

## LC-Q/TOF による災害時等を想定した水質の緊急調査手法の開発

山本道方

Development of rapid measurement method in water samples by LC-Q/TOF  
assuming emergency monitoring such as disaster

Masamichi Yamamoto

キーワード : LC-Q/TOF, 緊急調査手法

Key Words : LC-Q/TOF, rapid measurement method

はじめに

環境危機事象とは、突発的に発生する災害／事故等により環境中に拡散した化学物質によって人の健康が損なわれるおそれがある等、緊急迅速な対応が求められる事態であり、この事態に適切に対応するためには、原因物質を迅速に特定することが重要となる。しかし、このような予測不可能な事態に適切に対応することは難しく、予めこれに備えた取り組みが必要となる。そこで、本研究では迅速な原因物質の特定を目標とする、環境危機事象を想定した緊急調査手法の開発に取り組んだ。

未知物質を特定するためには、新たな分析手法が必要となる。これまで当センターでは、法律等で規定された既知物質を高感度・高精度で分析する、いわゆるターゲット分析に注力してきた。しかし、全く想定外の未知物質が原因物質となる場合には上手く対応することができない。より多くのターゲットを予め登録しておくことで網羅的に分析する手法が検討されているが、この手法もターゲット分析であるため未知物質に対応することができない。そこで、新たな分析手法として何を測定するかを決めずに測定できる、いわゆるノンターゲット分析が可能な LC-Q/TOF に着目した。この装置による高分解能測定

水質環境グループ

により、精密質量から組成式を特定することができれば、全くの未知物質であってもそれが何かを特定できると考えた。

一方、LC-Q/TOF による測定では極めて膨大な成分が検出されるため、如何に効果的に解析し、迅速に原因物質を特定できるかが課題となる<sup>1)</sup>。これには差分解析による絞り込みが有効と考えた。差分解析とは特異的な成分を抽出する手法であり、環境危機事象において原因物質が流入する地点（事故時）とその影響を受けていない地点（平常時）において検体を採取し、それぞれの測定結果を比較することで事故時の地点に顕著な成分を抽出できれば、迅速に原因物質を特定できると考えた。さらに、環境中に残留している化学物質を原因物質と取り違えることがないように、予め平常時における残留濃度をしっかりと把握しておき、これを事故時と比較することで、原因物質を確実に特定できると考えた。

そこで今回の報告では、高分解能測定による未知成分の特定、差分解析を適用できる濃度範囲について検証した。さらに実際に発生した魚のへい死事故に緊急調査手法を適用し、未知の原因物質を迅速に特定できるか検証したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬等

試薬は、富士フィルム和光純薬製のメタノール (LC/MS 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、アセトン (残留農薬・PCB 試験用 濃縮 5000)、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (高速液体クロマトグラフ用)、関東化学製のジクロロメタン (残留農薬・PCB 試験用 濃縮 5000)、残留農薬試験用農薬混合標準液 58 (農薬 35 成分を含有、各成分 10 mg/L) 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 Oasis HLB Plus Short Cartridge を使用した。ガラス繊維ろ紙は cytiva 製 Whatman GF/C  $\phi$ 47 mm を使用した。

### 2. 環境試料の前処理方法

前処理方法<sup>1)</sup>は、環境試料 500 mL を固相抽出カラム (Oasis HLB) に通液した。通液できない程度の濁りがあった場合は予めろ過処理し、ろ液及びろ紙をアセトンで超音波処理した抽出液を合わせたものを通液した。固相抽出カラムを脱水乾燥した後、メタノール 3 mL、アセトン 3 mL、ジクロロメタン 3 mL で溶出した。溶出液を濃縮乾固した後、メタノールで 1 mL に定容した。

### 3. 試験液の測定方法

測定は LC-Q/TOF を使用し、Q/TOF は ESI-positive でイオン化、SWATH モードで測定、LC は ODS 系カラムを使用、グラジエント分析した (表 1)。

### 4. 模擬試験液の調製方法

残留農薬試験用農薬混合標準液 58 をメタノールで希釈し、100 ng/mL に調製したものを模擬試験液とした。

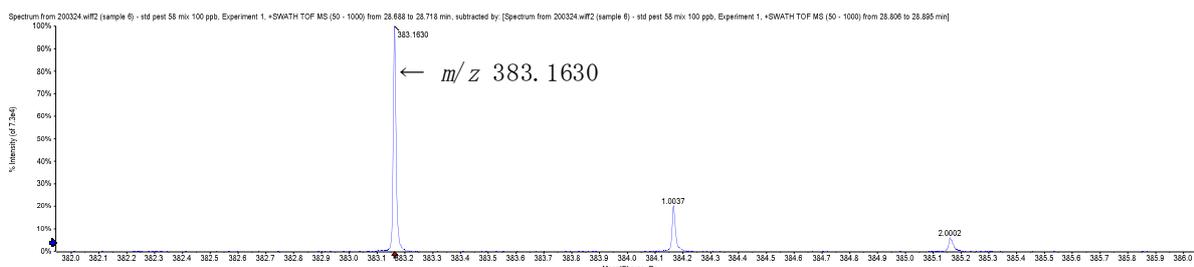


図 1. マススペクトル (TOFMS 測定)

未知試料と見立てたフラチオカルブのマススペクトルにおいて観測された  $m/z$  383.1630 と同位体パターンから組成式  $C_{18}H_{26}N_2O_5S$  と特定されフラチオカルブと一致した。

### 5. 差分解析方法

原因物質が流入する地点 (事故時) とその影響を受けていない地点 (平常時) の 2 地点の試験液を LC-Q/TOF で測定し、得られた TIC クロマトグラムを重ね合わせ比較することで、事故時に顕著に存在する成分を絞り込んだ。TIC クロマトグラムには TOFMS 測定、あるいは Q/TOF 測定 (SWATH モードで測定したもので、プリカーサーイオンの質量範囲が分画された TIC クロマトグラム) によるものを使用した。

### 結果および考察

#### 1-1. 精密質量から未知成分の組成式の特定

模擬試験液を LC-Q/TOF で高分解能測定し、未知物質と見立てた農薬成分について、マススペクトルの精密質量から組成式を絞り込んだ。フラチオカルブの例を示す (図 1)。マススペクトルの精密質量 ( $m/z$  383.1630) 及び同位体パターンから組成式  $C_{18}H_{26}N_2O_5S$  が特定され、フラチオカルブの組成式と一致した。このことから LC-Q/TOF による精密質量から未知成分を特定できることを検証した。

表 1. 測定条件

[LC条件]	
使用機種	: AB Sciex製 Exion AC LCシステム
カラム	: GL Sciences製 Inertsil ODS-4HP 3 $\mu$ m, 2.1*150 mm
移動相	: (A) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
	: (B) メタノール
	: 0→30 min A:95→5 B:5→95 linear gradient
	: 30→40 min A:B=5:95
	: 40→40.01 min A:5→95 B:95→5
	: 40.01→50 min A:B=95:5
カラム流量	: 0.3 mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
試料注入液量	: 2 $\mu$ L
[MS条件]	
使用機種	: AB Sciex製 X500R QTOF
イオン化法	: ESI
測定モード	: SWATH <sup>®</sup> Acquisition

## 1-2. 差分解析によって原因物質を特定できる濃度範囲

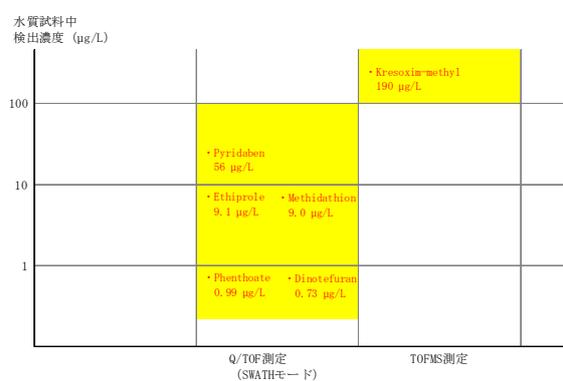
これまでに差分解析で特定された物質，濃度を取り纏めた(図2)．環境中の残留濃度が100 µg/Lを超過する場合，TOFMSによるTICクロマトグラムの差分解析が適用できた．一方，SWATHモードで測定し質量範囲が分画されたTICクロマトグラムの差分解析は低濃度にも有効であり，ジノテフラン0.73 µg/Lを特定した．差分解析は環境中の残留濃度1 µg/Lを検出できる感度を有する．環境危機事象は高濃度であると想定すると，十分な適用範囲と考える．

### 2-1. 水質事故概要

県内河川において約5,000匹の魚がへい死する水質事故が発生，当該地域を所管する保健所が迅速且つ適切に対応し，へい死魚が認められた流域の最上流(平常時)，及び下流(事故時)の2地点で検体を採取した．採取した水質試料は速やかに搬入され，迅速に前処理及びLC-Q/TOFによる測定を行った．

## 2-2. 差分解析による原因物質の特定

事故時及び平常時の2地点におけるTICクロマトグラム(TOFMS測定)を重ね合わせ差分解析した結果を図3に示す．事故時に特異的なシグナルが溶出時間26.4分に存在する．抽出したマススペクトル(図4)の精密質量及び同位体パターンから特異的なシグナルの組成式は $C_{18}H_{19}NO_4$ であり，農薬成分であるクレソキシムメチルと特定した．さらに標準物質による同定によりクレソキシムメチルであることが裏付けられ，その残留濃度が190 µg/Lであることが判明した．



差分解析に使用したTICクロマトグラム

### 図2. 差分解析を適用できる濃度範囲※

※実際に発生した魚のへい死事故において，緊急調査手法により特定された成分及び濃度を，差分解析に使用したTICクロマトグラム毎整理した．

- ・Q/TOF測定：SWATHモードで測定したもので，プリカーサーイオンの質量範囲が分画されたもの
- ・TOFMS測定：TOFMSモードで測定したもの

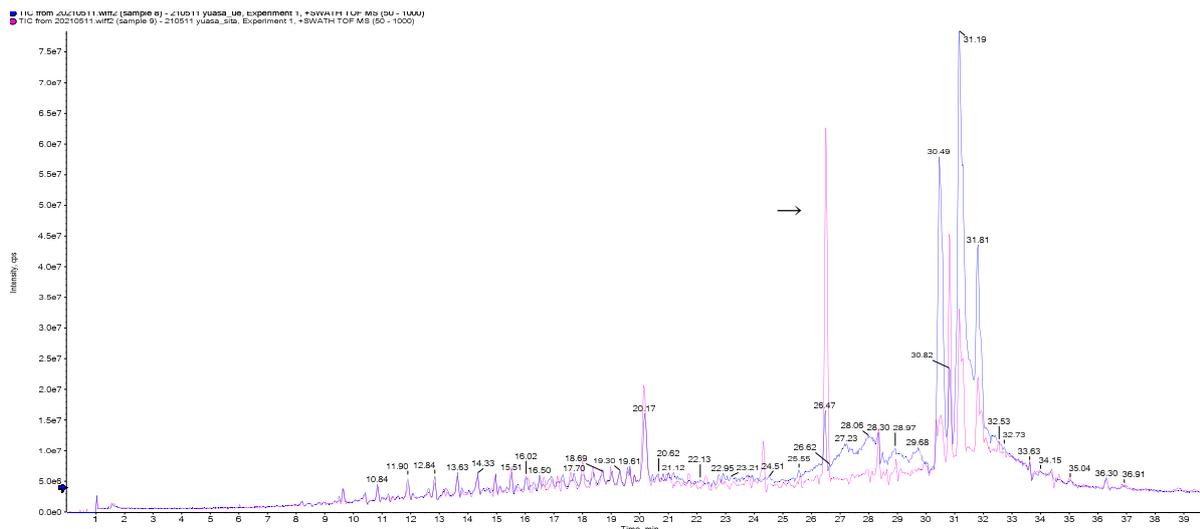


図3. 水質事故におけるTICクロマトグラムの差分解析結果

へい死魚が認められた最上流(平常時)，下流(事故時)で採水した検体のTICクロマトグラム(TOFMS測定)を重ね書きした．

### 2-3. 平常時残留濃度との比較

平常時における県内の河川水中の農薬残留濃度を調査した結果を図5に示す。河川水中には多くの農薬が検出されるが、平常時における最大濃度は0.4 µg/Lであった。一方、今回の水質事故の原因物質であるクレソキシムメチルの残留濃度は190 µg/Lであり、これは平常時を大きく超過する異常値であることがわかる。このことから今回の水質事故における事故原因がクレソキシムメチルであると確実に裏付けられた。

### まとめ

本検討では、差分解析による原因物質の効果的な絞り込みと、高分解能測定による組成式の特定に着目した緊急調査手法の開発に取り組んだ。開発した手法は、原因物質を1 µg/Lオーダーで特定でき、高濃度が想定される環境危機事象に十分に適用できる。また実際の魚のへい死事故に適用した結果、原因である農薬成分をわずか1日で特定することができた。今回農薬による水質事故への適用例を報告したが、本検討はこれに限定するものではなく、広く環境危機事象に適用できる緊急調査手法として期待される。

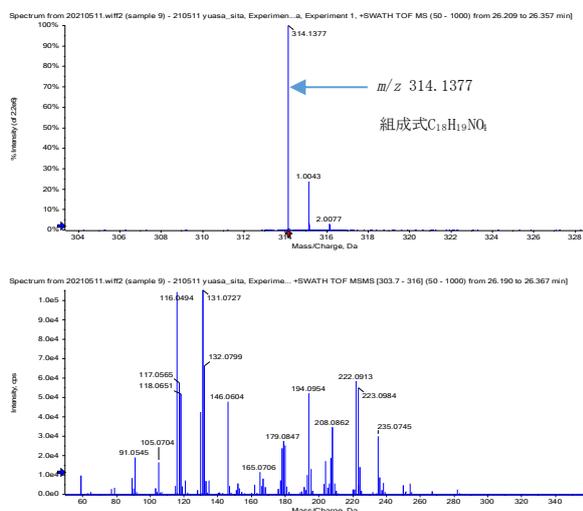


図4. 事故時に特異的なシグナルの組成解析結果\*  
(上図：TOFMSスペクトル，下図：Q/TOFMSスペクトル)

\* 差分解析により特定した差異ピークについて SCIEX Formula FinderによりTOFMS、Q/TOFMSスペクトルを解析、組成式を特定した結果、クレソキシムメチル（農薬）と一致した。

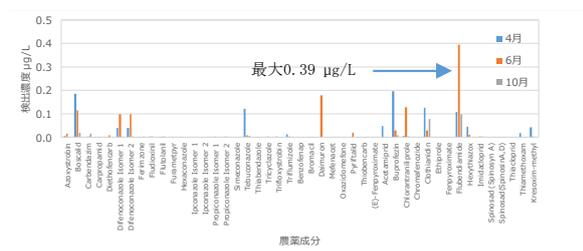


図5. 一般河川の農薬残留状況（平常時）

\* 水質事故の原因物質を判断するため、平常時バックグラウンドとして県内3河川（4地点）を対象に年3回の通年調査を実施（図は古川の結果、今回の水質事故河川と異なる）

### 文献

- 1) 西野貴裕等，多種・新規化学物質の網羅的モニタリングと地域ネットワークを活用した統合的評価・管理手法の開発(5-1602)，環境研究総合推進費終了研究成果報告書，平成30年度。