

平成 20～24 年度 調査研究の概要

課題名	【2】有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究
担当科名	環境科学部 水質科

研究概要	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 残留性・蓄積性の高い有機化合物について、環境中の挙動を調査する。 ➤ 多成分を高感度に測定することができる分析機器（ガスクロマトグラフ質量分析計及び液体クロマトグラフ質量分析計等）を活用し、分析方法が確立されていない化学物質を効率的に分析できる方法の開発を行う。 ➤ 水質事故等の危機管理分析に対応できる技術力を保持する。 							
研究成果	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた分析に関する主な研究成果 <ul style="list-style-type: none"> ◇ 使用量の多い殺虫剤や殺菌剤、除草剤について、8種類の同時分析が可能となった。 ◇ 魚毒性が強く難分解性物質（ポリ-<i>tert</i>-ブチルフェノール類）の分析が可能となった。 ➤ ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた分析に関する主な研究成果 <ul style="list-style-type: none"> ◇ 過去、県内の事業所において事故により漏洩した物質（炭酸ジメチル）の除染方法を確認することができた。 ◇ 口蹄疫の防疫用薬剤として使用されるグルタルアルデヒド等の迅速一斉分析法を検討し、口蹄疫の発生に備えた。 							
今後の課題	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 引き続き水質環境実態調査を実施し、公共用水域において検出される農薬等の濃度レベルの把握を行う必要がある。 ➤ 排出量が多い化学物質や有機フッ素化合物等が検出された地点の周辺において、追跡調査を実施する必要がある。 ➤ 水質事故時の原因究明がより迅速かつ的確に実施できるよう、分析項目のさらなる拡充など体制の整備が必要である。 							
実施内容	実施内容	年度	H20	H21	H22	H23	H24	
	分析法開発		—————					
	汚染実態調査		—————					
	計画事業費		6,711	5,935	5,766	5,465	5,078	単位： 千円
	一般財源		1,562	781	768	751	744	
	外部資金等		5,149	5,154	4,998	4,714	4,334	
人件費		5,600	5,600	5,600	5,600	5,600		
総事業コスト		12,311	11,535	11,366	11,065	10,678		

センター年報掲載	H20	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －LC/MS/MSを用いたトリメリット酸トリオクチルの分析法－
	H20	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －ヘッドスペース GC/MS法による炭酸ジメチルの分析と水中における分解性について－
	H20	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －岡山県の河川における農薬類の環境実態調査－
	H20	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －固相ディスク法による水質中オクタクロロスチレンの分析法－
	H20	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －LC/MS/MSを用いた水質中L-チロシンの分析法－

調査研究概要【有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究】

センター 年報掲載	H21	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －LC/MS/MS を用いた水中の農薬他成分同時分析法の検討－	
	H21	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －GC/MS を用いた水質中トルイジンとメチルナフタレンの同時分析法の検討－	
	H22	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －岡山県の公共用水域における有機フッ素化合物の環境実態調査－	
	H22	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －GC/MS を用いた水質中多環芳香族炭化水素 (PAH) の多成分分析法の検討－	
	H22	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －排出が多い化学物質の水質実態調査－	
	H23	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －GC/MS を用いた水質中フタル酸エステル (PAE) の多成分分析法の検討－	
	H23	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －LC/MS/MS を用いた生物中農薬の分析法の検討－	
	H23	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －LC/MS/MS を用いた水質中ポリ <i>tert</i> -ブチルフェノール類の同時分析法の検討－	
	H23	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 －多環芳香族炭化水素(PAH)類の水質環境実態調査－	
	H24	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 (投稿中) －GC/MS を用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAMES) 等の多成分分析法の検討－	
	H24	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 (投稿中) －LC/MS/MS を用いた 4-メチルベンジリデンカンファーの分析法の検討－	
	H24	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 (投稿中) －LC/MS/MS を用いた水質中マラカイトグリーン分析－	
	学会発表	H20	GC/MS による底質中の農薬類分析法の検討
H20		LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究	第 17 回環境化学討論会
H20		LC/MS/MS を用いた陽イオン界面活性剤の分析	第 11 回日本水環境学会シンポジウム
H20		LC/MS による化学物質分析法の基礎的検討 － L-チロキシンの分析法 －	平成 21 年度 保健所検査業務研究発表会
H21		ヘッドスペース GC/MS 法による炭酸ジメチルの分析と水中における分解性について	第 36 回環境保全・公害防止研究発表会
H21		オクタクロロスチレン (水質) の分析法	平成 21 年度 化学物質環境実態調査環境化学セミナー
H22		水質中農薬類の一斉分析	第 19 回環境化学討論会
H22		o-トルイジン, 1-メチルナフタレン, 2-メチルナフタレン (水質) の分析	平成 22 年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー
H22		L-チロキシン及び 3,3',5-トリヨード-L-チロニン (L-チロキシンの代謝物) (水質) の分析	平成 22 年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー
H22		1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル (水質) の分析法	平成 22 年度 化学物質環境実態調査環境科学セミナー
H22	有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発	平成 22 年度保健所検査業務研究発表会	

調査研究概要【有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究】

学会発表	H23	多量排出化学物質の水環境実態調査	第 14 回日本水環境学会シンポジウム
	H23	岡山県の河川及び海域の有機フッ素化合物の環境実態調査	第 20 回環境化学討論会
	H23	LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究	第 20 回環境化学討論会
	H23	フルオランテン（水質）の分析法	平成 23 年度「化学物質環境実態調査環境化学セミナー
	H23	オキサミル，フルフェノクスロン，フルアジナム（水質）の一斉分析法	平成 23 年度「化学物質環境実態調査環境化学セミナー
	H24	LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究	第 21 回環境化学討論会
	H24	水質試料中ポリ <i>tert</i> -ブチルフェノール類の同時分析	第 21 回環境化学討論会
	H24	GC/MS を用いた水質中のフタル酸エステル類の分析について	平成 24 年度「化学物質環境実態調査環境化学セミナー
	H24	LC/MS/MS を用いた水質中の 2,4-ジ- <i>tert</i> -ブチルフェノールの分析について	平成 24 年度「化学物質環境実態調査環境化学セミナー
H24	LC/MS/MS を用いた生物中のフルフェノクスロン，フルアジナムの分析について	平成 24 年度「化学物質環境実態調査環境化学セミナー	

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—GC/MS を用いた水質中フタル酸エステル（PAE）の多成分分析法の検討—

吉岡敏行，山辺真一，坂口浩範，大月史彦（水質科）

要 旨

フタル酸エステル 10 種類について水質分析法を検討した。前処理方法は、メスフラスコを用いたヘキサンスターラー攪拌抽出法と分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法を比較検討した。また、ブランクの管理手法を検討し、ブランク値がほとんど検出されない分析方法が確立できた。検討の結果、分析法の検出下限値は 0.0013～0.040 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限値は 0.0034～0.10 $\mu\text{g/L}$ となり、従来の分析法に比べてばらつきの少ない高感度分析方法が確立できた。

1 はじめに

本県では、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等を目的に、毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法の開発や、環境中の濃度の把握に努めている。今回、平成 23 年度化学物質環境実態調査と連携して、フタル酸ブチルベンジル及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)等のフタル酸エステル 10 種類の水質分析法について検討した。

フタル酸エステルは、その有害性から食品衛生法では特に、玩具や器具及び容器包装で規制がされている。環境基本法では水質汚濁に係る環境基準の要監視項目としてフタル酸ジエチルヘキシルの指針値が 0.06 mg/L と規定され、また、その測定方法として、共栓付き試験管を用いたヘキササン抽出法で GC/MS 又は GC/ECD 等を用いて測定する方法が規定されている。一方、環境省の化学物質環境実態調査では、フタル酸ブチルベンジルがメスフラスコを用いたヘキササン抽出法により GC/MS を用いて測定する方法がある。また、JIS K0450-30-10 では、工業用水・工場排水中のフタル酸エステル類の試験法として 8 種類の同様の測定法がある。このようにさまざまな公定法が規定されているが、フタル酸エステルはプラスチック製品の可塑剤等として身近に多量に使用されており、特に、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)やフタル酸ジ-*n*-ブチルは実験環境や試薬・器具類等からの汚染により、操作ブランク値が検出されることが多く、一定にコントロールすることは比較的困難であった。そのため、できるだけシンプルで操作ブランクの混入が少ない分析法を採用しているが、基本的には検出された操作ブランク値を差し引いて定量すること等から変動係数が比較的高く、検出下限も比較的高い等の問題点がある。

今回、試薬、器具、操作手順等を再確認したところ、汚染経路が明確となり、操作ブランク値をできるだけ低減するように汚染対策を行い、操作ブランク値がほとんど検出されず、検出下限も従来の分析法よりかなり低い分析方法を確立することができたので報告する。

2 検討結果及び考察

2.1 GC/MS 測定条件の検討結果

対象物質の GC カラムでの分離状況を図 1 と図 2 に示す。フタル酸エステルの測定では、一般的に、無極性から微極性の GC カラムが使用されるが、HP-1MS と DB-5MS (Agilent J&W) を比較したところ、DB-5MS ではフタル酸ジ-*n*-ヘプチルとフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)のピークが分離しなかったため、今回は HP-1MS を用いて検討を行った。

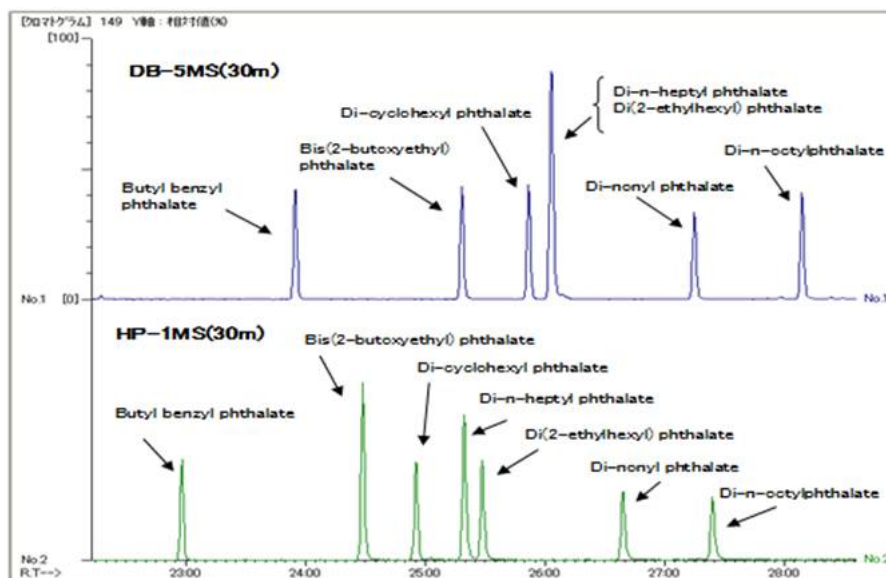


図 1 GC カラムの比較

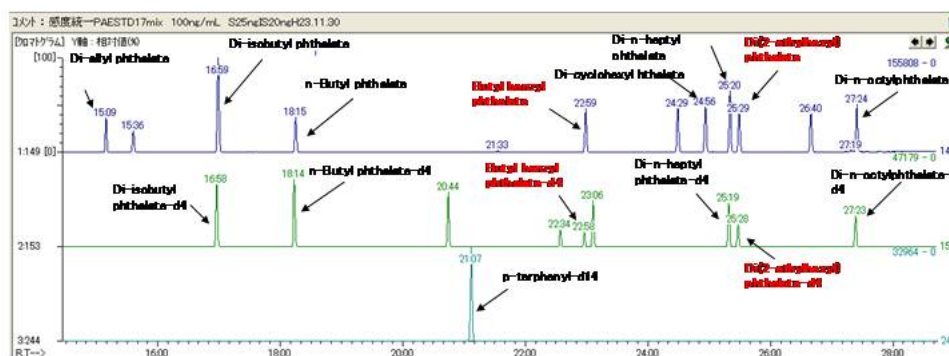
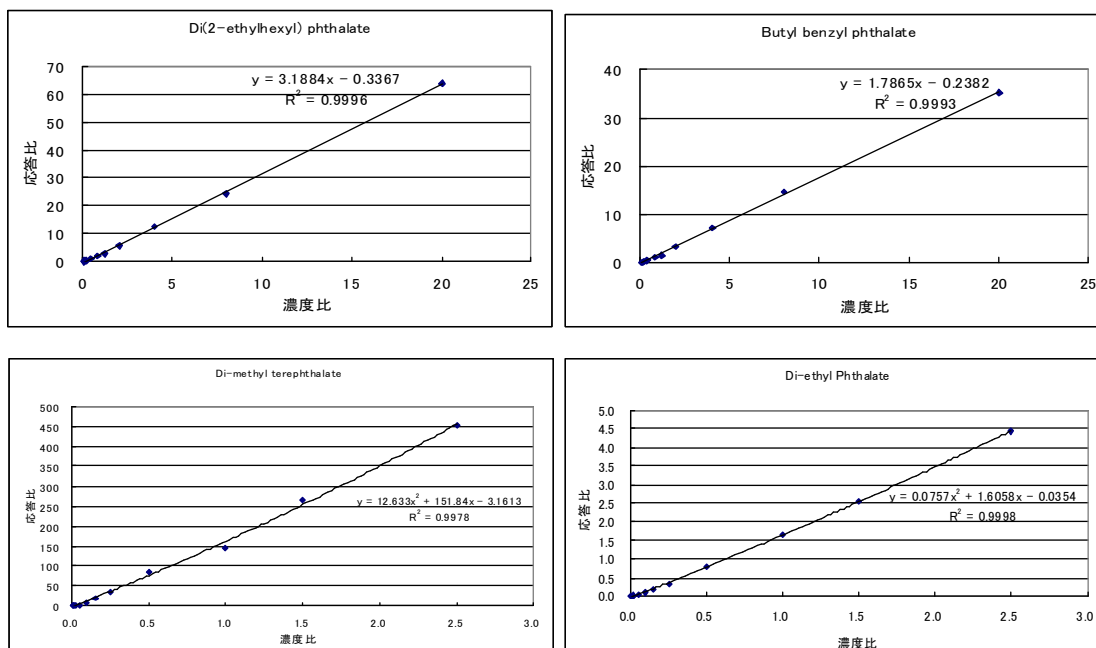


図 2 標準物質のクロマトグラム

フタル酸エステルの検量線を図 3 に示す。物質により最低濃度は 0.05~2.0ng/mL の幅があり、感度は大きく異なっていた。また、一部の物質では検量線は直線ではなく、二次曲線で相関が高かったが、今回検討に使用した分析装置の特徴と思われる。



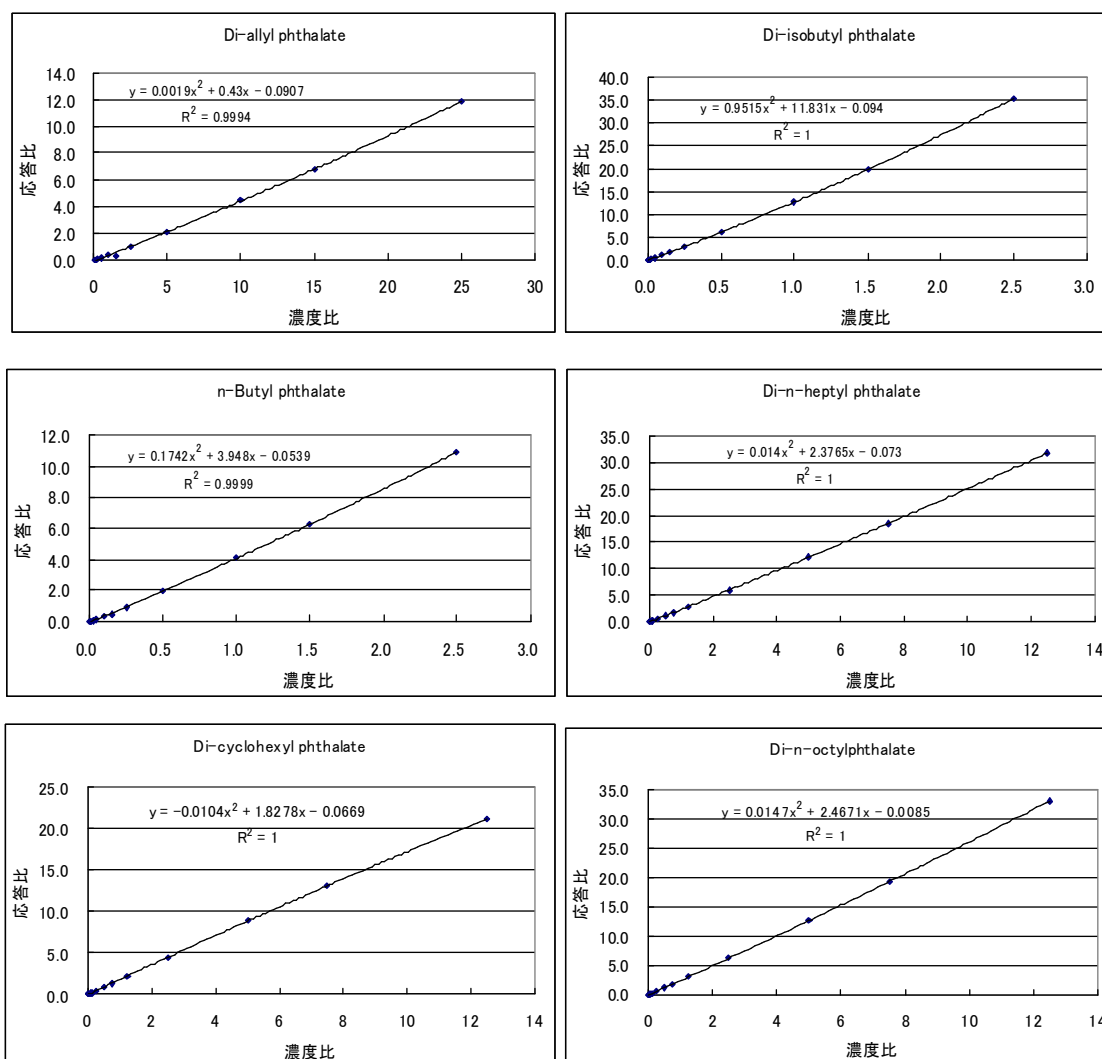


図 3 検量線

2.2 汚染源の検討結果

試薬類は、フタル酸エステル分析用の規格品が販売されているが、必ず、事前にブランクの有無をチェックして使用した。しかし、一度、開封して実験室内に放置すると、実験室の環境によっては室内空気から汚染されることがあることから、念のため使用の都度、新しい溶媒を使用した。なお、当センターの微量化学物質分析棟(建設後約 10 年経過)は、外気の導入及び室内空気の排気は活性炭フィルターやヘパフィルター等でろ過しているため、実験室内の空気が非常に清浄であり、溶媒を開封して約 1 ヶ月放置したものでほとんどフタル酸エステルの汚染は無かった。

塩化ナトリウムや無水硫酸ナトリウムはフタル酸エステル用のものであっても、使用前には加熱処理し、清浄な環境で放冷したものを使用した。しかし、長期間保存すると、室内空気から再度汚染される可能性があるため、基本的には塩析も脱水も行わない分析法とすることが望ましい。

器具類の洗浄等に使用する水は超純水を用い、また、操作ブランクに使用する水は超純水を活性炭 (EDS-Pak) 処理した後、必要に応じて、さらに、ヘキサン洗浄した。

加熱処理できるガラス器具類は、溶媒 (アセトンとヘキサン) 洗浄後、乾燥させ、250℃で 3 時間程度加熱処理した後、放冷し、できるだけ早めに使用することによりブランクを低く管理することができた。

分析操作で汚染を受ける可能性が考えられたのは、駒込ピペットのゴム球と操作を行う人の手指が考えられた。素手で分析を行うと、極微量のフタル酸エステルが検出されることがあり、ブランクを一定にコントロールすることは非常に困難であった。今回、試薬やガラス器具等のブランク管理を十分行った状態で、分析操作時に手袋をしなくて低濃度試料を分析したときのフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)のばらつきを図 4 に示す。操作ブランクである超純水にも 0.010 $\mu\text{g/L}$ 程度検出され、変動係数も 15%を超過し、測定結果は比較的ばらついていた。実際の河川試料の変動係数は、試料水の濃度が高くなるほど小さくなる傾向があり、0.025 $\mu\text{g/L}$ 程度であれば変動係数が 10%を下回り、安定した測定値が得られた。

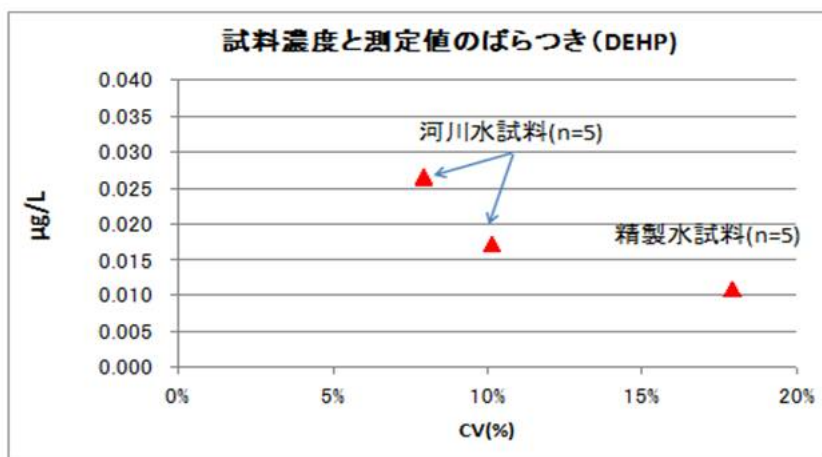


図 4 フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) 濃度による測定値のばらつき

その原因を確認するために、手指にヘキサンを 1mL 滴下して GC/MS で分析したところ、図 5 に示すとおり、非常に高濃度のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)が検出され、分析工程での最大の汚染源は分析者の手指である可能性が示唆された。そのためフタル酸エステル類の分析を行う際には、試料採取から分析操作のすべての工程において、素手でガラス器具等を取り扱えないと判断した。次に、手指からの汚染を避けるために手袋の汚染状況を手指と同様の方法で確認したところ、ニトリル手袋にはフタル酸エステルはほとんど検出されなかったことから、分析のすべての工程でニトリル手袋を着用することとした。その結果、操作ブランクはほとんど検出されなくなった。操作ブランクのクロマトグラムを図 6 に示す。

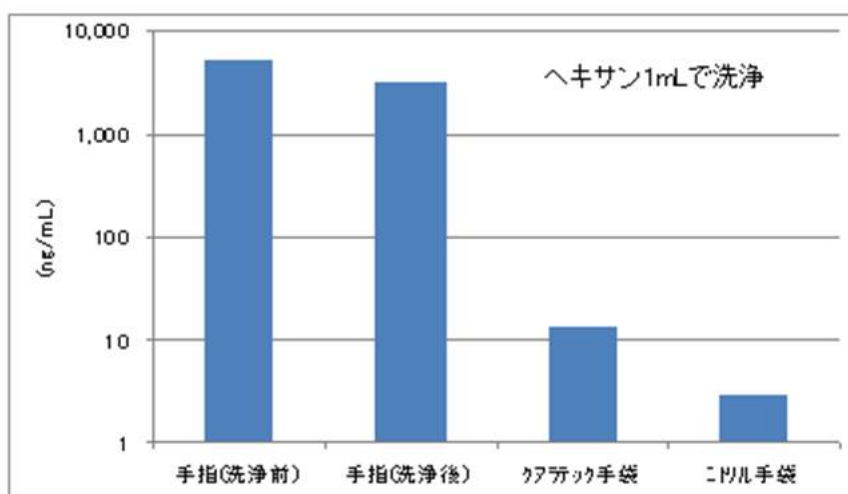


図 5 フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) の汚染状況

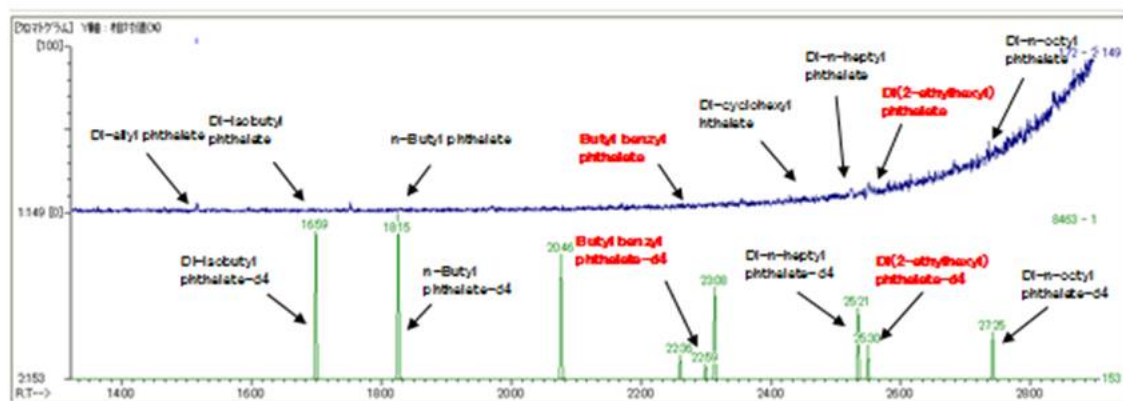


図 6 操作ブランクのクロマトグラム

また、フタル酸エステルの分析では、GC/MS 測定時にブランクピークが検出される場合³⁾もあるが、今回の検討時には装置由来のブランクピークはまったく検出されなかった。当センターでは、日常的に比較的清浄な試料と汚染の程度が著しい試料では分析装置の使用を目的により使い分けていることや、ピークのテーリング等が生じた場合には、頻繁に注入口周辺の洗浄と部品の交換を実施し、装置のメンテナンスを十分に行っているため装置由来のブランクが検出されなかったものと考えられた。

2.3 抽出方法及びクリーンアップの検討結果

メスフラスコを用いたヘキサンスターラー攪拌抽出法と分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法の添加回収試験結果を図 7 と図 8 に示す。ヘキサンスターラー攪拌抽出法では、比較的分子量が小さく水溶性の高いテレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチルの回収率は 40% 未満と低かった。また、フタル酸ジアリルの回収率も 60% 程度であり、スターラー攪拌が十分でないと抽出率が低くなる傾向が見られた。また、今回の検討では塩析を行わなかったことから、河川水の回収率は海水の回収率に比べて若干低い傾向が見られた。ジクロロメタン振とう抽出法では、分液ロートを加熱処理しなかったことや塩化ナトリウムと無水硫酸ナトリウムの添加や、ロータリーエバポレーターの使用等の操作工程が増加したことにより、フタル酸ジ-n-ブチルやフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)等の汚染をコントロールできず、回収率が 100% を大きく超過した。

2 種類の抽出方法を検討した結果、操作ブランクが懸念される物質でヘキサンによる抽出率に問題のないフタル酸エステルは、ヘキサンスターラー攪拌抽出法が適用できると考えられた。一方、ヘキサン抽出率が悪いが、操作ブランクが検出されないフタル酸エステルは、ジクロロメタン振とう抽出法が適用できると考えられた。

シリカゲルカートリッジカラム (Supelclean LC-Si 1g) の溶出パターンを図 9 に示す。アセトン及びヘキサンで洗浄したカートリッジカラムに標準物質(d 体)を 10ng 添加し、溶出液を順次、流したところ、5%アセトン/ヘキサン 5mL の画分に溶出した。しかしながら、試料 95mL を 2mL ヘキサンで抽出することから濃縮倍率が低く、妨害物質がない限りは、汚染の原因となる可能性があるクリーンアップ操作も省略するほうが望ましいと考えられた。なお、カートリッジカラムは、ガラス製であっても使用しているテフロンフリットから妨害物質が溶出することがあるため、あらかじめアセトンで洗浄した後、再度、ヘキサンで十分置換してから使用する必要があった。

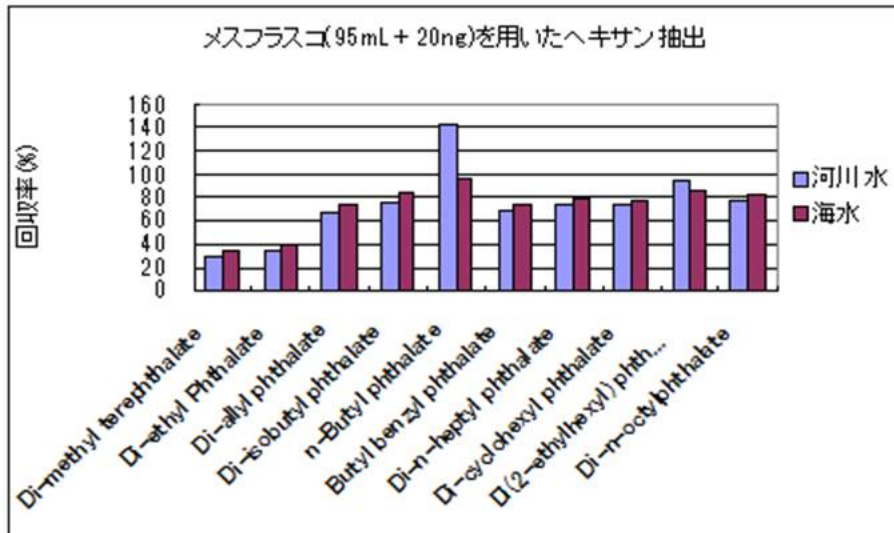


図 7 ヘキサンスターラー攪拌抽出法の回収率

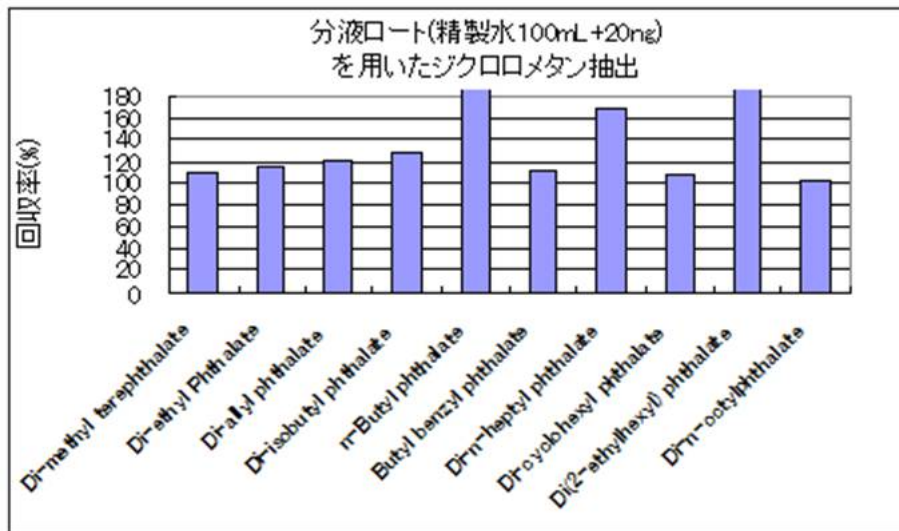


図 8 ジクロロメタン振とう抽出法の回収率

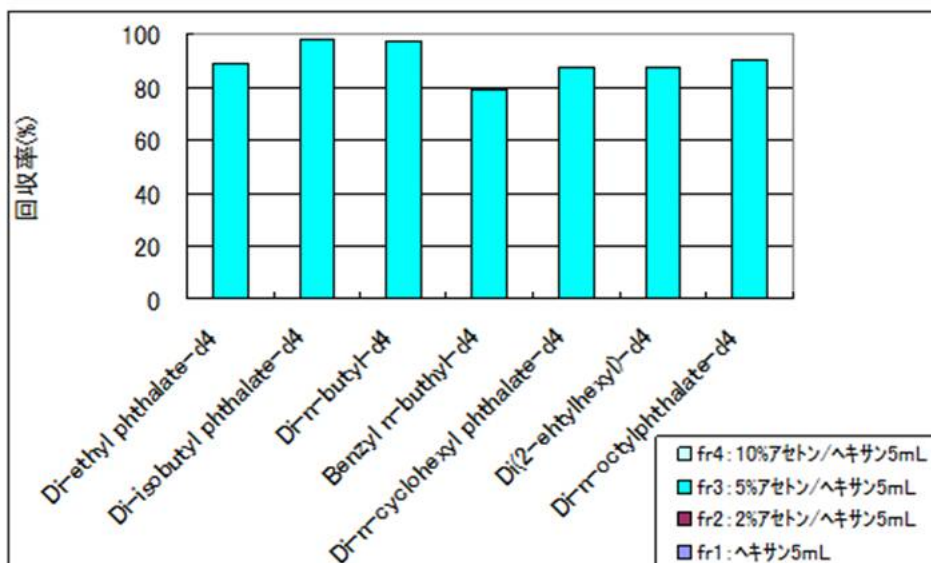


図 9 シリカゲルカートリッジカラムの溶出パターン

2.4 分解性スクリーニング試験及び保存性試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表 1 に示す。7 日後程度であれば、いずれのフタル酸エステルも分解はほとんど認められなかった。

保存性試験結果を表 2 に示す。1 ヶ月経過した後、フタル酸ジアリルを除いて残存率は 70% 以上であった。フタル酸ジアリルの残存率が低くなった原因は、ヘキサンスターラー攪拌抽出法を行う際、攪拌が不十分で、抽出率が低下した可能性が考えられた。

また、標準物質を添加しない超純水だけの保存性試験結果を図 10 に示す。14 日後までは目だった操作ブランクは見られなかったが、1 ヶ月経過した際の精製水からはフタル酸ジエチルやフタル酸ジアリル、フタル酸ジ-*n*-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)が検出され、冷蔵庫に保存中に汚染された可能性が考えられた。したがって、分解する可能性は少ないが、保存中に汚染を受ける可能性があることを考慮すれば、試料採取後は数日中には分析するのが望ましいと考えられた。

表 1 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	1時間後の 残存率(%)	7日後の残存率(%)	
			暗所	明所
Di-allyl phthalate	pH5	88	90	104
	pH7	89	79	98
	pH9	97	83	76
Di-isobutyl phthalate	pH5	88	90	105
	pH7	90	80	99
	pH9	99	86	78
n-Butyl phthalate	pH5	104	99	112
	pH7	106	70	109
	pH9	116	104	97
Butyl benzyl phthalate	pH5	93	88	97
	pH7	96	71	95
	pH9	84	76	87
Di-n-heptyl phthalate	pH5	83	88	97
	pH7	95	53	98
	pH9	94	105	106
Di-cyclohexyl phthalate	pH5	87	86	101
	pH7	97	60	97
	pH9	102	108	109
Di(2-ethylhexyl) phthalate	pH5	90	89	106
	pH7	103	61	87
	pH9	98	90	104
Di-n-octylphthalate	pH5	79	75	94
	pH7	85	54	74
	pH9	89	72	84

初期濃度0.42µg/L

表 2 保存性試験結果

	試料	1時間後	1日後	3日後	6日後	14日後	1ヶ月後
Di-allyl phthalate	河川水	66	68	60	58	55	54
	海水	75	72	75	70	61	58
Di-isobutyl phthalate	河川水	74	79	81	79	81	91
	海水	83	71	89	84	81	93
n-Butyl phthalate	河川水	101	87	85	81	87	94
	海水	96	77	100	95	87	98
Butyl benzyl phthalate	河川水	73	71	74	74	73	77
	海水	75	77	85	83	77	90
Di-n-heptyl phthalate	河川水	73	76	81	82	79	54
	海水	80	65	87	86	81	89
Di-cyclohexyl phthalate	河川水	70	74	77	79	81	97
	海水	79	63	88	85	82	93
Di(2-ethylhexyl) phthalate	河川水	93	86	93	90	92	112
	海水	87	92	93	94	85	97
Di-n-octylphthalate	河川水	76	76	84	84	80	74
	海水	81	80	88	89	82	89

初期濃度0.21µg/L

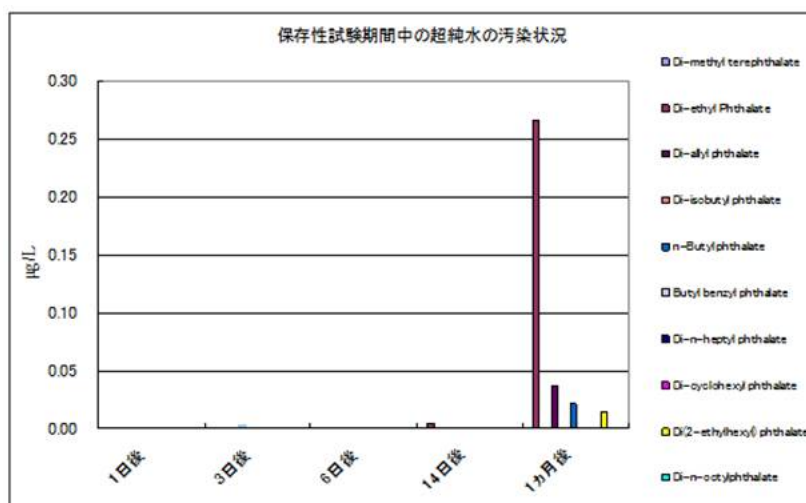


図 10 保存性試験期間中の超純水の汚染状況

2.5 IDL 及び分析法の MDL と MQL

IDL 及び MDL, MQL を表 3 に示す。IDL は 0.00023~0.013µg/L , MDL は 0.0013~0.040µg/L, MQL は 0.0034~0.10µg/L であり, 徹底したブランク管理と分析操作の簡略化により従来の分析方法に比べてかなり定量下限値を下げる事ができた。

表 3 IDL 及び MDL, MQL

	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL (µg/L)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
Di-methyl terephthalate*	100	1.00	0.00052	0.0013	0.0034
Di-ethyl phthalate*	100	1.00	0.00023	0.0016	0.0040
Butyl benzyl phthalate	95	2.00	0.013	0.033	0.085
Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	2.00	0.0076	0.014	0.035
Di-allyl phthalate	95	2.00	0.011	0.040	0.10
Di-isobutyl phthalate	95	2.00	0.00048	0.0051	0.013
n-Butyl phthalate	95	2.00	0.00057	0.0045	0.012
Di-n-heptyl phthalate	95	2.00	0.0042	0.026	0.067
Di-cyclohexyl phthalate	95	2.00	0.0036	0.024	0.063
Di-n-octyl phthalate	95	2.00	0.0024	0.028	0.073

*: 分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法

2.6 添加回収試験

添加回収試験結果を表 4 に示す。回収率は 62~111%と比較的良好な結果であった。サロゲートの回収率も 69~90%であり, 特に問題は無かった。

表 4 添加回収試験結果

試料	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	検対数	検出濃度 (µg/L)	回収率 (%)	サロゲート 回収率
河川水	Butyl benzyl phthalate	95	40	6	0.45	107	88
	Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	40	6	0.48	108	90
	Di-allyl phthalate	95	10	6	0.065	62	-
	Di-isobutyl phthalate	95	1	6	0.0082	78	84
	n-Butyl phthalate	95	1	6	0.0081	77	86
	Di-n-heptyl phthalate	95	5	6	0.043	83	78
	Di-cyclohexyl phthalate	95	5	6	0.043	81	75
	Di-n-octylphthalate	95	5	6	0.050	95	69
海水	Butyl benzyl phthalate	95	40	6	0.47	111	85
	Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	40	6	0.49	111	85

3 まとめ

フタル酸ブチルベンジル及びフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）を含むフタル酸エステル 10 種の水質分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) フタル酸エステルを分析する際の最大の汚染源は分析者の手指であることが確認された。汚染の少ないニトリル手袋を使用することにより、前処理工程で汚染されることが多いフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）等の操作ブランクが検出されない分析方法が確立できた。
- 2) テレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチル以外の 8 種類のフタル酸エステルは、ブランクを管理するため、使用するガラス器具はメスフラスコとパスツールピペットだけで、塩析も行わず、サロゲートと抽出溶媒のヘキサンを添加し、回転子によりスターラー攪拌して抽出する非常にシンプルな分析方法とした。
- 3) 汚染の少ないテレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチルは、ヘキサンスターラー攪拌抽出法では抽出率が悪く、分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法が適用できた。
- 4) 徹底したブランク管理と操作法の簡略化により、MDL は $0.0013 \sim 0.040 \mu\text{g/L}$ 、MQL は $0.0034 \sim 0.10 \mu\text{g/L}$ となり、従来の分析方法に比べてかなり定量下限値を下げる事ができた。

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MS を用いた水質中ポリ-*tert*-ブチルフェノール類の同時分析法の検討—

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 劔持堅志 (水質科)

要 旨

環境試料（水質中）のポリ-*tert*-ブチルフェノール類 4 種の多成分同時分析法について検討した。分析法はヘキサンで抽出後、アセトニトリルに転溶し LC/MS/MS(SRM 法)で測定する方法とした。各種溶媒、バイアルセプタム等に対象物質が含まれており、これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。開発した分析法では、要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。環境試料を分析したところ、いずれの物質も検出されなかった。

1 はじめに

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールは、魚毒性が強く、また難分解性有害化学物質のおそれも想定されている物質であるが、環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、本県に分析法の開発が委託されたことから、当該物質を含め 4 種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について、当該調査と連携して、LC/MS/MS を用いて同時分析する方法を検討するとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 結果及び考察

2.1 各種条件の検討結果

2.1.1 移動相溶媒と質量分析条件の検討

移動相溶媒と質量分析条件の検討を行った結果を表 1 に示す。100ng/mL の 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの標準溶液を用いて確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、SRM で二重にフィルターをかける形の 205>205 の質量数の分析で、最も良好な S/N 比が得られ、これを条件とした。また、205>189 の質量数は対象物質からフェノールの酸素原子が外れるという、物質の構造を示す特有のピークと言え、確認イオンとして最適であると考えられた。

表 1 各条件における 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの S/N 比（各最適条件化済み）

移動相溶媒	定量方法	SIM		SRM
	モニターイオン	205	205>189	205>205
	アセトニトリル	200	130	830
	メタノール	100	85	520

は本開発での条件。

2.1.2 HPLC 条件の検討

HPLC 条件の検討を行った結果を表 2 と図 2 に示す。移動相溶媒、溶出モードを変更して各物質の分離状況と 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのブランクを確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、溶出モードをアイソクラティックとすることで、良好な分離とブランクが得られた。グラジエントでブランクのピークが検出されるのは、3. 1. 3 の検討結果から、移動相溶媒中の不純物等に由来するものと考えられた。

表 2 HPLC 条件の検討結果（各物質の分離状況）

	溶出モード	グラジエント	アイソクラティック
移動相溶媒	アセトニトリル	Blank で検出, 分離良好	Blank で未検出, 分離良好
	メタノール	Blank で検出, 分離良好	Blank で未検出, 分離不良

は本開発での条件。

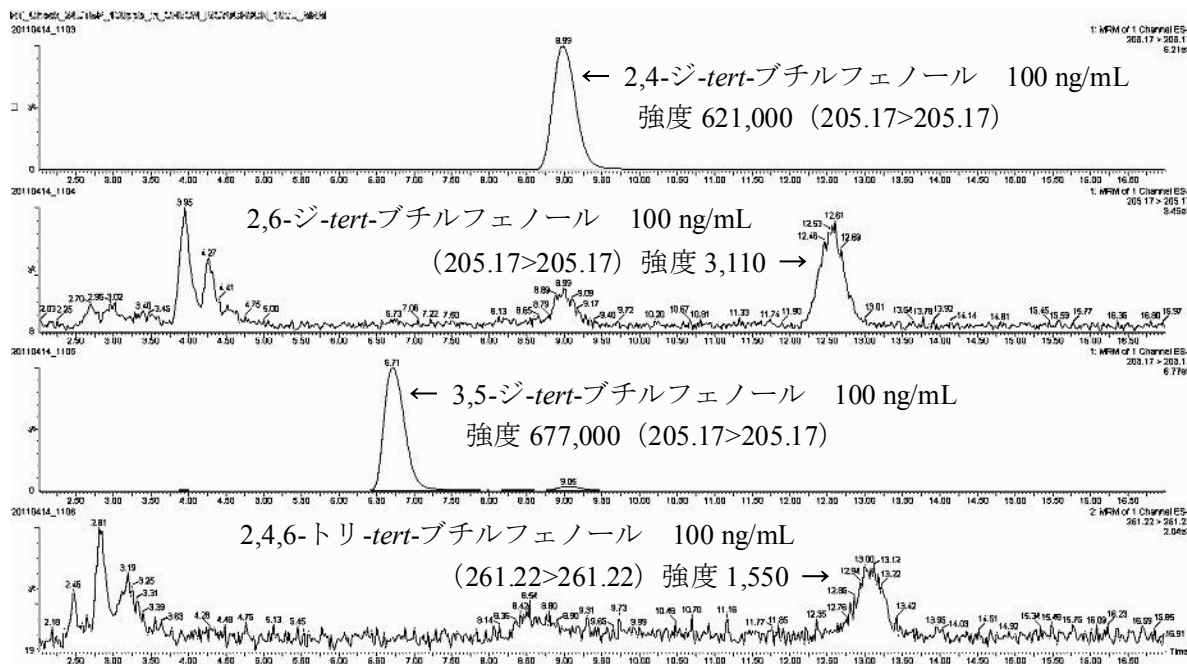


図 2 各物質の分離状況と強度

2.1.3 ブランクの検討

各種の実験時に、2,4-ジ-tert-ブチルフェノールがブランクで検出されたため、ブランクについての検討を実施した。当該物質は酸化防止剤の中間体として、幅広いところで用いられていることから、様々な場所からの汚染が想定された。

装置に標準溶液を繰り返し注入すると値が上昇したため、バイアルの蓋からの汚染を確認したところ、セプタムから汚染が起こっていることがわかった。テフロン製のセプタムを使用することにより、対処できた。結果を表 3 と図 3, 4 に示す。

表 3 バイアル蓋（セプタム）からの検出状況 (ng/mL)

	A 社 赤色	A 社 青色	A 社 緑色	W 社 赤色	W 社 青色	W 社 緑色	W 社 白色	S 社 黒色	S 社 テフロン 1	S 社 テフロン 2
24DTBP	25.5	19.1	36.4	25.1	32.7	21.8	40.5	12.0	ND	ND
26DTBP	10.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
246DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

セプタムを4つに切り、5mLのアセトニトリルで3.5時間振とう抽出した上澄みを測定。

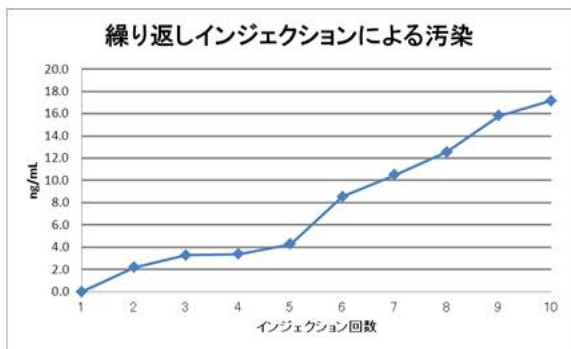


図 3 繰り返しによる汚染(W社白色蓋)

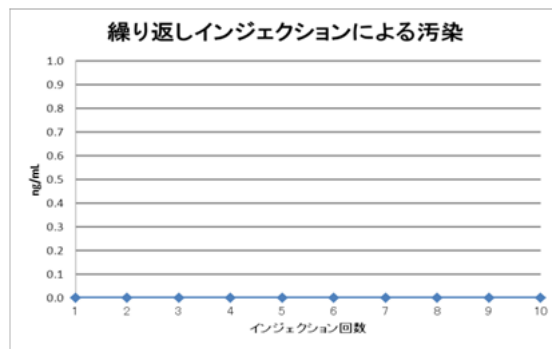


図 4 繰り返しによる汚染(S社7701)

また、グラジエント条件でブランクから検出されたことから、溶媒からの汚染が疑われたため、ガラスの器具を用いて、溶媒をエバポレーターで 100 倍濃縮し確認したところ、表 4 のとおり、すべての溶媒から 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが測定装置の検出限界と同程度のレベルで確認された。このため、前処理は抽出溶媒をあまり濃縮せず、かつ必要最小量を用いることとした。

表 4 溶媒からの検出状況 (ng/mL)

	W 社	W 社	W 社	W 社	W 社	W 社	K 社	K 社	W 社	W 社
	LC/MS	LC/MS	5000	テラム	LC/MS	5000	LC/MS	5000	5000	5000
	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ OH	CH ₃ OH	CH ₃ OH	CH ₃ OH	ヘキサン	アセトン
	Lot1	Lot2								
24DTBP	0.160	0.208	0.061	0.189	0.180	0.142	0.124	0.172	0.158	0.137
26DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
246DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

2.1.4 前処理法の検討

前処理法は、液液分配による方法と、固相抽出による方法を検討した。どちらの方法でも回収率は良好であったが、固相抽出は図 5 に示すようにブランクが大きく、またプラスチック製の大容量リザーバーがブランク対策で使用できないことから操作性が悪い等の問題点があったため、液液分配を採用した。

Sample17_4Mix_24_26_35_246TBP_in_CH3CN_IS070CH3CN_10uL_MRM_Check_Recovery_MilliQ_BL_0p

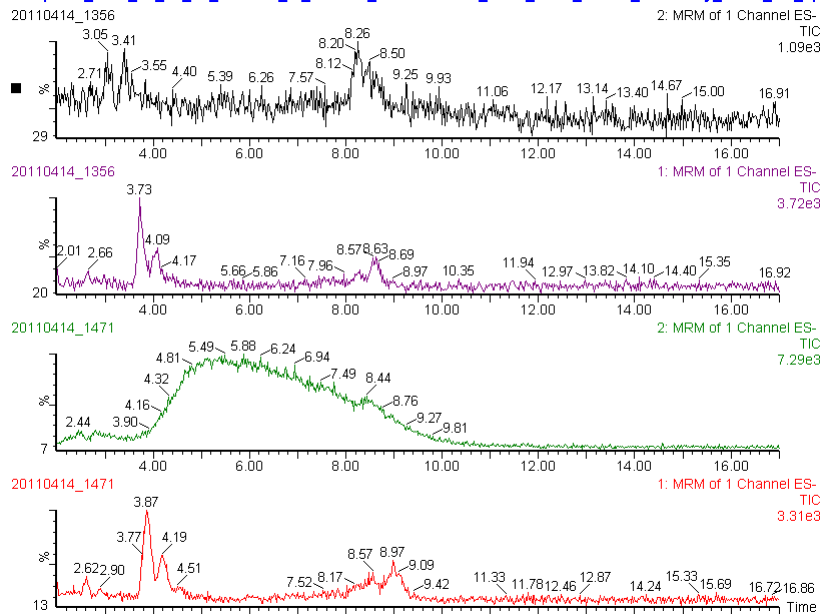


図 5 液液分配と固相抽出時のブランク比較用クロマトグラム

2.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表 5 に示す。添加回収試験には河川水は旭川水系の乙井手堰、海水は岡山県倉敷市水島沖の水質試料を使用した。河川水、海水ともに良好な添加回収試験結果が得られた。

表 5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験 数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	2,4-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	ブチルフェノール	100	5	7	46.8	94	10.0
	3,5-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	ブチルフェノール	100	5	7	45.7	92	5.5
海水	2,4-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	ブチルフェノール	100	50	3	479.5	96	2.0
	3,5-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	ブチルフェノール	100	50	3	487.8	98	2.7

※2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノールと 2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールは当装置では他に比べて感度が 1/100 以下と著しく悪かったため添加回収試験はせず。

2.3 分解性スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表 6 に示す。pH や光の有無によらず、著しい分解性は見られなかった。

表 6 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)	7 日後の残存率(%)	
					明所	暗所
2,4-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	5	2	500	109	90	—
	7	2	500	100	88	95
	9	2	500	98	86	—
3,5-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	5	2	500	105	95	—
	7	2	500	100	98	97
	9	2	500	98	92	—

※7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

2.4 保存性試験結果

保存性試験結果を表 7 に示す。保存性は良好であった。

表 7 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
			1 週間後	9 週間後	13 週間後
2,4-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	試料 (河川水)	0.2	101	—	—
	標準溶液	1	—	—	98
		2	—	106	—
		100	—	101	99
3,5-ジ- <i>tert</i> - ブチルフェノール	試料 (河川水)	0.2	100	—	—
	標準溶液	1	—	—	97
		2	—	101	—
		100	—	100	97

2.5 環境試料の分析結果

平成 23 年 10 月に採取した河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）からは、対象物質は検出されなかった。定量下限は 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが 46.6 ng/L, 3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールが 25.1 ng/L であった。

3 まとめ

4 種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について、多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールと 3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールは高感度測定が可能であったが、2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノールと 2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールは当装置では感度が著しく悪かったため、分離はできるものの他と同濃度レベルでの定量は困難と考えられた。
- 2) 移動相溶媒にアセトニトリル、定量方法に SRM を用いると、最も良好な S/N 比を得ることができた。
- 3) 各種溶媒、バイアルセプタム等に対象物質が含まれており、これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。
- 4) 液液分配と固相抽出による前処理方法を検討し、いずれも回収率は良好であったが、ブランクと操作性の点から液液分配を採用した。
- 5) 添加回収試験結果は、河川水、海水ともに良好であった。
- 6) 分解性スクリーニング試験結果は、pH 条件や光の有無によらず、著しい分解性は見られなかった。
- 7) 保存性試験の結果、保存性は良好であった。
- 8) 河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）から、対象物質は検出されなかった。

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MS を用いた生物中農薬の分析法の検討—

大月史彦, 浦山豊弘, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 劔持堅志

要 旨

環境試料（生物中）の農薬 2 種の同時分析法について検討した。分析法は生物試料を有機溶媒で抽出後、リン酸緩衝液等で夾雑物を除去し、更にヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂したのち定容した。その一部を分取し、ENVI-Carb/LC-NH₂ のデュアルレイヤー固相カートリッジで精製し LC/MS/MS(SRM 法)で測定する方法とした。LC/MS の機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線の使用が必要であった。その場合検量線標準溶液の保存性に留意する等の注意が必要であったが、本分析法は要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。環境試料を分析したところ、いずれの物質も検出されなかった。

1 はじめに

フルフェノクスロン及びフルアジナムは、近年使用されている農薬であるが、環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、本県に分析法の開発が委託されたことから、当該調査と連携して当該物質を LC/MS/MS を用いて分析する方法を検討し、マトリックス効果等について知見を得るとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 結果及び考察

2.1 マトリックス効果の検討

フルフェノクスロンで見かけ上の回収率の低下が生じたため、マトリックス効果について各種の検討を実施した。

2.1.1 マトリックス効果の装置による違いの検討

マトリックス効果の装置による違いについて検討を行った結果を表 1 に示す。50%アセトニトリル溶液と、同組成のマトリックス含有溶液に標準物質を 1ng/mL の濃度で添加し、マトリックス効果を確認した。Micromass Quattro micro API ではカラム、移動相によらず著しいイオン化抑制が生じたが、AppliedAPI3200 ではイオン化抑制はほぼ起こらなかった。装置により、マトリックス効果が著しく異なる場合があるとの結果が得られた。

表 1 マトリックス効果の装置による違い (Matrix 有り / Matrix 無し の相対%)

装置	Micromass Quattro micro API		AppliedAPI3200	
	移動相	カラム	移動相	カラム
	0.35%ギ酸	Xterra	5mMCH ₃ COONH ₄	Xterra
フルフェノクスロン	38	51	50	47
フルアジナム	103	117	107	112

は本開発での条件。

※AppliedAPI3200は臨時に借りたため、回収率が良好なフルアジナムは測定せず。

2.1.2 マトリックス効果の標準濃度依存性の検討

マトリックス効果の標準濃度依存性について検討を行った結果を表 2 に示す。フルフェノクスロンは、濃度によらずイオン化抑制のマトリックス効果がほぼ一定であり、フルアジナムは、高濃度でマトリックス効果によりイオン化が増進されていることがわかった。

表 2 マトリックス効果の濃度依存性 (Matrix 有り / Matrix 無し の相対%)

濃度 ng/mL	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100
フルフェノクスロン	46	24	27	27	37	31	32	35	31	29	28	29	33
フルアジナム	56	68	81	83	94	98	98	103	103	115	123	154	196

2.1.3 マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性について検討を行った結果を表 3 に示す。添加濃度 1ng/mL でマトリックス液の希釈倍率依存性を確認した。マトリックスの希釈率が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、マトリックス液の希釈は不可であることがわかった。

表 3 マトリックス液希釈倍率依存性確認 (Matrix 有り / Matrix 無し の相対%)

希釈倍率	抽出液原液	2 倍希釈	5 倍希釈	10 倍希釈	マトリックス無し
フルフェノクスロン	40	51	70	77	100
フルアジナム	100	101	101	96	100

2.1.4 マトリックス効果のマトリックス種依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス種依存性について検討を行った結果を表 4 に示す。添加濃度 1ng/mL でマトリックス液のマトリックス種依存性を確認した。マトリックスの種類が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、分析対象に応じてマトリックス検量線を作る必要があることがわかった。

表 4 マトリックス液種類依存性確認 (Matrix 有り / Matrix 無し の相対%)

種類	ヒラメ	マス	コイ	サーモン	アサリ	鶏肉	ボラ
フルフェノクスロン	78	70	86	67	52	64	52
フルアジナム	112	111	109	111	112	116	113

2.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表 5 に示す。添加回収試験には水島沖において採取されたボラを使用した。フルフェノクスロン、フルアジナムともに良好な添加回収試験結果が得られた。

表 5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ボラ	フルフェノクスロン	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.284	95	6.8
	フルアジナム	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.213	71	9.5

2.3 保存性試験結果

保存性試験結果を表 6 に示す。また、マトリックス標準の各濃度における残存率を図 1, 2 に示す。

マトリックスの入っていない標準溶液の保存性は良好であるが、マトリックス標準は約二週間を超えると保存性が悪化する。粗抽出液による試験では、14 日の保存性は良好であるのも、この傾向と一致している。溶液を調整後、二週間以内での測定が必要であることがわかった。

表 6 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)				
			6 日	12 日	14 日	17 日	28 日
フルフェノクスロン	標準溶液	0.1	—	—	—	—	92
		50	—	—	—	—	99
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	111	128	—	65	0
		50	103	117	—	85	33
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	95	—
フルアジナム	標準溶液	0.1	—	—	—	—	89
		50	—	—	—	—	102
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	115	136	—	110	0
		50	106	138	—	107	23
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	93	—

※粗抽出液20mLに0.2ngの標準を添加した。添加した粗抽出液を0日、14日保存後、カラム以降の前処理を実施した。

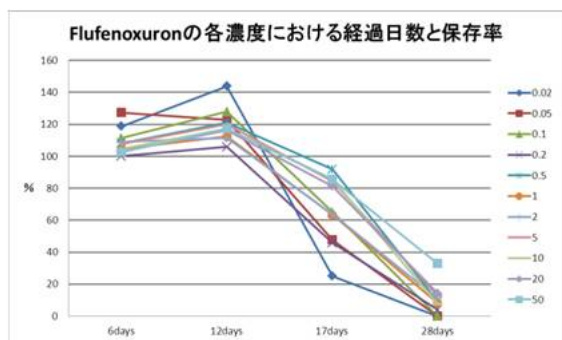


図 1 マトリックス標準の残存率(フルフェノクスロン)

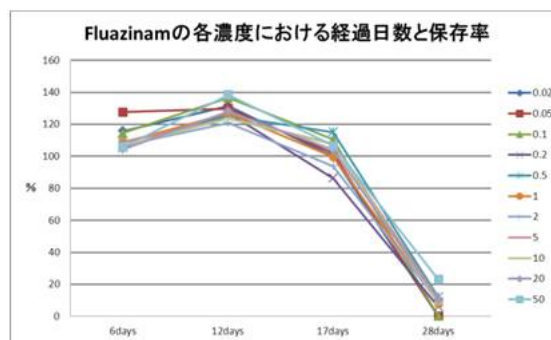


図 2 マトリックス標準の残存率(フルアジナム)

2.4 環境試料の分析結果

平成 23 年 8 月に採取した環境試料の生物 (水島沖のボラ)からは、対象物質は検出されなかった。定量下限はフルフェノクスロンが 0.025 ng/g-wet, フルアジナムが 0.032 ng/g-wet であった。

3 まとめ

生物中の農薬 2 種の同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) LC/MS の機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線等を用いる必要があった。
- 2) マトリックス効果の程度は、装置、標準濃度、マトリックスの種類及び濃度などで変化するため適切なマトリックス検量線を用いる等の注意が必要であった。
- 3) 添加回収試験結果は良好であった。
- 4) 保存性試験結果から、溶液を調整後、約 2 週間以内での測定が必要であることがわかった。
- 5) 環境試料の生物 (水島沖のボラ) から対象物質は検出されなかった。