

称号及び氏名	博士（工学） 上堀 美知子
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 31 日
論文名	「液体クロマトグラフィー／質量分析法による環境中の 微量有機化学物質の定性および定量に関する研究」
論文審査委員	主査 坂東 博
	副査 八尾 俊男
	副査 河野 健司

論文要旨

本論文は、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）および液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法（LC/MS/MS）による環境中微量有機化学物質の分析法を確立し、有機化学物質の環境における汚染実態および挙動を把握すること、有害化学物質を検索するための LC/MS スクリーニングシステムを構築することを目的とする。加えて、環境分析における LC/MS、LC/MS/MS の有効性を実試料の分析を実施する中から実証することを目的としたものであり、6 章から成る。

第 1 章は、本研究の背景について述べた。化学物質が原因で起こった環境問題の事例を文献等から引用し、環境への影響および関連する法規制を示すとともに、化学物質による環境汚染の実態を把握する必要性について示した。次に、そのための分析手段である LC/MS、LC/MS/MS の発達の経緯および環境分析への応用例を示し、本研究の目的を述べるとともに、本論文の構成を示した。

第 2 章は、金属加工事業場等を対象に、要監視項目に指定されているニッケル等の化学物質の排出および処理状況についてまとめた。各処理工程では種々のキレート剤や可塑剤（フタル酸ジエチルヘキシル）等が使用され、排水中には微量の有機化学物質が多く含まれることから、これらの有機化学物質の濃度を把握する重要性を見出し、その分析手段として LC/MS、LC/MS/MS が最適であることを示した。

第3章は、LC/MS、LC/MS/MSによる微量有機化学物質の分析法について示した。分析法は、微量有機化学物質の重要な分析手段であるGC/MSでは分析が困難とされる熱分解性・高極性化合物等を対象として、低濃度 (ng/L) レベルの分析に対応できる方法を検討した。

検討対象物質には環境水中の化学物質のうち、海棲生物防除剤 (防汚剤) として使用されてきた有機スズ化合物の代替防汚剤である 2-メチルチオ-4-*t*-ブチルアミノ-6-シクロプロピルアミノ-*s*-トリアジン (イルガロール 1051)、樹脂の硬化剤等に使用され動物実験により発がん性の可能性も疑われる 3-アミノ-1H-1, 2, 4-トリアゾール (アミトロール)、農薬としては失効しているが難分解性で蓄積性が疑われる 4,6-ジニトロ-*o*-クレゾール (DNOC) をとりあげた。一方、環境大気中の微量有機化学物質としてアクロレインをとりあげた。

イルガロール1051に関しては、シリカゲルにオクタデシル基を化学結合させたものを充填したカートリッジに試料水 (1 L) を通水してイルガロール1051を捕集後、アセトニトリル (5 mL) で溶出することにより高感度 (0.05 ng/Lレベル) に分析できる方法を見出した。

大阪湾の調査地点におけるイルガロール1051の濃度 (0.40~3.6 ng/L) は淀川河口域より泉州地域の南部の海域がやや高い濃度であるが、瀬戸内海沿岸の濃度 (平均25 ng/L程度) より低濃度であることを示した。

アミトロールは、従来はフルオレスカミンおよびアセチル誘導体等に誘導体化して測定されていたが、本研究では誘導体化を必要としない前処理法を見出し、直接アミトロールを分析する方法を開発した。前処理法は、活性炭を充填したカートリッジに試料水を通水してアミトロールを捕集後、25 %アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル (10/9/81) の混合溶媒で溶出する方法であり、直接定量することにより分析精度が向上した。

DNOCおよび異性体である 2,6-ジニトロ-*p*-クレゾール (DNPC) に関しては、2元細孔構造のスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填したカートリッジに高流量 (50 mL/min) で通水捕集する固相抽出法およびLC/MS/MSによる分析法について検討した。大阪府内の河川水中の濃度は、 $10^1 \sim 10^2$ ng/L程度であることを明らかにした。DNOCおよびDNPCは農薬としての登録はすでに失効しているが、我が国の水環境は現在も汚染されている状況にあり、残留性や拡散・分解のメカニズムの解明が必要であることを示唆する結果が得られた。

大気環境中のアクロレイン (ACR) は、従来法である 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 誘導体化に替わる *O*-(4-シアノ-2-エトキシベンジル)ヒドロキシルアミン (CNET) により誘導体化した後、LC/MS/MSによる定性・定量を行う分析法について検討した。一般に、採取時の気温および湿度は捕集効率に影響するが、捕集した誘導体の安定性は、DNPH法に比較してCNET法が優れており、ACR-CNET誘導体は捕集したカートリッジでは5日程度、溶出液中では1ヶ月程度保存可能であることが明らかになった。また、同方法は高感度であり、短時間 (2~3時間) の試料採取を行うことにより、ACR等アルデヒド類の時間的な濃度変動を把握できることを示した。

第3章では、LC/MS、LC/MS/MS分析の特徴として、煩雑な操作を必要としない前処理（25～100倍程度濃縮）により環境中の有機化合物の 10^{-1} ～ 10^{-2} ng/Lレベルの濃度でも定量が可能であり、それらの汚染の実態を把握できること、汚染源等の解明に必要な短時間の濃度変動情報を提供できることを示した。

第4章は、有害化学物質の検索システムとして、環境試料中の化学物質を検索および同定するためのスクリーニング法について検討した。スクリーニング法は、化学物質を分離・精製する前処理法と化学物質の検索および同定のためのLC/MSデータベースシステムとの組み合わせで構成した。検討の対象とした物質は「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」（化学物質管理促進法、PRTR）で定める化学物質を含む153物質である。

データベースはマススペクトル情報、相対保持時間（RRT）および $\text{Log } P_{\text{ow}}$ （ P_{ow} ：オクタノール/水分配比）の3項目で構成した。

マススペクトル情報は、1つの化学物質について大気圧化学イオン化法およびエレクトロスプレー法の2つのイオン化法でそれぞれ正と負イオンの合計4つのマススペクトルを測定し、その結果を基に、検索に用いるべき質量数（ m/z ）を正イオンおよび負イオンごとにリストアップした。

RRTは、LC分離カラムでの保持時間（ t_R' ）を測定して求めた。さらに、 t_R' を求めるための標準的な分析条件として、対象物質が40分程度で分離検出できる方法を確立した。

$\text{Log } P_{\text{ow}}$ は環境中における化学物質の生物濃縮性に関連づけることのできる有効な指標である。また、多数の化学物質において $\text{Log } P_{\text{ow}}$ と t_R' の対数値は直線関係にあることが知られている。本研究で検討対象とした化学物質においても両者の間に良好な相関が認められたことから、化学物質のRRTから $\text{Log } P_{\text{ow}}$ を推定することができると判断し、データベースの要素とした。

試料の前処理に関しては、捕集剤を充填した固相カートリッジによる化学物質を分離・精製する固相抽出法について検討した。検討した捕集剤は、疎水性の化学物質を捕集するために有効な固相カートリッジ（HLB）および親水性の化学物質に有効な固相カートリッジ（AC-2）である。各固相カートリッジに予め添加した物質（153物質）を種々の溶媒で溶出し、最も多くの物質が溶出する固相カートリッジと溶媒の組み合わせを最適と判断した。さらに、溶出した物質の検索・同定は前節で構築したデータベースを用いて行った。その結果、最適な前処理法はHLBとメタノールの組み合わせであり、25倍濃縮操作で1 $\mu\text{g/L}$ 程度の濃度レベルで存在する83物質の検索・同定が可能であることが明らかとなった。

本研究で提案したスクリーニング法により、試料水中の化学物質を固相抽出法で分離・精製し、各種データベースシステムを組み合わせることにより、化学物質を容易に検索し、同定できるシステムが構築できた。

第5章は、環境大気中におけるアクロレインなど微量アルデヒド類の定量および挙動の解明の可能性について示した。

LC/MSを用いて大気環境中に存在する25成分のアルデヒド類の汚染状況について調査した。大阪府下の道路沿道、準工業地域および住宅地域で調査した結果、ホルムアルデヒド(FA)、アセトアルデヒドの濃度レベルは、 $3.0\sim 6.9\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $1.3\sim 4.6\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、これまでの測定結果と同じ濃度レベルであった。また、ACR、クロトンアルデヒドは、ほとんど濃度が把握されていなかった成分であるが $0.01\sim 0.06\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ であることを明らかにした。

環境中におけるACRとFA他5成分のアルデヒド類の挙動は、5月11日～19日の間、2～3時間毎に濃度を測定して調査を行なった。ACR濃度は1日の中でも朝方および夕方から深夜に高く、日中は低くなる傾向を示し、日中に濃度が上昇するFAとは異なる濃度変動を示した。ACRは一酸化窒素、二酸化窒素、一酸化炭素および非メタン炭化水素と正の相関、オキシダントとは負の相関を示した。さらに、同測定地点と自動車排ガス測定局の大気汚染物質濃度との比較を行った。その結果、ACRの朝方および深夜における濃度の上昇は自動車から直接排出される燃焼由来の一次汚染物質としての挙動によるものであると結論づけた。日中は光化学反応により生成することが予想されるが、直接光分解により速やかに分解するために濃度が減少したと考えられた。FAについても同様の検討を行い燃焼由来の一次汚染物質であるが、光化学反応による生成がFAの濃度を上昇させる要因と結論づけた。

第6章は総括であり、本論文で得られた成果について要約するとともに、本分野における将来の研究課題について言及した。

審査結果の要旨

本論文は、液体クロマトグラフィー／質量分析法(LC/MS)および液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて環境中微量有機化学物質を定性・定量分析するための手法を確立するとともに、LC/MSデータから有害化学物質を検索・同定するためのスクリーニングシステムを構築することを目的とした研究の成果をまとめたものであり、つぎのような成果を得ている。

- (1) 従来法では分析が困難な熱分解性・高極性化合物を主な対象として、LC/MSおよびLC/MS/MS分析では誘導体化等の煩雑な前処理操作なしで25～100倍程度の濃縮処理のみで濃度が $10^{-1}\sim 10^{-2}\ \text{ng}/\text{L}$ レベルの物質の定量が可能であることを明らかにした。実際に化学物質4種について、大阪府下の環境中濃度を測定し、その実態を明らかにした。また、汚染原因の解明に必要な短時間の濃度変動情報を提供できることを示した。
- (2) 環境試料のLC/MS分析データから未知物質を同定するための最適なスクリーニング法

を提案した。即ち、疎水性、親水性それぞれの化学物質に対して最適な固相吸着剤と抽出液の組合せにより分離・精製する前処理と、LC分離における相対保持時間×4種類のMSスペクトル（大気圧化学イオン化法およびエレクトロスプレーイオン化法それぞれにおける正および負イオン質量スペクトル）情報の組合せをスクリーニングの手段とすることにより、PRTRに定める153物質中半数以上の物質が確実に検索ヒットできる検索法を構築し、提案した。

- (3) LC/MSを用いて大気環境中に存在する25種類のアルデヒド類の汚染状況を同時に分析できることを示すとともに、大阪府下におけるこれら汚染物質全体の濃度レベルを初めて明らかにした。25成分の中にはアクロレイン、クロトンアルデヒドのように初めて定量分析された物質も含まれる。加えて、短時間間隔での濃度測定により、アクロレイン等の発生源についても検討できる可能性を示した。

以上の諸成果は、LC/MSおよびLC/MS/MSという新しい分析手段を環境中微量有機化学物質の定性・定量分析およびその動態解析に適用する方法論を提示したものであり、農薬等有害有機物による環境汚染の問題の解決に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。