

【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-ベンジリデンカンファ－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-benzylidene camphor－

大月史彦, 浦山豊弘, 山本浩司, 吉岡敏行 (水質科)

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

要 旨

環境試料(水質中)の3-ベンジリデンカンファ－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、固相を有機溶媒含有水、アルカリ、酸の順に洗浄した後、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、光によるピークの減少が起るため、前処理時に注意が必要であった。開発した分析法では、要求感度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、3-ベンジリデンカンファ－は検出されなかった。

[キーワード: 3-ベンジリデンカンファ－, LC-MS/MS, 紫外線吸収剤]

[Key words: 3-Benzylidene camphor, LC-MS/MS, Ultraviolet absorber]

1 はじめに

3-ベンジリデンカンファ－は紫外線を吸収する能力が高く、日焼け止めや化粧品に含有されているが、内分泌かく乱作用が疑われている物質でもあり、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に選定され、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

3-ベンジリデンカンファ－: SIGMA-ALDRICH製

(analytical standard, $\geq 97.0\%$ (GC))

1 mol/L塩酸: 富士フィルム和光純薬製

1 mol/L水酸化ナトリウム: 富士フィルム和光純薬製

アセトニトリル, メタノール: 富士フィルム和光純薬製

LC/MS用

精製水: ミリポア製 Milli-Q Advantageにより調製

固相カートリッジ: Waters製 Oasis HLB Plus LP (225 mg)

固相カートリッジ: GL Sciences製 InertSep PLS-3 (200 mg)

ろ過フィルター: ミリポア製 Millex FilterUnit (13mm,

0.45 μ m)

5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液: 富士フィルム和光純薬製高速液体クロマトグラフ用

1 mol/L酢酸アンモニウム水溶液と精製水で調製

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 150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m (Waters製)

移動相: A (5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液): B (アセトニトリル)

0 ~ 0.1 min A : B = 80 : 20

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

9 ~ 20 min A : B = 2 : 98

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

20.5 ~ 33 min A : B = 80 : 20

流量: 0.2 mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

注入量: 10 μ L

(MS条件)

使用機種: Micromass Quattro micro API (Waters製)

キャピラリー電圧 : 3.0 kV

ソース温度 : 100 $^{\circ}$ C

デゾルベーション温度：500℃
 コーンガス流量：50 L/h
 デゾルベーションガス流量：600 L/h
 イオン化法：ESI Positive
 測定モード：SRM
 コーン電圧：30 V
 コリジョンエネルギー：10 eV (241.2>241.2のみ), 20 eV (それ以外)

モニターイオン(m/z)：241.2>241.2, 241.2>223.2,
 241.2>213.2, 241.2>198.1,
 241.2>181.1, 241.2>171.1,
 241.2>157.1, 241.2>143.1,
 241.2>131.1, 241.2>111.1,
 241.2>105.1, 241.2>97.1
 (本分析では、241.2>198.1を定量に使用)

2.3 分析法

分析法は、既報^{1)~5)}を基に、図1のフローチャートで示す方法とした。

あらかじめアセトニトリル10 mL、精製水10 mLの順でコンディショニングした固相カートリッジに水質試料100 mLを10 mL/minの速さで通水し、捕集する。固相カートリッジを精製水10 mL (使用器具を洗込)、40%アセトニトリル水溶液5 mL (同洗込)、精製水5 mL (同洗込)、30%アセトニトリル含有0.01 mol/L水酸化ナトリウム5 mL、精製水5 mL、30%アセトニトリル含有0.01 mol/L塩酸5 mL、精製水5 mLの順に洗浄し、窒素窒素を5分間通気する。これをアセトニトリル5 mLで溶出し、窒素気流下で0.4 mL程度まで濃縮し、アセトニトリルで1 mL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。

対象物質は、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500 lux未満で1~2時間程度の作業の場合は著しい分解は生じない。

2.4 装置検出下限値(IDL), 分析法検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)

IDL, MDL及びMQL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)」⁶⁾(以下「手引き」という。)に従った。IDLは、5 ng/mLの検量線用標準液を7回測定し、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、河川水(霞橋)に、IDL試料換算値の5倍程度の濃度となるように1 µg/mL標準液を10 µL添加し、分析フローに従い前処理を行ったものを7個作製して測定し、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

2.5 分解性スクリーニング試験, 保存性試験(新鮮試料及び粗抽出液), 添加回収試験

手引きに従い、分解性スクリーニング試験, 保存性試験及び添加回収試験を実施した。

分解性スクリーニング試験の試験液は精製水を用いてpH 5, pH 7及びpH 9のものを各100 mL作製し、これにMDL試料換算値の30倍程度の濃度となるように1 µg/mLの標準液を100 µL添加し、1時間後及び14日後(約20℃の明所及び暗所に保存)に分析フローに従い前処理を行ったものを測定した。光照射による分解性が確認されたため、照射時間を変更して同様の測定を実施した。

保存性試験は、新鮮な河川水(高梁川水系の霞橋で採水)及び海水(倉敷市水島地先海域で採水)を満水に入れ、

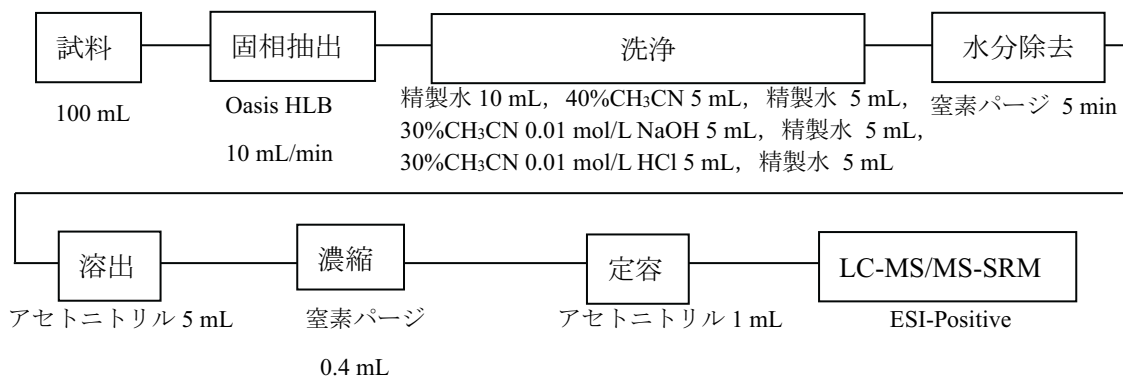


図1 分析法のフローチャート

対象物質の濃度がMDL試料換算値の10倍程度の300 ng/Lになるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を添加し、当日及び8日後（約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存）に分析フローに従い前処理後に測定した。

また、併せて粗抽出液による保存試験も実施した。これは、河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）を固相カートリッジ通水からアセトニトリルで溶出するまで前処理したものに、対象物質の濃度がMDL試料換算値の10倍程度の300 ng/Lになるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を添加し、当日及び15日後（約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存）に以降の前処理を分析フローに従って実施した後に測定したもので、抽出後の有機溶媒中における保存性が確認できる。

標準溶液の保存性試験として最高濃度の100 ng/mL及びMDLの10倍程度の20 ng/mLの検量線用標準液を33日間約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存し、33日後に新たに再調製した検量線用標準液と測定結果を比較した。

添加回収試験として海水（水島地先海域）100 mLにMDL試料換算値の30倍程度の濃度となるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準液を100 μL 添加し、分析フローに従い前処理

を行ったものを測定した。環境試料として、無添加の河川水及び海水も分析した。河川水はMDL試験の結果を添加回収試験結果として採用した。

また、操作ブランクとして精製水100 mLを分析フローに従い前処理を行ったものを測定した。

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以下の図2-1、2-2に示す。3-ベンジリデンカンファーは、プレカーサーイオンとして水素が付加した m/z 241のイオンができ、更にそのプロダクトイオンとして12種類のイオンが生じた。

図3に最低濃度（5 ng/mL）の標準液のクロマトグラムを示す。イオンは代表例を6つと12イオンのTICを示している。選択するイオンによっては近接ピーク等に注意が必要なことがわかった。

12種類のイオンを測定に用いることができ、感度、ブランク、ばらつき等を考慮して、最適なイオンを選択す

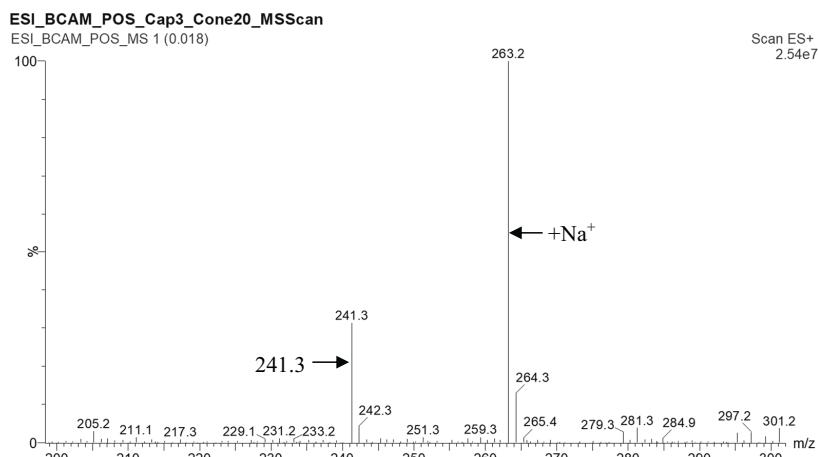


図2-1 3-ベンジリデンカンファー（プレカーサーイオン）のマススペクトル

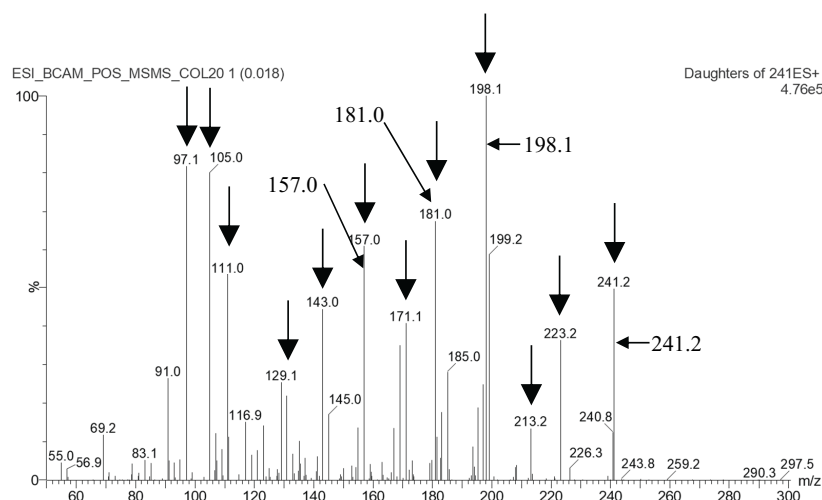


図2-2 プレカーサー m/z 241に対するプロダクトイオンのマススペクトル

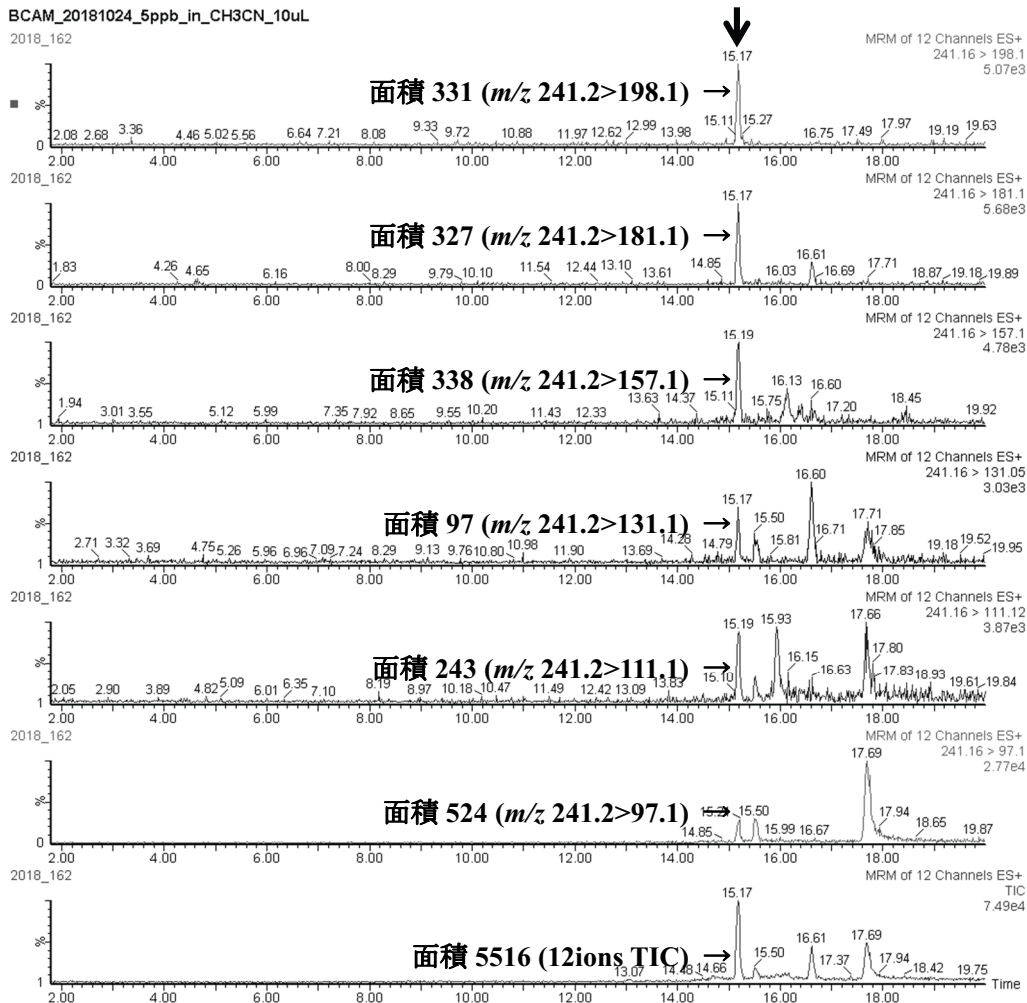


図3 3-ベンジリデンカンファアの代表的なイオンのクロマトグラム

ることが可能であった。本分析においては、241.2>198.1が感度も高く、ブランク等を考慮して良好であったため定量に用いた。

3.1.2 前処理法の検討

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固相カートリッジのHLBとPLS-3で比較したところ同程度の回収率であったが、HLBの方が通水時の抵抗が少なく操作が容易であった。
- ②夾雑物除去のため、酸やアルカリで洗浄しても、良好な回収率が得られた。
- ③HLBからの溶出時に、アセトニトリル濃度を順に変更した積み上げ回収率の結果を図4に示す。50%アセトニトリルでわずかに溶出が見られたため、40%アセトニトリルで洗浄することとした。40%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。

これらの結果を基に、前処理法を決定した。

3.2 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1に示す。pHに対しては安定性が高いが、光で残存率が低下した。

光照射時間を変更したクロマトグラム結果を図5-1～図5-5に、また照射時間による濃度減少のグラフを図5-6にそれぞれ示す。

光を照射し始めてすぐに3-ベンジリデンカンファアの濃度が減少し、同一イオンを持ち保持時間の異なる物質のピークが増加し始めるが、この増減は8時間程度で止

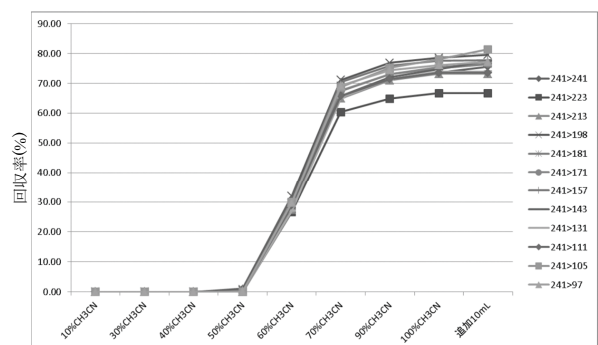


図4 HLB使用時の積み上げ回収率

まった。十分長時間（概ね8時間）光を照射すると、3-ベンジリデンカンファーと生成物の比は、一定の割合となった後に安定し、その後光照射を継続しても変化しなかった。14日光照射を継続しても、8時間照射時の濃度とほぼ同程度であった。これらの結果から、光に対して分解性（光による構造異性体化）があると考えられる。

3.3 保存性試験結果

保存性試験結果を表2に示す。各種保存性は良好であった。標準液は暗所、冷蔵の有機溶媒中で1か月以上安定である。また、暗所、冷蔵の河川水や海水中では1週間以上

安定に保存された。更に、河川水や海水をアセトニトリルに抽出した粗抽出液中（暗所、冷蔵）では2週間以上安定に保存された。

3.4 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表3に示す。添加回収試験には河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）をそれぞれ水質試験料として使用した。河川水、海水ともに良好な添加回収試験結果が得られた。

3.5 環境試料の分析結果

平成30年11月に採取した河川水（霞橋）及び海水（水

表1 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	1時間後の 残存率(%) [*]	14日後の残存率(%) [*]	
					暗所	明所
3-ベンジリデンカンファー	5	2	1.0	0.90(90)	0.91(91)	-
	7	2	1.0	0.92(92)	0.89(89)	0.47(47)
	9	2	1.0	0.96(96)	0.95(95)	-

* 各残存率は、調製濃度に対する検出濃度の割合。

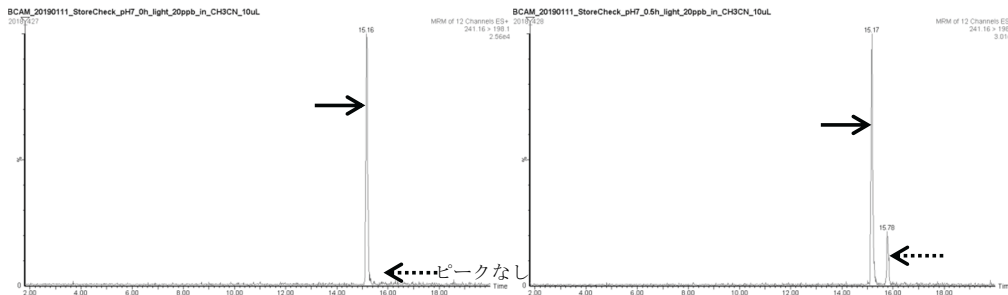


図5-1 光照射前のクロマトグラム

図5-2 光照射（0.5時間）後のクロマトグラム

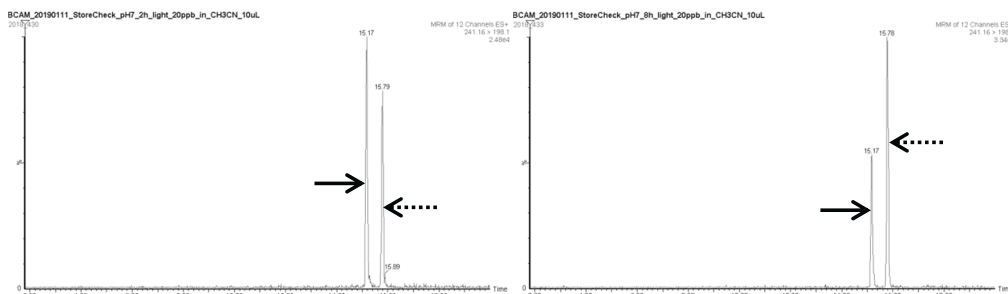


図5-3 光照射（2時間）後のクロマトグラム

図5-4 光照射（8時間）後のクロマトグラム

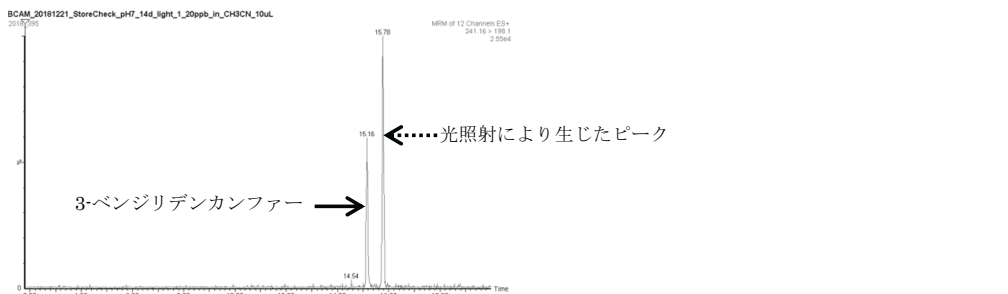


図5-5 光照射（14日）後のクロマトグラム

島地先海域)からは、対象物質は検出されなかった。装置検出下限値 (IDL), 分析法検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) はそれぞれ試料換算値で 0.015 $\mu\text{g/L}$, 0.023 $\mu\text{g/L}$ 及び0.059 $\mu\text{g/L}$ であった。

4 まとめ

3-ベンジリデンカンファアの分析法を検討し、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、LC-

MS/MS (SRM) 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、ばらつき等を考慮して、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た測定で、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、有機溶媒含有水、アルカリ、酸の順に洗浄することで、クリーンナップ

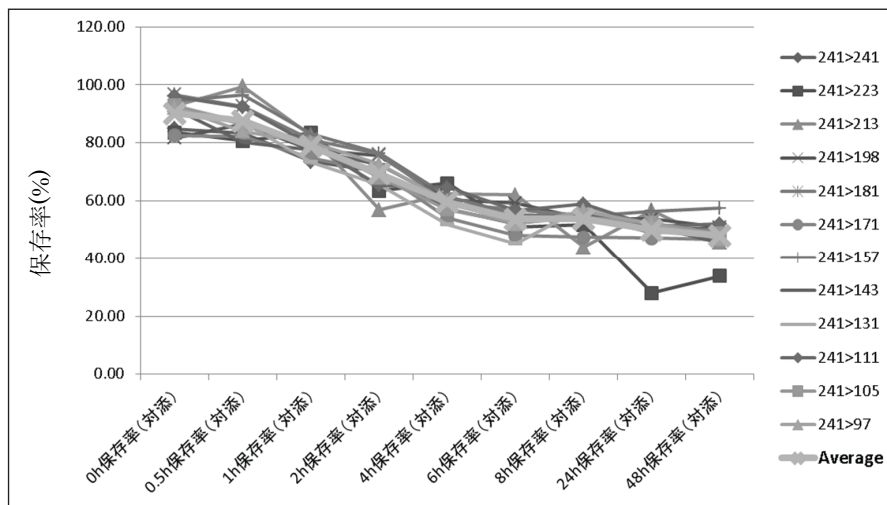


図5-6光照射時間による濃度減少 (保存率は、添加濃度を100%とした値) (対添は、添加濃度に対する各経過時間における保存率を示す。)

表2 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*			
				当日	8日後	15日後	33日後
3-ベンジ リデンカン ファー	新鮮試料	河川水	0.30	27.3(91)	27.5(92)	—	—
		海水	0.30	24.5(82)	27.1(90)	—	—
	粗抽出液	河川水	30	28.1(94)	—	30.2(101)	—
		海水	30	27.5(92)	—	30.3(101)	—
標準液	標準液(低)	20	20.6(103)	—	—	20.5(102)	
	標準液(高)	100	96.6(97)	—	—	100(100)	

* 各残存率は、調製濃度に対する検出濃度の割合。

表3 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 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
3-ベンジリ デンカンファー	河川水	100	0	1	<0.023	—	—
		100	0.010	7	0.078	78	7.6
	海水	100	0	1	<0.023	—	—
		100	0.10	5	0.77	77	4.0

- 効果を持たせつつ、良好な回収率が得られた。
- (4) モニターイオンによっては妨害があることから、複数のイオンをモニターする等の注意が必要であった。
 - (5) 添加回収試験結果は、河川水及び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、光照射でピークの減少が生じた。
 - (7) 保存性試験の結果、保存性は良好であった。
 - (8) 河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）から、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) 宮本道子, 中村義昭, 横山敏郎, 伊藤弘一, 寺島 潔ら：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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島 潔, 大貫奈穂美ら：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
- 5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成24年度化学物質分析法開発調査報告書（4-メチルベンジリデンカンファー, 水質, 岡山県環境保健センター）, 578-624, 2013
- 6) 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