

チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)
(別名ダイアジノン) の測定・分析手法に関する検討結果報告書

令和 4 年 3 月 1 日

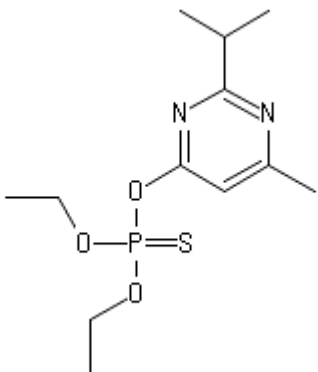
測定手法等検討評価委員会

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. 破過及び捕集剤の有効性	4
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）	8
11. 保存性	9
12. まとめ	10
13. 検討機関	10
14. 参考文献	10

1. はじめに

チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)の物理化学的性状を示した（表 1）。

表 1 チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)の物理化学的性状

CAS No.	333-41-5	
別名	ダイアジノン	
用途	農薬（殺虫剤）	
構造式	 <chem>CCOP(=S)(OCC)OC1=NC(C)=NC(C)=N1C(C)C</chem> $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
分子量	304.35	
物性	比重	1.116～1.118（20℃/4℃）
	沸点	354℃
	融点	不明
	蒸気圧	0.01197 Pa（25℃、純品）
	形状	液体（20℃、1 気圧）
許容濃度等	日本産業衛生学会	0.1 mg/m ³
	OSHA	PEL : 0.1 mg/m ³
	NIOSH	REL : 0.1 mg/m ³
	ACGIH	TLV-TWA : 0.01 mg/m ³ IFV

チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)（以下、ダイアジノンとする。）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、急性毒性（経口）（区分 4）、急性毒性（経皮）（区分 4）、急性毒性（吸入：粉塵、ミスト）（区分 4）、皮膚感作性（区分 1）、発がん

性（区分 1B）、生殖毒性（区分 2）、特定標的臓器毒性（単回ばく露）（区分 1（神経系））、特定標的臓器毒性（反復ばく露）（区分 1（神経系）、区分 2（肝臓、腎臓、血液系、生殖器（男性）））となっており、アレルギー性皮膚反応を起こすおそれや発がんのおそれ、生殖能又は胎児への悪影響のおそれの疑い、神経系の障害、また、長期にわたる、又は反復ばく露による神経系の障害、長期にわたる、又は反復ばく露による肝臓、腎臓、血液系、生殖器（男性）の障害のおそれ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 0.01 mg/m³ を暫定二次評価値（E）とし、1/100E 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、ダイアジノ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、ガラスろ紙、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 480 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。

ダイアジノン標準物質：富士フイルム和光純薬株式会社 純度 99.4%

ダイアジノン-d₁₀（ジエチル-d₁₀）：CDN ISOTOPES 純度 99%

メタノール：富士フイルム和光純薬株式会社 LC/MS 用

アセトニトリル：関東化学株式会社 LC/MS 用

ギ酸：富士フイルム和光純薬株式会社 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

定量下限値の標準液濃度 0.48 ng/mL（0.01 E）が十分に確保できるように条件を検討した。表 2 に測定条件を示す。

表 2 LC/MS/MS 条件

HPLC 条件								
装置	アジレント・テクノロジーズ株式会社 1260 Infinity II							
カラム	GL Sciences InertSustain C18 HP,3 μm 2.1×100 mm							
カラム温度	40℃							
移動相	A：0.2%ギ酸、B：メタノール							
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 QTRAP5500							
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				40 unit			
	コリジョンガス				10 unit			
	イオンスプレー電圧				4000 V			
	温度				550℃			
	イオンソースガス 1				70 unit			
	イオンソースガス 1				60 unit			
MRM 条件		Q1	Q3	Time	DP	EP	CE	CXP
	定量用	305.1	97.0	100 msec	85 V	10 V	55 V	10 V
	確認用	305.1	169.0	100 msec	85 V	10 V	35 V	10 V
	内部標準	315.1	170.0	100 msec	85 V	10 V	35 V	10 V

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、 ϕ 12 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。本来ならばインハラブル粒子と蒸気の同時サンプリングがで

きる IFV サンプラーで検討すべきではあるが、インハラブル粒子を捕集する際に必要な面速度 19 cm/s と同等の面速度となる 0.2 L/min で NOBIAS による捕集を検討した。しかし、NOBIAS の捕集粒子のサイズは未検証のため、IFV と同等ではない可能性があるが、粒子とガスの両方を捕集して検討している。

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（アセトニトリル）を逆方向に 10 mL 通液し、10 mL 遠沈管に受ける。試料液に内標準物質として、0.2 µg/mL のダイアジノン-d₁₀ 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

溶媒（アセトニトリル）及び捕集管のブランクの確認を行った。溶媒（アセトニトリル）及び捕集管ブランクについて、ダイアジノンの RT 位置にピークは認められなかった。溶媒（アセトニトリル）のクロマトグラムを図 1 に、捕集管ブランクのクロマトグラムを図 2 に示す。

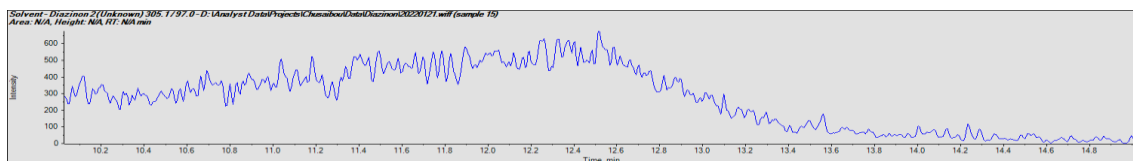


図 1 溶媒（アセトニトリル）のクロマトグラム

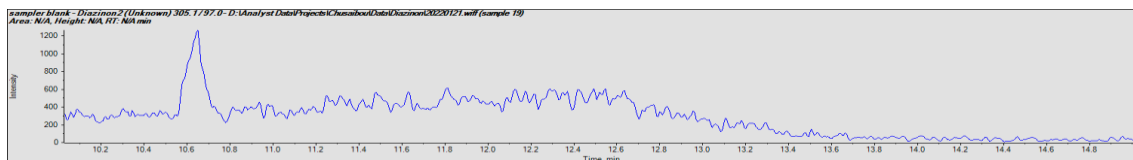


図 2 捕集管ブランクのクロマトグラム

5. 破過及び捕集剤の有効性

破過試験は、アセトニトリルで調製した標準液を 0.96 µg（2E 相当）添加した捕集管（1 段目）を上流側に、未添加の捕集管（2 段目）を下流側に連結したものについて、0.2

L/min で 4 時間 (22.6～22.8 °C、20～22 %(R.H.)) 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、ダイアジノンのピークは認められず、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 (%) n=5			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
1 段目 0.96(2E 相当)	94.5	88.2	91.3	2.5	2.7
2 段目	0.0	0.0	0.0	0.0	-
破過率 (%)	0.0	0.0	0.0	-	-

捕集剤の有効性の確認試験は、アセトニトリルで調製した標準液を 0.96 μg (2E 相当) 添加した捕集管について、0.2 L/min で 1 時間 (23.3～23.4 °C、25 %(R.H.)) 及び 2 時間 (23.0～23.3 °C、25～27 %(R.H.))、4 時間 (22.6～22.8 °C、20～22 %(R.H.))、8 時間 (22.0～23.3 °C、25～28 %(R.H.)) 室内空気を通気した。その後、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 4 に示す。通気時間が長いほど回収率が下がる傾向はみられたものの、8 時間通気を行っても回収率は、90%以上となり、有効な捕集剤と考えられる。

表 4 捕集剤の有効性確認試験結果

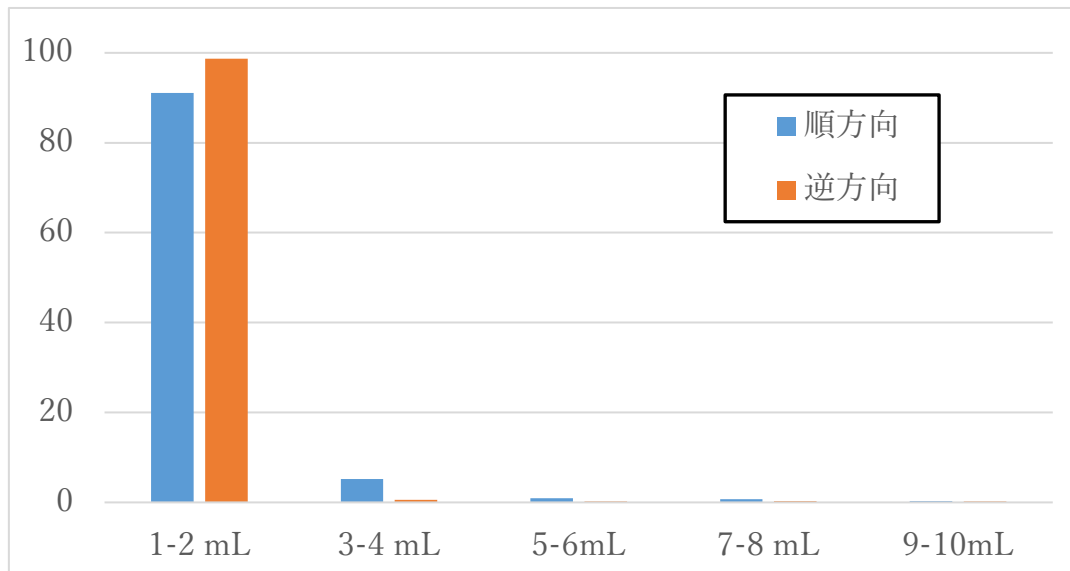
通気時間	回収率 (%) n=5			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
1 時間	96.6	93.7	95.2	1.3	1.4
2 時間	97.2	89.1	93.5	3.0	3.2
4 時間	93.0	87.5	90.7	2.6	2.9
8 時間	91.2	89.2	90.1	0.9	1.0

6. 脱着率

脱着率試験は、TLV-TWA:0.01 mg/m^3 の 1/100～2 倍の気中空気を 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 (アセトニトリル) 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 0.0001～0.02 mg/m^3 の範囲となる。(10 分間測定では、0.0024～0.48 mg/m^3 となる。)

順方向及び逆方向溶出について検討した。アセトニトリルで調製した標準液を捕集管に、0.96 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.) し、冷蔵庫（4℃）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。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。10mL 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、若干逆方向が良好であったため、逆方向での溶出を採用した。



	1-2 mL	3-4 mL	5-6mL	7-8 mL	9-10mL
順方向 (%)	91.1	5.2	0.9	0.7	0.3
逆方向 (%)	98.7	0.6	0.2	0.3	0.2

図3 分画試験結果

アセトニトリルで調製した標準液を捕集管に、0.0048 µg（0.01 E 相当）、0.048 µg（0.1 E 相当）、0.96 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（21.1℃、31 % (R.H.)）し、冷蔵庫（4℃）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5に示す。全ての添加量において、脱着率は90%超となり、良好な結果となった。

表5 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 (%) n=5			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0.0048(0.01E 相当)	101.6	95.6	99.1	2.3	2.3
0.048(0.1E 相当)	96.8	94.4	95.5	1.0	1.0
0.96 (2E 相当)	92.7	95.4	94.5	1.1	1.2

7. クロマトグラム

標準液（4.8 ng/mL（0.1E 相当））、内部標準物質（2 ng/mL）のクロマトグラムの例を図4に示す。

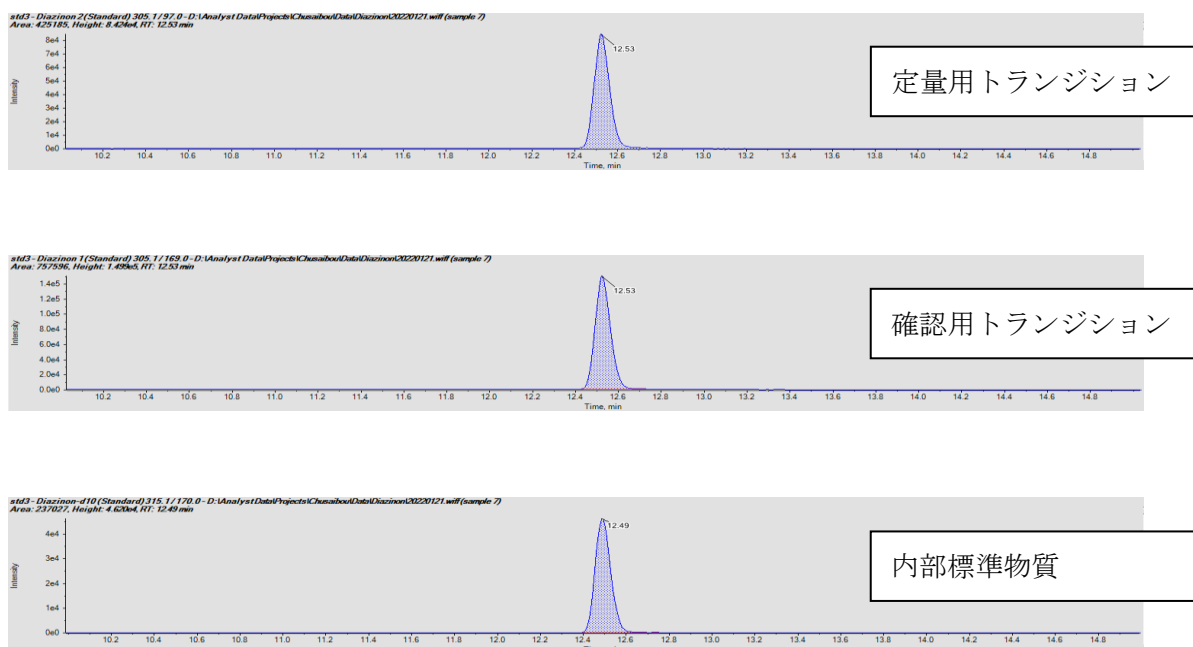


図4 標準液のクロマトグラム

8. 検量線

標準液をアセトニトリルで希釈、0.48、4.8、24、48、96 ng/mL の5段階の標準系列を調製し、各点を5回繰り返し測定し、検量線の直線性について確認を行った。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5）

Calibration for Diazinon 2: $y = 0.75753x + 0.02090$ ($r = 0.99992$) (weighting: $1/x$)

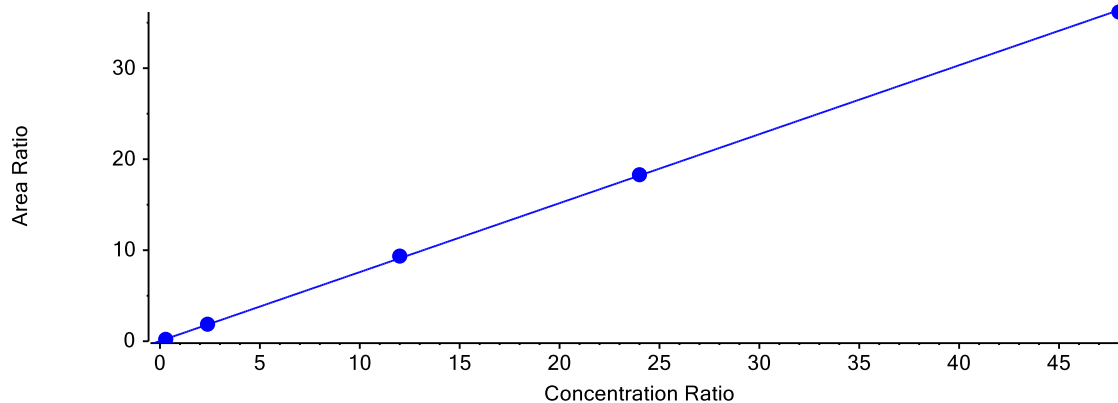


図5 ダイアジノンの検量線

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 0.48 ng/mL (0.2 L/min で 4 時間測定した場合；気中濃度 0.0001 mg/m³、1/100E 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。

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

その結果、検出下限および定量下限は表 6 に示すとおりとなった。

表 6 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)	0.042	0.14
48L 採気時の気中濃度 (mg/m ³)	0.0000088	0.000029

検量線最低濃度である 0.48 ng/mL の標準液のクロマトグラムを図 6 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 0.48 ng/mL の約 1/10 及び 1/3 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。

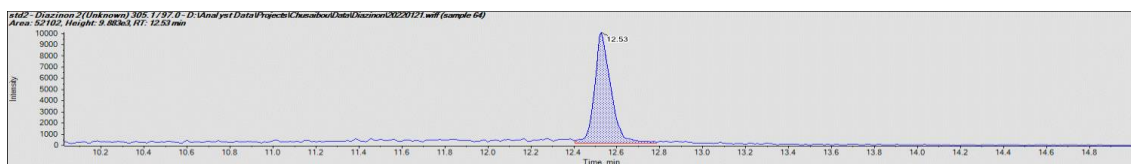


図 6 標準液のクロマトグラム (0.48 ng/mL)

10. 添加回収率 (通気試験)

アセトニトリルで調製した標準液を捕集管に、0.0048 µg (0.01 E 相当)、0.048 µg (0.1 E 相当)、0.96 µg (2E 相当) 添加後、直ちに 0.2 L/min で 4 時間室内空気を吸引 (22.4 ~ 23.6 °C、28 ~ 37 % (R.H.)) し、3 - 5. 試料の調製に従い、処理を行った。結果を表 7 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 7 (0.2L/min・4h) 添加回収率 (通気試験) 結果

添加量 (µg)	回収率 (%) n=5			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0.0048(0.01E 相当)	99.3	90.1	94.1	3.6	3.8
0.048(0.1E 相当)	97.2	87.0	91.9	4.2	4.6
0.96(2E 相当)	93.0	87.5	90.7	2.6	2.9

さらに、捕集剤の有効性の確認試験において、通気時間が短いほど回収率が上昇する傾

向がみられたことから、通気時間を 4 時間から 2 時間にし、0.001E 相当の添加回収率試験を行った。アセトニトリルで調製した標準液を捕集管に、0.00024 μg (0.001 E 相当) 添加後、直ちに 0.2 L/min で 2 時間室内空気を吸引 (21.7~21.8 $^{\circ}\text{C}$ 、24~25 % (R.H.)) し、3 - 5. 試料の調製に従い、処理を行った。但し、検量線の範囲は、0.024、0.048、0.48、2.4、4.8 ng/mL の 5 段階で調製した ($r=0.99983$)。結果を表 8 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 8 (0.2L/min・2h) 添加回収率 (通気試験) 結果

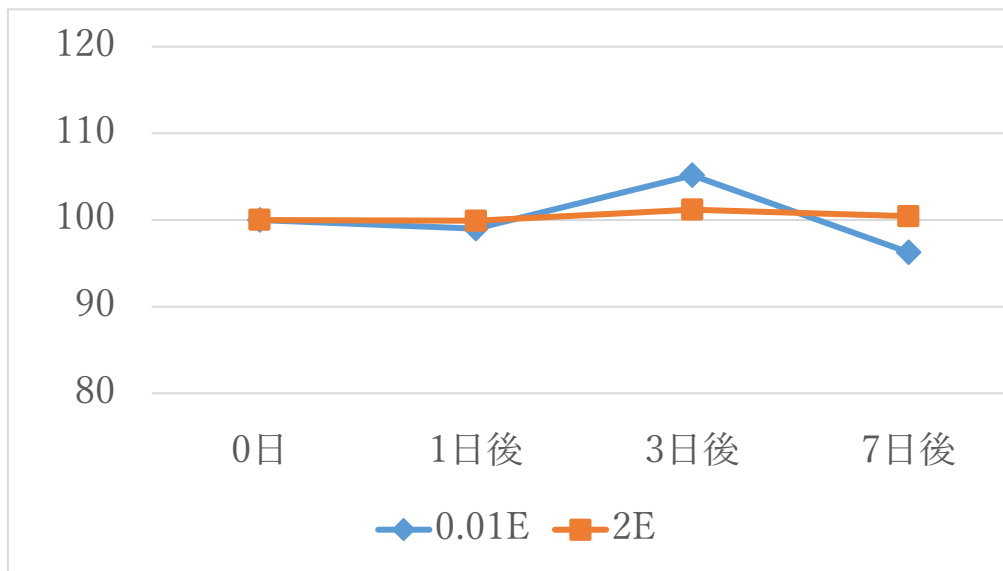
添加量 (μg)	回収率 (%) n=5			標準偏差 (%)	変動係数 (%)
	最大	最小	平均		
0.00024(0.001E 相当)	110.6	91.5	102.9	8.4	8.2

1 1. 保存性

保存試験は、アセトニトリルで調製した標準液を 0.0048 μg (0.01E 相当) 及び 0.96 μg (2E 相当) 添加した捕集管について、0.2 L/min で 4 時間 (22.5~23.0 $^{\circ}\text{C}$ 、26~38 % (R.H.)) 室内空気を通気した。これらのサンプルを 0、1、3、7 日、冷蔵庫 (4 $^{\circ}\text{C}$) で保管したものについて、3 - 3. 試料の調製に従い、処理を行い、0 日を 100 % として、保管日数による保存率を求めた。結果を表 9 及び図 7 に示す。7 日後の保存率は、ほぼ 100 % となり、7 日間の保存が可能と考えられる。

表 9 保存試験結果

添加量 (μg)	保存率 (%) n=3			
	0 日	1 日後	3 日後	7 日後
0.0048(0.01E 相当)	100.0	99.0	105.2	96.3
0.96(2E 相当)	100.0	99.9	101.2	100.4



(別紙) チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)

(別名ダイアジノン) 標準測定分析法

化学式: C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS 分子量: 304.35 CASNo: 333-41-5	
許容濃度等: 日本産業衛生学会: 0.1 mg/ m ³ OSHA PEL: 0.1 mg/ m ³ NIOSH REL: 0.1 mg/ m ³ ACGIH TLV-TWA: 0.01 mg/ m ³ IFV	物性等 沸 点: 354℃ 融 点: 不明 蒸気圧: 0.01197 Pa (25℃、純品) 形 状: 液体 (20℃、1 気圧)
別名	ダイアジノン
サンプリング	分析
サンプラー: NOBIAS RP-SG1WA (株式会社日立ハイテクサイエンス) サンプリング流量: 0.2 L/min サンプリング時間: 4 時間 (48 L) 保存性: 冷蔵で少なくとも 7 日間までは変化がないことを確認	分析方法: 液体クロマトグラフータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) 抽出溶媒: アセトニトリル 10 mL (内部標準物質 (I.S.); ダイアジノン-d ₁₀ , 2 ng/mL) 溶出方法: 逆方向溶出 機器: LC: 1260 Infinity II (アジレント・テクノロジー株式会社)、MS: QTRAP5500 (株式会社 AB SCIEX) カラム: InertSustain C18 HP 3 μm, 2.1×100 mm (GL サイエンス株式会社) カラム温度: 40 °C 移動相: A: 0.2 %ギ酸、B: メタノール 流速: 0.2 mL/min グラジエント条件: 5%B (0min) →100%B (10min) →100 % B (15min) →5 % B (15.1min) →STOP (22min) 注入量: 0.5 μL イオン化法: ESI、positive 測定モード: MRM 定量トランジション: m/z 305.1→97.0 確認トランジション: m/z 305.1→169.0 内部標準物質: m/z 315.1→170.0 検量線: 0.48~96 ng/mL の範囲で直線性が得られている。(r=0.999) 定量法: 内部標準法
精度	
脱着率; 添加量 0.0048μg の場合 99.1% 0.048 μg 95.5% 0.96 μg 94.5%	
回収率(4 時間捕集); 添加量 0.0048 μg の場合 94.1% 0.048 μg 91.9% 0.96 μg 90.7%	
回収率(2 時間捕集); 添加量 0.00024 μg の場合 102.9% 0.01 μg/m ³ レベルでは、捕集時間が 2 時間までは回収率が 90%以上である 定量下限 (10SD) 0.14 ng/mL 0.000029 mg/m ³ (採気量; 48 L)	
検出下限 (3SD) 0.042 ng/mL 0.0000088 mg/m ³ (採気量; 48 L)	
適用: 個人ばく露濃度測定、作業環境測定	
妨害: なし	
参考文献:	
1) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート チオりん酸 O,O-ジエチル-O-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジニル)	
2) NIOSH NMAM METHOD 5600, Issue2 ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES	
3) OSHA Sampling and Analytical Methods Method No.62 Chlorpyrifos(Dursban) DDVP(Dichlorvos) Diazinon Malathion Parathion	
4) 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料 ダイアジノン	
5) ダイアジノン標準物質 SDS 富士フイルム和光純薬株式会社	

作成日; 令和 4 年 3 月 1 日