

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. LC/MS/MS を用いたホルムアルデヒドの新規分析法の妥当性評価

さらに、国立医薬品食品衛生研究所において、本分析法の分析条件の最適化を行い、東京都健康安全研究センターの分析条件と比較するとともに、「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」に基づいて、検査方法の妥当性評価を行った。

4. 質量分析計を用いたフローインジェクション

ン分析法による水試料中の非イオン界面活性剤の同定手法の検討

界面活性剤は、分子中に疎水基と親水基を併せ持つ化合物で、液相と固相、液相と液相等の 2 相が接する部分の界面張力の調整等に用いられている。界面活性剤は、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤および両性界面活性剤の大きく 4 種類に分類される。それらの中には PRTR 制度の第一種指定化学物質に指定され、年間出荷量は 100 トンを超えるものもある。界面活性剤のヒトに対する毒性は一般的に低いものの、水道においては、発泡等を起こし、場合によっては利用上の障害を来す等の問題がある。界面活性剤を含む製品は家庭用品をはじめ工業用にも使用されるなど汎用されていることから、これまでにいくつかの河川水等の水道原水の汚染事故が発生しており、現在、水道の水質基準項目に生産量が比較的多い陰イオン界面活性剤や非イオン界面活性剤が含まれている。

水道の水質基準の陰イオン界面活性剤の分析法については、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の別表第二十四 (以下、LC-Flu 法) により測定することと定められている。この方法では、水道水中の陰イオン界面活性剤、炭素数 10 から 14 の直鎖アルキルベンゼン (以下、LAS)、を固相抽出により抽出・濃縮した後、蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフで分析しており、5 種類の LAS を個別に分離定量することが可能である。しかし、陰イオン界面活性剤には、LAS の他にアルキル硫酸塩 (以下、AS) やポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩 (以下、AES) 等があるが、LC-Flu 法では、それらを測定することができない。

一方、非イオン界面活性剤の分析法については、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の別表第二十八の一 (以下、PAR-UV 法) または、十八の二 (以

下、PAR-LC-UV 法) により測定することと定められている。PAR-UV 法では、水試料中の非イオン界面活性剤を固相抽出により抽出後、トルエンで溶出し、トルエン層でコバルトイオンと非イオン界面活性剤の錯体を形成させ、PAR 試薬でコバルトイオンを水層に逆抽出し、水層のコバルト-PAR 錯体を比色法により定量することを原理としている。また、PAR-LC-UV 法は、試験溶液の調製は基本的に PAR 法と同じで、検出感度を高めるために、コバルト-PAR 錯体を LC で分離し、UV で定量する改良法である。PAR-UV 法および PAR-LC-UV 法ともに、コバルトイオンと錯体を形成する化学物質を網羅的に捕えることが可能であり、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (以下、AE) の他に、ノニルフェノールエトキシレート (以下、NPE) やオクチルフェノールエトキシレート (以下、OPE) 等の非イオン界面活性剤も同時に検出されるが、それらを分別定量することは不可能である。また、比色法であることから、非イオン界面活性剤以外の化学物質が誤検出される可能性もある。

上記の 2 つの基準項目の測定法における問題点を解決するための一つの方法として、フローインジェクション分析 (以下、FIA) 法が挙げられる。FIA 法は、比較的新しい自動分析手法の一つであり、試料を直接または反応試薬を細管に通して混合・反応させ、下流部に設置した検出器で定量する方法である。FIA 法は、分離カラムを使用せずに、試験溶液中の化学物質を定性・定量することが可能であることから、迅速かつ簡便で高精度な分析手法と言える。FIA 法を水道における発泡汚染事故等の危機管理時の原因物質の迅速な同定に適用するため、平成 26 年度は、非イオン界面活性剤と水溶性ポリマーを分析対象とし、検出器に選択性や感度の高い質量分析計を用いたフローインジェクション分析 (FIA/MS) 法について検討した。平成 27 年

度は、PRTR 制度の第一種指定化学物質に指定されている界面活性剤で、前年度に対象としなかったものを分析対象とし、FIA/MS 法の適用について検討することを目的とした。

5. 水道水中のオキソ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 (HBrO_3) や塩素酸 (HClO_3) 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 (HClO_4) は、米国では環境水への汚染事例 (California Department of Health Services)、日本では飲料水や食品中での検出事例 (高附ら, 2009 ; 小坂ら, 2007) 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 (National Research Council, 2005 ; 前田ら, 2011)。

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。

6. 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 (日本薬学会, 2010; 日本水道協会, 2011)。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。

7. 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。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、規制物質以外で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 (馬場, 2012)。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 (環境省, 2013)。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テトラミンの排出がある (小林ら, 2013; 厚生労働省, 2013)。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 (NIST) 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 (門上ら, 2004; Kadokami et al., 2005)。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 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。

8. LC-高分解能 MS を用いたターゲットスク

リーニング手法の検討

世界で使用されている化学物質の数は70,000～100,000 物質に登ると推定されている(UNEP, 2006)が、環境濃度が測定されている物質は非常に限られている。日本ではわずか53 物質が、環境基準項目と要監視項目としてモニタリングされているだけであり、環境や水道水の安全性評価、特に汚染事故や災害時の2次被害などの防止には不十分である。このような事態に対応するには、可能な限り多数の物質をできる限り早く分析することが求められる。しかし、従来の個別分析法でこれらに対応しようとすれば、多数の分析法を用いる必要があり、長時間、高コスト、大量の資源の使用と廃棄物の発生等の問題がある。この問題を解決する手段として、迅速かつ網羅的に濃度把握が可能な高効率なスクリーニング分析が、非常に有効な手法である。

このような背景の元、我々はスクリーニング分析用に GC/MS 向け自動同定定量データベースシステム(AIQS)を開発(門上ら, 2004 ; Kadokami et al., 2005)し, AIQS の性能を活かした水質試料の前処理法を開発した(陣矢ら, 2011 ; Jinya et al., 2013)。本分析法では、半揮発性化学物質を1 時間に約 1000 種分析することが可能であり、環境水の分析に適用してその有効性を確認している(Kadokami et al., 2009; Hank et al., 2013)。

さらに、平成24 年度には LC-TOF-MS を用いて GC/MS 分析に適していない約 300 種の化学物質(LC 適用物質, LOCs)を一斉に測定する LC-TOF/MS 用 AIQS を開発した。今年度は開発した LC-TOF/MS 用 AIQS の性能を最大限に活かせる水質試料用のスクリーニング分析法(試料前処理法)の開発を目的として研究を実施した。

GC/MS および LC-TOF/MS の2 種のスクリーニング分析を用いれば、水中に存在する約 1200 物質を ppt レベルで検出することができ、環境水や水道水の安全性評価に非常に有効で

ある。

B. 研究方法

1. 水道水の検査対象農薬の LC/MS/MS 一斉分析法の検討

1.1. 対象物質

本研究では、対象農薬リスト掲載農薬類(120 物質)、要検討農薬類(16 物質)、その他農薬類(84 物質)、除外農薬類(14 物質)のうち、現在の標準検査法では、固相抽出による前処理後に GC/MS や LC/MS で分析している農薬および標準検査法のない農薬(合計 140 農薬)を対象とした。

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

各農薬の標準品は、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 μL 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）。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 8050, 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^{2,3)}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。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。

各農薬の目標値と検査試料水中の各農薬の添加濃度を示した。

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 μL 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、必要に応じて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必要に応じて差し引いた後、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。

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. 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。

2.2. 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 とな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 0.2mL、DNPH 溶液 0.5mL 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。

2.3. 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、上記に示す検水の濃度範囲を超えないようにした。以下、上記と同様に操作して、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。

2.4. 空試験

精製水 10 mL を採り、以下、上記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。

3. LC/MS/MS を用いたホルムアルデヒドの新規分析法の妥当性評価

3.1 前処理条件の最適化

水試料 10 mL を採り、20%リン酸 0.2 mL および 0.2%DNPH 溶液 0.5 mL を加えて混合する。室温で 20 分間静置後、一定量採り、試験溶液とした。上記で添加するリン酸および 0.2%DNPH 溶液は、0.1~0.5 mL および 0.25~1.25 mL の範囲でそれぞれ変動させ、クロマトグラムに変化がみられるかどうかについて検討した。また、0.2%DNPH 溶液の保存期限についても確認試験を行った。

3.2 LC/MS/MS 分析条件の最適化

東京都健康安全研究センターによって得られた LC/MS/MS 分析条件を参考に、ホルムアルデヒド-DNPH 誘導体およびアセトアルデヒド-DNPH 誘導体のモニターイオンや移動相等の LC/MS/MS 分析条件の最適化を行った。

最適化した分析条件を用いて、試験溶液の一定量を LC/MS/MS 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、作成した検量線から検水中の対象物質の濃度を算定した。

3.3 妥当性評価

最適化した分析条件において、本分析法の妥当性評価を行った。水道水試料を、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、1%塩化アンモニウム溶液を水試料100 mLあたり0.5 mL加えて残留塩素を除去した。

上記の水道水に、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドをホルムアルデヒドの基準値(0.08 mg/L)および基準値の1/10(0.008 mg/L)となるように各物質の標準溶液を添加した試料を5つずつ調製し、本分析法により測定を行った。添加濃度に対する定量値の割合を回収率として算出し、繰り返し試験における併行精度を求めた。

4. 質量分析計を用いたフローインジェクション分析法による水試料中の非イオン界面活性剤の同定手法の検討

4.1 試薬・器具

非イオン界面活性剤として、ノニルフェノールエトキシレート(NPE, EO=1-15)、オクチルフェノールエトキシレート(OPE, EO=1-10)、ドデシルアルコールエトキシレート(AE1-20, EO=1-20)は林純薬工業製、ドデシルアルコールエトキシレート(AE7, EO=7)、水溶性ポリマーとして、ポリエチレングリコール(PEG)-300、PEG-700、PEG-1000、ポリプロピレングリコール(PPG)-400、PPG-600およびPPG-1000は和光純薬工業製を用いた。固相抽出装置はセップパックコンセントレーター(日本ウォーターズ製)を用いた。

4.2 試験溶液の調製

PAR法に準じて、FIA/MSおよびLC/MS用の試験溶液を調製した。すなわち、予めメタノール5 mL、ついで精製水5 mLでコンディショニングしたエムポアディスクEZカートリッジRP-1(住友スリーエム製)に、水試料1 Lを流速50 mL/minで通水した。窒素ガス

で固相を乾燥後、トルエン5 mLで溶出し、溶出液を窒素気流下で乾固した後、メタノール1 mLに溶解し、これを試験溶液とした。

4.3 FIA/MS および LC/MS

PAR法陽性物質の定性では、FIA/MSを使用し、その分析条件は、つぎのとおりであった。

【FIA】HARVARD Apparatus PumpII:50μL/min

【MS】イオン化法:ESI+、キャピラリー:3 kV、コーン電圧:50 V、イオン源温度:120°C、脱溶媒温度:350°C

また、PAR法陽性物質の成分組成を調べるためにLC/MSを使用し、装置は2690セパレーションモジュールおよびZMD(ウォーターズ)で構成した。分析条件は、つぎのとおりであった。

【LC】カラム:Inertsil PH(2.1x250 mm, 5 μm, ジーエルサイエンス製)、カラムオーブン温度:40°C、移動相:メタノール-水(60:40)ーリニアグラジエント,20 minーメタノール-水(100:0)ー15 min保持、流速:0.2 mL/min

【MS】イオン化法:ESI+、キャピラリー:3 kV、コーン電圧:50 V、イオン源温度:120°C、脱溶媒温度:350°C

5. 水道水中のオキソハロゲン酸の分析法に関する検討

5.1. 分析方法の検討

5.1.1 対象物質:オキソハロゲン酸

分析法の開発を対象としたオキソハロゲン酸は、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-¹⁸Oを用いた。

5.1.2. 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 (φ4.6mm×75
mm, 6μm, 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℃

注入量：20μL

[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)

5.1.3. 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 5μL 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。

5.1.4. 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 1μg/L、塩素酸 60μg/L および過塩素酸 2.5μg/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。

5.1.5. 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。

6. 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

6.1. 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℃ 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。

6.2. 原理

イオンクロマトグラフ法による遷移金属イオン (Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 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 M^{3+} のイオンに対する錯体は、 $\text{M}(\text{PDCA})_2$ 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⁴³⁾。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、 $\text{Cr}(\text{PDCA})_2$ 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 (CrO_4^{2-}) 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⁴⁴⁾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。

6.3. 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 NaHPO_4 /
10 mmol/L NaI / 50 mmol/L CH_3COONa / 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 H_2SO_4

検出器 : UVD-510 UV-Vis 検出器 (520nm)

注入量 : 250 μL

7. GC-MS 向け汎用未知物質同定システムの開発

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 7-1 に示す。

7.1. 試薬

GC-MS 装置性能評価標準液(CS)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 $\mu\text{g/mL}$ に調製した。

7.2. 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、測定条件を統一し、データベース登録および試料測定を行った。

7.3. 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 2.71 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 (Kadokami et al., 2005), 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。

7.4. 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, 測定可能な物質である。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。

7.5. 登録物質の同定及び新規物質登録手順

7.5.1. データベース登録物質の同定手順

GC-MS の測定条件を設定した後, 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。

7.5.2. 新規物質のデータベース登録手順

GC-MS の測定条件を設定し, 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。

8. LC-高分解能 MS を用いたターゲットスクリーニング手法の検討

8.1 試薬

分析用農薬は関東化学株式会社および林純薬工業株式会社の農薬混合標準溶液を用いた。分析用医薬品は, 関東化学株式会社, 東京化成工業株式会社, 和光純薬工業株式会社, フナコシ株式会社, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Fluka, LKT laboratories, Sigma-Aldrich, Santa Cruz Biotechnology から購入した。各標準品をメタノール又はアセトニトリルに溶解して標準原液 (1000 µg/mL) を調製し, -20°C で保存した。標準原液をメタノールで希釈し, 実験用の混合標準液を調製した。サロゲートまたは内標準物質として使用した重水素ラベル化体は, 関東化学株式会社, 林純薬工業株式会社, Wellington Laboratories, Cambridge Isotope Laboratories, Sigma-Aldrich から購入し, 対象物質と同様に混合標準液を調製した。LC/MS 用メタノールとアセトニトリル, および残留農薬試験・PCB 試験用ジクロロメタンは, 関東化学株式会社製を用いた。HPLC 用 1mol/l

酢酸アンモニウム溶液は、和光純薬工業株式会社製を用いた。固相は Waters Sep-Pak PS-2, Oasis HLB Plus および Sep-Pak AC2(全て Nihon Waters)を使用した。Whatman GMF-150 ガラス繊維ろ紙(47 mm)は、GE Healthcare Japan から購入した。固相抽出装置(GL-SPE vacuum manifold system)は、GL サイエンスから購入した。HPLC 用精製水は、水道水を Milli-Q-Plus 超純水システム (Millipore) で精製して使用した。LC-TOF/MS は、アジレント製 (Agilent 1200 HPLC, 6220 MSD) を用いた。全てのガラス器具およびプラスチック器具は、洗剤と精製水で洗浄後、使用前にメタノールで洗浄して使用した。

8.2 モデル化合物

本研究の対象物質である AIQS 登録 LOCs は、表 8-1 に示した LC-TOF/MS 条件および ESI ポジティブモードで測定可能な物質である。AIQS 登録 LOCs の中から、Log Pow -2.20 から 8.53 の極性から構成される 257 物質をモデル化合物として用いて分析法を検討した。なお、抽出固相の選定では 128 種の農薬 (log Pow -2.20 ~5.03) を使用した。

8.3 抽出固相の検討

検討した 5 種の固相は使用する前にジクロロメタン 10 mL, メタノール 10 mL および精製水 20 mL を通水してコンディショニングした。

8.4 固相抽出

水試料(200 mL)にリン酸緩衝液(1 M, pH 7.0)とサロゲート物質を加えた後、ガラス繊維ろ紙(47 mm, GF/C)でろ過した。ろ紙はメタノール 3 mL で 2 回超音波抽出した。ろ液は上に Sep-Pak PS2 (または Oasis HLB Plus), 下に Sep-Pak AC2 を直列に接続した固相に毎分 10 mL の速度で吸引通水した。通水後、窒素ガスを 40 分流して脱水し、AC2 側からメタノール 5 mL, 続いてジクロロメタン 3 mL を流して溶出した。溶出液をろ紙抽出液と併せ、窒素気流で 200 μ L まで濃縮した。濃縮液に内標準溶液を加え (40 μ L), 続いてメタノールを加えて 400 μ L とした後、シリンジフィルター(Millipore Milliex LG, Merck Millipore)でろ過して最終試料液とした。

8.5 LC-TOF/MS 測定 (同定と定量)

LC-TOF/MS 測定条件を Table 1 に示す。試料はフラグメント電圧を変えて (100 V および 100, 150, 200, 250 V の 4 電圧) 2 回測定した。100V の測定結果は同定と定量に用い、4 電圧での測定データは、100V で検出された物質のフラグメントイオンを確認することで確実な同定に用いた。

モデル化合物とサロゲート物質の定量は、内標準法で行った。検量線は 9 段階の濃度 (0, 0.004, 0.010, 0.020, 0.040, 0.10, 0.20, 0.40, 1.0 μ g mL⁻¹) を調製し、内標準 (methomyl-d3, pirimicarb-d6 および imazalil-d5) を各 0.20 μ g/mL になるよう添加し、LC には 2 μ L を注入した。

C. 結果と考察

1. 水道水の検査対象農薬の LC/MS/MS 一斉分析法の検討

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 1-1 に示す。また、140 農薬を 10 μ g/L に調製した混合標準液を LC/MS/MS に 100 μ g/L 注入して得られた MRM クロマトグラムを図 1-1 に示す。溶出時間が早い数農薬についてはピーク形状が良好ではなかったが、その他の農薬については概ね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

いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、全

体として良好な回収率および併行精度が得られた。

アスコルビン酸ナトリウムで脱塩素処理した水道水を用いた場合は、目標値の 1/100 超 1/10 以下の濃度では 117 物質が、目標値の 1/100 以下の濃度においても 105 物質が妥当性評価ガイドラインの真度 (70~120%) および併行精度 ($\leq 25\%$ あるいは $\leq 30\%$) の目標を満たした。

チオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理した水道水を用いた場合は、目標値の 1/100 超 1/10 以下の濃度では 114 物質が、目標値の 1/100 以下の濃度においても 105 物質が妥当性評価ガイドラインの真度および併行精度の目標を満たした。

いずれの脱塩素処理剤を用いた場合も、ガイドラインの目標を満たす回収率が得られなかった農薬が 6~9 物質、測定中に徐々に感度低下がみられ定量が困難であった物質が 7 物質、定量下限値未満となった物質が 10~22 物質あり、これらの物質数は脱塩素処理剤の違いによらず、ほぼ同じであった。

ただし、一部の農薬については、脱塩素処理剤の違いにより異なる結果となった。アスコルビン酸ナトリウムを用いた場合は、エトフェンブロックスおよびフラザスフロンの回収率が低く、またカルバリル (NAC) が、測定中の感度低下により定量が困難であった。

一方、チオ硫酸ナトリウムを用いた場合は、チオジカルブおよびメタミドホスの回収率が低く、ベンフラカルブが測定中の感度低下により定量が困難であった。

上記の 6 農薬は、脱塩素処理剤との反応によって分解あるいはイオン化阻害を受けたことが考えられるが、その原因については明らかにすることはできなかった。

本法を用いて一斉分析を行う場合は、測定対象とする農薬によって脱塩素処理剤を使い分ける必要があると考えられる。

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。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 (U.S.EPA, 1992) 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、正確な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0.0008 mg/L検出され、定量下限値はそれぞれ0.006および0.002 mg/Lであった。

真度については、添加濃度0.01 mg/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0.005 mg/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 で比較的高い感度を得られた。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。

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。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 $r^2=0.998$ および $r^2=0.998$ 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. LC/MS/MS を用いたホルムアルデヒドの新規分析法の妥当性評価

3.1 前処理条件の最適化

20%リン酸の添加量については、100, 200, 500 μL 添加時のクロマトグラムを比較したが、いずれも違いはみられなかったため、東京都健康安全研究センターの検討と同じ 200 μL 添加を選択した。

0.2%DNPH 溶液の添加量については、250, 500, 1000, 1250 μL 添加時のクロマトグラムを比較したところ、250 μL と 500 μL 添加のクロマトグラムに違いはみられなかったが、1000 μL 以上添加でベースライン上昇とピーク形状が悪化し、DNPH 溶液を大量に添加すると、クロマトグラムに影響がみられることがわかった。そのため、最終的に 0.2%DNPH の添加量は、500 μL 添加を選択した。

なお、0.2%DNPH 溶液の調製後 1 ヶ月経過後と調製直後の溶液を用いた試験結果を比較したところ、ブランク値に違いはみられなかったことから、保存状態が良ければ 1 ヶ月程度は使用可能と判断した。

3.2 LC/MS/MS 分析条件の最適化

最適化し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 LC/MS/MS 分析条件を表 3-1 に示す。また、この分析条件における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/MS/MS クロマトグラムを図 3-1 に示す。

東京都健康安全研究センターと国立医薬品食品衛生研究所で、使用している装置のメ

一カー（および機種）および分離カラムに違いがあったものの、概ね同じ最適分析条件が得られた。

移動相組成については、精製水：アセトニトリルの比率を 30～70% で検討したところ、精製水：ACN = 50:50 の時、ピーク強度が最大となったため、この組成を採用した。

3.3 妥当性評価

0.005～0.1 mg/L の範囲で良好な直線性および再現性が得られており、測定上の問題はみられなかった。

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドともに、いずれの添加濃度においても良好な回収率と併行精度が得られており、本分析法はホルムアルデヒドの基準値の 1/10 の濃度まで、高精度に分析可能であることが示された。

4. 質量分析計を用いたフローインジェクション分析法による水試料中の非イオン界面活性剤の同定手法の検討

PAR 法で陽性となり得る物質である PEG、PPG、OPE、NPE および NPEC 等 9 種を用いて、PAR 法による発色の程度を調べた。非イオン界面活性剤および水溶性ポリマーともに、一成分が 10 μ g になるように添加した。AE (C12,EO=7) と比較した場合、発色の程度は、NPE、OPE、PPG、PEG の順で強く、PAR 法では、AE1-20 だけでなく、PPG、OPE、NPE も陽性になった。真柄ら (1999～2001) の報告では、OPE や NPE も PAR 法で陽性になるが、LAS や PEG は環境中の濃度レベルではほとんど影響を及ぼさないとしている。本研究で、PAR 法により PPG も AE1-20 と同程度の強さで陽性を示すことが明らかになった。

FIA/MS 法により、非イオン界面活性剤等を測定した。非イオン界面活性剤および水溶性ポリマーの濃度は 10 mg/L メタノール溶液を用いた。本 FIA/MS の条件下では、各化合物のスペクトルは Na⁺ 負荷体として検出され

た。AE1-20 の FIA/MS スペクトルは m/z 341-1090 の範囲で認められ、各ピーク間の差は m/z 44 であった。これは、ポリオキシエチレン基に由来するものと考えられる。PEG 等の FIA/MS スペクトルは、PEG-300、PEG-700 および PEG-1000 で、それぞれ m/z 217-525、m/z 349-833 および m/z 261-1142 の範囲で認められた。アルキルフェノール等の FIA/MS スペクトルについては、OPE および NPE が、それぞれ m/z 317-670 および m/z 375-904 の範囲で認められた。これら化合物は、AE1-20 と同様に、いずれの化合物も分子内にポリオキシエチレン基を有していることから、各スペクトルの差は m/z 44 であった。これに対して、PPG 等の FIA/MS スペクトルについては、PPG-400、PPG-600 および PPG-1000 で、それぞれ m/z 273-680、m/z 380-1028 および m/z 409-1144 の範囲で認められた。各ピーク間の差は m/z 58 で、これはポリオキシプロピレ基に起因するものと考えられる。以上の結果から、FIA/MS スペクトルの各ピークの m/z を比較することにより、AE1-20 と他の化合物とを区別することが可能であることが分かった。

水試料を濃縮操作なしで FIA/MS で測定した場合、対象化合物の FIA/MS スペクトルを検出するためには 0.5 - 1 mg/L の濃度が必要である。これは非イオン界面活性剤の発泡の最低濃度 0.02 - 0.05 mg/L よりも高いことから、実際の発泡事故の場合には濃縮操作が必要である。そこで、PAR 法に採用されている固相カラムによる濃縮を行って得られた試験溶液を FIA/MS 法でスペクトルを測定する方法について検討した。東京都多摩川羽村堰付近の河川水に各非イオン界面活性剤を最終濃度が 0.02 mg/L になるように添加し、固相抽出後の濃縮液を FIA/MS で分析した。非イオン界面活性剤等を添加していない羽村堰の河川水からは m/z 497, 363 および 242 が検出されたが、その他に m/z 200 以上では特に大きなピークは認められなかった。非イオン界面活

性剤等を添加した場合、PPG-1000 は回収率は 10%程度であったが、その他のものについては、十分な感度で測定可能で、固相抽出を行わない場合と同じような FIA/MS スペクトルが得られた。

東京都内の専用水道（病院）において、地下水を飲用水等の生活用水に利用する目的で、井戸を掘削し、水道法に基づく水質検査を実施したところ、PAR 法による非イオン界面活性剤が基準値を超えて検出されたことから、本方法を用いてその汚染物質を同定することとした。

当該施設の原水および浄水を PAR 法の比色法により分析した時の値は、それぞれ 0.052 および 0.055 mg/L であった。本施設では浄水処理として塩素処理を行っているが、汚染物質は、残留塩素では分解されないものであると推察された。

当該施設の原水から調製した試験溶液を FIA/MS 法によりマススペクトルを測定した。そのピークは m/z 331~969 に認められ、各ピークの差は 58 であった。非イオン界面活性剤の PAR 法による分析では、コバルトイオンと錯体を形成する物質は陽性となり得る。そこで、ポリオキシエチレン基を分子内に有している非イオン界面活性剤（NPE、OPE）、水溶性ポリマー（PEG、PPG）の水溶液を調製し、FIA/MS 法によりマススペクトルを測定した。当該施設の原水および浄水から調製したマススペクトルは、最大ピークは m/z 622 で、スペクトルパターンは PPG と良く一致した。一方、OPE、NPE および AE1-20 のスペクトルパターンと異なっており、PAR 法に陽性となった汚染物質は、PPG であると同定された。

PPG の組成比を調べるために、当該施設の原水および浄水から調製した試験溶液を LC/MS に注入し、成分分析を行った。原水および浄水ともに、PPG と同じ保持時間にピークが認められ、各ピークのマススペクトルもほとんど同じであった。一方、その他の界面

活性剤については、保持時間とマススペクトルが一致するピークは認められなかった。

以上の結果から、当該施設の原水や浄水中に混入したものは、PPG（平均分子量 600）であると考えられる。

これまでに、水道水源である河川水の PPG による汚染事例が報告されている。また、PEG や PPG のような水溶性ポリマーは、井戸の掘削時に発泡剤としてされる場合がある（佐野，1997）。そのため、新設井戸の場合には、PAR 法により非イオン界面活性剤が検出されることがあることから、掘削時に使用したポリマーが検出されなくなるまで捨水等を行い、その後使用を開始する必要があると言える。

平成 27 年度は、平成 26 年度に対象としなかった非イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤等について、ZMD を用いて FIA-MS 法を検討した。

HDTMAC は、ESI⁻ではマススペクトルが得られず、ESI⁺で測定可能であった（図 4-1）。HDMAC は塩化物塩であり、検出されたイオンは m/z 284 であることから、塩化物イオンが外れた 4 級のアンモニウムイオンの形で検出されることがわかった。

AO は、分子量が 229 であり、ESI⁺では m/z 230 と m/z 252 にスペクトルが検出され、それぞれプロトンが負荷した $[M+H]^+$ イオンおよび $[M+Na]^+$ イオンであると推察される（図 4-1）。また、 m/z 460 および m/z 482 のスペクトルは、それぞれ二量体 $[2M+H]^+$ および $[2M+Na]^+$ と考えられる。

AS については、炭素数 12、14 および 16 の分子量が、それぞれ 288、316 および 344 で、いずれもナトリウム塩である。ESI⁻では各 AS ともナトリウムイオンが外れた形で検出された（図 4-2）。

AES については、ポリオキシエチレン基が 1 から 3 までのものを ESI⁻で測定した結果を示す。いずれも m/z 265 のイオンが最も強度が高く、オキシエチレン基の重合数が増えるこ

とに $m/z44$ 増加したスペクトルが観察された (図 4-3)。

LAS については、河川水に混合標準液を添加し、FIA-MS 法により測定した (図 4-4)。その結果、河川水 A および B に LAS を添加した場合、添加濃度 1 mg/L においては十分に検出可能であることがわかった。しかし、水道における LAS の基準値は 0.2 mg/L 以下であることから、定量下限値をその $1/10$ とすると、FIA-MS 法では、 100 倍ほどの濃縮が必要であると考えられる。

以上の ZMD における測定結果を、表 6 に示す。スペクトルパターンの機種依存性に関して、AO の場合、Xevo TQD で FIA-MS 分析したところ、ZMD で観察された $m/z460$ のイオンは非常に小さかった。したがって、MS の装置により、検出されるイオンは変わらないが、各物質のスペクトルパターンは若干異なることが予想される。

FIA-MS 法の市販の家庭用洗剤への適用について検討した。市販の家庭用洗剤 10 mg/L メタノール溶液を調製し、Xevo TQD を用いて FIA-MS 法で分析した (図 4-5)。当該洗剤の成分表の表示は界面活性剤 31% (AO, AES, AE, AS) であった。ESI⁻では $m/z265$, 309 , 353 および 397 のイオンが認められ、標準物質の AES とスペクトルパターンが良く一致していることがわかった。また、ESI⁺では、 $m/z230$ イオンが観察され、これは標準物質の AO のスペクトルパターンと一致した。

以上より、今回対象とした界面活性剤については、水中の濃度が 1 mg/L 程度であれば、前処理をすることなく検出が可能であることが示唆された。ただし、河川水等では、浮遊物質などが含まれる場合があることから、遠心分離等の前処理をする必要があると考えられる。また、日本の河川水中の界面活性剤のモニタリングによれば、検出濃度は最高でも $100\text{ }\mu\text{g/L}$ を超えていないことから、そのレベルでの分析をするためには、今後、前処理法

の検討が必要である。

5. 水道水中のオキシハロゲン酸の分析法に関する検討

5.1. 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 5-1 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 40 V 、イオンの解裂エネルギー (CE) として 15 eV 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 5-2 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 50 V 、CE として 15 eV 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 5-3 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 50 V 、CE として 15 eV 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。

5.2. 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 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ で、MS/MS の

定量イオンを選択・決定した。3物質ともに分離、ピーク形状は良好であった。

5.3. 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イオンの MS/MS クロマトグラムを図 5-4 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、いずれの対象物質についても検量線の相関係数 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 ($0 \sim 50 \mu\text{g/L}$) 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。

5.4. 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 5-1 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 5-2 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 5-3 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。

6. 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 6-1 に示した。それぞれの標準品として、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）を用いたが、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。

7. 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。

7.1. 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 (Van Den Dool et al., 1963)。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精確に保持時間を予測できることを明らかにした⁵⁾。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。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⁾。

7.2. 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。

7.3. 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 (Ragnar Norli et al., 2010)。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 (Meng and Szelewski, 2010)。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。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。

7.4. 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。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。

7.5. 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性能を確認した。地下水試料は北