—原著—

陰イオン性毒物のペンタフルオロベンジル誘導体化 GC-MS 法を用いた同時検出

柘 浩一郎, 瀬戸康雄

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

Simultaneous Detection of Anionic Toxic Substances Using GC-MS Analysis of Pentafluorobenzyl Derivatives

Kouichiro Tsuge and Yasuo Seto

*National Research Institute of Police Science**6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 21 September 2001; accepted 7 February 2002)*

A method for the simultaneous detection of anionic toxic substances and related compounds (azide, cyanide, thiocyanate, sulfide, ethyl methylphosphonate, isopropyl methylphosphonate, pinacoryl methylphosphonate (PMPA), methylphosphonate (MPA), nitrate, nitrite) has been developed using gas chromatography-mass spectrometry after pentafluorobenzyl (PFB) derivatization. The PFB derivatives of the analyte anions separated on a HP-5 capillary column were identified by the characteristic electron impact ionization mass spectra (EI-MS). Cyanide gave three kinds of derivatives, and two PMPA diastereomers were separated. The PFB derivative of nitrite could be clearly identified because of the poor resolution from that of nitrate and the absence of distinctive fragmentation ions on EI-MS. The effect of reaction conditions on the yield of the PFB derivatives was investigated. As catalysts, tetradecyldimethylbenzylammonium chloride (TDMBA) and polymer bound tributylmethylphosphonium chloride (TC) were examined. The effect of phosphate (pH 7.0) and borate (pH 9.3) buffer were examined. The pentafluorobenzylation with TC in borate buffer gave the best degree of efficiency except for thiocyanate. The highest yields of PFB derivatives in beverages and blood samples were also given using TC and borate buffer just the same as when tested in water. The derivatization values were 75–100% in the tea sample and 12–100% in the canned coffee sample. For the blood sample, five fold dilution was proved to be necessary in order to avoid coagulation. The derivatization efficiency values were 6–93% in the blood sample. The derivatization yield of MPA was considerably low in the coffee and blood samples.

Key words: Simultaneous detection, Anion, Pentafluorobenzyl derivatization, GC-MS

緒 言

1998年に我が国で多発した毒物混入事案においては、和歌山カレー事件、新潟アジ化物混入事件、長野青酸ウーロン茶事件などの重大事件に加え、多数の模倣事件が発生し、毒物が検出されない事例も含めれば極めて多数の鑑定が行われた。さらに、サリン事件のようなテロ事案の発生に対する危惧もなくなることはないと考えられ、これらの毒性物質の体系的な分析法が必要とされている。これらの事件発生時には、当然、中毒原因物質は未知であり、一刻も早い中毒起因物質の同定が事件捜査、被害者救命、二次被害防止等の観点から重要である。完全に未知の段階からの中毒起因物質の同定においては、疎水性の有機化合物については有機溶媒抽出後、GC-MS分析を行うことでスクリーニングが可能である。また、重金属などは蛍光X線分析により金属元素の含有についてスクリーニングを行うことが可能である。親水性の有機化合物、たとえば、パラコート・ジクワット¹⁾や界面活性剤²⁾などについては、近年、LC-MSによる分析例が報告されており、LC-MSの条件を検討することにより、ある程度のスクリーニングは可能となってきている。しかしながら、陰イオン性化合物については試料を希釈、ろ過した後、イオンクロマトグラフィーで分析^{3,4)}することが可能であるものの、この方法は生体試料や飲料などの複雑なマトリクスを試料とする場合には分析が不可能である。

ペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体化法はカルボン酸⁵⁾、フェノール⁶⁾等の有機性陰イオンをはじめとして、シアン等の無機陰イオン^{7,8)}などをアルキル化する誘導体化法であり、水が存在していても誘導体化反応が進行するという利点がある。イオン類はその極性ゆえ水溶性であり、有機溶媒への抽出は困難であり、非水系の誘導体化反応は不可能である。しかしながら本法は水溶液中で陰イオン類を誘導体化し、有機溶媒抽出、ならびにGC-MSを用いた分析を可能にする極めて有用な誘導体化法である。

(X = R-COO⁻, Ph-OH, CN⁻, N₃⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, I⁻...etc.)

Scheme 1 PFB 誘導体化反応

本誘導体化反応を用いたGC-MS分析は、近年、法科学分野で広く利用されている。鹿毛らは硫化水素中毒の指標として、硫化物⁹⁾、多硫化物¹⁰⁾およびチオ硫酸塩¹¹⁾に対して本誘導体化反応を用いて分析を行っており、硫化物の分析⁹⁾に際しては、触媒としてtetradecyldimethylbenzylammonium chloride (TDMBA)を用いている。また、菊地ら¹²⁾は本法を用いてアジ化物をPFB化し、過剰の誘導体化試薬ペンタフルオロベンジルブロミド (PFBBBr) をチオ硫酸塩の添加により取り除いた後、GC-NPD分析を行っている。三木らは本誘導体化反応の触媒として三層移動触媒であるポリマー結合型tributylmethylphosphonium chloride (TC)を用いた、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)¹³⁾、シアン¹⁴⁾、神経ガス分解物であるメチルホスホン酸アルキルエステル類¹⁵⁾の分析を報告している。しかしながら、これらの報告は個々の陰イオンについて条件検討がされているのみで、この方法を同時分析に適用することが可能であるかは未検討である。特に、触媒の種類ならびにpHの条件については各分析対象物により様々な条件で反応が行われている。そこで、本研究においては、陰イオン性毒物および神経ガスの分解物について、PFB化反応の条件を比較検討し、これらの同時分析法を確立することを目的とした。

実験方法

材料

血液試料および飲料試料

血液は期限切れのヒト輸血用保存血を用いた。市販飲料としては「爽健美茶」ならびに「GEORGIA EMELALD MOUNTAIN BLEND」(日本コカコーラ㈱)を用いた。

試薬

ペンタフルオロベンジルブロミド (PFBBBr) は東京化成工業製を用い、5% v/v トルエン溶液を作

成した。本試薬は非常に催涙性が高い物質であるので、ドラフトチャンバー内での使用が必要である。tetradecyldimethylbenzylammonium chloride (TDMBA) は東京化成工業製を用いた。また、三層移動触媒 polymer bound tributylmethylphosphonium chloride (TC) は Fluka 製を用いた。内部標準物質 (I. S.) としては 1,3,5-tribromobenzene (TBB) を用い、5 μ M 酢酸エチル溶液を作成した。測定に供した陰イオン (およびその塩) としては、アジ化ナトリウム、シアン化カリウム、チオシアン酸カリウム、硫化ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム (いずれも和光特級) を、メチルホスホン酸 (MPA)、エチルメチルホスホン酸 (EMPA)、ピナコリルメチルホスホン酸 (PMPA) (いずれも Sigma 製) ならびにイソプロピルメチルホスホン酸 (IMPA: 合成品¹⁶⁾) を用い、それぞれ蒸留水に溶解して標準溶液を作成した。その他の試薬については和光純薬特級を用いた。

装置

GC-MS 分析は HP 製 6890 ガスクロマトグラフ-5973 質量分析計を用い、カラムは HP 製 HP-5MS (30 m, 0.25 mm I. D., 膜厚 0.25 μ m) を用いた。

実験操作

試料溶液の作成

アジ化ナトリウム、シアン化カリウム、チオシアン酸カリウム、硫化ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、MPA、EMPA、PMPA、IMPA については各試料 (蒸留水、飲料、5 倍希釈した血液) に各々 10 μ M となるように添加し、混合試料とした。

一方、亜硝酸および硝酸については、それぞれ別個に試料を作成した。なお、濃度は 10 μ M とし、用いる溶液としては蒸留水のみで行った。

誘導体化反応

誘導体化反応は、(1) 触媒を添加しない、(2) 触媒として TDMBA を用いる、(3) 触媒として三層移動触媒 (TC) を用いる条件を検討した。さらに、反応溶液に添加する緩衝液として (a) リン酸緩衝液 (pH 7.0) の添加ならびに (b) 飽和ホウ砂水溶液 (pH 9.3) の添加の 2 通りを組み合わせ、計 6 通りの反応条件を検討した。

(1) 触媒を添加しない方法

試料 1.0 mL をスクリーキャップ付き試験管 (PYREX 製, 10 mL 容) に入れ、これに緩衝液 (150 mM リン酸ナトリウム水溶液 pH 7.0 もしくは飽和ホウ砂水溶液) 500 μ L を加えた。この試験管に 5% v/v PFBBr トルエン溶液 500 μ L を加え、スクリーキャップをしっかりと締めた。誘導体化反応は沸騰水中で 30 分間行ない、時折、試験管を振り動かして反応の均一化を行った。反応後、冷水で試験管を冷却、内部標準物質 TBB の 5 μ M 酢酸エチル溶液 1.0 mL を加えた。これを 10 分間振とうし、誘導体化物を酢酸エチル層に抽出した。遠心分離し、その上清 1 μ L を GC-MS 分析に供した。

(2) 触媒として TDMBA を用いる方法

(1) の方法において、あらかじめ各緩衝液に TDMBA を 10 mM となるように溶解したものをを用いて反応を行なった。

(3) 三層移動触媒 (TC) を用いる方法

(1) の方法において、各試料混合液に 50 mg の TC を添加して反応を行なった。

GC-MS 条件

カラム温度: 80°C で 1 分間保持, 15°C/min で 200°C まで昇温, その後 30°C/min で 290°C まで昇温後, 3 分間保持 (2 段昇温)。注入口温度: 250°C。キャリアガス: ヘリウム (1.0 mL/min)。試料注入: スプリット法 (20:1)。イオン化法: 電子衝撃イオン化 (EI) 法。イオン化電圧: 70 eV, イオン化電流: 30 μ A, イオン源温度: 250°C, トランスファーライン温度: 280°C, 測定質量範囲: m/z 50–600 (スキャン法) および SIM 法 (測定物質に特徴的なフラグメントイオンを使用: Table 1 参照)。

血液試料の凝固に関する検討

輸血用保存血を蒸留水で 2 倍, 3 倍, 4 倍, 5 倍, 10 倍に希釈して上述の誘導体化反応を行い、血液の凝固の状態を目視で観察した。

結果および考察

1. 誘導体化物の GC-MS

Fig. 1 および Fig. 2 には TC およびホウ酸緩衝液を使用して誘導体化反応を行ない、GC-MS 分析を行なった際の抽出イオンクロマトグラムを、Fig. 3

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of pentafluorobenzyl derivatives of anionic toxic substances and related compounds (azide, cyanide, thiocyanate, sulfide, EMPA, IMPA, PMPA and MPA) at 10 μ M concentration.

にその質量スペクトルを示した。混合試料として作成したアジ化物、シアン化物、チオシアン酸、硫化物、MPA、EMPA、PMPA、IMPAの8種の抽出イオンクロマトグラム上の分離は良好であった。従って、本実験で検討したいいずれの反応条件においても

上記8種のPFB誘導体化物の同時分析が可能と考えられ、以後、最適反応条件について検討を行った。

以下に各陰イオンのPFB誘導体化物のGC-MS分析結果の詳細について示す。

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of pentafluorobenzyl derivatives of nitrate (A) and nitrite (B) at 10 μ M concentration.

(1) アジ化物

アジ化物 PFB 誘導体化物 (PFB-N₃) は保持時間 (Rt) 3.71分にピークが認められ、質量スペクトルにおいては m/z 223の分子イオンピーク、ならびに m/z 194, 181などのフラグメントイオンピークが得られた。また、GCにおける分離に関して、GC-NPDを用いた分析において菊地ら¹²⁾は共存する誘導体化試薬 (PFBBBr) のピークのテーリングと重複するため、過剰の PFBBBr を除去する操作を行っているが、本法では GC-MS を用いていることから、 m/z 194でモニターすることにより、仮に過剰の PFBBBr のピークがテーリングによって重なっていた場合においてもアジ化物の確認定量が可能であった。

(2) シアン化物

シアン化物 PFB 誘導体化物は、三木ら¹⁴⁾が示したとおり、反応条件の違いにより、3種の誘導体化物が混合して得られた。まず、Rt 4.09分に *mono*-PFB 誘導体化物 (*mono*-PFB-CN: C₆F₅-CH₂-CN), Rt 7.94分に *bis*-PFB 誘導体化物 (*bis*-PFB-CN: C₆F₅-CH(C₆F₅-CH₂-)-CN), Rt 10.91分に *tris*-PFB 誘

導体化物 (*tris*-PFB-CN: C₆F₅-C-(C₆F₅-CH₂-)₂-CN) と考えられるピークが認められ、それぞれの質量スペクトルにおいて、 m/z 207, 387, 567の分子イオンピークが得られた。

(3) チオシアン酸

チオシアン酸 PFB 誘導体化物 (PFB-SCN) は Rt 5.92分にピークが認められ、質量スペクトルにおいては m/z 239の分子イオンピークならびに m/z 181, 161などのフラグメントイオンピークが得られた。

(4) EMPA

EMPA の PFB 誘導体化物 (PFB-EMPA) は Rt 7.45分にピークが認められ、質量スペクトルにおいては m/z 304, 256, 181などのフラグメントイオンピークが得られたが、分子イオンピークは認められなかった。

(5) IMPA

EMPA の PFB 誘導体化物 (PFB-IMPA) は Rt 7.63分にピークが認められ、質量スペクトルにおいては m/z 303, 256, 181などのフラグメントイオンピークが得られたが、分子イオンピークは認められ

Fig. 3 Mass spectra of pentafluorobenzyl derivatives of anionic toxic substances and related compounds.

なかった。

(6) 硫化物

硫化物の *bis*-PFB 誘導体化物 (*bis*-PFB-S) は Rt 9.06 分にピークが認められ、質量スペクトルにおいては m/z 394 の分子イオンピークならびに m/z 211, 181 などのフラグメントイオンピークが得られた。

(7) PMPA

PMPA には 2 つの不斉炭素が存在し、4 種の光学異性体 (*R, R*), (*R, S*), (*S, S*), (*S, R*) が存在する。

これら 4 種の光学異性体のうち、(*R, R*), (*S, S*) と (*R, S*), (*S, R*) の 2 組はジアステレオマーであることから、本実験で用いた光学分割作用を持たない GC カラムによってもこの 2 組は分離が可能である。実際、PMPA の誘導体化物 (PFB-PMPA) は Rt 9.14 分および 9.30 分にそれぞれピークが得られており、それぞれの質量スペクトルはほぼ同一の m/z 303, 277, 256, 181 などのフラグメントイオンピークが観察され、分子イオンピークは認められなかった。このことから PMPA は 2 種のジアステレ

オマーが分離, 同定されたと考えられる。

(8) MPA

MPA の *bis*-PFB 誘導体化物 (*bis*-PFB-MPA) は Rt 10.40分にピークが認められ, その質量スペクトルにおいては m/z 275, 197, 181などのフラグメントイオンが得られたが, 分子イオンピークは認められなかった。三木ら¹⁵⁾は, 神経ガス分解物であるメチルホスホン酸アルキルエステル類 (EMPA, IMPA, PMPA) の PFB 誘導体化 GC-MS 分析を報告しているが, MPA に関しては分析対象としていない。しかしながら, 本研究では MPA も分析対象として検討し, これについても分析が可能であることを示した。MPA は神経ガスの加水分解物であるだけでなく, 製造工程で使用する原料物質の加水分解物でもあり, 中毒事案の場合だけでなく, 神経ガス製造場面において検出されうる。したがって, 本法を用いたスクリーニングは, これら神経ガス製造の証明にも有用であるものと考えられる。

(9) 硝酸

硝酸の PFB 誘導体化物 (PFB-NO_3) は Rt 4.29分にピークが認められ (Fig. 2), 質量スペクトルにおいては m/z 243の分子イオンピークならびに m/z 197, 181, 167などのフラグメントイオンピークが得られた。

(10) 亜硝酸

亜硝酸の PFB 誘導体化物 (PFB-NO_2) は硝酸の PFB 化物と非常に近接した保持時間 (4.26分) にピークが認められた。その質量スペクトルにおいては, m/z 181のフラグメントイオンピークを除いて, 分子イオンピークも含め, 特に特徴的なフラグメントイオンは得られなかった。

PFB 誘導体化法を用いた硝酸¹⁷⁾, 亜硝酸¹⁸⁾の分析はこれまでに報告がなされている。しかしながら, 今回用いた GC 条件では, 硝酸・亜硝酸の PFB 誘導体化物は良好に分離できなかった。また, 亜硝酸の PFB 化物が PFB 誘導体化物にほぼ共通に出現する m/z 181を除いて特徴的なフラグメントイオンピークを示さず, また, 硝酸の PFB 化物も m/z 181のフラグメントイオンピークを持つことから, 亜硝酸と硝酸が混在していた場合, 亜硝酸の定量は困難であると考えられる。実際, 硝酸・亜硝酸

の $10\mu\text{M}$ 標品混合物の分析においては, m/z 181の抽出イオンクロマトグラムにおいて, Rt 4.2~4.4分付近にブロードなピークが得られるものの, その分離定量は困難であった。さらに, 亜硝酸は自然酸化され, 硝酸を生じる¹⁹⁾。Fig. 2B には亜硝酸ナトリウム $10\mu\text{M}$ 標品の PFB 化物の抽出イオンクロマトグラムを示しているが, ここで, m/z 275の抽出イオンクロマトグラム上で Rt 4.29分にピークが認められており, これは硝酸の PFB 化物の存在を示している。この硝酸 PFB 誘導体化物の生成は, 標品作製時, もしくは誘導体化反応時における亜硝酸の自然酸化によるものと推定される。なお, この際に生成した硝酸は m/z 275の抽出イオンクロマトグラムの面積比から算出したところ, 添加した亜硝酸の約10%程度であった。

これらの結果から, 本研究においては硝酸, 亜硝酸の反応効率の定量的解析は困難であると考えられ, また, 血液試料への亜硝酸塩の添加はメトヘモグロビンの生成をもたらす, 毒物としての定量的解析が難しいと判断し, 以後の飲料・血液試料への適用においてはアジ化物, シアン化物, チオシアン酸, 硫化物, MPA, EMPA, PMPA, IMPA の 8 種を分析対象とすることとした。

2. 誘導体化効率の比較

GC-MS (スキャン法) の結果をもとに, 誘導体化効率の測定に際しては, 強度が高く, かつ各化合物に特徴的なイオンとして Table 1 に示したフラグメントイオンを選択し, SIM 法を用いて誘導体化物の定量をすることとした。

(1) 蒸留水中での誘導体化条件の検討

蒸留水に $10\mu\text{M}$ の各陰イオンを添加し, 触媒の種類 (有無), pH 条件を変化させて各陰イオンの誘導体化効率を定量した結果を Table 2 に示した。数値は Table 1 に示した各 PFB 化物に特徴的なフラグメントイオンと内部標準物質 (TBB) の SIM イオンクロマトグラムのピーク面積比およびその繰り返し分析誤差 ($n=3$ での標準偏差) を示している。

触媒の有無および種類についてみると, 触媒無添加での誘導体化効率はいずれの pH 条件においても極めて低いことが分かり, 触媒の添加は必須と考え

Table 1 Retention times and measured fragment ions for the quantification of anionic toxic substance PFB derivatives.

Analyte	Derivatives	Retention time (min)	Measured mass (m/z)
Azide	PFB-N ₃	3.71	194
Cyanide	<i>mono</i> -PFB-CN	4.09	207
Nitrite	PFB-NO ₂	4.28	181
Nitrate	PFB-NO ₃	4.29	243
Thiocyanate	PFB-SCN	5.92	239
(I.S.)	TBB	7.25	314
EMPA	PFB-EMPA	7.45	256
IMPA	PFB-IPMA	7.63	256
Cyanide	<i>bis</i> -PFB-CN	7.94	387
Sulfide	<i>bis</i> -PFB-S	9.06	394
PMPA	PFB-PMPA	9.14, 9.30 ^{a)}	256
MPA	<i>bis</i> -PFB-MPA	10.40	197
Cyanide	<i>tris</i> -PFB-CN	10.91	567

a) Two diastereomers of PMPA.

られる。一方、TDMBA と三層移動触媒 TC の比較では、MPA 類 (EPMA, IMPA, PMPA, MPA) の誘導体化効率が TC を用いた系で良好であり、特に、MPA 類の誘導体化効率が他の陰イオンと比べて低いことから、MPA 類を含めた同時分析においては TC を用いた反応系が適していると考えられた。また、繰り返し分析精度は10%以下の誤差であり、良好であった。

なお、チオシアン酸については TDMBA を用いた系のほうが誘導体化効率が高かった。チオシアン酸はシアン物の代謝物であるが、それ自体は毒物ではないこと、仮に代謝物として測定する場合においても試料中の内在性のチオシアン酸含量が比較的高いことから、TDMBA を触媒として用いてチオシアン酸の分析感度を向上させるメリットが高いとはいえず、本研究の目的であるスクリーニングには他の陰イオンの誘導体化効率が高い TC を用いた反

応系が適していると考えられた。

次に、pH 条件を変化させた場合、MPA 類の反応効率が pH 7.0での反応より pH 9.3 (飽和ホウ砂を用いた系) の誘導体化効率が高かったことから、pH 9.3の反応系が適していると考えられた。その他の陰イオンに関しては、シアンを除き、pH 条件を変化させても大きな反応効率の差は認められなかった。三木ら¹⁴⁾は、三層移動触媒 TC を用いたシアンの分析において、アルカリ性条件では *bis*-, *tris*-の PFB 誘導体化物が生じることを示し、これらの副生成物の生成を避けるため、中性 (pH 7.0程度) での誘導体化反応を推奨している。本研究においても、これらの副生成物の生成が認められたが、Table 2 に示したように、TC を用いた反応系において、pH 7.0での *mono*-PFB-CN の生成量と pH 9.3での *tris*-PFB-CN の生成量を比較すると後者の生成量の方が高いこと、さらに後者の分子イオンが比較的大きな分子量を持つ (m/z 567) ことから、アルカリ性条件の方が高感度分析が可能であろうと考えられる。厳密な定量を行うためには、数種の誘導体化物が生成することは決して好ましくはないが、本研究の目的である同時分析ならびに簡易定量系の確立に関しては、それらの問題はそれほど大きくはないと考えられる。ただし、実際の鑑定においては本法のスクリーニングで簡易定量した後、GC 法、呈色法などを用いての厳密な定量が必要になると思われる。

一般に、質量分析においては物質によってイオン化の効率は異なり、また、フラグメントによってある特定のイオンが生成する程度は物質によって異なる。したがって本来は、特定のイオンをモニターして得られた強度で各物質間の生成物量を比較することは不可能ではあるが、実際の分析においてどの程度の感度を得られるかを知ることが重要であることから、本比較を試みた。最も反応効率が良好であった、触媒: TC, pH 9.3の条件において、今回用いた陰イオンの中では、硫化物、アジ化物、シアン化物の感度が高く (I. S. に対する面積比が 1 を超える)、チオシアン酸、MPA, PMPA, IMPA, EMPA の感度は低かった (I. S. に対する面積比が 1 以下)。特に、同じメチルホスホン酸アルキルエステ

Table 2 PFB derivatization efficiency of anions in distilled water.

(1) Inorganic toxic anions

Catalyst	pH	PFB-N ₃	<i>mono</i> -PFB-CN	<i>bis</i> -PFB-CN	<i>tris</i> -PFB-CN
None	7.0	1.87 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	10.1 ± 0.07	4.66 ± 0.04	0.28 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TC	7.0	10.8 ± 0.14	2.36 ± 0.03	9.11 ± 0.01	1.37 ± 0.02
None	9.3	1.45 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	9.92 ± 0.04	5.37 ± 0.19	2.60 ± 0.01	0.54 ± 0.02
TC	9.3	9.67 ± 0.16	0.10 ± 0.00	1.55 ± 0.06	11.8 ± 0.21

Catalyst	pH	PFB-SCN	<i>bis</i> -S-PFB	PFB-NO ₂	PFB-NO ₃
None	7.0	0.15 ± 0.00	0.53 ± 0.03	4.50 ± 0.22	2.40 ± 0.11
TDMBA	7.0	0.53 ± 0.00	9.19 ± 0.33	24.5 ± 0.69	8.20 ± 0.32
TC	7.0	0.44 ± 0.02	11.8 ± 0.01	38.5 ± 0.89	11.1 ± 0.25
None	9.3	0.11 ± 0.00	3.38 ± 0.09	5.21 ± 0.18	2.10 ± 0.12
TDMBA	9.3	0.60 ± 0.01	15.4 ± 0.12	25.2 ± 0.75	7.60 ± 0.22
TC	9.3	0.03 ± 0.00	19.4 ± 0.54	39.4 ± 1.04	10.3 ± 0.32

(2) Degradation product anions of nerve agents

Catalyst	pH	PFB-EMPA	PFB-IMPA	PFB-PMPA ^{a)}	PFB-PMPA ^{b)}
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.73 ± 0.02	0.76 ± 0.02
TC	7.0	0.52 ± 0.03	4.49 ± 0.03	3.78 ± 0.06	4.20 ± 0.18
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.04 ± 0.00	0.23 ± 0.01	1.18 ± 0.04	1.27 ± 0.03
TC	9.3	0.51 ± 0.01	5.37 ± 0.14	3.99 ± 0.10	5.26 ± 0.30

Catalyst	pH	<i>bis</i> -PFB-MPA
None	7.0	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	2.02 ± 0.02
TC	7.0	2.93 ± 0.00
None	9.3	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.19 ± 0.00
TC	9.3	6.29 ± 0.16

Each value presents peak area ratio (analyte/I.S.) ± standard deviation ($n=3$)

^{a)} PMPA diastereomer eluted at 9.14 min

^{b)} PMPA diastereomer eluted at 9.30 min

ル間でも EMPA の感度がかなり低かった。PFBBBr を用いたアルキル化反応には、陰イオン側のイオン性が高いことが重要と考えられ、PMPA > IMPA > EMPA の順で誘導体化効率が高いことから、アルキル鎖が大きいほど化合物の陰イオン性が高くなり、これによって誘導体化効率の差が生じているのではないかと推定される。また、本反応の定量性については、今回用いた 10 μ M までの範囲で良好な直線性が得られた。

(2) 各種飲料中での誘導体化条件の検討

市販の飲料（茶、コーヒー飲料）に 8 種の陰イオンを添加した場合の誘導体化効率を検討した。Table 3 には茶に、Table 4 にはコーヒー飲料にそれぞれ添加した場合の結果を示した。標品の濃度や分析条件は上述の蒸留水の場合と同様である。

誘導体化反応条件による効率の違いは蒸留水の場合とほぼ同様で、飲料に添加した場合でも触媒を添加しない系、TDMBA を触媒として用いた系と比較して、TC を用いた系が最も誘導体化効率が良いと考えられた。また、pH 9.3 が pH 7.0 の反応系より良好と考えられた。

飲料成分によるマトリクスの影響をみると、茶の場合、各分析対象イオンについて、水の場合の 75～100% の誘導体化効率を得られ、茶の成分は誘導体化反応に影響を及ぼさないことが確認された。一方、コーヒー飲料の場合の誘導体化率は MPA が 10% と極めて低いほか、他の分析対象陰イオンでは約 50～100% 程度であった。これはコーヒー飲料中のタンパク質成分（乳成分由来と考えられる）などへの測定陰イオンの吸着や、コーヒーの成分による誘導体化反応の阻害などが原因と考えられるが、MPA を除いては、各成分の回収率はそれほど低くないので、コーヒー飲料などの比較的複雑な組成の飲料でも本法が適用できると考えられる。一般に、毒物中毒で重症患者が発生するようなケースでは、比較的多量の毒物が飲料中に含有されていると考えられ、蒸留水に比べて約 50% の誘導体化率でも十分な実用性があると考えられる。また、両飲料ともに、チオシアン酸、硫化物、シアン化物に関しては内在性成分としてブランク試料からも検出されており、Table 3, 4 に関してはブランク値を差し引いて算出

している。

シアンに関しては内在性成分として存在している可能性のほか、亜硝酸の添加によって非特異的に生成する例¹⁹⁾も報告されていることから、本法で飲料等からシアンが検出された場合においても、ヘッドスペース-GC 法などによって厳密な定量を行い、シアンが毒物として添加されたのかについて、詳細に検討する必要があると考えられる。さらに、コーヒー試料において TC を触媒とし、アルカリ性で反応させた場合、シアンの誘導体化物は bis-PFB 体の生成が主となり、蒸留水中では主要生成物であった tris-PFB 体の生成は少なくなっている。このように、マトリクスによって bis-PFB 体、tris-PFB 体の生成比が異なることが考えられるので、上述の内因性シアンの問題も含め、厳密な定量には GC 等の他の分析手法を併用する必要があると思われる。

(3) 全血試料での誘導体化条件の検討

(a) 血液の希釈による凝固の状態の確認

血液は約 14% 量のヘモグロビンをはじめとするタンパク質を含有し、それらは加熱、pH の変化、有機溶媒の添加により変性し凝固する。今回用いた方法では、誘導体化反応時に沸騰水で加温していることから、血液試料そのままを試料とした場合はこの凝固によって分析が不可能となる。そこで、どの程度以上の希釈をすれば血液試料の凝固を防げるかを検討した。その結果、原液～4 倍希釈までの試料では血液が完全に凝固してしまい、有機溶媒を添加しての誘導体化物の抽出は不可能であった。一方、5 倍以上の希釈では、若干の沈殿物（凝固物）の生成は認められるものの、水層・有機層の分離がみられた。そこで、酢酸エチル 1.0 ml を加えたところ、上から有機層・沈殿物・水層の 3 層に分離が観察され、有機層の GC-MS 分析が可能であると考えられた。そこで、血液試料については蒸留水で 5 倍希釈したものを試料とし、上述の手順どおりに分析を行った。

(b) 血液試料における反応条件の検討

血液を蒸留水で 5 倍に希釈した溶液を試料とし、上記の飲料の場合と同様に 8 種の陰イオンを添加し分析した結果を Table 5 に示す。誘導体化反応条件による効率の変化は蒸留水や飲料中の場合とほぼ同

Table 3 PFB derivatization efficiency of anions in tea drink.

(1) Inorganic toxic anions

Catalyst	pH	PFB-N ₃	<i>mono</i> -PFB-CN	<i>bis</i> -PFB-CN
None	7.0	1.43 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	10.3 ± 0.23	2.32 ± 0.05	0.12 ± 0.02
TC	7.0	10.4 ± 0.48	2.55 ± 0.13	8.34 ± 0.46
None	9.3	1.08 ± 0.13	0.15 ± 0.01	0.02 ± 0.00
TDMBA	9.3	9.68 ± 0.11	3.06 ± 0.08	2.45 ± 0.08
TC	9.3	9.32 ± 0.41	0.00 ± 0.00	1.28 ± 0.07

Catalyst	pH	<i>tris</i> -PFB-CN	PFB-SCN	<i>bis</i> -S-PFB
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.03
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.02	4.30 ± 0.19
TC	7.0	0.96 ± 0.03	0.41 ± 0.01	10.6 ± 0.42
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.42 ± 0.03
TDMBA	9.3	0.25 ± 0.01	0.40 ± 0.01	14.8 ± 0.54
TC	9.3	8.98 ± 0.80	0.03 ± 0.00	15.2 ± 0.41

(2) Degradation product anions of nerve agents

Catalyst	pH	PFB-EMPA	PFB-IMPA	PFB-PMPA ^{a)}
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.63 ± 0.04
TC	7.0	0.42 ± 0.03	3.78 ± 0.19	2.95 ± 0.34
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.03 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.94 ± 0.08
TC	9.3	0.45 ± 0.02	4.71 ± 0.24	3.60 ± 0.14

Catalyst	pH	PFB-PMPA ^{b)}	<i>bis</i> -PFB-MPA
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.66 ± 0.06	0.00 ± 0.00
TC	7.0	4.13 ± 0.33	1.96 ± 0.08
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.98 ± 0.08	0.15 ± 0.00
TC	9.3	4.36 ± 0.21	5.51 ± 0.15

Each value presents peak area ratio (analyte/I.S.) ± standard deviation ($n=3$)

^{a)} PMPA diastereomer eluted at 9.14 min

^{b)} PMPA diastereomer eluted at 9.30 min

Table 4 PFB derivatization efficiency of anions in canned coffee drink.

(1) Inorganic toxic anions

Catalyst	pH	PFB-N ₃	<i>mono</i> -PFB-CN	<i>bis</i> -PFB-CN
None	7.0	1.36 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	9.16 ± 0.36	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00
TC	7.0	10.3 ± 0.39	2.47 ± 0.05	0.42 ± 0.01
None	9.3	2.65 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	7.63 ± 0.15	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00
TC	9.3	10.1 ± 0.18	0.07 ± 0.06	4.01 ± 0.09

Catalyst	pH	<i>tris</i> -PFB-CN	PFB-SCN	<i>bis</i> -S-PFB
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.05	1.89 ± 0.26
TC	7.0	0.00 ± 0.00	0.34 ± 0.04	3.21 ± 0.10
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.00	1.27 ± 0.13
TDMBA	9.3	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.02	5.83 ± 0.31
TC	9.3	0.74 ± 0.04	0.03 ± 0.03	12.9 ± 0.84

(2) Degradation product anions of nerve agents

Catalyst	pH	PFB-EMPA	PFB-IMPA	PFB-PMPA ^{a)}
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.03	0.54 ± 0.17
TC	7.0	0.25 ± 0.03	2.28 ± 0.20	3.52 ± 0.43
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.51 ± 0.03
TC	9.3	0.28 ± 0.01	2.63 ± 0.18	4.11 ± 0.48

Catalyst	pH	PFB-PMPA ^{b)}	<i>bis</i> -PFB-MPA
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.01
TDMBA	7.0	0.54 ± 0.18	0.38 ± 0.06
TC	7.0	4.13 ± 0.42	0.81 ± 0.10
None	9.3	0.02 ± 0.00	0.31 ± 0.01
TDMBA	9.3	0.50 ± 0.04	0.02 ± 0.01
TC	9.3	5.20 ± 0.43	0.80 ± 0.05

Each value presents peak area ratio (analyte/I.S.) ± standard deviation ($n=3$)

^{a)} PMPA diastereomer eluted at 9.14 min

^{b)} PMPA diastereomer eluted at 9.30 min

Table 5 PFB derivatization efficiency of anions in five times diluted human whole blood.

(1) Inorganic toxic anions

Catalyst	pH	PFB-N ₃	<i>mono</i> -PFB-CN	<i>bis</i> -PFB-CN
None	7.0	0.96 ± 0.05	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	1.63 ± 0.15	0.22 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TC	7.0	6.68 ± 0.26	2.83 ± 0.19	5.02 ± 0.15
None	9.3	0.44 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	4.86 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.04 ± 0.00
TC	9.3	7.94 ± 0.21	0.00 ± 0.00	2.39 ± 0.19

Catalyst	pH	<i>tris</i> -PFB-CN	PFB-SCN	<i>bis</i> -S-PFB
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.36 ± 0.05
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.55 ± 0.07	6.54 ± 0.69
TC	7.0	0.55 ± 0.01	0.37 ± 0.01	9.20 ± 0.90
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.01	1.80 ± 0.30
TDMBA	9.3	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.05	10.9 ± 0.74
TC	9.3	5.76 ± 0.24	0.03 ± 0.01	18.0 ± 3.04

(2) Degradation product anions of nerve agents

Catalyst	pH	PFB-EMPA	PFB-IMPA	PFB-PMPA ^{a)}
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.15 ± 0.01
TC	7.0	0.13 ± 0.01	1.38 ± 0.12	2.94 ± 0.15
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.00
TC	9.3	0.17 ± 0.00	1.63 ± 0.04	2.21 ± 0.05

Catalyst	pH	PFB-PMPA ^{b)}	<i>bis</i> -PFB-MPA
None	7.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	7.0	0.15 ± 0.01	0.02 ± 0.00
TC	7.0	3.94 ± 0.20	0.27 ± 0.02
None	9.3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TDMBA	9.3	0.17 ± 0.01	0.01 ± 0.01
TC	9.3	2.86 ± 0.12	0.39 ± 0.01

Each value presents peak area ratio (analyte/I.S.) ± standard deviation ($n = 3$)

^{a)} PMPA diastereomer eluted at 9.14 min

^{b)} PMPA diastereomer eluted at 9.30 min

様で、血液試料においても TC 触媒使用の結果が良好であった。緩衝液については pH 9.3 の緩衝液を用いた方が pH 7.0 の緩衝液を用いた場合と比べて誘導体化効率が良好であった。なお、ブランク血液からは比較的多量の内因性チオシアン酸、硫化物が検出されており、Table 5 においてはブランク値を差し引いて表示している。また、内因性シアンについては痕跡程度の検出が認められたがその他の陰イオンについてはブランク血液の分析でピークは認められなかった。

MPA はコーヒーの場合と同様、いずれの反応条件を用いても、蒸留水に添加した場合と比較して 10 % 以下の低い誘導体化率であった。一方、アジ化物、チオシアン酸、硫化物の誘導体化率は比較的良好であった。シアンに関しては、TC 触媒使用・アルカリ性の条件下で、コーヒーの場合と同様、*tris*-PFB 体の生成が抑えられ、*bis*-PFB 体が増加している傾向が見られた。この原因としては、コーヒーもしくは血液内のタンパク質等による緩衝作用によって、pH 9.3 の緩衝液を添加しても反応液の pH があまり上がらず、これによって *tris*-PFB 体の生成が抑えられてたと推察される。

本スクリーニング法の血液試料への適用については、血液を 5 倍希釈せねばならないことから、感度面での問題が残されている。一般的に、生体試料中の毒性物質の含量は比較的少ないため、特に、希釈を行った場合に中毒量が検出限界以下となる可能性がある。特に、MPA をはじめとする神経ガス加水分解物は、生体内での存在量は極めて少なく、かつ、本誘導体化法での誘導体化効率が決して高くはないことから、実際に被害者試料から検出できるかは検討の余地がある。しかしながら、本分析法では、有機溶媒抽出液が約 1.0 ml 得られることから、これを濃縮することにより感度を高められる可能性がある。ただし、この場合、ペンタフルオロアザイド (PFB-N₃) などの沸点が比較的低いことから、濃縮によって定量性が損なわれる点は留意しておく必要がある。また、感度向上という点からは、Negative-CI イオン化法による GC-MS 分析も有効な手段であると考えられる。

血液試料からの陰イオン性毒物の分析にあたって

は、酸添加や有機溶媒添加による除タンパク操作を行うのが一般的であり、個別の物質に関してはそれらの前処理を行っている例が報告されている¹⁵⁾。しかしながら、今回目的としたスクリーニング段階においては、試料にシアンやアジ化物などの揮発性毒物が含有されている可能性もあることから、酸添加は好ましくない。操作の簡便性等を考えると、少なくともスクリーニング段階においては、今回用いた希釈という単純な前処理が適しているのではないかと考えられる。

結 語

本研究では、陰イオン性毒物（およびその関連化合物）8 種（アジ化物、シアン化物、チオシアン酸、硫化物、MPA, EMPA, PMPA, IMPA）について、ペンタフルオロベンジル誘導体化 GC-MS を用いた同時分析法の反応条件、すなわち、触媒の種類ならびに添加緩衝液の pH を検討した。

その結果、触媒として三層移動触媒 Tributylmethylphosphonium chloride polymer bound (TC) を用い、緩衝液として飽和ホウ砂水溶液を添加する反応条件が、もっとも誘導体化物の生成量が多く、同時分析系として適していると考えられた。実試料を想定して、茶・コーヒー飲料にこれらの物質を添加した場合においても、上記の条件で比較的良好な誘導体化率が得られ、毒物混入事案におけるスクリーニング法として利用できるものと考えられた。血液試料の場合、希釈せずに反応を行うと、タンパク質の変性・凝固により分析が不可能であるが、血液を 5 倍希釈以上した場合、凝固は起こらず、誘導体化反応を行うことが可能であった。誘導体化率については MPA が悪かったものの、アジ化物、チオシアン酸、硫化物、シアン化物の無機陰イオンについては比較的良好であり、これらの陰イオンに関しては、生体試料であっても本法が適用可能であろうと考えられた。

文 献

- 1) Castro, R., Moyano, E., Galceran M. T.: Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem

- mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **914**, 111–121 (2001).
- 2) Ferrer, I., Furlong E. T.: Identification of alkyl dimethylbenzylammonium surfactants in water samples by solid-phase extraction followed by ion trap LC/MS. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 2583–2588 (2001).
- 3) Curran, M. A., Palmer A. S.: Suppressed ion chromatography methods for the routine determination of ultra low level anions and cations in ice cores. *J. Chromatogr. A*, **919**, 107–113 (2001).
- 4) Stefanovic, S. C., Bolanca, T., Curkovic L.: Simultaneous determination of six inorganic anions in drinking water by non-suppressed ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **918**, 325–334 (2001).
- 5) Rosenfeld, J., Mureika-Russell, M., Yeroushalmi S.: Solid-supported reagents for the simultaneous extraction and derivatization of carboxylic acids from aqueous matrices. Studies on optimization of reaction conditions. *J. Chromatogr.*, **358**, 137–146 (1986).
- 6) Ehrsson H.: Quantitative gas chromatographic determination of carboxylic acids and phenols after derivatization with pentafluorobenzyl bromide. Evaluation of reaction conditions. *Acta Pharm. Suec.*, **8**, 113–118 (1971).
- 7) Wu, H. L., Chen, S. H., Lin, S. J., Hwang, W. R., Funazo, K., Tanaka, M., Shono T.: Gas chromatographic determination of inorganic anions as pentafluorobenzyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **269**, 183–190 (1983).
- 8) Chen, S. H., Wu, S. M., Kou, H. S., Wu H. L.: Electron-capture gas chromatographic determination of cyanide, iodide, nitrite, sulfide, and thiocyanate anions by phase-transfer-catalyzed derivatization with pentafluorobenzyl bromide. *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 81–85 (1994).
- 9) Kage, S., Nagata, T., Kimura, K., Kudo K.: Extractive alkylation and gas chromatographic analysis of sulfide. *J. Forensic. Sci.*, **33**, 217–222 (1988).
- 10) Kage, S., Nagata, T., Kudo K.: Determination of polysulphides in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **564**, 163–169 (1991).
- 11) Kage, S., Nagata, T., Kudo K.: Determination of Thiosulfate in Body Fluids by GC and GC/MS. *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 148–150 (1991).
- 12) Kikuchi, M., Sato, M., Ito, T., Honda M.: Application of a new analytical method using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the azide ion to human blood and urine samples of an actual case. *J. Chromatogr. B*, **752**, 149–157 (2001).
- 13) Miki, A., Tsuchihashi, H., Yamashita M.: GC and GC-MS determination of fluoroacetic acid and phenoxy acid herbicides via triphasal extractive pentafluorobenzylation using a polymer-bound phase-transfer catalyst. *J. Anal. Toxicol.*, **22**, 237–245 (1998).
- 14) Miki, A., Nishikawa, M., Tsuchihashi H.: Simultaneous GC-MS Determination of Azide, Cyanide and Thiocyanate via Phase-Transfer-Catalyzed Pentafluorobenzylation. *J. Health Sci.*, **46**, 81–88 (2000).
- 15) Miki, A., Katagi, M., Tsuchihashi, H., Yamashita M.: Determination of alkylmethylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid-solid-phase-transfer-catalyzed pentafluorobenzylation. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 86–93 (1999).
- 16) Kataoka, M., Tsunoda, N., Ohta, H., Tsuge, K., Takesako, H., Seto, Y.: Efficiency of cation-exchange pretreatment of aqueous soil extract on gas chromatography-mass spectrometric determination of nerve agent hydrolysis products after *tert*-butyldimethylsilylation. *J. Chromatogr. A*, **824**, 211–221 (1998).
- 17) Kage, S., Kudo, K., Ikeda N.: Determination of

- nitrate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **742**, 363–368 (2000).
- 18) Wu, H. L., Chen, S. H., Funazo, K., Tanaka, M., Shono T.: Electron-capture gas chromatographic determination of nitrite as the pentafluorobenzyl derivative. *J. Chromatogr.*, **291**, 409–415 (1984).
- 19) Seto, Y., Kataoka, M., Tsuge, K., Takaesu H.: Pitfalls in the toxicological analysis of an isobutyl nitrite-adulterated coffee drink. *Anal. Chem.*, **72**, 5187–5192 (2000).