

LC/MS による魚斃死等緊急時の未知物質検索について

徳島県保健環境センター

大野ちづ子・出羽 達也¹⁾

Studies on a retrieval method of the organic chemical substances with LC/MS by which the fish dies.

Chizuko OHNO and Tatsuya DEBA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

要 旨

LC/MS のライブラリーを構築するとともに、スキャン測定において感度向上の手法を取り入れ、緊急時における LC/MS による未知物質検索のシステムを構築したので、その手法について報告する。

Key words : LC/MS, 未知物質検索 retrieval of unknown material, 農薬 agricultural chemicals

I 緒 言

魚斃死等緊急時における原因物質究明のための未知物質検索は、GC/MS が非常に有用であるが、農薬等難揮発性物質の中には、GC/MS 法では誘導体化の手法を取らなければ測定できないものもある。近年 LC/MS が普及し、環境分析にも急速に使用されるようになった。LC/MS による測定では誘導体化の手法を用いなければならないのは少なく、農薬の分析では GC/MS より感度が高いものもある。しかし、LC/MS は、機種によりイオン化が異なり、スペクトルも異なる場合があるので、市販のライブラリーが無いのが欠点である。

従って、ライブラリーはユーザーが独自に作製しなければならないので、現在も構築中である。また、未知物質の場合はスキャン測定になるがスキャン測定は感度が低く、低濃度の環境測定には不適であった。この感度を向上させる手法について検討した結果、質量数を100毎に区切ってスペクトルを取るという手法を用いることにより飛躍的に感度の向上が得られることを見出した。未知物質の検索では短時間で結果を得る必要があり、LC 条件は分離よりも感度を優先し、ゼネラルメソッド的な条件とした。

II 方 法

1 ライブラリー構築

①使用機種

LC: Waters 製 Alliance 2695

MS: Waters 製 Quattro micro

②機器条件

MS 条件は、インフュージョン分析により、各物質について最適条件を求めた。

LC の主として使用したカラムは次のとおりである。

カラム: 野村化学製 Develosil RPAQUEOUS 2.0mm×150 mm, 5 μm

移動相は A: アセトニトリル B: 0.1% ギ酸水溶液 A:B=70:30 をゼネラルメソッドとし、ギ酸が不適である場合は水に変更した。アセトニトリルが不適である場合はメタノールに変更した。

③ライブラリーの1例

ライブラリーは LC/MS 本体に構築しているが、エクセル形式でまとめたものの一部を表示する。

¹⁾ 現南部総合県民局保健福祉環境部 (美波庁舎)

物質名	検出器	分子量	測定質量 (親)	ドーター	キャピラ リー電圧	コーン電圧 (V)	コリジョン 電圧(V)	desolvation gas temp. (°C)
methamidophos	ESI pos.	141.1	142.1	98.0	3.0	25	10	150
siduron	ESI pos.	232.3	233.2	137.1	3.5	30	15	300
halosulfuronmethyl	ESI pos.	434.8	435.1	182.2	3.5	25	20	300
asulam	ESI pos.	230.2	231.2	156.0	4.8	15	10	300
thiodicarb	ESI pos.	354.5	355.0	163.1	3.0	20	10	300
thiram	ESI pos.	240.4	241.1	88.0	3.5	20	10	300
azoxystrobin	ESI pos.	403.4	404.1	372.1	3.5	30	15	300
oxine-copper	ESI pos.	351.9	146.1	118.1	3.5	30	20	300
simazin	ESI pos.	201.7	202.1	124.1	4.0	35	20	350
thiobencarb	ESI pos.	257.06	258.1	125.0	3.5	25	15	350
acephate	ESI pos.	183.2	184.1	143.0	3.5	25	10	150
fosetyl	ESI neg.	354.1	109.0	81.0	2.5	20	10	300
MCPP	ESI neg.	214.6	213.1	141.1	3.0	20	15	300
17αestradiol	ESI neg.	272.0	270.9	145.0	3.0	50	40	300
17βestradiol	ESI neg.	272.0	270.9	145.0	3.0	50	40	300
bisphenol A	ESI neg.	228.0	227.2	212.1	3.0	40	20	300
2,4-dichlorophenol	ESI neg.	162.0	160.8	124.9	2.5	30	15	300
4-t-octylphenol	ESI neg.	206.0	205.2	133.1	3.0	40	30	300
nonylphenol	ESI neg.	220.0	219.1	133.1	3.0	40	30	300
pentachlorophenol	ESI neg.	264.0	262.8	34.9	3.0	45	20	300
buthylbenzylphthalate	ESI neg.	312.14	312.9	149.0	4.0	15	15	300
di-n-buthyl-phthalate	ESI neg.	278.15	278.9	149.0	4.0	15	15	300
di-n-ethyl-phthalate	ESI neg.	222.09	222.9	177.0	4.0	10	8	300
methyl dimeton	ESI pos.	230.0	230.9	88.9	4.5	15	10	300
methylparation	ESI pos.	263.0	263.8	124.8	4.5	35	15	300
paration	ESI pos.	291.0	291.7	235.9	4.5	25	15	300
EPN	ESI pos.	323.3	323.9	296.0	3.5	25	15	350
SAP	ESI pos.	397.5	398.1	314.1	3.0	20	10	300
pencycuron	ESI pos.	328.0	329.1	125.1	3.5	30	20	300
DEP	ESI pos.	257.4	257.0	221.1	3.0	25	10	150
methyltioacetohydroxamate	ESI pos.	105.0	105.9	57.8	3.5	15	10	300
methomyl	ESI pos.	162.0	162.9	105.9	3.5	14	8	300
24D	ESI neg.	218.0	218.9	160.9	3.5	20	10	300
245T	ESI neg.	254.0	252.7	194.9	3.5	20	10	300
phenol	ESI neg.	94.0	93.0	65.0	3.0	30	20	300
metribuzin	ESI pos.	214.1	215.1	187.2	3.0	30	18	300
metribuzinDK	ESI neg.	184.1	183.0	41.7	3.0	30	15	300
metribuzinDA	ESI pos.	199.1	200.1	172.1	3.0	30	18	300
metribuzinDADK	ESI neg.	169.1	168.0	97.0	3.0	30	15	300
diazinon	ESI pos.	304.0	305.0	169.1	3.5	20	20	300
isoxathion	ESI pos.	313.0	314.0	170.1	3.5	20	15	300
diazinon-oxon	ESI pos.	288.1	289.1	153.2	0.5	30	20	300
isoxathion-oxon	ESI pos.	297.1	298.1	242.2	0.5	25	18	300
triclopyr	ESI neg.	255.0	253.9	196.1	3.5	18	10	300
triclopyrbutoxyethyl	ESI pos.	355.0	356.0	238.1	3.5	20	10	300
chlorothalonil (TPN)	ESI neg.	265.9	245.0	175.0	3.0	40	25	300
benfuracarb	ESI pos.	410.5	411.3	252.3	4.5	20	15	350
benomyl	ESI pos.	290.3	291.4	192.2	2.0	18	10	350
thiophanate-methyl	ESI pos.	342.4	343.2	151.1	2.5	20	20	400
pyributycarb	ESI pos.	330.1	331.3	181.2	3.0	25	15	300
pretilachlor	ESI pos.	311.9	312.5	252.3	3.0	20	20	300
benzofenap	ESI pos.	431.0	431.3	119.0	1.0	35	20	300
pylimidifen	ESI pos.	377.9	378.3	184.2	1.0	35	25	350
fenthion	ESI pos.	278.0	279.3	149.1	3.0	20	15	300
fenarimol	ESI pos.	331.2	331.3	268.2	2.5	36	21	300
methidathion	ESI pos.	302.3	303.1	145.0	1.0	18	10	300
diquat-dibromide	ESI pos.	344.1	183.2	157.2	1.0	35	20	300
dalapon	ESI neg.	141.96	141.0	96.9	3.0	20	10	300
disulfoton	ESI pos.	274.0	275.2	88.9	3.0	12	10	300
imidacloprid	ESI pos.	255.66	256.2	175.2	1.0	25	20	300

物質名	検出器	分子量	測定質量 (親)	ドーター	キャピラ リー電圧	コーン電圧 (V)	コリジョン 電圧(V)	desolvation gas temp. (°C)
flufenoxuron	ESI pos.	488.04	489.0	158.1	3.0	30	20	300
indoxacarb	ESI pos.	527.0	528.0	249.2	3.0	30	15	300
clothianidin	ESI pos.	249.7	250.2	132.0	3.0	20	15	300
thiamethoxam	ESI pos.	291.7	292.2	211.2	3.0	20	15	300
acetamiprid	ESI pos.	222.68	223.2	126.0	1.0	25	20	300
alanycarb	ESI pos.	399.5	400.2	238.2	1.0	10	10	300
lufenuron	ESI pos.	509.97	510.8	158.1	3.0	30	20	300
triflumizole	ESI pos.	345.75	346.1	278.1	1.0	18	10	300
spinosad	ESI pos.	732.0	732.0	142.1	3.0	35	30	300
dimethomorph	ESI pos.	387.9	388.1	301.1	1.0	30	22	300
chlorfluazuron	ESI pos.	538.96	539.9	383.0	3.0	30	25	300
pymetrozine	ESI pos.	217.2	218.2	105.0	3.0	30	18	300
teflubenzuron	ESI pos.	380.0	381.0	158.0	3.0	25	15	300
cyazofamid	ESI pos.	324.8	325.1	107.9	3.0	20	15	300
cyromazine	ESI pos.	166.18	167.2	84.9	1.0	30	20	300
flusulfamide	ESI neg.	415.2	413.0	171.1	1.0	50	35	300
malathon	ESI pos.	330.0	331.1	285.2	3.5	20	8	350
NAC	ESI pos.	201.0	202.0	145.0	1.0	20	10	300
iminoctadine triacetate	ESI pos.	535.7	356.3	314.3	3.0	45	20	300
tralomethrin	ESI pos.	665.01	665.8	440.9	3.0	20	12	300
chlorpropham	ESI pos.	213.66	214.2	172.1	1.0	15	10	350
iprodione	ESI pos.	329.03	330.2	245.1	3.0	20	15	300
flutolanil	ESI pos.	323.3	324.2	282.2	1.5	25	15	350
phenthoate	ESI pos.	320.38	321.2	247.2	3.0	30	10	350
alachlor	ESI pos.	269.8	270.4	238.2	3.5	25	10	350
etoxazole	ESI pos.	359.4	360.3	304.2	1.5	35	18	350
tetraconazole	ESI pos.	371.02	372.2	159.0	2.0	35	30	350
hexaconazole	ESI pos.	313.07	314.3	159.0	2.0	30	30	350
kresoxim – methyl	ESI pos.	313.36	314.3	206.2	2.5	15	8	350
fenpropathrin	ESI pos.	349.42	208.2	181.0	3.0	20	18	350
procymidone	ESI pos.	284.14	284.2	256.2	3.5	30	15	350
triflumizole – metabolite	ESI pos.	294.7	295.2	278.1	1.5	20	15	350
probenazole	ESI pos.	223.25	224.2	—	3.0	10	—	350
thiophanate – methyl	ESI pos.	342.39	343.2	151.0	2.5	25	20	400
fluazinam	ESI pos.	465.09	465.0	373.0	3.5	35	25	350
propargite (BPPS)	ESI pos.	350.47	373.2	142.9	1.5	30	15	350
fenothiocarb	ESI pos.	253.36	254.4	160.0	1.5	20	10	350
triadimenol	ESI pos.	295.11	296.2	69.5	3.0	18	10	350
dichlofenthion	ESI pos.	313.97	315.0	259.0	3.0	20	15	350
trichlamide	ESI pos.	339.02	340.1	120.9	3.0	15	20	350
tricyclazole	ESI pos.	189.4	190.1	162.9	1.0	40	22	350
buprofezin	ESI pos.	305.16	306.2	201.1	1.0	20	15	350
carbendazim	ESI pos.	191.19	192.2	160.0	2.5	25	18	400
dimethoate	ESI pos.	228.99	230.2	199.0	1.5	15	10	350
ethoprophos	ESI pos.	242.06	243.2	173.0	1.5	25	15	350
dichlorvos (DDVP)	ESI pos.	220.5	221.2	127.0	3.0	40	15	300
ethopenprox	ESI pos.	376.2	394.2	177.2	3.0	20	15	300
fenobucarb (BPMC)	ESI pos.	207.3	208.1	95.0	3.0	20	15	300
flazasulfuron	ESI pos.	407.3	408.0	301.2	3.0	25	15	300
iprobenfos	ESI pos.	288.0	289.0	205.1	3.0	20	10	300
isoprothiolane	ESI pos.	290.0	291.0	189.0	3.0	20	20	300
etrimfos	ESI pos.	292.06	293.2	265.0	1.0	35	18	300
quinalphos	ESI pos.	298.05	299.1	162.9	1.5	30	20	300
tebufenpyrad	ESI pos.	333.16	334.2	145.0	1.5	40	25	300
cyfluthrin	ESI pos.	433.06	434.2	191.0	4.0	15	15	300
cypermethrin	ESI pos.	415.07	416.1	191.0	4.0	15	15	300
prothiophos	ESI pos.	343.96	345.1	259.0	3.0	20	20	300
flucythrinate	ESI pos.	451.16	412.2	219.1	3.0	25	25	300
diethofencarb	ESI pos.	267.15	268.2	226.2	2.0	20	10	300
mepronil	ESI pos.	269.14	270.2	119.0	1.0	30	30	300
terbufos	ESI pos.	288.04	289.2	102.9	3.0	10	10	300
chlorpyrifos	ESI pos.	348.93	350.0	198.0	3.0	20	20	300

2 魚斃死等緊急時の未知物質検索手法

農薬等有機系の汚染によると考えられる緊急時における未知物質検索手法を図-1に示す。

3 LC/MS スキャン測定 of 感度向上手法について

GC/MS, LC/MS 共にスキャン測定をする場合は一般的に質量数50~500或いは100~1,000のように広範囲の質量をスキャンして測定する。しかし、SIMと比べてスキャン測定は感度が悪く、魚斃死事故のように、現場に到着した時点ですでに原因物質が殆ど流出している等により、低濃度の試料を測定しなければならない場合は、ピークとして見ることさえ困難な場合がある。

ところが、質量数を細かく区切って測定すると感度の向上が図れることが判明した。図-2は1ppmのトリアジメノールを質量数100~1,000でスキャンしたクロマトグラムである。このクロマトグラムでは1ppmのトリアジメノールのピークは殆ど見ることができない。しかし図-3のように質量を200~300, 300~400, 400~500と100毎に区切ってスキャンすると200~300の質量域にピークがはっきりと現れた。

LC/MS のスペクトルは単純な場合が多く、100毎に区切っても一度の注入で100~1000までのスペクトルを同時に得ることができるので、原因物質のピークを捕らえることが可能となった。図-4にトリアジメノールのスペクトルを示す。

4 内部標準を使用したリテンションインデックス比の指標について

LC/MS のスペクトルは単純で物質同定の決定性に欠ける

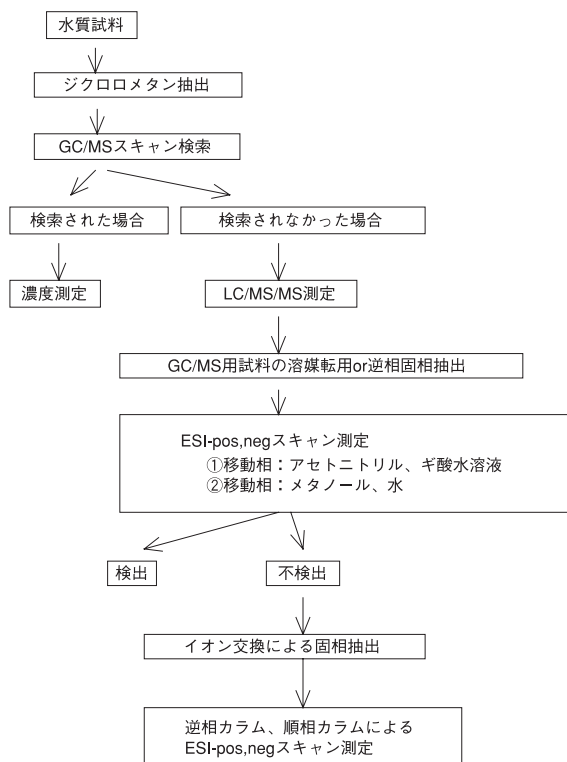


図-1 未知物質検索手法

点がある。これを少しでも補うために内標を使用したリテンションインデックスの指標を取り入れることについて検討した。しかし、LC条件は多種多様であるのでこの場合は移動相をアセトニトリル70:0.1%ギ酸水溶液30のアイソクラティックのみに限定した。

内標として、シマジン-d10を使用し、カラム毎にシマジン-d10のリテンションタイムを求めておくだけで、毎回注入の必要はない。

表-1にカラムの充填剤は同じでカラムの径が2mmと3mmのものを使用し、移動相の流量をそれぞれ0.2mL/m.と0.3mL/m.とした場合の対内標リテンションタイム比の比較を行った。この結果、3mmカラムの対内標リテンションタイム比を2mmカラムのそれで除した比は殆ど1であり、リテンションタイム比が物質の同定の一助になる可能性がある。内標を2個使用すればさらに精度が上がるのではないかと思われる。

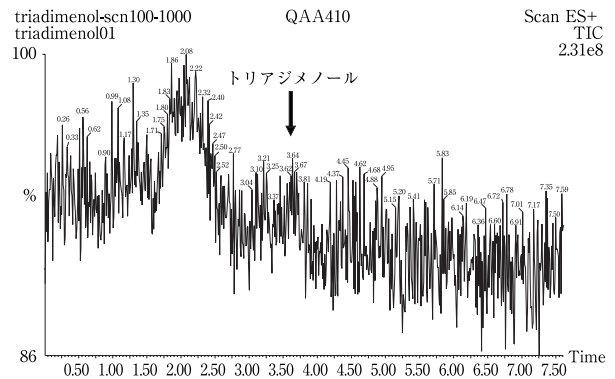


図-2 質量数100-1000でスキャンしたクロマトグラム

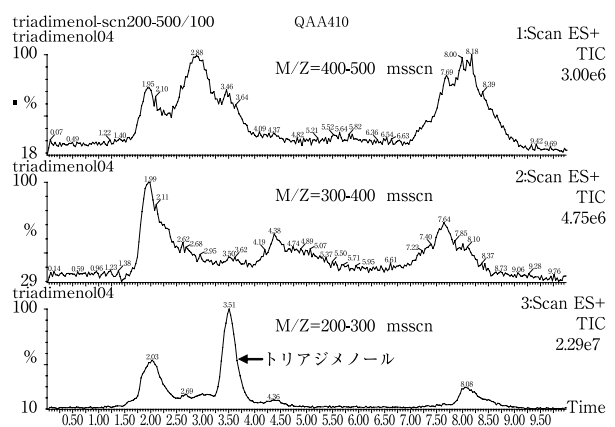


図-3 質量数を100毎に区切ってスキャンしたクロマトグラム

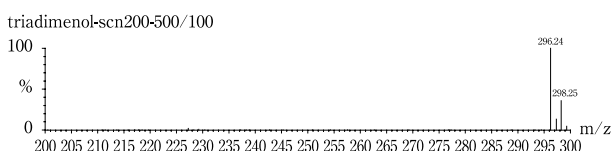


図-4 トリアジメノールのマススペクトル

表-1 シマジン-d10を内標にした場合のリテンションタイム比

物質名	2 mm カラム RT	3 mm カラム RT	2 mm カラム 対内標比	3 mm カラム 対内標比	3 mm/ 2 mm
Triadimenol	3.51	4.61	1.26	1.32	1.048
Dichlofenthion	11.04	15.36	3.97	4.39	1.105
Trichlamide	6.48	8.80	2.33	2.51	1.077
Tricyclazole	2.38	2.93	0.86	0.84	0.977
Buprofezin	8.45	11.68	3.04	3.34	1.099
Simazine-d10	2.78	3.50			

Ⅲ まとめ

1 魚斃死等の緊急時における未知物質の検索手法について、GC/MSで検索されなかった場合にLC/MSで検索できるように検討を行った。

2 LC/MSのライブラリーは機種間差があり、市販されていないので独自にライブラリーの構築を行った。

3 質量数を100毎に区切ってスキャンをする手法を取れば感度が向上し、低濃度でもピークが得られる可能性が高い。

4 アイソクラティック測定に限られるが、リテンションタイム指標のための内部標準のリテンションタイムをカラム毎に測定しておくことにより、ライブラリー検索の結果と併せて物質同定の決定性が高められると考えられる。

以上の方法により、魚斃死等の緊急時にGC/MSのみならず、LC/MSでも未知物質の検索が行えるように、ゼネラルメソッドを作製したが、ライブラリーは今後とも追加して行く予定であり、より多くの未知物質の検索が可能になるようにしたい。