

ジンクピリチオノンおよびカッパーピリチオノン

[対象物質および構造式]

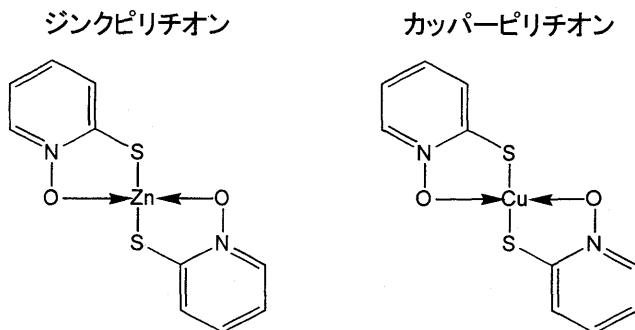
ジンクピリチオノン C₁₀H₈N₂O₂S₂Znカッパーピリチオノン C₁₀H₈N₂O₂S₂Cu

図1 構造式

[物理化学的性状値および用途]

物質名	分子量		log P _{ow}	水溶解度	用途
	平均同位体	最多同位体			
ジンクピリチオノン	317.7078	315.9319	-	-	船底塗料・抗ふけ剤・抗菌剤
カッパーピリチオノン	315.8638	314.9323	1.4*	0.09μg/ml*	船底塗料

*実測値

§1 分析法

水質試料はジクロロメタンによる抽出後、脱水、ロータリーエバボレータで乾固した後、アセトニトリル1mLで再溶解する。試料液はLC/MSで定量する。

[試験法]

[試料の採取及び保存]

試料水は1L容褐色試料瓶（注1）に満水に採り、直ちにクーラーボックスに収納し、可能な限り速やかに実験室に持ち帰って抽出に供する。試料採取から抽出まで1~2日以内に操作しなければならない。

[試料の前処理]

試料水1Lを2L容分液ロートに採り、ジクロロメタン100mLを加えて、振とう機で10分間振とう、ジンクピリチオノンを抽出する。静置後、ジクロロメタンを分取する。水層にジクロロメタン100mLを加え、同様な抽出操作を繰り返して、ジクロロメタン層を先の抽出液に合わせる。ジ

クロロメタン抽出液は、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバボレータで乾固する。これにアセトニトリル 1 ml を正確に加え、超音波処理により溶解し、測定用試料とする。(注 2,3)

[空試験液の調製]

試料と同量の精製水を用いて、前項の操作を行い水試料の空試験液を調製する。

[標準液の調製]

ジンクピリチオノン 10mg を精秤し、アセトニトリルで正確に 100 ml として標準原液(100μg/ml)を調製する。標準原液の所定量を適宜、アセトニトリルで希釈混合し、0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 μg/ml の検量線用標準液を作成する。

標準原液は密封褐色試薬瓶に入れ、冷暗所(4°C)に保存する。保存期間は 1 ヶ月までとする。また、検量線用標準液は用時調製する。

[測定]

LC/MS(HP1100 Series LC/MSD)の測定条件を示す。(注 4)

<HPLC> カラム: C4 シリカ系充填剤 (InertsilC4 (4.6×150mm, 5μm, GL Science)) (注5)

移動相: A 液(2mM 酢酸アンモニウム水溶液)、B 液(HPLC 用アセトニトリル)

溶離条件: 0~10 分⇒B 液(20%)→(95%), 10~15 分⇒B 液(95%)→(100%)

流速: 0.5ml/分

カラム温度: 40°C

注入量: 20μl

<MS> マスレンジ(m/z): 100~400

イオン化法: Electrospray 陽イオン検出モード (ESI-Positive)

フラグメント電圧: 50V

ネプライザー: N₂(60psi)

ドライングガス: N₂ (12l/分, 350°C)

モニターイオン(m/z): 316(定量用)、318(確認用)

[検量線]

ジンクピリチオノンの検量線作成用標準液 20μl を LC/MS に注入し、カッパーピリチオノンとして検出したピーコ面積と濃度から検量線を作成する。

この際、同様の操作でカッパーピリチオノンについても検量線を作成し、ジンクピリチオノンと同一の直線回帰が得られることを確認する。

[定量及び計算]

標準物質の LC における保持時間が一致し、かつ MS における確認イオンと定量イオンのピーコ強度比が理論値の±20%以内であれば、試料液中にジンクピリチオノンが存在していると見なす。

試料液におけるジンクピリチオノンの定量イオンピーコの強度から検量線により絶対量を求め、次式で定量値を算出する。

$$C(\mu\text{g/l}) = S_{abs}(\text{ng}) \times \frac{V_{conc}(\text{ml}) \times 1,000}{V_{inj}(\mu\text{l}) \times V_{spl}(\text{ml})}$$

ここで、C: 試料水中のジンクピリチオノ濃度($\mu\text{g}/\text{l}$)

S_{abs} : 検量線から求めた試料液中ジンクピリチオノ量(ng)

V_{conc} : 試料液の最終液量(ml)

V_{inj} : LC/MS への注入量(μl)

V_{spl} : 試料水量(ml)

[検出限界]

本分析法を用いた LC/MS(HP1100 Series LC/MSD)における装置検出限界値ならびに定量域の上限値を以下に示す(注 6,7)。

試料	IDL (ng)	試料量 (l)	検出限界 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	定量域上限 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
水質	0.048	1	0.0024	0.5

本分析法の検出限界値を以下に示す(注 6,7)。

試料	試料量 (l)	検出限界 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
水質	1	0.02

試薬・器具

[試薬]

ジンクピリチオノ: 純度 97%以上(Arch Chemicals)

カッパーピリチオノ: 純度 97%以上(Arch Chemicals)

ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール(残留農薬分析用)

アセトニトリル、イソプロピルアルコール(HPLC 分析用)

酢酸アンモニウム(試薬特級)

硝酸(試薬特級)

無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用

精製水: 超純水(注 8)

[器具及び装置]

試薬瓶、共栓付試験管、メスフラスコ、オートサンプラーバイアル瓶: パイレックス製で褐色のもの(注 1,9)。

メスシリンダー、分液ロート: パイレックス製

ロータリーエバポレーター

超音波洗浄器

高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)(注 11)

C4 シリカ系充填剤 LC カラム(注 5)

注 解

(注1)

水中のジンクピリチオンは直射日光下で速やかに分解する。したがって、試料水は褐色の試料瓶に採り、光分解を防ぐ。

(注2)

抽出からLC/MS測定に至る操作は速やかに、かつ連続的に行い、全ての操作を1日以内に完了する。この一連の操作は、直射日光の当たらない場所で行う。

(注3)

ジンクピリチオンの配位子であるピリチオン分子は、分析の濃縮操作やLC/MS測定時において溶存あるいはガラス器具表面に露出する他の金属原子に容易に結合する。この性質が感度や再現性に影響するので、注9～10に留意して適切なガラス器具の洗浄とLCカラムのコンディショニングを行わなければならない。また、エバポレーターによる乾固の操作は不純物の金属原子との反応をできるだけ防ぐために乾固直後に吸引を止めるようとする。

(注4)

LC/MSの機器により得られるマススペクトルに違いが生じことがある。またマスのパラメータも機器により、その名称または最適値が異なる。このため、各装置に応じた最適条件に設定して、測定を行う（解説4,6参照）。

(注5)

カラムとしてInertsilC4(4.6×150mm, 5μm, GL Science)のほか、Develosil TMS-VG-5(4.6×150mm, 5μm, Nomura Chemical)などのC4系シリカカラムも使用が可能であった。

(注6)

本法は水中のジンクピリチオンを溶媒抽出からLC/MS検出によって測定する方法である。しかし、現在一般的に流通している試薬、器具および装置を用い、全操作を通じてジンクピリチオンの形態を維持して検出することは不可能であった。そこで、ジンクピリチオンをより安定性の高いカッパーピリチオンとして検出する間接定量法を示した。この方法は、水中のジンクピリチオンの全量が定量的にカッパーピリチオンに変換していることが前提となる。これを確保するために、器具の取り扱いとLC/MSの測定条件の設定にとくに留意する必要がある。また、現状では変換効率を制御する方法が見出せないことから、Cuの供給源をLCカラム（カラム本体、シリカ充填剤、移動相溶媒）に含まれる不純物に依存している。したがって、定量範囲が問題となり、検出下限値とともに定量上限値を設定した。

なお、低濃度添加回収実験の7回繰り返しにより得られた分析値の標準偏差に $t(n-1, 0.02)$ を掛けた値を検出限界値とした。

表 回収率試験の結果

繰り返し	濃度	精製水 (%)	海水 (%)
1	0.05μg/l	79	61
2	0.05μg/l	74	80
3	0.05μg/l	74	76
4	0.05μg/l	73	90
5	0.05μg/l	75	70
6	0.05μg/l	76	74
7	0.05μg/l	72	91
平均		75	77
標準偏差		2	11

表 検出限界値

	精製水	海水
試料濃度(μg/l)	0.05	0.05
応答値(X)	0.036	0.037
標準偏差(dR)	0.0014	0.0046
検出限界(μg/l)	0.0049	0.016

(注7)

シリカ系の充填剤では、少なくとも 0.5μg/m/l 以下の濃度であればジンクピリチオンとカッパーピリチオンは同一と見なせる検量線が得られる。この濃度以上では、ジンクピリチオンの検量線の傾きが、カッパー ピリチオンに比べて低下する可能性があり、定量上限値を 0.5μg/lとした(参考1)。

(注8)

測定を妨害したり、バックグラウンドレベルを上昇させたりする成分を含まないもの。

(注9)

ガラス器具の洗浄は分析結果の精度に大きく影響する。これは、ガラス器具の表面に付着および露出している金属原子、あるいは試料溶液中の溶存金属イオンにジンクピリチオンのピリチオンが配位するためと想定され、このような過程は濃縮操作で起こる。この反応を抑えるために、分析操作に用いる全てのガラス器具から予め金属を除く必要がある。洗浄、乾燥および保管、ガラス器具に関する留意点を以下に示す。

ガラス器具の洗浄と乾燥

全てのガラス器具は、洗剤で洗浄し、十分に水洗した後一昼夜以上濃硝酸槽に浸漬して、ガラス表面の金属を溶解させる。使用前は、水道水、精製水、アセトン、ヘキサンの順に洗浄後、乾燥する。乾燥は風乾で行い、ドライヤーや乾燥機は用いない。ドライヤーで乾燥すると、鉄やニッケルがガラス表面に付着し、著しい回収率の低下につながる。また、乾燥機のオーブン内は金属粒子の浮遊があるので乾燥機の使用は避ける。

風乾時のガラス器具の入れ物はプラスチック製とし、埃の付着を防ぐためにろ紙やガーゼ等で覆いをする。覆いにはアルミホイル等の金属素材は使わない。

ガラス器具の保管

埃等の付着を防ぐために、ガラス器具は風乾後直ちにポリ袋に入れて保管する。しかし、ガラス器具は使用前に濃硝酸槽から取り出し、水洗、溶媒洗浄、風乾して、分析操作に用いる。

ガラス器具の質

ガラス器具表面の露出金属も回収率や精度低下の原因となるので、パイレックス製で、かつ使用履歴が明確なものを用いる。

(注10)

ガラス器具の取り扱いとともに、LC/MS の測定条件の設定も重要である。 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の高濃度は別として、LC 導入ではジンクピリチオンはカッパーピリチオンとなって検出される。このメカニズムは明確となっていないが、一般的なカラム本体やフリットの素材であるステンレス、充填剤基材のシリカ、精製水、移動相溶媒にプロトンドナーとして添加する酢酸アンモニウム等に含まれる不純物としての Cu が移動相中に溶出し、ジンクピリチオンのピリチオン分子が配位するためと考えられる。低濃度域であれば、ジンクピリチオンからカッパーピリチオンへ変化は意図的な操作がなくとも定量的に進行する。その一方で、充填剤の素材や状態によっては、定量域が狭まったり、全く検出できなかったりすることもあり、事前の確認と条件の最適化が不可欠である。以下に基本的な留意点をまとめる。

検量線の確認

LC カラムや移動相溶媒によって Cu の含有量が異なることが想定されるので、予めジンクピリチオンとカッパーピリチオンで検量線を作成し、両者の一致度と定量域を確認する必要がある。分離性能が同等以上であれば、ポリマー系の充填剤も使用できるが、Cu の溶出量の低下で定量域が狭まる可能性がある。

カラムの洗浄

とくにカラムの接続直後では、鉄ピリチオンやニッケルピリチオンの質量に近接した $m/z 308\sim313$ に強いピークが出現して、カッパーピリチオンが全く検出できないことがある。この場合は、期待されるカッパーピリチオンのマススペクトルが得られるまで、イソプロピアコールでカラムを洗浄するか、別のカラムに取替え、マススペクトルを確認する。洗浄は一晩から 1 日程度を要する。

流路の洗浄

カッパーピリチオンの擬分子イオンである水素とナトリウム付加ピークの比率が流路の汚れの目安となる。汚れるに従って、ナトリウム付加ピークの強度が増加し、ベースピークとなることがある。この場合も、ナトリウム付加がプロトン付加ピークの $1/5\sim1/10$ 程度になるまで流路をイソプロピルアルコールで洗浄することが望ましい。さらに汚れが進むと、感度が極端に低下したり、検出できなくなる。この際は、インターフェイス部の分解洗浄が必要となる。

イオン検出

LC/MS はインターフェイスの構造や制御方式より感度などに機種間差が大きい。本法では、ESI の陽イオン検出を一例として示したが、装置によっては APCI で最高感度が得られる場合もある。したがって、測定条件の最適化にあっては選択できる全ての機能について検討する。

(注 11)

電界噴霧-エレクトロスプレーイオン化法(ESI: Electrospray Ionization)または大気圧化学イオン化法(APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)の大気圧イオン化法(API: Atmospheric Pressure Ionization)の機能をもつもの。

表 装置検出限界の算出(HP1100 Series LC/MSD)

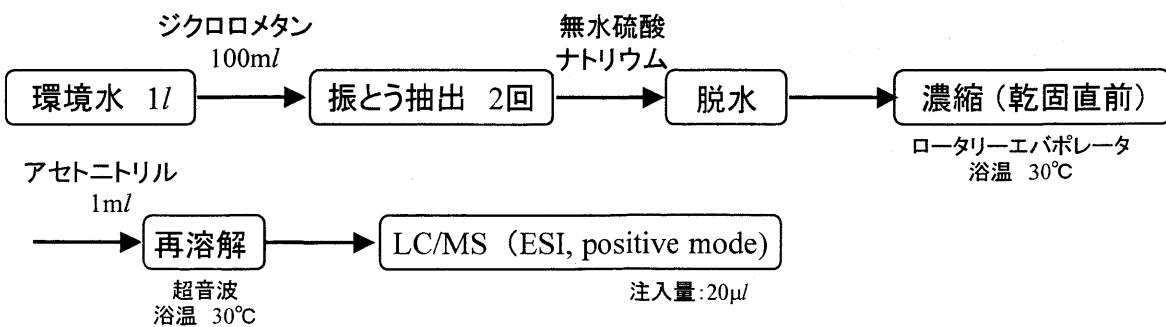
試料量(μl)	1
最終液量 (ml)	1
注入量濃度(ng/ml)	50
装置注入容量(μl)	20
結果 1	51.2
結果 2	51.5
結果 3	51.2
結果 4	48.6
結果 5	50.7
結果 6	48.6
結果 7	50.7
標準偏差	1.23
I D L (ng)	0.048
IDL 試料濃度換算 (ng/l)	2.40
S/N	9.30
S/N 適否	○
平均(ng)	50.4
RSD%	2.5

§ 2 解説

[分析法]

[フローチャート]

ジンクピリチオノンは LC カラムを通過する間にカッパーピリチオノンに変化するので、MS ではカッパーピリチオノンとして検出する。したがって、試料液中にカッパーピリチオノンが共存すれば、ジンクピリチオノンとカッパーピリチオノンの合量となる。



[分析法の検討]

1. 検量線

ジンクピリチオンとカッパーピリチオンの $0.01\mu\text{g}/\text{ml} \sim 5\mu\text{g}/\text{ml}$ アセトニトリル溶液 $20\mu\text{l}$ を LC/MS に注入して得られた検量線を図1に比較した。左図のように、ジンクピリチオンはカッパーピリチオンに比べて明らかに直線領域が狭い。しかし、 $0 \sim 0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度域においてはほぼ等しい検量線で表現できる(右図)。ジンクピリチオンは、右図が確認できる条件で測定し、定量は直線性が得られる範囲内に限定され、検量線濃度の上限が定量上限値に相当する。

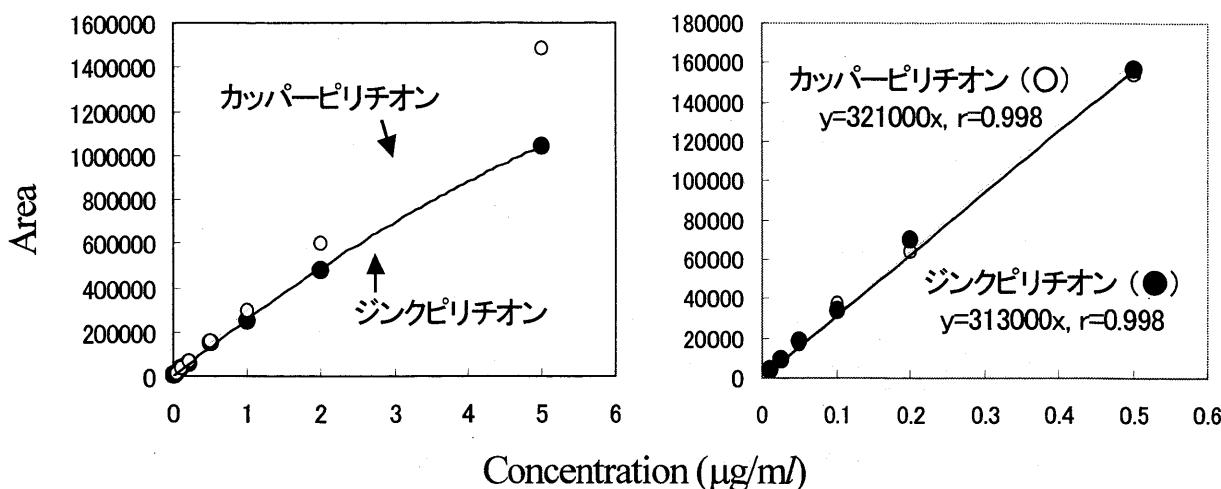


図1 ジンクピリチオンとカッパーピリチオンの検量線の比較

2. 回収率と定量下限値

1L の精製水と海水（大阪港表層海水）にジンクピリチオンの $50\mu\text{g}/\text{l}$ アセトニトリル溶液を 1ml 添加し混合して、 $0.05\mu\text{g}/\text{l}$ の試験溶液を調製した。この試験溶液にジクロロメタンを加え、振とう抽出して、脱水、濃縮の操作を辿り、LC/MS 測定して回収率を求めた。

ジンクピリチオンの回収率は、精製水で $73 \sim 79\%$ 、海水で $50 \sim 90\%$ の範囲にあり、海水で若干変動が大きかったが、 70% 程度の回収率が期待できる。

表 低濃度添加回収実験

試料	試料量 (l)	添加量 (μg)	測定回数	回収率 (%)	変動係数 (%)
精製水	1	0.05	7	72	2.8
海水	1	0.05	7	74	9.2

3. マススペクトル

カッパーピリチオンの LC/MS (ESI-Positive モード) スペクトルは、プロトン付加の擬分子イオン (m/z 316) とナトリウム付加の擬分子イオン (m/z 338) の同位体クラスターで構成され、プロトン付加がベースピークをなす(図2)。しかし、プロトンとナトリウム付加の擬分子イオンの相対強度は、LC/MS 装置内の流路系に付着するナトリウム量によって変化し、場合によってはナトリウム付加の擬分子イオンがベースピークとなる可能性もある。したがって、事前の LC/MS 操作条件の最適化が不可欠であり、両者の相対強度が $5:1 \sim 10:1$ になるよう設定する。

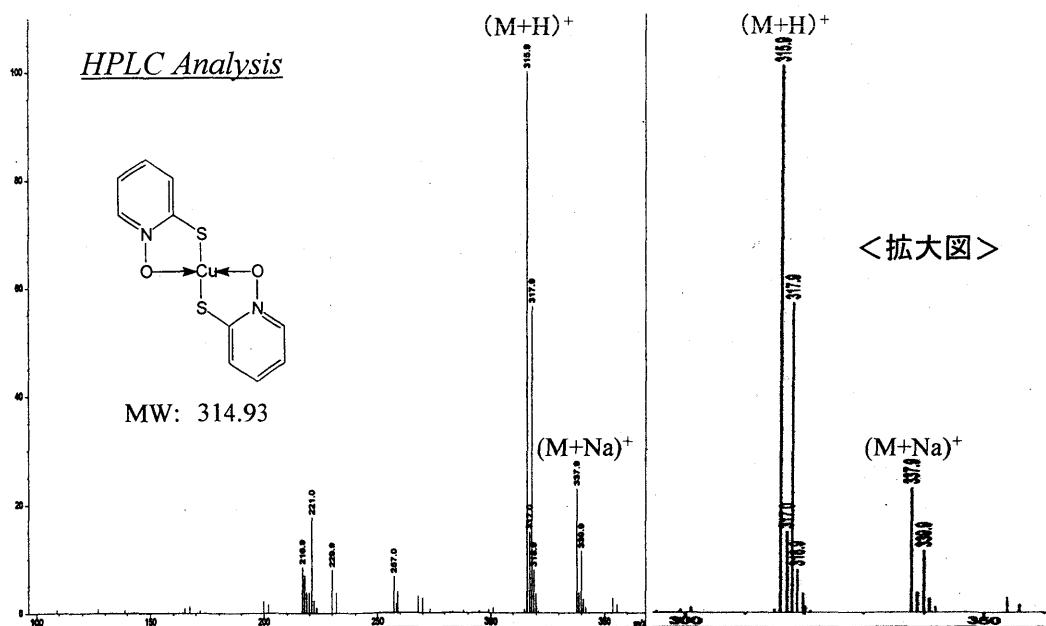


図2 カッパーピリチオニンの LC/MS スペクトル (ESI-Positive)

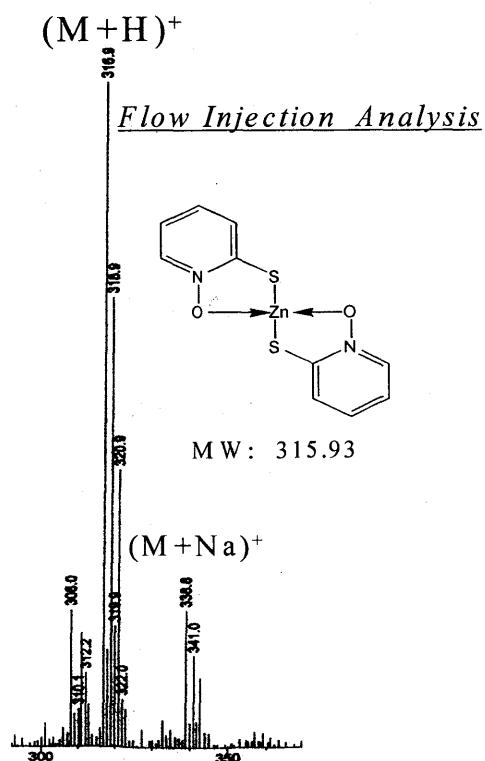
参考として、ジンクピリチオニンのマススペクトルを図3に示す。ジンクピリチオニンとしての検出はフローインジェクション分析(FIA)でのみ可能であった。カッパーピリチオニンと同様に、ジンクピリチオニンもプロトンとナトリウム付加の擬分子イオンで構成されるスペクトルを描いた。しかし、フラグメンテーションはカッパーピリチオニンに比べてさらに測定条件に左右される。また、ジンクピリチオニンの分子内のZnは他の重金属元素と置換し易く、図中にみられるm/z 308～312のクラスターイオンは、質量的にはニッケルや鉄ピリチオニンに相当する。

ジンクピリチオニンのLC注入において、上記のイオンピークがベースに検出される場合は、カッパーピリチオニンの感度が極端に低いか、全く検出されない状態となるので、LCカラムのイソプロピルアルコールによる洗浄で対処する。

図3 ジンクピリチオニンの LC/MS スペクトル(ESI-Positive)

4. LC/MS 機種によるマススペクトルの違い

前節に示したジンクピリチオニンおよびカッパーピリチオニンのマススペクトルは本法作成に用いたHP1100 Series LC/MSDで得られたものである。他のLC/MS機種を用いると異なったマススペクトルが得られることがある。Finnigan AQAを用いた際に得られたフローインジェクションによるジンクピリチオニンのマススペクトルを図4に示す。ここで見られる271のピークはピリチオニン配位子の半分が解離し、アセト



ニトリル二分子が配位した錯体に起因すると考えられ、また 358 のピークはジンクピリチオノンにアセトニトリルが付加したイオンであると考えられる。これらのピークは標準溶液をメタノール溶液にし、移動相を水/メタノール溶液にすることにより、全く観測されなくなり、ジンクピリチオノンのプロトン付加体、メタノール付加体のピーク 348 が見られるのみとなる。なおメタノール付加体のピークは本法で用いた LC/MS では観測されなかった。カッパーピリチオノンについてもフローインジェクションによるマススペクトルを測定したところ、ジンクピリチオノンと同様の挙動が見られた。この機種の場合は移動相に水/メタノール系を用い、モニターイオンを 316 とすることで本法と同様の検出限界を得ることができた。

このようにジンクピリチオノンのマススペクトルは LC/MS 機種によりスペクトルパターンの挙動が変化することがあるので、留意が必要である。

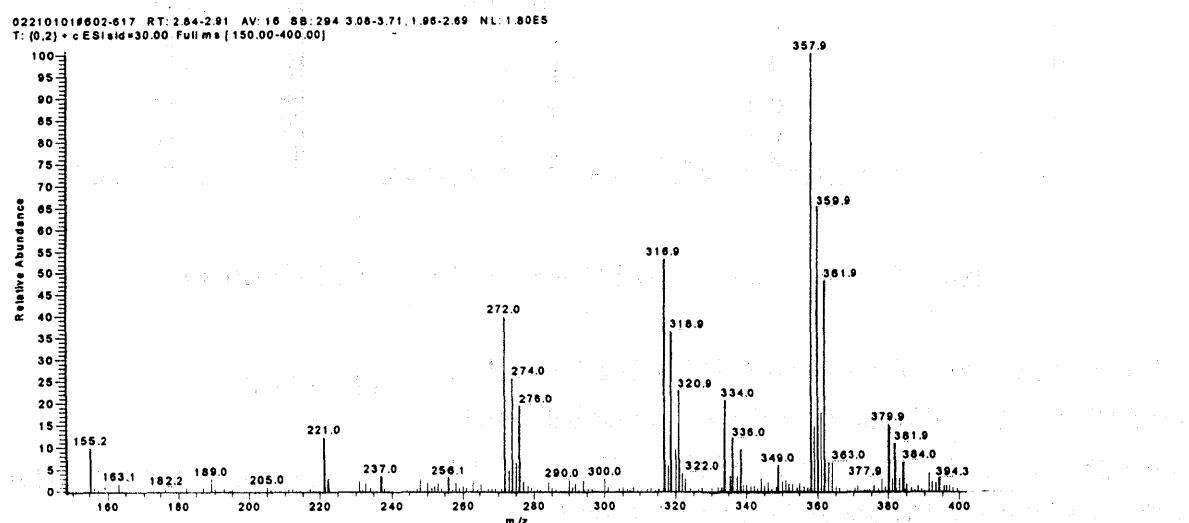


図 4 Finnigan AQA によるジンクピリチオノンのマススペクトル

5. 実試料における定量妨害成分

保持時間がカッパーピリチオノンに近接して溶出し、定量の妨げとなる成分の存在が大阪港表層海水から確認された（図 5a）。この分離に関して、移動相溶媒をグラディエント分析の最初の展開溶媒（20% 2mM 酢酸アンモニウム+80% アセトニトリル）を 10 分間保持することで若干の改善が見られた（図 5b）。

6.HPLC カラムの選択

使用するカラムは ODS や疎水性ポリマー基材の充てん剤など有機物質との相互作用が大きいカラムではピーク形状が不良で、満足な分離が行えない。現状では、C4 カラムを用いるのが適当であるが、移動相溶媒をメタノールに変えることで C18 カラムの利用が可能とのアプリケーションがある。

7. 光分解性

ジンクピリチオノンを 500μg/l、25μg/l の濃度に調製した精製水と海水（標準海水、塩分 3.5%）をビーカーに入れ、直射日光をあてて濃度の減衰挙動をみた。結果は図 6 の通りであり、精製水中のジンクピリチオノンの分解速度は海水に比べて若干速く、半減期で 10~20 分、海水では 25~30 分であった。対照の遮光条件では濃度の低下はなかった。

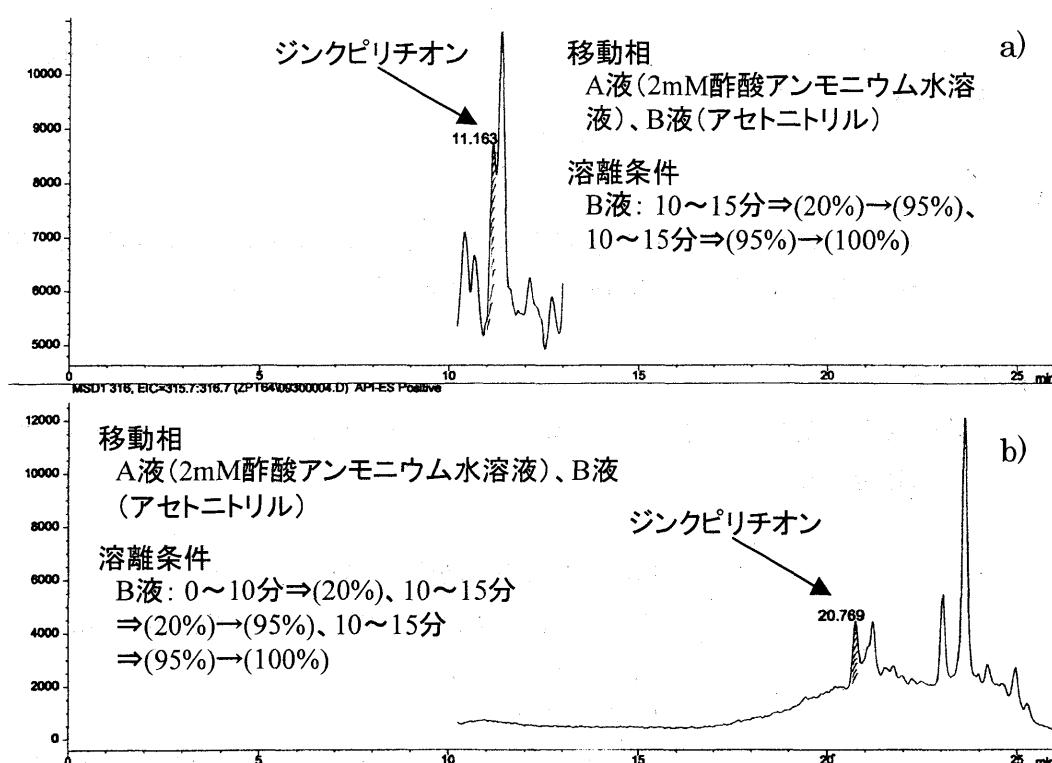


図 5 実試料分析で出現した定量妨害物質の LC における挙動

- a) 本法で示した移動相条件で得られたマスクロマトグラフ
 b) 最初の展開溶媒を 10 分間保持させた移動相条件で得られたマスクロマトグラフ

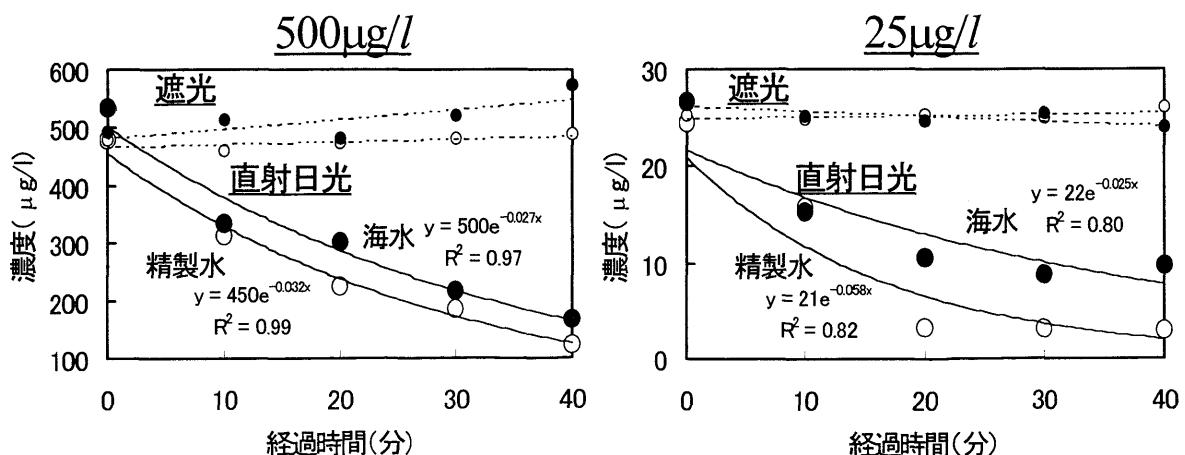


図 6 精製水および海水中におけるジンクピリチオンの光分解性

[環境試料分析]

海水(大阪港)について分析を行ったところ、ジンクピリチオンおよびカッパーピリチオンは検出されなかった。

[評価]

本法を用いて水質試料中に存在するジンクピリチオンおよびカッパーピリチオンの含量として $\mu\text{g}/\text{l}$ レベルの測定が可能である。

参考文献

銅オマダイン :平成 10 年度化学物質分析法開発調査報告書 環境庁環境保健部保健調査室(1998)

日本ウォーターズ :ZMD 搭載アライアンス LC/MS システムによる環境と食品関係の分析例

分析法試料送付方法

試料水は 1L 容褐色試料瓶に満水を採る。試料瓶は採取後、直ちにクーラーボックスに収納し、その日のうちに冷蔵送付する。

担当 : 大阪市立環境科学研究所

住所 : 〒547-0027 大阪市天王寺区東上町 8-34

電話 : 06-6771-3199

FAX : 06-6772-0676

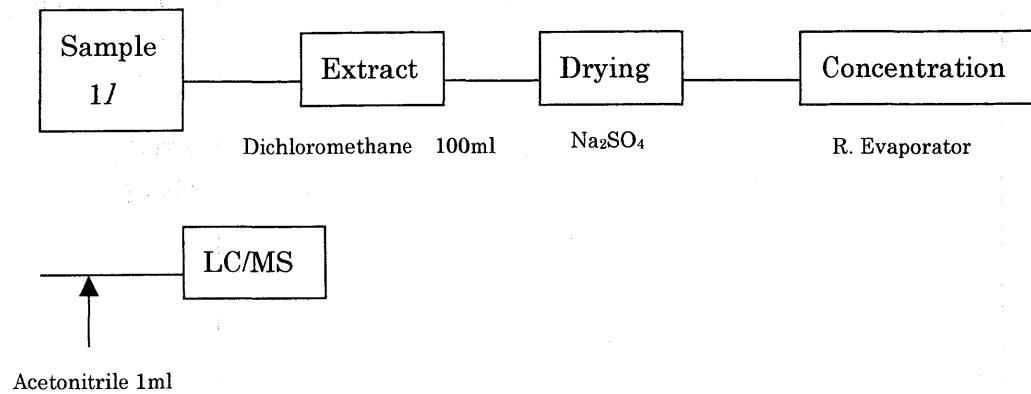
担当者 : 森脇 洋、張野宏也、山口之彦、福島 実

物質名	分析法フローチャート	備考
ジンクピリ チオン カッパーピ リチオン	<p>ジクロロメタン 100mL</p> <p>環境水 1L → 振とう抽出 2回 → 脱水 → 濃縮(乾固直前) 無水硫酸ナトリウム ロータリーエンボリータ 浴温 30°C</p> <p>アセトニトリル 1mL</p> <p>再溶解 → LC/MS (ESI, positive mode) 注入量: 20μL 超音波 浴温 30°C</p>	<p>L C / M S (SIM)</p> <p>カラム: C 4 カラム長: 15 cm カラム内径: 4.6mm 流速: 0.5ml/min</p> <p>検出限界 ジンクピリチオ ン とカッパーピリ チオンの含量と して</p> <p>水試料 0.02μg/L</p>

Zinc pyrithione and copper pyrithione

Abstract

A water sample is extracted with dichloromethane. The extract is dried with anhydrous sodium sulfate, and concentrated to dryness. The concentrate is solved in acetonitrile (1ml), and the solution is injected into LC/MS.



測定機関名	大阪市立環境科学研究所		
住所及び 電話番号	〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34 Tel 06-6771-3199 Fax 06-6772-0676		
測定者	森脇 洋	測定年月日	1999/9/29
物質名 (英語)	ジンクピリチオニン(zinc pyrithione)		
<HPLC>	機種:HP1100 Series カラム: C4 シリカ系充填剤 (InertsilC4 (4.6×150mm, 5μm, GL Science)) 移動相: A 液(2mM 酢酸アンモニウム水溶液)、B 液(HPLC 用アセトニトリル) 溶離条件: 0~10 分⇒B 液(20%)→(95%)、10~15 分⇒B 液(95%)→(100%) 流速: 0.5ml/分 カラム温度: 40°C 注入量: 20μl		
<MS>	機種:HP1100Sereies MSD マスレンジ(m/z): 100~400 イオン化法: Electrospray 陽イオン検出モード フラグメントー電圧: 50V ネブライザー: N ₂ (60psi) ドライングガス: N ₂ (12l /分、350 °C) モニターイオン(m/z): 316(定量用)、318(確認用)		

注入液濃度 0.05μg/ml, 装置注入量 20μl

結果

	濃度(μg/ml)
測定 1	51.2
測定 2	51.5
測定 3	51.2
測定 4	48.6
測定 5	50.7
測定 6	48.6
測定 7	50.7
標準偏差	1.23
IDL(ng)	0.048
IDL 試料濃度 (ng/l)	2.40
S/N	9.3
S/N 適否	○
平均(ng)	50.4
CV(%)	2.5