

原著

## 環境水中に含まれるりん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニルの分析法の開発

酒谷圭一

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を用い、環境水中のりん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル (DDVP) を分析する方法を開発した。試料200 mLにギ酸を添加した後、DDVP-*d*<sub>6</sub>を10 ng添加し、固相カートリッジ (Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge) に通水した。固相カートリッジを超純水/メタノール(5:5)溶液10 mLで洗浄し、空気約20 mLを通気して水分を除去した後、アセトニトリル6 mLで溶出した。溶出液を窒素気流下で0.2 mLまで濃縮した後、0.1%ギ酸で1 mLに定容し、LC/MSで測定した。本分析法で用いた装置の検出下限値は0.60 pg、本分析法の検出下限値は河川水0.39 ng/L、海水0.43 ng/Lであった。環境水200 mLにDDVPを5.0 ng添加し添加回収試験を行った結果、回収率は河川水96%、海水95%であった。本分析法を用い、県内で採取した河川水及び海水を分析した結果、当該物質は検出されなかった。

[キーワード：分析法開発、りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル、河川水、海水]

### 1 はじめに

化学物質は日常生活を豊かにし、また、便利で快適な生活を維持する上で欠かせないものとなっている。その一方で、その生産、使用及び廃棄の仕方によっては、環境汚染や健康被害といった問題を引き起こすことが懸念されている。このような状況に対応するため、環境省を主体とした“化学物質環境実態調査”が1974年より開始され、今日までに全国150以上の地点で環境中の化学物質の残留状況が調査されている<sup>1)</sup>。

当所は化学物質環境実態調査に継続的に参加しており、県内の水質、底質及び大気中の各種化学物質の濃度を調査している。また、化学物質環境実態調査の支援事業として“分析法開発調査”にも取り組んでおり、化学物質環境実態調査において環境中の残留状況の把握が必要とされる化学物質のうち要求感度を満たす適切な分析法がないものについて新たな分析法を開発している。

筆者は令和元年度分析法開発調査に参加し、環境水中に含まれるりん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル (DDVP) の分析法を開発したので報告する。DDVPは国内において動物用医薬品、家庭用殺虫剤及び防疫用殺虫剤として用いられている有機リン化合物である<sup>2)</sup>。なお、環境省より提示された要求検出下限値は0.7 ng/Lであった。

### 2 方法

#### 2・1 試料

県内で2019年10月に採取した環境水 (河川水及び海水) を試料として用いた。

#### 2・2 試薬

##### 2・2・1 標準物質

DDVPの標準物質はAccuStandard製の100 µg/mL メタノール溶液を用いた。また、サロゲート内標準物質としてCambridge Isotope Laboratories製のDDVP-*d*<sub>6</sub> (純度98%) を用いた。

##### 2・2・2 溶媒

メタノール、アセトニトリル、ギ酸、ギ酸アンモニウム及び超純水は富士フィルム和光純薬製のLC/MS用を用いた。アンモニア水は富士フィルム和光純薬製の試薬特級を用いた。酢酸メチルは富士フィルム和光純薬製の和光一級を用いた。

#### 2・3 標準液の調製

##### 2・3・1 標準液

標準物質をメタノールで希釈し、1.0 µg/mLの標準液とした。

##### 2・3・2 サロゲート内標準液

サロゲート内標準物質を10.0 mg量りとり、メタノールで100 mLとして100 µg/mLのサロゲート内標準原液を作製した。これをメタノールで希釈し、1.0 µg/mLのサロゲート内標準液とした。

##### 2・3・3 検量線用標準液

標準液を0.1%ギ酸/アセトニトリル(8:2)溶液で順次希釈し、DDVPが0.50 ng/mL～100 ng/mLの濃度になるように検量線用標準液を作成した。各検量線用標準液にはDDVP-*d*<sub>6</sub>が10 ng/mLの濃度になるようにサロゲート内標準液を添

加した。

## 2・4 DDVP及びDDVP-*d*<sub>6</sub>の測定

DDVP及びDDVP-*d*<sub>6</sub>の測定には液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS、島津製作所製 Nexera X2/島津製作所製 LCMS-8050）を用いた。

LCについて、分析カラムはWaters製 XBridge C18（150 mm×2.1 mm、3.5 μm）を用いた。移動相はA：0.1%ギ酸、B：アセトニトリルとし、グラジエント条件（0→1 min：A:B = 80:20、1→5 min：A:80→10, B:20→90、5→15 min：A:B = 10:90、15→16 min：A:10→80, B:90→20、16→21 min：A:B = 80:20）で送液した。カラム流量は0.2 mL/min、カラム温度は40℃、試料注入量は10 μLとした。

MSについて、測定法はエレクトロスプレーイオン化法（ポジティブモード）とした。ドライイングガス流量は10 L/min、ネブライザーガス流量は2 L/min、インターフェース電圧は4.0 kV、ヒーティングガス流量は10 L/min、インターフェース温度は350℃、脱溶媒管温度は250℃、ヒートブロック温度は400℃とした。モニターイオン及びコリジョン電圧は、DDVPについて*m/z* 223.1 > 109.1、16 Vを定量用、*m/z* 221.1 > 109.1、16 Vを確認用とした。また、DDVP-*d*<sub>6</sub>について*m/z* 229.1 > 115.1、16 Vを定量用、*m/z* 227.1 > 115.1、17 Vを確認用とした。

## 2・5 検量線の作成及び装置検出下限値の算出

検量線は検量線用標準液をLC/MSに注入し、得られたDDVPとDDVP-*d*<sub>6</sub>の濃度比及び面積比から作成した。

装置検出下限値（IDL）は検量線に用いる最低濃度の検量線用標準液を7回繰り返し測定し、得られた測定値の標本標準偏差を用いて(1)式により算出した。

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

ここで、 $t(n-1, 0.05)$ は危険率5%、自由度*n*-1の*t*値（片側）、 $\sigma_{n-1,I}$ はIDL算出のための測定値の標本標準偏差である。

## 2・6 前処理方法の検討

### 2・6・1 固相カートリッジ及び溶出溶媒の検討

試料の前処理に用いる固相カートリッジ及び溶出溶媒について検討した。固相カートリッジには、疎水性のポリマーを採用しているWaters製 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge、Waters製 Oasis HLB Plus Short Cartridge及びAgilent Technologies製 Bond Elut Jr-Nexusの3種類の市販固相カートリッジを用いた。超純水200 mLにDDVPを5 ng添加した後、ギ酸を0.2 mL、DDVP-*d*<sub>6</sub>を10 ng添加した。続いて、溶出溶媒及び超純水でコンディショニングした各固相

カートリッジに通水した。各固相カートリッジを超純水10 mLで洗浄し、空気約20 mLを通気して水分を除去した後、3種類の溶媒（メタノール、アセトニトリル、酢酸メチル）10 mLで溶出した。各溶出液を窒素気流下で1 mLまで濃縮したものを試験液とし、LC/MSで測定した。

### 2・6・2 固相カートリッジ洗浄溶液の検討

2・6・1の結果、最も回収率が良好であった固相カートリッジについて、試料通水後の洗浄に用いる溶液を検討した。超純水200 mLにギ酸0.2 mLを添加した後、DDVPを50 ng、DDVP-*d*<sub>6</sub>を100 ng添加した。続いて、2・6・1と同様の手順で試料を固相カートリッジに通水するまでの操作を行った後、3種類の溶液（超純水、超純水/メタノール(8:2)溶液、超純水/メタノール(5:5)溶液）10 mLで固相カートリッジの洗浄を行った。各洗浄液を試験液とし、LC/MSで測定した。

### 2・6・3 溶出溶媒量の検討

2・6・1の結果、最も回収率が良好であった固相カートリッジ及び溶出溶媒を用い、溶出溶媒量の最適化を図った。超純水200 mLにギ酸を0.2 mL、DDVP-*d*<sub>6</sub>を10 ng添加した後、2・6・1と同様の手順で脱水までの操作を行った。ただし、固相カートリッジの洗浄溶液は2・6・2の結果、最も良好だったものを用いた。続いて溶出溶媒を2 mLずつ流し、分画試験を行った。0~2 mL、2~4 mL、4~6 mL、6~8 mL、8~10 mLの各分画液を窒素気流下で1 mLまで濃縮したものを試験液とし、LC/MSで測定した。

## 2・7 添加回収試験

環境水を用いた添加回収試験を行った。試料200 mLにDDVPを5 ng添加した後、2・6で最適化された条件で前処理を行い、LC/MSで測定した。また、DDVPを添加しなかった試料についても同様の操作を行った。

## 2・8 分析法の検出下限値の算出

環境水を用い、分析法の検出下限値（MDL）を算出した。試料200 mLにDDVPを0.5 ng添加した後、2・6で最適化された条件で前処理を行い、LC/MSで測定した。この操作を7回繰り返し、得られた測定値の標本標準偏差を用いて(2)式によりMDLを算出した。

$$MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1,M} \times 2 \quad (2)$$

ここで、 $t(n-1, 0.05)$ は危険率5%、自由度*n*-1の*t*値（片側）、 $\sigma_{n-1,M}$ はMDL算出のための測定値の標本標準偏差である。

## 2・9 分解性スクリーニング試験

DDVPの水中での安定性を確認するため、pH又は光によ

る分解性を調査した。10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 200mLをギ酸及び1 mol/L アンモニア水でpH5、7及び9に調整した後、DDVPを5 ng添加した。所定の期間（1時間及び7日）経過後、2・6で最適化された条件で前処理を行い、LC/MSで測定した。なお、試料の保存は室温（20℃）で行い、保存期間7日の試料については明所及び暗所のそれぞれで保存した。

## 2・10 保存性試験

化学物質環境実態調査では、試料採取機関と分析機関が異なる場合がある。その場合、試料採取から分析までに日数を必要とする。そこで、粗抽出液及び環境水について、冷暗所（4℃）でのDDVPの保存性を調査した。

粗抽出液は、河川水200 mLに対し2・6で最適化された前処理方法のうち溶出までの操作を行った後、DDVPを5 ng添加したものを保存試料とした。所定の期間（当日、3日、5日、7日、14日及び28日）経過後、DDVP-d<sub>6</sub>を10 ng添加し、窒素気流下で0.2 mLまで濃縮した後、0.1%ギ酸で1 mLに定容したものを試験液とし、LC/MSで測定した。

環境水については、試料200 mLにDDVPを5 ng添加し、所定の期間経過後、2・6で最適化された条件で前処理を行い、LC/MSで測定した。また、河川水についてはギ酸を0.1%の濃度となるように、海水についてはギ酸を0.1%及び1%の濃度となるように前処理操作開始前に添加した試料についても同様の保存性試験を行った。

## 3 結果及び考察

### 3・1 検量線の作成及び装置検出下限値の算出

検量線は低濃度用（DDVP：0.50～10 ng/mL、DDVP-d<sub>6</sub>：10 ng/mL）と高濃度用（DDVP：5.0～100 ng/mL、DDVP-d<sub>6</sub>：10 ng/mL）をそれぞれ作成した（図1）。決定係数（R<sup>2</sup>）は低濃度用が0.9998、高濃度用が0.9999であり、両者ともに直線性は良好であった。

また、本研究で用いたLC/MSのIDLは0.60 pg（IDL試料換算値0.30 ng/L）であった。

### 3・2 前処理方法の検討

#### 3・2・1 固相カートリッジ及び溶出溶媒の検討

試料の前処理に用いる固相カートリッジ及び溶出溶媒について検討した（n=3）。各固相カートリッジ及び溶出溶媒からの回収率を図2に示す。なお、DDVPの回収率はサロゲート補正後のものである。固相カートリッジはSep-Pak PS2 Plus Short Cartridgeを、溶出溶媒はアセトニトリルを用いた場合がDDVP、DDVP-d<sub>6</sub>ともに回収率が良好であったため、以降の操作はこれらを用いることとした。

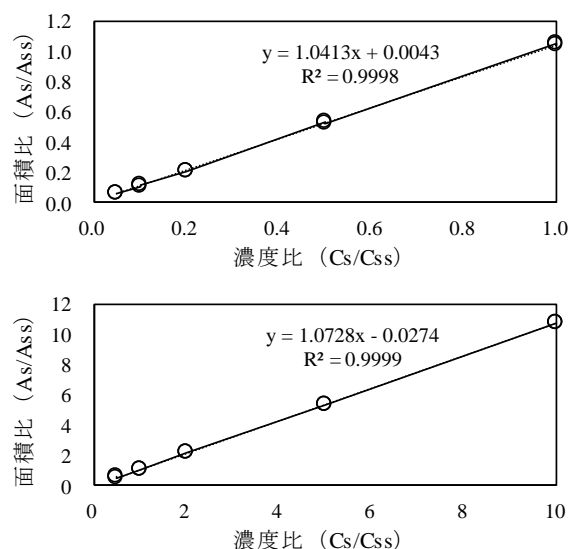


図1 検量線（上段：低濃度用、下段：高濃度用）

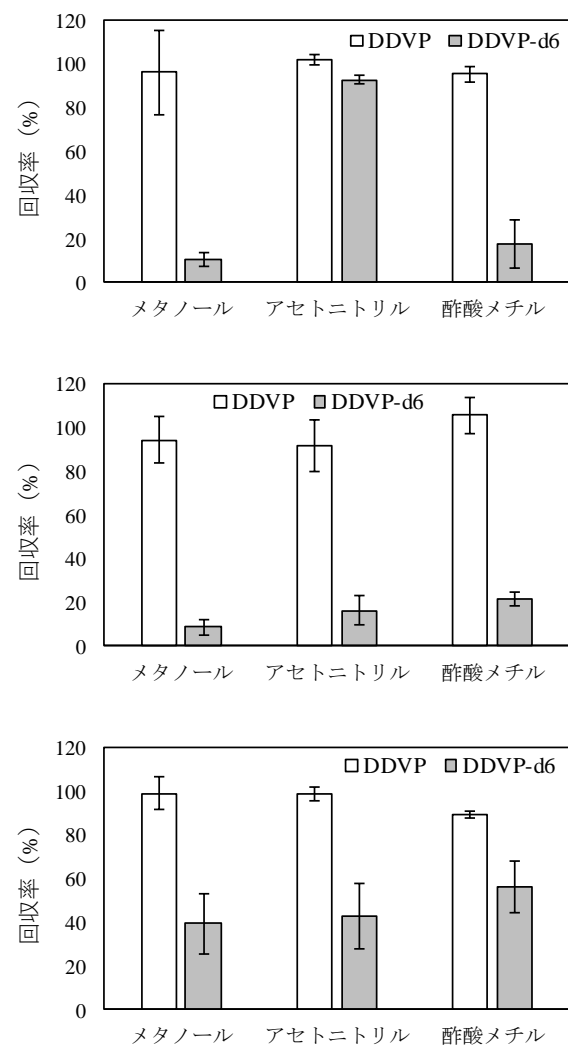


図2 各固相カートリッジ及び溶出溶媒における回収率（上段：Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge、中段：Oasis HLB Plus Short Cartridge、下段：Bond Elut Jr-Nexus）

### 3・2・2 固相カートリッジ洗浄溶液の検討

試料通水後の固相カートリッジの洗浄に用いる溶液を検討した (n = 2)。超純水、超純水/メタノール(8:2)溶液及び超純水/メタノール(5:5)溶液で洗浄した結果、いずれの洗浄液からもDDVP及びDDVP-d<sub>6</sub>は検出されなかった。このため、最も洗浄効果が高いと考えられる超純水/メタノール(5:5)溶液を洗浄溶液として用いることとした。

### 3・2・3 溶出溶媒量の検討

溶出溶媒量の最適化を図ることを目的に、アセトニトリルを用いた分画試験を行った (n = 2)。各分画液におけるDDVP-d<sub>6</sub>の回収率を図3に示す。回収率は0~2 mLで平均65%、2~4 mLで平均28%であった。一方、4~6 mL、6~8 mL及び8~10 mLではDDVP-d<sub>6</sub>は検出されなかった。以上の結果から、環境水を前処理する際は余裕をもってアセトニトリル6 mLで溶出することとした。

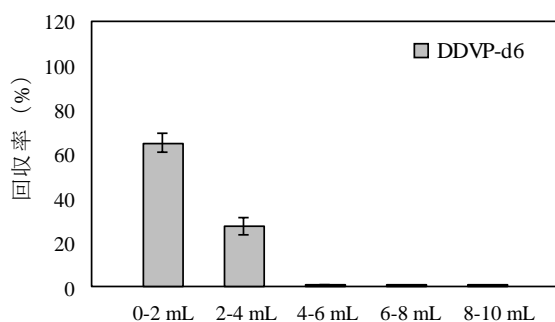


図3 分画試験結果

### 3・2・4 分析法の開発結果

3・2・1から3・2・3の検討結果をふまえ、図4のとおり分析法を開発した。

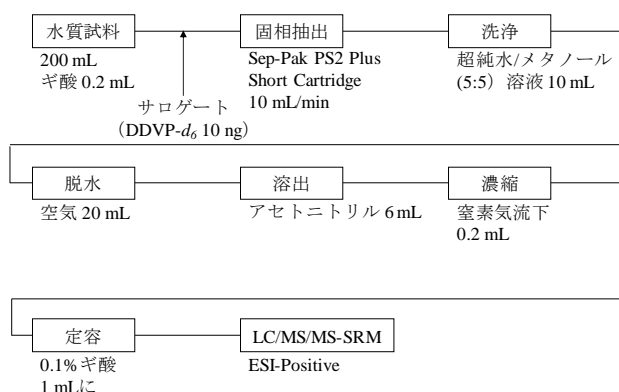


図4 開発した分析法のフローチャート

### 3・3 添加回収試験

環境水を用いた添加回収試験 (n = 6) の結果を図5に示す。なお、DDVPの回収率はサロゲート補正後のものである。河川水からの回収率は平均96% (サロゲート内標準の回収率は平均84%)、海水からの回収率は平均95% (サロゲ

ート内標準の回収率は平均93%) であり、回収率の許容範囲の目安とされる70~120% (サロゲート内標準の回収率は50~120%)<sup>3)</sup>を満足していた。また、DDVPを添加しなかった試料からは当該物質は検出されなかった (n = 2)。

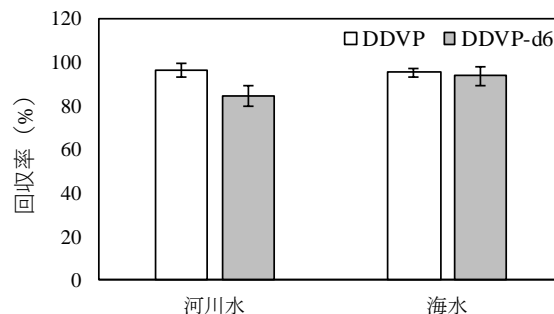


図5 添加回収試験結果

### 3・4 分析法の検出下限値の算出

本分析法のMDLは河川水で0.39 ng/L、海水で0.43 ng/Lであり、環境省より提示された要求検出下限値 (0.7 ng/L) を満足していた。

### 3・5 分解性スクリーニング試験

分解性スクリーニング試験 (n = 3) の結果を図6に示す。DDVPの残存率はpHの上昇に伴い低下した。この結果は、塩基性においてDDVPの加水分解反応が促進されるとするLamoreauxらの研究<sup>4)</sup>と一致した。一方、光によるDDVPの分解は確認されなかった。

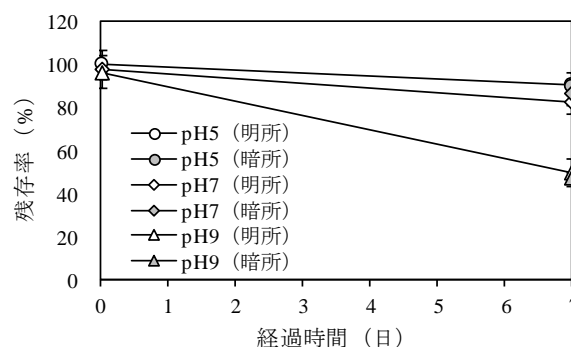


図6 分解性スクリーニング試験結果

### 3・6 保存性試験

保存性試験 (n = 3) の結果を図7に示す。粗抽出液は28日経過後も90%以上残存しており、保存性は良好であった。環境水については保存期間が長くなるにつれ残存率が低下した。このため、環境水にギ酸を添加したところ、保存性が向上した。残存率の許容範囲の目安は70%とされている<sup>3)</sup>。保存性試験の結果から、環境水中のDDVPを分析す

る場合は、試料採取後、速やかに抽出までの操作を行う必要があると考える。また、速やかに分析を行えない場合は、河川水であればギ酸を0.1%となるように添加した後、冷暗所に保存し、14日以内を目安に分析を行う、海水であればギ酸を1%となるように添加した後、冷暗所に保存し、7日以内を目安に分析を行うことが望ましいと考える。

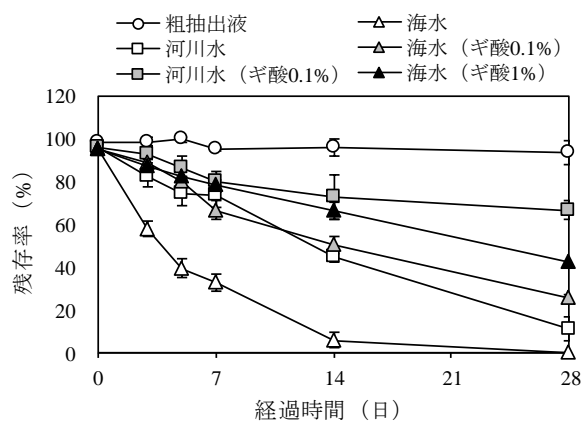


図7 保存性試験結果

#### 4 まとめ

環境水中に含まれるDDVPの分析法を開発した。本分析法で用いたLC/MSのIDLは0.60 pg (IDL試料換算値0.30 ng/L)であった。検量線は0.50~100 ng/mLの濃度範囲で直線性が確認された。環境水を用いた添加回収試験結果は、河川水96% (サロゲート内標準回収率84%)、海水95% (サ

(英文要旨)

## Development of an analytical method for determination of dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate in water

Keiichi SAKATANI

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

We describe a procedure for the determination of dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Formic acid is added to a 200-mL water sample, followed by 10 ng DDVP-d<sub>6</sub>. Each water sample is passed through a solid phase extraction cartridge (Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge). The cartridge is washed with 10 mL water-methanol (1:1, v/v) and then dehydrated before elution with 6 mL acetonitrile. The eluate is concentrated to 0.2 mL under a flow of nitrogen, and adjusted to 1 mL with 0.1% v/v formic acid for LC/MS/MS-selected reaction monitoring analysis. The instrument detection limit is 0.60 pg. The detection limits of the method for DDVP in river water and sea water are 0.39 ng/L and 0.43 ng/L, respectively. The average recoveries from samples spiked with 5.0 ng DDVP were 96% from river water and 95% from sea water. The concentrations of DDVP in river and sea water surface samples collected in Fukuoka prefecture were below the detection limit.

[Key words; analytical method, dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate, river water, sea water]

ロゲート内標準回収率93%)であった。MDLは河川水0.39 ng/L、海水0.43 ng/Lであった。なお、本研究で用いた河川水及び海水からは当該物質は検出されなかった。以上の結果から、本分析法は環境水中のDDVPについて0.4 ng/Lレベルの定量に適用可能と判断される。

#### 謝辞

本研究は令和元年度環境省環境政策基盤整備費によるものである。ここに記して謝意を表します。

#### 文献

- 1) 環境省：“化学物質環境実態調査－化学物質エコ調査ってどんな調査？－”, available from <https://www.env.go.jp/chemi/anzen/ecochousa.htht>, (accessed 2021-7-1)
- 2) 環境省：“環境省 化学物質情報検索支援システム”, available from [http://www.chemicoco.env.go.jp/detail.html?worw=ジクロロボス9&chem\\_id=301&n\\_id=2](http://www.chemicoco.env.go.jp/detail.html?worw=ジクロロボス9&chem_id=301&n_id=2), (accessed 2021-7-1)
- 3) 環境省：“化学物質環境実態調査実施の手引き (令和2年度版)”, p. 106 (2021).
- 4) Lamoreaux Robert J. and Newland Leo W.: The fate of dichlorvos in soil, *Chemosphere*, 7(10), 807-814, 1978.