—原著—

神経ガス分解物の固相抽出前処理法

片岡美江子, 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

Solid Phase Extraction Pretreatment of Nerve Gas Hydrolysis Products

Mieko Kataoka and Yasuo Seto

*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan*

(Received 25 July 2001; accepted 14 December 2001)

The pretreatment method using solid phase extraction (SPE) was investigated for the determination of nerve gas hydrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry after *tert.*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatization. Various pretreatment conditions using six SPE cartridges [three strong anion exchanger (SAX), one weak anion exchanger, one reversed phase and one mixed mode] were examined for the clean-up of methylphosphonic acid (MPA), ethyl-, isopropyl- and pinacolylmethylphosphonic acid (EMPA, IMPA and PMPA), with regard to recovery from aqueous solution. Within them, optimized pretreatment method using a Bond Elut SAX cartridge containing 500 mg solid phase of fluoride form was established. After sample loading the cartridge was washed with water and retained methylphosphonates were eluted from the cartridge with 5 ml of 3% (v/v) ammonia in methanol. The established method was applied to the pretreatment of various kinds of aqueous samples such as aqueous soil extract, sea water and beverages, and the dramatically improved yields of TBDMS derivatives were obtained, compared with those without SPE pretreatment.

Key words: Solid phase extraction, Alkyl methylphosphonate, Methylphosphonic acid, *tert.*-Butyldimethylsilylation, GC-MS

緒 言

1994年から1995年に発生した松本および東京地下鉄サリン事件は、多数の死者および重軽症者が出るという前代未聞の事件となり¹⁾、我が国における危機管理意識の低さに警鐘を鳴らした。サリン等の神

経ガスは容易に加水分解され、安定なアルキルメチルホスホン酸に変化する。エチルメチルホスホン酸 (EMPA)、イソプロピルメチルホスホン酸 (IMPA)、ピナコリルメチルホスホン酸 (PMPA) (以下これら3種の化合物を総称してRMPAとする) は各々 VX, サリン, ソマンの加水分解物であ

Fig. 1 Hydrolysis products of nerve gases used. EMPA: ethyl methylphosphonic acid; IMPA: isopropyl methylphosphonic acid; PMPA: pinacolyl methylphosphonic acid; MPA: methylphosphonic acid.

る．これらの化合物は更にメチルホスホン酸 (MPA) へと分解される (Fig. 1)．また，MPA は神経ガス製造の中間体であるメチルホスホン酸ジクロリドやメチルホスホン酸ジメチルの分解によっても生成する．MPA および RMPA は天然に存在していないので，法科学資料からこれらの化合物を検出することにより，神経ガスが使用・製造されたことを証明することができる．

MPA および RMPA の分析方法として，ガスクロマトグラフィー (GC)²⁾，キャピラリー電気泳動 (CE)^{3,4)}，高速液体クロマトグラフィー (LC)⁵⁾，イオンクロマトグラフィー⁶⁾，CE-質量分析 (MS)⁷⁾，LC-MS⁸⁾等による分析が報告されているが，なかでも GC-MS による分析が MPA および RMPA の検出・同定に汎用されている．この MPA および RMPA は極性が高く水溶性であるため，GC-MS 分析を行う前にメチル化²⁾，トリメチルシリル化⁹⁾，*tert.*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 化¹⁰⁾，ペンタフルオロベンジル化¹¹⁾等の誘導体化処理が必要である．TBDMS 化反応は，誘導体化効率が高く，かつ生成した誘導体化合物が安定であることから，筆者らはこの誘導体化法を利用して MPA および RMPA の GC-MS 分析を行い¹²⁻¹⁴⁾，実際のサリン分解物の鑑定にも活用した¹⁵⁾．

土砂は，分析試料の中でも戦争や化学テロ等の，

神経ガスが用いられた事案において最も容易に採取できる環境試料の一つである¹⁶⁾．実際の鑑定において，土砂資料から水抽出ならびに誘導体化 GC-MS 分析を行った際に，MPA および RMPA の誘導体化反応が妨害を受け，検出感度が十分でないと思われるケースが認められた．筆者らは，土砂からの MPA および RMPA の検出性を向上させるために，イオン交換樹脂を用いた前処理法の検討を行い，誘導体化 GC-MS 分析による MPA および RMPA の検出性を改善させた^{12,13)}．しかし，イオン交換樹脂を用いた前処理法は，操作が煩雑であり迅速性に欠ける．

一方，固相抽出法は操作が簡便であり，短時間で試料を処理することができ，溶媒使用量が少量で済むなどの利点から，試料からの目的化合物の抽出・濃縮・クリーンアップ方法の一つとして汎用されている¹⁷⁾．環境試料からの MPA および RMPA の分析についても，固相抽出を用いた前処理法の報告がなされているが^{2,11,18-20)}，これらの文献においては，固相抽出法の手順が詳細に示されていないものが認められ，また，筆者らが利用している TBDMS 誘導体化へと進めるための固相抽出法に関する報告はない．

そこで，水試料について各種市販の固相抽出カートリッジの条件を最適化し，カートリッジにアプライする MPA および RMPA 量に対して溶出回収された MPA および RMPA 量を回収率 (recovery, %) として CE 分析により求め，比較検討を行った．次いで，回収率が一番良好であった固相抽出前処理法を用い，数種の土砂の水抽出液中に回収された MPA および RMPA のクリーンアップを行った．添加した MPA および RMPA 量の GC-MS 検出量を 100% とする時の，GC-MS 分析により検出された MPA および RMPA 誘導体化合物の量を検出率 (detection yield, %) として表し，TBDMS 誘導体化 GC-MS 分析による MPA および RMPA 検出率の向上を図った．さらに，MPA および RMPA のクリーンアップ法として，土砂水抽出液以外の試料 (海水および飲料) に本固相抽出法を応用し，実試料への適応性を検討した．

試料および方法

1. 試料

神経ガス分解物の標準試料として、アルドリッチ社のMPA, EMPA, PMPAを使用した。IMPAは、文献¹²⁾に示した方法により合成した。N-メチル-N-(tert.-ブチルジメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) はピアス社のものを使用した。その他の試薬については全て試薬特級を使用した。

土砂試料として、農林水産省農業環境技術研究所所蔵の標準土砂4種、ならびに海岸（岡山県）および公園（京都府）で採取した土砂2種の計6種を使用した¹⁴⁾。各土砂の特性はTable 1に示すとおりである。

固相抽出カートリッジとして、バリアン社製のBond Elut SAX [固相重量500 mg, 以下()内に重量を示す], Bond Elut NH₂ (500 mg), ウォーターズ社製OASIS MAX (60 mg), SepPak Accell Plus QMA (360 mg), SepPak C₁₈ (360 mg), アンシス社製SPEC SAX (15 mg)を用いた。メンブレンフィルターとしては、アドバンテック社製0.45 μm 酢酸セルロースフィルターを用いた。

2. 標準溶液および試液の調製

MPA, EMPA, IMPA, PMPA 各々1500 μg/mlを蒸留水に溶解させたものを標準溶液1, 各々1500 μg/mlをアセトニトリルに溶解させたものを標準溶

液2とした。また、標準溶液1は4°C, 標準溶液2は-20°Cで保存し、使用時に蒸留水またはアセトニトリルで希釈した。

フッ化ナトリウム (NaF) については、1 M 水溶液を調製し、これをメンブレンフィルターでろ過して使用した。

3. CE 分析

CE 分析条件は Pianetti *et al.* の方法³⁾を参考にした²¹⁾。

装置：ウォーターズ社製 Quanta 4000 E, カラム：ヒューズドシリカキャピラリー (40 cm × 75 μm i.d., 有効長32 cm), バッファー：100 mM ホウ酸-10 mM 安息香酸水溶液 (pH 6.0, 水酸化ナトリウムで調整), 注入法：重力法30秒, 温度：25 °C, 検出波長：254 nm (間接吸光度検出法), 印加電圧：30 kV, パワーサプライ：ポジティブ

各サンプルの分析ごとに、0.1 M 水酸化リチウム水溶液で1分間, 続いて蒸留水で1分間キャピラリーカラムを洗浄した後, 泳動バッファーを1分間パージして平衡化させた後に分析を行った。

4. TBDMS 誘導体化 GC-MS

既報¹⁴⁾に従い, MPA および RMPA の TBDMS 誘導体化反応を行った。すなわち, 1 ml 容ガラスバイアル (日電理化硝子, MV-07) 内で試験溶液を60°Cで減圧遠心乾固させた後, MTBSTFA 50 μl およびアセトニトリル50 μl (内部標準として12 ppm アントラセンを含む) を添加した。密栓し,

Table 1 Pedological characteristics of the soil samples used.

No.	group	location	depth (cm)	particle distribution (%)			pH		total carbon (g/kg)	total nitrogen (g/kg)	exchangeable cation (mequiv/kg)				CEC ^{a)} (mequiv/kg)	PAC ^{b)}
				clay <2 μm	silt 2-20 μm	sand >20 μm	H ₂ O	KCl			Ca	Mg	K	Na		
1	Andosols	forest	12-22	40.0	17.0	44.0	5.0	4.5	178.0	8.5	0.3	0.9	1.3	1.7	401	2570
2	Acrisols	forest	0-12	36.0	12.0	51.6	4.2	3.6	45.0	3.3	5.0	5.0	4.1	1.6	165	782
3	Luvisols	farm	0-19	57.0	33.0	10.8	7.5	6.6	17.8	1.8	205.0	18.5	10.6	7.0	211	1248
4	Regosols	seashore	0-5	0.9	0.7	98.5	7.3	6.2	0.0	nd ^{c)}	32.4	9.1	1.9	22.5	11	118
5	Fluvisols	paddy field	0-11	15.5	25.6	58.9	5.6	4.5	20.0	1.4	43.0	8.0	4.3	1.6	94	495
6	Fluvisols	city park	0-5	14.0	13.3	72.6	6.4	3.7	35.7	nd	159.4	15.4	8.3	1.2	205	548

a) Cation exchange capacity.

b) Phosphate absorption coefficient (P₂O₅ mg/100 g of soil).

c) Not determined.

室温で5分間超音波処理を行った後に60°Cで1時間反応させた。

GC-MS分析は、以下の条件で行った。

装置：ヒューレットパッカード社製6890シリーズガスクロマトグラフおよび5973質量分析装置，カラム：横河アナリティカルシステムズ社製HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μm)，キャリアガス：ヘリウム (0.8 ml/分)，スプリット比：50，カラム温度：90°Cで1分間保持－290°Cまで20°C/分昇温－290°Cで5分間保持，注入口温度：250°C，トランスファーライン温度：280°C，イオン化法：電子イオン化 (EI) 法，イオン化電圧：70 eV，イオン化電流：60 μA，測定質量範囲： m/z 50–550，注入量：1 μl

m/z 267, 153, 178のマスクロマトグラムにおいて、各々MPA, RMPAのTBDMS化体および内部標準アントラセンのピーク面積比により定量を行った。

5. 固相抽出法

Bond Elut SAX (500 mg) をメタノール 2 ml および蒸留水 (H₂O) 2 ml でコンディショニング後，1 M NaF 水溶液 10 ml および H₂O 5 ml で平衡化し，試料溶液をアプライした。H₂O 5 ml で洗浄後，3% (v/v) アンモニア-メタノール溶液 5 ml で溶出した。

他の固相抽出条件については，Table 3 に記載した。

6. 固相抽出条件最適化のための試料溶液ならびに

CE 分析用溶液の調製

標準溶液 1 を 20 倍希釈し，そのうちの 2 ml (各 150 μg) を使用した。ただし，SPEC SAX カートリッジにおいては標準溶液 1 の 20 倍希釈液 0.5 ml (各 37.5 μg) を用いた。

固相抽出処理により得られた溶出液を 50°C で減圧遠心濃縮し，蒸留水で希釈したものを CE 分析用溶液とした。塩酸-メタノール溶出の場合には，溶出液を水酸化ナトリウムで中和後，減圧遠心濃縮ならびに希釈を行い，CE 分析用溶液とした。

7. CE 分析用土砂水抽出液の調製

土砂 2 g に標準溶液 2 を 100 μl (各 150 μg) 添加し，室温で 2–3 時間放置した。蒸留水 4 ml を加え

て室温で 1 分間振とうした後，10 分間超音波抽出を行った。遠心して得られた上清をメンブレンフィルターでろ過したものを土砂水抽出液とした。

8. GC-MS 分析用土砂水抽出液の調製

土砂 2 g に標準溶液 2 の希釈液 (各 3 μg) を添加し，2–3 時間放置した。蒸留水 4 ml を用い，CE 分析の場合と同様に抽出操作を行った。このうちの 1 ml を誘導体化 GC-MS 分析用試料とした。また，土砂水抽出液 2 ml を「試料および方法 5.」に示した方法により固相抽出処理して得られた溶出液全量を 60°C で減圧遠心濃縮した後に 1 ml 容ガラスバイアルに移し替え，さらに減圧遠心で完全に乾固させたものを誘導体化 GC-MS 分析用試料とした。

9. 海水ならびに飲料からの MPA および RMPA の回収

海水は，葛西臨海公園 (東京都) の海浜から採取したものをメンブレンフィルターによりろ過し，蒸留水で 4 倍に希釈して以下の実験に使用した。なお，海水中に含有される塩化物イオン (Cl⁻) ならびに硫酸イオン (SO₄²⁻) は，それぞれ 7630, 970 ppm であった。飲料として，日本コカコーラボトラーズ社のコーラ (コカコーラ) および缶コーヒー飲料 (ジョージア) の 2 種類を使用した。

海水 4 倍希釈液ならびに飲料それぞれ 3 ml に標準溶液 1 を 100 μl (各 150 μg) 添加したものをメンブレンフィルターでろ過し，そのうちの 2 ml を Bond Elut SAX (500 mg) により固相抽出処理して得られた溶出液を濃縮後，蒸留水で希釈して CE 分析を行い，回収率を求めた。さらに，海水 4 倍希釈液ならびに飲料それぞれ 3 ml に標準溶液 2 の希釈液 (各 5 μg) を添加したものをメンブレンフィルターによりろ過し，そのうちの 0.5 ml については直接，2 ml については Bond Elut SAX (500 mg) カートリッジで固相抽出処理した後，溶出液全量を乾固，誘導体化 GC-MS 分析し，各々の検出率を求めた。

結果および考察

1. 固相抽出前処理法の比較検討

本実験で検討を行った固相抽出カートリッジの特性を Table 2 に示す。使用した固相の分離モードは，(1)強陰イオン交換，(2)弱陰イオン交換，(3)逆相

Table 2 Characteristics of solid phase extraction cartridges used.

cartridge		structure of the surface of solid phase	ion exchange capacity (mequiv/g)	pKa	weight of packing (mg/cartridge)	total ion exchange capacity (μ equiv)
Bond Elut SAX	SAX ^{a)}	trimethylaminopropyl ^{d)}	0.7	—	500	350
Bond Elut NH ₂	WAX ^{b)}	aminopropyl ^{d)}	1.1	9.8	500	550
SepPak C ₁₈	RP ^{c)}	octadecyl ^{d)}	—	—	360	—
SepPak Accell Plus QMA	SAX	trimethylaminopropylamido ^{d)}	0.22	11.0	360	79.2
OASIS MAX	SAX, RP	dimethylaminobutyl ^{e)}	0.25	—	60	15
SPEC SAX	SAX	trimethylaminopropyl ^{d)}	0.6	—	15	9

a) Strong anion exchange.

b) Weak anion exchange.

c) Reversed phase.

d) Bonded silica.

e) Poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) copolymer.

Table 3 Recoveries of MPA and RMPA from aqueous solution in solid phase extraction.

	Bond Elut SAX ^{a)}	SepPak QMA ^{b)}	SPEC SAX ^{c)}	Bond Elut NH ₂ ^{d)}	OASIS MAX ^{e)}	SepPak C ₁₈ ^{f)}
MPA	91.9 $\pm$ 16.7 ^{g)}	90.5 $\pm$ 7.0 ^{h)}	73.9 $\pm$ 8.0 ^{h)}	85.4 $\pm$ 7.5 ^{h)}	106.5 $\pm$ 5.6 ^{h)}	106.8 $\pm$ 9.4 ^{h)}
IMPA	98.4 $\pm$ 2.9	88.2 $\pm$ 2.8	77.3 $\pm$ 10.0	93.8 $\pm$ 2.5	94.7 $\pm$ 9.0	6.8 $\pm$ 2.6
EMPA	99.3 $\pm$ 3.3	86.2 $\pm$ 6.2	82.5 $\pm$ 6.4	108.0 $\pm$ 9.8	88.3 $\pm$ 17.1	0.0
MPA	93.1 $\pm$ 11.0	90.2 $\pm$ 11.9	88.6 $\pm$ 4.0	37.0 $\pm$ 2.0	97.0 $\pm$ 1.7	0.0

A 2-ml volume of an aqueous solution, containing MPA and RMPA (each 150 μ g), was pretreated by SPE, and analyzed by CE.

In the case of SPEC SAX cartridge, the same procedure was carried out except for the applied quantity of the analyte (37.5 μ g).

a) Conditioning: MeOH 2 ml, H₂O 2 ml; equilibration: 1 N NaF in H₂O 10 ml, H₂O 5 ml; washing: H₂O 5 ml; elution: 3% (v/v) NH₄OH in MeOH 5 ml.

b) Conditioning: MeOH 5 ml, H₂O 5 ml; equilibration: 1 N NaF in H₂O 10 ml, H₂O 5 ml; washing: MeOH 5 ml; elution: 0.1 M hydrogen chloride (HCl) in MeOH 5 ml.

c) Conditioning: MeOH 0.5 ml, H₂O 0.5 ml; equilibration: 1 N NaF in H₂O 1 ml, H₂O 0.5 ml; washing: H₂O 0.5 ml; elution: 3% (v/v) NH₄OH in MeOH 5 ml.

d) Conditioning: MeOH 2 ml, H₂O 2 ml; equilibration: 1 N NaF in H₂O 10 ml, H₂O 5 ml; washing: H₂O 5 ml; elution: 3% (v/v) NH₄OH in MeOH 5 ml.

e) Conditioning: MeOH 2 ml, H₂O 2 ml; equilibration: 1 N NaF in H₂O 5 ml, H₂O 2 ml; washing: MeOH 2 ml; elution: 60 mM HCl in MeOH 2 ml.

f) Conditioning and equilibration: MeOH 5 ml, H₂O 5 ml; washing: 12 mM HCl in H₂O 10 ml; elution: MeOH 3 ml.

g) The recovery value represents an average of four determinations $\pm$ standard deviation.

h) The recovery value represents an average of two determinations $\pm$ standard deviation.

の3種類に大別される。MPA および RMPA の酸解離定数 (pKa) は, MPA は2.2および7.7, EMPA は2.75, IMPA は2.38, PMPA は2.5²²⁾と各々固有の値を有しており水溶液中では陰イオンとして存在す

る。分離モード(1)および(2)は, 平衡化した固相に MPA および RMPA イオンを静電引力により保持させて, 目的化合物を溶出する方法である。分離モード(3)は, 疎水性物質の精製に汎用されている固

相であり、MPA および RMPA 標準液を塩酸酸性 ($\text{pH} \approx 1$) にして MPA および RMPA を非解離型に変換し、ファンデルワールス力により固相へ保持させた後に溶出を行う方法である。最適化した条件下で、MPA・RMPA 水溶液を固相抽出処理して得られた溶出液について、CE 分析により算出した MPA および RMPA の回収率を Table 3 に示す。

今回使用した固相抽出カートリッジのうち、強陰イオン交換相のみを有するものは、Bond Elut SAX, SPEC SAX および SepPak Accell Plus QMA である。Bond Elut SAX カートリッジの固相表面の対イオンは、未処理の状態において Cl^- であり、 Cl^- は MPA および RMPA イオンよりも固相への相対的吸着選択性が高いため、MPA および RMPA を保持させるには固相表面の対イオンを選択性の低いイオンに変換しておく必要がある。最も選択性の低い水酸化物イオン (OH^-) 型に変換するために、平衡化溶媒として水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液を充填することを試みたが、MPA および RMPA を完全に固相に保持することができなかった。これは OH^- 型への変換が十分でないためと考えられたが、さらに強アルカリ性である NaOH 水溶液を多量使用することにより固相のシリカ相に悪影響を与え、また、充填後にアルカリ性を呈さなくなるまでの洗浄に時間を要することから、今回の平衡化には不適であると結論された。Shih *et al.*¹¹⁾ は、 NaF 水溶液を使用して、固相表面の対イオンを MPA および RMPA イオンよりも相対的選択性の低い F^- に変換している。今回、 NaF 水溶液による固相の平衡化を行ったところ、MPA および RMPA は固相に十分保持され、さらに、 F^- は GC-MS 分析までの一連の操作に影響を及ぼさなかった。

陰イオン交換相の溶出液として、主に塩酸やギ酸等を含有する酸性溶媒が使用される。これは、溶出液の充填により、保持されている目的化合物の pK_a よりも低い pH に固相が設定されることから、目的化合物が非解離型に変換され固相から溶出されるものである。溶液中に回収された MPA および RMPA を誘導体化 GC-MS 分析へと進めるために、溶出液を乾固する必要がある。酸性溶媒を使用

した場合、MPA および RMPA が非解離型に変換されるために、乾固の際に蒸気圧の若干低い RMPA が揮散する可能性を考慮して溶出液の中和を行う必要があるが¹²⁾、中和後の乾固の際に塩が析出し、問題が生じると予想される。

Creasy *et al.*¹⁸⁾ は、1% (v/v) アンモニア-メタノール溶液を使用し、強陰イオン交換固相抽出カートリッジからの MPA および RMPA の溶出を行っている。アンモニア-メタノール溶液を使用して、 OH^- と目的化合物との固相保持競合による溶出を行った場合、中和等の操作を必要とせず乾固が可能となり、本報で使用した Bond Elut SAX カートリッジによる固相抽出法において、1% (v/v) 溶液を使用した場合、MPA が溶出されず回収率が著しく低かったため、溶出液のアンモニウム濃度を 3% (v/v) に設定したところ、定量的な回収率が得られた。

SPEC SAX カートリッジは Bond Elut SAX と同じ官能基を固相表面に有し、Bond Elut SAX の場合と同種の溶媒で処理することにより、CE 分析による MPA および RMPA の回収率は 80–90% と良好であった。しかし、今回使用したディスクタイプのカートリッジは、他のカートリッジよりも固相量が少なくイオン交換容量が小さい。このため、固相抽出法の最適化において、他のカートリッジに適用した MPA および RMPA 量を完全に固相へ保持させることができず、試料量を 4 分の 1 に減じて条件の最適化を行った。よって、SPEC SAX カートリッジは、ごく少量の試料に適しているが、マトリックスの種類が未知である試料からの MPA および RMPA の回収については、他のカートリッジよりも不適であると推察された。

SepPak Accell Plus QMA カートリッジは、固相表面に pK_a 11.0 のイオン交換基を有する。本カートリッジへの MPA および RMPA の保持はほぼ定量的であったが、3% アンモニア-メタノール溶液による溶出において、MPA および RMPA はほとんど回収されなかった。しかし、固相からの解離を促進するために、酸性溶媒である 0.1 M 塩酸-メタノール溶液を使用して pH を下げたところ、MPA および RMPA は定量的に溶出された。

OASIS MAX はミックスモードの固相抽出カー

トリッジであり、その固相表面は強陰イオン交換ならびに逆相を有している。MPA および RMPA を固相に定量的に保持させた後に、3%アンモニア-メタノール溶液で溶出を行ったところ、RMPA は50%以下しか回収されず、MPAに至っては全く回収されなかった。Bond Elut SAX と比較して、OASIS MAX はMPA および RMPA に対する吸着力がより高いと考えられる。また、OASIS MAX はイオン交換相だけでなく、逆相も有するため、RMPA、特に PMPA においては、アルキル鎖が固相中の逆相部分に疎水結合して溶出の妨害が起こっている可能性も推察される。そこで、60 mM 塩酸-メタノール溶液により、MPA および RMPA を非イオン型に変換して溶出を行ったところ、Table 3 に示すようにほぼ100%の回収率が得られた。

弱陰イオン交換相 Bond Elut NH₂ の固相表面官能基の pKa は9.8であり、pH を下げることによって固相表面が非イオン型となり、固相からの目的化合物の解離が進む。しかしながら、誘導体化反応への影響を最小限にするために、3%アンモニア-メタノール溶液を溶出溶媒とし、固相への競合的保持による目的化合物の解離を行った。その結果、RMPA の回収率はほぼ100%であったが、MPA は40%以下であった。MPA および RMPA は、素通り液ならびに洗浄液中に回収されないことを確認しており、完全に固相に保持されたと考えられた。さらに、MPA はアルカリ溶液中では十分に2価の陰イオンとして存在し、1価である RMPA と比較して Bond Elut NH₂ の固相への保持がより強固となり、今回適用したアンモニア-メタノール溶液の容量範囲内でMPAは十分に溶出されず、溶出液量を増すことによってそれ以降においても徐々に溶出された。よって、MPA の溶出には酸性溶媒の使用が適していると推察される。

SepPakC₁₈ 固相へのMPA および RMPA の保持を強化させるために、試料水溶液を塩酸酸性 (pH ≈ 1) で非イオン型へ変換した後、固相抽出処理を行った。PMPA は完全に保持され溶出液中に回収されたが、IMPA および EMPA は洗浄液中にほぼ100%が、MPA に至っては保持されず素通り液中に約4分の3が回収された。MPA および RMPA

の疎水性の強さは、アルキル基の長さから PMPA, IMPA, EMPA, MPA の順である。最も疎水性の大きい PMPA は固相に保持されて溶出液中に回収されたが、他は極性が高く、さらに固相自身の保持力が物理的に弱いために保持されなかったと推測される。

以上のことから、イオン交換容量、操作の簡便性ならびに溶出液の誘導体化反応および GC-MS 分析への影響を考慮すると、今回検討した6種の固相抽出カートリッジの中で Bond Elut SAX カートリッジがMPA および RMPA の回収に最も適していることが確認された。

2. 土砂試料からのMPA 類の抽出および回収

サリン等の神経ガスが散布された事案における法科学資料として、被害者の生体試料や衣服、壁・地面等の拭き取り試料等の他に、大気、水、土砂等の環境試料が想定される。しかしながら、実際の鑑定において、土砂からMPA および RMPA を水抽出した後に誘導体化 GC-MS による分析を行った際にMPA および RMPA がほとんど検出されない場合が認められた。そこで、今回確立した Bond Elut SAX カートリッジ (500 mg) を使用した前処理法を、土砂からのMPA および RMPA の回収・検出に応用した。

6種類の土砂にMPA および RMPA を添加後、水抽出を行い、得られた抽出液を未処理あるいは固相抽出処理した後に誘導体化 GC-MS 分析へ進めた際のMPA および RMPA の検出率、ならびにCE分析による土砂からのMPA および RMPA の水抽出率をTable 4に示す。いずれの土砂においても、固相抽出前処理を行うことにより、未処理の場合と比較して誘導体化 GC-MS 分析によるMPA および RMPA の検出率は向上し、固相抽出処理を行った際の検出率は、CE分析で得られた土砂からの水抽出率の値とほぼ同等であった。筆者らは、土砂自身の特性と土砂からのMPA および RMPA の水抽出率の関係において、土砂のリン酸吸収係数と水抽出率との間に高い相関が認められ、リン酸吸収係数の高い土砂からのMPA および RMPA の水抽出率が低いことを確認している¹³⁾。土砂のリン酸吸収係数、MPA および RMPA の水抽出率と GC-MS

分析による検出率との比較により、MPA および RMPA の回収ならびにクリーンアップの状況を判断することができる。Table 4 において、MPA および RMPA の GC-MS 分析による検出率が、CE 分析による水抽出率に近似していることから、固相抽出処理により MPA および RMPA が十分にクリーンアップされ、誘導体化反応が効率よく行われていることが示された。

筆者らは、誘導体化 GC-MS 分析の際に土砂から MPA および RMPA が検出されない要因について検討を行い、土砂から抽出される遊離金属イオンが MPA および RMPA の誘導体化を妨害する一要因であることを以前に示した¹²⁾。また、イオン交換

樹脂を用いた前処理法により、夾雑物である遊離金属イオン等の陽イオンならびに中性物質を除去することにより、誘導体化 GC-MS 分析による MPA および RMPA の検出率を上昇させることができた^{12,13)}。イオン交換樹脂による前処理を行った場合、溶出液として塩酸を使用しており、炭酸水素ナトリウムによる溶出液の中和を行った。しかしながら、溶出液乾固の際に大量の塩が析出する等の問題が生じた。このため、誘導体化 GC-MS 分析による土砂からの MPA および RMPA の検出率は未処理の場合よりも向上するものの、水抽出率の値に及ばなかったと推定される。今回使用した固相抽出カートリッジ Bond Elut SAX の場合、揮発性のア

Table 4 Extraction recoveries and detection yields of alkylmethylphosphonates and methylphosphonic acid from soil samples.

analyte	analysis	extraction recovery or detection yield (%)					
		1	2	3	4	5	6(soil No.)
PMPA	CE ^{a)}	38.7 ± 2.9	67.0 ± 3.3	116.5 ± 10.6	92.4 ± 2.4	80.6 ± 6.5	97.6 ± 14.4
	GC-MS ^{b)}	12.4	5.9	51.1	48.2 ± 5.6	6.6	14.5 ± 4.9
	SPE & GC-MS ^{c)}	67.1	99.0	100.0	92.3 ± 33.5	100.8	106.5 ± 16.5
IMPA	CE	40.2 ± 9.4	72.3 ± 12.0	107.6 ± 11.2	95.6 ± 1.1	91.1 ± 5.5	98.5 ± 12.2
	GC-MS	2.9	3.3	43.8	29.3 ± 11.0	4.8	7.0 ± 1.4
	SPE & GC-MS	46.4	91.5	109.0	88.6 ± 23.9	84.8	88.3 ± 4.8
EMPA	CE	36.0 ± 6.2	77.5 ± 4.0	112.1 ± 15.0	96.0 ± 3.6	90.7 ± 4.4	93.4 ± 9.6
	GC-MS	2.4	2.8	37.5	24.3 ± 10.9	5.6	7.1 ± 2.2
	SPE & GC-MS	39.0	89.6	102.2	88.6 ± 24.6	87.9	88.1 ± 5.1
MPA	CE	0.0	12.6 ± 0.7	5.6 ± 3.9	72.7 ± 2.7	41.9 ± 5.4	59.9 ± 3.2
	GC-MS	0.0	0.0	0.0	1.2 ± 0.8	0.0	0.8 ± 0.4
	SPE & GC-MS	1.0	14.9	10.2	76.6 ± 3.9	37.7	66.9 ± 12.2

^{a)} A 100- μ l volume of an acetonitrile solution containing MPA and RMPA (each 150 μ g) was spiked to 2 g of a soil, and the mixture was extracted with 4 ml of water. The extract was analyzed by CE. The extraction yield is defined as the percentage value of the peak area of MPA and RMPA, compared to the value for aqueous solution containing the same concentrations of MPA and RMPA. The extraction recovery value represents an average of three determinations $\pm$ standard deviation.

^{b)} A 50- μ l volume of an acetonitrile solution containing MPA and RMPA (each 3 μ g) was spiked to 2 g of a soil, and the mixture was extracted with 4 ml of water. A 1-ml aliquot of the extract was dried, treated by *tert.*-butyldimethylsilylation, and analyzed by GC-MS.

^{c)} A 50- μ l volume of an acetonitrile solution containing MPA and RMPA (each 3 μ g) was spiked to 2 g of a soil, and the mixture was extracted with 4 ml of water. A 2-ml aliquot of the extract was pretreated by SPE using Bond Elut SAX, treated by *tert.*-butyldimethylsilylation, and analyzed by GC-MS.

^{b)c)} The detection yield is defined as the percentage value of the peak area ratio of TBDMS derivatives to internal standard, compared to the value for acetonitrile solution containing the same concentrations of MPA and RMPA. The detection yield value was an average of two determinations $\pm$ standard deviation or that of single determination.

ンモニア-メタノール溶液を用いて固相からの MPA および RMPA の溶出を行うため、溶出液の中和が不要となり、かつ溶出液の乾固時間の短縮も図ることができ、さらに、イオン交換樹脂使用の場合と比較して、水抽出および誘導体化 GC-MS 分析による土砂からの MPA および RMPA の検出率が飛躍的に向上した。

3. 海水および飲料からの MPA および RMPA の回収

土砂水抽出液以外の試料についても、Bond Elut SAX カートリッジによる固相抽出法を応用し、その有効性について検討を行った。試料として、海水および飲料（コーラ、コーヒー）を使用し、固相抽出前処理溶出液を CE 分析した際の MPA および RMPA の回収率、ならびに固相抽出前処理から誘導体化 GC-MS 分析を行った際の MPA および RMPA の検出率を Table 5 に示す。

化学査察においては、対象資料として神経ガス製造プラントの廃水を分析する。その際に、施設内だ

けでなく環境への汚染の程度を調べるために周辺の湖沼、河川、海水が対象となりうるが、海水には高濃度の塩類が含有されているため、分析が困難であると予測される。実際に他の環境水とは別に、海水を分析対象とした報告もされている²³⁾。海水には Cl^- や SO_4^{2-} 等の、固相抽出カートリッジへの相対的吸着選択性が高い陰イオンが多量に含有されており、今回使用した他の試料よりも MPA および RMPA の固相への保持が低かったため、希釈して使用した。海水の 4 倍希釈液に MPA および RMPA を添加し固相抽出を行ったところ、保持力の弱い RMPA については、一部が洗浄液中に回収されたが、いずれも 65% 以上の検出率を得ることができ、CE 分析による回収率の値に近づいた。

飲料への異物混入のような事案が発生した場合、あらゆる毒物の混入を考慮しなければならず、サリン等が混入される可能性も否めない。また、神経ガス散布事案において、放置された飲料が鑑定資料として有効となりうることなどから、飲料への応用を

Table 5 Recoveries and detection yields of alkylmethylphosphonates and methylphosphonic acid from sea water and beverage samples.

	sea water (diluted $\times 4$)			coke			canned coffee		
	CE ^{a)}	GC-MS ^{b)}	SPE & GC-MS ^{c)}	CE	GC-MS	SPE & GC-MS	CE	GC-MS	SPE & GC-MS
MPA	96.7 ^{e)}	31.7 $\pm$ 5.5 ^{d)}	79.9 ^{e)}	88.1	2.4 $\pm$ 0.7 ^{d)}	108.5	ND ^{f)}	2.7 $\pm$ 0.0 ^{d)}	89.8
EMPA	102.5	10.5 $\pm$ 3.9	65.0	91.5	2.6 $\pm$ 1.2	95.6	108.7	2.8 $\pm$ 0.2	54.6
RMPA	95.1	6.8 $\pm$ 3.0	67.8	106.5	2.8 $\pm$ 1.0	108.5	107.5	3.3 $\pm$ 0.1	60.6
IMP	95.8	0.9 $\pm$ 0.7	86.8	88.4	1.9 $\pm$ 1.5	74.0	108.5	1.3 $\pm$ 0.1	95.0

a) A 2-ml sample, spiked with 100- μl volume of an aqueous solution containing MPA and RMPA (each 150 μg), was pretreated by SPE using Bond Elut SAX, and analyzed by CE. The recovery is defined as the percentage value of the peak area of MPA and RMPA, compared to the value for aqueous solution containing the same concentrations of MPA and RMPA.

b) A 0.5-ml sample spiked with MPA and RMPA (each 0.8 μg) was directly treated by *tert.*-butyldimethylsilylation, and analyzed by GC-MS.

c) A 2-ml sample, spiked with MPA and RMPA (each 3 μg), was pretreated by SPE using Bond Elut SAX 500 μg , treated by *tert.*-butyldimethylsilylation and analyzed by GC-MS.

b/c) The detection yield is defined as the percentage value of the peak area ratio of TBDMS derivatives to internal standard, compared to the value for acetonitrile solution containing the same concentrations of MPA and RMPA.

d) The value represents an average of three determinations $\pm$ standard deviation.

e) The value represents that of single determination.

f) Not determined because of interference by unknown peaks contained in the coffee drink.

試みた。今回使用したコーラ、コーヒーについてはいずれも GC-MS 分析により高い検出率を示し、いずれも陰イオン交換樹脂使用の際の検出率よりも上昇しており¹³⁾、CE 分析による回収率に近似した値が得られた。今回使用した飲料には、陰イオンだけでなく、多くの夾雑物が含まれている。そのうちの中性物質の一つであるショ糖について、筆者らは、誘導体化反応の妨害物質であることを示した¹³⁾。今回使用した固相抽出法は、飲料中のショ糖を含め誘導体化反応を妨害する物質を除去することができ、GC-MS 分析により高い検出率が得られたことから、他の飲料に適用が可能であると判断された。

結 語

固相抽出法を利用した前処理法により、神経ガス分解物である MPA および RMPA の水溶液中からのクリーンアップを行った。各種固相抽出カートリッジを使用して MPA および RMPA のクリーンアップ条件の最適化を行った結果、強陰イオン交換相を有する Bond Elut SAX カートリッジを使用し、固相を NaF 水溶液により F⁻ 型に平衡化した後にサンプルを充填し、水で洗浄後 3% (v/v) アンモニア-メタノール溶液で溶出した場合において、ほぼ完全に MPA および RMPA を回収することができた。さらに実際の試料を想定した土砂、海水、飲料に対して、固相抽出法を適用し誘導体化 GC-MS 分析を行った結果、効率よく MPA および RMPA を検出することができた。したがって、固相抽出前処理により、これらの試料中に混在する陽イオンや中性物質等、誘導体化反応を妨害する夾雑物が十分に除去され、MPA および RMPA の誘導体化 GC-MS 分析による検出を大幅に向上させることができた。このように、固相抽出カートリッジによる前処理法は、溶液中からの迅速かつ効率良い、神経ガス加水分解物のクリーンアップ法として有用であると結論される。

文 献

- 1) 警察庁：警察白書1994-1995.
- 2) Tønnes, J. A. and Johnsen, B. A.: Gas chro-

matographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide. *J. Chromatogr.*, **467**, 129-138 (1989).

- 3) Pianetti, G. A., Taverna, M., Baillet, A., Mahuzier, G. and Baylocq-Ferrier, D.: Determination of alkylphosphonic acids by capillary zone electrophoresis using indirect UV detection. *J. Chromatogr.*, **630**, 371-377 (1993).
- 4) Nassar, A.-E. F., Lucas, S. V., Jones, W. R. and Hoffland, L. D.: Separation of chemical warfare agent degradation products by the reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **70**, 1085-1091 (1998).
- 5) Roach, M. C., Ungar, L. W., Zare, R. N., Reimer, L. M., Pompliano, D. L. and Frost, J. W.: Fluorescence detection of alkylmethylphosphonic acids using *p*-(9-anthroxyl) phenacyl bromide. *Anal. Chem.*, **59**, 1056-1059 (1987).
- 6) Kingery, A. F. and Allen, H. E.: Ion chromatographic separation of closely related nerve agent degradation products using an organic modifier to provide selectivity. *Anal. Chem.*, **66**, 155-159 (1994).
- 7) Mercier, J.-P., Chaimbault, P., Morin, P., Dreux, M. and Tambute, A.: Identification of phosphonic acid by capillary electrophoresis-ion-spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **825**, 71-80 (1998).
- 8) Black, R. M. and Read, R. W.: Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A*, **794**, 233-244 (1998).
- 9) Bauer, G. and Vogt, W.: Gas chromatographic determination of acids derived from phosphorus by trimethylsilylation with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Anal. Chem.*, **53**, 917-

- 919 (1981).
- 10) Purdon, J. G., Pagotto, J. G. and Miller, R. K.: Preparation, stability and quantitative analysis by gas chromatography and gas chromatography-electron impact mass spectrometry of *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives of some alkylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids. *J. Chromatogr.*, **475**, 261–272 (1989).
- 11) Shih, M. L., Smith, J. R., McMonagle, J. D., Dolzine, T. W. and Gresham, V. C.: Detection of metabolites of toxic alkylmethylphosphonates in biological samples. *Biol. Mass Spectrom.*, **20**, 717–723 (1991).
- 12) Kataoka, M., Tsunoda, N., Ohta, H., Tsuge, K., Takesako, H. and Seto, Y.: Effect of cation-exchange pretreatment of aqueous soil extracts on the gas chromatographic-mass spectrometric determination of nerve gas agent hydrolysis products after *tert.*-butyldimethylsilylation. *J. Chromatogr. A*, **824**, 211–221 (1998).
- 13) Kataoka, M., Tsuge, K. and Seto, Y.: Efficiency of pretreatment of aqueous samples using a macroporous strong anion-exchange resin on the determination of nerve gas hydrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry after *tert.*-butyldimethylsilylation. *J. Chromatogr. A*, **891**, 295–304 (2000).
- 14) Kataoka, M., Tsuge, K., Takesako, H., Hamazaki, T. and Seto, Y.: Effect of pedological characteristics on aqueous soil extraction recovery and *tert.*-butyldimethylsilylation yield for gas chromatography-mass spectrometry of nerve gas hydrolysis products from soils. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1823–1829 (2001).
- 15) Seto, Y., Tsunoda, N., Kataoka M., Tsuge, K. and Nagano, T.: Toxicological analysis of victim's blood and crime scene evidence samples in the sarin gas attacks caused by the Aum Shinrikyo cult. In Natural and Selected Synthetic Toxins-Biological Implication (Eds. Tu, A. T. and Gaffield, W.), pp. 318–332, American Chemical Society, Washington, DC (1999).
- 16) Black, R. M., Clarke, R. J., Read, R. W. and Reid, M. T. J.: Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve gas agent sarin, sulphur mustard and their degradation products. *J. Chromatogr. A*, **662**, 301–321 (1994).
- 17) ジーエルサイエンス：最新固相抽出ガイドブック，東京（1996）。
- 18) Creasy, W. R., Rodríguez, A. A., Stuff, J. R. and Warren, R. W.: Atomic emission detection for the quantitation of trimethylsilyl derivatives of chemical-warfare-agent related compounds in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, **709**, 333–344 (1995).
- 19) Fredriksson, S.-Å., Hammarström, L.-G., Hendriksson, L. and Lakso, H.-Å.: Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **30**, 1133–1143 (1995).
- 20) Sega, G. A., Tomkins, B. A., Griest, W. H.: Analysis of methylphosphonic acid, ethyl methylphosphonic acid and isopropyl methylphosphonic acid at low microgram per liter levels in groundwater. *J. Chromatogr. A*, **790**, 143–152 (1997).
- 21) 片岡美江子，柘浩一郎，瀬戸康雄：キャピラリー電気泳動を用いた神経ガス分解物分析法の比較検討。鑑識科学，**4**，67–75（2000）。
- 22) Kingery, A. F. and Allen, H. E.: The environmental fate of organophosphorous nerve agents: a review. *Toxicol. Environ. Chem.*, **47**, 155–184 (1995).
- 23) Rosso, T. E. and Bossle, P. C.: Capillary ion electrophoresis screening of nerve agent degradation products in environmental samples using conductive detection. *J. Chromatogr. A*, **824**, 125–134 (1998).