

LC-MS/MS による底質中のアルキルアミノオキシドの分析法の検討

山本道方

Determination of Alkylamineoxide in Sediment by LC-MS/MS

Yamamoto Masamichi

キーワード：アルキルアミノオキシド, LC-MS/MS

Key Words : Alkylamineoxide, LC-MS/MS

はじめに

環境省の化学物質環境実態調査は一般環境中における化学物質の残留状況の把握を目的に実施され、その成果は化学物質によるリスクの把握や様々な施策に活用される。全国の地環研はこの調査に不可欠な環境試料の分析や分析法の開発において中心的な役割を担っており、当センターでは機器分析の習熟を目的に調査を受託し、環境危機事象等の問題に適切に対応できるよう、資質向上に取り組んでいる。

今回分析方法の開発を受託したアルキルアミノオキシド (AOs) (図1) は界面活性剤であり、洗剤等に使用され、環境中から検出されると予測される。生態系に対する影響が懸念されるため、国は化審法の優先評価化学物質に指定し、リスク評価を行う。ここで生態系に対するリスクは有害性と暴露量によって評価されるため、この暴露量を適切に評価できる分析法が必要となる。

アルキルアミノオキシドは分解性が良好と判断される物質¹⁾であり、環境試料の分析例として水質試料の場合、保存による濃度低減を抑制するため、アルコールによる保存処理が報告されている²⁾。一方、底質試料の場合、環境試料の保存を考慮した分析法はなく、このため底質中の残留実態を適切に

把握できない³⁾。そこで本研究では、測定対象を限定しないノンターゲット分析が可能であり、精密質量から組成式を絞り込むことが可能なLC-Q/TOFに着目し、アルキルアミノオキシド分解物を特定し、効果的な保存方法に適用することで、環境中の残留実態をより正確に把握できる分析方法の開発を目指した⁴⁾。

実験方法

1. 試薬及び器具

標準物質としては、Anatrace 製 AOC₁₀, AOC₁₂, AOC₁₄ 及び AOC₁₈ として東邦化学製ユニセーフ A-SM を用いた。

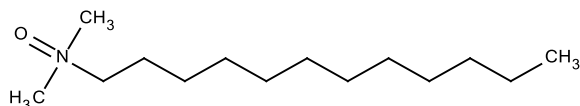


図1. アルキルアミノオキシド同族体群 (AOs) *
*AOC₁₀, AOC₁₂, AOC₁₄, AOC₁₈ (構造式はAOC₁₂を例示した.)

試薬は、富士フィルム和光純薬製の 4-メチルモルホリン *N*-オキシド (以下 NMO) (>96%) , メタノール (LC/MS 用) , アセトニトリル (LC/MS 用) , 28%アンモニア水 (試薬特級) , ギ酸 (LC/MS 用) , 酢酸アンモニウム (高速液体クロマトグラフ用) , *N,N*-ジメチル-*n*-ドデシルアミン (特級) を使用した。

精製水はヴェオリア・ジェネッツ製 PURELAB Chorus で精製したものを使用した。

固相カートリッジは Waters 製 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge 300 mg 80 μm, Oasis MCX Plus Short Cartridge 225 mg 60 μm, Oasis HLB Plus Short Cartridge 225 mg 60 μm を用いた。

2. 環境試料の前処理方法及び試験液の測定方法

前処理方法はアンモニア/メタノールで抽出, 固相抽出カラムによる精製後, 定容したものを試験液とした (図2)。

測定は LC-MS/MS を使用, MS は ESI-positive でイオン化, MRM モードで測定, LC は PEEK 系カラムを使用, グラジエント分析した (表1)。

3. LC-Q/TOF による分解物の特定方法

底質試料 10 g (dry 換算) に標準物質 (AOs 各 10 μg) を添加後, 分析フロー (図2) に従って処理を行い, 試験液を得た。無添加試料についても同様に処理した。

測定は LC-Q/TOF を使用, MS は ESI-positive でイオン化, MRMHR モード及び SWATH モードで測定した (表2) 。 LC は PEEK 系カラムを使用, グラジエント分析した。

4. 保存方法の検討方法

底質試料 10 g (dry 換算) に標準物質 (AOs 各 500 ng) を添加した後, 保存処理し, 所定期間冷蔵保存 (4℃) 後, 分析フロー (図2) に従って処理した。また, 底質試料 10 g (dry 換算) に標準物質 (AOs 各 100 ng) を添加した後, 保存処理せずに冷蔵保存することで, 保存処理の効果を検証した。

5. 分析方法のバリデーション

環境省の化学物質環境実態調査実施の手引き⁵⁾に従って評価した。

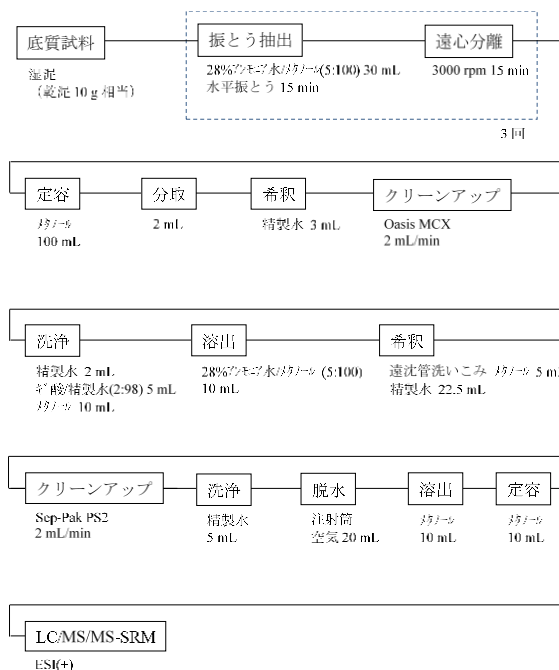


図2. 分析フローチャート

* 「3. LC-Q/TOFによる分解物の特定方法」では *N,N*-ジメチルドデシルアミン抽出するため Oasis HLB を用いた。

表1. LC-MS/MS装置及び測定条件

【LC条件】	
使用機種	: Agilent 製 1100 series
使用カラム	: GL Sciences 製 UHPLC PEEK Column InertSustain C18 (3 μm 2.1×100 mm)
リテンションギヤップ用カラム	: 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (100 mm × 2.1 mm, 3 μm)
移動相	: A : 0.1% ギ酸水溶液 B : アセトニトリル : 0→15 min A:90→5 B:10→95 linear gradient 15→25 min A:B = 5:95 25→25.1 min A:5→90 B:95→10 linear gradient 25.1→40 min A:B = 90:10
流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40℃
注入量	: 2 μL
【MS条件】	
使用機種	: AB Sciex 製 API3200
イオン化法	: ESI (Positive)
測定モード	: SRM (Selected Reaction Monitoring)
イオンソース	: Curtain Gas : 35 psi Collision Gas : 3 Ion Source Gas 1 : 70 psi Ion Source Gas 2 : 60 psi Ion Spray Voltage : 4500 V Temperature : 600℃
モニターイオン、ドリフト電圧(DP)、コリジョン電圧(CE)	
AOC ₁₀	: <i>m/z</i> 202.2>58.0, DP:56 V, CE:31 V
AOC ₁₂	: <i>m/z</i> 230.2>58.0, DP:56 V, CE:33 V
AOC ₁₄	: <i>m/z</i> 258.2>58.1, DP:61 V, CE:37 V
AOC ₁₈	: <i>m/z</i> 314.2>58.3, DP:76 V, CE:51 V

結果および考察

1. LC-Q/TOF による分解物の特定

標準添加試料, 無添加試料の抽出イオンクロマトグラムを比較した結果, 標準添加試料にのみ検出される未知成分を特定した (図3). TOFMS, MS/MS スペクトル (図4) において検出される精密質量 (214.2529) から推定される組成式は $C_{14}H_{31}N$ (214.25293) であることから, 未知成分はアルキルアミノキシドの還元体である *N,N*-ジメチルドデシルアミンと予測された. そこで標準添加試料と *N,N*-ジメチルドデシルアミンの抽出イオンクロマトグラムを比較した結果 (図5), リテンションタイムが一致し, 未知成分が *N,N*-ジメチルドデシルアミンであると同定された. 以上の結果, 底質の嫌氣的雰囲気下, 還元反応によってアルキルアミノキシドが *N,N*-ジメチルドデシルアミンに分解しており, このことから還元反応を抑制することで保存処理が可能であると推測された.

表 2. LC-QTOF装置及び測定条件

【LC 条件】	
使用機種	: AB Sciex 製 ExionA
使用カラム	: 化学物質評価研究機構製 L-column3 C18, 3 μ m 2.0 \times 150 mm METAL FREE
リテンションギャップ用カラム	: 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (100 mm \times 2.1 mm, 3 μ m)
移動相	: A : 0.1% ギ酸水溶液 B : アセトニトリル
【MS 条件】	
使用機種	: AB Sciex 製 X500R
イオン化法	: ESI (Positive)
測定モード	: MRMHR, SWATH
MRMHR	
イオンソース	: Curtain Gas : 35 psi CAD Gas : 3 Ion Source Gas 1 : 70 psi Ion Source Gas 2 : 60 psi Ion Spray Voltage : 4500 V Temperature : 600 $^{\circ}$ C
TOF MS ドリフト電圧(DP), コリジョン電圧(CE)	
測定範囲	: m/z 50 - 1000
DP	: 80 V
CE	: 10 V
SWATH	
イオンソース	: Curtain Gas : 30 psi CAD Gas : 7 Ion Source Gas 1 : 50 psi Ion Source Gas 2 : 80 psi Ion Spray Voltage : 5500 V Temperature : 350 $^{\circ}$ C
TOFMS ドリフト電圧(DP), コリジョン電圧(CE)	
測定範囲	: m/z 50 - 1000
DP	: 80 V
CE	: 5 V
MSMS ドリフト電圧(DP), コリジョン電圧(CE)	
測定範囲	: m/z 50 - 1000
DP	: 60 V
CE	: 35 V

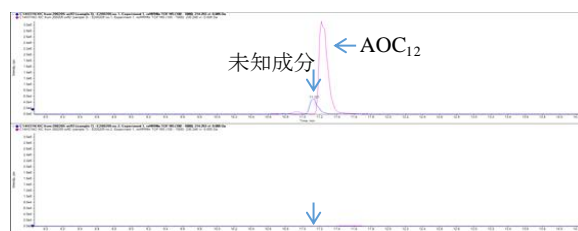


図 3. 抽出イオンクロマトグラム*
上図: 標準添加試料, 下図: 無添加試料
* m/z 214.253 ($C_{14}H_{31}N$) 及び m/z 230.248 (AOC₁₂) の重ね書き, MRMHRモードで測定

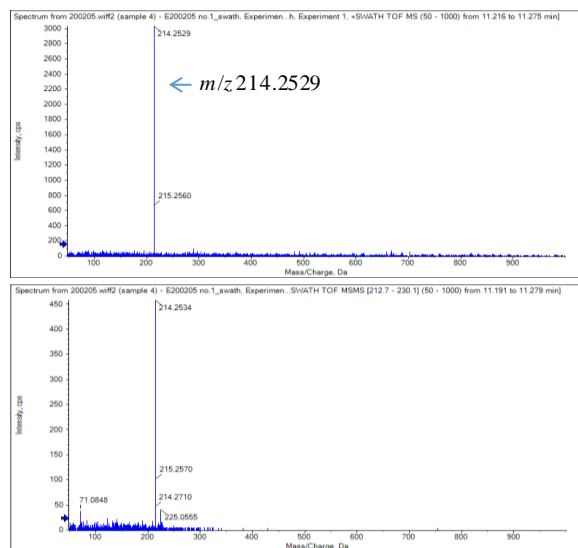


図 4. 未知成分のマススペクトル*
上図: TOFMS, 下図: MS/MS
* SWATHモードで測定

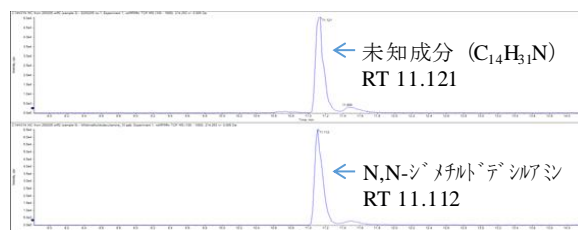


図 5. 抽出イオンクロマトグラムによる溶出時間の比較*
(m/z 214.253)
上図: 標準添加試料,
下図: *N,N*-ジメチルドデシルアミン
* MRMHRモードで測定

2. 保存方法検討

保存性試験の結果を表3に示す。保存処理しない場合、底質中アルキルアミノキシドは経時的に濃度低減し、特に AOC₁₀ で顕著であった。さらに全体が嫌気状態の底質については速やかに濃度低減することから、嫌気的な環境試料からアルキルアミノキシドは検出されないものと予測される。

酸化剤として対象物質と同じアミノキシドを有する NMO (図6) により保存処理した結果を表4に示す。アミノキシドの経時的な濃度低減はなく、保存処理の効果が認められた。

NMO はアンモニアと組み合わせることで効果を発揮し、いずれか一方では効果が低下する(表5)。精製水は、30 mL の場合 精製水を遠心分離により除去する工程を要することで AOC₁₀ の回収率が低下するため、3 mL とした。

ただし、底質中 N,N-ジメチルドデシルアミンが存在する場合、NMO によりアミノキシドが複製するおそれがあるため注意が必要である。

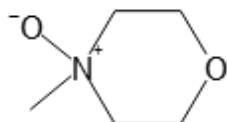


図6. 4-メチルモルホリンN-オキシド(NMO) 構造式

表3 保存性試験結果 (保存処理なし)

試料名	物質名	調製濃度 (ng/g-dry)	試験 数	検出濃度(ng/g-dry) (残存率(%))* ¹		
				1日間	4日間	1週間
底質	AOC ₁₀	10	2	5.3 (53)	3.4(34)	3.0(30)
	AOC ₁₂	10	2	11 (114)	7.0(70)	6.6(66)
	AOC ₁₄	10	2	9.9 (99)	7.8(78)	7.7(77)
	AOC ₁₈	10	2	9.3 (93)	8.2(82)	8.1(81)
底質* ²	AOC ₁₀	10	2	-	-	-
	AOC ₁₂	10	2	3.3(33)	3.2(32)	3.8(38)
	AOC ₁₄	10	2	2.0(20)	1.8(18)	1.6(16)
	AOC ₁₈	10	2	-	-	-

*¹ 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

*² 全体が嫌気状態の底質を使用

表4. 保存性試験結果 (保存処理あり)

物質名	調製濃度 (ng/g-dry)	試験数	検出濃度(ng/g-dry) (残存率(%))* ²		
			当日	4日間	11日間
AOC ₁₀	50	1	-	34 (68)	34 (67)
AOC ₁₂	50	1	-	36 (71)	34 (68)
AOC ₁₄	50	1	-	40 (79)	37 (73)
AOC ₁₈	50	1	-	35 (69)	36 (72)

*¹ 保存処理としてNMO 3 g, 28%アンモニア水1 mLを精製水3 mLに溶解させたものを添加した。

*² 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表5. 酸化剤検討結果*¹

#	酸化剤			残存率(%)* ²			
	NMO	28% アンモニア水	精製水	AOC ₁₀	AOC ₁₂	AOC ₁₄	AOC ₁₈
1	3 g	1 mL	3 mL	68	71	79	69
2	3 g	1 mL	30 mL	40	71	78	72
3	3 g	-	30 mL	44	60	61	61
4	-	1 mL	30 mL	27	38	45	54

*¹ 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

*² 精製水30 mLの場合、所定期間冷蔵保存後遠心分離により上澄みを除去した後処理した。精製水3 mLの場合は、上澄みを除去しなかった。冷蔵保存期間は1~4日間とした。

3. 分析方法のバリデーション

今回開発した分析方法の精度を検証するためバリデーションデータを取得した。検量線については直線性が良好であった(図7-1, 7-2)。検出下限値は水質試料で最大 0.0035 µg/g-dry となり, それぞれ暴露量を適切に評価するための要求下限値である 0.014 µg/g-dry を満たした(表6)。環境試料を用いた添加回収試験の結果, 水溶性の AOC₁₀ から疎水性の AOC₁₈ まで良好な回収率が得られた(表7)。和歌山県内における環境試料(河川水)の分析例を図8に示す。AOs はいずれも MDL 未満であり, 検出されなかった。

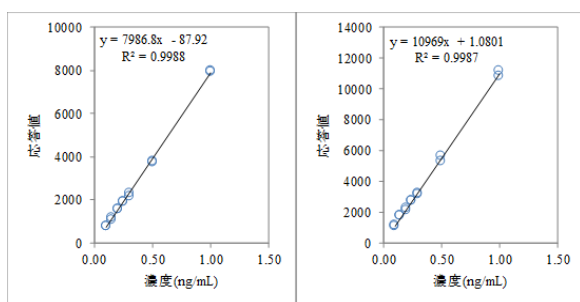


図7-1. 検量線
AOC₁₀ 0.10~1.0 ng/mL (左図), AOC₁₂ 0.10~1.0 ng/mL (右図)

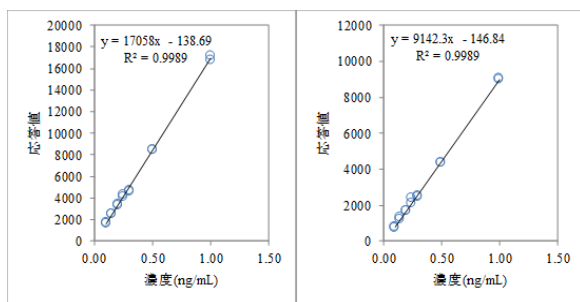


図7-2. 検量線
AOC₁₄ 0.10~1.0 ng/mL (左図), AOC₁₈ 0.10~1.0 ng/mL (右図)

表6. 分析法の検出下限値*

物質名	試料量 (g-dry)	分取*	最終液量 (mL)	MDL (µg/g-dry)	SQL (µg/g-dry)
AOC ₁₀	10	1/50	10	0.0016	0.0041
AOC ₁₂	10	1/50	10	0.0020	0.0051
AOC ₁₄	10	1/50	10	0.0016	0.0040
AOC ₁₈	10	1/50	10	0.0035	0.0091

* NMO 3 g, 28%アンモニア水 1 mLを精製水 3 mLに溶解させたもので保存処理した底質を使用した。

表7. 添加回収試験結果*

試料	試験数	添加量 (ng)	試料量 (g-dry)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	CV (%)
AOC ₁₀	2	0.0	10	< 1.6	-	-
	7	100	10	9.53	95	4.3
AOC ₁₂	2	0.0	10	< 2.0	-	-
	7	100	10	10.8	108	4.7
AOC ₁₄	2	0.0	10	< 1.6	-	-
	7	100	10	10.3	103	3.9
AOC ₁₈	2	0.0	10	< 3.5	-	-
	7	100	10	9.01	90	10

* NMO 3 g, 28%アンモニア水 1 mLを精製水 3 mLに溶解させたもので保存処理した底質を使用した。

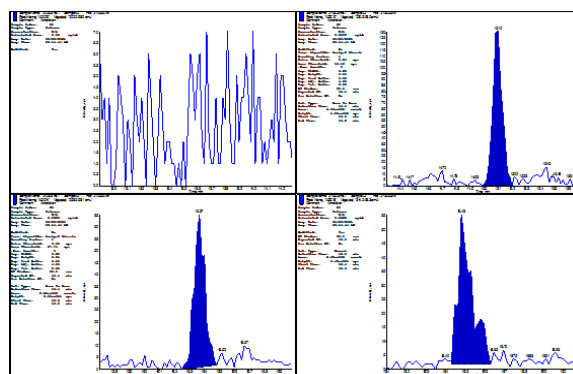


図8. 紀の川底質の測定結果(MRMクロマトグラム)*
AOC₁₀ (左上), AOC₁₂ (右上), AOC₁₄ (左下), AOC₁₈ (右下)

* 保存処理せず処理した結果を示す。

まとめ

本検討では、LC-Q/TOFによるノンターゲット分析に着目、分解物を特定し、効果的な保存方法に適用することで、残留実態をより正確に把握できる分析法の開発を目指した。結果、LC-Q/TOFは分解物を特定するための極めて有効な手段であり、アルキルアミンオキシドの分解物としてN,N-ジメチルドデシルアミンを特定することで、保存による濃度低減は還元反応に起因するものと予測し、酸化剤により抑制できることを示した。

本分析法は、環境中のアルキルアミンオキシドの残留状況を把握する上で有用であると結論され、今後生態系に対する暴露量を適切に評価していくための分析法となるであろう。

文献

- 1) 通産省公報(1995.12.28)
- 2) 環境省：化学物質と環境 平成29年度化学物質分析法開発調査報告書(平成30年12月), p. 774-806.
- 3) 環境省：化学物質と環境 平成17年度化学物質分析法開発調査報告書(平成18年7月), p. III-327-III-337.
- 4) 環境省：化学物質と環境 令和元年度化学物質
- 5) 分析法開発調査報告書(令和3年1月), 印刷中.
環境省：化学物質環境実態調査実施の手引き(平成28年3月)