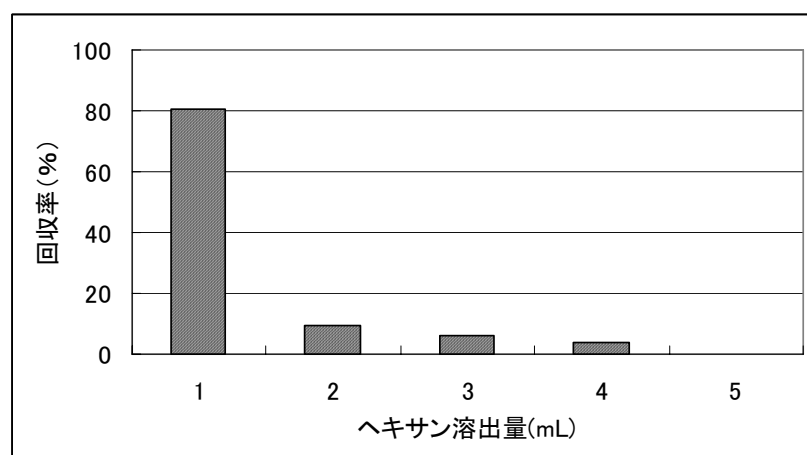


図 13 溶出パターン

バックフラッシュ法により、4 mL で全量が溶出したので、溶出液量は 4 mL とした。

〔環境試料の分析〕

河川水無添加試料は図 2 の MDL 試験試料クロマトグラムに示した。

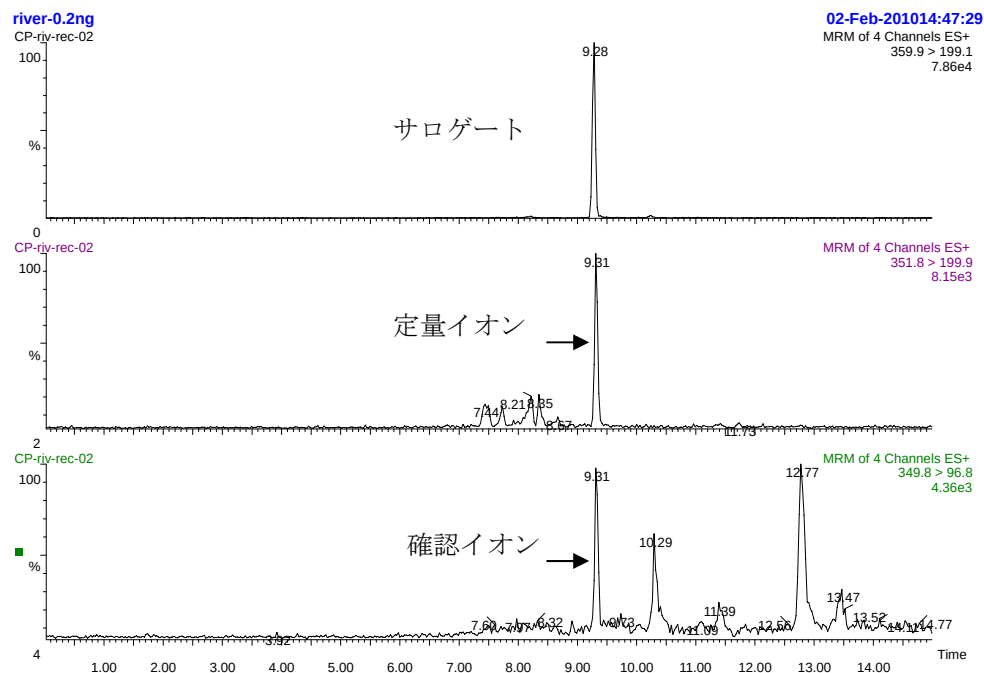


図 14 河川水添加回収試験 (0.2 ng 添加) クロマトグラム

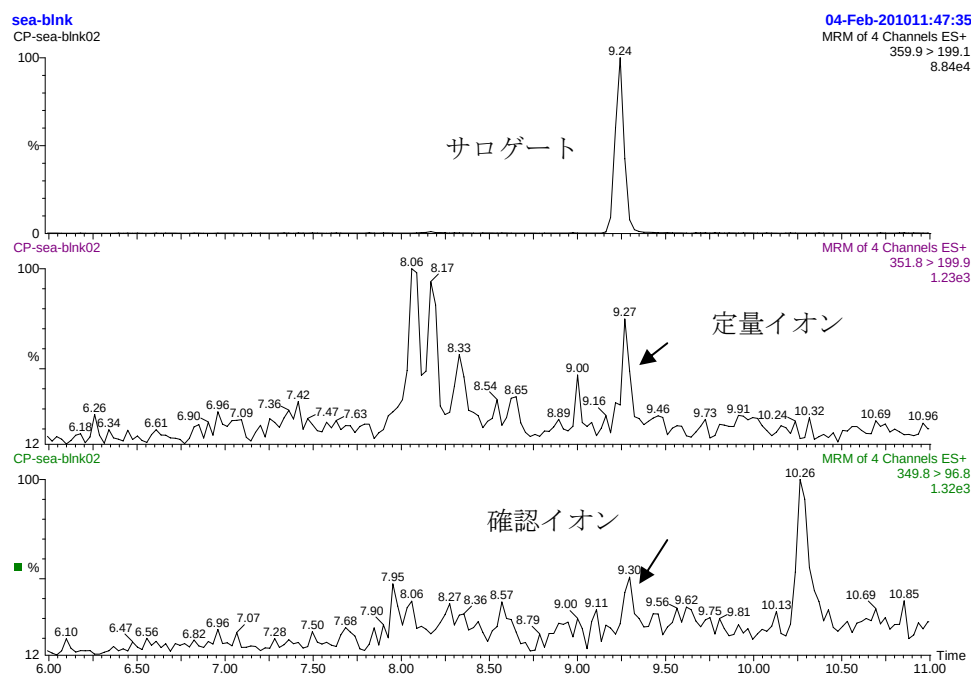


図 15 海水無添加クロマトグラム (小松島港、B 類型)

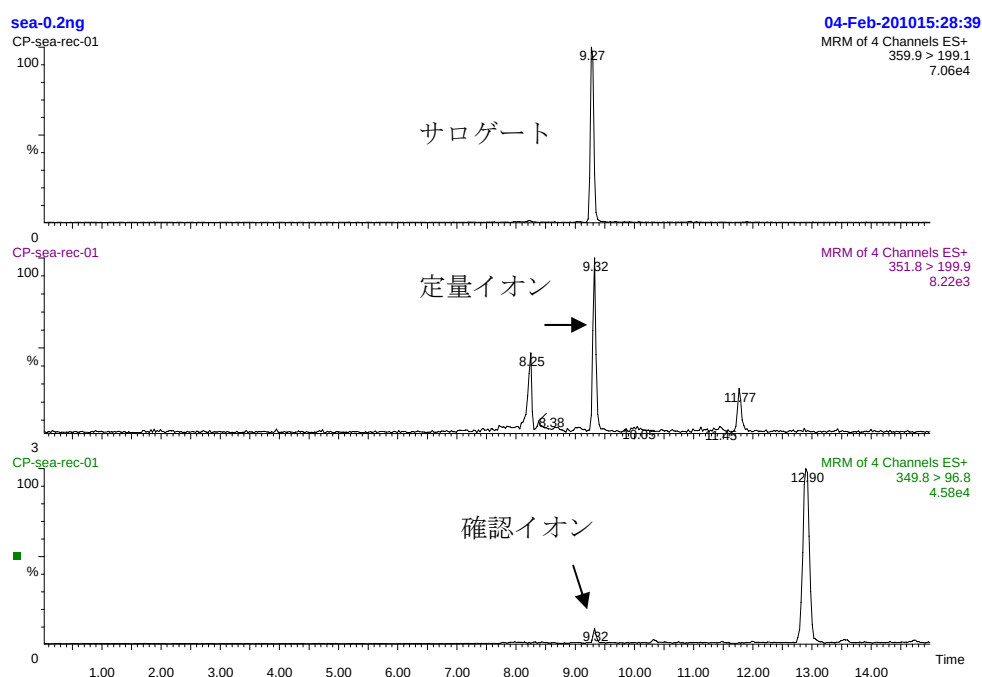


図 16 海水添加回収試験 (0.2 ng 添加) クロマトグラム

海水からも河川水と同様に MDL から MQL レベルの間のクロルピリホスが出された。

【評価】

環境水中に含まれるチオリン酸 *o,o*-ジエチル-*o*-(3,5,6-トリクロロ-2-ピリジル) (別名: クロルピリホス) の定量分析法を開発した。本法の MDL は 0.015 ng/L、MQL は 0.038 ng/L であった。河川水及び海水を用いた添加回収試験 (添加量 0.2ng) の回収率はそれぞれ 106.2% (サロゲート回収率 57.2%、変動係数 5.6%)、及び 96.9% (サロゲート回収率 62.5%、変動係数 6.9%) であった。以上の結果から、本法は環境水中に含まれる 0.02 ng/L オーダーのクロルピリホスの検出に適用可能であると判断される。

【参考文献】

環境庁保健調査室編 昭和 62 年度 化学物質分析法開発調査報告書、
岡山県環境保健センター p 134～142

【担当者連絡先】

所属先名称：徳島県保健環境センター

所属先住所：〒770-0941 徳島市万代町 5-71

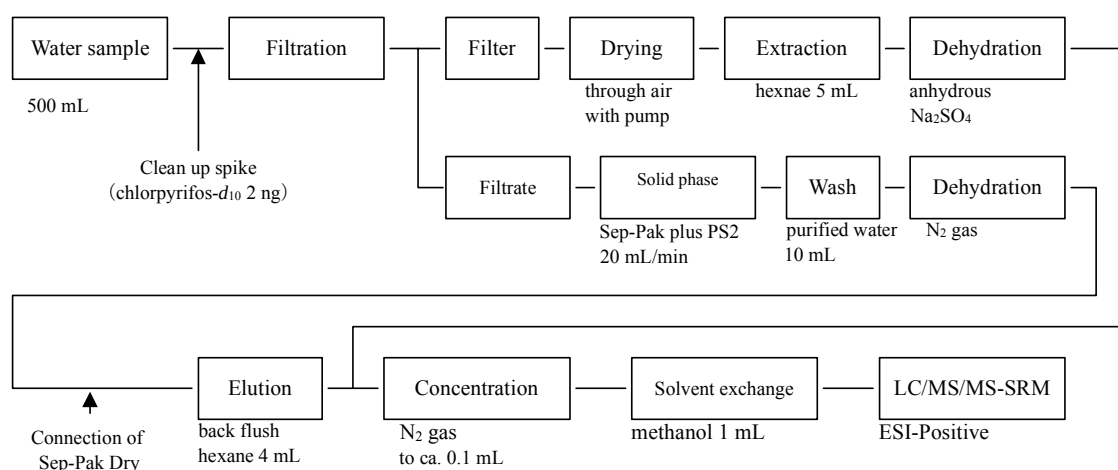
TEL：088-625-7751 FAX：088-625-1732

担当者名：大野ちづ子、藤井伸基

E-mail：oono_chiduko_1@pref.tokushima.lg.jp, fujii_nobuki_1@pref.tokushima.lg.jp

***O,O*-diethyl-*O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate
(Chlorpyrifos)**

This method provides procedures for the determination of chlorpyrifos in water samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Ionization mode is positive ESI (electrospray ionization). Five hundred milliliters of water sample is spiked with chlorpyrifos-*d*₁₀ as the surrogate standard and filtered through a glass-fiber filter (pore size 1 µm) prior to extract. Then a water sample is applied to preconditioned Sep-Pak plus PS2 cartridge at a flow rate of 20 mL/min or less. After passing through, the cartridge is rinsed by purified water and dehydrated using nitrogen gas. Then the PS2 cartridge is joined with Sep-Pak dry cartridge, and eluted with 4 mL of hexane using back flush method. The filter paper is suctioned for 15 minutes and eluted with 5 mL of hexane. Then the extract is dehydrated with anhydrous sodium sulfate and combined to solid phase extract. The extract is concentrated to nearly dryness under gentle stream of nitrogen gas, and redissolved in 1 mL of methanol. The components are determined in the selected-reaction-monitoring (SRM) mode as the precursor/product ion pair of *m/z* 352/200 for chlorpyrifos and of *m/z* 360/199 for the surrogate standard chlorpyrifos-*d*₁₀. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.015 and 0.038 ng/L, respectively. The average of recoveries (*n* = 5) from 0.2 ng chlorpyrifos added surface water from the river and sea were 106.2% and 96.9% (the average recoveries of surrogate: 57.2% and 62.5%), and the relative standard deviation were 5.6% and 6.9%, respectively. Using this method, the target compounds in the river water (the Shinmachi River) and sea water (the Komatsushima Port) were 0.029 and 0.025 ng/L.



物質名	分析法フローチャート	備考
チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(3,5,6-トリクロロ-2-ピリジル) 別名：クロルピリホス	【水質】 <pre> graph TD A[水質試料 500 mL] -- "サロゲート添加 (クロルピリホス-d10 2 ng)" --> B[ろ過] B --> C[ろ紙] B --> D[ろ液] C --> E[乾燥] E -- "吸引通気" --> F[抽出] F -- "ヘキサン 5 mL" --> G[脱水] G -- "無水Na2SO4" --> H[濃縮] D --> I[固相抽出] I -- "Sep-Pak plus PS2 20 mL/min" --> J[水洗] J -- "精製水 10 mL" --> K[脱水] K -- "窒素ガス" --> L[溶出] L -- "バックフラッシュ ヘキサン 4 mL" --> M[濃縮] L -- "Sep-Pak Dry連結" --> M M -- "窒素ガス 約0.1 mLまで" --> N[転溶] N -- "メタノール 1 mL" --> O[LC/MS/MS-SRM] O -- "ESI-Positive" --> P[] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI(+) 検出下限値： 【水質】(ng/L) 0.015 分析条件： 機器 LC: Waters Alliance 2695 MS: Waters Quattro Micro カラム Mightysil RP-18 MS 150 mm × 2.0 mm、 5 μm