

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

室内濃度指針値見直しスキーム・曝露情報の収集に資する
室内空气中化学物質測定方法の開発

室内空气中準揮発性有機化合物試験法の開発

研究分担者 上村 仁 神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員

研究要旨

室内空气中に存在する可能性のある準揮発性有機化合物（SVOC）のうち、防蟻剤・殺虫剤について、測定法を検討し、以下に示す方法を構築した。

本年度は、昨年度の研究でマトリクス効果が認められたピレスロイド系殺虫剤の測定法に改良を加えるとともに、ネオニコチノイド系殺虫剤の LC/MS 法による測定法を構築した。

ピレスロイド系殺虫剤の測定法改良については、測定対象成分の重水素化置換体（ペルメトリン-d5）を内部標準として用いることにより、マトリクス効果を回避することが可能であった。

ネオニコチノイド系殺虫剤の分析は以下のように行った。

空气中的 SVOC の捕集には、石英フィルターとエムポアディスク C18 を積層して使用し、1L/分で 24 時間空気を吸引してフィルター上に捕集した。

フィルターからの抽出には初めにアセトニトリルで超音波抽出を行い、次いで 20% アセトニトリル水溶液で超音波抽出を行った。測定には LC/MS/MS を用い、内部標準としてイミダクロプリド-d4 を用いる内部標準法による定量とした。

A. 研究目的

室内空气中の揮発性有機化合物（VOC）や準揮発性有機化合物（SVOC）についての測定方法は現状では必ずしも十分に整備されている状況ではない。室内濃度指針値の見直し作業を進める上で多くの検体を地方衛生研究所の協力のもと分析することが必要不可欠であるが、統一的な妥当性が検証された分析法が確立されて

いない。

そこで、室内空气中の SVOC のうち、殺虫剤（ピレスロイド系及びネオニコチノイド系）について、測定方法を確立することを目的とする。

わが国で汎用されている石英フィルターとオクタデシルシリル固相抽出ディスク（ODS フィルター）を併用する方法を標準に、ISO 等で検討されているポリウ

レタン樹脂フォーム(PUF)を用いる方法についても比較を行う。また、確立した方法が従来からの規制項目であるフェノブカルブ、クロルピリホス、ダイアジノンの分析にも適用できるかについて検討を行う。

平成 28 年度は、平成 27 年度において課題の残った GC/MS 法によるピレスロイド系殺虫剤の分析法の改良を行うとともに、ネオニコチノイド系殺虫剤の分析法確立を目指した。

B. 研究方法

B-1. 対象とする防蟻剤・殺虫剤の選定

家庭用殺虫剤・防蟻剤として汎用されるピレスロイド系殺虫剤、ネオニコチノイド系殺虫剤の中から、本年度は新たに、LC/MS 法で測定可能で、標準物質が入手できた化合物を選定した。表 1 に選定した化合物名を示した。GC/MS 測定対象化合物はアレスリン、ピフェントリン、フタルスリン、フェノトリン、アクリナトリン、ペルメトリン、トラロメトリン、クロルフェナピル、エトフェンプロックス、シラフルオフェン、クロルピリホス、フェノブカルブ、ダイアジノン、LC/MS 測定対象化合物はジノテフラン、ニテンピラム、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド、フィプロニルである。内部標準には *trans*-Permethrin-(*phenoxy*-d₅) (以下、ペルメトリン-d₅: GC/MS 法用) 及びイミダクロプリド-d₄(LC/MS 法用) を使用した。

各化合物の構造式を図 1~ 図 3 に示した。

B-2. 試薬及び捕集剤

試薬

標準物質はいずれも和光純薬工業製のアレスリン、ピフェントリン、フタルスリン、フェノトリン、アクリナトリン、ペルメトリン、トラロメトリン、クロルフェナピル、エトフェンプロックス、シラフルオフェン、クロルピリホス、フェノブカルブ、ダイアジノン、ジノテフラン、ニテンピラム、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド、フィプロニルを使用した。内部標準物質は C/D/N Isotope 社製のイミダクロプリド-d₄ 及びシグマアルドリッチ社製ペルメトリン-d₅ を使用した。アセトンは和光純薬工業製の残留農薬・PCB 試験用(5000 倍)を、アセトニトリルは和光純薬製 LC/MS 用試薬を使用した。

捕集剤

石英フィルター(直径 47mm、粒子保持能 0.3µm : 東京ダイレック製 Model 2500 QAT-UP) 及びエムポアディスク(直径 47mm : 住友 3M 製 C18 以下、ODS ディスクと表記)を用いた。石英フィルターは使用前に電気炉で 450℃、4 時間加熱し、ODS ディスクはアセトン洗浄して不純物を除去した。

ピレスロイド系殺虫剤については、石英フィルター及び ODS ディスクは捕集物質の酸化を防止するため、BHT を含浸させた後、使用した。ネオニコチノイド系殺虫剤については、捕集の際に酸化を受けるとはなかったため、酸化防止剤は含浸させず、洗浄後そのまま使用した。

B-3. 捕集方法

室内空気の捕集方法は辻の方法に準じた。すなわち、石英フィルターと ODS ディスク 2 枚を重ねてろ紙ホルダー（ジーエルサイエンス EMI-47）にセットし、サンプリングポンプ（ジーエルサイエンス SP208 10L）により石英フィルター側から空気を吸引した。吸引速度は 1L/分、吸引時間は 24 時間とし、吸引量は 1440L であった。

B-4. 測定用試料の調製

GC/MS 測定用（ピレスロイド系殺虫剤）の試料の調製は平成 27 年度の報告書に記したとおりである。

LC/MS 測定用（ネオニコチノイド系殺虫剤）の試料調製方法は以下の通りである。

サンプリング終了後、石英フィルター、ODS ディスクをそれぞれ共栓遠沈管に入れ、アセトニトリル 7~8mL を加え、10 分間超音波抽出を行い、抽出液を 50mL メスフラスコに入れた。その後、フィルターを 20% アセトニトリル水溶液 7~8mL で 2 回、同様の抽出を行い、抽出液を合わせた。抽出液に懸濁物が見られる場合は遠心分離（3000rpm、10 分間）を行い、上清を採取した。あわせた抽出液に内部標準溶液（イミダクロプリド-d4 1mg/L アセトン溶液）2.5mL を添加し、20% アセトニトリル水溶液で 50mL とした。この溶液を LC/MS 測定用試料とした。

B-5. 分析方法

GC/MS 分析

測定用試料 2 μ L をスプリットレス方式（高圧注入）で GC/MS に注入し、SIM 法を用いて定量を行った。内部標準法によりあらかじめ作成した検量線から試料中の各成分の濃度を算出した。

装置：Thermo Fisher Scientific

TRACE -1310, TSQ-8000

カラム：アジレント VF-5MS（30m \times 0.25mmID、膜厚 0.25 μ m）

注入方式：スプリットレス（高圧注入）
2 μ L

注入口温度：280

イオン源温度：230

カラム温度：50（2 分）（35 /分）
120（6 /分）310（2 分）

内部標準物質：ペルメトリン-d5

キャリアガス：ヘリウム（カラム流量
1.0mL/分 定流量モード）

モニターイオン：表 2 に示した。

LC/MS 分析

測定用試料 5 μ L を LC/MS に注入し、MRM 法で定量を行った。内部標準法によりあらかじめ作成した検量線から試料中の各成分の濃度を算出した。

装置：Waters Aquity UPLC、Xevo TQ MS

カラム：Waters Aquity UPLC HSS T3
（2.1mmID \times 100mm、粒径 1.8 μ m）

溶離液：A:5% アセトニトリル B:アセ
トニトリル

A(100%)（5.5 分）A(5%)(1.5 分保持)
カラム流量：0.32mL/分

コリジョンガス：アルゴン

脱溶媒ガス：窒素（1000L/時、500）

内部標準物質：イミダクロプリド-d4

モニターイオン等：表 3 に示した。

(倫理面への配慮)

本研究は室内環境質を対象とする調査・研究であり、人あるいは実験動物を対象とするものではない。ただし、試料採取に当たっては研究目的を含む研究の実施内容について説明し、所有者等の同意を得た上で実施する。

C. 結果

C-1. GC/MS 法における内部標準の選定

平成 27 年度の研究において、GC/MS 法で測定する際に、試験溶液中の夾雑物質に由来する正のマトリクス効果がピレスロイド系殺虫剤に顕著に現われ、回収率が 100% を大きく上回る現象が見られた。対処方法として、マトリクスを含むアセトンを使用して検量線作成用の標準溶液を作ることを試みたが、検体によりマトリクスの量や内容が異なるため、様々な検体に柔軟に対応できる方法とは言い難かった。

そこで、平成 28 年度においては、内部標準物質をマトリクス効果を受けるピレスロイド系殺虫剤の重水素化置換物質に変更して検討を行った。

内部標準物質としてペルメトリン-d5 を使用したところ、マトリクスを含むアセトンで定容した標準液において、定量対象成分と内部標準物質がほぼ同等の挙動を示し、マトリクス効果を回避することが可能であった。なお、マトリクス効果を受けない物質の定量を同時に行う場合は従来通りアセナフテン-d10 又はクリセン-d12 も併せて添加して内部標準物質として用いることにより、広範な化合物

に対して良好な定量性を確保できると考えられる。前処理方法修正後の分析フローを図 4 に示した。また、クロマトグラムの例を図 5 に示した。

C-2. 対象とする濃度域の設定 (LC/MS)

昨年度検討した GC/MS 分析対象殺虫剤同様、LC/MS 分析対象殺虫剤についても、分析法を構築するに当たり、どの程度までの濃度を測定する必要があるのかについて検討した。

対象とする化合物には現在、室内濃度指針値は設定されていない。そこで、現在指針値が設定されている殺虫剤 (クロルピリホス、フェノブカルブ、ダイアジノン) の指針値と同化合物の ADI 値を参考とした。すなわち、指針値と ADI 値の比をとると、その比はダイアジノンが一番小さく、ダイアジノンが他の化合物に比べて ADI 値に対して指針値が低く (厳しく) 設定されていた。そこで、ダイアジノンの指針値/ADI 値 (58) を他の対象化合物の ADI 値に乗じて指針値として想定される濃度を見積もった。本研究においてはその 1/10 程度の濃度が測定できることを目標に分析法を検討した。表 4 に想定した濃度を示した。想定される指針値が最も低かったのはフィプロニルの $11.6\text{ng}/\text{m}^3$ で、この濃度の検体を今回検討した前処理で抽出、濃縮した場合、LC/MS に注入する試験溶液濃度は $0.334\mu\text{g}/\text{L}$ となる。よって、フィプロニルについてはその 1/10 濃度を十分満足する、 $0.02\mu\text{g}/\text{L}$ を測定できることを条件とした。

C-3. LC/MS 条件の検討

ジノテフラン、ニテンピラム、チアメ

トキサム、クロチアニジン、イミダクロブリド、アセタミブリド、チアクロブリド、フィプロニルを測定対象とした。各対象物質の標準溶液(1mg/L)を LC/MS に注入し、スキャンモードでマススペクトルの測定を行った。マススペクトルから各物質に特徴的なフラグメントを選択し、コリジョンセルで開裂させたのち、二段目四重極でスキャン測定して MRM 分析のためのマストレースを決定した。キャピラリー電圧、コーン電圧、各選択フラグメントイオン、コリジョンエネルギーの決定は装置の最適化プログラムを使用して行った。決定した各パラメーターは表 3 の通りである。

本条件で測定した標準溶液のクロマトグラム例を図 6 に示した。

検量線は各化合物の 0.02、0.1、0.2、0.4、1、2、5、10、20、50 μ g/L (溶媒は 20% アセトニトリル水溶液) を測定して作成した。定量方法は、イミダクロブリド-d4 を内部標準とする内部標準法を用いた。

溶媒に 100% アセトニトリルを用いたところ、各化合物のピーク形状が悪かったが、溶媒に水を加えることによりピーク形状は良好なものになった。

C-4. 前処理方法の検討 (LC/MS 法)

LC/MS 分析対象化合物について、フィルターの抽出条件について検討した。

GC/MS 分析対象化合物と同様、フィルターを溶媒抽出(10 分間 超音波抽出)し、回収率を求めた。

フィルターを 10mL 遠沈管に入れ、抽出溶媒 7~8mL を入れ、10 分間超音波抽出を行った。その後、遠心分離 (3000rpm

10 分間) を行い、溶媒層を採取した。

抽出溶媒にアセトン、アセトニトリル、メタノールを用いて比較したところ、アセトンとアセトニトリルはほぼ全量が回収できたが、メタノールでは回収率が悪かった。LC/MS 分析の溶離液にアセトニトリル系の溶液を使用することを考慮し、抽出溶媒にはアセトニトリルを使用することとした。

ジノテフランとニテンピラムはアセトニトリル抽出では回収率が悪かった (15~60% 程度)。各化合物の水-オクタノール分配係数 (log Pow) は表 5 の通りで、この 2 化合物の値は他の化合物に比べて低い値となっており、アセトニトリルのみでは抽出溶媒の極性が足りない可能性が考えられた。そこで、20% アセトニトリル水溶液で同様の抽出を行ったところ、ジノテフランとニテンピラムの回収率は良好な値を示したが、他の化合物の回収率は悪かった。

以上の状況を勘案し、まずアセトニトリルで超音波抽出を行い、抽出液を回収後、溶媒を 20% アセトニトリル水溶液にかえて 2 回超音波抽出を行うこととした。この抽出方法を用いることにより、対象成分全てについて良好な回収率を得ることができた。

抽出溶媒に水を含む溶液を用いたことにより、抽出液を濃縮することは困難となったが、LC/MS の感度が良いことから 50mL へのメスアップを行っても測定が可能であった。

前処理操作のフローを図 7 に示した。

C-5. 試料捕集方法の検討

ネオニコチノイド系殺虫剤はピレスロイド系殺虫剤と比較して酸化分解を受けにくいと思われ、試料採取の際に酸化防止用のBHTを捕集材に含浸させる必要はないと考えられた。

そこで、石英フィルター上にネオニコチノイド混合標準溶液を添加し（各化合物 250ng 相当量）、室温において、1mL/分で 24 時間通気後の濃度変化を調べた。その結果、各化合物は石英フィルター上にほぼ 100% 残留しており、酸化分解等は受けていなかった。また、ODS フィルターへの移行も見られなかった。

D. 考察

GC/MS 分析対象化合物については、内部標準にペルメトリン-d5 を使用することにより、マトリクス効果を相殺することが可能であった。マトリクス効果を受けない化合物の定量に対しては、従来通りアセナフテン-d10 やクリセン-d12 を内部標準として用いることにより、マトリクス効果を受ける化合物、受けない化合物いずれも定量が可能であった。

LC/MS 分析対象化合物の捕集については、ピレスロイド系殺虫剤と異なり、ネオニコチノイド系殺虫剤はサンプリング中の酸化を受けにくいいため、酸化防止剤として BHT を添加する必要はなかった。フィプロニルの ADI 値が低いため、低濃度まで測定可能な分析方法を構築する必要があった。フィルターからの抽出溶媒に水を含むため、抽出後の濃縮はできず、LC/MS 分析用の試料液の濃度は低くなるを得なかったが、各化合物の LC/MS における感度が良いため、十分な感度を

得ることができた。

次年度においては、LC/MS 分析対象農薬について、PUF フィルターを用いた試料採取方法を構築し、これまでの方法と比較検討を行う予定である。

E. 結論

室内空気中に存在する可能性のある準揮発性有機化合物のうち、防蟻剤・殺虫剤について、測定法を検討し、以下に示す方法を構築した。

初年度に構築した GC/MS による分析法でマトリクス効果により正確な定量ができない可能性のあった化合物について、内部標準を同様にマトリクス効果を受けるペルメトリン-d5 とすることにより、マトリクス効果を相殺し、正確な定量が可能となった。

LC/MS 分析対象のネオニコチノイド系殺虫剤は、酸化防止剤（BHT）を添加しないフィルター（石英フィルターと ODS ディスクの積層）で捕集可能であり、吸引空気量は 1440L（1L/分で 24 時間吸引）とした。フィルターはアセトニトリルを用いて超音波抽出し、次いで、20%アセトニトリル水溶液で抽出することにより、対象化合物全てで良好な回収率が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 佐藤学, 上村仁, 小坂浩司, 浅見真理, 鎌田素之: 神奈川県相模川流域における河川水及び水道水のネオニコチノイド系農薬等の実態調査. 水環境学会誌, 39(5), 153-162 (2016).

2. 学会発表

なし

評価手法の開発に関する研究 平成 18
- 20 年度 総合研究報告書, 48-68
(2009)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他

2) 上村 仁: 防蟻剤・殺虫剤による室内環
境汚染と曝露評価, 厚生労働科学研究費
補助金 化学物質リスク研究事業 室
内環境における準揮発性有機化合物の
多経路曝露評価に関する研究 平成
24-26 年度総合研究報告書, 54-76 (2015)

3) 佐藤学, 上村仁, 小坂浩司, 浅見真理, 鎌
田素之: 神奈川県相模川流域における河
川水及び水道水のネオニコチノイド系
農薬等の実態調査. 水環境学会誌,
39(5), 153-162 (2016).

H. 参考文献

1) 辻 清美: 空気質中のピレスロイド系
殺虫剤、防虫剤の分析法の検討と放散
試験に関する研究, 厚生労働科学研究
費補助金 化学物質リスク研究事業 化
学物質、特に家庭内の化学物質の曝露

表1 測定対象とした殺虫剤

ネオニコチノイド	イミダクロプリド	ピレスロイド	アクリナトリン
	クロチアニジン		アレスリン
	ジノテフラン		トラロメトリン
	ニテンピラム		ビフェントリン
	アセタミプリド		フェントリン
	チアクロプリド		ペルメトリン
	チアメトキサム		フタルスリン
ネオニコチノイド様	フィプロニル		エトフェンプロックス
	クロルフェナピル		シラフルオフェン

この他に、従来からの規制項目（フェノカルブ、ダイアジノン、クロルピリホス）についても検討

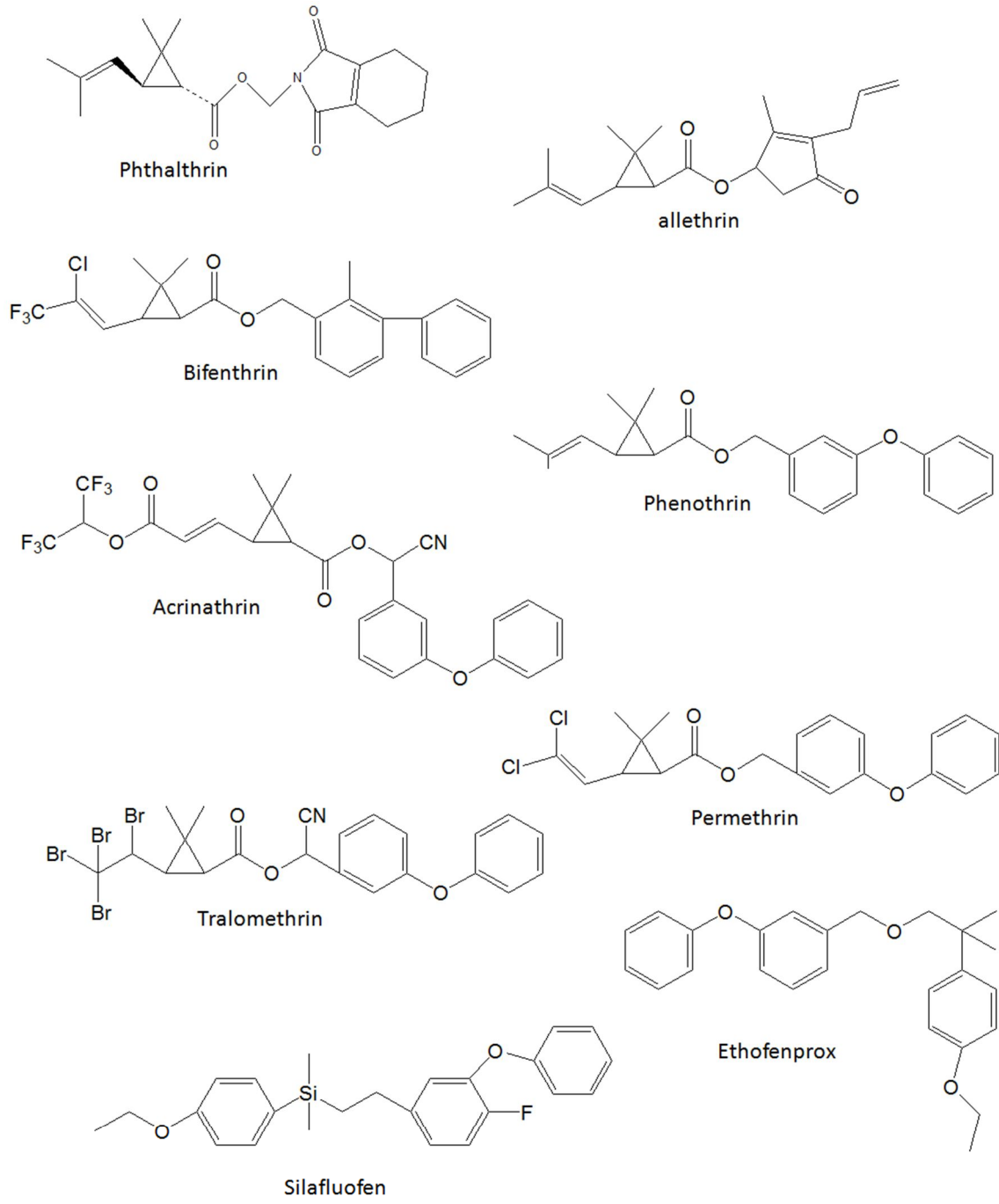


図1 GC/MS分析対象化合物の構造式(1)

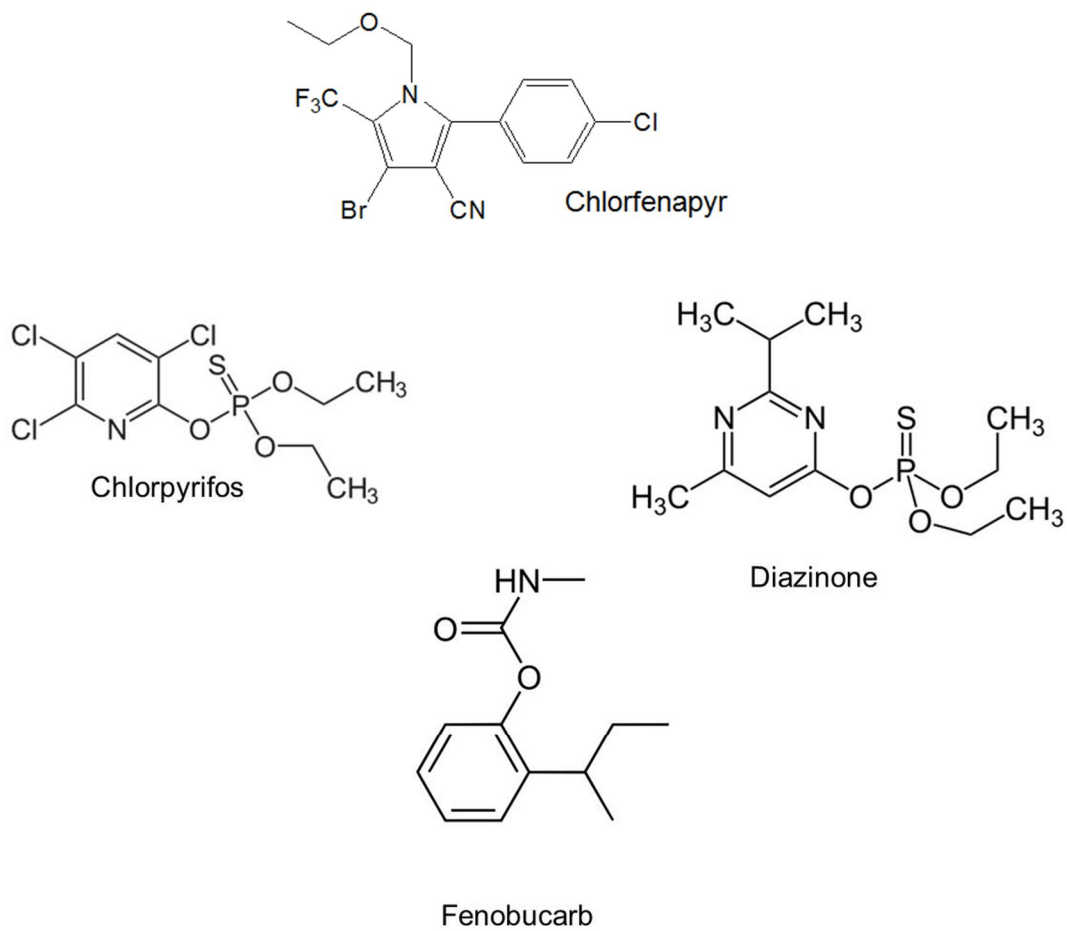


図1 GC/MS分析対象化合物の構造式(2)

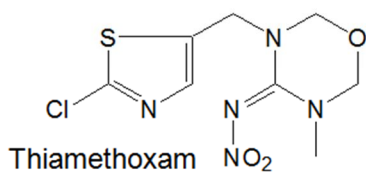
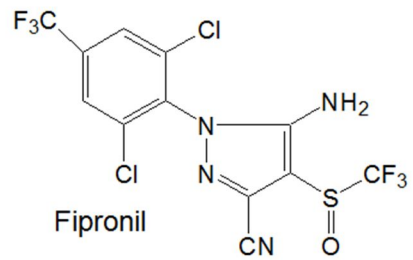
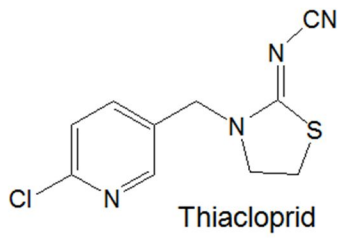
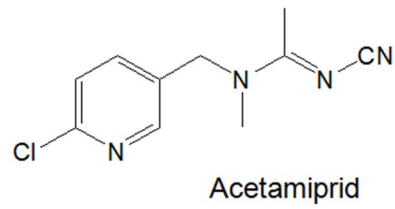
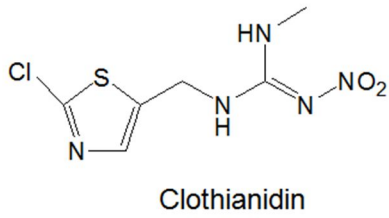
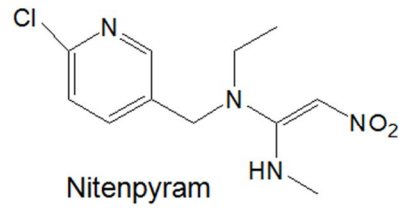
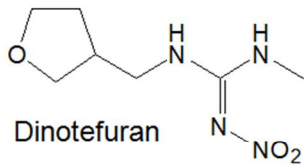
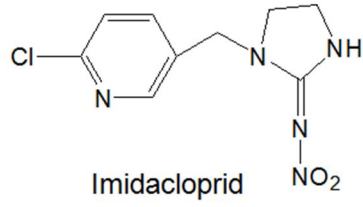
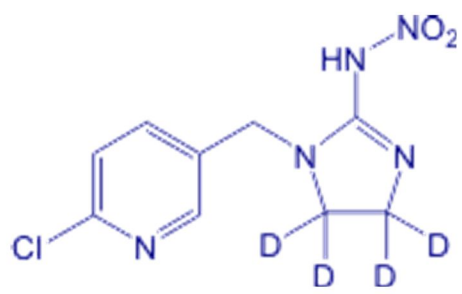
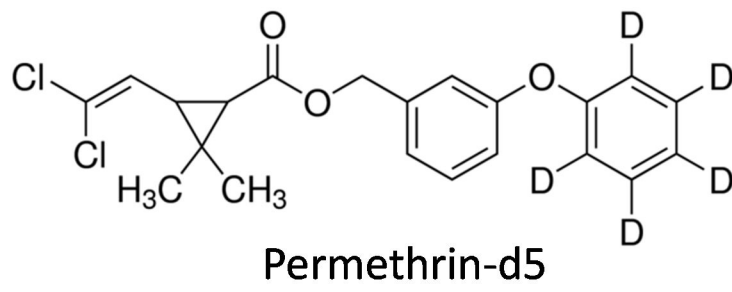


図2 LC/MS分析対象化合物の構造式



Imidacloprid-d4

図3 内部標準化合物の構造式

表2 GC/MS測定条件(モニターイオン)

	保持時間 (分)	測定イオン (m/z)
アセナフテン-d10(内標)	11.6	162, 164
フェノブカルブ	13.42	121, 150
ダイアジノン	16.56	179, 137
クロルピリホス	19.64	197, 314
アレスリン	21.36	123, 136
クロルフェナピル	23.53	59, 247
ビフェントリン	26.94	181, 166
フタルスリン	27.08	164, 123
クリセン-d12(内標)	27.14	240, 236
フェントリン	27.89	123, 183
アクリナトリン	28.8	181, 208
ペルメトリン-d5(内標)	30.09	188, 189
ペルメトリン	30.12	183, 184
エトフェンプロックス	31.86	163, 135
シラフルオフエン	32.07	179, 286
トラロメトリン	34.01	181, 253

表3 LC/MS/MS法の測定条件

	極性	保持時間 (分)	キャピラリー電圧 (kv)	コーン電圧 (v)	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)
ジノテフラン	positive	2.62	0.5	16	203.11	129.05	12
ニテンピラム	positive	2.98	0.5	20	271.05	99.03	18
チアメトキサム	positive	3.22	0.5	20	291.9	211	12
クロチアアジン	positive	3.48	0.5	18	249.95	168.98	14
イミダクロプリド	positive	3.59	0.5	22	256.09	209.2	16
アセタミプリド	positive	3.72	0.5	24	223.07	125.99	22
チアクロプリド	positive	4.01	0.5	28	252.99	126.06	20
エチプロール	negative	5.25	0.5	22	395.02	330.9	12
ヒドラメチルノン	positive	5.48	0.5	54	495.26	323.21	30
フィプロニル	negative	5.92	0.5	24	435.03	330.07	16
ピリプロキシフェン	positive	6.73	0.5	22	322.21	96.02	16
フロニカミド	positive	2.44	1.3	26	229.98	203.12	14
ルフェエロン	positive	5.76	1.3	28	511.03	158.03	20

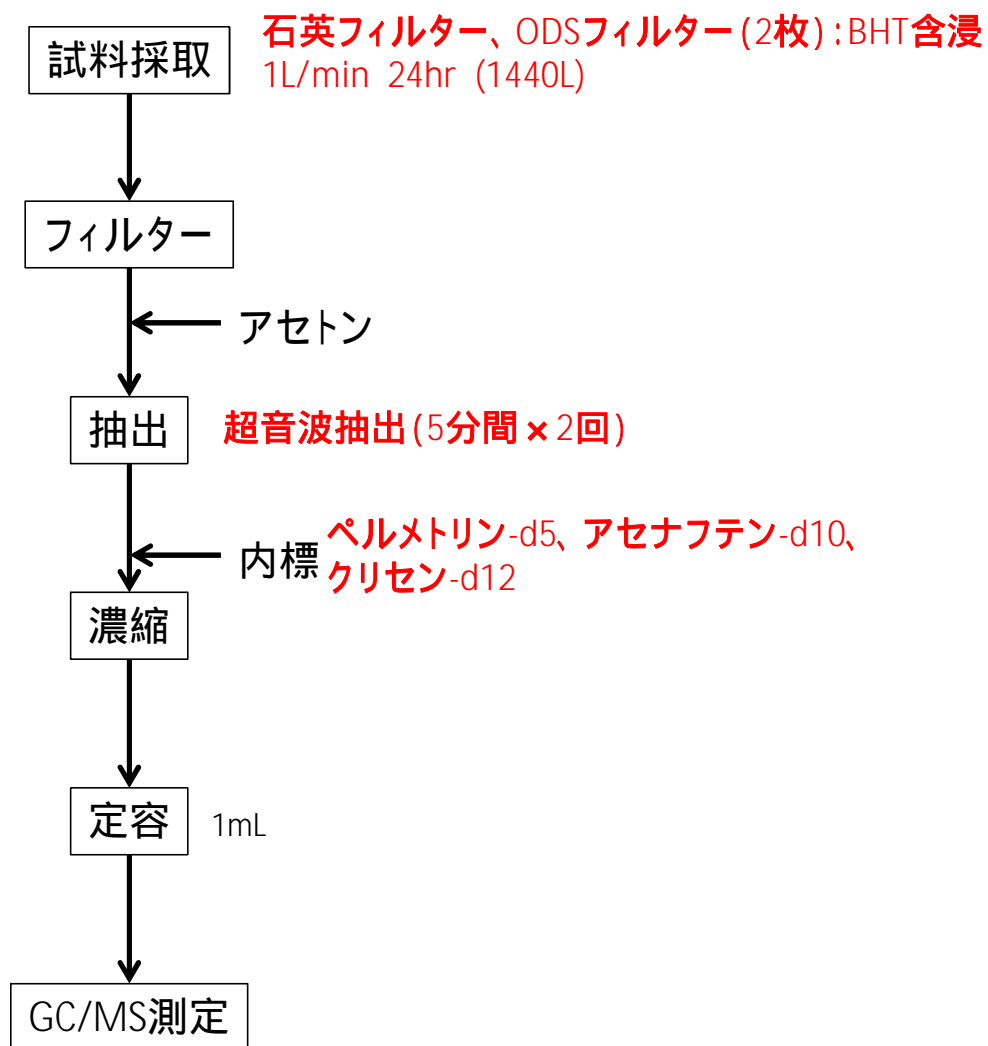


図4 GC/MS分析対象化合物の前処理フロー

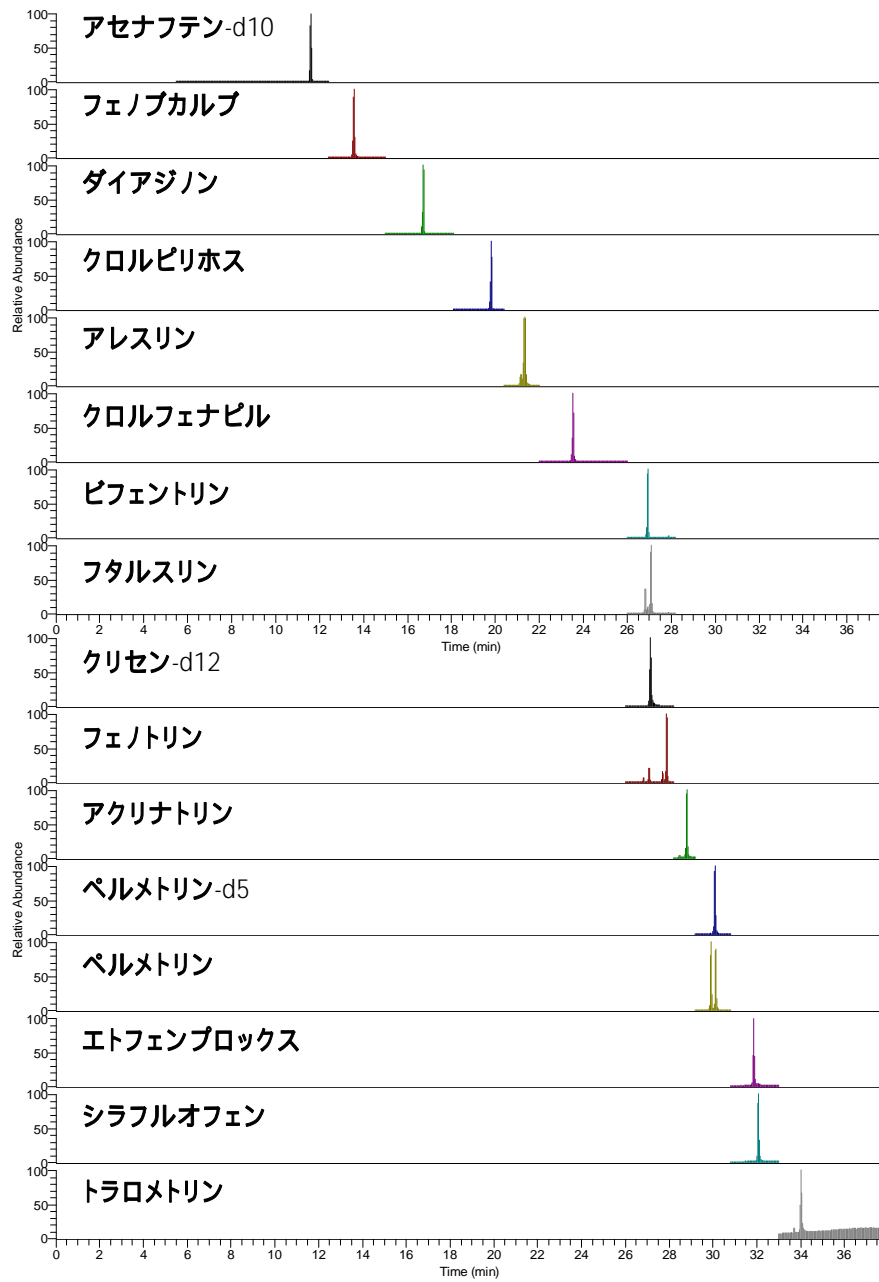


図5 GC/MS分析対象化合物のクロマトグラム

表4 想定した指針値と分析濃度

	ADI (mg/kg weight/day)	指針値想定値 (ng/m ³)	1L/分 24hr吸引時 (1440L)の試験溶液濃度 (μg/L)
イミダクロプリド	0.057	3306	95.2
クロチアニジン	0.097	5626	162
ジノテフラン	0.22	12760	367
ニテンピラム	0.53	30740	885
アセタミプリド	0.071	4118	119
チアクロプリド	0.012	696	20.0
チアメトキサム	0.018	1044	30.1
エチプロール	0.005	290	8.35
フロニカミド	0.073	4234	122
フィプロニル	0.0002	11.6	0.334

	ADI (mg/kg weight/day)	指針値 (μg/m ³)	指針値/ADI
クロルピリホス	0.01	1	100
フェノプカルブ	0.012	33	2750
ダイアジノン	0.005	0.29	58

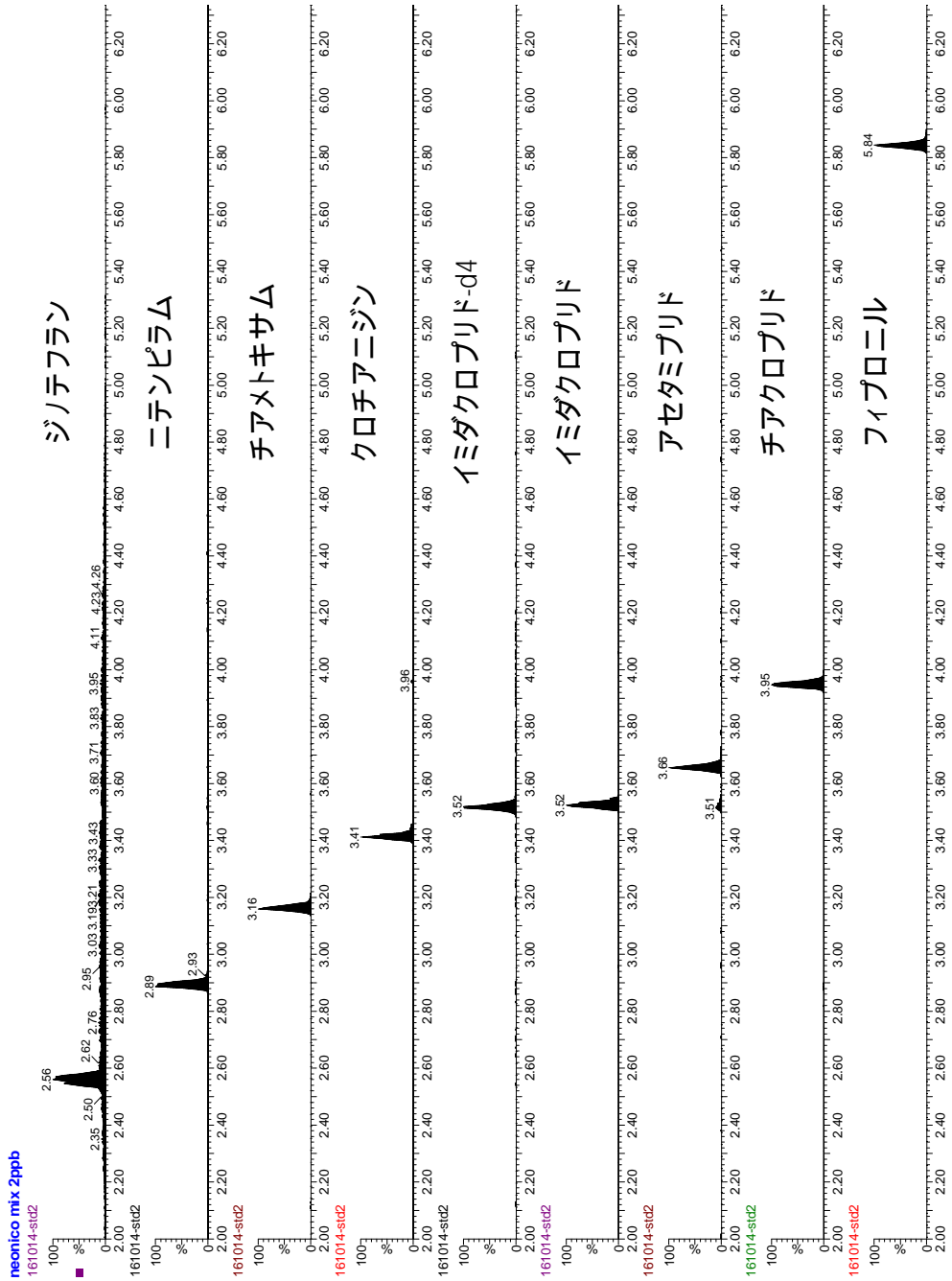


図6 LC/MS分析対象化合物のクロマトグラム

表5 各化合物の水-オクタノール分配係数

化合物名	水-オクタノール分配係数 (logPow)
ジノテフラン	-0.549
ニテンピラム	-0.66
チアメトキサム	-0.13
イミダクロプリド	0.57
アセタミプリド	0.80
チアクロプリド	1.26
フィプロニル	4.00

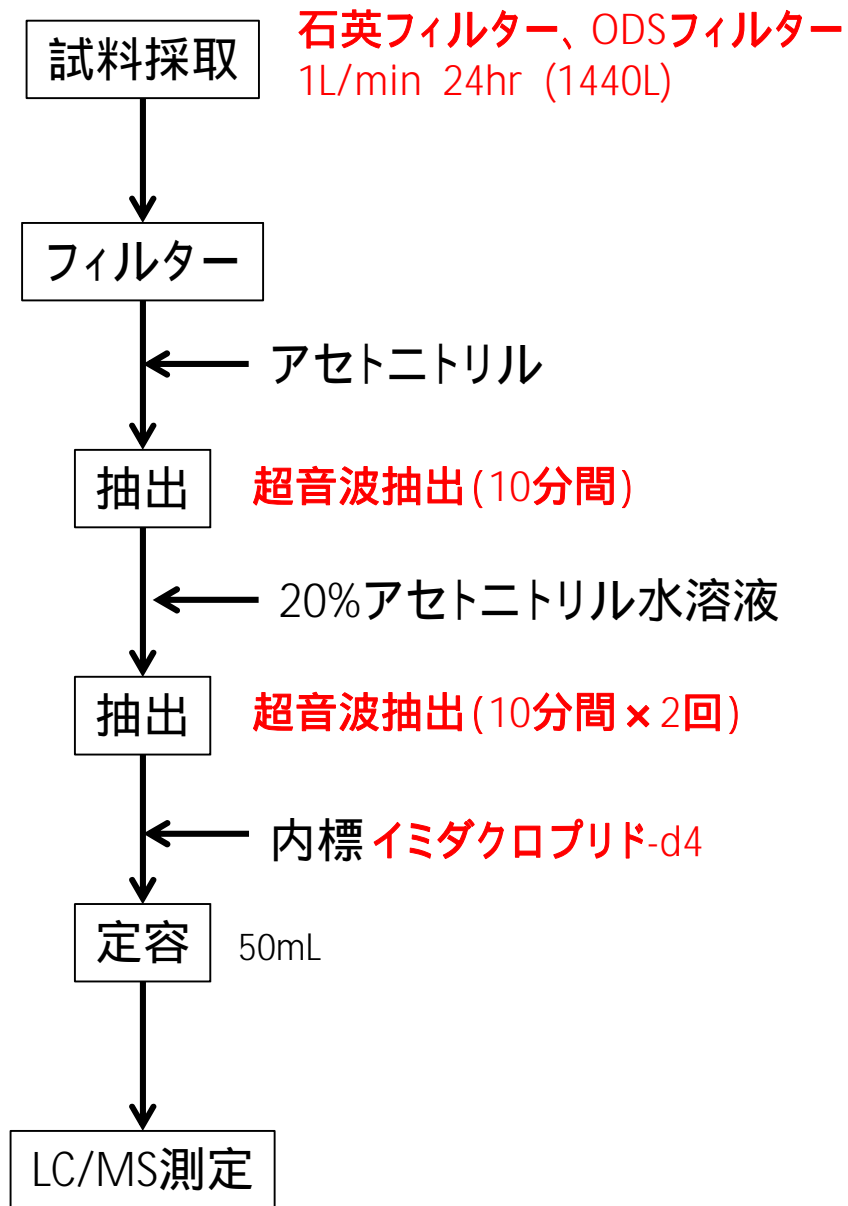


図7 LC/MS分析対象化合物の前処理フロー