

ガスクロマトグラフ質量分析計による水中の フタル酸エステル類の分析方法の検討 —サロゲート物質添加の必要性—

中西 成子, 日野 隆信

Necessity of Addition of the Surrogate Substance for Determination of
Phthalates in Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Shigeko NAKANISHI and Takanobu HINO

I はじめに

環境省が公表した環境ホルモン戦略計画SPEED'98で、内分泌攪乱作用を有する疑いがあるため優先的に調査研究を進めていく必要性が高いとされる65の化学物質群が掲げられており、その中にフタル酸エステル類8物質が含まれている¹⁾。環境省は水質、底質、水生生物中の内分泌攪乱化学物質測定のための暫定マニュアル²⁾を作成したが、水中のフタル酸エステル類の分析にあたっては、操作中に生じるコンタミネーションの影響が大きく³⁾¹⁵⁾、測定値の精度や定量下限値を確保することが難しいとされている³⁾。

著者らは、JIS規格制定に伴う原案作成のためのフタル酸エステル類の検討試験に参加し、水中のフタル酸エステル類を振とう溶媒抽出あるいは固相抽出カートリッジで濃縮し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で定量する分析方法を検討したが、固相抽出法では添加回収率の低いフタル酸エステル類が有り、十分な測定精度が得られなかった⁹⁾。

フタル酸エステル類の重水素化合物をサロゲート物質とし、その一定量を試料水に添加した後分析操作を行い、試料水中のフタル酸エステル類濃度は、サロゲート物質を内標準物質とする検量線から求める方法を適用することにより、フタル酸エステル類13物質の一斉分析法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 試薬及び器具

水はミリポア製Milli-Q Plus純水製造装置より得られた水を、ヘキサンとメタノールは関東化学製フタル酸エステル試験用を、アセトンと酢酸エチルは関東化学製残留農薬・PCB試験用(3,000倍濃縮検定品)を、イソオクタンは関東化学製高速液体クロマトグラフィー用を使用した。硫酸ナトリウム(無水)は和光純薬製PCB・フタル酸エステル試験用を、塩化ナトリウムは関東化学製特級を550℃で1晩加熱処理して使用した。

フタル酸エステル類13物質およびサロゲート物質9物質の標準原液として、1,000mg/Lのヘキサン溶液を各々調製した。内標準

物質のフェナントレン-*d*₁₀とフルオランテン-*d*₁₀の標準原液は1,000mg/Lのヘキサン溶液を、クリセン-*d*₁₃は1,000mg/Lのジクロロメタン溶液を各々調製した。検量線用の混合標準液は各標準原液を、振とう溶媒抽出法はヘキササンで、固相抽出法は酢酸エチルで希釈調製した。試料への添加用混合標準液はアセトンで希釈調製した。

振とう溶媒抽出法の抽出容器は柴田製容量100mLのSPC摺り栓付き全量フラスコ(短型)を、固相抽出カートリッジはバリアン製 C₁₈ Bond Elut Glass 500mg/6 ccを使用した。

ガラス器具類は洗剤洗浄後110℃で乾燥し、これを試験前日あるいは当日にアセトンで2回洗浄し、アセトンが揮散後、アルミホイルで覆って200℃の乾燥器中で2時間以上加熱処理したものを使用した。

2. 装置及びガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件

振とう器はタイテック製レシプロシェーカーSR-2Sを、固相抽出カートリッジへの通水はウォーターズ製Sep-Pakコンセントレータを、素空気流下での溶離液の濃縮にはザイマーク製ターボバンプLVを使用した。

GC/MS装置はアジレント製HP5890 (Series II)-HP5972A型を使用し、測定条件は以下の通りである。

キャリアガス：ヘリウムを定流量で1 mL/min

カラム：A社製100%ジメチルポリシロキサン結合キャピラリーカラムおよびS社製不活性化処理100%ジメチルポリシロキサン結合キャピラリーカラム(いずれも内径0.25 mm 長さ30m 膜厚0.25μm)

カラム温度：70℃(2min)→25℃/min→170℃→7℃/min→280℃(15min)

注入口温度：250℃

インターフェース温度：280℃

イオン化法：EI

試料注入条件：試料2 μLをスプリットレスで1分間

3. 定量操作

1) 振とう溶媒抽出法

あらかじめ塩化ナトリウム15gを入れた全量フラスコに試料水95mLを採り、これにサロゲート物質0.1μgを添加し、混和後30分間程度静置する。ヘキサン2.5mLを加え、振とう器で200回/分、水平方向に10分間振とう抽出する。全量フラスコを振とう器からはずし数回転倒混和し、再度200回/分で水平方向に10分間振とう抽出後、30分間以上静置する³⁾。ヘキサン層の分離が十分な場合は、パスツールピペットでヘキサン層を容量5mLの共栓試験管

に分取し、窒素気流下で濃縮後、ヘキサンで全量を1 mLにする。これに内標準物質0.1 μgを添加し、硫酸ナトリウム0.2 gを加えて脱水する。

エマルジョンが多量に生成しヘキサン層の分離が困難な場合は、パスツールピペットでヘキサン層を容量10 mLの共栓付き遠心分離管に分取し、10℃、2,000rpmで10分間遠心分離後、別のパスツールピペットでヘキサン層を容量5 mLの共栓試験管に分取し、以後同様に操作する。

2) 固相抽出法

固相抽出カートリッジは、あらかじめ酢酸エチル5 mLで洗浄し、10秒間程度窒素を吹き付けて乾燥後、メタノール5 mLおよび水4 mLでコンディショニングする。試料水100 mLを容量100

mLの共栓メスシリンダーに採り、サロゲート物質0.1 μgを添加混和し静置後、通水速度10 mL/minでコンディショニング済みの固相抽出カートリッジに通水する。通水終了後、カートリッジに窒素を穏やかに吹き付けながら5分間程度吸引脱水し、容量5 mLの試験管を受器として酢酸エチル4 mLで溶出する。窒素気流下で濃縮後、酢酸エチルで全量を1 mLにする。これに内標準物質0.1 μgを添加し、硫酸ナトリウム0.2 gを加えて脱水する。

振とう溶媒抽出法、固相抽出法いずれも調製した試料2 μLをGC/MSに注入し、選択イオン検出法(SIM)で測定を行い、フタル酸エステル類を定量する。表1にフタル酸エステル類13物質、サロゲート物質9物質および内標準物質3物質のSIM測定条件を示した。

表1 フタル酸エステル類のSIM測定条件

No.	検討対象化合物名	略名	R.time (min)	定量イオン	確認イオン
1	Dimethyl phthalate	DMP	7.53	163	194
2	Sur.1 Diethyl phthalate- <i>d</i> ₄	DEP- <i>d</i> ₄	8.67	153	
3	◎ Diethyl phthalate	DEP	8.68	149	177
4	Sur.2 Dipropyl phthalate- <i>d</i> ₄	DPP- <i>d</i> ₄	10.44	153	
5	◎ Dipropyl phthalate	DPP	10.45	149	209
6	Int.1 Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀		10.69	188	
7	Di-iso-butyl phthalate	D-isoBP	11.51	149	223
8	Sur.3 Di-n-butyl phthalate- <i>d</i> ₄	DBP- <i>d</i> ₄	12.53	153	
9	◎ Di-n-butyl phthalate	DBP	12.55	149	223
10	Int.2 Fluoranthene- <i>d</i> ₁₀		13.81	212	
11	Sur.4 Dipentyl phthalate- <i>d</i> ₄	DPeP- <i>d</i> ₄	14.77	153	
12	◎ Dipentyl phthalate	DPeP	14.79	149	237
13	Sur.5 Butylbenzyl phthalate- <i>d</i> ₄	BBzP- <i>d</i> ₄	16.89	153	
14	◎ Butylbenzyl phthalate	BBzP	16.91	149	206
15	Sur.6 Dihexyl phthalate- <i>d</i> ₄	DHP- <i>d</i> ₄	17.00	153	
16	◎ Dihexyl phthalate	DHP	17.02	149	251
17	Int.3 Chrysene- <i>d</i> ₁₂		18.20	240	
18	Sur.7 Dicyclohexyl phthalate- <i>d</i> ₄	DCHP- <i>d</i> ₄	18.80	153	
19	◎ Dicyclohexyl phthalate	DCHP	18.82	149	167
20	Sur.8 Di-2-ethylhexyl phthalate- <i>d</i> ₄	DEHP- <i>d</i> ₄	19.30	153	
21	◎ Di-2-ethylhexyl phthalate	DEHP	19.32	149	167
22	Sur.9 Dioctyl phthalate- <i>d</i> ₄	DOP- <i>d</i> ₄	21.21	153	
23	Dioctyl phthalate	DOP	21.23	149	279
24	Didecyl phthalate	DDcP	26.24	149	307
25	Diundecyl phthalate	DUP	30.44	149	321

◎ : JIS対象化合物 Sur. : サロゲート物質 Int. : 内標準物質

III 結果と考察

1. 振とう溶媒抽出法によるサロゲート物質の添加回収実験結果

ミリQ水と河川水各95 mLにサロゲート物質0.1 μgを添加したもの、および河川水95 mLにフタル酸エステル類とサロゲート物質を各々0.1 μg添加したものを試料水とし、4回の繰り返し測定を行い、多環芳香族の重水素化合物を内標準物質とする内標準法により濃度を算出して回収率を求めた。図1にサロゲート物質の回収率を示した。ミリQ水での回収率は68.7~80.4%、変動係数は2.1~4.7%、サロゲート物質のみを添加した河川水での回収率は61.4~69.1%、変動係数は7.1~10.3%、フタル酸エステル類とサロゲート物質を添加した河川水での回収率は68.1~75.6%、変動係数は5.6

~11.1%で、サロゲート物質間、試料水間いずれもサロゲート物質の回収率に大きな差はなかった。表2の上段にフタル酸エステル類とサロゲート物質の回収率の比(フタル酸エステル類の回収率/サロゲート物質の回収率)を示した。フタル酸ジ-n-ブチルとフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの回収率比は0.89、0.80と低めであったが、その他の回収率比は0.97~0.99で、分析操作におけるフタル酸エステル類とサロゲート物質の挙動は非常に良く一致している。フタル酸ジ-n-ブチルの空試験値は0.11 μg/L、変動係数13.0%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの空試験値は0.19 μg/L、変動係数88.3%、他のフタル酸エステル類では0.00 μg/Lであった。フタル酸ジ-n-ブチルとフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの回収率比が低いのは、空試験値が検出されるための測定誤差と考えられる。

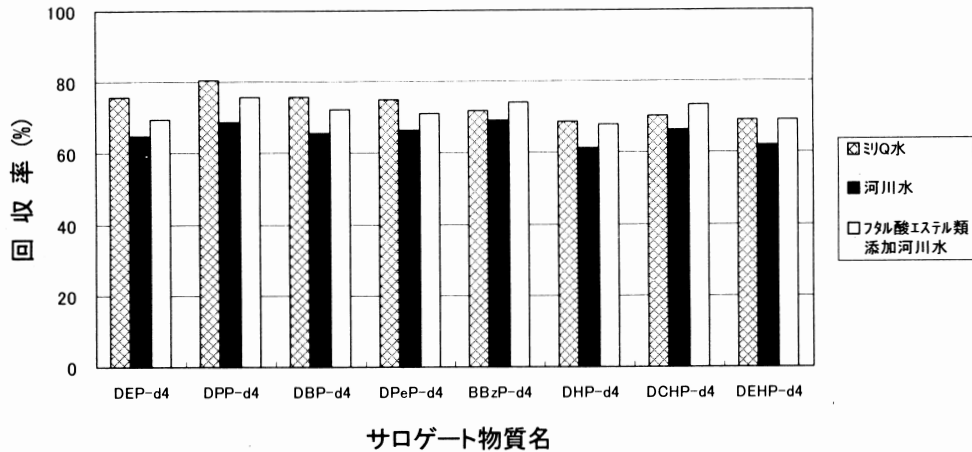


図1 振とう溶媒抽出法でのサロゲート物質の回収率の比較

表2 フタル酸エステル類とサロゲート物質の回収率の比

	DEP/ DEP-d ₄	DPP/ DPP-d ₄	DBP/ DBP-d ₄	DPeP/ DPeP-d ₄	BBzP/ BBzP-d ₄	DHP/ DHP-d ₄	DCHP/ DCHP-d ₄	DEHP/ DEHP-d ₄
溶媒抽出法	0.98	0.98	0.89	0.98	0.98	0.99	0.97	0.80
固相抽出法	0.97	0.94	0.53	0.80	0.88	0.75	0.83	0.57

注：回収率の比=フタル酸エステル類の回収率/サロゲート物質の回収率

2. 固相抽出法によるサロゲート物質の添加回収実験結果

ミリQ水、河川水各100mLで、振とう溶媒抽出法と同様に標準添加回収実験を行い、図2にサロゲート物質の回収率を示した。ミリQ水での回収率は40.9~101.8%、変動係数は4.1~15.3%で、回収率が低かったのは、フタル酸ジベンチル-d₄ 59.7%、フタル酸ジヘキシル-d₄ 40.9%、フタル酸ジシクロヘキシル-d₄ 67.6%およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d₄ 42.6%であった。サロゲート物質のみを添加した河川水での回収率は51.2~108.6%、変動係数は3.4~40.2%、フタル酸エステル類とサロゲート物質を添加した河川水での回収率は78.0~118.1%、変動係数は1.4~8.5%であった。振とう溶媒抽出法と異なり、サロゲート物質間、試料水間い

ずれにも回収率に大きな差があり、フタル酸エステル類を添加した河川水、河川水、ミリQ水の順でサロゲート物質の回収率は低下した。表2の下段のフタル酸エステル類とサロゲート物質の回収率の比では、空試験値が高いフタル酸ジ-n-ブチル（空試験値0.24μg/L、変動係数22.7%）とフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（空試験値0.24μg/L、変動係数25.8%）が0.53と0.57と低かったが、その他は0.75~0.97であり、フタル酸エステル類とサロゲート物質の挙動は、ほぼ一致しているといえる。固相抽出法でサロゲート物質間、試料水間の回収率に大きな差が生じた原因としては、フタル酸エステル類のガラス容器への吸着が考えられる。

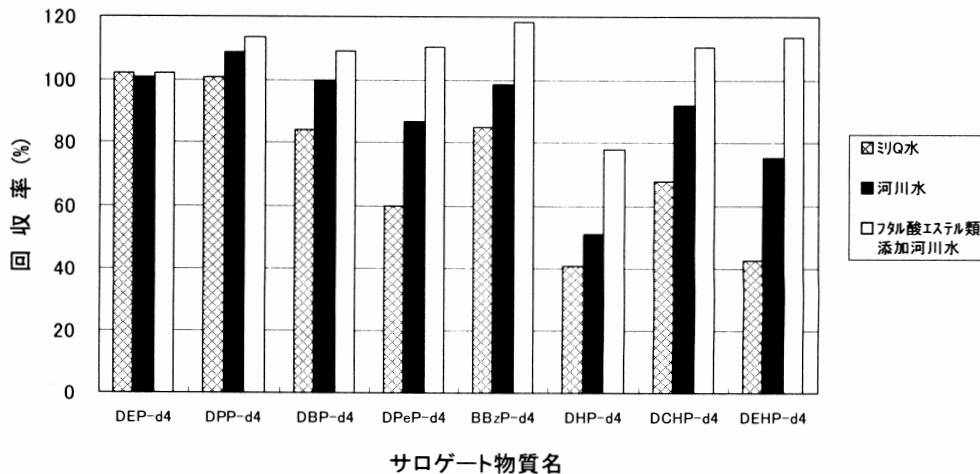


図2 固相抽出法でのサロゲート物質の回収率の比較

3. キャピラリーカラムの選択

前述のサロゲート物質の添加回収実験ではA社製カラムを用いたが、内標準法による検量線はフタル酸エステル類、サロゲート物質いずれも直線性が得られなかった。GC分析ではフタル酸エステル類は活性度の高い化合物であり、GC注入口やカラム内部

で吸着を起こしやすいと考えられる。不活性度を高めたとされるS社製カラムを用いた測定では、いずれの対象物質も内標準法で良好な直線性が得られた。図3にA社製とS社製カラムでのフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの内標準法による検量線を、図4にS社製カラムによる標準溶液のクロマトグラムを示した。

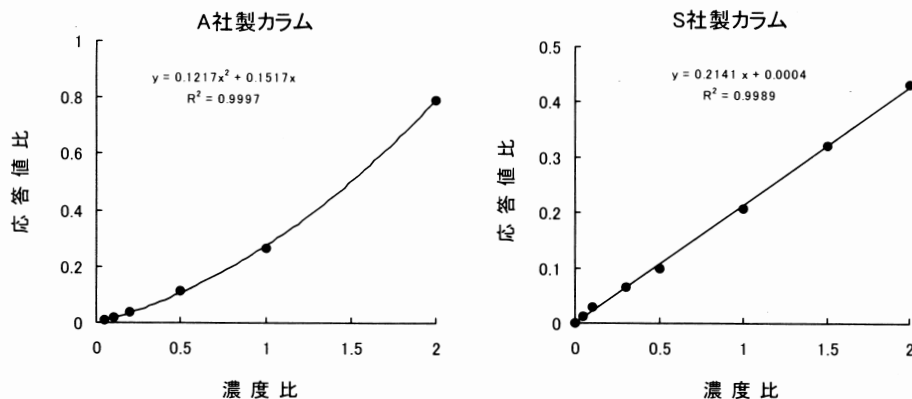


図3 異なるカラムでの内標準法による検量線の比較
(フタル酸ジ-2-エチルヘキシル：0.005~0.2mg/L, クリセン-d₁₂：0.1mg/L)

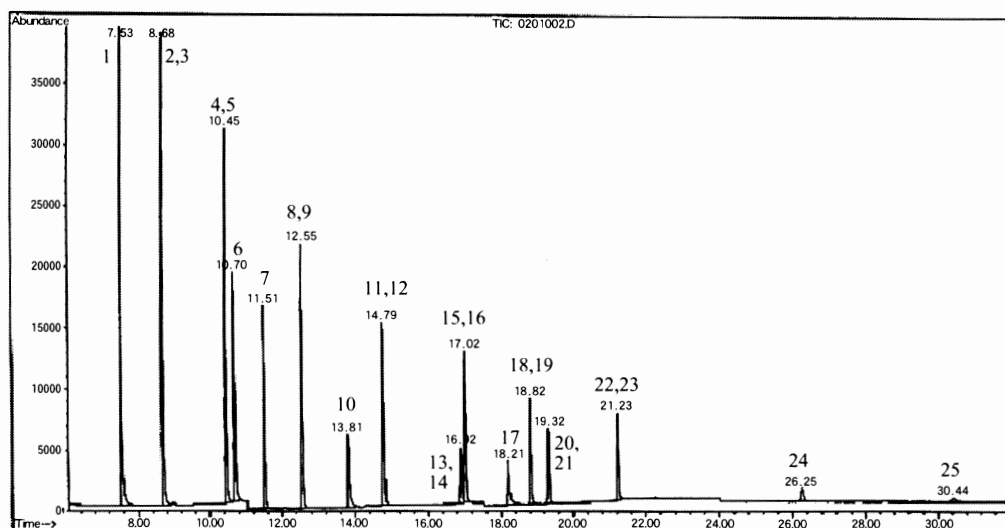


図4 GC/MS (SIM) による標準溶液のクロマトグラム
(フタル酸エステル類：各0.2mg/L, サロゲート物質：各0.1mg/L, 内標準物質：各0.1mg/L)

4. 固相抽出法での空試験値の比較

空試験値とそのバラツキが、フタル酸エステル類の測定値の精度に大きな影響を与えることは表2の結果でも明らかである。コンディショニングした空試験用の固相抽出カートリッジを加圧装置に装着し、純水の通水は行わず試料水の通水時間と同じ時間だけそのまま放置する空試験と、純水を通水する空試験を実施し、サロゲート法により空試験値を求めた。表3に示したようにいずれの空試験でもフタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジオクチルのみが検出されたが、純水の通水を行わない方が検出濃度が低く2回の測定値間の差も小さかった。純水の通水を行わない空試験でも、フタル酸ジ-n-ブチルが0.27あるいは0.30μg/L検出されたのは、窒素気流下での濃縮に用いる装置からの汚染が大きな要因であった。フタル酸エステル類が検出されない水を得ることが困難なこと、また純水の通水処理を行うと

空試験値のバラツキが大きくなることから、以後空試験では純水の通水操作は行わないことにした。

5. 試料容器内壁の不活性化処理の効果

フタル酸エステル類はガラス容器壁面へ吸着しやすいことが知られており、固相抽出法では試料水を入れる容器への吸着が問題となる。使用直前にイソオクタンで容器の内壁面を洗浄し、不活性化処理を行うことの効果を検討した。容量100mLの共栓メスシリンダーの内壁面をイソオクタンで洗浄処理したものとし、これを試料容器とし、サロゲート物質の回収率をそれぞれ求めて、表1に示した。9物質の回収率は、洗浄処理した場合の方が同等あるいは若干良くなっているが、バラツキが大きくなる可能性や空試験値に与える影響を考慮し、試料容器内壁のイソオクタン洗浄は行わないことにした。

表3 通水操作の有無による空試験の測定結果の差

フタル酸 エステル類	通水無し* (µg/L)		通水有り** (µg/L)	
	測定値 1	測定値 2	測定値 1	測定値 2
DMP	0.00	0.00	0.00	0.00
DEP	0.00	0.00	0.00	0.00
DPP	0.00	0.00	0.00	0.00
D-isoBP	0.00	0.00	0.00	0.00
DBP	0.27	0.30	0.62	0.44
DPeP	0.00	0.00	0.00	0.00
BBzP	0.00	0.00	0.00	0.00
DHP	0.00	0.00	0.00	0.00
DCHP	0.00	0.00	0.00	0.00
DEHP	0.07	0.09	0.23	0.19
DOP	0.02	0.03	0.10	0.13
DDcP	0.0	0.0	0.0	0.0
DUP	0.0	0.0	0.0	0.0

* : 空試験用カートリッジを加圧装置に装着し、純水の通水を行わず、10分間放置する。
 ** : 純水を10分間通水する。

表4 サロゲート物質の回収率に与える不活性化処理の有無の影響

サロゲート物質	不活性化処理*		不活性化処理無し
	測定値 1	測定値 2	平均値 (n=4)
DEP- <i>d</i> ₄	96.4	106.7	97.6
DPP- <i>d</i> ₄	95.3	105.3	96.0
DBP- <i>d</i> ₄	72.6	78.8	67.0
DPeP- <i>d</i> ₄	59.2	59.0	36.6
BBzP- <i>d</i> ₄	61.6	81.7	64.0
DHP- <i>d</i> ₄	44.1	52.8	26.1
DCHP- <i>d</i> ₄	57.1	62.2	44.5
DEHP- <i>d</i> ₄	41.4	36.3	28.3
DOP- <i>d</i> ₄	39.9	32.1	27.7

* : 容量100mLの共栓メスシリンダーの内壁を、使用直前イソオクタンで洗浄する。

6. サロゲート法および内標準法によるフタル酸エステル類の回収率の比較

フタル酸エステル類とサロゲート物質各0.1µgを添加した河川水100mLを、固相抽出カートリッジで濃縮後GC/MS (SIM) で測定し、サロゲート法と内標準法で回収率を求め表5に示した。内標準法で求めたフタル酸エステル類の回収率は22.3~86.0%、変動係数は5.4~23.9%であった。サロゲート法で求めたフタル酸エステル類の回収率は、空試験値の高いフタル酸ジ-n-ブチルとフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを除くと、84.2~99.1%、変動係数

は1.9~7.5%と非常に良好な結果が得られた。フタル酸ジ-n-ブチルとフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの回収率も104.8%と120.4%、変動係数は14.9%と14.8%で良好な結果であった。サロゲート法を適用することにより、フタル酸エステル類のガラス容器への吸着や、GC/MS測定で内標準物質と目的物質の相対感度比が標準液と試料では変動することから生じる誤差を補正することが出来たものと考えられる。フタル酸ジウンデシルはGC/MSに対する感度が低く検出できなかった。

表5 固相抽出法による標準添加回収実験の結果

(n = 4)

検量線法 No.	略名	サロゲート法		サロゲート物質	内標準法		内標準物質
		回収率(%)	C.V.(%)		回収率(%)	C.V.(%)	
1	DMP	91.8	5.7	DEP- <i>d</i> ₄	86.0	6.5	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀
2	DEP	95.0	2.8	DEP- <i>d</i> ₄	85.8	7.1	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀
3	DPP	93.9	1.9	DPP- <i>d</i> ₄	85.2	7.7	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀
4	D-isoBP	97.5	4.6	DBP- <i>d</i> ₄	62.0	5.4	Fluoranthene- <i>d</i> ₁₀
5	DBP	104.8	14.9	DBP- <i>d</i> ₄	60.3	11.9	Fluoranthene- <i>d</i> ₁₀
6	DPeP	84.2	2.1	DPeP- <i>d</i> ₄	30.5	17.9	Fluoranthene- <i>d</i> ₁₀
7	BBzP	96.5	3.5	BBzP- <i>d</i> ₄	61.9	9.1	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
8	DHP	87.1	4.6	DHP- <i>d</i> ₄	24.0	12.2	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
9	DCHP	91.9	5.0	DCHP- <i>d</i> ₄	40.8	12.3	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
10	DEHP	120.4	14.8	DEHP- <i>d</i> ₄	27.2	12.4	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
11	DOP	97.8	5.8	DOP- <i>d</i> ₄	27.2	20.8	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
12	DDcP	99.1	7.5	DOP- <i>d</i> ₄	22.3	23.9	Chrysene- <i>d</i> ₁₂
13	DUP	検出不可	-	-	検出不可	-	-

注1 : 試料水は河川水。

注2 : フタル酸エステル類は、各々0.1µg/100mL添加。

IV まとめ

水中のフタル酸エステル類13物質を対象物質とし、試料にサロゲート物質を添加後、振とう溶媒抽出あるいは固相抽出カートリッジで濃縮し、GC/MS (SIM) で定量するサロゲート法を検討した。フタル酸エステル類とサロゲート物質の標準添加回収実験を行ったところ、振とう溶媒抽出法ではフタル酸エステル類とサロゲート物質の分析操作上の挙動が非常に良く一致し、対象物質間、試料水間での回収率も安定していた。固相抽出法では、空試験値の影響が大きいフタル酸エステル類があり、さらに対象物質間、試料水間の回収率も大きく変動した。GC用キャピラリーカラムの選択、空試験の方法、目的物質の吸着を防ぐためのガラス容器内壁の不活性化処理を固相抽出法で検討した結果、S社製カラムの採用と通水を行わない空試験の方法では良好な結果が得られたが、ガラス容器壁面の不活性化については、明確な効果が得られなかった。サロゲート法を適用することにより固相抽出法でも非常に良好な回収率が得られた。

振とう溶媒抽出法の方が固相抽出法より測定精度が高いが、いずれも濃縮操作過程およびGC/MS測定上の誤差を補正するためには、サロゲート法の適用が必須である。

文献

- 1) 環境庁環境保健部環境安全課：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」、2000年11月版。
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）、1998。
- 3) 藤本千鶴（1999）：水中のフタル酸エステル類の分析方法の検討とモニタリング、用水と廃水、41、41-47。
- 4) 今中努志（2001）：フタル酸エステル分析における汚染、ぶんせき、7、366-367。
- 5) 日野隆信、中山和好（2001）：活性炭充填捕集管 - 溶媒抽出法による空気中のフタル酸エステル類の分析、千葉県衛生研究所報告、25、1-7。
- 6) 平成12年度経済産業省委託 用水・排水中の微量有機化学物質の試験法に関する調査研究成果報告書、65-92、日本工業用水協会、2001。