

液体クロマトグラフィー質量分析による羊毛繊維中 4・6-ジクロル-7-(2・4・5-トリクロルフェノキシ)- -2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール (DTTB) 分析法の検討

井上 智 宮本紫織 岡 裕三 小笠原光憲 大瀬戸光明 井上博雄

A Study on Determination of 4・6-Dichloro-7-(2・4・5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB) in Wool Fabrics by Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Satoshi INOUE, Shiori MIYAMOTO, Yuuzou OKA, Mitsunori OGASAWARA
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE

An analytical method for determination of 4・6-Dichloro-7-(2・4・5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB) in wool fabrics by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) was developed.

10% sodium hydroxide solution of household wool yarn was extracted with ether, and the extract was dissolved in acetonitrile. It was added DTTB standard solution and was measured by MS with electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The ionization was suppressed much more higher with APCI than ESI by matrices.

DTTB was able to be clearly separated with acetonitrile-0.075% formic acid including 7.5mM ammonium formate (80 : 20) used as the mobile phase by C18 column (50mm × 2.1mm i.d.) within three minutes at retention time. Within the range from 1 to 500 $\mu\text{g/L}$, all peaks were proportional and correlation coefficient showed 0.999 in linear regression analysis. Detection limit of the developed method was 0.3 $\mu\text{g/L}$ (S/N=3) and relative standard deviation was less than 1% (n=6).

The recoveries of DTTB spiked to commercially available household wool yarn showed more than 90%, and relative standard deviation was less than 5%. DTTB more than 500ng in an extracted solution was able to identify by the FDA criteria

Keywords : DTTB, wool fabrics, LC-MS, C18, short column, determination, identification

はじめに

4・6-ジクロル-7-(2・4・5-トリクロルフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール (DTTB) は、従来、繊維製品用防虫加工剤として使用されていたが、動物を用いた毒性試験結果から、経皮・経口急性毒性が極めて強く、反復投与により肝臓障害や生殖器障害等の毒性を示し、また、加工羊毛製品から汗への溶出も明らかとなったことから「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」において30ppm以下という基準が設定されている¹⁾。このため、当所においても薬務衛生課が試買した製品を対象に試験を実施し安全性の確保に努めて

いる。

現在、DTTBの基準試験法は、製品を10%水酸化ナトリウムに溶解してエチルエーテルで抽出し、得られた抽出物をN-メチル化したのち、電子捕獲型検出器 (ECD) 付きのガスクロマトグラフにより、分離・定量するものである。しかし、メチル化試薬のジメチル硫酸は発ガン性を有しているため、その取り扱いに十分注意をする必要がある²⁾。このため、メチル化処理を行わず分離・定量の可能な蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-FL) 及び紫外分光光度計検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) による方法が報告されているが、直接注入では抽出液の妨害物質のため定量が困難である。また、カラムによるクリーンアップが必要

であるため、分析に長時間を要し試料の処理能力に限界がある^{3, 4)}。一方、検出器としての質量分析装置 (MS) は、その選択性の高さから、従来から、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法として環境分野等で広く利用されていたが、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 法は検出部への試料導入時ガス化が必要なため、通常分析業務への適用が困難であった。しかし、大気圧イオン化法 (API) の開発により、近年では、様々な分野への適用が図られている。

また、HPLCは様々な分野で活用されているが、創薬研究では、コンビナトリアルケミストリーの技術と連携し、多様な化合物を迅速に精製分析するため、ショートカラムを用いたハイスループットスクリーニングとして利用されている^{5, 6)}。環境汚染物質の分析においても、多数の検体中の多様な化合物を分析することが必要であり、迅速分析法の開発は重要である。

そこで今回、ショートカラムを用い、迅速性、選択性に優れたLC-MS法を開発したので報告する。

材料と方法

1 装置

高速液体クロマトグラフはアライアンス2695 (日本ウォーターズ株式会社) を、質量分析計はQuattro micro (日本ウォーターズ株式会社) を、イオン源はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 及び大気圧化学イオン化 (APCI) の両イオン化が可能なESCiイオン源を使用した。

2 測定条件

カラムはAscentis C18 (5 μ m, 50mm \times 2.1mm i.d.) (SUPELCO社) を、移動相はアセトニトリルと7.5mMギ酸アンモニウムを含有する0.075%ギ酸溶液を80 : 20の割合で混合し、メンブレンフィルターでろ過後使用した。移動相の流速は0.2mL/min, カラム温度は40 $^{\circ}$ C, 試料注入量は2 μ Lとした。

イオン化法はESIのネガティブモードを採用し、測定はSelected Ion Recording (SIR) で行った。MS条件としては、温度及びソース温度をそれぞれ350 $^{\circ}$ C, 120 $^{\circ}$ Cとし、コーンガス (N₂) 流量及びデソルベーションガス (N₂) 流量を50L/hr, 600L/hrとした。また、キャピラリー電圧及びコーン電圧をそれぞれ3.2kV, 49Vとした。モニタリングイオンは m/z 446.8, 448.8, 450.8, 452.8とし、ベースピークイオンである448.8を定量イオンとし、その他のイオンは定性に使用した。定性方法は、FDAの残留動物用医薬品の同定法の基準⁷⁾を準用し、 m/z 446.8, 450.8, 452.8のイオンピークの m/z 448.8イオンピークに対する全ての相対強度が、同位体存在度から求めた計算値0.620, 0.648, 0.212の \pm 10%以内となる場合とした。なお、測定ソフトウェアはMassLynx

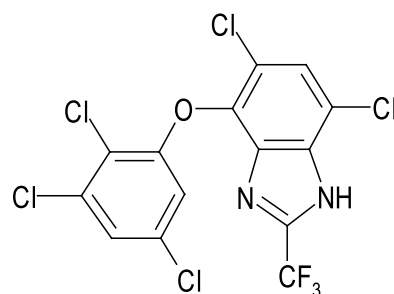
(日本ウォーターズ株式会社) を、解析ソフトウェアはTargetLynx (日本ウォーターズ株式会社) を使用した。

3 試薬

DTTB標準品は家庭用品試験用 (和光純薬工業株式会社) を使用した。アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用 (関東化学株式会社) を、ギ酸、ギ酸アンモニウム、酢酸、酢酸アンモニウム、水酸化ナトリウム及びエチルエーテルは特級 (ナカライテスク株式会社, 和光純薬工業株式会社) を、硫酸ナトリウム (無水) は残留農薬試験用 (和光純薬工業株式会社) を使用した。ろ過にはPTFE製0.5 μ mメンブレンフィルター及びPTFE製0.2 μ mディスポーザブルメンブレンフィルターユニット (アドバンテック東洋株式会社) を使用した。標準液は、精秤したDTTB標準品20mgをアセトニトリルで20mLに定容し、標準原液 (1mg/mL) を調製後、アセトニトリルで適宜希釈し調製した。精製水は蒸留水をMILLI-Q SP TOC超純水製造装置 (日本ミリポア・リミテッド) により精製後使用した。なお、DTTBの構造式及び分子量を図1に示した。

4 実験操作

抽出法は家庭用品の基準試験法に従い実施した。まず、細かく切った試料0.5gを精秤し、50mLの共栓付遠沈管に入れ、10%水酸化ナトリウム溶液10mLを加え、3時間放置して溶解した。次に、この液にエチルエーテル10mLを加えて5分間激しく振り混ぜた後、1分間4000回転で10分間遠心分離を行い、エチルエーテル層を分取した。この操作を更に3回繰り返し、全エチルエーテル層を合わせた。これに硫酸ナトリウム (無水) 約5gを加えてよく振り混ぜた後、ガラスろ過器 (G2) を用いてろ過し、ろ液を100mLのナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターを用いて50 $^{\circ}$ Cでエチルエーテルを除去した。残留物にアセトニトリル10mLを正確に加え溶かし、メンブレンフィルターでろ過し試験溶液とした。



分子式 : C₁₄H₄Cl₃F₃N₂O

分子量 : 450.47

図1 DTTBの構造式及び分子量

結果及び考察

1 MS測定条件の検討

MSは、マトリックス共存下でも特定イオンを選択的に測定することができ、前処理操作の簡略化が可能なため医薬品分析及び環境汚染物質分析等様々な分野で広く利用されている。試料が液体の状態でもMSへ導入されるLC-MSでは、試料を気体にイオン化する必要があり、その困難さのために、種々のイオン化法が検討されてきたが、API法が開発され、その取り扱いの簡便さのため利用が急速に広がってきた。一方、イオン源でのイオン化効率は移動相中の溶媒濃度、pH及び塩濃度等に影響されることが知られている^{8, 9)}。また、試料中の共存物質によるイオン化への抑制効果による定量値への影響が指摘されている^{10, 11)}。そこで、DTTBにおける適切なイオン化方法を選択するためESI及びAPCIで比較検討した。なお、移動相のpH及び塩濃度の影響はHPLCの測定条件と併せて検討した。

(1) 移動相溶媒濃度のイオン化に対する影響

ESIによるイオン化は、イオン化過程の脱溶媒時に電荷の濃縮が起こるため溶媒濃度が高いほどイオン化効率が良いことが知られている。このため、アセトニトリルと精製水混液移動相中のアセトニトリル濃度を10, 30, 50, 70, 90%とし、ネガティブモードで標準液(1mg/L)をフローインジェクション法により5 μ L注入し、イオン強度高さをSIRにより測定し、溶媒濃度の影響を検討した。その結果を図2に示した。

APCIは、アセトニトリル濃度が高くなるに従って徐々にイオン強度が上昇し、90%では10%の約3.2倍であった。一方、ESIは10%から30%は強度の変化はほとんどなく、70%まではAPCIとほぼ同程度の強度で徐々に上昇し、それ以降急激な上昇を示し、90%では10%の約3.7倍となり、APCIに比較し溶媒濃度の影響が大きかった。なお、ポジティブモードでは両イオン化法ともネガティ

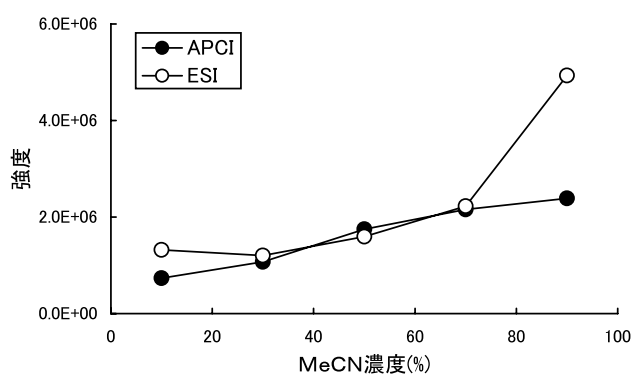


図2 溶媒濃度のイオン化に対する影響

〔標準液(1mg/L)をフローインジェクション法で5 μ L注入〕

ブモードに比較しイオン強度が低かったため、これ以後の検討はネガティブモードのみで行った。

(2) 試料中共存物質のイオン化に対する影響

APIはソフトなイオン化のため生体試料のように種々の物質が共存すると分析対象物のイオン化に影響を及ぼし、また、イオン化法によりその影響の割合も異なることが知られている。このため、DTTBを含有していないことを確認した家庭用毛糸を試料とし、実験操作に従い抽出した試験溶液4mLに標準液(5mg/L)1mLを加え混合した試料をフローインジェクション法により5 μ L注入し、イオン強度高さをSIRにより測定し、標準液と比較し、共存物質のイオン化に対する影響を検討した。なお、同時に移動相中の溶媒濃度の影響も検討するため、アセトニトリル濃度は50%と90%とした。その結果を図3に示した。

APCIはアセトニトリル濃度50%では5.4%であり、90%では6.1%であった。また、ESIはアセトニトリル濃度50%では60.9%であり、90%では54.1%であった。共存物質の影響は、ESIに比較しAPCIの方が大きく約10倍であった。また、移動相中のアセトニトリル濃度の影響はみられなかった。Kingらは、排尿障害改善・降圧剤であるウラピジルの血漿中濃度をESIとAPCIで測定し、イオン化抑制効果がESIの方が大きいと報告している¹⁰⁾。その原因は、ESIでは共存する試料由来の非揮発性物質が蒸発効率を低下させ、小滴形成効率を減少させるためであり、APCIでは、非揮発性物質と分析対象物の結晶生成によりイオン化効率が減少するためであるが、生体試料中の非揮発性物質はESIへの影響の方が大きいと考察している。今回の検討結果は、生体試料とは異なり、APCIの方がイオン化抑制効果が著しかった。これは、タンパク質をアルカリ分解後ジエチルエーテルで抽出する前処理操作によりイオン源で気化する前に結晶化する物質が多量に共存しているためと考えられる。

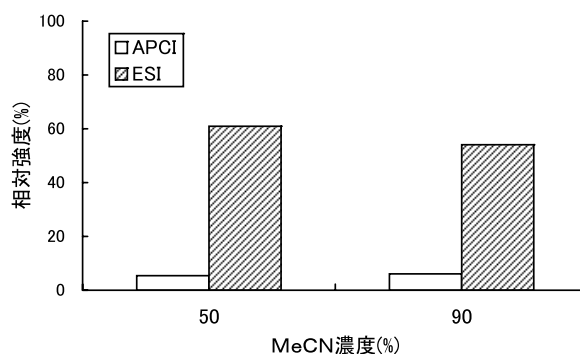


図3 共存物質のイオン化に対する影響

〔家庭用毛糸抽出液と標準液の混合液(1mg/L)及び標準液(1mg/L)をフローインジェクション法で5 μ L注入〕
相対強度(%) = (家庭用毛糸抽出液と標準液の混合液のイオン強度 / 標準液のイオン強度) × 100

このため、イオン化法はESIを用いることにした。

なお、ESIにおいても共存物質の影響が観察されるため、フローインジェクション分析法の適用は困難であり、カラムによる分離が必要であった。

また、試料の定性法として、タンデム質量分析による最適条件を検討したが、緩和な条件下でも塩素イオンのピークしか観察されず、適切なフラグメントイオンを生成しなかったため、同位体ピークを用いて同定することにした。

2 HPLC測定条件の検討

萩原ら³⁾及び石川ら⁴⁾はHPLCによるDTTBの分離にはODSカラムが有用であると報告している。一方、近年のカラム製造技術の進歩により、創薬研究においては、候補化合物を迅速にスクリーニングするためショートカラムを用いたハイスループット法が汎用されている。分析法のハイスループット化は、多数の検体を処理することが可能となるとともに、有機溶媒の使用量も減少することから環境に対しても優しいという長所を有している。このため、カラム長さ50mmのODSショートカラムにより検討した。

(1) 移動相中の緩衝液の検討

萩原ら³⁾は水-メタノール-酢酸を用いた移動相でDTTBのODSカラムへの容量比 (k') がpHにより影響を受け、pH3.85で k' が最大となると報告している。そのため、LC-MSで汎用されるギ酸緩衝液及び酢酸緩衝

液を用い最適条件を検討した。移動相は、pH調整の煩雑さの軽減と緩衝能力を維持させるため一定濃度の酸と塩を混合することとし、ギ酸アンモニウムを0, 5, 10, 15, 20mM含有する0.05%ギ酸溶液及び酢酸アンモニウム0, 5, 10, 15, 20mM含有する0.05%酢酸溶液を調製しpHを測定後、それぞれの溶液とMeCNを30:70の割合で混合し、標準液 (0.1mg/L) 2 μ L注入し、イオン強度面積をSIRにより測定した。その結果を表1に示した。

ギ酸及び酢酸の解離定数は25℃でそれぞれ3.55及び4.56であり、アンモニウム塩を含有する溶液のpHは、それぞれ3.3~3.9及び4.5~5.0であり、全濃度で緩衝作用を示していた。ギ酸緩衝液及びアンモニウム塩を含有しない酢酸緩衝液ではpHは2.8~3.9であり、保持比は12.5~15.2でありpHの上昇に伴い保持比が減少した。一方、アンモニウム塩を含有する酢酸緩衝液はpHが4.5~5.0、保持比が4.7~7.0であり、ギ酸緩衝液に比較し保持能力が低かった。また、両緩衝液とも k' の極大値は示さなかった。イオン強度は、緩衝液の種類による大きな差を示さなかったが、アンモニウム塩を含有しない場合は、両緩衝液とも低下の傾向を示した。理論段数は、ギ酸緩衝液の方が高い傾向を示し、保持比の減少に従い低下する傾向を示した。また、クロマトグラムの形状は全クロマトグラムでテーリングを示した。

以上の結果から、保持比が大きく理論段数の高いギ酸

表1 移動相中緩衝液のHPLC分離及びイオン化に対する影響

緩衝液濃度 (mM)	ギ酸緩衝液				酢酸緩衝液			
	pH	保持比 (k')	理論段数 (N)	強度 (Area)	pH	保持比 (k')	理論段数 (N)	強度 (Area)
0	2.8	15.2	2536	11740	3.4	15.1	1716	12487
5	3.3	14.4	2339	19415	4.5	7.0	1181	20115
10	3.6	13.6	2169	21323	4.8	5.5	952	19170
15	3.7	13.1	2141	21879	4.9	4.9	896	19021
20	3.9	12.5	2013	22208	5.0	4.7	845	17872

表2 移動相中溶媒濃度のHPLC分離及びイオン化に対する影響

溶媒濃度 (%)	保持比 (k')	理論段数 (N)	シンメトリー係数 (S)	強度 (Area)
70	14.4	2339	0.83	19415
75	9.5	1871	0.87	22740
80	6.2	1677	0.94	27146
85	4.0	1472	1.06	33237
90	2.4	1090	1.37	43217

緩衝液を用いることにし、濃度は理論段数の最も高い値を示した5mMを用いることにした。

(2) 移動相中の溶媒濃度の検討

MS測定条件の検討で明らかなように、アセトニトリルが高濃度であるほど感度は上昇するが、DTTBが十分に保持されなければ、試料中の共存物質の影響で感度が減少し、定量に影響を及ぼす恐れがある。そのため、移動相中のアセトニトリル濃度を70, 75, 80, 85, 90%とし、標準液 (0.1mg/L) 2 μ L注入し、イオン強度面積をSIRにより測定した。なお、ギ酸濃度及びギ酸アンモニウム濃度は、アセトニトリルとの混合後の溶液の濃度がそれぞれ0.015%及び1.5mMとなるように調製した。その結果を表2に示した。

溶媒濃度の上昇に伴いイオン強度は増加するが、保持比及び理論段数は減少した。一方、ピーク形状は、70%でのシンメトリー係数が0.83とリーディングを示したが、濃度の上昇に伴い改善され82%付近で左右対象の良好な形状を示し、それ以上ではテーリングが認められた。

以上の結果から、保持比、理論段数、ピーク形状及びイオン強度を総合的に検討し、アセトニトリル濃度は80%を用いることにした。この条件でDTTBの保持時間は2.23分であった。

(3) 検量線及び検出限界

DTTBとして1 μ g/Lから5000 μ g/Lの範囲で標準液を調製し検量線を作成し、回帰分析により直線性を検討した。その結果、1 μ g/Lから500 μ g/Lの範囲で相関係数は0.999であり良好な直線関係を示したが、500 μ g/Lを超えるとイオン強度の減少がみられ直線性が見られなかった。また、S/N=3により求めた検出限界は、0.3 μ g/Lであった。試験の再現性を確認するため、10 μ g/L及び100 μ g/Lの標準溶液を6回繰り返し注入したところ、相対標準偏差は、それぞれ、0.9%及び0.8%であり、良好な結果を示した。

なお、標準液のマスキロマトグラムを図4に、スキャン測定によるマススペクトルを図5に示した。

3 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため家庭用毛糸に添加量として50, 500, 5000ngとなるよう標準溶液を添加し回収率を測定した。また、TargetLynxを用い定性イオンの定量イオンに対する相対強度による同定を行った。

なお、対照として精製水を用い同様の試験を行った。その結果を表3に示した。

回収率は精製水では91.5~97.8%、家庭用毛糸では

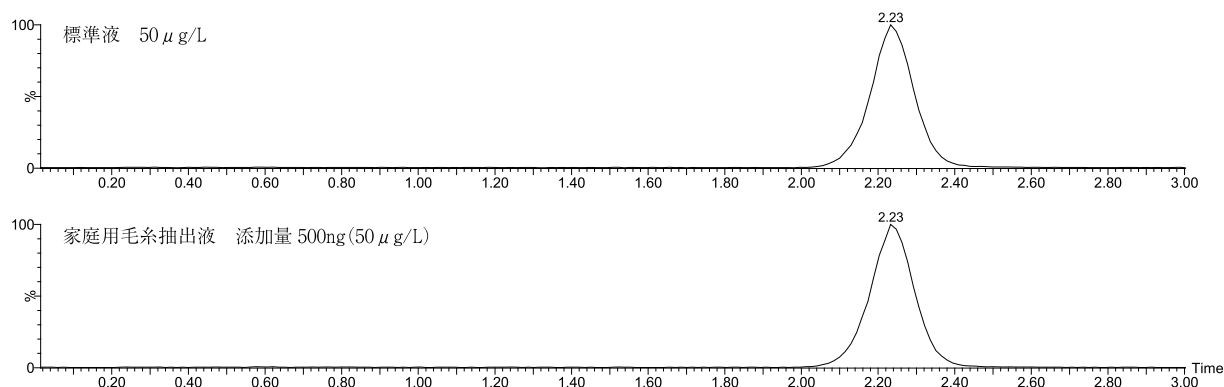


図4 標準溶液及び家庭用毛糸抽出液のマスキロマトグラム

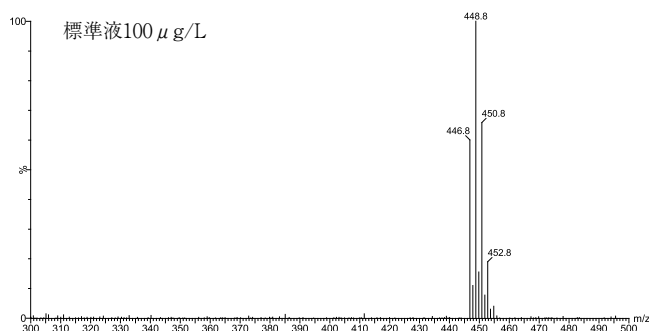


図5 標準溶液のマススペクトル

表3 添加回収実験結果

試料名	添加量 (ng)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)	許容比* (%)
精製水	50	97.8	2.1	10
	500	94.9	4.7	5
	5000	91.5	3.3	5
家庭用毛糸	50	93.8	2.8	40
	500	95.4	2.8	10
	5000	94.5	1.6	5

(n=5)

* m/z 446.8, 450.8, 452.8イオンピークの m/z 448.8イオンピークに対する相対強度が同位体存在度から求めた計算値に対し誤差範囲となるための許容比

93.8~95.4%であり全濃度で90%以上の良好な結果を示した。また、相対標準偏差は、精製水では2.1~4.7%、家庭用毛糸では1.6~2.8%であり全濃度で5%未満の良好な結果を示した。なお、標準品を添加し測定した家庭用毛糸のマスプロトグラムを図4に示した。

DTTBの同定では、全ての定性イオンが条件を満たす許容比は、精製水及び家庭用毛糸とも添加濃度の上昇に伴い減少した。同位体イオンを定性イオンとした時のFDAの基準である $\pm 10\%$ を満足する定性限界濃度は、精製水では50ng、家庭用毛糸では500ngであり、基準値から換算した15000ngに比較し十分な感度を有しており定性においても良好な結果を示した。

以上のことから、今回開発した方法が実試料においても広範囲な濃度で精度及び再現性よく適用できるとともに定性法としても有用な方法であることが明らかとなった。

まとめ

羊毛繊維中のDTTB分析法として、ショートカラムを用いたLC-MSで測定する方法について検討した結果、次のことが明らかとなった。

- 1 イオン化法をESIとAPCIで比較したところ、両法とも溶媒濃度の上昇に伴いイオン強度が上昇したが、ESIの方が、高濃度では、より影響が大きかった。
- 2 試料中の共存物質の影響をESIとAPCIで比較したところ、APCIの方が抑制効果が大きかった。
- 3 ODSショートカラムを用い最適条件を検討したところ、ギ酸緩衝液を用いることにより適正な保持を示し、また、移動相に含有するアセトニトリル濃度によりピーク形状が変化するが、80%で適正な形状を示した。
- 4 本法により作成した検量線は、1~500 $\mu\text{g/L}$ の範囲で直線性を示し ($r=0.999$)、検出限界は0.3 $\mu\text{g/L}$

($S/N=3$) であり、6回繰り返し注入による相対標準偏差は1%未満であった。

- 5 家庭用毛糸に標準品を添加し、今回開発した方法により定量したところ、分析時間は1検体あたり3分以内であり、回収率は90%以上、相対標準偏差は5%未満と良好な結果を示した。また、3種類の同位体イオンを用い定量と同時に定性を試みたところ、絶対量として500ngまで確認可能であった。

文 献

- 1) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(昭和48年10月12日法律第112号)
- 2) 厚生省環境衛生局企画課家庭用品安全対策室編：家庭用品規制関係実務便覧，2043の42，第一法規出版(1977)
- 3) 萩原輝彦ほか：衛生化学，28，155-159(1982)
- 4) 石川英樹ほか：香川県衛生研究所報，11，103-109(1982)
- 5) D. B. Kassel：Chem. Rev.，101，255-267(2001)
- 6) X. Cheng et al：Anal. Chem.，74，2679-2690(2002)
- 7) U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine：Guidance for Industry Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues Final Guidance，4-6，May 1(2003)
- 8) R. F. Straub et al：J. Am. Soc. Mass Spectrom.，4，578-587(1993)
- 9) A. M. Kamel et al：Anal. Chem.，71，968-977(1999)
- 10) R. King et al：J. Am. Soc. Mass Spectrom.，11，942-950(2000)
- 11) B. K. Matuszewski et al：Anal. Chem.，75，3019-3030(2003)