

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MSを用いた4-メチルベンジリデンカンファーの分析法の検討—

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MSを用いた4-メチルベンジリデンカンファールの分析法の検討—

Study for Analysis Method of 4-Methylbenzylidene camphor in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

環境試料(水質中)の4-メチルベンジリデンカンファールの分析法について検討した。分析法は固相カートリッジで濃縮後、固相をアルカリ、酸、有機溶媒の順に洗浄した後、アセトニトリルで溶出し、LC/MS/MS(SRM法)で測定する方法とした。対象物質は紫外線吸収剤でもあり、紫外線による構造異性体化が起こるため、注意が必要であった。開発した分析法では、要求感を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。環境試料を分析したところ、いずれの物質も検出されなかった。

[キーワード: 4-メチルベンジリデンカンファール, LC/MS/MS法, 紫外線吸収剤]

[Key words: 4-Methylbenzylidene camphor, LC/MS/MS, Ultraviolet absorber]

1 はじめに

4-メチルベンジリデンカンファールは紫外線を吸収する能力が高く、日焼け止めや化粧品に用いられているが、内分泌かく乱作用の可能性も想定されている物質であり、その環境中での実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、岡山県に分析法の開発が委託されたことから、当該物質をLC/MS/MSを用いて分析する方法を検討するとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

4-メチルベンジリデンカンファール

: AccuStandard製(輸入元: 和光純薬工業)

4-メチルベンジリデン-d₄カンファール

: CDN Isotopes製(輸入元: セントラル薬品)

ベンザルカンファール

: MP Biomedicals製(輸入元: 和光純薬工業)

塩酸

: 1 mol/Lに調製済みの市販品

水酸化ナトリウム水溶液

: 1 mol/Lに調製済みの市販品

アセトニトリル, メタノール

: LC/MS用 和光純薬工業製

精製水

: ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

固相カートリッジ

: Waters製 Oasis HLB Plus LP (225mg)

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム: Atlantis T3 150mm×2.1mm, 3 μm (Waters製)

移動相: A (5mM酢酸アンモニウム水溶液)

: B (アセトニトリル)

0~0.1min A : B = 80 : 20

0.1~9min A : 80→2 B : 20→98 linear gradient

9~20min A : B = 2 : 98

20~20.5min A : 2→80 B : 98→20 linear gradient

20.5~33min A : B = 80 : 20

流量: 0.2mL/min

カラム温度: 40℃

注入量: 5.0 μL

(MS条件)

使用機種: Micromass Quattro micro API

キャピラリー電圧: 3.0kV

ソース温度: 100℃

デゾルベーション温度: 500℃

コーンガス流量: 50L/hr

デゾルベーションガス流量: 600L/hr

イオン化法

- : ESI Positive (4-メチルベンジリデンカンファー)
- : ESI Positive (4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : ESI Positive (ベンザルカンファー)

コーン電圧

- : 30V (4-メチルベンジリデンカンファー)
- : 30V (4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : 30V (ベンザルカンファー)

コリジョンエネルギー

- : 10eV (255.17>255.17のみ), 20eV (それ以外)
(4-メチルベンジリデンカンファー)
- : 10eV (259.19>259.19のみ), 20eV (それ以外)
(4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : 10eV (241.16>241.16のみ), 20eV (それ以外)
(ベンザルカンファー)

モニターイオン

- : 255.17>255.17, 255.17>237.16, 255.17>227.18,
255.17>212.12, 255.17>195.12, 255.17>185.13,
255.17>171.12, 255.17>157.10, 255.17>145.07,
255.17>119.09, 255.17>111.12, 255.17>97.10
(4-メチルベンジリデンカンファー)
 - : 259.19>259.19, 259.19>241.18, 259.19>231.20,
259.19>216.14, 259.19>199.14, 259.19>189.15,
259.19>175.14, 259.19>161.12, 259.19>149.09,
259.19>123.11, 259.19>111.12, 259.19>97.10
(4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
 - : 241.16>241.16, 241.16>223.15, 241.16>213.16,
241.16>198.10, 241.16>181.10, 241.16>171.12,
241.16>157.10, 241.16>143.09, 241.16>131.05,
241.16>111.12, 241.16>105.07, 241.16>97.10
(ベンザルカンファー)
- (下線部は本分析で定量に用いたモニターイオン)

2.3 分析法

図1に示す分析法について検討した。

水質試料100mLに10ng/ μ Lのサロゲートを100 μ L添加

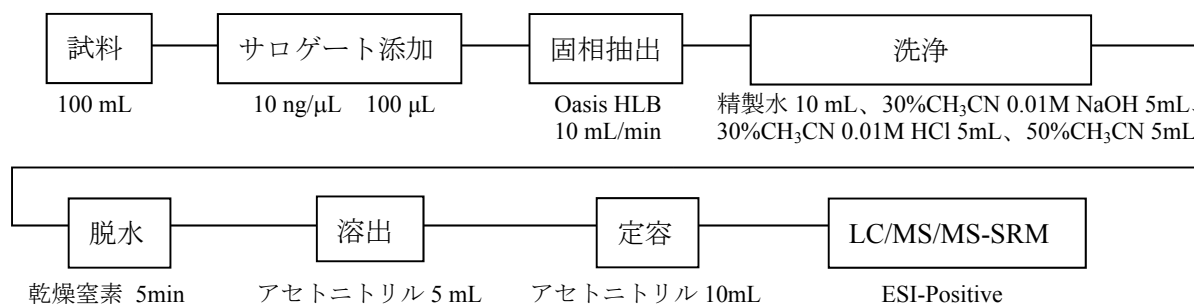


図1 分析法のフローチャート

し混合する。これを固相カートリッジ (HLB) に10mL/minの速さで通水し捕集する。固相カートリッジを水10mL, 30%アセトニトリル含有0.01mol/L水酸化ナトリウム水溶液5mL, 水5mL, 30%アセトニトリル含有0.01mol/L塩酸5mL, 水5mL, 50%アセトニトリル水溶液5mLの順に洗浄し, 乾燥窒素を5分間通気する。これをアセトニトリル5mLで溶出し, アセトニトリルで10mLに定容し, 試験液とする。なお, 懸濁物がある場合にはフィルターでろ過を行い, 試験液とする。試験液をLC/MS/MS-SRMにて分析する。

光に対して分解性 (異性体化) があるため, 操作はなるべく手早く暗めの部屋で行う。暗室を使用する必要はないが, ブラインドを下ろし直射日光を避ける, 必要以上の蛍光灯は点灯しない等の配慮が必要である。目安として, 照度500lux未満で1~2時間程度の作業の場合, 著しい分解は生じない。

3 結果及び考察

3.1 各種条件の検討結果

3.1.1 質量分析条件の検討

MS条件の検討を行った結果を図2に示す。各種条件を変化させ, イオン化の強度を測定したところ, 図に示すデータが得られ, これをもとに最適な条件を設定した。なお, 図には4-メチルベンジリデンカンファーとベンザルカンファーの代表的なイオンをそれぞれ3つ示している。

12種類のイオンを測定に用いることができ, 感度やブランクやバラつき等を考慮して, 最適なイオンを選択することが可能である。

3.1.2 移動相溶媒の検討

移動相溶媒の検討を行った結果を図3に示す。5mM程度の酢酸アンモニウムを入れることにより, 2.5倍程度感度がよく, また, 装置安定性等が良くなったため, 酢酸アンモニウムを入れた移動相を用いることとした。

3.1.3 前処理法の検討 (固相カートリッジ)

前処理法の検討を行った。各種の評価を実施し, 次のようなことがわかった。

- ① HLBとPLS-3ではHLBの方が10%弱程度回収率良好だが、マトリックスも多かった。
- ② 回収率は通液pHに依存せず、酸やアルカリでの洗浄が可能であった。
- ③ 50%アセトニトリルまでは保持され、同溶媒による洗浄が可能であった。

これらの結果をもとに、前処理法を決定した。

3.1.4 前処理法の検討（マトリックス効果）

前処理法の検討を行った。各種の評価を実施し、次のようなことがわかった。

- ① HLBとPLS-3どちらにおいても、20倍濃縮以上で負のマトリックス効果が見られた。また、移動相にバッファーがあった方が、マトリックス効果が抑えられた。
- ② 酸やアルカリや有機溶媒で洗浄することにより、マトリックスは除去されているものの、マトリックス効果の程度に大きな違いは見られなかった。
- ③ 酢酸アンモニウムバッファーの有無で、マトリックス効果が著しく異なる場合があった。
- ④ 汚水によっては、いくつかのモニターイオンで、妨害

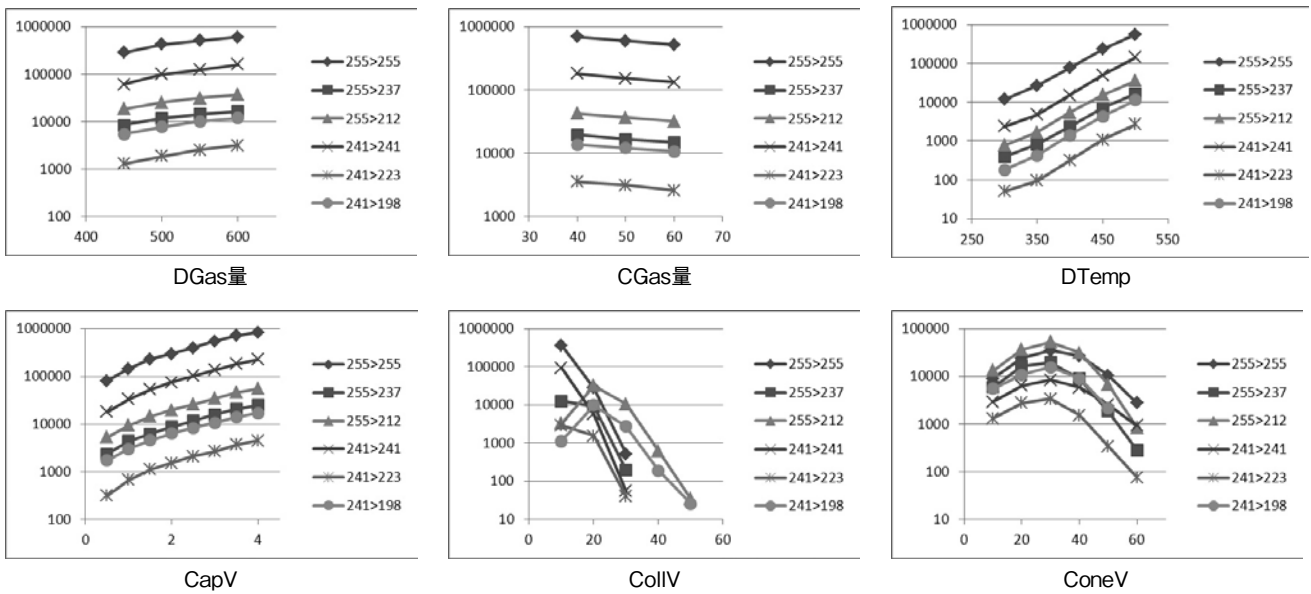


図2 質量分析条件の検討結果

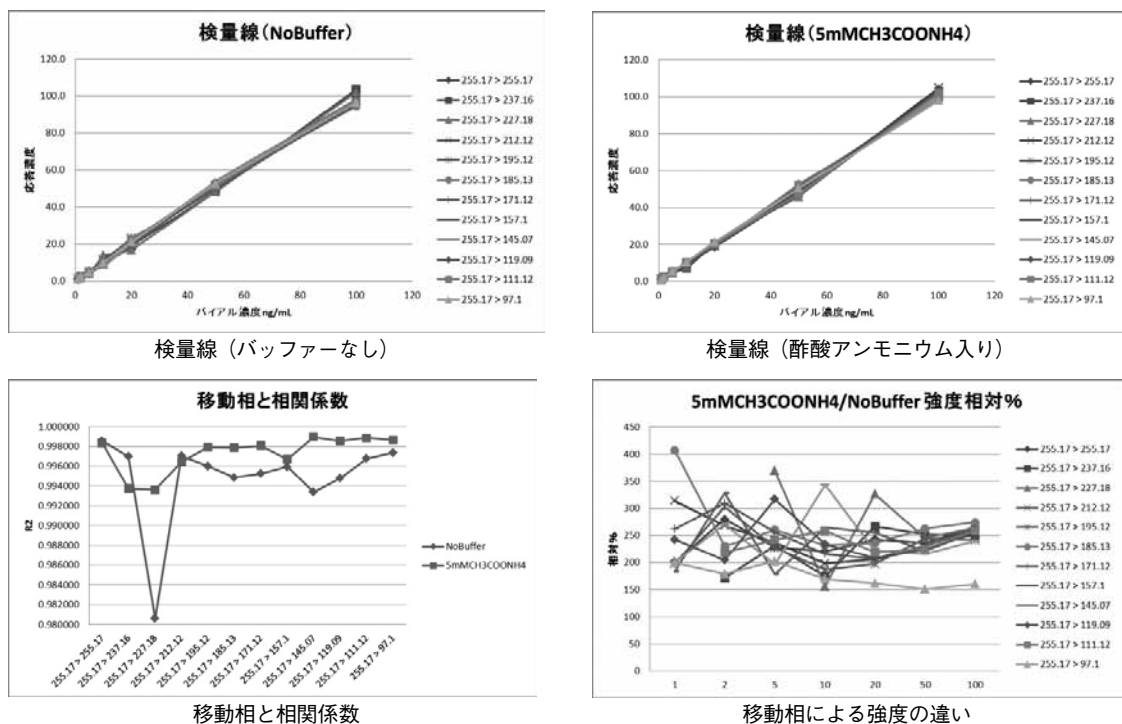
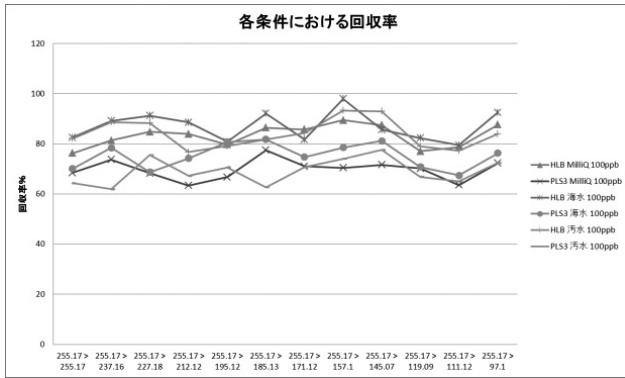
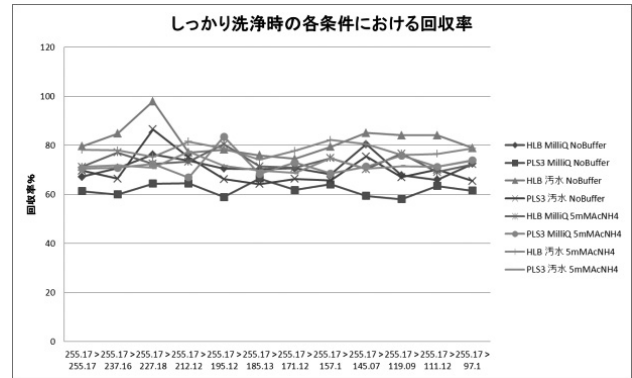


図3 移動相溶媒の検討結果

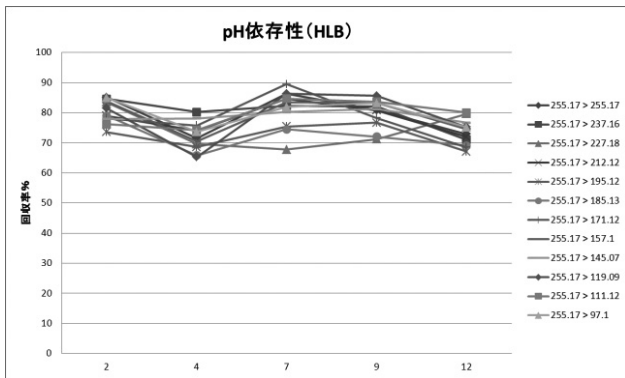


普通洗浄時の回収率

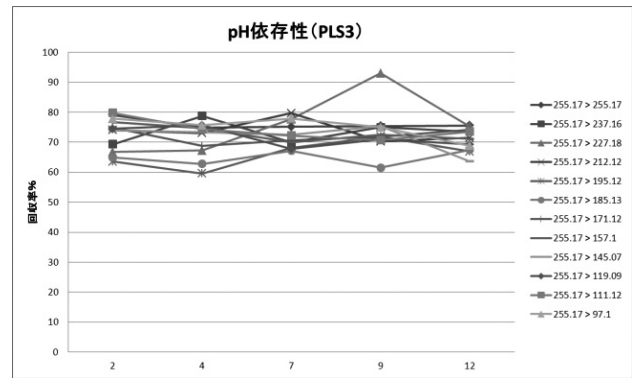
(普通洗浄は水のみ、しっかり洗浄は酸やアルカリや有機溶媒で洗浄。)



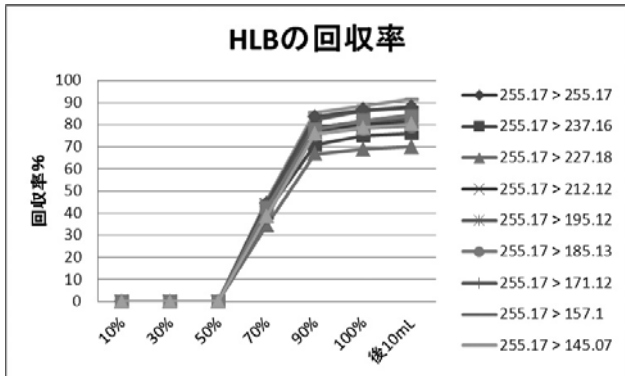
しっかり洗浄時の回収率



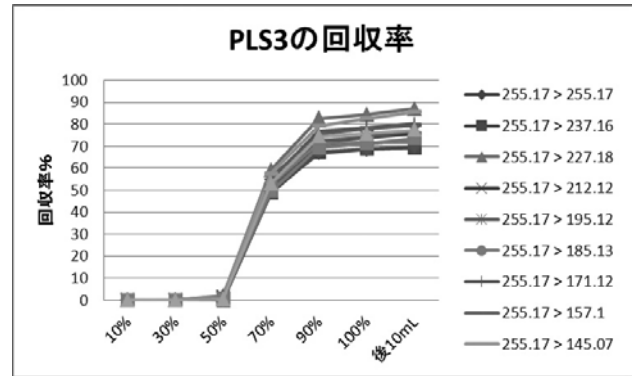
HLB使用時の通液pH依存性



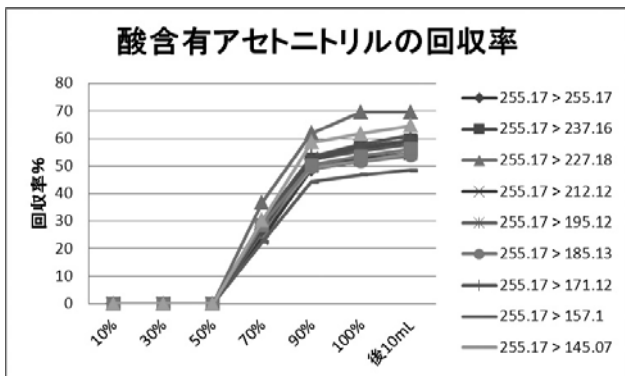
PLS-3使用時の通液pH依存性



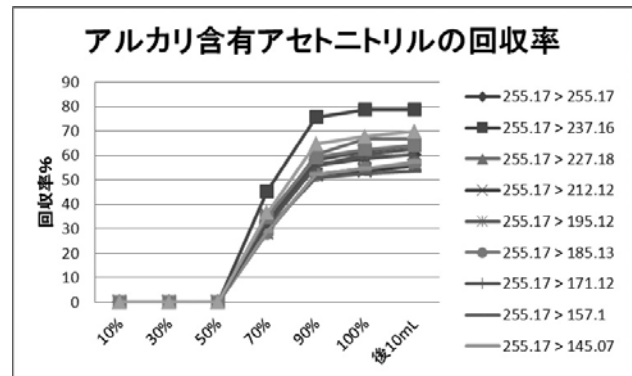
HLB使用時の積み上げ回収率



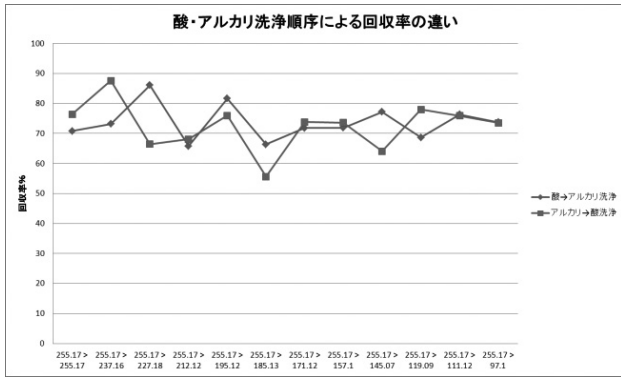
PLS-3使用時の積み上げ回収率



HLB酸洗浄時の積み上げ回収率

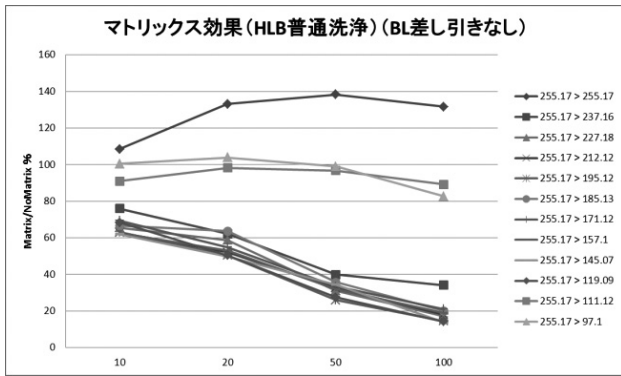


HLBアルカリ洗浄時の積み上げ回収率



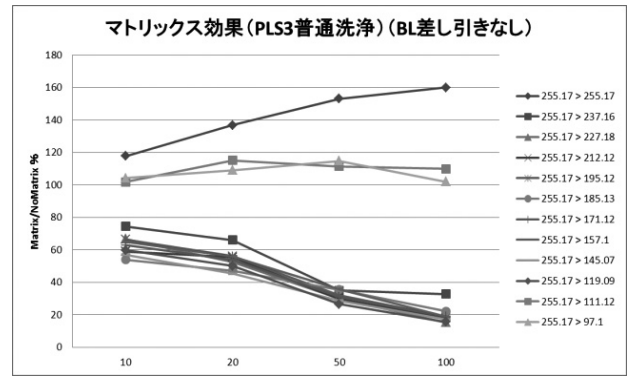
洗浄順序による回収率の違い

図4 前処理法の検討結果 (固相カートリッジ)

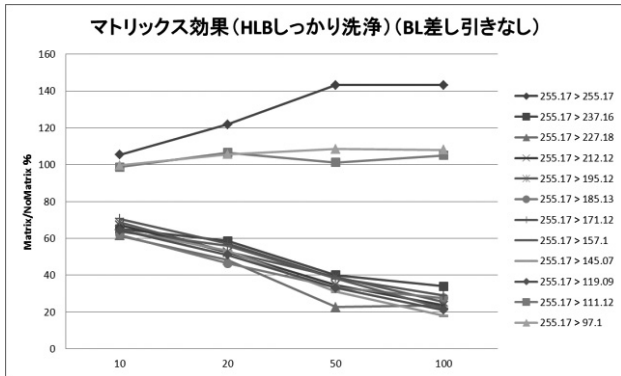


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーなし、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄なし。)

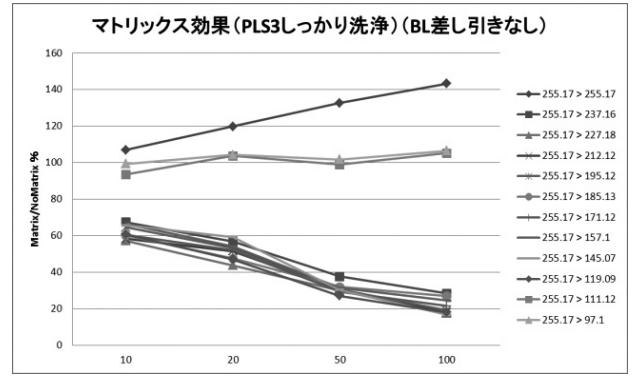


PLS-3使用時のマトリックス効果

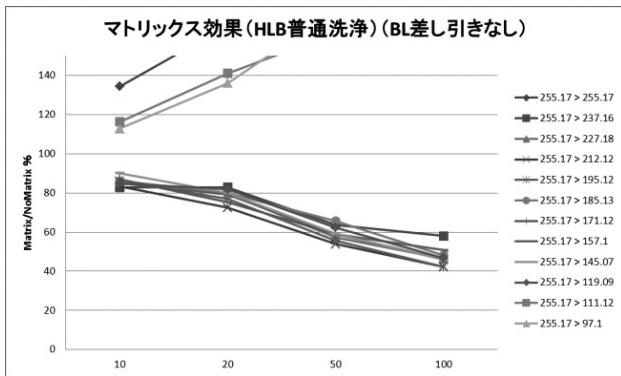


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーなし、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄あり。)

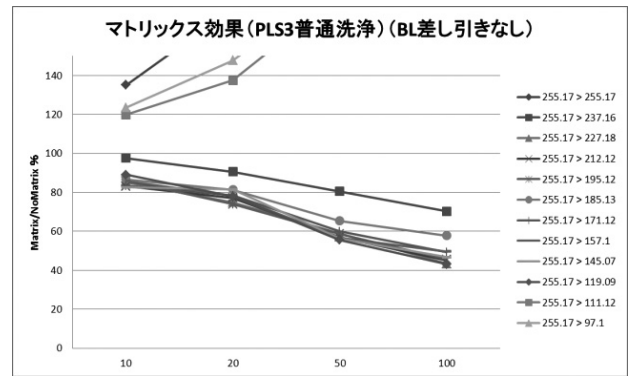


PLS-3使用時のマトリックス効果

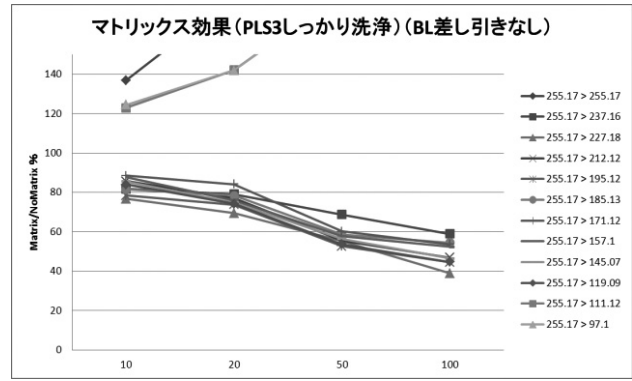
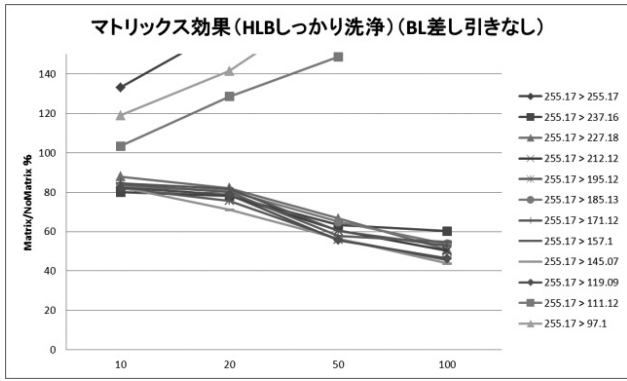


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーあり、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄なし。)



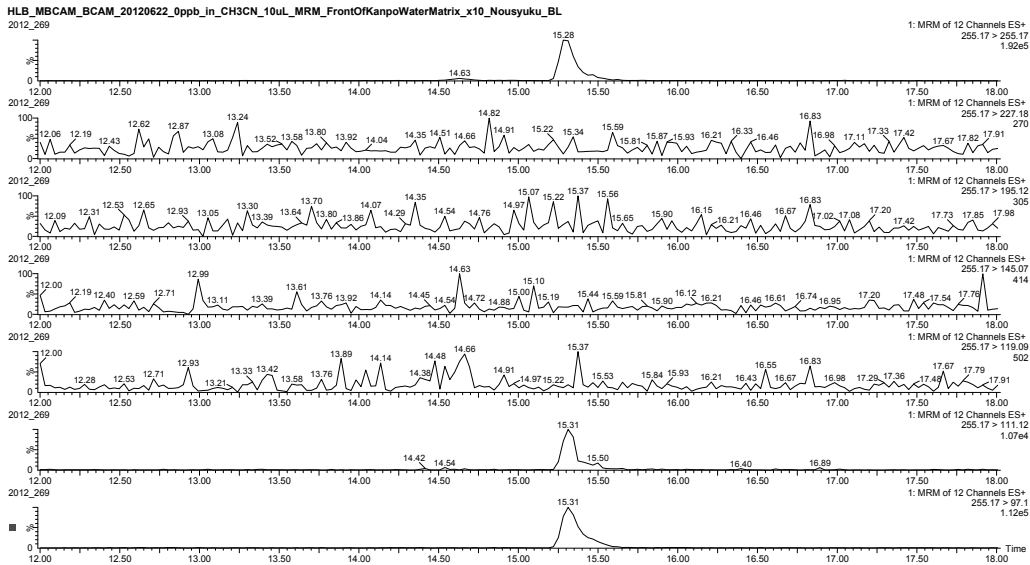
PLS-3使用時のマトリックス効果



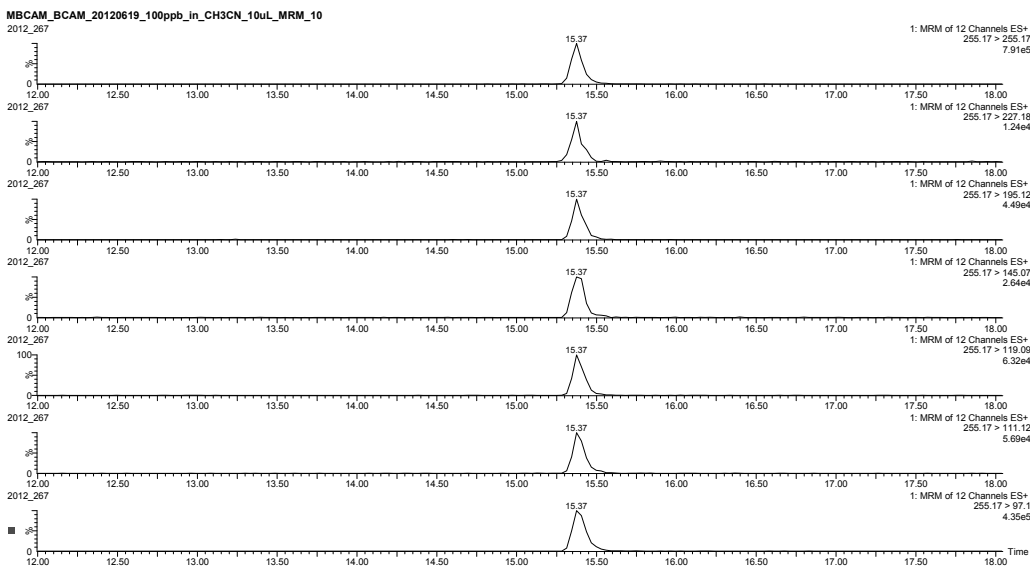
HLB使用時のマトリックス効果

PLS-3使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーあり、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄あり。)



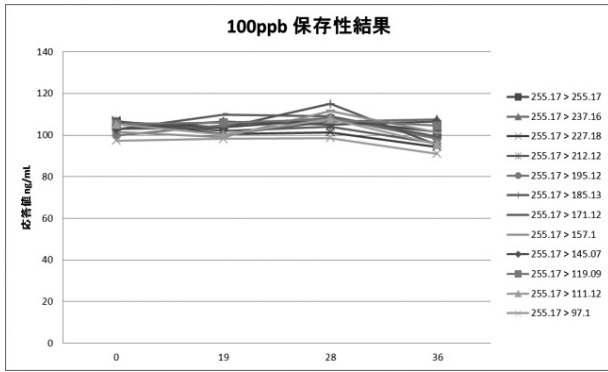
汚水でのブランク検出例



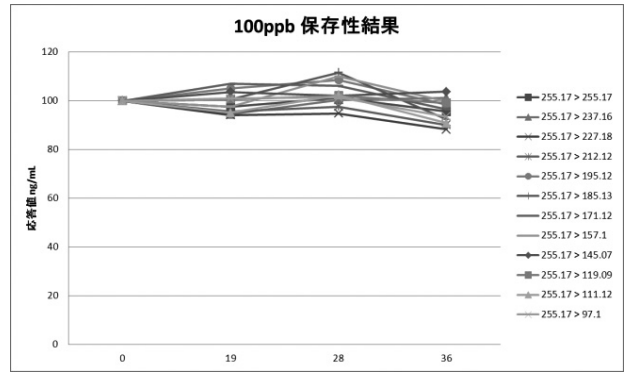
標準液

(12のモニターイオンのうち、3つにブランクが検出された例。図は7イオンを抜粋。)

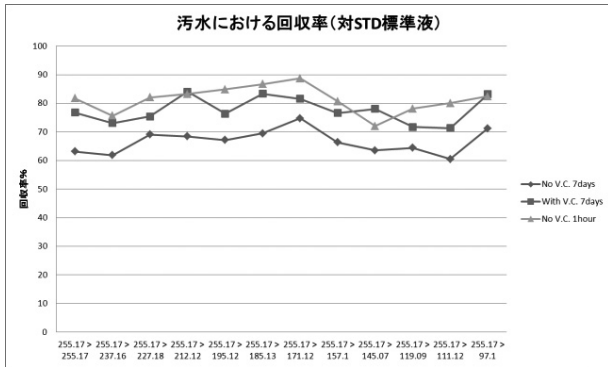
図5 前処理法の検討結果 (マトリックス効果)



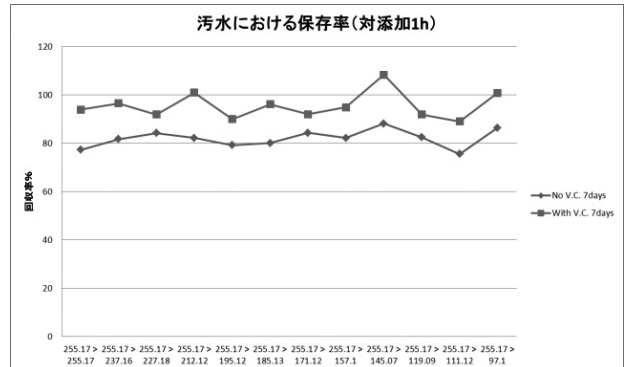
標準溶液の保存性



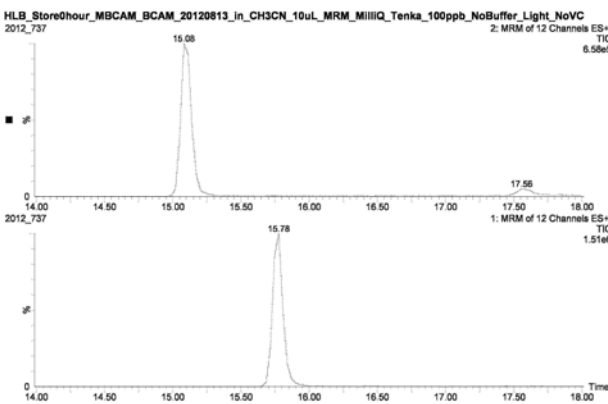
標準溶液の保存性 (0日を100%)



河川水 (汚水) での保存性

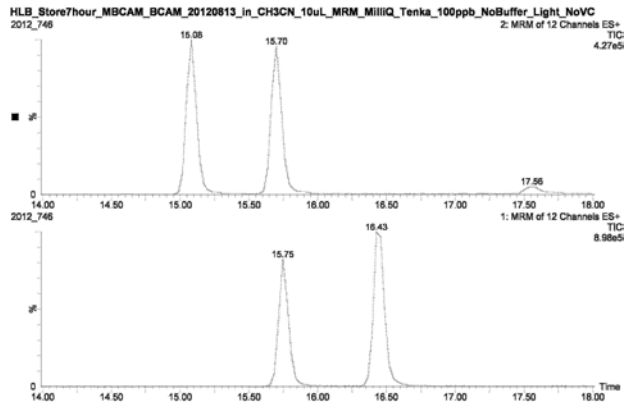


河川水での保存性 (対添加直後%)

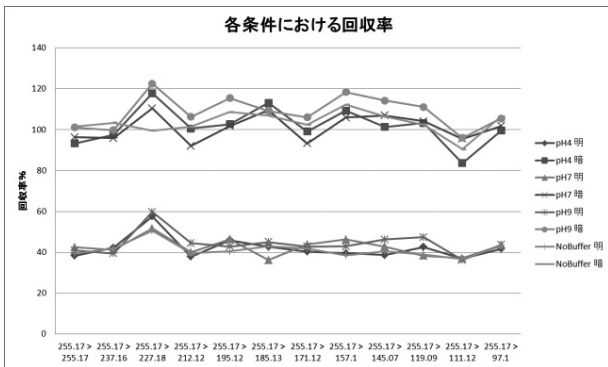


光照射前のクロマト

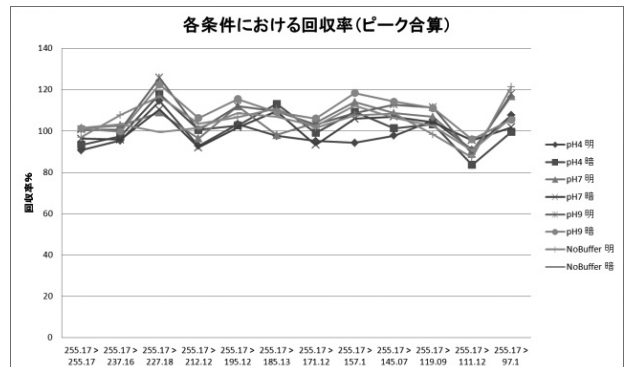
(上段はベンザルカンファー, 下段は4-メチルベンジリデンカンファー。)



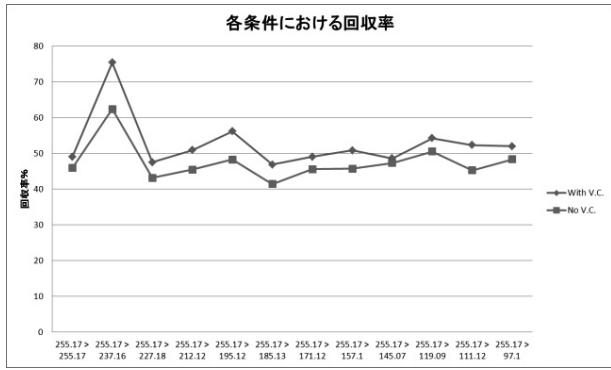
光照射 (7時間) 後のクロマト



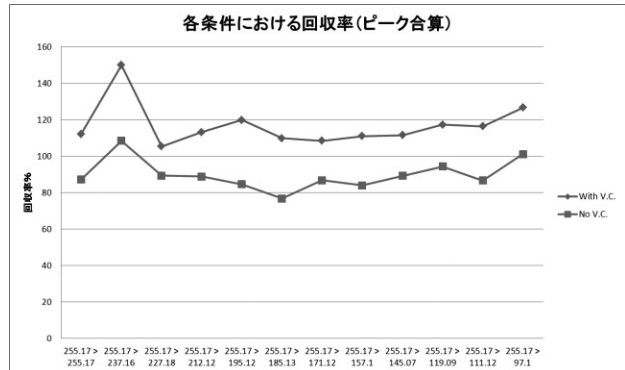
各pH条件での7日光照射



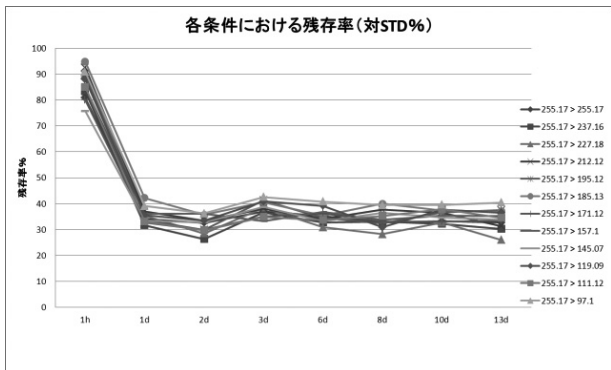
各pH条件での7日光照射 (合算)



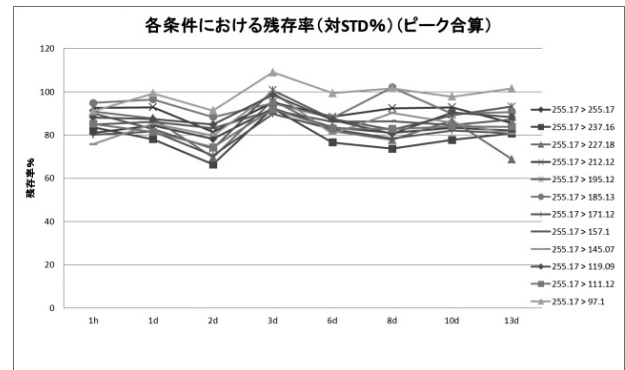
V.C.有無での7日光照射



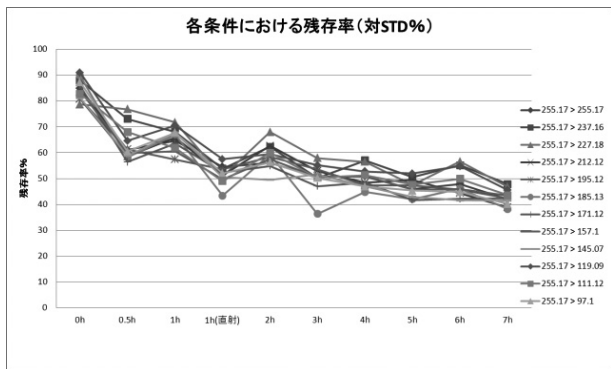
V.C.有無での7日光照射 (合算)



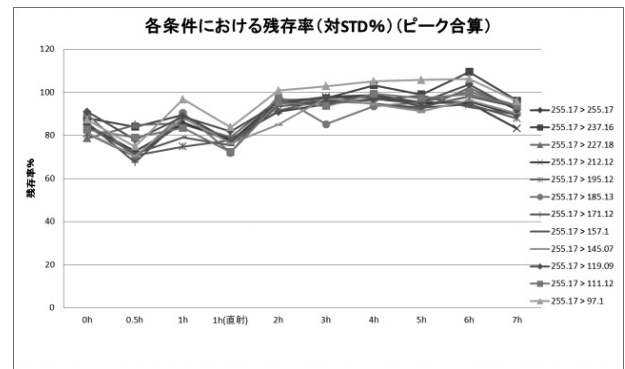
長期間光照射時の残存率



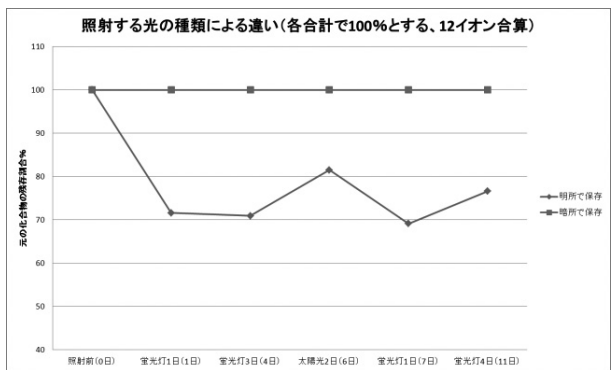
長期間光照射時の残存率 (合算)



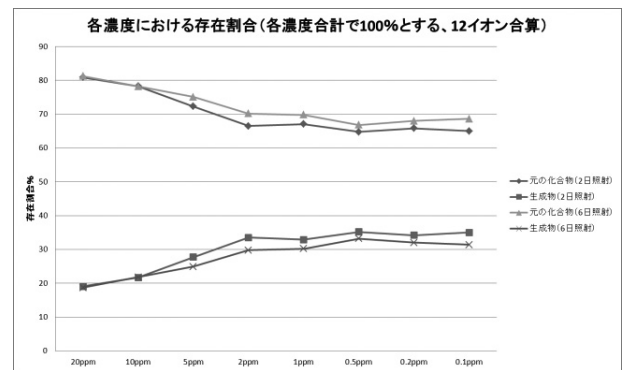
短期間光照射時の残存率



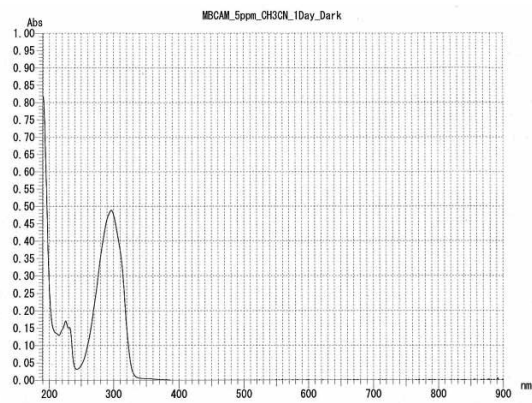
短期間光照射時の残存率 (合算)



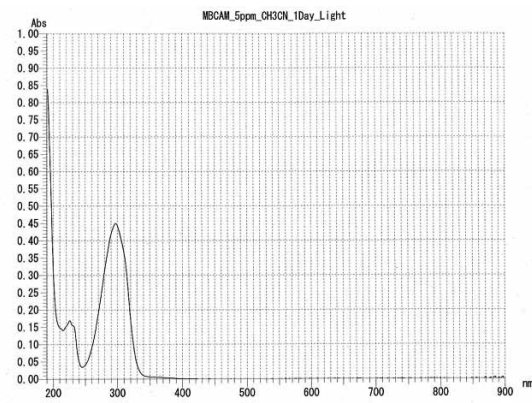
照射光と経過日数



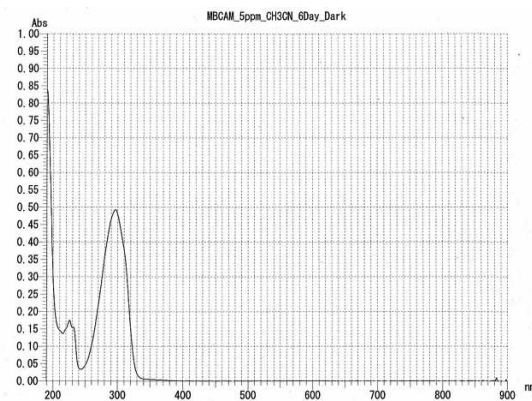
濃度と異性化の程度 (CH₃CN中)



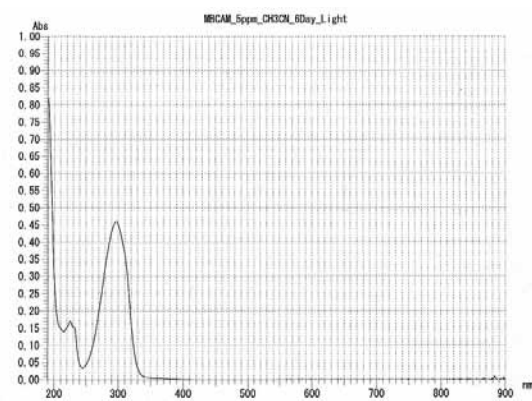
暗所1日経過の吸収スペクトル



明所1日経過の吸収スペクトル



暗所6日経過の吸収スペクトル



明所6日経過の吸収スペクトル

図6 保存性と分解性（光による構造異性体化）の検討結果

表1 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (mL)	添加量 (μg)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率 (%)
4-メチルベンジルピペロン カンファー	河川水	100	無添加	1	ND	—	—	74.6
		100	1.00	5	9.23	92.3	6.8	81.7
	海水	100	無添加	1	ND	—	—	75.9
		100	1.00	5	9.31	93.1	7.3	81.3

表2 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (μg/L)	1時間後の残存率(%)	7日後の残存率(%) ^{*1}	
					暗所	明所
4-メチルベンジルピペロン カンファー	5	2	10	97	100	51
	7	2	10	90	110	52
	9	2	10	99	93	49
4-メチルベンジルピペロン カンファー(ピーク合算)	5	2	10	(97) ^{*2}	(100)	108
	7	2	10	(90)	(110)	110
	9	2	10	(99)	(93)	102

*1 7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

*2 カッコは生成物のピークがなかったため、合算しても変わらなかったもの。

表3 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
				9日後	15日後	84日後
4-メチルベンジリデン カンファー	試料	河川水	5	99	—	—
		河川水(V.C.有)	5	93	—	—
		海水	5	88	—	—
	粗抽出液	河川水	5	—	94	—
		海水	5	—	97	—
	標準液	標準液(低)	10	—	—	98
		標準液(高)	100	—	—	101

イオンが出ることがあった。

これらの結果をもとに、前処理法を決定した。

3.1.5 保存性と分解性（光による構造異性体化）の検討

保存性と分解性の検討を行ったところ次のようなことがわかった。

- ①暗所、冷蔵の有機溶媒中で1か月以上安定であった。
- ②暗所、冷蔵の汚水中では1週間以上安定に保存される。酸化防止剤（ビタミンC）の有無で、著しい違いは見られなかった。
- ③光に対して分解性（構造異性体化）があり、数時間の光で異性体化する。異性体化はpHには依存しなかった。酸化防止剤（ビタミンC）の有無で、異性体化に著しい違いは見られなかった。元化合物と異性体化生成物を足し合わせると、元化合物の初期濃度とほぼ一致した。
- ④照射光の種類（蛍光灯、太陽光）では異性化の程度に著しい違いは見られなかった。
- ⑤十分に光を照射すると、異性体化前と異性体化後の比は、濃度に応じて一定の割合となった後に安定する。
- ⑥UV領域の300nm付近に強い吸収があるが、可視領域には吸収はほぼなかった。光で異性体化しても吸収極大波長や吸収スペクトルの形に大きな変化は生じないが、異性化生成物はモル吸光係数が元の物質の2/3程度であった。

3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表1に示す。添加回収試験には河川水は旭川の乙井手堰、海水は倉敷市水島沖の水質試料を使用した。河川水、海水ともに良好な添加回収試験結果が得られた。

3.3 分解性スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表2に示す。pHに対しては安定性が高いが、光で構造異性体化する。元の物質と生成物のピークを合算すると、ほぼ100%の残存率となった。

3.4 保存性試験結果

保存性試験結果を表3に示す。保存性は良好であった。河川水試料については、酸化防止剤（ビタミンC）を1g/L添加したものを合わせて確認したが、違いは見られなかった。

3.5 環境試料の分析結果

平成24年10月に採取した河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）からは、対象物質は検出されなかった。定量下限は1.1 μg/Lであった。

4 まとめ

4-メチルベンジリデンカンファーの分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はESI Positiveモードでイオン化され、SRM（MS/MS）法による測定が有効であった。12種類のイオンを測定に用いることができ、感度やブランクやバラつき等を考慮して、最適なイオンを選択することができた。
- 2) 移動相溶媒に酢酸アンモニウム／アセトニトリルを用いると、良好な感度と装置安定性等を得ることができた。
- 3) 固相抽出による前処理方法を検討し、アルカリ、酸、有機溶媒の順に洗浄することで、クリーンアップ効果を持たせつつ、良好な回収率が得られた。
- 4) マトリックス効果が大きく、また試料の汚れの程度によっては妨害イオンがあることから、複数のイオンをモニターする等の注意が必要ことがわかった。
- 5) 添加回収試験結果は、河川水、海水ともに良好であった。
- 6) 分解性スクリーニング試験結果は、pHに対しては安定性が高いが、光で構造異性体化し、また元の物質と生成物のピークを合算すると、ほぼ100%の残存率となることがわかった。
- 7) 保存性試験結果は、保存性は良好であった。
- 8) 河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）からは、対象物質は検出されなかった。

なお、本研究は環境省委託の平成24年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課：化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009
- 2) 宮本道子，中村義昭，横山敏郎，伊藤弘一，寺島 潔，鈴木淳子，浜野朋子，萩野周三：医薬部外品および化粧品中の紫外線吸収剤の分析に関する研究（第2報）ビスエチルヘキシルオキシフェノールメトキシフェニルトリアジン，ホモサレートおよびメチルベンジリデンカンファを含む17成分同時分析法，東京都健康安全研究センター研究年報，60，97-102，2009
- 3) 松本比佐志，足立伸一，鈴木定彦：紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用，薬学雑誌，125(8)，643-652，2005
- 4) Agilent technologies, Inc. Application Note : Agilent 1290 Infinity LC with Agilent Poroshell columns for simultaneous determination of eight organic UV filters in under two minutes, Publication Number 5990-6861EN, 2010 December 1, 2010
- 5) 横山敏郎，森謙一郎，中村義昭，寺島 潔，大貫奈穂美，宮本道子，萩野周三，斉藤和夫：医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法についての改良，東京都健康安全研究センター研究年報，57，145-150，2006