

LC/MS による化学物質の分析法開発に携わっての一考察

徳島県保健環境センター

大野ちづ子・藤井 伸基・織田まゆみ

Chizuko OHNO, Nobuki FUJII and Mayumi ODA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

要 旨

環境省の受託業務である分析法開発業務に参加し、数件の開発を行ってきた経験から、化学物質の分析法開発についての留意点、問題点、苦労話等について述べる。

Key words: LC/MS, 農薬 agricultural chemicals, 医薬品 Pharmaceuticals

I 緒言

分析法開発調査は、環境省の委託業務である「化学物質環境実態調査」の中で、化学物質環境実態調査対象候補物質の物理化学的性状等を把握するとともに、ある一定の要求感度を満たす分析方法を開発するための調査である。

ある一定の要求感度というものには様々な部署からの要望に応じるわけで、中には0.1pptというような極微量の定量を要求される場合がある。又、誰が分析しても精度良く測定できなければならないことも条件の一つである。ところが、LC/MSは機種によってイオン化に差があり、ある機種ではイオン化阻害がなくても、他の機種ではイオン化阻害が大きいというような場合がある。従って、少なくとも2機種で分析法を開発するのが理想的である。

濃縮操作は、一般的には固相抽出が主であるが、これも低濃度の測定になると、50%程度の回収率は案外簡単に得られる場合が多いが、それを70%以上に上げるために、非常に苦

勞することがある。分析する者の立場からすれば、できれば一斉分析をしたいものであるが、物質の性状により、抽出段階でも差があり、機器測定でも異なった挙動を示す場合が多いことから、微量の一斉分析は難しいと痛感した。

現在までに、①フェナリモル（水質）、②チオファネートメチル（水質）、③メトリブジン（水質、底質）、④プロピルチオウラシル（水質）の開発を終了し、⑤クロルピリホスを開発中であるが、その中で、②、③（底質）、④の特に苦労した点等について説明する。これらが、今後の化学物質測定の一助になればと願っている。

II 測定法の概要と留意点

1 チオファネートメチル（水質）

① 測定法概要

測定法は「化学物質と環境」平成18年度化学物質分析法開発調査報告書 795～809 p を参照。

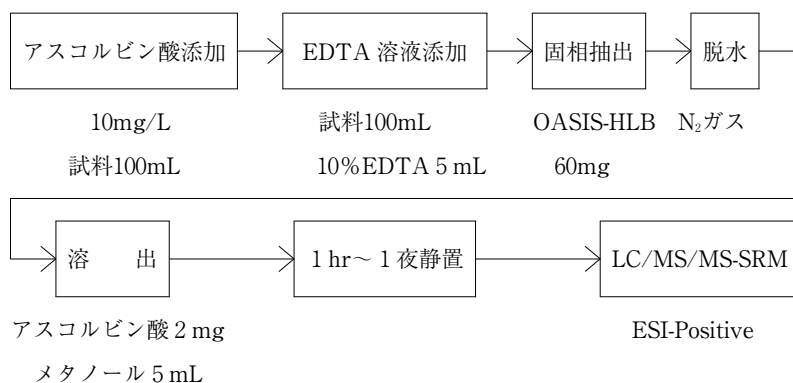


図1 チオファネートメチル分析フロー

② 物質の特性

ベンゾイミダゾール系の殺菌剤で、ベノミルと共に水中で加水分解し、カルベンダゾール（カルベンダジム）となる。従って分解を抑制しながら測定する必要がある。なぜなら分解したカルベンダゾールも農薬として使用されており、ベノミルもカルベンダゾールに分解されることから、チオファネートメチルを分解してカルベンダゾールとして測定する方法は不可であるからである。

③ 分析の留意点

A 金属類の影響

固相の選択において、最も回収率が高いものの中で、固相中の微量金属が濃縮中に影響することが考えられたので、通水量の2倍でも破過しないで、さらにできるだけ少量の充填量の固相を選択した。その結果OASIS-HLBの60mgが最適であった。又、金属成分をマスキングする手法として、通水時に10%EDTA溶液を添加した。EDTA溶液は用事調製が必須である。（このことを気づくのに日数を要した。）

さらに、試料採取ビンやメスフラスコ、バイアルの褐色ビンの中には、鉄分などの金属成分が溶出するものがあるので、透明ビンを使用し、遮光の必要性もあることから、外側をアルミホイルで覆って使用することとした。（バイアルはバイアルラックがLC本体に収まる場合は不要）

B バイアルの品質

バイアルは、透明であるばかりでなく、内部を不活性処理したものを使用する。このような分解しやすい物質のみならず、分解しにくい物質でもバイアルで保存すると分解、吸着を起こす物質が多いので注意を要

する。少量の溶液保存の難しさかもしれない。

さらにパスツールピペットも吸着、分解を起こしやすいので分解しやすい物質には使用しない方が良いと思われる。

C アスコルビン酸の効果

従来からアスコルビン酸で分解を抑制する手法がフェノール類の測定等で用いられてきた。試料水に添加して分解を抑制する方法を試みたが、それだけでは画期的な効果が得られなかった。固相溶出時に分解することが確認できたので、分解した物を元に戻す手法をとることにした。すなわち、予め溶出する試験管にアスコルビン酸を添加しておき、そこへ固相から溶出して、溶出液をしばらく放置し、アスコルビン酸と反応させる手法である。

アスコルビン酸は後で添加すれば良いのではないかと考えたが、最初から添加した場合と後から添加した場合では回収率に大きな差が出た。（108.6%と45.4%）

アスコルビン酸の添加量は多量に添加するとLC/MSにダメージを与えるので、秤取りができる最少量の2mgとした。しかし、次年度の初期調査で同様の方法でラウンドロビンの精度管理試料を測定した時に、時期が冬季でアスコルビン酸が溶けづらく、回収率がやや思わしくなかった。そこで試験管をメタノールで濡れた状態でアスコルビン酸を添加すると回収率が復活した。溶出液は5mLも必要ないので、できれば2mg/mLのアスコルビン酸メタノール溶液1mLを添加した試験管に4mLのメタノールで溶出するのが良いと思われる。ここで測定法を訂正したい。

（底質試料）

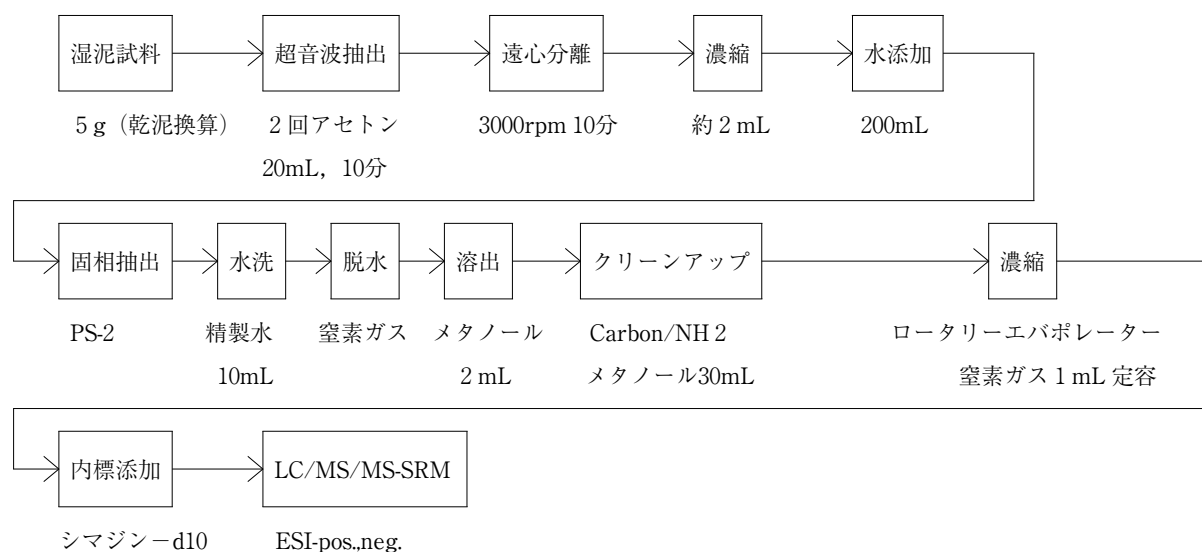


図2 メトリブジン（底質）分析フロー

2 メトリブジン（底質）

① 測定法概要

測定法は「化学物質と環境」平成19年度化学物質分析法開発調査報告書1227～1249 pを参照。

② 物質の特性

トリアジン系除草剤で分解物としてメトリブジンデスアミノ、メトリブジンデスアミノジケト、メトリブジンジケトがある。しかし、分析中に分解するものではない。これら分解物も合わせて分析する方法を開発した。

③ 分析の留意点

A 抽出操作

食品の残留農薬分析法には、メトリブジンはケトン類と反応しやすいという記述も見られるが、底質からの抽出を検討した結果、抽出率はアセトン：メタノール：アセトニトリルで1：0.51：0.37であった。アセトンと反応する気配も見られなかったことから抽出溶媒はアセトンにした。

抽出法は、高速溶媒抽出と超音波抽出を検討したが、高速溶媒抽出はイオン化を阻害する物質が多く抽出されて妨害が大きかったことから、超音波抽出法で行った。

B クリーンアップの簡便化

水質の測定は、通常の固相抽出操作であるが、底質はクリーンアップが必要である。クリーンアップについては、面倒な操作をできるだけ省き、簡易に測定できるように市販のカートリッジでのクリーンアップを模索した。すなわち、色素除去の目的で使用されるSep-pak Vac Carbon/NH₂（6 cc）をクリーンアップ用カートリッジとして前処理法を検討した。

クリーンアップ用カートリッジをメタノールで洗浄し、抽出をメタノールで溶出した場合は、メトリブジンデスアミノが全く出ない。クリーンアップ用カートリッジの前処理をメタノールで行い、0.2%ギ酸メタノールで溶出した場合は、ギ酸の影響でメトリブジンデスアミノジケトとメトリブジンジケトの感度が上昇し、回収率が100%を大きく超える。クリーンアップ用カートリッジの前処理を0.2%ギ酸メタノールで洗浄し、さらにメタノール10mLで洗浄する前処理法では、メタノールで溶出すると全項目が溶出された。

C 移動相の溶媒

アセトニトリル系とメタノール系で検討した結果、アセトニトリル系では精製水、河川水、ヘドロ質底質とマトリックスが増えるにつれて空試験の固相抽出液に標準品を添加した場合、イオン化阻害により感度が大きく低下した。メタノール系では感度低下が少なかったため、移動相はメタノール系とした。LC/MSはGC/MSよりもマトリックスによる影響が大きく、注意を要するところである。

3 プロピルチオウラシル

① 測定法概要

測定法は、平成21年9月時点で発行されていないが、「化学物質と環境」平成20年度化学物質分析法開発調査報告書を参照。

② 物質の特性

抗甲状腺剤の医薬品である。LogPowが0.98で水溶性物質である。

③ 分析の留意点

水溶性が高いために、固相抽出ではやや特異的な手法が有効であった。

A 固相の選択

スチレンジビニルベンゼン系よりもC18系が良く、さらに精製水での回収試験では0.5gのC18カートリッジで破過しなかったが、河川水では大容量の2g充填タイプが必要であった。マトリックスによってこれだけ差がある物質は経験したことがなかった。

B 固相抽出操作

通水時の試料のpHは、2gのC18カートリッジ1本でトラップするために最適なpHの範囲を検討した結果、pH3～3.5が最適であった。

固相からの溶出液については、河川水では100%メタノールでの回収率よりも80%メタノールの回収率が高く、精製水では70%メタノールが最も回収率が高いという特異的な結果が得られた。

本法では、80%メタノールを採用した。さらに、一般的には固相に通水濃縮した後は、窒素ガス等で完全に固相を乾燥してから溶出するが、この物質は完全乾燥すると回収率が低下するので、10mLの注射器で3回程度空気を通気して脱水する程度が良い。

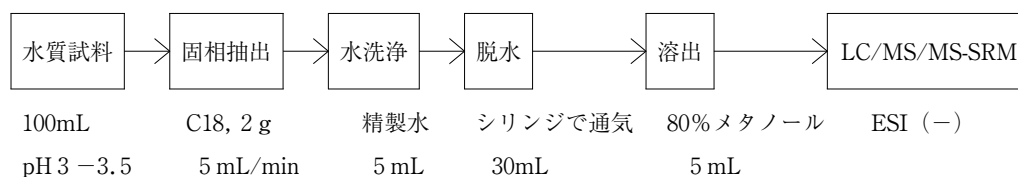


図3 プロピルチオウラシル分析フロー

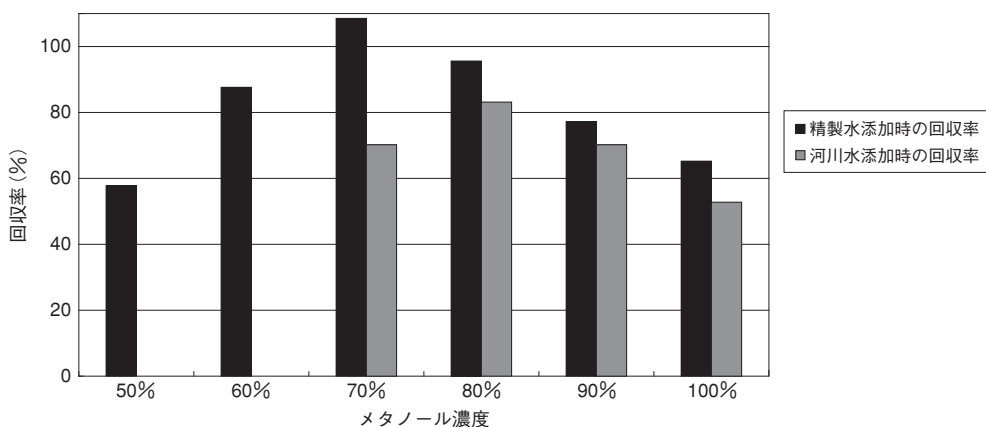


図4 プロピルチオウラシル溶出液の検討

C 水質汚濁が大きい河川水、海水の場合

化学物質環境実態調査の分析法開発では、B 類型の河川水、海水で添加回収を行い、70%以上の回収率があることを求められているが、このようにマトリックスによるイオン化阻害が激しい物質では、D、E 類型に属する河川水、海水で対応できるかどうかを検討した結果、やはりイオン化阻害が大きく、回収率は55%程度であった。そこで、回収率が悪い場合は、標準添加法により測定することを推奨する。すなわち、試料を固相抽出した試料液 5 mL を 1 mL ずつに分け、その液に標準品を添加して標準添加検量線を作成し、マイナスの x 軸に外挿して x 軸との交点で試料液中の濃度を測定する。

IV まとめ

- 1 低濃度の化学物質を、簡便で精度良く測定できる方法を開発するために分析法開発に携わってきたが、その過程は地味な試行錯誤であった。しかし、その過程において、様々な発見があり、微量分析の難しさと達成感の両者が入り交じる業務でもあった。

- 2 特に LC/MS に於いては、機種間の差が大きく、機種が異なれば報告書を参考にして、自分の機種での最適条件を設定しなければならない。しかし、濃縮方法等はそのまま適用でき、「解説」で示された検討事項は苦勞した集大成であると思われるので、業務の参考になると思う。

- 3 すでに公定法となっている一斉分析を極微量分析に応用する場合には、再度回収率等を個別に確認してから測定すべきである。今年度開発を行っているクロルピリホスについては、0.1ng/L を要求されているが、公定法を応用すると回収率は50%を満たさない。難分解性であるにもかかわらず、固相抽出液で分解されることが判明したからである。

V 参考文献

- 1) 化学物質と環境 平成18年度化学物質分析法開発調査報告書 795～809 p
- 2) 化学物質と環境 平成19年度化学物質分析法開発調査報告書 1227～1249 p
- 3) 化学物質と環境 平成20年度化学物質分析法開発調査報告書