

環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

—LC/MSを用いた鳥インフルエンザ関連消毒剤の分析—

劔持堅志，浦山豊弘，吉岡敏行，中桐基晴，藤原博一（水質第二科）

【調査研究】

環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

—LC/MSを用いた鳥インフルエンザ関連消毒剤の分析—

Determination of Cationic Surfactants, used as Disinfectant for Quarantine Activity of Avian Influenza, in Water by LC/MS/MS

劔持堅志，浦山豊弘，吉岡敏行，中桐基晴，藤原博一（水質第二科）

Katashi Kenmotsu, Toyohiro Urayama, Toshiyuki Yoshioka, Motoharu Nakagiri, Hiroichi Fujiwara

要 旨

高病原性鳥インフルエンザ防疫措置で使用された消毒剤について周辺環境影響調査のための分析法をLC/MSを用いて検討した。防疫措置で使用された消毒剤（明治製菓製 パコマ）は，有効成分としてMethyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chloride（モノ体）及びMethyl dodecyl xylilene bis（trimethyl ammonium chloride）（ビス体）の2成分を含有し，ESI-PositiveモードでMS/MS（SRM）分析が可能であった。モノ体はHPLC分離が可能で，0.05ng/mLまで検出可能であったが，ビス体はHPLCでの分離が困難であった。また，モノ体は直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）等の陰イオン界面活性剤が共存すると定量値が低下する傾向があり，陰イオン交換カラムを用いて陰イオン界面活性剤を除去する必要がある。陰イオン交換カラムとしてSAX及びWAXを使用する方法を検討し，SAXを使用する迅速分析法では0.1 μ g/Lレベル，WAXを使用する高感度分析法では0.001 μ g/Lレベルの検出下限値を得た。

[キーワード：高病原性鳥インフルエンザ防疫措置，消毒剤，陽イオン界面活性剤，陰イオン交換カラム，LC/MS/MS]

[Key words：quarantine activity of avian influenza, disinfectant, cationic surfactants, Anion exchange column, LC/MS/MS]

1 はじめに

高病原性鳥インフルエンザは，その感染力の強さ，高致死性を示すことから，家畜産業に及ぼす影響は甚大であるほか，人への致死的な感染被害が懸念されることから，国際的にも最も警戒すべき家畜の感染性疾病の一つとして，その制圧と感染拡大防止が図られている¹⁾。岡山県でも平成19年1月27日に，高梁市内の養鶏場で高病原性鳥インフルエンザが発生し，岡山県は直ちに知事を本部長とする岡山県高病原性鳥インフルエンザ対策本部を設置し，鳥インフルエンザの征圧と感染拡大防止に向けた防疫措置を開始し，平成19年2月7日には全ての防疫措置を完了し，3月1日には移動制限区域・搬出制限区域を解除した。防疫措置では，鶏舎内外及び農場に出入りする車両，機材等の徹底した消毒が行われ，感染の拡大防止が図られたが，防疫措置に使用する消毒剤による周辺環境への影響が懸念されたため，県は農場周辺地域において「鳥インフルエンザ防疫作業に係る水質調査」

を実施した。この調査では，防疫措置の環境影響を適確に把握できる分析項目として，消毒剤として使用された逆性石けん製剤に着目し，製剤中の有効成分である陽イオン界面活性剤をLC/MSを用いて迅速に分析する方法を検討し，その分析法を確立したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

消毒剤標準品：(株)科学飼料研究所製〔モノ・ビス（塩化トリメチルアンモニウムメチレン）〕アルキル（C9-C15）トルエン（50%溶液）（明治製菓(株)製動物用医薬品 パコマの主成分）

カートリッジカラム：

Bond Elut Jr SAX（500mg）Varian社製

Oasis WAX（150mg/6cc）Waters社製

その他試薬は，残留農薬分析用，LC/MS分析用または特級試薬を用いた。

2.2 測定法

2.2.1 LC/MSの測定条件

[LC条件]

カラム：東ソー TSK-GEL SuperAW2500
 2mmφ×150mm (特注品)
 移動相：A：水，C：メタノール，D：0.5%ギ酸/メ
 タノール
 0～0.1min A：C：D = 80：0：20
 0.1～5min A：80→0 C：0→100
 D：20→0 liner gradient
 5～17min A：0 C：100 D：0
 17～17.1min A：0→80 C：100→0
 D：0→20 liner gradient
 17.1～30min A：C：D = 80：0：20
 流量：0.2mL/min，カラム温度：40℃，注入量：10 μL

[MS条件]

Capillary：3kV，SourceTemp：100℃，
 DesolvationTemp：500℃，
 DesolvationGas：600L/hr，ConeGas：50L/hr
 Cone：30V，Collision：30eV
 イオン化法：ESI-Positive
 モニターイオン：332.2→119 (モノ体定量用)，332.2

→133, 332.2→147 (確認用)

2.2 分析方法

分析方法は，迅速分析法と高感度分析法について検討した (図1)。

(1)迅速分析法

予めメタノール (10mL×2回) 及び精製水 (5mL×2回) を用いてコンディショニングした陰イオン交換カートリッジカラム (Bond Elut Jr SAX, 500mg) に試料水 (pH7) 10mlをシリンジを用いて通水し，ろ液を採取した。カートリッジカラムにシリンジで通気し，過剰な水分を除去した後，メタノール2mLを用いて溶出し，溶出液は先のろ液と合わせた。ろ液にギ酸10 μLを添加した後，水を用いて12mLに定容し，一部を分取してLC/MS/MS-SRM測定を行った。

(2)高感度分析法

予めメタノール (5mL×2回) 及び精製水 (5mL×2回) を用いてコンディショニングした弱陰イオン交換カートリッジカラム (Oasis WAX (150mg/6cc)) に試料水 (pH7) 100mlを通水した。カートリッジカラムを通気し，過剰な水分を除去した後，メタノール5mLを用いて溶出した。溶出液は窒素吹きつけにより1mL以下まで濃縮した後，10%ギ酸10 μLを添加した後，メタノールを用いて1mLに定容し，LC/MS/MS-SRM測定を行った。

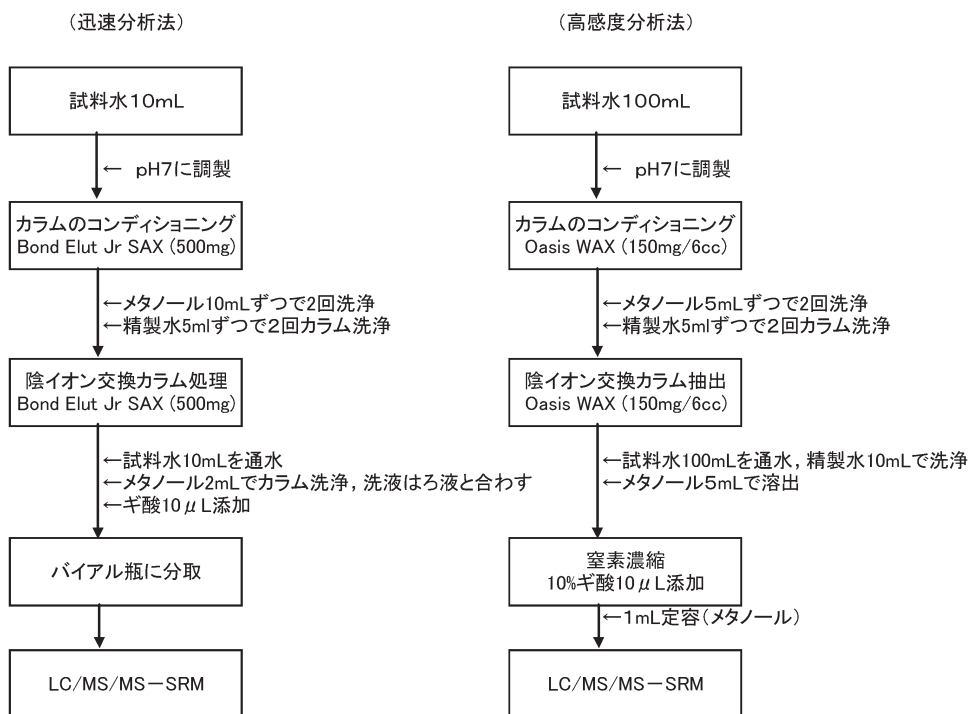


図1 検討した分析法のフローチャート

3 結果及び考察

3.1 防疫措置で使用された消毒剤の成分と既存分析法

今回の防除措置では、生石灰及び逆性石けんを主成分とする動物医薬品（明治製菓製 パコマ）が消毒剤として使用された。養鶏場の立地する地域には石灰岩地帯も存在することから、生石灰の成分であるカルシウムの測定では、周辺環境への影響を適確に把握できない可能性があった。このため、一般環境中には存在しないと考えられるパコマの成分をモニタリングする方向で検討を開始した。パコマの成分は、明治製菓が提供する性状及び取扱に関する情報（MSDS：Material Safety Data Sheet）に〔モノ・ビス（塩化トリメチルアンモニウムメチレン）〕アルキル（C9-C15）トルエン（50%溶液）を成分とすると記載され、パコマの有効成分は陽イオン界面活性剤（逆性石けん）で、モノ体とビス体の2成分を含有することが判明した。陽イオン界面活性剤の試験法は、工場排水試験方法（JIS K0102）²⁾の参考にオレンジII吸光度法により定量する方法（図2）が記載されているが、オレンジII吸光度法は洗濯柔軟剤やリンスとして使用されている他の陽イオン界面活性剤も同時に定量される欠点があった。また、今回の「鳥インフルエンザ防疫作業にかかる水質調査」では、水質試料の採取が消毒作業の開始と同時に開始され、早急に分析体制を整える必要があったことから、JIS法による分析の準備と併行して、LC/MSを用いた陽イオン界面活性剤分析法の検討を開始した。

3.2 LC/MS イオン化条件の検討

パコマに含有されるモノ体及びビス体の標準品は入手できなかったため、散布しているパコマ自体を標準品として、LC/MSのイオン化条件を検討した。ESI-Positiveモードで検出されたマススペクトルを図3及び図4に示すが、図3に示すようにモノ体であるMethyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chlorideから塩素イオンが脱離したと考えられる

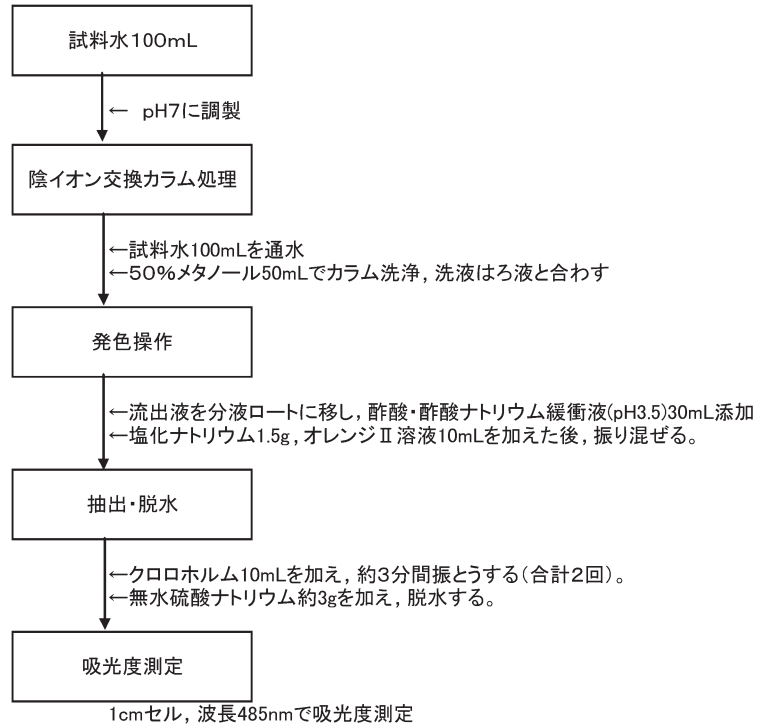


図2 JIS K0102 参考法による陽イオン界面活性剤の分析フローチャート

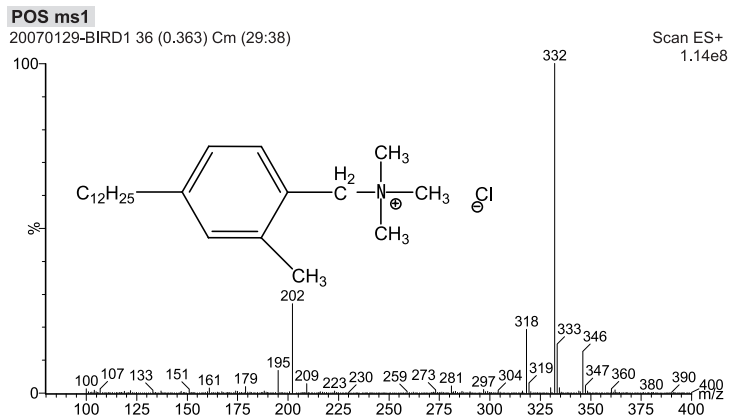


図3 消毒剤パコマの成分であるMethyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chloride（モノ体、MW=332.3、C12H25=C9H19~C15H31）のLC/MSスペクトル（ESI-Positive、インフュージョン測定）

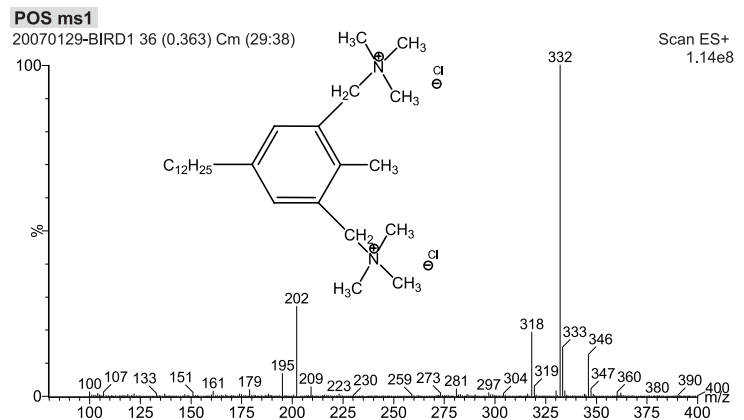


図4 消毒剤パコマの成分であるMethyl dodecyl xylylene bis(trimethyl ammonium chloride)（ビス体、MW=404.2/2->202.1、C12H25=C9H19~C15H31）のLC/MSスペクトル（ESI-Positive、インフュージョン測定）

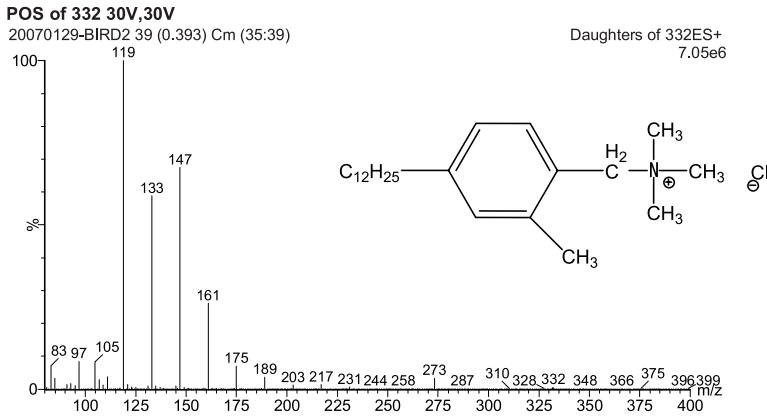


図5 消毒剤パコマの成分であるMethyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chloride (モノ体、プレカーサーイオンM/Z=332.3)のプロダクトイオンスペクトル (ESI-Positive, インフージョン測定)

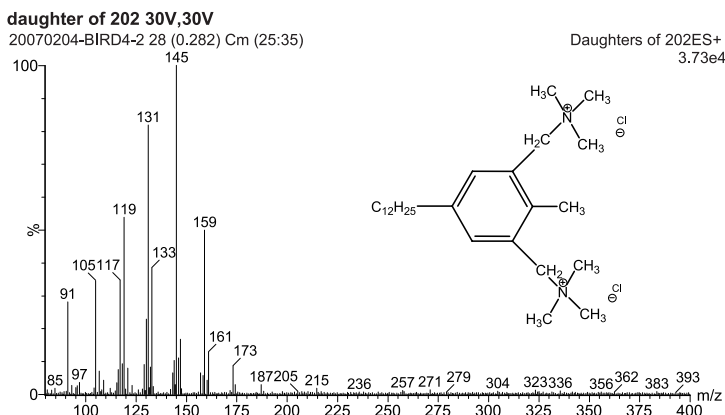


図6 消毒剤パコマの成分であるMethyl dodecyl xylilene bis(trimethyl ammonium chloride) (ビス体、プレカーサーイオンM/Z=202.1)のプロダクトイオンスペクトル (ESI-Positive, インフージョン測定)

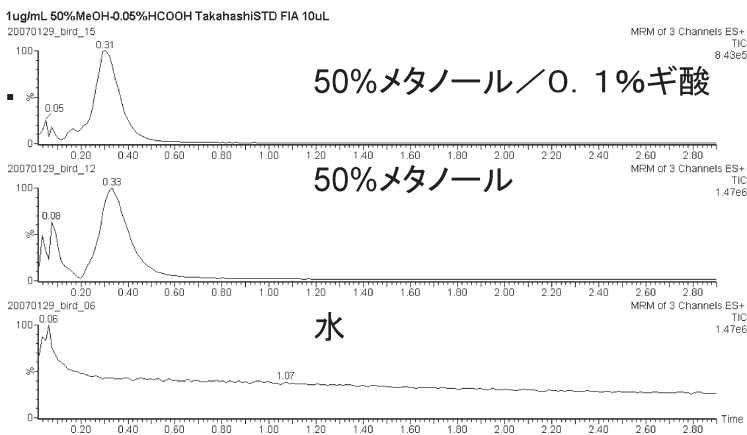


図7 モノ体のフローインジェクションによるMRM測定

イオン (MW=332.3) と一致するピークが検出された。また、鎖長の異なるアルキル基に起因すると考えられるピーク (M/Z 318 及び 346) も検出された。一方、図4では、ビス体である Methyl dodecyl xylilene bis(trimethyl ammonium chloride) から塩素イオンが2個が脱離したと考えられるイオン (二価イオンであるため

MW=404.2/2-> 202.1として検出) が検出され、鎖長の異なるアルキル基に起因すると考えられるピーク (M/Z 195 及び 209) も M/Z 7の差で二価イオンの特徴を持って検出された。

一般に LC/MS 分析では、MS/MS (SRM) 分析の方が高感度に測定できることから、図3 及び図4 で得られたイオンをプレカーサーイオン (親イオン) としてプロダクトイオンの探索を行い、その結果を図5 及び図6 に示した。モノ体 (プレカーサーイオン M/Z=332.3) からは M/Z 119, 133, 147 等のプロダクトイオンが得られ (図5), また、ビス体 (プレカーサーイオン M/Z=202.1) からは M/Z 119, 131, 133, 145, 159 等のプロダクトイオンが得られた (図6)。

3.3 フローインジェクション測定の検討

得られたプロダクトイオンを用いて、モノ体のフローインジェクション測定を行った結果を図7 に示したが、HPLC カラムを使用しないフローインジェクション測定では、移動相が水の場合は対象物質が装置内に吸着し全く検出されなかったが、50%メタノールでは感度よく検出された。対象物質が塩基性であることから、ギ酸を添加して吸着性の抑制を試みたが、ピーク幅の減少、ベースラインの低下等の吸着防止効果が若干得られたが、ギ酸の添加によりイオン強度が低下する傾向が認められた。このため、HPLC 条件の検討では、ピーク検出時にギ酸濃度を0にすることを試みることにした。

3.4 HPLC 条件の検討と検量線

フローインジェクション測定においてモノ体は HPLC の配管等に吸着する傾向を示したことから、吸着が少ないと考えられる親水性ビニルポリマーを基材とした水系、極性有機溶媒系分子排除 (SEC) カラムである TSK-GEL SuperAW2500 を選定してモノ体の分離を検討した (図8)。移動相が50%メタノールとしたアイソクラティック分析の場合は、モノ体はブロードなピークとして検出されたが、20%メタノールを初期濃度とし、5分後にはメタノール濃度を100%にするとともに、イオン強度の

向上を目的にギ酸濃度を0にするグラジエント分析条件では、図8に示すようにモノ体をシャープなピークとして検出することができた。一方、逆相系カラム(Waters Atlantis dC18)では、モノ体はテーリングする傾向を示し、AW2500と比較して高感度な分析は不可能であった。なお、ビス体についても同時に検討を行ったが、吸着性が著しく、ピーク分離可能なカラムは選定できなかった。

設定したグラジエント条件におけるモノ体の検量線を図9に示したが、検量線はばらつきが大きく、1ng/mL以下の低濃度領域ではゴーストピークが生じて直線性が失われていた。このような現象は、HPLC内における吸着が原因と考えられたため、オートサンプリング洗浄液の変更(メタノール濃度90%から100%に)、オートサンプリング周辺部品の交換、カラムフィルターの交換等の対策を実施したところ、図9に示すように1ng/mL以下の低濃度においても良好な直線性が得られるようになった。

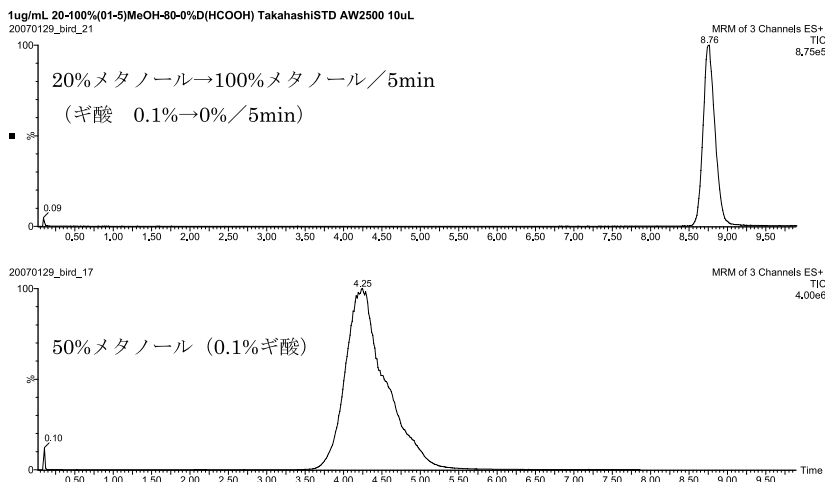


図8 東ソー TSK-GEL SuperAW2によるHPLC分離

3.5 迅速分析法の検討

HPLC測定条件の改善により、環境測定に十分な0.05ng/mL程度の感度が得られたため、試料水をガラスファイバーフィルター(1μm)を用いてろ過するのみでモノ体をLC/MS分析することを試みた。しかし、精製水では十分な回収率が得られたが、図10に示すように河川水では30%以下の回収率しか得られなかった。図2に示すJIS参考法の分析法では、水中の陽イオン界面活性剤は陰イオン界面活性剤とイオン対を形成して存在するため、オレンジIIによる発色が妨害されること、この妨害を排除するためには強塩基性陰イオン交換樹脂を用いて陰イオン界面活性剤をイオン交換により除去する必要があると記載されている²⁾。LC/MSの測定においても同様な妨害が生じる可能性³⁾が考えられるため、モノ体の感度に対する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の影響を検討し、その結果を図11に示したが、LAS濃度の増加とともにモノ体の定量値は急激に低下し、LAS濃度2μg/mLでモノ体の感度は20%まで減少した。このため、強塩基性陰イオン交換樹脂を用いて陰イオン界面活性剤を除去する必要があるが生じたが、平成16年1月に鳥インフルエンザの発生を経験した山口県保健環境研究センターから図2に示したJIS法において、強塩基性陰イオン交換樹脂として市販のカートリッジカラム(Bond Elut Jr SAX, 1g, 溶出溶媒量:メタノール10mL)が使用できるとの情報提供があった。図12にSAXカラム(Bond Elut Jr, 500mg)の溶離パターンを示したが、このSAXカラムは試料水10mLの分画にもモノ体が溶出することが判明したことから、図1の迅速分析法に示すように試

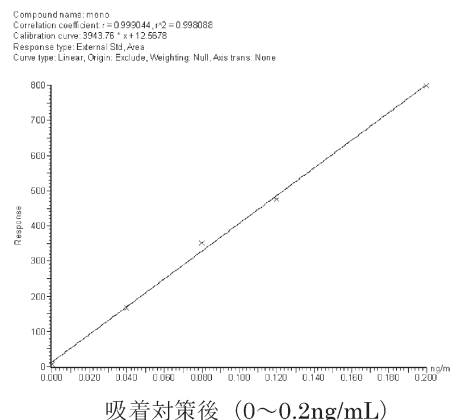
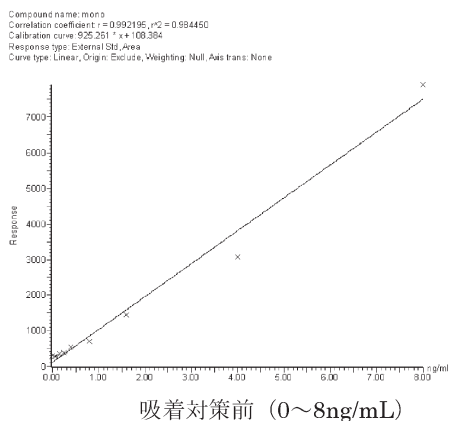


図9 モノ体の検量線と吸着防止対策の効果

料水のカラム処理液とメタノール溶出液2mLを合わせてLC/MS分析に供する方法を採用し、図10に示すように

SAX処理により良好な回収率が得られた。

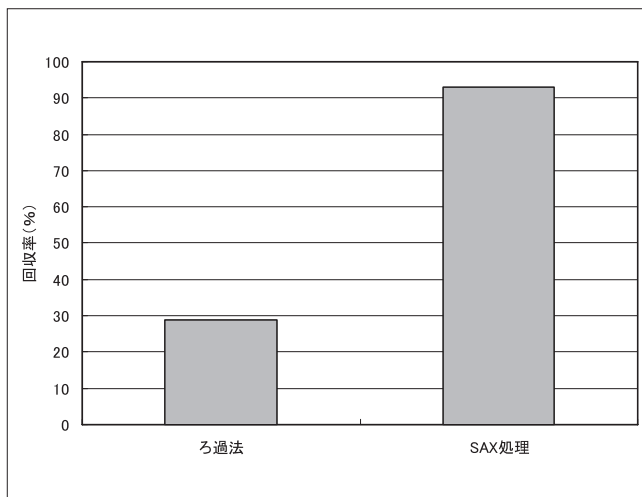


図10 モノ体の河川水からの回収率

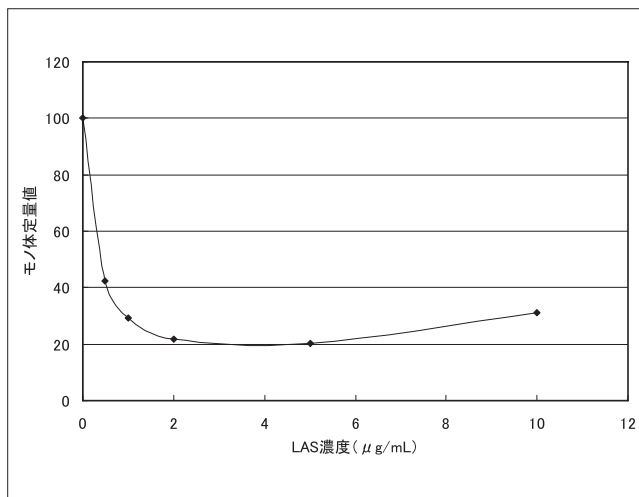


図11 モノ体のLC/MS定量値に対するLASの影響 (モノ体濃度：5ng/mL)

3.6 高感度分析法の検討

SAXカラムを使用する迅速分析法(図1)は、試料水を通水する際に一部のモノ体が試料水のろ液中に溶出する(図12)ことから、ろ液とカラムのメタノール溶出液を合わせてLC/MSに注入する必要がある、試料水中の夾雑物質がHPLCカラムやLC/MSを汚染する可能性があり、また、濃縮を行わないことから高感度分析が不可能な欠点を有する。このため、シリカゲルベースの固相材にイオン交換基を結合させたSAXカラムよりも吸着能が高いと考えられる親水性ビニルポリマーを基材とする

イオン交換カラム(ミックスモード固相)を用いて試料水を通水することを試みた。その結果、モノ体は陽イオン交換固相であるOasis MCX及びWCXは吸着後の溶出が不可能であったが、陰イオン交換固相であるOasis MAX及びWAXはメタノールにより溶出が可能であった。Oasis MAXよりも高い回収率を示したOasis WAXの溶出パターンを図13に示したが、モノ体はろ液中には溶出せず、メタノール5mL以内に完全に溶出した。図2に示した高感度分析法の分析フローに従い、河川水100mLをOasis WAXに通水・濃縮後、溶出液を1mLに濃縮し

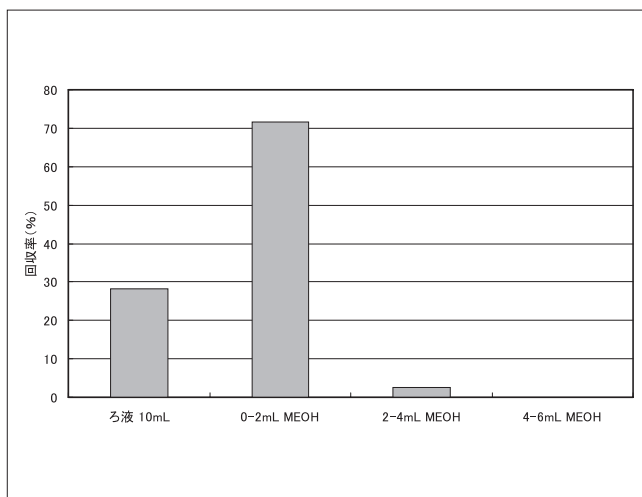


図12 モノ体のBond Elut Jr SAX (500mg)における溶離パターン

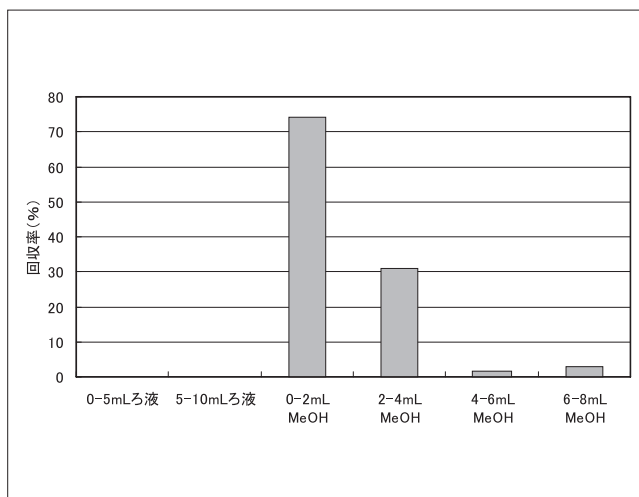


図13 モノ体のOasis MAX (150mg/6cc)における溶離パターン

た場合の添加回収率は87.9 ± 8.6%を示し、良好な回収率が得られた。河川水の測定例を図14に示したが、妨害の少ない良好なクロマトグラムが得られたが、高感度分析のためブランクピークが検出され、ブランク値の管理に注意が必要であった。

4 まとめ

鳥インフルエンザ防疫措置において消毒剤として使用された陽イオン界面活性剤についてLC/MSを用いた分析法を検討し、次に示す結果を得た。

- 1) 消毒剤パコマに含有される有効成分の中、モノ体である Methyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chloride 及びビス体である Methyl dodecyl xylilene bis (trimethyl ammonium chloride) は、ESI-Positive モードでイオンを検出できた。また、モノ体（プレカーサイオン M/Z=332.3）からは M/Z 119, 133, 147 等のプロダクトイオンが得られ、また、ビス体（プレカーサイオン M/Z=202.1）からは M/Z 119, 131, 133, 145, 159 等のプロダクトイオンが得られ、MS/MS (SRM) 測定が可能であった。
- 2) モノ体は、水系、極性有機溶媒系分子排除 (SEC) カラムである TSK-GEL SuperAW2500 で良好なクロマトグラムが得られたが、ビス体は吸着が著しく、適切な HPLC カラムを選定できなかった。
- 3) モノ体も吸着性が著しく、ゴーストピークが生じるなどの現象が生じたため、試料液及び初期移動相へのギ酸の添加、オートサンプリング洗浄液の変更、オートサンプリング周辺部品の交換、カラムフィルターの交換等の対策を実施する必要があった。
- 4) SAX カラムを用いて試料水 10mL をイオン交換処理する迅速分析法を検討し、0.1µg/L レベルで測定可能

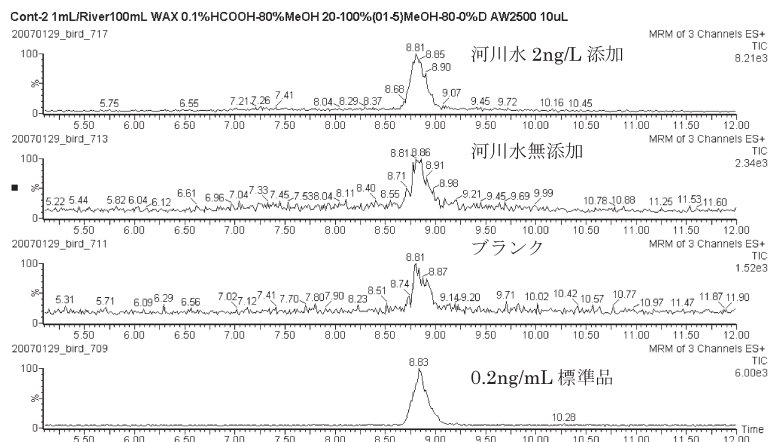


図14 河川水のクロマトグラム（高感度分析法，モノ体）

な迅速分析法を確立した。

- 5) Oasis WAX カラムを用いて河川水を濃縮する分析法を検討し、1ng/L レベルの高感度分析が可能な分析法を確立した。

謝 辞

鳥インフルエンザ発生に伴う周辺環境調査の実施に際し、分析法に関する情報を提供していただいた 山口県保健環境研究センター 下濃義弘氏他の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産省：高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針（平成16年11月18日）
- 2) 日本工業規格 (JIS) K0102 (工業排水試験法)，日本規格協会，1998
- 3) 特許庁公開特許公報 (A) 特開2003-156483 (P2003-156483A)：陽イオン界面活性剤の定量法（出願者：日本大学，発明者：渋谷雅美），2001