

〔報 文〕

環境中の化学物質の体系的分析法について

石川県保健環境センター 環境科学部 齣 幹夫・安田 和弘
石川県環境部廃棄物対策課 吉本 高志

〔和文要旨〕

水質事故、特に魚類へい死事故の原因究明に迅速に対応し、県民の安全安心に直接寄与することを目的に、多種多様な有機化学物質を対象にした体系的分析方法の開発を行った。近年注目を集めているキャッチャーズ法に準拠した手法を採用し、生物（魚類）の各部位に有機化学物質を添加した試料を対象として検討を行い、事故の際、最も影響を受けるであろうエラ部について県内流通農薬を含む約100物質について検出を可能とした。

キーワード：水質事故，魚類，農薬，化学汚染物質，キャッチャーズ法

1 はじめに

河川で大量に魚が死亡した（浮いた）といった水質事故は全国各地で毎年数百件起きているが、その内の大部分は原因不明となっている事が多い^{1) 2)}。また水質事故の原因究明に時間がかかるとその対応も後手後手になる可能性があり、その究明には迅速性が要求される。そのため、水質事故発生時に、迅速に事故原因を究明する方法について検討した。水質事故発生時、河川の場合には時間の経過とともに原因物質は下流域に移動拡散するため、状況によってはそれが含まれた水が得られない場合がある。今回は魚が持ち込まれた場合を想定し、魚から原因物質を推定するための方法について検討した。

分析にあたり以下の3点に着目して実施することとした。

- ・対象は魚類とする。
- ・迅速性に重きを置くため定性試験とする。
- ・分析時間の短縮とコストの削減を考慮する。

2 材料と方法

2・1 検査対象

(1) 検査対象魚類

魚類へい死事故として考えられる魚類としては、県内においては、アユ、ウグイ、フナ、コイなどが考えられる。この中で一番水質変化に敏感であろうアユを対象魚類として選択した。入手したアユは、頭部を除去後3枚におろし、筋肉、内臓、エラ、皮・ひれの4部位に分けホモジナイズしたものを使用した。

(2) 検査対象化学物質

県内流通農薬及び化学物質のうちガスクロマトグラフ質量分析法により分析可能とされている化学物質159物質を対象とした。

2・2 標準液及び試薬

(2) 試薬

農薬の標準品は、関東化学(株)、林純薬工業(株)又は和光純薬工業(株)のものをを用いた。他の化学物質標準品については以前に化学物質環境実態調査において環境省より提供を受けたものを使用した。

アセトン、アセトニトリル、塩化ナトリウム、n-ヘキサンは残留農薬試験用を、硫酸マグネシウムは試薬特級

Development of Rapid, Simultaneous and Systematic Analysis of Many Chemicals, probably Causing Water Pollution Accidents. by ITOH Miki, YASUDA Kazuhiro (Environmental Science Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science), YOSHIMOTO Takashi (Waste Management Division, Environment Department, Ishikawa Prefecture)

Key words : Water Pollution Accident, Fishes, Pesticides, Chemical Pollutant, QuEChERS method

を用いた。

オクタデシルシリル化シリカゲルカラム, (以下「C18カラム」という。)はSep-Pak Plus C-18 360mg (waters社製)を, スチレン-ジビニルベンゼン共重合体カラム (以下「PS2カラム」という。)はSep-Pak Plus PS-2 360mg (waters社製)を, シリカゲルカラム (以下「シリカカラム」という。)はSep-Pak Plus Silica 690mg (waters社製)を用いた。

2・3 分析方法

分析に迅速性が求められることから試料の前処理 (抽出)にはキャッチャーズ (QuEChERS)法に準拠した手法を用いることとした³⁾⁴⁾。また, 試験対象は生物試料であるため, 対象となる化学物質を抽出・精製するために大量のマトリックスを除去する必要がある。そのため抽出した抽出液からの精製方法についても検討を加えた。

2・4 装置及び測定条件

(1) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)

(株)島津製作所のGCMS-QP2010又は(株)日本電子のJMS-AMsunを使用した。

(2) 測定条件

データ取得範囲は, 未知物質の解析のため可能な限り広い範囲 (取得時間3.5-38min間隔0.5s/scan イオン範囲50-430)で行うこととした。以下にガスクロマトグラフの分析条件を示す。

微極性カラム: DB-5 MS (J&W社製), 長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μ m

カラム温度: 50°C (2min) - 10°C /min - 300°C (13min)

注入口温度: 250°C

インターフェイス温度: 250°C

注入方式: スプリットレス

注入量: 1 μ L

高極性カラム: TR-WAX (サーモフィッシャー社製), 長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μ m

カラム温度: 50°C (5min) - 10°C /min - 250°C (15min)

注入口温度: 250°C

インターフェイス温度: 250°C

注入方式: スプリットレス

注入量: 1 μ L

また, 水質事故発生時にはマトリックス等の影響でカラムの劣化が激しく同じカラムを使用し続けることが困難となる可能性もあるため, 保持時間の指標となるC13,C14,C15のアルカンも同時に測定した。

3 実験及び考察

3・1 使用カラムの選択

カラムは微極性のDB-5MSおよび高極性のTR-WAXの2種類について検討したが, 今回用いた測定条件 (注入した標準物質の濃度100ng/mL)ではDB-5MSは159化学物質中130物質, TR-WAXは80物質しか標準物質のピークを確認できなかった。そのため本法における使用カラムをDB-5MSとした。DB-5MSで測定可能であり, 今回の試験法に用いた化学物質を表1に示す。

表1 検討対象化学物質の保持時間及びモニターイオン

化学物質名	保持時間 (min)	テトラデカンの保持時間との比	モニターイオン		化学物質名	保持時間 (min)	テトラデカンの保持時間との比	モニターイオン	
			定量イオン	定性イオン				定量イオン	定性イオン
1e,3e,5a-トリフェニルシクロヘキサン	26.333	2.086	317	130	チオベンカルブ	19.658	1.557	125	257
1-メチルナフタレン	11.484	0.910	142	141	テトラコナゾール	19.858	1.573	336	171
1-メトキシ-2-ニトロベンゼン	11.950	0.947	153	123	テトラデカン*	12.625	1.000	85	71
2-(チオシアナートメチルチオ)-1,3-ベンゾチアゾール	21.500	1.703	180	136	テブコナゾール	23.617	1.871	250	125
2,3-ジクロロアニリン	12.017	0.952	161	163	テブフェンピラド	24.533	1.943	318	333
2,4,6-トリクロロフェノール	12.117	0.960	196	-	テフルトリン	17.865	1.415	177	197
2,4-キシレノール	8.925	0.707	107	122	トリデカン*	11.183	0.886	85	127
2,4-ジクロロアニリン	11.725	0.929	161	163	トリフルラリン	16.110	1.276	306	264
2,5-ジクロロアニリン	11.783	0.933	161	163	トリフロキシストロピン	23.058	1.826	116	222
2,6-ジ-tert-ブチル-4-sec-ブチルフェノール	15.592	1.235	233	247	トルフェンピラド	29.750	2.356	383	197
2,6-ジクロロアニリン	10.342	0.819	161	163	ノニルフェノール	16.342	1.294	163	107
2,6-ジニトロトルエン	13.500	1.069	165	148		16.617	1.316	135	220
2-アミノ-4,6-ジメトキシピリミジン	11.458	0.908	154	155		16.558	1.312	149	191
2-ニトロアニリン	12.850	1.018	138	92		16.708	1.323	149	191
2-ヒドロキシビフェニル	14.340	1.136	170	141		16.900	1.339	149	107
2-メチルナフタレン	11.249	0.891	142	141		16.925	1.341	163	-
3,4-ジクロロアニリン	13.175	1.044	161	163		17.175	1.360	135	107
3,5-ジクロロアニリン	12.800	1.014	161	163		17.092	1.354	177	163
3-メチルピリジン	3.842	0.304	93	66		17.267	1.368	149	107

4-プロモフルオロベンゼン	4.792	0.380	174	95	パラチオンメチル	18.760	1.486	263	93
6,6'-ジ-tert-ブチル-4,4'-ジメチル-2,2'-メチレンジフェノール	23.775	1.883	340	288	ハルフェンブロックス	27.100	2.147	265	183
EPN	24.275	1.923	157	169	ビスフェノールA	21.500	1.703	213	228
m-ニトロアニリン	13.900	1.101	138	92	ピリダベン	26.317	2.085	147	309
N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド	27.650	2.190	180	98	ピリブチルカルブ	23.925	1.895	165	181
o m p クレゾール	6.966	0.552	108	79	ピリミノバックメチル(E)	22.992	1.821	302	330
	7.747	0.614	108	79	ピリミノバックメチル(Z)	22.358	1.771	302	330
o-クロロニトロベンゼン	10.391	0.823	111	157	ピリミホスメチル	19.210	1.522	290	305
o-トルイジン	7.558	0.599	106	107	フィプロニル	20.250	1.604	367	351
p-t-オクチルフェノール	15.142	1.199	135	107	フェニトロチオン	19.292	1.528	260	277
Pプロチオホス	21.525	1.705	309	267	フェノブカルブ	10.742	0.851	121	150
p-安息香酸 n プロピル	15.742	1.247	121	138		15.425	1.222	121	150
アゾキシストロビン	29.325	2.323	344	388	フェンチオン	19.708	1.561	278	169
アトラジン	17.207	1.363	200	215	フェントエート	20.625	1.634	274	246
アメトリン	19.058	1.510	227	212	フェンプロバトリン	24.425	1.935	181	125
アラクロール	18.758	1.486	269	160	フサライド	20.033	1.587	243	272
アントラキノ	19.534	1.547	208	180	ブタクロール	21.108	1.672	176	160
イソキサチオン	22.092	1.750	105	177	ブタミホス	21.292	1.686	286	200
イソプロカルブ	14.542	1.152	121	136	ブプロフェジン	21.842	1.730	172	175
イソプロチオラン	21.545	1.707	231	290	フルオランテン	20.733	1.642	202	101
イソプロピルベンゼン	4.717	0.374	120	105	フルトラニル	21.467	1.700	173	281
イブジオン	24.217	1.918	314	187	プレチラクロール	21.533	1.706	262	238
エトフェンブロックス	27.383	2.169	163	135	プロパルギット	23.625	1.871	350	173
オキサジクロメホン	13.800	1.093	187	189	プロピコナゾール	23.275	1.844	173	-
オクタクロロスチレン	20.275	1.606	380	343	プロピザミド	17.573	1.392	173	175
カズサホス	16.375	1.297	158	159	プロフェノホス	21.625	1.713	339	337
カルバリル	14.383	1.139	144	115	プロモブチド	18.606	1.474	119	232
	18.901	1.497	144	115	ヘキサクロロ-1,3-ブタジエン	9.775	0.774	223	225
キャプタン	20.583	1.630	79	107	ベルメトリン	26.250	2.079	183	163
クロルピリホス	19.606	1.553	197	314	ベンシクロン	16.417	1.300	180	209
クロロタロニル	17.741	1.405	266	264	ベンジルアルコール	6.958	0.551	79	108
クロロフェナピル	21.883	1.733	408	247	ベンゾフェノン	15.792	1.251	182	105
シアナジン	19.709	1.561	225	240	ペンタデカン*	13.992	1.108	155	168
ジイソプロピルナフタレン	16.208	1.284	212	197	ペンディメタリン	20.292	1.607	252	281
	16.308	1.292	212	197	マラソン	19.467	1.542	173	127
	16.792	1.330	212	197	マイクロブタニル	21.817	1.728	179	152
	16.858	1.335	212	197	メソミル	14.758	1.169	105	58
	16.917	1.340	212	197	メチダチオン	20.958	1.660	145	125
ジエトフェンカルブ	19.667	1.558	267	225	メチル=ドデカノアート	14.308	1.133	214	171
ジクロシメット	20.675	1.638	277	221	メチレンビス(4,1-シクロヘキシレン)=ジイソシアネート1	20.908	1.656	81	139
	21.017	1.665	277	221		21.433	1.698	81	139
ジクロルボス	10.375	0.822	109	185		21.533	1.706	81	139
シハロホップブチル	25.133	1.991	357	256	メトキサレン	20.308	1.609	216	201
ジフェノコナゾール	28.683	2.272	233	265	メトラクロール	19.558	1.549	162	238
シマジン	17.110	1.355	201	186	メフェナセット	25.233	1.999	192	120
ジメトエート	16.917	1.340	229	93	メプロニル	22.850	1.810	119	91
シメトリン	18.896	1.497	213	170	酢酸2-エトキシエチル	4.417	0.350	72	59
ダイアジノン	17.567	1.391	304	179					

*保持時間の指標物質

3・2 抽出条件

キャッチャーズ法を用いた抽出条件について検討を行った。試料(筋肉部) 10gに標準物質を各々 100ng, 水10mL, 塩化ナトリウム 1gを添加し, ラボミキサーを用い試料をスラリー状にした後, アセトニトリル 20mL, 硫酸マグネシウム 8gを添加し振とう機にて振とうを行った。振とう後, 遠心分離器により3,000rpm 15分間の遠心分離を行い分離したアセトニトリル層を分取した。残さをラボミキサーで再度スラリー状にした後ア

セトニトリル10mL, 硫酸マグネシウム 4gを添加し振とう機にて振とうを行った。

図1に振とう時間が10分の場合の抽出回数が1回と2回を比較したものを示す。なおここでは, 抽出溶液の精製を行っていないため確認できた対象物質の一部について検討を行った。

抽出回数が1回と2回を比較すると1回より2回の方がより多く抽出されたことから抽出回数は2回とした。また3回以上については分析時間が長くなることから検

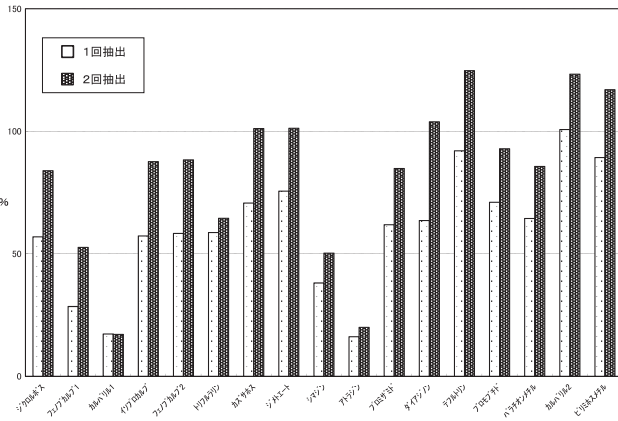


図1 抽出回数と回収率の関係

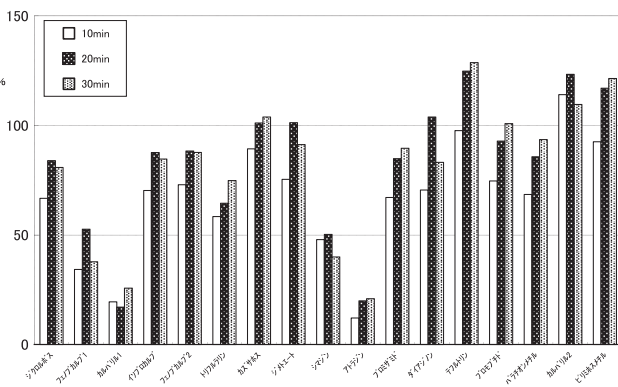


図2 抽出時間と回収率の関係

討しなかった。

図2に、抽出回数2回で、振とう時間10分、20分、30分としたとき（延べ振とう時間は20分、40分、60分）の抽出時間と抽出率との関係を示す。

抽出時間が長くなると抽出率も上がるが20分と30分にあまり差が見られなかったことから、以下の操作では抽出時間については短い方の20分とした。

3・3 精製条件

粗抽出液ではマトリックスが大きすぎてそのままでは対象物質を検出することはできない。そのために精製が

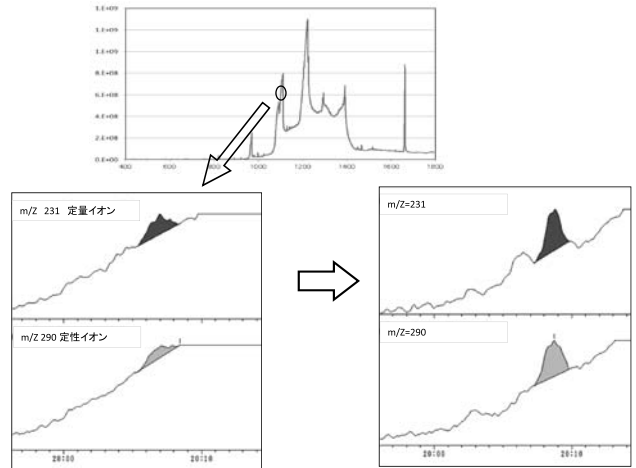


図3 C18カラムによる精製（例：イソプロチオラン）

必要となる。なるべく多くの化学物質を検出するために、特殊な前処理を行わず、固相カラムによるマトリックス成分除去について検討した。

生物試料からのアセトニトリル抽出物に含まれる不純物の多くは脂肪であると考えられることからC18カラムによる精製を行った。アセトニトリル10mLでコンディショニングしたC18カラムに抽出したアセトニトリル溶液1mLを添加しアセトニトリル10mLで溶出、窒素ガスを吹きつけ1mLまで濃縮、測定試料とした。

図3にイソプロチオランのC18カラムによる精製前後のピーク形状の変化を示す。上段は定量イオンm/z 231 下段は確認イオンm/z=290のスペクトルの一部である。

イソプロチオランに関してはC18カラムを通すことによりマトリックスの低減は図られているが、他の化学物質について十分ではなかったため追加の精製として、C18カラムの追加、PS2カラム、シリカカラムによる精製を検討した。精製手法はC18カラムと同様とした。

図4にC18カラム、C18カラム2段、C18カラム2段+PS2カラム、C18カラム2段+PS2カラム+シリカカ

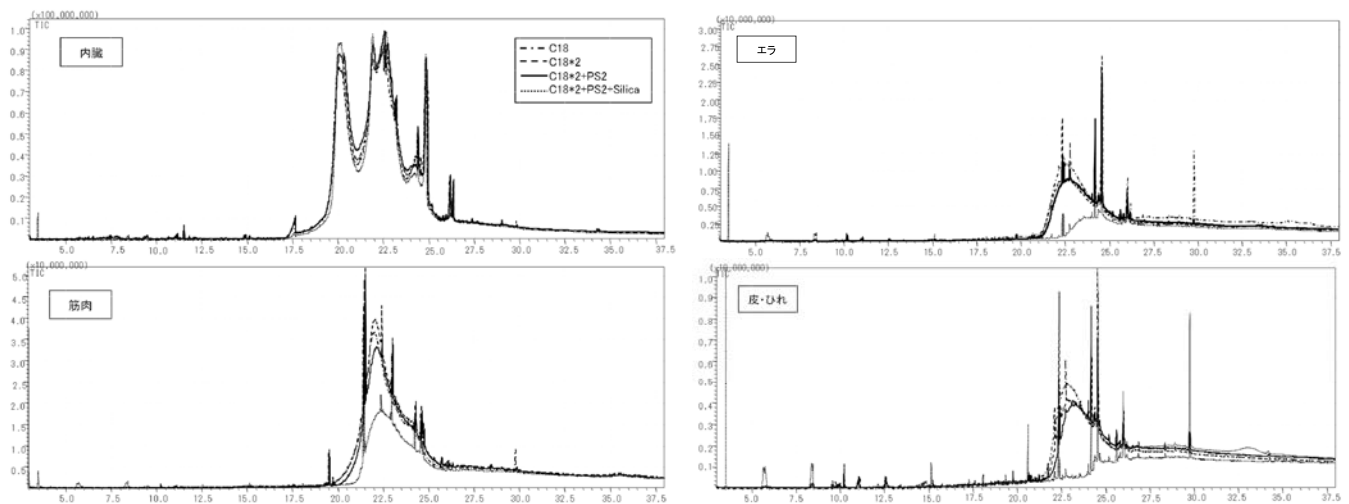


図4 前処理方法の違いによるTICの変化

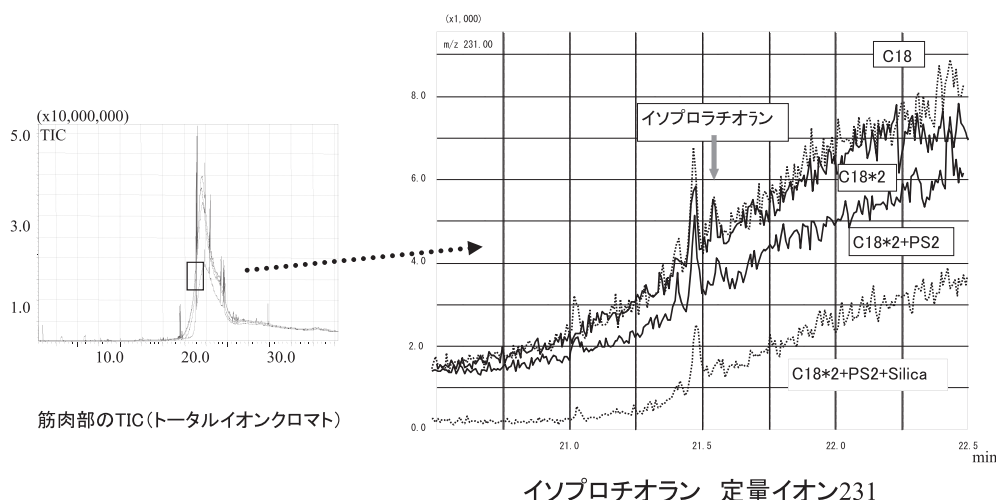


図5 前処理方法の違いによるクロマトの変化

ムと順次精製カラムを追加した場合の筋肉, 内臓, エラ, 皮・ひれのクロマト全体を示す。

内臓部や筋肉部ではカラムを追加しても顕著なクロマト形状の変化が認められないが, エラ部や皮・ひれ部ではC18カラム, C18カラム2段, C18カラム2段+PS2カラム, C18カラム2段+PS2カラム+シリカカラムとカラムを追加するにつれクロマト全体の強度が低くなりマトリックスが低減されていることがわかる。これは内臓部や筋肉部はエラ部や皮・ひれ部に比べ含まれる脂肪が多いため今回の精製方法により十分に除去されていないと

考えられる。

図5にイソプロチオランについて, それぞれの前処理を施した場合の定量イオンm/z 231のピーク形状の変化を示す。

C18カラムを2段にしてもピーク形状に変化が見られないことからイソプロチオランの精製に関してはC18カラムの追加が不要であることがわかる。さらにPS-2カラムを追加した場合マトリックスの低減が認められた。さらにシリカカラムを追加した場合は著しくマトリックスの低減が認められたが, 対象物質のピークも消失した

表2 部位・精製法による定性可能性の違い

		回収率					定性可能
部位	精製方法	不検出	-50%	50-150%	150-200%	200%以上	
エラ	C18	21	27	58	6	18	85
	C18*2	18	23	63	3	23	86
	C18*2+PS2	26	89	14	0	1	103
	C18*2+PS2+Silica	28	95	7	0	0	102
皮	C18	16	21	60	16	17	81
	C18*2	14	29	66	8	13	95
	C18*2+PS2	15	90	21	1	3	111
	C18*2+PS2+Silica	33	91	6	0	0	97
内臓	C18	46	9	28	3	44	37
	C18*2	48	19	14	2	47	33
	C18*2+PS2	47	58	18	0	7	76
	C18*2+PS2+Silica	49	65	10	1	5	75
筋肉	C18	20	7	43	13	47	50
	C18*2	33	16	56	9	16	72
	C18*2+PS2	24	74	25	2	5	99
	C18*2+PS2+Silica	26	95	7	0	2	102

定性可能

ことからシリカカラムはイソプロチオランの精製に関しては不適であることがわかった。

対象部位、精製の違いによる測定可能な化学種の数を表2に示す。マトリックスの除去が十分でないためそれらを対象化学種と誤認識し回収率が200%を超える化学物質が多いが、150%以下の回収率のものを定性可能と考え、C18カラム2段+PS2カラムでの精製がよいと判断した。C18カラム2段+PS2カラム+シリカカラムの場合、200%以上の割合は低下し150%以下の回収率の化学物質が増加するが不検出の化学物質が増加することから不適と判断した。

3・4 事故を想定した場合の適用に関する留意点

図6に水質事故時の魚類からの化学物質の測定までの分析法を示す。本法を用いると検体搬入から4時間以内に解析までを行い結果を出すことができるようになった。また今回検討した159種の化学物質の内、約100種について測定が可能となった。

しかし本分析法では前節でふれたようにマトリックス成分を十分に除去できず、ガスクロマトグラフ質量分

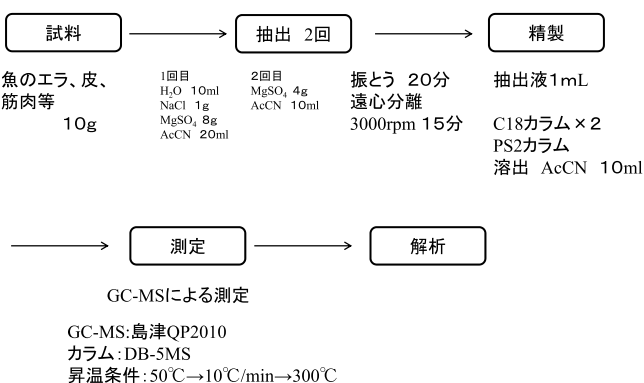


図6 魚類に含まれる化学物質の分析方法

析装置がマトリックス成分による汚染の蓄積と考えられるノイズの上昇が見られた。そのため、本法を用いて分析を行った後は、測定器内部の洗浄等、通常業務の測定に支障がないか確認が必要である。

4 まとめ

- (1) キャッチャーズ法を用いることにより、短時間で抽出を行うことができるようになった。
- (2) C18カラム、PS2カラムによる精製で、検討した159種の化学物質の内約100種について検出を可能とした。
- (3) 本法ではマトリックス成分が十分に除去しきれないため、使用した測定装置を通常業務に使用するためには性能確認を行い、必要があれば装置の洗浄等が必要である。

文 献

- 1) 中央環境審議会大気環境・水環境合同部会 公害防止取組促進方策小委員会 (第4回) 会議資料 資料4 公共用水域における水質事故について <https://www.env.go.jp/council/41air-wat/y411-04.html> (2009年11月20日)
- 2) 水質汚濁事故発生状況 静岡県環境局生活環境課HP <https://www.pref.shizuoka.jp/kankyoku/ka-050/sui/suisutujiko.html> (2012年4月)
- 3) 仲谷 正, 宮本伊織, 清水 充: QuEChERS法キットを用いた食品中の合成香料の分析について, 大阪市立環科研報告, 74, 29-36 (2012)
- 4) CVUA Stuttgart: QuEChERS法ホームページ <http://quechers.cvua-stuttgart.de/> (2012年4月)