

## LC-MS/MS による水質中の塩化ベンザルコニウム塩の分析法の検討

山本道方

### Determination of Benzalkonium chloride in Water by LC-MS/MS

Masamichi Yamamoto

キーワード：塩化ベンザルコニウム塩, LC-MS/MS

Key Words : Benzalkonium chloride, 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を把握することを目的に実施され、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科学的な根拠を担った重要な調査である。この調査に不可欠な環境試料の分析や分析法開発で中心的な役割を担っているのが全国の地環研である。当センターでは機器分析の習熟を目的に調査を受託しており、化学物質について何か問題があったとき適切に対応できるよう資質の向上に取り組んでいる。

今回、受託した塩化ベンザルコニウム塩（図1）はアルキル基の異なる同族体群3物質であり、用途は陽イオン界面活性剤、殺菌剤等に使用される。一般家庭等でも使用され、河川水等に排出されることで、広く環境中から検出されると予測される。生態系への影響が懸念されることから、国は化審法の優先評価化学物質に指定し、対応の必要性を検討するための基礎データを収集している。生態系に対するリスクは有害性と暴露量から評価されるため、暴露量を適切に評価できる分析方法が必要となる。

環境試料の分析事例としては、液液抽出<sup>1)</sup>や、固相抽出<sup>2)</sup>による方法が報告されており、容易に検出

される塩化ベンザルコニウム塩の操作ブランクを検出下限値未満にコントロールしている。しかしながら、いずれの報告でもブランクコントロールの方法が明確ではないため、確実なコントロールが困難であり、環境中における塩化ベンザルコニウム塩の残留実態を正しく把握できないおそれがある。そこで本研究では、操作ブランクを確実にコントロールするため、ガラス器具の加熱処理によるブランク低減に着目し、より微量の塩化ベンザルコニウム塩を確実に定量し、残留実態を正しく把握できる分析法の開発を目指した。

なお本報は、環境省委託化学物質分析法開発（LC/MS）における検討等で得られた主な知見を取りまとめたものである<sup>3)</sup>。

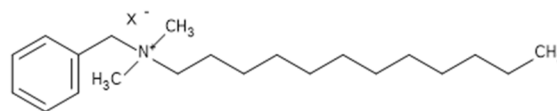


図1. 塩化ベンザルコニウム塩同族体群\*  
(BAC-C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>)

\*BAC-C<sub>12</sub>を例示

## 実験方法

### 1. 試料および試薬

塩化ベンザルコニウム標準品として、東京化成工業製 BAC-C<sub>12</sub> (純度 100 area%, 水分 9.6%), BAC-C<sub>14</sub> (純度 98.5 area%, 水分 9.7%), 富士フィルム和光純薬製 (含量 (NMR) 91%) をそれぞれ用いた。メタノールおよびアセトニトリルは LC/MS 用, 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用 (以上, 和光純薬製), 塩化ナトリウムは特級 (キシダ化学製) をそれぞれ使用した。精製水はヴェオリア・ジェネッツ株式会社製 PURELAB Chorus の超純水装置にて精製したものをを用いた。固相抽出カートリッジは Waters 製 Oasis HLB Plus Short Cartridge 225 mg 60 μm を使用した。

環境試料として、紀の川 (南田井ノ瀬橋付近), 市堀川 (寄合橋) および和歌山下津港 (本港区) において採取した河川水, 海水を用いた。採取容器にはあらかじめ塩化ナトリウム 5.0 g を添加したガラス製ねじロビン (PTFE 張りセプタム付き蓋) を用い, 水質試料 100 mL を採取し, 振とうした。試料は採取後, 冷暗所に保管し, 速やかに試験操作を行った。

### 2. 試験液の調整

分析フローは図 2 に示す。水質試料をろ過した後, 固相カートリッジに通水して対象物質を吸着し, これをアセトニトリルで溶出して LC-MS/MS-SRM (ESI-positive) で定量する。

### 3. LC-MS/MS 装置および測定条件

LC として Agilent 製 1100 シリーズ, リテンションギャップ法を採用, ODS 系カラムを使用し, グラジエント分析を行った。MS として AB Sciex 製 API3200 を用い, LC-MS/MS-SRM (ESI-positive) で測定した (表 1)。

### 3. 加熱処理条件検討

バイアルに標準液 (0.10 ng/mL) 0.5 mL を分取し, 窒素ガスの吹き付けにより濃縮乾固し, バイアルの蓋を外した状態で所定温度 (600, 500, 400, 350, 300, 250 °C) 所定時間 (2, 1, 0.5 時間)

で加熱処理した後, アセトニトリル 1 mL に定容したものを試験液とした。

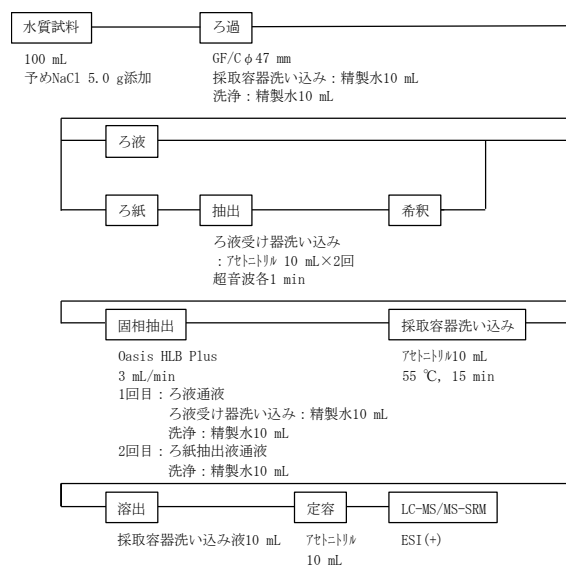


図 2. 分析フロー

表 1. 測定条件

[LC条件]	
使用機種	: Agilent製 1100 series
カラム	: GL Sciences製UHPLC PEEK Column InertSustain C18 (50 mm × 2.1 mm, 3 μm)
移動相	: (A) 5 mM酢酸アンモニウム水溶液 : (B) 5 mM酢酸アンモニウム含有アセトニトリル溶液 : 0→5 min A:80→5 B:20→95 linear gradient 5→13 min A:B=5:95 13→13.1 min A:5→80 B:95→20 linear gradient 13.1→28 min A:B=80:20
カラム流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
試料注入液量	: 5 μL
[MS条件]	
使用機種	: ABサイエックス製 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 : 20 psi : Collision Gas : 5 psi : Ion Source Gas 1 : 60 psi : Ion Source Gas 1 : 40 psi : Ion Source Voltage : 5500 V : Temperature : 600 °C
モニターイオン	: BAC-C <sub>12</sub> m/z 304.3>91.1 DP 66 V CE 45 V (定量用) m/z 304.3>212.3 DP 66 V CE 27 V (確認用) : BAC-C <sub>14</sub> m/z 332.3>91.1 DP 76 V CE 53 V (定量用) m/z 332.3>240.2 DP 76 V CE 31 V (確認用) : BAC-C <sub>16</sub> m/z 360.3>91.1 DP 81 V CE 57 V (定量用) m/z 360.3>268.3 DP 81 V CE 33 V (確認用)

## 結果および考察

### 1. 加熱処理条件

250, 300, 350 °Cで0.5 時間, 加熱処理した結果を図3-1~3-3に示す。結果, 300 °C, 0.5 時間の加熱処理で, 塩化ベンザルコニウム塩のシグナルが十分に減少し, 除去できた。このことから, 加熱処理可能なガラス器具については, ブランクコントロールのため, 350 °C, 1 時間, 加熱処理することとした。

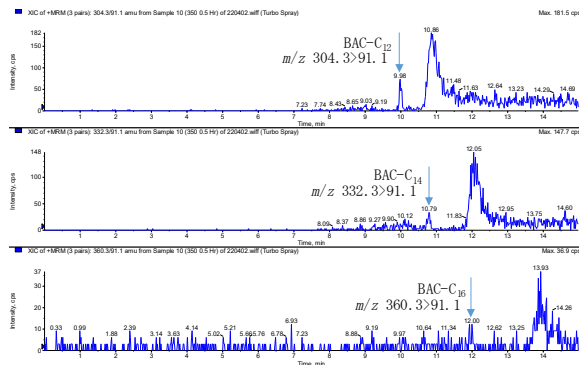


図3-1. 加熱温度250 °C, 0.5 時間

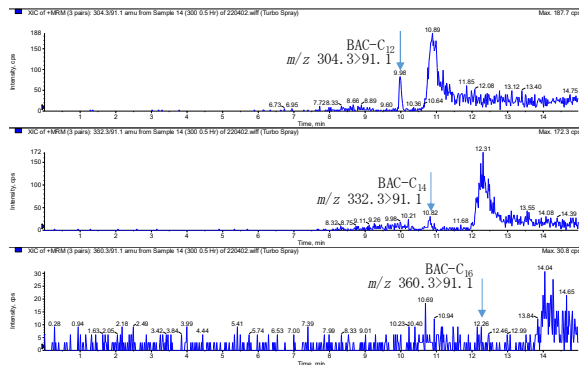


図3-2. 加熱温度300 °C, 0.5 時間

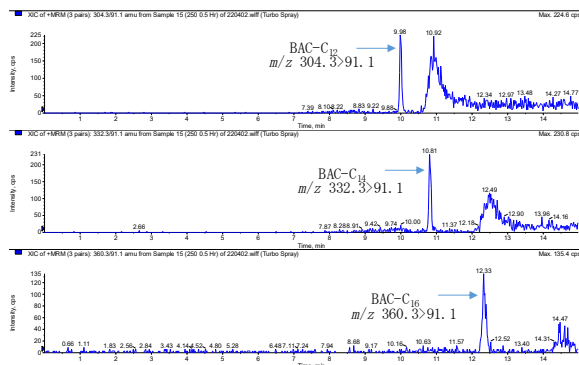


図3-3. 加熱温度350 °C, 0.5 時間

### 2. 操作ブランク値

操作ブランク試験の結果を図4に示す。いずれの同族体についても加熱処理によるブランクコントロールにより概ねMDL程度~MDL未滿にコントロールすることが可能であった。

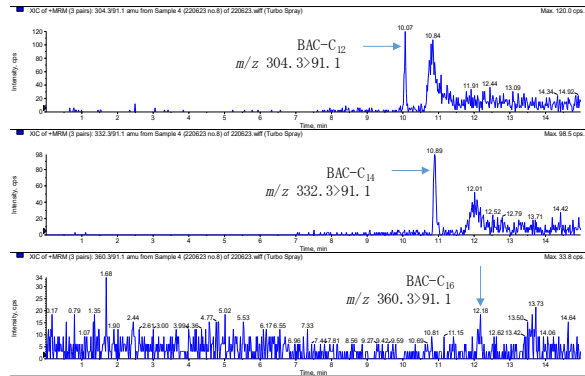


図4. 操作ブランク試験のSRMクロマトグラム (上) BAC-C<sub>12</sub> (中) BAC-C<sub>14</sub> (下) BAC-C<sub>16</sub>

### 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。検量線の直線性は 0.010~0.10 ng/mL の範囲で  $R^2=0.9974\sim0.9995$ , 0.10~1.0 ng/mL の範囲で  $R^2=0.9994\sim0.9999$  を示しており, 良好であった (図5-1~5-3)。標準液のクロマトグラムを図6-1~6-3に示す。

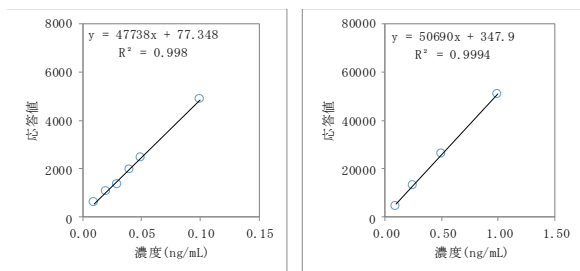


図5-1. BAC-C<sub>12</sub>  
0.010~0.10 ng/mL (左) 0.10~1.0 ng/mL (右)

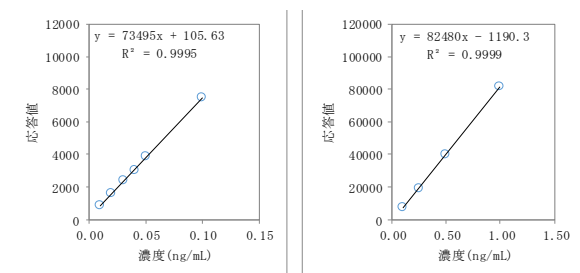


図5-2. BAC-C<sub>14</sub>  
0.010~0.10 ng/mL (左) 0.10~1.0 ng/mL (右)

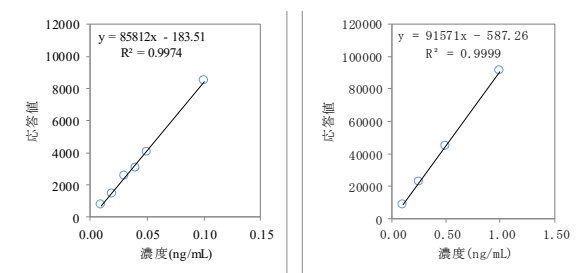


図5-3. BAC-C<sub>16</sub>  
0.010~0.10 ng/mL (左) 0.10~1.0 ng/mL (右)

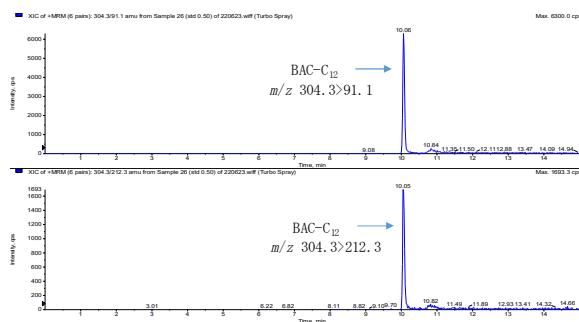


図6-1. 検量線用標準液クロマトグラム  
(BAC-C<sub>12</sub> 0.050 ng/mL)  
定量イオン  $m/z$  304.3>91.1(上図) 確認イオン  $m/z$  304.3>212.3(下図)

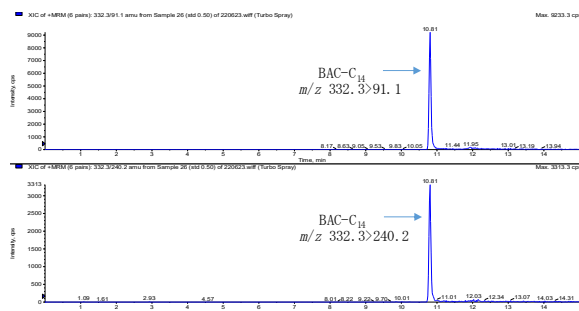


図6-2. 検量線用標準液クロマトグラム  
(BAC-C<sub>14</sub> 0.050 ng/mL)  
定量イオン  $m/z$  332.3>91.1(上図) 確認イオン  $m/z$  332.3>240.2(下図)

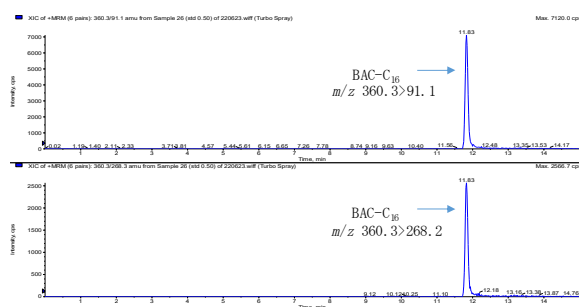


図6-3. 検量線用標準液クロマトグラム  
(BAC-C<sub>16</sub> 0.050 ng/mL)  
定量イオン  $m/z$  360.3>91.1(上図) 確認イオン  $m/z$  360.3>268.3(下図)

検出下限値は 0.00024~0.00073 µg/L, 定量下限値は 0.00063~0.0019 µg/L となった(表2)。環境試料を用いて添加回収率を求めたところ, 河川水で 93~98%(CV 2.5~6.0%), 海水で 96~98%(CV 2.5~6.7%) が得られ, 回収率, 再現性共に良好であった(表3-1~3-3)。7日間保存後の残存率は河川水で 96~102%, 海水で 82~93% となり, 濃度低減はなく, 保存性は良好であった(表4-1~4-3)。

表2. MDL及びMQLの算出結果

物質名	BAC-C <sub>12</sub>	回収率 (%)	BAC-C <sub>14</sub>	回収率 (%)	BAC-C <sub>16</sub>	回収率 (%)
試料	海水	-	海水	-	海水	-
試料量 (L)	0.10	-	0.10	-	0.10	-
標準添加量 (ng)	0.10	-	0.10	-	0.10	-
試料換算濃度 (ng/L)	1.0	-	1.0	-	1.0	-
最終液量 (mL)	10	-	10	-	10	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.010	-	0.010	-	0.010	-
装置注入液量 (µL)	5.0	-	5.0	-	5.0	-
操作ブランク値 (ng/L) <sup>*1</sup>	< 0.73	-	< 0.46	-	< 0.24	-
無添加平均値 (ng/L) <sup>*2</sup>	< 0.73	-	< 0.46	-	< 0.24	-
結果 1 (ng/L)	1.46	146	1.03	103	0.918	92
結果 2 (ng/L)	1.14	114	0.895	89	0.943	94
結果 3 (ng/L)	0.971	97	1.02	102	0.839	84
結果 4 (ng/L)	0.993	99	1.04	104	0.946	95
結果 5 (ng/L)	1.07	107	1.29	129	1.05	105
結果 6 (ng/L)	1.39	139	1.06	106	0.944	94
結果 7 (ng/L)	1.20	120	1.08	108	0.984	98
平均値 (ng/L)	1.175	118	1.059	106	0.9460	94.6
標準偏差 (σ <sub>n-1</sub> ) (ng/L)	0.189	-	0.118	-	0.0628	-
MDL (ng/L) <sup>*3</sup>	0.73	-	0.46	-	0.24	-
MQL (ng/L) <sup>*4</sup>	1.9	-	1.2	-	0.63	-
S/N 比	24	-	26	-	16	-
CV (%)	16	-	11	-	7.0	-

\*1: 操作ブランク試料を測定した値 (n = 1)

\*2: MDL算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n = 2)

\*3: MDL = t (n-1, 0.05) × σ n-1 × 2

\*4: MQL = σ n-1 × 10

表3-1. 添加回収試験結果 (BAC-C<sub>12</sub>)

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
BAC-C <sub>12</sub>	河川水	0.10	0.0	10	2	<0.73	-	-
		0.10	1.0	10	5	9.84	98	4.9
	海水	0.10	0.0	10	2	<0.73	-	-
		0.10	1.0	10	5	9.64	96	4.1

表3-2. 添加回収試験結果 (BAC-C<sub>14</sub>)

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
BAC-C <sub>14</sub>	河川水	0.10	0.0	10	2	<0.46	-	-
		0.10	1.0	10	5	9.35	93	6.0
	海水	0.10	0.0	10.0	2	<0.46	-	-
		0.10	1.0	10.0	5	9.80	98	6.7

表3-3. 添加回収試験結果 (BAC-C<sub>16</sub>)

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
BAC-C <sub>16</sub>	河川水	0.10	0.0	10	2	<0.24	-	-
		0.10	1.0	10	5	9.47	95	2.5
	海水	0.10	0.0	10.0	2	<0.24	-	-
		0.10	1.0	10.0	5	9.57	96	2.5

表4-1. 保存性試験結果 (BAC-C<sub>12</sub>)

試料名	調製濃度 (ng/L)	試験数	検出濃度 (ng/L) (残存率%)			
			当日	7日間	1月間	
境試料	河川水	5.00	2	5.05(101)	5.10(102)	-
	海水	5.00	2	4.36(87)	4.63(93)	-
験液	河川水	0.0602	2	-	-	0.0529(88)
	海水	0.0943	2	-	-	0.102(108)
準液	0.0500	2	-	-	0.0551(110)	

\* 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表4-2. 保存性試験結果 (BAC-C<sub>14</sub>)

試料名	調製濃度 (ng/L)	試験数	検出濃度 (ng/L) (残存率%)			
			当日	7日間	1月間	
境試料	河川水	5.00	2	5.45(109)	4.93(99)	-
	海水	5.00	2	3.62(72)	4.08(82)	-
験液	河川水	0.0642	2	-	-	0.0673(105)
	海水	0.0956	2	-	-	0.101(106)
準液	0.0500	2	-	-	0.0504(101)	

\* 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

表4-3. 保存性試験結果 (BAC-C<sub>16</sub>)

試料名	調製濃度 (ng/L)	試験数	検出濃度 (ng/L) (残存率%)			
			当日	7日間	1月間	
境試料	河川水	5.00	2	4.85(97)	4.81(96)	-
	海水	5.00	2	3.48(70)	4.20(84)	-
験液	河川水	0.0490	2	-	-	0.0469(96)
	海水	0.0967	2	-	-	0.0978(107)
準液	0.0500	2	-	-	0.0447(89)	

\* 残存率(%): 調製濃度に対する保存後の検出濃度の割合

#### 4. 環境試料の分析例

和歌山県内の河川水（市堀川）を分析した結果、BAC-C<sub>12</sub> 63 ng/L, BAC-C<sub>14</sub> 25 ng/L, BAC-C<sub>16</sub> 5.4 ng/L が検出された。クロマトグラムを図7-1～7-3に示す。

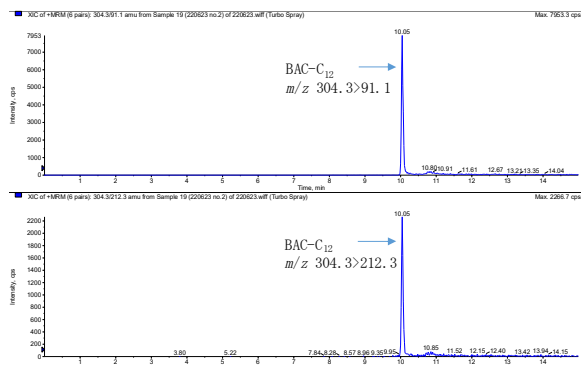


図7-1. 河川水（市堀川）試料のクロマトグラム（BAC-C<sub>12</sub>）

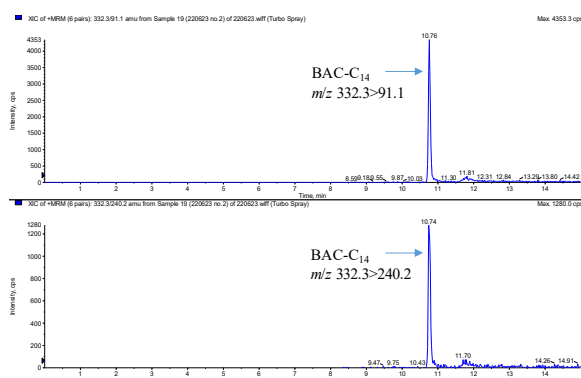


図7-2. 河川水（市堀川）試料のクロマトグラム（BAC-C<sub>14</sub>）

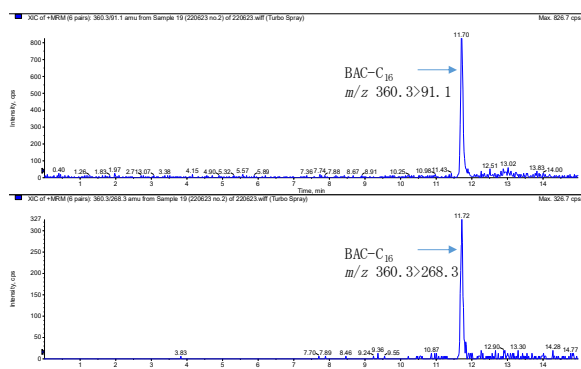


図7-3. 河川水（市堀川）試料のクロマトグラム（BAC-C<sub>16</sub>）

#### まとめ

今回、水質中の微量の塩化ベンザルコニウム塩を定量するLC-MS/MS分析法を開発した。課題であるブランクコントロールについて、ガラス器具の加熱処理に着目した。加熱処理は一度に多くのガラス器具を一様に処理できるため、操作ブランク値を確実にコントロールできる。ブランクコントロールの方法は明確であり、環境中の微量の塩化ベンザルコニウム塩を確実に定量できるため、環境中の残留状況を正しく把握できる。以上より、本分析法は、環境中の塩化ベンザルコニウムの残留状況を把握する上で有用であると結論される。

#### 文献

- 1) 平成19年度化学物質分析法開発調査報告書（平成20年12月）（岡山県）
- 2) 吉田（住化分析センター）他、環境試料中の塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム定量法、水環境学会誌, Vol. 31, No. 4, pp. 203-208(2008)
- 3) 令和3年度化学物質分析法開発調査報告書（令和4年）（印刷中）