

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
 - 3-クロロ-2-プロペン酸の水質分析法の検討 -

Study on the development of analysis method of chemical substances at the time of water quality accidents
 - Study of water quality analysis method of 3-chloro-2-propenoic acid -

浦山豊弘, 大月史彦, 山本浩司, 吉岡敏行 (水質科)

URAYAMA Toyohiro, OTSUKI Fumihiko, YAMAMOTO Koji, YOSHIOKA Toshiyuki (Water Section)

要 旨

環境基本法に基づき水質汚濁に係る環境基準等が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物である3-クロロ-2-プロペン酸について、水質試料の分析法を検討した。水質試料にギ酸を加えて酸性にし、グラファイトカーボン固相カートリッジで抽出して前処理を行い、Amide系カラムを用い、移動相の初期条件をアセトニトリル99%とすることで異性体をそれぞれ分離した定量が可能となった。保存性試験の結果、水質試料中での分解性が確認されたが、ギ酸を添加することで7日間は安定であった。本法の検出下限値はtrans体が0.10 µg/L、cis体が0.12 µg/Lであった。

[キーワード：3-クロロ-2-プロペン酸, 水質, 1,3-ジクロロプロペン, LC-MS/MS]

[Key words : 3-Chloro-2-propenoic acid, Water quality, 1,3-Dichloropropene, LC-MS/MS]

1 はじめに

事故時等緊急時に対応するためには、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等が必要であり、当センターは毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法開発及び環境中濃度の調査を行っている。平成27～30年度の化学物質環境実態調査においては、3-クロロ-2-プロペン酸の水質分析法を検討してきた。

3-クロロ-2-プロペン酸は、環境基本法に基づく水質汚濁に係る環境基準等が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物¹⁾である。本物質には異性体としてtrans体とcis体が存在し、それぞれを分離して定量する分析法の開発が緊急時の的確な対応実施のために必要不可欠となっている。今回、当センターにおいて、同物質についてグラファイトカーボン固相カートリッジで抽出し、LC-MS/MSで測定する方法によるtrans体及びcis体の分離分

析法を開発したので報告する。

2 試験方法

2.1 対象物質の構造と性状

対象物質の構造を図1に、物理化学的性状を表1に示す。

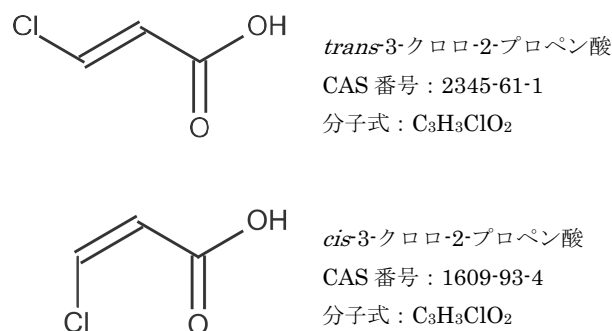


図1 対象物質の構造

表1 3-クロロ-2-プロペン酸の物理化学的性状

物質名	分子量 (モライトビック質量)	比重 (g/cm ³)	沸点 (°C)	融点 (°C)	水溶解度 (mg/mL)	log P _{ow}
<i>trans</i> -3-クロロ -2-プロペン酸	106.51 (105.9822)	1.2288 (概算)	118.27 (概算)	82-85	57.6 (推定値)	0.80 (推定値)
<i>cis</i> -3-クロロ -2-プロペン酸	106.51 (105.9822)	1.2288 (概算)	118.27 (概算)	60-64	68.77 (推定値)	0.87 (推定値)

2.2 試薬等

trans-3-クロロ-2-プロペン酸：Acros Organics製（純度99 %）

cis-3-クロロ-2-プロペン酸：Acros Organics製（純度99 %）
1 mol/L酢酸アンモニウム溶液：HLPC用 富士フィルム和光純薬製

アセトニトリル，ギ酸：LC/MS用 富士フィルム和光純薬製

トルエン，アセトン：残留農薬・PCB試験用（濃縮5000）
富士フィルム和光純薬製

精製水：メルクミリポア製 Milli-Q Advantageにより調製

固相カートリッジ：シグマアルドリッチ製 Supelclean ENVI-Carb Plus, 400 mg, 1 mL, reversible tube

0.45 μmフィルター：メルクミリポア製 MILLEX-LCR 13 mm

2.3 LC-MS/MSの測定条件

[LC条件]

使用機種：Waters製 Alliance 2695

カラム：Waters XBridge Amide (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)

移動相：A：アセトニトリル

B：10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液（pH 9.5）

（1 mol/L酢酸アンモニウム水溶液10 mLに精製水を加えて1 Lに定容した後，アンモニア水を加えてpHを調整したもの）

0→15 min A :99→70, B :1→30 linear gradient

15→15.1 min A :70→50, B :30→50 linear gradient

15.1→20 min A : B = 50 : 50

20→20.1 min A :50→99, B :50→1 linear gradient

20.1→40 min A : B = 99 : 1

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40 °C

試料注入量：5 μL

[MS条件]

使用機種：Waters Quattro micro API

キャピラリー電圧：3 kV

ソース温度：100 °C

デソルベーション温度：500 °C

コーンガス量：50 L/h

デソルベーション流量：600 L/h

イオン化法：ESI-Negative

測定モード：SRM

コーン電圧：13 V

コリジョン電圧：7 eV

モニターイオン：m/z 104.9 > 34.9（定量用）

m/z 106.9 > 36.9（確認用）

2.4 混合標準溶液の調製

2.4.1 混合標準溶液の調製

trans-3-クロロ-2-プロペン酸10.0 mgをアセトニトリルで10 mLに定容し，1000 mg/Lのtrans体標準原液を調製した。cis-3-クロロ-2-プロペン酸についても同様の操作で，1000 mg/Lのcis体標準原液を調製した。

trans体標準原液，cis体標準原液を各1 mL分取し，アセトニトリルで10 mLに定容し，各100 mg/Lの混合標準溶液を調製した。

2.4.2 添加用標準液及び検量線用標準液の調製

混合標準溶液をアセトニトリルで段階的に希釈し，1 mg/L及び10 mg/Lの添加用標準液（添加回収試験，分解性スクリーニング試験等に使用）並びに2～200 μg/Lの検量線用標準液を調製した。

2.5 固相抽出の検討

2.5.1 固相溶出溶媒の検討

精製水10 mLに標準物質各0.01 μg，ギ酸20 μLを添加し，グラファイトカーボン固相カートリッジのENVI-Carb Plus（以下「固相カートリッジ」という。）に通水後，窒素を10分間通気（以下「窒素通気」という。）及びアセトン2 mLを通液（以下「アセトン通液」という。）して脱水した。これを組成を変えた6通りの溶媒で試料水の通液時とは逆の方向から通液して溶出（以下「バックフラッシュ溶出」という。）し，溶出液を窒素気流下で濃縮後，アセトニトリル1 mLに転溶し，回収率を比較した。

2.5.2 固相カートリッジのコンディショニング条件の検討

固相カートリッジを4通りの条件でコンディショニングした後，標準物質各0.01 μgを添加した精製水10 mLを通水した。窒素通気及びアセトン通液で脱水後，アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し，溶出液を窒素気流下で濃縮した後，アセトニトリル1 mLで定容し，回収率を比較した。

2.5.3 pH調整条件の検討

精製水100 mLに標準物質各0.01 μgを添加し，ギ酸又は塩酸を用いてpHを計6通り調整して固相カートリッジに通水し，窒素通気及びアセトン通液で脱水後，アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し，溶出液を窒素気流下で濃縮後，アセトニトリル1 mLで定容し，回収率を比較した。

2.5.4 最終液量の検討

マトリックス成分に起因する回収率の低下の有無を検討するため、海水（倉敷市水島沖で採水）100 mLに標準物質各0.01 µg、ギ酸200 µLを添加し、固相カートリッジに通水し、窒素通気及びアセトン通液で脱水後、アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮後、最終試験液1 mLとしてアセトニトリルで定容したものと、同じ最終試験液をアセトニトリルでそれぞれ10倍希釈したものについて、回収率を比較した。

2.6 前処理方法

採用した分析法のフローチャートを図2に示す。なお、対象物質は試験液に水が混入すると保持時間が短くなる性質があり、窒素通気及びアセトン通液による脱水で検討を進めていたが、アセトン通液による保持時間の差が認められなかったため、窒素通気のみ実施することとした。

水質試料100 mLにギ酸200 µLを添加した後、あらかじめトルエン10 mL、アセトン10 mL、精製水10 mLで順次コンディショニングした固相カートリッジに10 mL/minで通水した。通水後、固相カートリッジを精製水10 mLで洗浄し、窒素通気で脱水後、アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出した。溶出液を窒素気流下で1 mL程度まで濃縮してアセトンを除去し、アセトニトリルで10 mLに定容後、0.45 µmフィルターでろ過したものを試験液とした。

2.7 試料注入量の検討

海水又は河川水（笹ヶ瀬川の笹ヶ瀬橋で採水）100 mLに標準物質各0.02 µgを添加し、2.6に従い前処理を行ったものを測定試料とした。LC-MS/MSへの試料注入量を5

µL, 10 µL, 20 µLと変更し、回収率を比較した。

2.8 IDL, MDL及びMQLの算出

装置検出下限値（以下「IDL」という。）、分析法の検出下限値（以下「MDL」という。）及び定量下限値（以下「MQL」という。）の算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成27年度版）」²⁾に従った。IDLは、5 µg/Lの検量線用標準液を7回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL及びMQLは、海水100 mLに、試料中濃度がIDL試料換算値の5倍程度に当たる0.5 µg/Lとなるように標準物質各0.05 µgを添加し、2.6に従い前処理を行ったものを7検体作製し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1, I} \times 2$$

$$MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1, M} \times 2$$

$$MQL = 10 \times \sigma_{n-1, M}$$

t(n-1, 0.05)：危険率5%，自由度n-1のt値（片側）

$\sigma_{n-1, I}$ ：IDL算出のための測定値の標本標準偏差

$\sigma_{n-1, M}$ ：MDL算出のための測定値の標本標準偏差

2.9 添加回収試験、環境試料及び操作ブランクの分析

河川水100 mLに標準物質各0.1 µgを添加し、2.6に従い前処理して測定した。なお、海水はMDL試験の結果を添加回収試験結果として採用した。環境試料として、無添加の河川水及び海水を同様に前処理して測定し、その結果を添加回収試験の試料ブランクとし、また、操作ブランクとして、精製水100 mLを同様に前処理して測定した。

2.10 分解性スクリーニング試験及び保存性試験

試料中で対象物質の安定性を確認するため、手引き²⁾に従い7日間の分解性スクリーニング試験及び保存性試験を実施した。

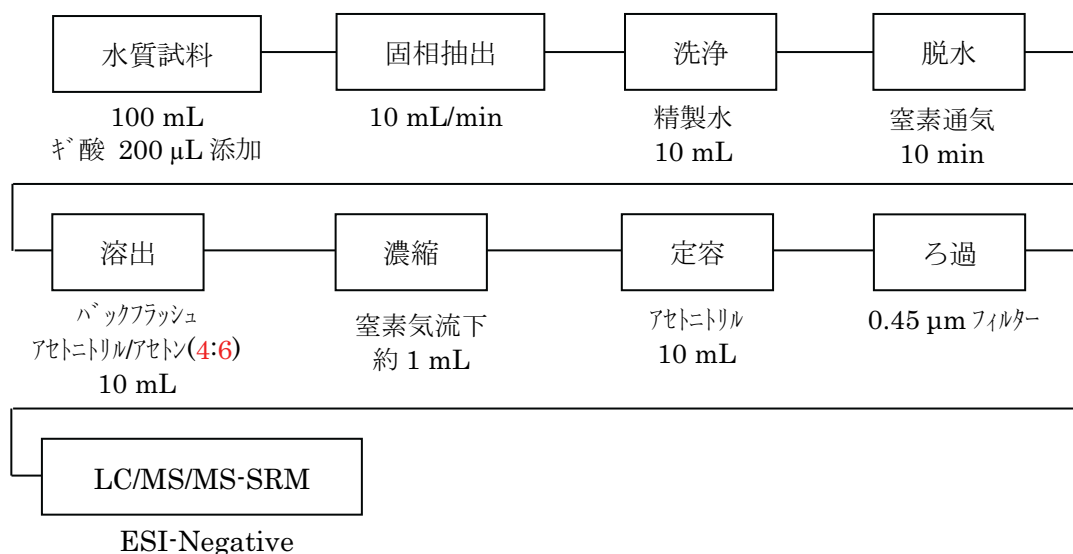


図2 分析法のフローチャート

分解性スクリーニング試験の試験液は、精製水のpHを5、7及び9に調整後、各100 mLに標準物質各10 µgを添加し、1時間後及び7日後（約20 °Cの明所及び暗所に保存）に精製水で100倍に希釈し、2.6に従い前処理して測定した。

保存性試験は、新鮮な河水水を用い、各1 µg/Lになるよう試料100mLに標準物質各0.1 µgを添加した後、分解の抑制のためのギ酸200 µLを添加したものと添加していないものの2種類を作製し、それぞれ冷暗所で1～7日間保存後、2.6に従い前処理して測定した。

また、抽出液（試験液）の保存性試験として、試験液濃度が各10 µg/Lになるよう試料100mLに標準物質各0.1 µgを添加し、2.6に従い前処理した試験液を測定した後、試験液を冷暗所で14日間保存し、当日の測定値と14日後の測定値を比較した。

併せて、検量線用標準液の保存性試験として10 µg/Lの検量線用標準液を冷暗所に保存し、1か月後に再調製し

た検量線用標準液と測定値を比較した。

3 結果及び考察

3.1 測定イオンの検討結果

cis-3-クロロ-2-プロペン酸のメタノール溶液をESI Negativeでインフュージョン測定したマススペクトルを図3に示す。 ^{35}Cl の $[\text{M}-\text{H}]^-$ に相当する m/z 104.9とその同位体 (^{37}Cl) の $[\text{M}-\text{H}]^-$ の m/z 106.9が検出された。

次に、プレカーサーイオン m/z 104.9に対するプロダクトイオンのスペクトルを図4に示す。 $^{35}\text{Cl}^-$ と考えられる m/z 34.9のみが検出された。同様にプレカーサーイオン m/z 106.9に対するプロダクトイオンは図5のとおり $^{37}\text{Cl}^-$ と考えられる m/z 36.9のみであり、また、trans-3-クロロ-2-プロペン酸のプレカーサーイオン、プロダクトイオンもcis体と同様であった。

このことから、測定イオンを m/z 104.9 > 34.9 (定量用)、 m/z 106.9 > 36.9 (確認用)とした。

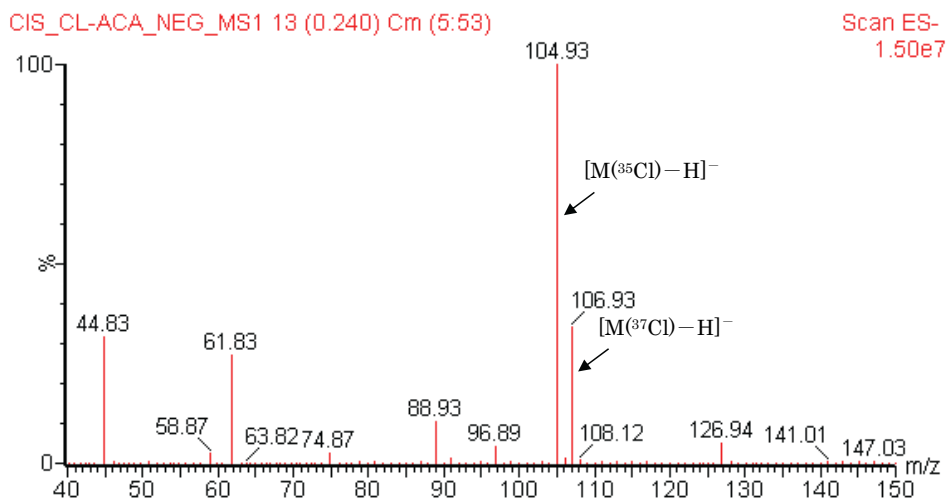


図3 cis-3-クロロ-2-プロペン酸のマススペクトル

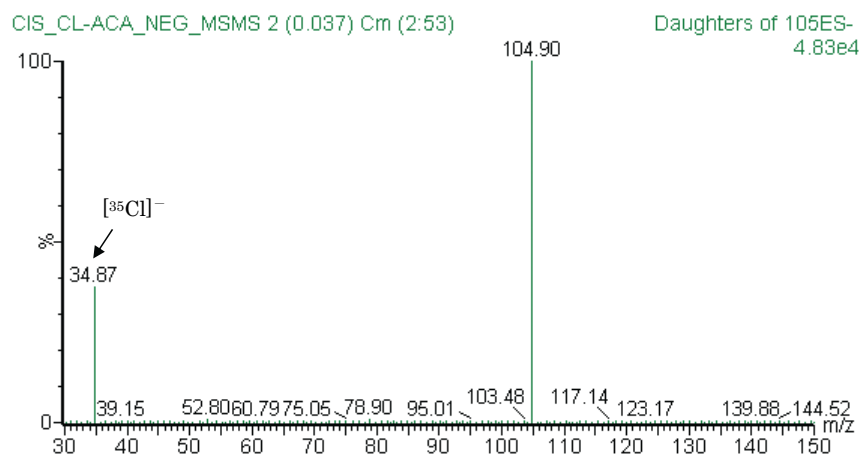


図4 プレカーサーイオン m/z 104.9に対するプロダクトイオン

3.2 測定カラム及び移動相の検討結果

対象物質は表1のとおり水溶解度が大きく $\log P_{ow}$ が小さく親水性の高いことから、一般に用いられているC18等の逆相系測定カラムでは測定が困難であり、逆逆相カラムであるAmideカラムを使用した。更に、水又はメタノールの割合が多くなるとカラムに保持しにくくなるため、移動相の初期条件をアセトニトリル：水溶液=99:1とすることで、十分な保持時間を得ることができ、異性体分離も可能であった。

また、逆逆相カラムの場合、目的物質をイオン化させた方が保持しやすくなることから移動相をアルカリ性にする事とし、アルカリ性でも使用できるXBridge Amideを使用し、水系移動相のpHを9.5とした。標準液のクロマトグラムを図6に示す。

3.3 検量線の測定結果

検量線を図7及び図8に示す。trans体及びcis体の低濃度域検量線及び高濃度域検量線のいずれも $r^2 > 0.999$ で良好な直線性があった。

3.4 固相抽出の検討結果

3.4.1 固相溶出溶媒の検討結果

溶媒ごとの回収率を表2に示す。アセトニトリル/アセトン (4:6) 10 mL溶出でほぼ100%の回収が可能であった。

3.4.2 固相カートリッジのコンディショニング条件の検討結果

コンディショニング条件ごとの回収率を表3に示す。トルエン10 mL, アセトン10 mL, 精製水10 mLの順にコンディショニングした場合にほぼ100%の回収率となった。なお、trans体において、他のコンディショニング条件では回収率が低くなった。

3.4.3 pH調整条件の検討結果

酸の種類及び添加量ごとの回収率を表4に示す。精製水100 mLにつきギ酸を200 μ L又は400 μ L加えてpH調整した場合に回収率が高く、塩酸でpH調整した場合は回収率が低くなった。なお、ギ酸添加量は400 μ Lで最も高い回収率が得られたが、200 μ Lでも十分な回収率が得られたので、ギ酸添加量は200 μ Lとした。

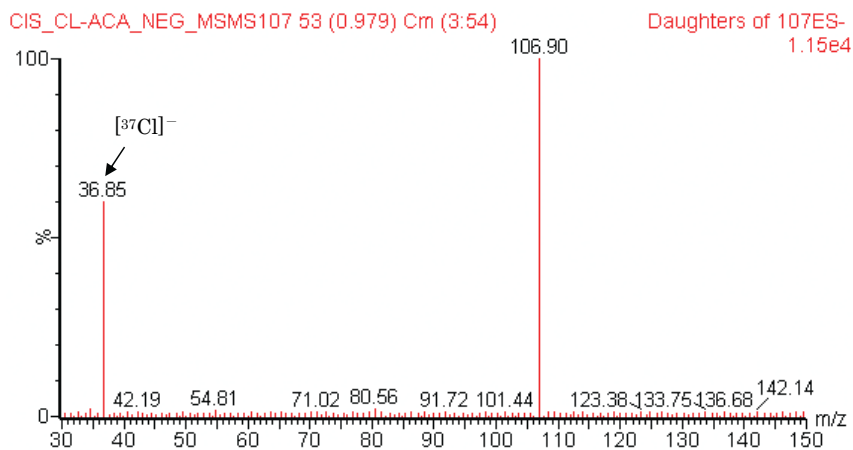


図5 プレカーサーイオン m/z 106.9に対するプロダクトイオン

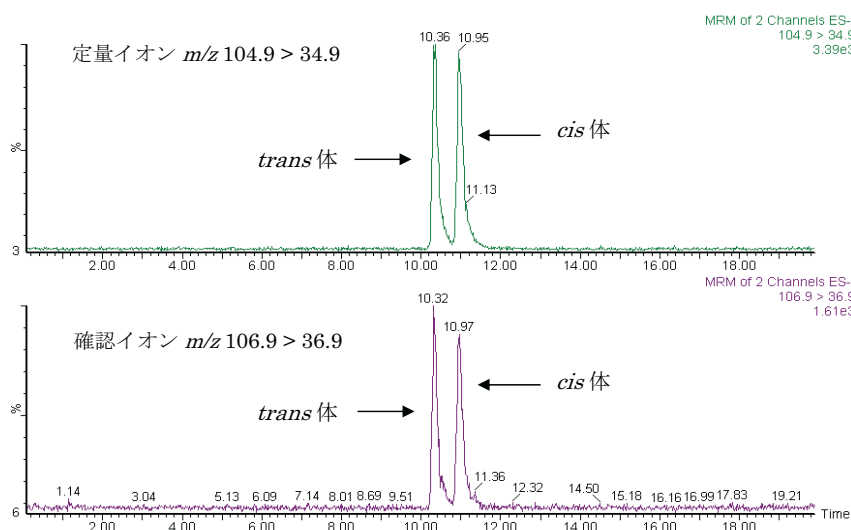


図6 標準液のクロマトグラム

3.4.4 最終液量の検討結果

表5の①及び②のとおり，最終液量を1 mLにすると回収率が低下し，値もばらつきが見られた。これに対し，アセトニトリルで希釈して最終液量10 mLにすると，表5

の③及び④のとおりマトリックスの影響を抑えることができ，回収率70%を確保できたので，最終液量は10 mLとした。

3.5 試料注入量の検討結果

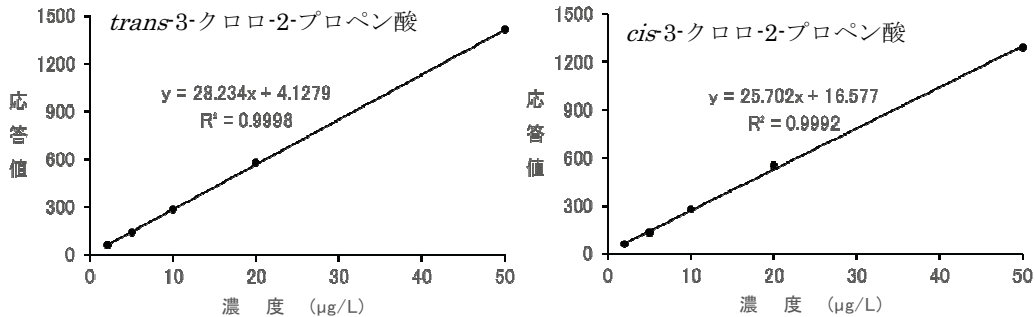


図7 低濃度域検量線

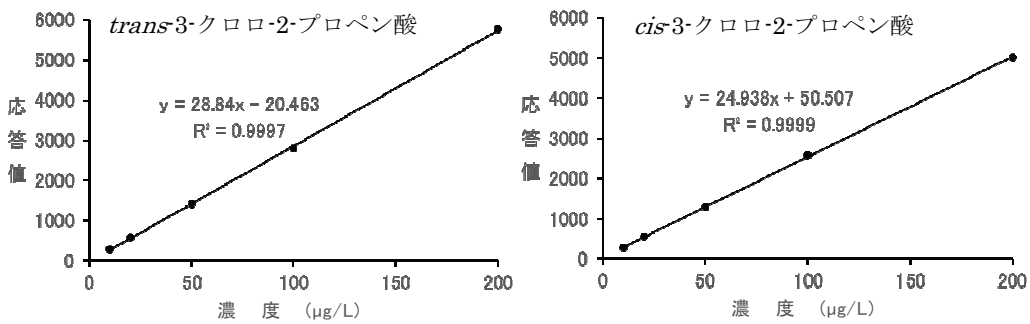


図8 高濃度域検量線

表2 溶出溶媒組成と回収率

溶媒組成	回収率(%)			
	0-10 mL		10-20 mL	
	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体
アセトニトリル/アセトン(2:8)	58	58	-	-
アセトニトリル/アセトン(4:6)	104	100	1.5	1.0
アセトニトリル/アセトン(5:5)	81	90	5.8	7.9
アセトニトリル/アセトン(6:4)	96	91	5.5	2.5
トルエン/アセトン(2:8)	75	69	-	-
アセトニトリル	90	90	10	10

表3 コンディショニング条件と回収率

コンディショニング条件	回収率(%)	
	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体
コンディショニングなし	28	60
アセトニトリル 10 mL + アセトン 10 mL + 精製水 10 mL	82	94
アセトニトリル 20 mL + アセトン 20 mL + 精製水 20 mL	87	116
トルエン 10 mL + アセトン 10 mL + 精製水 10 mL	98	103

試料注入量と回収率の関係を表6に示す。注入量が少ないほど回収率が高くなったので、試料注入量は5 µLとした。検出下限値を下げるためには試料注入量が多い方が有利であるが、注入量が多いほど回収率が低下しており、これはマトリックス成分によるイオン化抑制が原因と考えられた。

3.6 IDL, MDL及びMQLの算出結果

IDLを表7に、MDL及びMQLを表8に示す。IDL試料換算値はtrans体0.074 µg/L, cis体0.094 µg/L, MDLはtrans体0.10 µg/L, cis体0.12 µg/L, MQLはtrans体0.25 µg/L, cis体0.30 µg/Lであった。

3.7 添加回収試験及び環境試料分析結果

添加回収試験結果を表9に、環境試料及び添加回収試

料のクロマトグラムを図9～12に示す。海水の回収率はtrans体80%, cis体81%, 河川水の回収率はtrans体83%, cis体78%と良好な結果であった。無添加の河川水及び海水並びに操作ブランクからは、trans体, cis体ともに検出されなかった。

3.8 分解性スクリーニング試験

分解性スクリーニング試験結果を表10に示す。1時間後の残存率と7日後の残存率に差は確認されず、pH又は光による分解性は確認されなかった。

3.9 保存性試験結果

試料水の保存性試験結果を表11に示す。

ギ酸を添加していない試料水中では、trans体, cis体ともに7日間で残存率が10%未満まで分解していたが、ギ

表4 酸の種類・添加量と回収率

調整試薬	調整条件 (pH(添加量))	回収率(%)	
		trans 体	cis 体
	無調整	5.5	16
	pH 2.3 (400 µL)	95	83
ギ酸 (精製水 100 mL)	pH 2.4 (200 µL)	92	83
	pH 2.6 (100 µL)	83	73
	pH 1	19	59
塩酸 (精製水 100 mL)	pH 2	27	66
	pH 4	26	44

表5 海水試料における最終液量と回収率

海水試料 (100 mL)	回収率(%)		
	trans 体	cis 体	
最終液量 1 mL	①	52	31
	②	56	60
最終液量 10 mL	③	72	71
	④	75	72

表6 試料注入量と回収率

注入量 (µL)	回収率(%)			
	trans 体		cis 体	
	海水	河川水	海水	河川水
20	88	91	36	80
10	86	91	54	86
5	91	98	78	86

表7 IDLの算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL試料換算値 (µg/L)
trans-3-クロロ-2-プロペン酸	3.7	100	10	0.074
cis-3-クロロ-2-プロペン酸	4.7	100	10	0.094

表8 MDL及びMQLの算出結果

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
trans-3-クロロ-2-プロペン酸	100	10	0.10	0.25
cis-3-クロロ-2-プロペン酸	100	10	0.12	0.30

酸を試料100 mLにつき200 μL添加することで、7日間保存可能であった。

本結果から、当日中に抽出操作ができない場合、抽出時に添加するギ酸（試料100 mLにつき200 μL）をあらかじめ添加すれば保存できることが分かった。

なお、表12に示すとおり、抽出液（試験液）及び検量線用標準液については、保存性の問題は確認されなかった。

表9 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (mL)	添加量 (μg)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
<i>trans</i> -3-クロロ-2-プロペン酸	海水	100	0	10	1	< 0.10	-	-
		100	0.05	10	7	0.40	80	7.8
	河川水	100	0	10	1	< 0.10	-	-
		100	0.1	10	5	0.83	83	6.9
<i>cis</i> -3-クロロ-2-プロペン酸	海水	100	0	10	1	< 0.12	-	-
		100	0.05	10	7	0.40	81	7.4
	河川水	100	0	10	1	< 0.12	-	-
		100	0.1	10	5	0.78	78	7.1

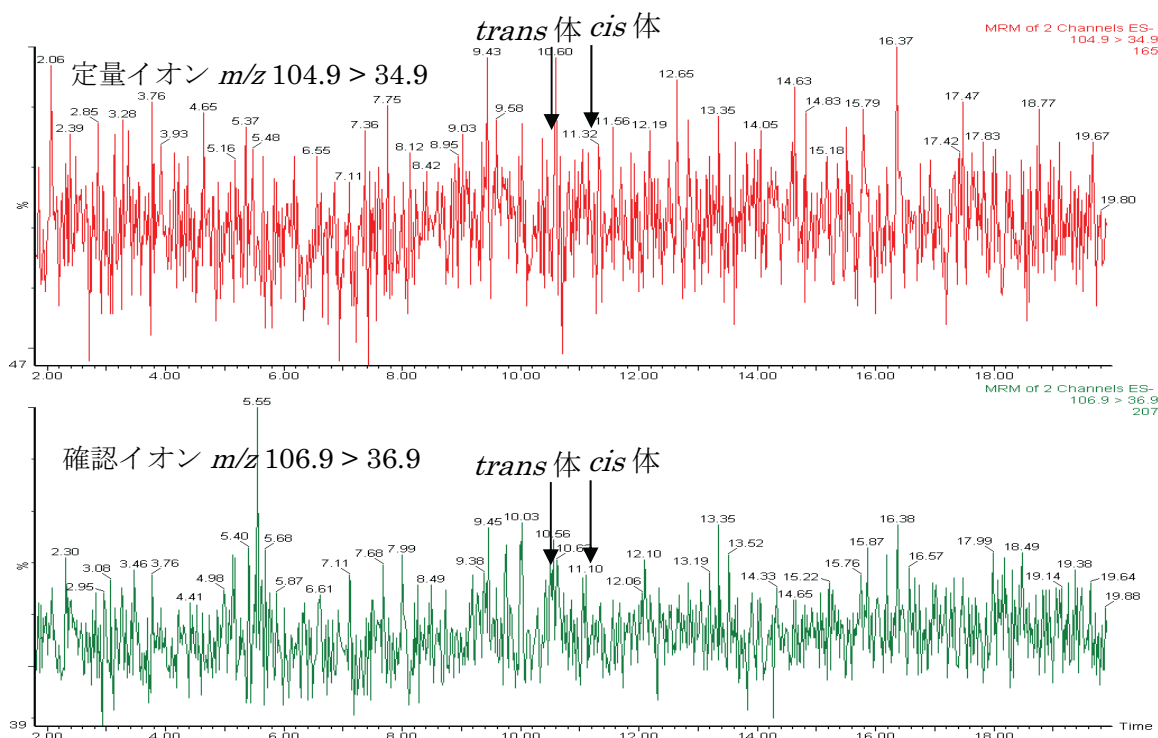


図9 無添加試料（海水）のSRMクロマトグラム

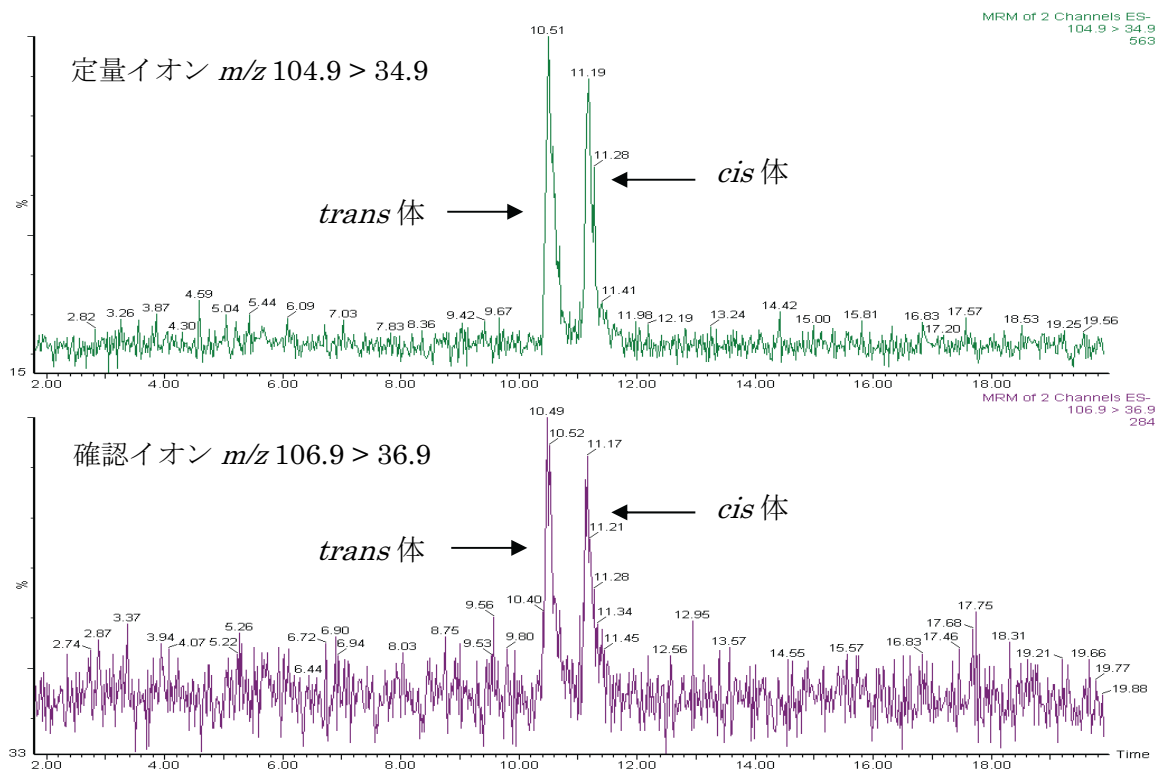


図10 添加試料（海水）のSRMクロマトグラム

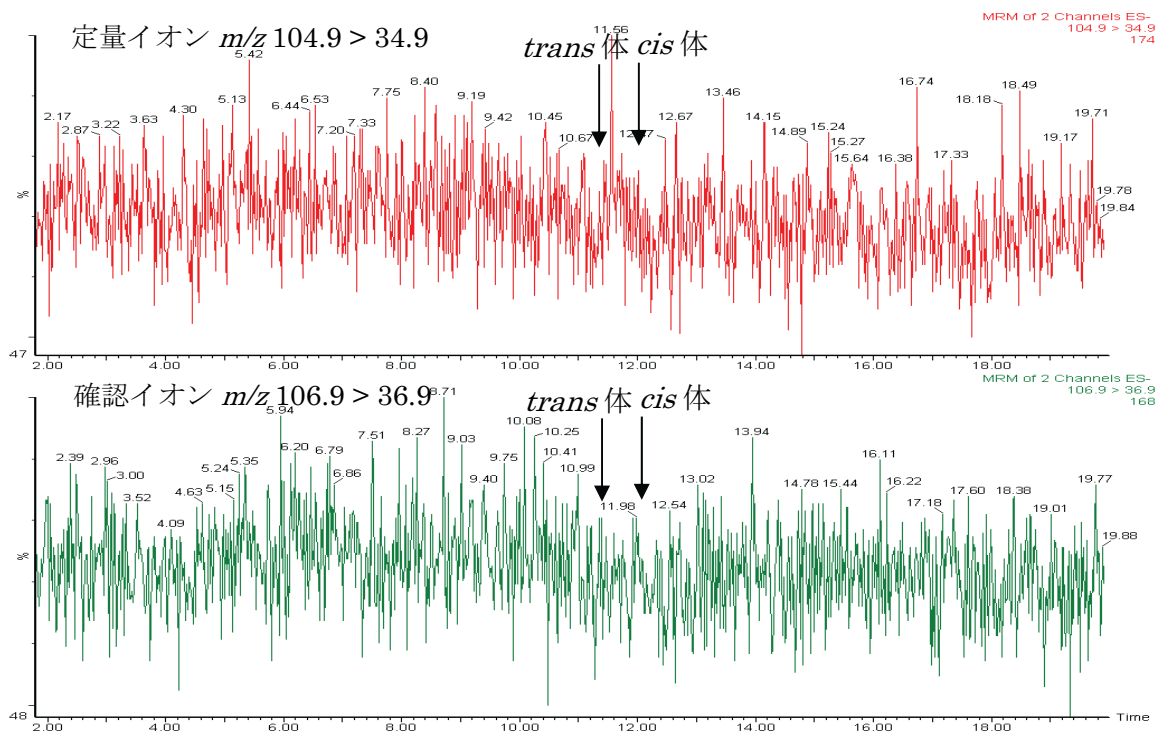


図11 無添加試料（河川水）のSRMクロマトグラム

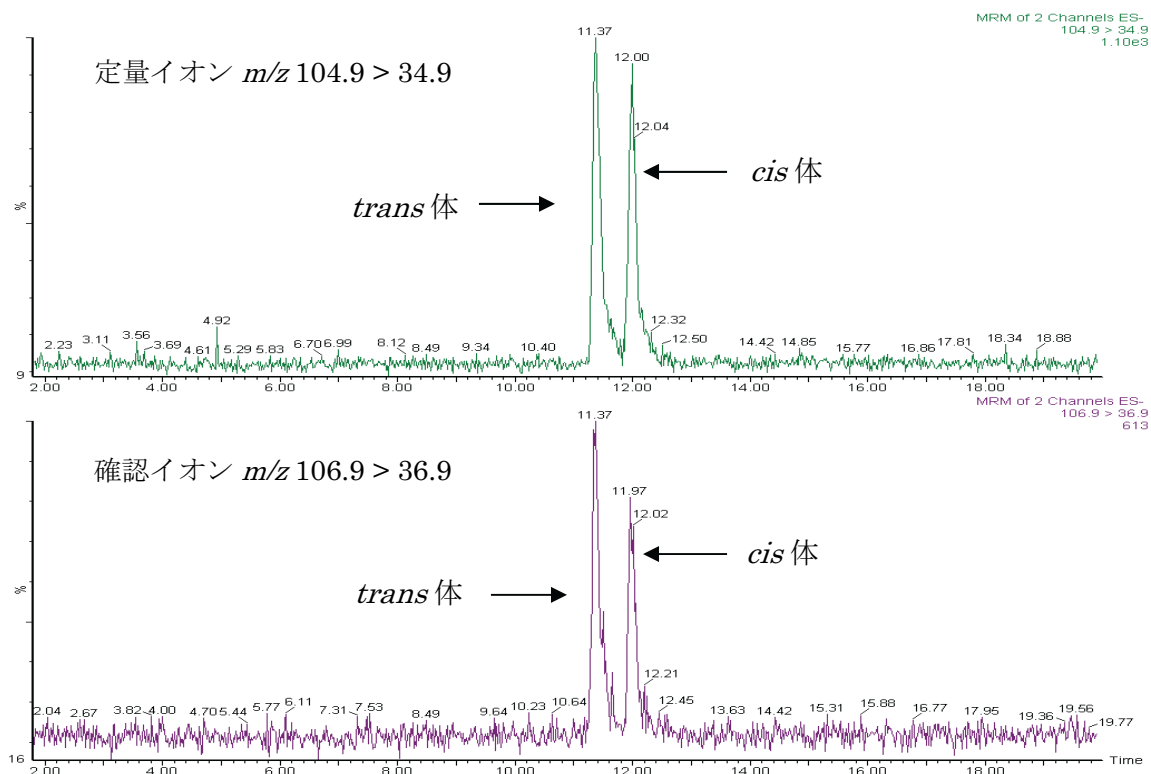


図12 添加試料（河川水）のSRMクロマトグラム

表10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	精製水中の 調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*		
			1 時間後	7 日後	
				暗所	明所
<i>trans</i> -3-クロロ-2- プロペン酸	5	100	87	87	-
	7	100	100	100	99
	9	100	96	95	-
<i>cis</i> -3-クロロ-2- プロペン酸	5	100	77	76	-
	7	100	88	88	86
	9	100	85	82	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表11 保存性試験結果 (試料水)

試料名	試験数	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*				
			1 日間	3 日間	7 日間		
河川水 (100 mL)	無添加	<i>trans</i> 体	2	1.0	74	43	9
		<i>cis</i> 体	2	1.0	47	6	<2
	ギ酸添加 (200 μL)	<i>trans</i> 体	2	1.0	—	—	101
		<i>cis</i> 体	2	1.0	—	—	96

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表12 保存性試験結果 (抽出液及び標準液)

試料名	試験数	調製 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*		
			14 日間	1 か月	
抽出液 (試験液)	<i>trans</i> 体	2	10	101	—
	<i>cis</i> 体	2	10	96	—
検量線用 標準液	<i>trans</i> 体	2	10	—	100
	<i>cis</i> 体	2	10	—	100

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

4 まとめ

3-クロロ-2-プロベン酸の分析法を検討し、次の結果を得た。

- (1) 親水性の高い物質であり、グラファイトカーボン固相カートリッジで抽出し、Amideカラムで測定する方法で、*trans*体及び*cis*体の分離分析ができた。
- (2) 最終液量1 mL又は注入量10 μL では回収率が低くなる傾向があったが、最終液量10 mLで注入量5 μL とすることにより、回収率70%以上の安定した回収率となった。
- (3) MDLは*trans*体0.10 $\mu\text{g/L}$ 、*cis*体0.12 $\mu\text{g/L}$ 、MQLは*trans*体0.25 $\mu\text{g/L}$ 、*cis*体0.30 $\mu\text{g/L}$ であった。
- (4) 添加回収試験の回収率は、海水で*trans*体80%、*cis*体81%、河川水で*trans*体83%、*cis*体78%と良好な結果であった。

(5) 精製水中でのpH又は光による分解性は、7日間確認されなかった。

(6) 試料水中での分解性が確認されたが、ギ酸を添加することで、7日間の保存が可能であった。

なお、本研究は環境省委託の平成27～30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) IPCS(1993)Environmental Health Criteria,146
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成27 年度版), 2016