

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金

(健康安全・危機管理対策総合研究事業) 分担研究報告書

水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究

－水質分析法に関する研究－

研究分担者	小林憲弘 鈴木俊也 川元達彦 門上希和夫	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部 北九州市立大学 国際環境工学部
研究協力者	五十嵐良明 久保田領志 小杉有希 木下輝昭 矢野美穂 阿部晃文 境泰史 大窪かおり	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部 川崎市上下水道局 水管理センター 水道水質課 (公財)北九州生活科学センター 佐賀県衛生薬業センター

研究要旨

水質分析法に関する研究では、必要性の高い新規の水質検査法の開発および既存の水質検査法の改良を行うことと、平常時および異常発生時の簡便かつ網羅的な水質スクリーニング手法についての検討を行う。また、これらの分析法を、水道事業体および地方衛生・環境研究所、保健所に普及し、分析技術の向上と水質監視体制の強化を図ることを目的に、研究を実施した。

平成 25 年度は、農薬、有機物、および無機物を対象に、それぞれの新規分析法を開発するとともに、網羅分析法に関する検討を併せて行った。

農薬については、厚生労働省の新規農薬分類の中で「要検討農薬類」あるいは「その他農薬類」に該当するが標準検査法が定められていないエチプロール (要 03)、テフリルトリオン (要 06)、およびフェノキサニル (他 64) の 3 農薬の分析法について検討した。その結果、これらの農薬を LC/MS/MS による一斉分析法 (別添方法 20) の対象農薬と同時に分析可能な分析条件を確立することができた。さらに、開発した分析法の妥当性評価を行うため、脱塩素処理を行った水道水に上記の 3 農薬を各農薬

の目標値の 1/10 および 1/100 の濃度となるように添加し、LC/MS/MS による一斉分析を行ったところ、いずれの添加濃度においても、各農薬とも妥当性評価ガイドラインにおける真度と併行精度の目標を満たした。以上のことから、開発した手法は、水道水の検査法として有用と考えられる。

有機物については、現在、GC/MS により分析されているホルムアルデヒドについて、DNPH 誘導体化後に LC/UV または LC/MS で定量する分析法を開発した。その結果、UV 法および MS 法ともに、妥当性評価ガイドラインの目標を満たした。また、分析時間が告示法よりも短く、アセトアルデヒドも同時に分析可能であった。

無機物については、オキソハロゲン酸の新規分析法を開発するとともに、クロムの価数分離手法及び高感度化のための条件等に関する検討を行った。具体的には、オキソハロゲン酸として、過塩素酸、臭素酸および塩素酸の LC/MS/MS による同時分析法の開発を行った。実試料で検討した結果、分析時間はいずれも 10 分以内であり、さらに基準値・目標値と比べて高感度分析が可能となった。また、毒性の高い六価クロムと三価クロムを分離した同時分析法をポストカラム付イオンクロマトグラフにより検討し、六価クロムを高感度に検出することを可能とした。

網羅分析法については、米国 NIST の無料マススペクトル検索ソフトに自作のデータベースを組み込むことで、GC/MS 向けの汎用全自動同定システムを開発した。統一した GC 条件及び MS チューニングを採用することで、機種依存無く確実に未知物質を同定できた。現在の登録物質は約 1000 物質であるが、簡単に物質追加ができ、市販の全 GC/MS で標準物質を使用することなく未知物質の同定が可能である。

A. 研究目的

水質分析法に関する研究では、必要性の高い新規の水質検査法の開発および既存の水質検査法の改良を行うことと、平常時および異常発生時の簡便かつ網羅的な水質スクリーニング手法についての検討を行う。また、これらの分析法を、水道事業体および地方衛生・環境研究所、保健所に普及し、分析技術の向上と水質監視体制の強化を図ることを研究目的としている。

平成 25 年度は、農薬、有機物、および無機物を対象に、それぞれの新規分析法を開発するとともに、網羅分析法に関する検討を併せて行った。

農薬については、標準検査法が定められていない農薬類の LC/MS/MS 一斉分析の検討を行った。有機物については、水道水中のホルムアルデヒドの DNPH 誘導体化—液体クロマトグラフ法の検討を行った。無機物については、水道水

中のオキソハロゲン酸の分析法に関する検討と、水道原水中のクロムの価数を分離した同時分析法に関する検討を行った。網羅的分析法については、GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発を行った。

以下に、研究課題毎の具体的な研究の背景と目的を記す。

1. 標準検査法が定められていない農薬類の LC/MS/MS 一斉分析の検討

水道水中の農薬類は、毒性評価結果が暫定的な物質や、検出レベルは高くないものの水質管理上注意喚起すべき物質が多いことから、「水質管理目標設定項目」に設定されている。ここで、検査対象とする農薬は、基本的には各水道事業者がその地域の状況を勘案して適切に選択することになっているが、500 を超

える登録農薬の中から検出可能性のある農薬を選定することは非常に困難である。そこで、近年の国内推定出荷量、上水および原水における検出状況、一日許容摂取量（ADI）等のデータに基づいて、水道原水から検出される可能性が高いと考えられる農薬類のリストが、厚生労働省から通知されており、同リストは随時改定されている。

その最新のリスト¹⁾では、農薬類を①水質基準農薬類（0物質）、②対象農薬リスト掲載農薬類（120物質）、③要検討農薬類（16物質）、④その他農薬類（84物質）、⑤除外農薬類（14物質）の5つに区分し、測定の実優先順位が付けられている。

一方、検査法に関しては、上記でリストアップされた全ての農薬について標準検査法が定められておらず、標準検査法のない農薬を検査対象として選定した場合、検査実施機関が独自に検査法を開発する必要があるため、標準検査法の更なる拡充が求められている。また、農薬類の場合は非常に多くの物質を分析対象とする場合が多いことから、検査に要する労力をできるだけ軽減するため、多物質の一斉分析法が有用と考えられる。

そこで本研究では、水道水の標準検査法が定められていない農薬類の中から、LC/MS/MSによる一斉分析が可能な農薬を選定し、分析条件の検討を行った。我々は過去に農薬76物質を対象に、水道水試料を液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）に直接導入する一斉分析法を新たに開発し^{1,2,1-3)}、開発した分析法は後に水道水の標準検査法（別添方法20）となった。今回の検討では、別添方法20の対象農薬と同時に分析を行うための条件を確立することとした。

また、平成25年10月から「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」が適用されたことにより¹⁴⁾、機器分析による全ての水道水質検査において、分析精度がガイドライン

の目標を満たすかどうかを確認する必要がある。そこで、本研究においても、同ガイドラインに従った妥当性評価を実施した。

2. 水道水中のホルムアルデヒドのDNPH誘導体化—液体クロマトグラフ法の検討

現在、水道水中のホルムアルデヒドの測定は、告示法の別表第19 溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法（GC/MS法）により行うこととされている。この方法ではヘリウムガスが必須となるが、ヘリウムガスの供給が不足、あるいは途絶えた場合には、検査に支障をきたす可能性がある。したがって、ヘリウムガスを使用しない代替法の検討が必要である。

既存のホルムアルデヒドの分析法として、ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン（PFBOA）、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）および*O*-(4-シアノ-2-エトキシベンジル)ヒドロキシルアミン（CNETまたはCEBHA）等の試薬によりホルムアルデヒドを誘導体化後、ガスクロマトグラフまたは液体クロマトグラフで分離定量する方法がある。水中のホルムアルデヒドの分析においては、クロモトロボ酸や4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール（AHMT）による比色法や、DNPH誘導体化後に液体クロマトグラフ（LC）で分析する方法が複数報告されている。

今年度は、ホルムアルデヒドの他に要検討項目アセトアルデヒドを加え、DNPH誘導体化後に逆相系LCカラムを用いて分離し、紫外外部吸収検出器または質量分析計で定量する一斉分析法について検討することとした。

3. 水道水中のオキシハロゲン酸の分析法に関する検討

水道水の殺菌目的で使用する次亜塩素酸ナトリウムには、不純物として有害な臭素酸（HBrO₃）や塩素酸（HClO₃）が含まれている

ケースがある。また、両物質は浄水処理のオゾン酸化により臭化物イオン (Br⁻) や塩化物イオン (Cl⁻) から生成する消毒副生成物としても知られている。

一方、過塩素酸 (HClO₄) は、米国では環境水への汚染事例³⁻¹⁾、日本では飲料水や食品中での検出事例^{3-2, 3-3)}が報告されている。過塩素酸は、燃料エンジン、花火、安全マッチ等の原料として使用されるが、有害であるため、河川水等への汚染事故が発生した場合、飲料水への混入が懸念される^{3-4, 3-5)}。

これらの、オキソハロゲン酸の分析法として、臭素酸にはポストカラム付イオンクロマトグラフ法、塩素酸にはイオンクロマトグラフ法が告示法として示されているが、特に臭素酸分析においては、高濃度の劇物 (試薬) を使用する方法であること、また操作が煩雑であることから熟練を要する方法となっている。一方、過塩素酸の分析法は未設定となっている現状がある。

そこで、本研究では、LC-MS/MS によるオキソハロゲン酸の迅速かつ高感度な同時分析法の開発を目的とした。

4. 水道原水中のクロムの価数を分離した同時分析法に関する検討

水道水質基準においてクロム (Cr) は、「六価クロム化合物」として規定されている。一方で、Cr の告示法で示されているフレームレス原子吸光光度法、誘導結合プラズマ発光分光分析法、誘導結合プラズマ質量分析法は、いずれも価数を分離する前処理が含まれていないことから、Cr の総濃度を測定する方法となっている。これは、水質基準の適用を受けるのは塩素処理された水であるため、原水中に三価のクロム (Cr (III)) が含まれていたとしても塩素により酸化されて六価 (Cr (VI)) に変化していること、浄水中に六価に酸化されていないものが存在していても、三

価のものは毒性が低く、問題にならないということによるものである^{4-1, 4-2)}。このような背景を理解した上で、水道水質管理計画に基づく監視地点の水道原水を対象とした測定法として、また水道水源で高濃度のクロムが検出された場合の原因究明と対応策の一環として、Cr (VI) と Cr (III) を分離した方法の確立も重要と考えられ、分析方法の検討を実施した。

5. GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発

化学物質は現代社会の基礎的物資であり、100,000 種以上の化学物質が全世界で年間 4 億トン以上生産・使用されている⁵⁻¹⁾。この様に化学物質は、我々の生活を豊かにする必要不可欠な存在であるが、一部の化学物質はヒトの健康や生態系に悪影響を与えてきた。その為、健康被害や環境汚染が明らかになった物質は各種の基準により規制・モニタリングがされている。しかし、規制物質以外にも不適切な使用や廃棄、および地震等による非意図的な流出が原因で生じる環境汚染が懸念される。例えば、農薬による食品汚染は消費者の関心が高く、全国各地で報告される魚へい死事件の原因の 1 つは化学物質である⁵⁻²⁾。東日本大震災では、地震や津波による工場の損壊により、化学物質が環境中に流出したと考えられている⁵⁻³⁾。また、不適切な廃棄の例として、2012 年 5 月の利根川でのヘキサメチレントラミンの排出がある^{5-4, 5-5)}。これらの事件・事故による汚染は、法律を強化しても無くすことは困難であり、地震などでの 2 次被害の防止対策も必要である。この様な事件・事故に対応して安全を担保するには、まず原因物質の迅速な究明が必要であることは論を待たない。

有機化学物質の検出同定には、クロマトグラフと質量分析計を組み合わせた手法が最も

有効であり、環境や食品分析には従来から GC/MS が多用されている。GC/MS で未知汚染物質を同定する最も一般的な手法は、全イオンモニタリング(TIM, スキャン法)で試料を測定し、原因物質と思われるピークのマススペクトルを NIST データベース⁵⁻⁶⁾などを用いてライブラリー検索し、候補物質を探し出す。次に、候補物質の標準品を測定して保持時間とマススペクトルが試料のそれと一致することをもって同定する。この様に原因物質の同定には、標準品の測定が必要であり、迅速な原因究明を妨げている。

筆者らは、この標準品が必要という GC/MS の測定上の制限の解決を目指して研究を進め、全自動同定・定量データベース法(AIQS-DB)を開発した^{5-7, 5-8)}。AIQS-DB を用いれば、標準品を用いることなくデータベース登録物質を同定・定量することができる。しかし、現在販売されている AIQS-DB^{5-9, 5-10)}は、使用する装置毎にソフトウェアを購入しなければならず、これが普及とデータベース登録物質数の拡大を妨げている。

本研究では、この機種依存を無くして市販の全ての GC-MS で使用できる汎用同定システムの開発を目標とした。

B. 研究方法

1. 標準検査法が定められていない農薬類の LC/MS/MS 一斉分析の検討

1.1. 対象物質

本検討における対象物質は、平成 25 年 4 月の農薬類の分類見直しにおいて要検討農薬に分類されているエチプロール (要 03) およびテフリトリオン (要 06) と、その他農薬に分類されているフェノキサニル (他 64) とした。

エチプロールは、 γ -アミノ酪酸 (GABA) による神経伝達を阻害することにより殺虫活性を有する殺虫剤である。テフリトリオン

は、トリケトン系の除草剤である。フェノキサニルは、いもち病菌のメラニン生合成を阻害することにより殺菌効果を有する殺菌剤である。

これらの農薬の中で、特にテフリトリオンについては、検出報告例が存在し、駒田ら (2013)¹⁻⁵⁾の報告では、鶴見川流域で比較的高頻度で検出され、検出最大濃度は 0.19 $\mu\text{g/L}$ と、目標値 (2 $\mu\text{g/L}$) の 1/10 程度の濃度であることから、分析法の検討の必要性が高いと考えられる。

エチプロール、テフリトリオン、およびフェノキサニルの基本的情報をそれぞれ表 1-1~表 1-3 に示す。

1.2. 標準品・試薬

(1) 精製水

ミリ-Q SP standard (Millipore 製) により精製して得られたものを使用した。

(2) メタノール

関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。

(3) 酢酸アンモニウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(4) アスコルビン酸ナトリウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(5) チオ硫酸ナトリウム

和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

(6) 農薬混合標準原液

エチプロール、テフリトリオン、およびフェノキサニルの標準品は、和光純薬工業(株)の残留農薬分析用の規格品を使用した。

1.3. 標準液の調製

各農薬の標準品 10 mg を秤量してメスフラ

スコに採り、メタノールで 10 mL に定容して標準原液を調製した (各 1000 mg/L)。また、各標準原液の 100 μ L をメスフラスコに採り、10 mL に定容して各農薬の標準液を調製した (各 10 mg/L)。

エチプロール標準液の 100 μ L、テフリルトリオン標準液の 20 μ L、およびフェノキサニル標準液の 200 μ L をメスフラスコに採り、メタノールを加えて 10 mL に定容して混合標準液を調製した。この混合標準液には、エチプロールを 0.1 mg/L、テフリルトリオンを 0.02 mg/L、およびフェノキサニルを 0.2 mg/L ずつ含む。これを必要に応じて適宜希釈して試験に用いた。

1.4. 分析条件の最適化

調製した各農薬の標準液および混合標準液を用いて LC/MS/MS (Shimadzu Prominence UFLC - LCMS 8030 plus, 島津製作所) の分析条件の検討を行った。最初に、各農薬の個別標準液を用いて、スキャンモードにより各農薬の ESI ポジティブイオンおよびネガティブイオンモードのマスペクトルを測定し、最も強度の強いイオンを MRM モードにおけるプリカーサイオンとして選択した。次に、選択したプリカーサイオンから得られるプロダクトイオンのスキャンを行い、最も強度の強いイオンを定量イオンとして、2 番目に強度の強いイオンを確認 (定性) イオンとして選択した。スキャンモードによる分析で、最も強度の強いイオンが一つに絞れなかった場合は、複数のプリカーサイオンでプロダクトイオンスキャンを行い、最も強度の強いプロダクトイオンを定量イオンとして選択した。

各農薬のモニターイオンを決定後、混合標準溶液を用いて LC/MS/MS 一斉分析条件を検討した。別添方法 20 の対象農薬との一斉分析を可能とするため、過去に別添方法 20 の対象農薬の分析法を検討した際の分析条件^{1,2)}と同条件で分析を行ったが、グラジエント

条件のみ若干の変更を行った。

1.5. 分析法の妥当性評価

1.5.1. 検査試料水の調製

我が国の水道水質管理において、目標値の 1/10 を超えて検出される物質については、原則として個別に水質基準が設定されるため、目標値の 1/10 を超えるかどうかを正確に判定できる分析法が必要である。すなわち、水道水質検査法として、目標値の 1/10 以下の定量下限が求められる。さらに、農薬類については、原則として目標値の 1/100 の濃度まで分析を行うこととされている (厚生労働省, 2003)。そこで、各農薬について目標値の 1/10 の濃度および 1/100 の濃度の 2 濃度となるように混合標準液を添加した水道水を調製した。

洗浄済みのガラス瓶に水道水 500 mL を採取し、脱塩素処理剤を 20 mg 添加した後、よく攪拌した。脱塩素処理剤による分解等の影響について知見を得るため、脱塩素処理剤はアスコルビン酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムそれぞれを使用し、試験結果を比較した。農薬混合標準液をアスコルビン酸ナトリウム脱塩水道水およびチオ硫酸ナトリウム脱塩水道水に上記の濃度となるように添加し、検査試料水を調製した (表 1-2 参照)。また、空試験用の試料水として、農薬混合標準液未添加の脱塩素処理水道水を用意した。各濃度の添加試料および空試験の検査試料は 5 つずつ調製し、よく攪拌した後で、それぞれ 1 回ずつ (合計 5 回) 分析操作を行った。

1.5.2. LC/MS/MS 分析

最適化した分析条件を用いて、検査試料水 (高濃度および低濃度) および空試験用試料水の 100 μ L を LC/MS/MS に注入し、各農薬のピーク面積および S/N 比を求めた。各農薬の添加試料中のモニターイオンのピーク面積から、空試験試料中のピーク面積を差し引いた後、作成した検量線を用いて添加試料中の

各農薬の濃度を求めた。

1.5.3. 検量線の作成

農薬混合標準溶液を精製水に添加し、各農薬につき5つの検量線用の標準液を調製した。また、検量線のブランクとして、農薬混合標準溶液未添加の精製水を用意した。検量線用標準液および検量線ブランクは、検査試料水と同様にLC/MS/MS分析を行い、各農薬の検量線用標準液中のフラグメントイオンのピーク面積から検量線ブランク中のピーク面積を差し引いた後、検量線を作成した。検量線用標準液は5回の繰り返し測定を行い、再現性および直線性を確認した。

表1-4に、各農薬の目標値と、検査試料水における添加濃度および検量線の濃度範囲についてまとめた。

2. 水道水中のホルムアルデヒドのDNPH誘導体化—液体クロマトグラフ法の検討

2.1. 試薬

(1) 精製水

ミリポア製超純水製造装置より調製したもの

(2) 還元剤

チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、塩化アンモニウム、アスコルビン酸ナトリウムは和光純薬工業製を用いた。それぞれ1%水溶液を工事調製した。

(3) 20% (v/v) リン酸

(4) 0.2% DNPH 溶液

DNPH (和光純薬工業製) 0.2 g をアセトニトリルに溶かして 100 mL とした。この溶液は、褐色瓶に入れて冷暗所に保存した。

(5) ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド標準原液

ホルムアルデヒドは 1000 mg/L メタノール溶液 (関東化学製)、アセトアルデヒドは 1000 mg/L メタノール溶液 (和光純薬工業製) を用いた。

(6) ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド標準液

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドとして 1 mg に相当するホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド標準原液を採り、アセトニトリルで 100 倍に薄めたもの。この溶液 1 mL は、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド 0.01 mg を含む。この溶液は、使用の都度調製した。

2.2. 器具および装置

(1) ねじ口瓶

ガラス製容量 125 mL

(2) ねじロバイアル

ガラス製容量 1.5 mL、PTF セプタム付

(3) 液体クロマトグラフ

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体の LC 分析条件を表 2-1 に示す。なお、C. 研究結果および考察の 1～8 までは、LC/UV 法により得られた結果を示した。

2.3. 水試料の採取および保存

水試料は、精製水およびアセトニトリルで洗浄したガラス瓶に採取し、満水にして直ちに密栓し、速やかに試験した。速やかに試験できない場合は、冷蔵保存し、72 時間以内に試験した。なお、残留塩素が含まれている場合には、1% 塩化アンモニウム溶液を水試料 100 mL あたり 0.5 mL 加えた。

2.4. 試験操作

(1) 前処理

水試料 10 mL (水試料に含まれるホルムアルデヒドまたはアセトアルデヒドの濃度が 0.060 mg/L を超える場合には、0.005～0.060 mg/L と

るように精製水を加えて 10mL に調製したもの) を採り、20%リン酸 0.2 mL、DNPH 溶液 0.5 mL を加えて混合した。室温で 20 分間静置後、一定量採り、試験溶液とした。

(2) 分析

上記(1)で得られた試験溶液の一定量を LC に注入し、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体のピーク面積を求め、下記 5 により作成した検量線から試験溶液中の対象物質の濃度を求め、検水中の対象物質の濃度を算定した。

2.5. 検量線の作成

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド標準液を段階的にメスフラスコ 4 個以上に採り、それぞれに精製水を加えて 10 mL とした。この場合、調製した溶液のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドとしての濃度は、上記 2.4(1) に示す検水の濃度範囲を超えないようにした。以下上記 2.4(1)および(2)と同様に操作して、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの濃度とホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体のピーク面積との関係を求めた。

2.6. 空試験

精製水 10 mL を採り、以下上記 2.4(1)および(2)と同様に操作してホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの濃度を求め、上記 2.4(1)に示す検水の濃度範囲の下限値を下回ることを確認した。

2.7. 連続試験を実施する場合の措置

オートサンプラーを用いて 10 以上の水試料の試験を連続的に実施する場合には、以下に掲げる措置を講じた。

(1) おおむね 10 の水試料ごとの試験終了後および全ての水試料の試験終了後に、上記 5 で調製した溶液の濃度のうち最も低いものの濃度 (以

下この 7 において「調製濃度」という。) に調製した溶液について、上記 2.4(1)および(2)に示す操作により試験を行い、算定された濃度と調製濃度との差を求めた。

(2) 上記(1)により求められた差が調製濃度の $\pm 20\%$ の範囲を超えた場合には、是正処置を講じた上で上記(1)で行った試験の前に試験を行ったおおむね 10 の水試料およびそれらの後に試験を行った全ての水試料について再び分析を行った。その結果、上記(1)により求められた差が再び調製濃度の $\pm 20\%$ の範囲を超えた場合には、上記 4 および 5 の操作により試験し直した。

3. 水道水中のオキシハロゲン酸の分析法に関する検討

3.1. 分析方法の検討

3.1.1 対象物質：オキシハロゲン酸

分析法の開発を対象としたオキシハロゲン酸は、臭素酸、塩素酸および過塩素酸の 3 種類とした。また、内部標準物質として過塩素酸- ^{18}O を用いた。

3.1.2. 分析装置及び測定条件

分析時間の短縮化 (迅速性) のため、超高速液体クロマトグラフを適用した。また、妨害物質を排除して選択性を高める MS/MS 機能を適用し、高感度分析条件を確立することとした。以下に、最適な分析条件を示した。

[LC]

超高速液体クロマトグラフ：Acquity UPLC (Waters 社製)

分離カラム：IC-Pak Anion HR (ϕ 4.6mm \times 75 mm, $6\mu\text{m}$, Waters 社製)

溶離液：50mM 酢酸アンモニウム (pH10.0) : アセトニトリル=1 : 1

流速：0.7mL/min

カラム温度：30°C

注入量：20 μ L

[MS]

検出器：Acquity TQD (Waters 社製)

イオン化：ESI (-)

モード：MS/MS ; MRM

測定イオン：

臭素酸 (プリカーサーイオン：m/z127, 129
プロダクトイオン：m/z111, 113)

塩素酸 (プリカーサーイオン：m/z83, 85
プロダクトイオン：m/z 67, 69)

過塩素酸 (プリカーサーイオン：m/z99, 101
プロダクトイオン：m/z 83, 85)

過塩素酸-¹⁸O (プリカーサーイオン：m/z107
プロダクトイオン：m/z89)

3.1.3. MS/MS 法による高感度化条件の検討

TIC (トータルイオンクロマトグラム) から特徴的なイオン (プリカーサーイオン) を選択し、それぞれに対して MS/MS モードから得られるによるプロダクトイオンの中から最適なイオンを選択し、定量イオンと確認イオンとした。また、内部標準物質として過塩素酸-¹⁸O (10mg/L) を試料 1mL に対して 5 μ L 添加 (m/z107 をプリカーサーイオン, m/z89 を定量用のプロダクトイオン) した。これを LC-MS/MS 用試験溶液とした。

3.1.4. 陰イオン類の影響に関する検討

臭素酸、塩素酸および過塩素酸の分析に対する陰イオン類の影響の有無について検討した。オキソハロゲン酸の定量に妨害となる可能性のある陰イオン類として、臭化物イオン、硫酸イオン、チオシアン酸イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンおよび塩化物イオンが想定されるため、精製水に臭化物イオン 1mg/L, 硫酸イオン 40mg/L, チオシアン酸イオン 10mg/L, 硝酸イオン 20mg/L, 亜硝酸イオン 1mg/L, 塩化物イオン 50mg/L を添加した模擬試料を調製し、臭素酸 1 μ g/L, 塩素酸 60 μ g/L および過

塩素酸 2.5 μ g/L (基準値, 目標値等の 1/10 濃度) となるように添加した水試料について LC-/MS で分離条件等を検討した。

3.1.5. 妥当性評価

分析法の妥当性を評価する試料として、河川水および水道水に 3 物質 (臭素酸, 塩素酸, 過塩素酸) を、それぞれ基準値, 目標値の 1/10 濃度を添加した。さらに、サロゲート 10ng を添加して分析に供した。また、水道水中の亜塩素酸イオンから塩素酸イオンへの酸化, 塩素酸イオンから過塩素酸イオンへの酸化を抑制するために、水道水に 2 種類の抗酸化剤 (アスコルビン酸ナトリウム VC 10mg/L, エチレンジアミン EDA 50mg/L) を添加した試料, 計 4 種類を用いた。

4. 水道原水中のクロムの価数を分離した同時分析法に関する検討

4.1. 前処理方法

クロムの測定試料と溶離液 (4.3. に記載) の 10 倍濃度の溶液を 9 : 1 の割合で混合した溶液を調製する。この調製液を温浴で 80°C に加熱し、10 分間反応させた後、放冷し、pH を 6.8 に調整する。この前処理は、Cr (III) とピリジンジカルボン酸 (PDCA) を反応させて錯体を形成させるための操作であり、Cr (III) が存在すれば、薄い紫色に着色する。

4.2. 原理

イオンクロマトグラフ法による遷移金属イオン (Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺等) の測定で、溶離液に PDCA を使用し、試料中の遷移金属イオンと PDCA の錯体を形成させ、金属による錯体生成定数の差を利用して分離する方法がある。その際に生成される M³⁺ のイオンに対する錯体は、M (PDCA)₂ というような 2 分子配位した 6 配位構造と推定されている⁴⁻³⁾。このことから、上記 1. の前処理により生成された

Cr (III) の錯体は、Cr (PDCA)₂⁻と推定され、この金属錯体の薄い紫色の吸収（可視部 520nm）を測定する。これに対して、Cr (VI) はクロム酸イオン(CrO₄²⁻)として分離される。その後、ジフェニルカルバジドによる吸光光度法⁴⁻⁴⁾を用いたポストカラム誘導体化により、Cr (VI) とジフェニルカルバジドとの反応で生じる紫紅色の錯化合物を可視部 520nm の吸光により測定する。

4.3. ポストカラム付イオンクロマトグラフの分析条件

装置：Dionex ICS-1000

カラム：Dionex IonPac CG5A / CS5A

溶離液：2 mmol/L 2,6 ピリジンジカルボン酸 / 2 mmol/L NaHPO₄ / 10 mmol/L NaI / 50 mmol/L CH₃COONa / 2.8 mmol/L LiOH

流量：1.0 mL/min

反応試薬：2 mmol/L ジフェニルカルバジド / 10%メタノール / 0.5 mol/L H₂SO₄

検出器：UVD-510 UV-Vis 検出器 (520nm)

注入量：250 μL

5. GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発

5.1. 試薬

GC-MS 装置性能評価標準液(CS, 表 5-1)⁷⁾に含まれる n-アルカン標準混合液は林純薬工業から購入し、その他は関東化学、和光純薬工業、Dr.Ehrenstorfer から購入した。それらを残留農薬分析用ヘキサンに溶解し、1 μg/mL に調製した。

5.2. 装置と測定条件

GC-MS は島津製作所製の GC-MS-QP2010 Plus, アジレントテクノロジー製の 5975C

MSD, 及びサーモフィッシャーサイエンティフィック製の TSQ Quantum GC を使用した。保持時間やマススペクトルは、GC 測定条件や MS チューニングによって変動するため、測定条件を表 5-2 に統一し、データベース登録および試料測定を行った。

5.3. 検索ソフトウェアとパラメーター

近年ではコンピュータの性能向上により、TIM で得られた全イオン電流クロマトグラム (TICC) から複数のピークが重なったマススペクトルをデコンボリュートし、独立したマススペクトルを抽出するソフトウェアが開発されている。デコンボリューションとは、GC-MS で得られた TICC からピークを分離、補正することで夾雑イオンを除いたマススペクトルを取り出すことである。本研究では、米国国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology : NIST)のフリーウェア "AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution & Identification System)" ver 2.71⁵⁻¹¹⁾を採用した。AMDIS は市販の全ての GC-MS の測定データを解析でき、デコンボリューション処理で得られたマススペクトルと保持時間を用いてデータベース検索をして物質の同定を行う。一般に、AMDIS でのデータベース検索には NIST マススペクトルデータベースを使用するが、NIST データベースには保持時間が登録されていない。一方、AMDIS ではユーザーが独自のデータベースを作成することができるため、本研究では保持時間とマススペクトルの2種のデータベースを作成した。また、保持時間やマススペクトルは測定条件を統一すれば、GC-MS に拘わらずほぼ同一であり⁵⁻⁸⁾、複数の機種で測定したデータを持ち寄ることでデータベース登録物質数の拡大を容易に行うことができる。本研究では、誤検出をゼロとすると同時に、誤検出の発生を最小限に抑えるように AMDIS の解析パラメーターを設定した。代

表的なパラメーターを表 5-3 に示す。

5.4. データベースの構築

AMDIS と組み合わせたデータベースは、n-アルカン(C9-C33)の昇温保持指標(PTRI)ライブラリー及び約 1,000 物質の情報を登録したターゲットライブラリー(表 5-4)の 2 種である。ターゲットライブラリー登録物質は、農薬、工業薬品及び医薬品・パーソナルケア製品(PPCPs)、日本やアメリカの規制物質や環境から検出例のある物質であり、表 5-2 の測定条件で測定可能な物質である⁵⁻⁸⁾。各データベースには、物質名、CAS No, PTRI, 及びマススペクトルを登録している。

5.5. 登録物質の同定及び新規物質登録手順

本システムを用いたデータベース登録物質の同定手順及びデータベースへの新規物質登録手順を図 5-1 に示す。

5.5.1. データベース登録物質の同定手順

GC-MS を表 5-2 の測定条件に設定した後、米国環境保護庁が採用しているデカフロトリフェニルフォスフィン(DFTPP)のフラグメントパターンを満足する方法(US EPA Method 625)で MS をチューニングする。次に、CS を測定し、n-アルカンの保持時間と装置が所定の性能を維持していることを確認した後、解析対象試料を測定する。AMDIS で測定データを直接読めない場合は、TICC データを Net CDF ファイルに変換する。AMDIS で CS の n-アルカン(C9-C33)を同定し、PTRI ライブラリーの保持時間を更新する。最後に、解析対象試料の TICC をデコンボリューション後、保持時間を更新した PTRI ライブラリーと約 1,000 物質のマススペクトルを登録したターゲットライブラリーを用いて登録物質を同定する。

5.5.2. 新規物質のデータベース登録手順

GC-MS を表 5-2 の測定条件に設定し、CS を測定する。n-アルカンの保持時間と GC-MS の性能を確認した後、新規登録物質を測定する。NIST など市販のマススペクトルライブラリーで新規登録物質のマススペクトルに問題がないことを確認した後、必要に応じて TICC データを Net CDF ファイルに変換する。AMDIS で CS の n-アルカン(C9-C33)を同定し、PTRI ライブラリーの保持時間を更新する。新規登録物質の TICC をデコンボリューション後、保持時間とマススペクトルをデータベースに登録する。

C. 結果と考察

1. 標準検査法が定められていない農薬類の LC/MS/MS 一斉分析の検討

1.1. 分析条件の最適化

最適化により決定した全農薬共通の LC/MS/MS 一斉分析条件および各農薬の個別の LC/MS/MS 一斉分析条件を表 1-5 および表 1-6 に示す。また、精製水で希釈した 10 µg/L の混合標準液 (100 µg/L 注入) の LC/MS/MS 一斉分析クロマトグラムを図 1-1 に示す。対象農薬いずれについても良好なピーク形状と分離が得られた。

1.2. 分析法の妥当性評価

1.2.1. 検量線の評価

エチプロール、テフリトリオン、およびフェノキサニルの検量線をそれぞれ図 1-2, 図 1-3, および図 1-4 に示す。いずれの農薬についても検量線の直線性は良好で、検量線の最低濃度 (低濃度添加試料中の各農薬の 1/2 の濃度) においてもピークの定量を行うことができた。しかし、テフリトリオンについては、他の農薬と比べてデータの再現性が悪く、特に高濃度試料でそのような傾向が顕著であった。この原因については現状では不明であるため、今後実施予定の他機関における

妥当性評価試験の中で更なる検討と改善を行いたい。

1.2.2. 添加回収試験の評価

アスコルビン酸ナトリウム脱塩水道水およびチオ硫酸ナトリウム脱塩水道水における各農薬の高濃度・低濃度添加試料の試験結果を表 1-7～表 1-10 に示す。

いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、各農薬の目標値の 1/10 および 1/100 の添加濃度において良好な回収率が得られ、平均値だけでなく、5 回の繰り返し試験における全ての回収率が、妥当性評価ガイドラインの目標 (70～120%) を満たした。また、併行精度については、低濃度添加試料 (目標値の 1/10 の濃度) の方が、高濃度添加試料 (目標値の 1/100 の濃度) と比べてばらつき (RSD_r) が大きい結果となったが、全ての農薬でガイドラインの目標 (目標値の 1/10 の濃度においては <25%、目標値の 1/100 の濃度においては <30%) を満たした。以上のことから、今回対象とした 3 農薬の添加回収試験の結果はいずれも良好と評価できる。

なお、脱塩素処理剤の違いによる回収率の差はほとんどみられなかったことから、対象とした 3 農薬については、どちらの脱塩素処理剤も有効と考えられる。

2. 水道水中のホルムアルデヒドの DNPH 誘導体化—液体クロマトグラフ法の検討

2.1. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH の LC 分析条件および誘導体化時間

カラムに逆相系 ODS カラム、移動相にアセトニトリル-水系を用いて、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体の分析条件の検討を行った。その結果、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体のピークはそれぞれ保持時間約 7.5 分および 9.0 分に認められた。両誘導体は比較

的短時間 (10 分以内) で良好な分離が可能であった (図 2-1)。また、この LC 条件下において、精製水の他に、水試料に東京都多摩地域の飲用井戸水や多摩川の河川水を用いた場合にも、妨害ピークは認められず、選択性は高いと考えられる。

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体化に要する時間を調べたところ、室温 10 分で、両誘導体のピーク面積値がプラトーに達したことから、誘導体化に要する時間は室温 20 分にする事とした。

2.2. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体の検量線および定量下限値

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体の検量線の直線性について、濃度範囲 0.005～0.080 mg/L で、それぞれ $r^2=0.998$ および $r^2=0.997$ 以上と良好な結果であった。なお、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体については、空試験の場合に若干のピークが認められ、検量線は原点を通過しなかった。

2.3. 残留塩素除去剤の検討

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドは消毒副生成物であることから、採水から分析開始までの間の増加を防ぐために、採水時に残留塩素を除去する必要がある。そこで、代表的な残留塩素除去剤としてチオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、塩化アンモニウムまたはアスコルビン酸ナトリウムを用いて、本分析法に対する影響を調べた。その結果、塩化アンモニウムは濃度 0.1～100 mg/L で、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体化に影響を及ぼさなかった。ついで、影響が少なかったのはチオ硫酸ナトリウムであったが、EPA method 554 では、チオ硫酸ナトリウムを使用してはならないとされている。その他の還元剤については、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体化に影響を及ぼし、

正確は測定が出来ないことがわかった。

2.4. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドのDNPH誘導体化に及ぼすpHの影響

アルデヒド類とDNPHの反応はpHに依存することが知られている。そこで、本反応系における至適pHをリン酸緩衝液およびリン酸を用いて検討した。その結果、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドともに、pH3以下でDNPH誘導体の生成量が高いことがわかった。また、リン酸の場合には、水試料10mLに対して20%リン酸の添加量が0.05~0.5mLの範囲でDNPH誘導体の生成量がほぼ一定になることがわかった。そこで、20%リン酸の添加量を水試料10mLに対して0.2mLにすることとした。

2.5. DNPH誘導体化-LC法の妥当性評価

水道水質検査の妥当性評価ガイドラインに従い、定量下限値および真度を調べた。空試験により、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドはそれぞれ0.002および0.0008mg/L検出され、定量下限値はそれぞれ0.006および0.002mg/Lであった。

真度については、添加濃度0.01mg/Lにおける回収率を調べた。ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドはそれぞれ94±13%（変動係数14%）および94±12%（変動係数13%）と良好な結果であり、水道水質検査の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことがわかった。

2.6. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの標準液の安定性

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの標準液を遮光下、4℃で保存し、安定性を調べた。その結果、両化合物とも調製から16日後の濃度はほとんど同じであり、保存が可能であることがわかった。

2.7. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH誘導体の安定性

オートサンプラーにより自動分析する場合、測定化合物の安定性を調べる必要がある。そこで、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドをDNPHで誘導体化し、遮光下、4℃に静置し、経時的に残存量を調べた。その結果、ホルムアルデヒド-DNPH誘導体は28時間後に100%、72時間後に80%であった。一方、アセトアルデヒド-DNPH誘導体は徐々に減少し、28時間後に88%、76時間後に76%に減少した。したがって、誘導体化後28時間以内に測定すれば、連続分析時の変動を20%未満に抑えられることがわかった。

2.8. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドのブランク値

市販のDNPHを開封し、冷蔵庫（4℃）に保存したものは、空試験値が徐々に増加し、3ヶ月後には0.005mg/Lを超えるようになった。この状態のDNPHを使用した場合に、濃度依存的にDNPH誘導体が生成されず、その上、検量線の直線性も悪化した。一方、同じ冷蔵庫内に保存してあった同ロットで未開封のものを使用した場合には、空試験値が低く、良好な検量線が得られた。これらのことから、開封したDNPHにおけるブランク値の増加は、冷蔵庫内のホルムアルデヒドとDNPHが反応したためと考えられる。

ホルムアルデヒド分析について、JIS法や環境省の方法では、市販のDNPHをアセトニトリル-水系の溶媒から再結晶により精製したものを使用することとされている。しかし、水道水のホルムアルデヒドの基準値は0.08mg/Lで、その1/10値まで測定すれば良いことから、市販のDNPHをそのまま使用しても差し支えないと言える。しかし、空試験値の3倍が定量下限値を超えるようになった場合には、新しいものに交換、または、再結晶により精製したものを使用する必要がある。

2.9. ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド

-DNPH の LC/MS/MS 分析

以上、LC/UV 法により良好な結果が得られたことから、LC/MS/MS 法による測定条件の検討および精度を調べた。

質量分析計の測定条件について、イオン化法として ESI 法を用いた場合、ポジティブモードでは、ほとんどイオンが認められず、感度はネガティブモードの方が良かった。また、キャピラリー電圧については、2.5 kV で比較的高い感度が得られた。コーン電圧は 40 V、コリジョンエネルギーは 10 V が至適条件であった。以上の検討結果より、LC/MS/MS の分析条件は表 2-1 に示すとおりとした。

LC/UV 法で確立した誘導体化条件に従い試験溶液を調製し、LC/MS/MS 法で分離定量した (図 2-2)。その結果、ブランク値はホルムアルデヒド 0.0017 mg/L、アセトアルデヒド 0.0026 mg/L で定量下限値は LC/UV 法と同程度であった。ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体の検量線の直線性について、濃度範囲 0.005~0.060 mg/L で、それぞれ $\gamma^2=0.998$ および $\gamma^2=0.998$ 以上と良好な結果であった。また、添加濃度 0.01 mg/L で真度および併行精度を調べたところ、それぞれホルムアルデヒド 97% および 4%、アセトアルデヒド 93% および 2% と良好な結果が得られた。水試料に東京都多摩地域の飲用井戸水や多摩川の河川水を用いた場合にも、妨害ピークは認められず、選択性は高いと考えられる。

LC/MS/MS 法は、LC/UV 法と比較し定量下限値や分析精度がほとんど同じであることがわかった。装置の定量下限値としては、LC/MS/MS 法の方が LC/UV 法より低かったが、ホルムアルデヒドのブランク値が数 $\mu\text{g/L}$ であり、これを下げない限り分析法としての感度は LC/MS/MS 法と LC/UV 法は同程度と言える。

3. 水道水中のオキソハロゲン酸の分析法に関する検討

3.1. 臭素酸、塩素酸および過塩素酸イオンの MS/MS 条件

臭素酸イオンの MS/MS スペクトルを図 3-1-1 に示した。臭素には同位体の質量数 79 と 81 が存在しているため、臭素酸イオンの分子イオンピークとして $m/z127$ (左上図) と $m/z129$ (右上図) が検出された。さらに、臭素酸イオンのイオン化に必要なコーンボルテージ (CV) として 40V, イオンの解裂エネルギー (CE) として 15eV を適用した結果、 $m/z127$ および $m/z129$ のプリカーサーイオンは、酸素原子 ^{16}O がひとつ取り除かれて、それぞれ $m/z111$ (左下図), $m/z113$ (右下図) のプロダクトイオンが得られた。 $m/z111$ を定量イオン, $m/z113$ を確認イオンとした。

同様に、図 3-1-2 に塩素酸イオンの MS/MS スペクトルを示した。塩素は質量数 35 と 37 の同位体が存在するため、分子イオンピークとして $m/z83$ と 85 が検出された。CV として 50V, CE として 15eV を与えた結果、それぞれ ^{16}O が脱離して $m/z67$ と 69 が検出され、それぞれを定量イオン, 確認イオンとした。

さらに、図 3-1-3 に過塩素酸イオンの MS/MS スペクトルを示した。塩素酸と同様に、塩素は質量数 35 と 37 の同位体が存在するため、分子イオンピークとして $m/z99$ と 101 が検出された。CV として 50V, CE として 15eV を与えた結果、それぞれ ^{16}O が脱離して $m/z83$ と 85 が検出され、それぞれを定量イオン, 確認イオンとした。

3.2. 臭素酸、塩素酸および過塩素酸イオンの MS/MS クロマトグラム

臭素酸、塩素酸および過塩素酸イオンの MS/MS クロマトグラムを図 3-2 に示した。臭素酸イオン、塩素酸イオンおよび過塩素酸イオンはそれぞれ各 $10\mu\text{g/L}$ で、MS/MS の定量イオンを選択・決定した。横軸は時間、縦軸は強度を示したが、3 物質ともに分離、ピーク形状は良好であった。

3.3. 陰イオン類の影響に関する検討

臭素酸、塩素酸、過塩素酸イオンと各種陰イオン類の LC-MS クロマトグラムを図 3-3 に示した。臭素酸イオンピークでは塩化物イオン、塩素酸イオンでは亜硝酸イオンのピーク、過塩素酸イオンではチオシアン酸イオンピークが近接していることが分かったが、MS クロマトグラムで分離が良好であったことから、臭素酸、塩素酸、過塩素酸イオンの MS/MS による定量には全く問題がないことが分かった。

また、図 3-4 に、臭素酸、塩素酸および過塩素酸イオンの検量線を示した (LC-MS/MS 法)。いずれの対象物質についても相関係数 r は高く、臭素酸で $r = 0.998$ 、塩素酸で $r = 0.998$ 、過塩素酸で $r = 0.994$ であり、濃度範囲 (0~50 $\mu\text{g/L}$) においても直線性は良好であった。

調製した模擬水には、比較的高い濃度の臭化物イオン、塩化物イオン等の陰イオン類が含まれているが、各対象物質に対して妨害ピークは認められず、10 分程度の短時間で分析が可能な条件を確立することができた。

3.4. 妥当性評価結果

臭素酸 1 $\mu\text{g/L}$ 添加時における妥当性評価結果を表 3-1 に示した。いずれの項目も適合条件を満たしていることが分かった。また、塩素酸 60 $\mu\text{g/L}$ 添加時における妥当性評価結果を表 3-2 に示した。いずれの項目も適合条件を満たしていることが分かった。さらに、過塩素酸 2.5 $\mu\text{g/L}$ 添加時における妥当性評価結果を表 3-3 に示した。いずれの項目も適合範囲を満たしていることが分かった。

また、3 物質の測定値について、現行法と本研究で開発した LC/MS/MS 法とで比較し、比の値 (%) を表 3-4 に示した。なお、試料は水道水に臭素酸、塩素酸、過塩素酸を添加した試料で、現行法による測定値、LC/MS/MS 法

による測定値、LC/MS/MS 法と現行法との比を%ものである。

過塩素酸は通知法がないため、IC 法による結果を示したが、いずれも 100%近傍の値を示し、今回開発した LC/MS/MS 法は現行法 (臭素酸、塩素酸のイオンクロマトグラフ法) と比較して同等性を有する分析法であることが明らかとなった。また、1 検体当たりの分析時間が現行法の 1/4 の時間で、迅速な分析が可能となった。

4. 水道原水中のクロムの価数を分離した同時分析法に関する検討

精製水で調製した Cr (III) 100 $\mu\text{g/L}$ と Cr (VI) 1 $\mu\text{g/L}$ の混合液の測定結果を図 4-1 に示した。それぞれの標準品はとして、クロム (III) は硝酸クロム・9 水和物を、Cr (VI) は 100mg/L クロム標準液 (二クロム酸カリウム) を用いた。溶出時間は、Cr (III) は 3.5 分、Cr (VI) は 5.9 分で、十分に分離が可能であった。感度は、面積値として Cr (III) よりも Cr (VI) の方が 2 桁程度高感度であった。しかしながら、Cr (III) 単独の標準液を注入しているにも関わらず、Cr (VI) のピークが検出されるという現象が認められた。そのピーク強度は、Cr (III) 濃度の約 0.14%に相当している。このことについては、現時点では、①クロム (III) の標準品として用いた硝酸クロム・9 水和物の不純物として Cr (VI) が含まれていた、②前処理反応により Cr (III) の一部が Cr (VI) に酸化されたことなどの理由を考えている。このことを考慮した上で、50 $\mu\text{g/L}$ の Cr (VI) の水質基準に対して 1 $\mu\text{g/L}$ の定量は十分可能と考えられた。しかしながら、今後は上記の課題を克服するための検討を行う必要があるものと考えている。具体的には、Cr (VI) のみの定量に特化し、Cr (VI) を高感度に定量できる分離カラムへの変更等も一方策と考えている。

5. GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発

本システムは、市販の全ての GC-MS において標準品を使用せずにデータベース登録物質を迅速かつ確実に同定することを目的としている。そのためには、装置に拘わらず正確な保持時間予測とマススペクトルの再現性が求められる。この2つの課題を解決する手法として、GC-MS の測定条件を定めた上で PTRI を用いた保持時間予測と MS のターゲットチューニングを採用した。また、誤不検出をゼロとし、誤検出の発生を最少に抑える AMDIS のパラメーターを検討した。これらにより短時間で確実にデータベース登録物質を同定することができる。

5.1. 保持時間の予測精度

保持時間は、GC において物質を同定するための必須情報であるが、カラムやオープン温度などの測定条件で容易に変化する。一方、Van らが発表した PTRI は、装置や測定条件への依存性が保持時間に比べて非常に小さいことが知られている⁵⁻¹²⁾。筆者らは装置や測定条件を固定した上で、様々な物質の PTRI をデータベース化することで標準品を用いることなく正確に保持時間を予測できることを明らかにした⁵⁻⁷⁾。本研究でもこの手法を取り入れて複数の機種での保持時間予測精度を検討した。その結果を表 5-5 に示すが、複数の機種を用いた場合でも、データベース登録 PTRI 値と実測 PTRI 値の差は 4 以内と高い再現性を示した。代表的な AMDIS パラメーター(表 5-3)を用いて、PTRI の有無による同定能力の違いを検討した結果、PTRI とマススペクトルを組み合わせることで誤検出が抑制され、同定の確実さが格段に向上したため、正しい PTRI は同定に必須な情報である。なお、カラム長、膜厚、キャリアーガスの線速度を正

確に知ることは難しく、それらが原因でデータベースと実測の PTRI 値の差が大きい場合は、CS に含まれる perylene-*d*₁₂ の PTRI から最適なカラムヘッド圧を求めて正確に PTRI を予測することが可能である⁵⁻⁸⁾。

5.2. MS チューニングの同定への影響

全ての GC-MS で信頼できる結果を得るためには、GC-MS 測定条件を同一にし、性能を一定以上に保つ必要がある。前述のように本システムはカラムやオープン温度を統一することで、異なる機種でも PTRI を確実に予測することができる。しかし、MS のチューニングがデータベース登録時と異なっていれば、マススペクトルが異なったものとなり、誤不検出が発生する可能性がある。本システムでは、MS のチューニング法として US EPA Method 625 で指定する手法を採用している。今回用いた GC-MS-QP2010 Plus および 5975C MSD ではこの MS チューニングを用いることができるが、TSQ Quantum GC ではこのチューニングができないため、DFTPP のマススペクトルは図 5-2 に示すように異なっていた。その結果、データベース登録スペクトルと TSQ Quantum GC で測定したマススペクトルに違いが生じて類似度が低下し、時には誤不検出が生じた。一方、GC-MS-QP2010 Plus と 5975C MSD では、全ての物質が高い類似度で確実に同定された。以上から、MS のチューニングの統一が必要であることが確認された。

5.3. AMDIS パラメーターの同定への影響

本システムは異なる機種でも GC 測定条件と MS のチューニングを統一することで誤不検出の発生を抑制することができるが、同定精度を向上するには、AMDIS の解析パラメーターの最適化が必要である。そこで、グリーンピースの抽出液 1 mL に農薬標準液(50 物質混合)を 1 µg 添加し、添加物質を最も多く同定できる AMDIS パラメーターを検討した。

最も良い結果が得られた(誤不検出が無く、誤検出の発生が最少)AMDIS パラメーターを表 5-3 に示す。最小類似度を示す Minimum match factor は、誤不検出の発生を最小限に抑えることを優先して“40”に設定した⁵⁻¹³⁾。PTRI は高い精度で予測できるため、同定タイムウィンドウ範囲を“5 秒”に設定した。Component width は“7”を基本とし、CS の n-アルカン同定状況によって数値を増減した。Adjacent peak subtraction は同定への影響が小さいため、“Two”に設定した⁵⁻¹⁴⁾。Sensitivity の“High”と“Very High”の同定への影響は小さかったが、Shape requirement を Resolution と同等、もしくはそれ以上の値にすると同定数が減少することが確認された。

次に、農薬混合標準液(97 物質)を 3 種類の野菜抽出液(1 mL)に各 1 µg 添加して、Shimadzu GC-MS-QP2010 で測定し、最適化した AMDIS パラメーターで解析した。その結果を表 5-6 に示す。添加物質の大半を同定できたが、共通する物質で類似度の低下や誤不検出が確認された。これは何らかの夾雑物の影響を受けていることや装置の感度が原因であると考えられた。ピーク強度が小さい場合や妨害ピークが存在する場合など、「きれいな」マススペクトルが得られない場合、Component width や同定タイムウィンドウ範囲の変更及びリバースサーチを採用することで同定精度が向上することが確認された。

5.4. 汎用性の確認

筆者らは、標準品を用いることなくデータベース登録物質を同定・定量できる AIQS-DB を開発した^{5-7,5-8)}。しかし、現在販売されている AIQS-DB は、使用装置毎にソフトウェアを購入しなければならず、普及や登録物質数の拡大を妨げている。本研究では、市販の全ての GC-MS で使用できる汎用同定システムの開発を目的としており、開発システムは正確な保持時間予測とマススペクトルの高い再

現性を備えている。この検討では、標準液と環境試料を複数の機種で測定し、開発システムの同定結果と市販の AIQS-DB の同定結果を比較した。

まず、60 物質の混合標準液(表 5-1)を 3 種の GC-MS で測定した。試料測定時の MS チューニングが異なる TSQ Quantum GC において、データベース登録スペクトルと測定マススペクトルが異なったため、AIQS-DB と AMDIS の両方で pentachlorophenol や trans-nonachlor の類似度が低下して、一部が誤不検出となった。一方、同一の MS チューニングを採用した 2 機種は全ての物質を高い類似度で確実に同定した。したがって、本システムは「きれいな」マススペクトルを得ることで、複数の機種でもデータベース登録物質を迅速かつ確実に同定できることが確認された。

次に、大量の夾雑物を含む底質試料を MS のチューニングを統一した GC-MS-QP2010 Plus および 5975C MSD で測定し、本システムの同定結果とベテラン分析者が AIQS-DB を用いてマニュアル解析した結果を比較した。AMDIS ではピーク強度の小さい物質ほど類似度が低下し、AIQS-DB でのマニュアル同定物質が誤不検出となる傾向を示した。しかし、環境試料中の有害物質は低濃度であり、また、夾雑物による妨害ピークの影響で「きれいな」マススペクトルが得られることは希であるため、本システムの自動スクリーニングの結果は良好と考えられた。

以上より、本システムは機種に拘らず正確な保持時間とデコンボリューション処理による「きれいな」マススペクトルに基づき、データベース登録物質を確実に同定できることを確認した。また、試料に夾雑物を多く含む場合でも本システムの自動スクリーニングは市販の AIQS-DB と同等の同定能力を発揮し、分析者のマニュアル同定を併せることで同定精度の向上が期待できる。

5.5. 実試料への適用例

2 種の実試料(地下水及びネギ)を用いて本システムのパフォーマンスを確認した。地下水試料は北九州市内の緑地で採取し、ジクロロメタン-液々抽出で得た最終試料液を測定及び同定性能を評価した。その結果を図 5-3(A)に示すが、マトリックスの少ない地下水試料では、TNT とその代謝物を確実に同定できた。試料採取地は過去に弾薬庫として使用されていた歴史があり、現在でも TNT やその代謝物によって地下水が汚染されていることが示された。

ネギ試料は、超臨界抽出で得た最終試料液を測定した。地下水試料よりもマトリックスを多く含み、TICC にも多くのピークが出現したが、農薬の Methamidophos や EPN が検出された(図 5-3(B))。以上より、本システムはマトリックスの量に関わらず、データベース登録物質を迅速かつ確実に同定することができ、環境汚染の原因究明や残留農薬などの食品・環境の安全性評価への適用が期待できる。

D. 結論

1. 標準検査法が定められていない農薬類の

LC/MS/MS 一斉分析の検討

本検討によって、水道水の標準検査法が定められていないエチプロール、テフリトリオン、およびフェノキサニルの 3 農薬について、別添方法 20 の対象農薬と併せて LC/MS/MS 分析を行うための分析条件を確立することができた。

また、検討した分析法の妥当性評価を行った結果、いずれの農薬についても各農薬の目標値の 1/10 および 1/100 の濃度において良好な回収率および併行精度が得られた。今後は、開発した分析条件の他機関における妥当性評価試験を行い、室内精度あるいは室間精度について検証を行うとともに、これらの分析条件を、水道事業体をはじめとする水質検査実施機関に普及させることで、水質管理体制の

強化を目指す。

2. 水道水中のホルムアルデヒドの DNP 誘導体化-液体クロマトグラフ法の検討

上記の検討結果をまとめると、つぎのようになる。

(1) DNP 誘導体化および分離時間

誘導体化に係る時間は室温 10 分で、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNP 誘導体は ODS カラムを用い 10 分以内に溶出し、良好な分離が可能であった。また、LC/UV および LC/MS/MS 法ともに、妨害ピークはクロマトグラム上に認められなかった。

(2) 定量下限値

LC/UV 法および LC/MS/MS 法ともに、ホルムアルデヒドの水道水質基準値 0.08 mg/L の 1/10 を測定可能であった。

(3) 検量線

LC/UV 法では、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの水試料中濃度 0.005~0.080 mg/L で良好な直線性 ($r^2 > 0.997$) が得られた。LC/MS/MS 法では、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの水試料中濃度 0.005~0.60 mg/L で良好な直線性 ($r^2 > 0.998$) が得られた。

(4) 真度 (回収率) と併行精度

LC/UV 法および LC/MS/MS 法ともに、添加濃度 0.01mg/L におけるホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの回収率および変動係数は、良好で、妥当性評価ガイドラインの評価目標である回収率 70~120%以内、併行精度 15%未満を満たしていた。

(5) 水試料中に存在する残留塩素の影響

残留塩素はホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの測定を妨害したが、塩化アンモニウ

ムの添加により改善された。

(6)DNPH 誘導体の安定性

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体は遮光下 4℃で経時的に徐々に減少するが、誘導体化後 28 時間以内に測定すれば、変動は 20%以内に入ることがわかった。

以上のことから、DNPH 誘導体化-液体クロマトグラフ法は水道水の妥当性評価ガイドラインの評価目標を満たすことから、告示法別表第 19 の代替法となり得ることが示唆された。また、本法は、誘導体化および誘導体化の分析時間が短いことから、緊急時に必要とされる迅速性の観点からみた場合、別表第 19 よりも優れた方法であると言える。

本法を告示法とするためには、今後、室内精度や室間精度等のバリデーションを実施し、妥当性や汎用性について評価する必要がある。

3. 水道水中のオキソハロゲン酸の分析法に関する検討

本法は、水中からの濃縮・精製操作を行わずに、超高速液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたエレクトロスプレーイオン化 (ESI) のネガティブイオン検出により定量する方法とした。

1. 実試料で LC/MS/MS 法の適用性を検討した結果、3 物質 (臭素酸、塩素酸および過塩素酸) の同時分析が可能で、かつ分析時間はいずれも 10 分以内 (迅速同時分析) であった。
2. 臭素酸、塩素酸、過塩素酸の各定量下限値はそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.05 $\mu\text{g/L}$ で、臭素酸の基準値 10 $\mu\text{g/L}$ (1/20)、塩素酸の基準値 600 $\mu\text{g/L}$ (1/1200)、過塩素酸の目標値 25 $\mu\text{g/L}$ (1/500) に対して低濃度レ

ベルまでの測定が可能であった。

3. 臭素酸、塩素酸、過塩素酸の妥当性評価試験に本法を適用した結果、すべて満足できる良好な結果であった。

4. 本法から得られた結果は、PC-IC 法、IC 法による水道水中臭素酸、塩素酸、過塩素酸の分析結果とも同等性が認められ、実用性の高い分析法であることが確認された。

4. 水道原水中のクロムの価数を分離した同時分析法に関する検討

毒性の異なるクロムの六価と三価を価数分離し、定量する分析方法の確立を目的として、ポストカラム付イオンクロマトグラフを用いて検討した。その結果、若干の課題はあるものの、Cr (III) と Cr (VI) を分離して、6 分以内に両者の検出が可能であった。また、50 $\mu\text{g/L}$ の Cr (VI) の水質基準に対して 1 $\mu\text{g/L}$ の定量が十分可能と考えられた。

5. GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発

本研究では、NIST が提供するマススペクトル検索ソフトの AMDIS とプライベートライブラリーを組み合わせ、市販の全ての GC-MS で使用可能な汎用同定システムを開発した。開発したシステムは GC-MS 測定条件を統一し、保持時間を正しく予測することで GC-MS 機種に拘らず、データベース登録物質を迅速かつ確実に同定することができる。

現在、プライベートライブラリーには約 1,000 物質の情報を登録しているが、震災時などの緊急時モニタリング、水道や土壌、食品などの各種基準に対応するには不十分である。本システムは測定条件を統一すれば、機種を問わず新規物質の登録ができるため、データ

ベース登録物質数の拡大が容易であり、環境・食品の迅速な安全性確認や環境汚染事故の原因究明など、様々な用途に適用することが可能である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 微量化学物質による環境汚染の安全性評価—ノンターゲット分析の必要性と手法—(総説), 門上希和夫, 安全工学, 52, pp155-161, 2013.

2. 学会発表

- 1) 小林憲弘, 久保田領志, 浅見真理, 五十嵐良明: 水道水中のホルムアルデヒド簡易・迅速分析法の妥当性評価. 第 22 回環境化学討論会 (2013.7.31 東京都府中市).
- 2) 小林憲弘, 久保田領志, 塚本多矩, 五十嵐良明: 水道水中のホルムアルデヒド前駆物質の LC/MS/MS 一斉分析法の開発. 第 22 回環境化学討論会 (2013.8.1 東京都府中市).
- 3) 水道水中の農薬類の GC/MS および LC/MS/MS 一斉分析方法の開発. 環境科学会 2013 年会 (2013.9.4 静岡県静岡市).
- 4) 小林憲弘, 久保田領志, 田原麻衣子, 木村謙治, 林広宣, 山田義隆, 小林利男, 舟洞健二, 三枝慎一郎, 古谷智仁, 杉本智美, 五十嵐良明: 固相抽出—GC/MS による水道水中農薬類の一斉分析法の妥当性評価. 平成 25 年度全国水道研究発表会 (2013.10.25 福島県郡山市).
- 5) 小林憲弘, 久保田領志, 五十嵐良明: LC/MS/MS を用いた水道水中のホルムアルデヒド前駆物質の一斉分析法の開発. 第 50 回

全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11.8 富山県富山市).

- 6) 小林憲弘: 水道水質検査方法の開発に関する最近の話題と今後の課題. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11.8 富山県富山市).
- 7) 菱木麻佑, 小杉有希, 鈴木俊也, 保坂三継, 中江 大, 水道水中ホルムアルデヒドの誘導体化—HPLC による分析法, 第 48 回日本水環境学会年会 (仙台)
- 8) 川元達彦, 矢野美穂, 前田絵理, 森田寛子, 鈴木俊也, 三橋隆夫: LC/MS/MS を適用した水道水中臭素酸及び塩素酸の同時分析法の開発, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 講演集 p. 202-203 (2013. 11)
- 9) GC-MS プライベートライブラリーを用いた汎用スクリーニング手法の開発, 川瀬敬三, 門上希和夫, 第 22 回環境化学討論会 (2013.8.1 東京都府中市).
- 10) LC/TOF-MS 用全自動同定・定量データベースシステムの開発—環境水・農産物への適用—, 大窪かお¹, 中園陽子, 宮脇崇, 門上希和夫, 第 22 回環境化学討論会 (2013.8.1 東京都府中市).
- 11) Development of Wide Use GC-MS Database for Non-target Analysis, Kiwao Kadokami* and Keizo Kawase, Asianalysis XII (2013.8.23 福岡市).
- 12) LC/TOF-MS 用全自動同定・定量データベースシステムの開発: 環境試料への適用, 大窪かおり, 平成 25 年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー (2014.1.23 東京都)
- 13) データベースを用いた化学物質の網羅分析法の開発, 門上希和夫, 第 59 回日本水環境学会セミナー (2014.2.3 東京都)
- 14) LC/TOF-MS を用いた水試料中の難揮発性農薬の一斉分析法開発, 伊福知美, 吉