—技術報告—

キャピラリー電気泳動を用いたびらん剤分解物分析法

大沢勇久, 瀬戸康雄

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6 丁目 3 番地 1

Capillary Electrophoretic Analyses for Blister Agent Hydrolysis Products

Isaac Ohsawa and Yasuo Seto

*National Research Institute of Police Science**6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 3 October 2006; accepted 12 March 2007)*

Screening methods for blister agent hydrolysis products in an aqueous sample using capillary electrophoresis (CE) have been developed. Thiodiglycol, the hydrolysis product of mustard gas (HD) was analyzed by micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) mode with direct ultraviolet detection at 200 nm, and the limit of detection (LOD) and within-day repeatability were 1.2 $\mu\text{g/ml}$ and $\leq 2.8\%$, respectively. *N*-Ethyldiethanolamine, *N*-methyldiethanolamine and triethanolamine, which are the hydrolysis products of nitrogen mustard 1, 2 and 3 (HN-1, 2, 3) were analyzed by capillary zone electrophoretic mode using cation complexing reagent with indirect ultraviolet detection at 214 nm, and LOD and within-day repeatability were 150 ng/ml, $\leq 9.7\%$, 135 ng/ml, $\leq 8.2\%$, 90 ng/ml, $\leq 14.2\%$, respectively. It was concluded that hydrolysis products of HD and HN-1, 2, 3 in aqueous solution can be determined by the above-mentioned two kinds of CE methods, respectively.

Key words: Capillary Electrophoresis, Thiodiglycol, *N*-ethyldiethanolamine, *N*-methyldiethanolamine, Triethanolamine

緒 言

化学剤にはびらん剤 (Blister agents), 神経ガス (Nerve gases), 血液剤 (Blood agents), 窒息剤 (Choking agents), 無力化剤 (Incapacitating agents), 嘔吐剤 (Vomiting agents) および催涙剤 (Lacrimators) がある¹⁾。大量破壊兵器の廃絶・不拡散の重要性の高まりの中, 上述の化学剤のうち, びらん剤, 神経ガス, 血液剤とそれらの類縁化合

物, および窒息剤の一部は, 1992年11月30日の国連第47総会において採択され, 1997年4月29日に発効した「化学兵器の開発, 生産, 貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」²⁾により国際的に規制されるに至った。また, 国内においては1995年に公布・施行された「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」³⁾によって規制されている。

びらん剤は主なものとして, マスタードガス

(HD), 窒素マスタード (HN-1~3), ルイサイト (L), ホスゲンオキシム (CX) などがある¹⁾. 実環境中において, びらん剤は水分子もしくはヒドロキシラジカルと反応して容易に分解し, 分解物を生じる⁴⁾. 従って, 法科学資料からのびらん剤そのものの検出は困難である場合が多い. HD からはチオジグリコール (TDG) が生じ, 高濃度の場合にはさらに副反応生成物も生ずるが⁵⁾, 比較的低濃度では, TDG が主な加水分解産物となる (Fig. 1(A)). HN1~3 からは *N*-エチルジエタノールアミン (EDEA), *N*-メチルジエタノールアミン (MDEA) およびトリエタノールアミン (TEA) のエタノールアミン類がそれぞれ加水分解物として生じる (Fig. 1(B))⁴⁾. TDG やこれらのエタノールアミン類は染料や化粧品等の工業用原料として使用される

場合はあるものの, 天然に大量に存在することはない. 従って, びらん剤の存在が疑われる法科学資料からこれらの化合物が検出された場合には, 対応するびらん剤が存在したことがレトロスペクティブに推定される.

環境中および水中における TDG およびエタノールアミン類の分析法としては, これまでに誘導体化ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 法⁶⁻¹⁰⁾や大気圧化学イオン化法を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法^{11,12)}, およびエレクトロスプレーイオン化法を用いた LC/MS 法¹³⁻¹⁵⁾などの報告がある. しかし, これらの手法は手順が煩雑であるため多検体のスクリーニングに不向きであり, 純度の高い有機溶媒を使用するため高コストかつ環境にも負荷がかかる, 絶対的な定量が

Fig. 1 Hydrolysis of mustard gas and nitrogen mustards (HN-1~3). Hydrolysis pathway of HD (A) and HN-1~3 (B) are showed. The figure in the ref. 5) was modified to (A). R in (B) represents $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ for HN-1 and EDEA, $-\text{CH}_3$ for HN-2 and MDEA.

不可能な場合が多い, などの難点がある. 一方, キャピラリー電気泳動 (CE) 法は, 抽出や誘導体化等の複雑な前処理を必要とせず, 多数の化合物を一度に短時間で分離, 検出することが可能であり, 定量性に優れる¹⁶⁾. このような簡便さに加え, 有機溶媒を用いない水系のバッファーで分析が可能であり有機溶媒使用量が抑えられることから, CE 法は多検体を扱う際のスクリーニング手法として特に優れていると考えられる. そのため, CE 法は様々な化合物の分析に利用され, 法薬毒物学分野においても活用されている¹⁷⁾.

今回, 我々は CE を用いた手法について, 水溶液中のびらん剤加水分解物の検出限界, 定量性および再現性について詳細に検討を行ったので報告する.

材料及び方法

1. 試薬

TDG はアルドリッチ社より, EDEA は東京化成工業より, MDEA および TEA は和光純薬工業より入手して使用した. ホウ酸およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬工業製を用いた. Ion-Select Low Mobility 陽イオン分析用バッファーはウォーターズ社製を用いた. 超純水はミリポア社製 Milli-Q Gradient 超純水製造装置により製造して使用した.

2. 標準試料溶液の調製

TDG, EDEA, MDEA および TEA は超純水にそれぞれ 10 mg/ml の濃度で溶解させたものを保存水溶液とした. 保存水溶液は 4 °C で保存し, 分析時にはそれらを超純水で段階希釈して, 標準試料溶液として使用した.

3. CE

CE の条件は以下に示すとおりである.

装置: アジレント社製 Agilent^{3D} キャピラリー電気泳動システム, カラム: フェーズドシリカキャピラリー (60 cm × 75 μm I.D., 有効長 52 cm)

TDG 分析条件; 注入法: 加圧法 50 mbar, 4 秒, 温度: 35 °C, バッファー: 10 mM ホウ酸, 100 mM SDS, pH 9.0 (水酸化ナトリウム水溶液で調整), 検出波長: 200 nm (直接吸光法), 印加電圧: 15 kV, 印加極性: ポジティブ.

エタノールアミン類分析条件; 注入法: 加圧法 40 mbar, 5 秒, 温度: 25 °C, バッファー: ウォーターズ社製 IonSelect Low Mobility 陽イオン分析用バッファー, 検出波長: 350 nm, リファレンス波長: 214 nm (間接吸光法), 印加電圧: 20 kV, 印加極性: ポジティブ.

結果及び考察

1. TDG の分離, 検出

TDG は中性の化合物であるため, 電荷を持たない. したがって, バッファーにイオン性界面活性剤を臨界ミセル濃度以上で添加して電気泳動を行うミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)^{16,18-20)} の手法が有効と思われる. Cheicante らは SDS を用いた MEKC により水溶液中の TDG を分析した例を報告している²¹⁾. それによれば, ホウ酸に陰イオン性界面活性剤である SDS を 100 mM で添加したバッファーを用いた場合に最良の分離が得られたということである. 我々は彼らの方法を改変して, 25 °C から 35 °C にキャピラリーの温度を上げ MEKC を行ったところ, 妨害もなく良好な分離が見られ, 10.3 分にピークが検出された. なお, 3 回の繰返し分析による移動時間の日内変動は 0.2 % 未満であった. TDG 濃度 25 μg/ml の標準試料溶液を分析した時のエレクトロフェログラムを Fig. 2 に示す. 2.5 μg/

Fig. 2 Electropherogram of aqueous sample containing thiodiglycol at 25 μg/ml.

ml から100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度間でピーク面積値をプロットしたところ、良好な直線性が得られた (Fig. 3, 相関係数: 1.000). S/N 比 3 の時の検出限界は1.2 $\mu\text{g/ml}$ であり, Cheicante らの論文の値10 $\mu\text{g/ml}$ よりも大幅に感度が高かった. これは, 主に使用した CE 装置の違い, 分析の温度条件の違いに起因すると思われる. 25 $\mu\text{g/ml}$ および100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度での4回の分析における繰返し精度は, 0.8%および2.8%であった. したがって, 本手法は TDG のスクリーニング法としての利用に加え, 簡便な定量法としての利用も十分可能であることが示唆された.

2. エタノールアミン類の分離, 検出

窒素マスタードの分解物である EDEA, MDEA および TEA はいずれも $\text{p}K_a$ が9前後を示す塩基性化合物であるため^{22,23}, 酸性バッファー中で正電荷を持つ. また, 化合物自体が紫外吸収光を持たないため, バッファーに紫外吸収光をもつ成分を添加して, その吸光度の減少で検出を行う間接紫外吸光法²⁴が有効と思われる. 間接紫外吸光法によるアミンの分析に関しては, イミダゾールを添加した酸性バッファーで, 金属加工工場の空气中より捕集したエアロゾル状態の低分子量のアミンをキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) で分析した例²⁵などがある. また, Bord らは製油の課程で脱硫に用いたジエタノールアミンおよび MDEA のプロセス水中における残存量を内部標準物質として TEA を用いて, 間接紫外吸光法での CZE により分析した例を

Fig. 3 Calibration curve for TDG in an aqueous sample. The peak area of TDG was plotted against the concentration ($r^2=0.9995$).

報告している²⁶. 本法では彼らが報告した論文で用いられたバッファーのうち, 準備が容易なウォーターズ社製 IonSelect Low Mobility 陽イオン分析用バッファーを用いて, 間接紫外吸光法による分析を行った. この泳動バッファーには4-メチルベンジルアミン, ヒドロキシイソ酪酸および18-クラウン-6-エーテルが含有されており, 対象の陽イオンとヒドロキシイソ酪酸との錯形成反応に基づく分離, 4-メチルベンジルアミンの間接吸光による検出がなされるものである. 高濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) の標準混合試料溶液では EDEA と TEA のピークが重なって検出されたが, 比較的低濃度 ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$) の場合には良好な分離が見られた. これは, 高濃度領域ではピークが高さ方向に延びずに時間軸方向に広がる傾向が多少あるためと, 試料溶液の pH とバッファーの pH の差が大きく, 分析時の pH の変動が大きいことが影響していることが考えられる. なお, 3回の繰返し分析による移動時間の大きな日内変動は見られなかった (1%未満). EDEA, MDEA および TEA の濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ の標準混合試料溶液を分析した時のエレクトロフェログラムを Fig. 4 に示す. バックグラウンド由来のピークが3.8分から5.5分に見られるものの, それ以外には妨害なく EDEA が7.5分, MDEA が7.0分, TEA が7.7分に検出された. 0.5 $\mu\text{g/ml}$ から100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の中で EDEA, MDEA および TEA を単独で分析し, ピー

Fig. 4 Electropherogram of aqueous sample containing ethanolamines: EDEA, MDEA and TEA, at 5 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 5 Calibration curves for ethanolamines in aqueous samples. The peak areas of EDEA (A), MDEA (B) and TEA (C) were plotted against ethanolamine concentrations ($r^2=0.9956$ for EDEA, 0.9865 for MDEA, and 0.9996 for TEA).

ク面積値をプロットしたところ, 比較的良好な直線性が得られた (Fig. 5, 相関係数: EDEA 0.996, MDEA 0.987, TEA 1.000). S/N 比 3 の時の検出限

界は EDEA が 150 ng/ml, MDEA が 135 ng/ml, TEA が 90 ng/ml であり, 報告されている間接紫外吸光検出を用いた CE 法での陽イオンの分析での検出限界 (200~800 ng/ml)^{26,27)}と比較して, 同等以上の感度であった. 25 μg/ml および 100 μg/ml の濃度での 4 回の分析における繰返し精度は, EDEA が 1.0% および 9.7%, MDEA が 8.2% および 4.1%, TEA が 14.2% および 4.1% であり, 若干繰返し精度は低いものであったが, 窒素マスタード分解物のスクリーニング法として有用であることが示唆された。

結 語

マスタードガス加水分解産物である TDG, 窒素マスタードの加水分解産物である EDEA, MDEA および TEA が水溶液中において, それぞれ CE 法により分離・検出された. TDG はホウ酸に陰イオン性界面活性剤 SDS を添加したバッファー (pH 9.0) を使用することにより, 良好な分析が可能であった. また, EDEA, MDEA および TEA はウォーターズ社製 IonSelect Low Mobility 陽イオン分析用バッファーを使用することにより, 良好な分析が可能であった. なお, EDEA の CE による分析は今回が初めての報告である. これらの方法は簡便かつ迅速であることから, 水試料を含む環境試料などの法科学試料からの μg/ml 濃度レベルのびらん剤加水分解産物のスクリーニングに有用であると結論できる. 加えて, CE 法による TDG の分析では極めて良好な定量性も示されたため, 簡便な定量法としての利用も有望と思われる. 今後は, これらのマスタード系のびらん剤加水分解物を生体試料から分析できるような CE 条件を検討していく.

文 献

- 1) Stewart, C. E. and Sullivan, J. B., Jr.: Military munitions and antipersonnel agents. In Hazardous materials toxicology (Eds. Sullivan, J. B., Jr. and Krieger, G. R.), pp.986-1014, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).
- 2) Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of

- chemical weapons and destruction, Technical Secretariat of Organization for Prohibition of Chemical Weapons, The Hague (1997), <http://www.opcw.org/>.
- 3) 化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律（平成七年四月五日法律第六十五号）
最終改正年月日：平成一七年五月二〇日法律第四四号，
http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/index.htm.
- 4) Munro, N. B., Talmage, S. S., Griffin, G. D., Waters, L. C., Watson, A. P., King, J. F. and Hauschild V.: The Sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 933–973 (1999).
- 5) Yang, Y-C., Barker, J-A. and Ward, J. H.: Decontamination of chemical warfare agents. *Chem. Rev.*, **92**, 1729–1743 (2004).
- 6) Black, R. M., Clarke, R. J., Read, R. W. and Reid, M. T. J.: Application of gas chromatography-mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products. *J. Chromatgr. A*, **662**, 301–321 (1994).
- 7) Tomkins, B. A. and Sega, G. A.: Determination of thiodiglycol in groundwater using solid-phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detection in the selected-ion mode. *J. Chromatgr. A*, **911**, 85–96 (2001).
- 8) Black, R. M. and Muir, B.: Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. *J. Chromatgr. A*, **1000**, 253–281 (2003).
- 9) Ohsawa, I., Kanamori-Kataoka, M., Tsuge, K. and Seto, Y.: Determination of thiodiglycol, a mustard gas hydrolysis product by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butylidimethylsilylation. *J. Chromatgr. A*, **1061**, 235–241 (2004).
- 10) Ohsawa, I. and Seto, Y.: Determination of nitrogen mustard hydrolysis products, ethanolamines by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butylidimethylsilyl derivatization. *J. Chromatgr. A*, **1112**, 242–248 (2006).
- 11) Black, R. M. and Read, R. W.: Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents. *J. Chromatgr. A*, **759**, 79–92 (1997).
- 12) Read, R. W. and Black, R. M.: Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography-mass spectrometry with atomospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatgr. A*, **862**, 169–177 (1999).
- 13) D’Agostino, P. A., Provost, L. R. and Hancock, J. R.: Analysis of mustard hydrolysis products by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatgr. A*, **808**, 177–184 (1998).
- 14) D’Agostino, P. A., Hancock, J. R. and Chenier, C. L.: Packed capillary liquid chromatography-electrospray ionization (tandem) mass spectrometry of mustard hydrolysis products in soil. *J. Chromatgr. A*, **1058**, 97–105 (2004).
- 15) Chua, H-C., Lee, H-S. and Sng, M-T.: Screening of nitrogen mustards and their degradation products in water and decontamination solution by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatgr. A*, **1102**, 214–223 (2006).
- 16) 本田 進, 寺部 茂：キャピラリー電気泳動基礎と実際。講談社サイエンティフィク，東京（1995）。
- 17) 瀬戸康雄, 片岡美江子：キャピラリー電気泳

- 動法の法薬毒物分析への応用. 鑑識科学, **8**, 1–19 (2003).
- 18) Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.*, **56**, 113–116 (1984).
- 19) Terabe, S., Otsuka, K. and Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal. Chem.*, **57**, 834–841 (1985).
- 20) Terabe, S.: Micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.*, **76**, A240–A246 (2004).
- 21) Cheicante, R. L., Stuff, J. R. and Durst, H. D.: Separation of sulfur containing chemical warfare related compounds in aqueous samples by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, **711**, 347–352 (1995).
- 22) Lemire, S. W., Ashley, D. L. and Calafat, A. M.: Quantitative determination of the hydrolysis products of nitrogen mustards in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **27**, 1–6 (2003).
- 23) Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. and Kinneary, J. F.: The Merck Index Twelfth Edition, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ (1996).
- 24) Macka, M., Johns, C., Doble, P. and Haddad, P. R.: Indirect photometric detection in CE using buffered electrolytes—Part I, Principles. *LCGC*, **19**, 38–47 (2001).
- 25) Fekete, A., Frommberger, M., Ping, G., Lahaniatis, M. R., Lintelman, J., Fekete, J., Gebefugi, I., Malik A. K., Kettrup, A. And Schmitt-Kopplin, P.: Development of a capillary electrophoretic method for the analysis of low-molecular-weight amines from metal working fluid aerosols and ambient air. *Electrophoresis*, **27**, 1237–1247 (2006).
- 26) Bord, N., Crétier, G., Rocca, J. L., Bailly, C. and Souchez, J. P.: Determination of diethanolamine or *N*-methyldiethanolamine in high ammonium concentration matrices by capillary electrophoresis with indirect UV detection: application to the analysis of refinery process waters. *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**, 325–332 (2004).
- 27) Xiong, X. and Li, S. F. Y.: Dual UV-absorbing background electrolytes for simultaneous separation and detection of small cations and anions by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**, 2243–2251 (1998).