

固相マイクロ抽出 (SPME) / GC-MS 法を用いた 外因性内分泌かく乱化学物質の分析

(水試料中のフタル酸エステル類及び
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルについて)

渡辺 由香里 小林 規矩夫

Determination of Endocrine Disrupters Using Solid Phase
Microextraction/GC-MS Method

(Phthalic Acid Esters and Ajipic Acid Ester in River Water)

Yukari WATANABE and Kikuo KOBAYASHI

環境中の超微量な成分が世代を超えて生物へ悪影響を及ぼす怖れがあると問題視されている外因性内分泌かく乱化学物質 (環境ホルモン) は, その環境動態や環境安全性の解明が急がれている^{1, 2)}。

山梨県では平成10年度から3年計画で環境中の当該物質の測定を行っており, 平成12年度最終年度には約70物質群の基礎データ³⁾が出そろった。

この調査に用いた分析方法は, 環境庁の「外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアル」⁴⁾で示された主に溶媒抽出法であったが, この方法では使用溶媒による環境汚染が危惧された。

筆者らは抽出溶媒を全く使用しない分析法の固相マイクロ抽出 (SPME) 法⁵⁾を用いて, アルキルフェノール類⁶⁾, 低沸点有機化合物⁷⁾, および農薬類⁸⁾について分析を試みてこれまでに良好な結果を得ている。

そこで今回, SPME法を用いて環境中から比較的高濃度, 高濃度で検出される外因性内分泌かく乱化学物質^{9, 10, 11)}のフタル酸エステル類8物質とアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの分析を試みた。その結果, 本法が水試料中のスクリーニング法として有用であることが認められたので報告する。

実験方法

1. 試薬

1) フタル酸エステル類・アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル標準品

フタル酸ジエチル (DEP), フタル酸ブチルベンジル (BBP), フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP), フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP), アジピン酸ジ-2-エチル

ヘキシル (DEHA) (以上和光純薬社製), フタル酸ジ-n-ブチル (DBP) (東京化成社製), フタル酸ジプロピル (DPrP), フタル酸ジペンチル (DPeP), フタル酸ジヘキシル (DNHP) (以上関東化学社製) の9物質を用いた。

2) 混合標準液

各フタル酸エステル類と DEHA の標準品 0.5mg をアセトン 50ml に溶解する (10 μ g/ml)。これをさらにアセトンで希釈し標準液 (0.2 μ g/ml) を調製した。

3) サロゲート物質 (安定同位体標識物質) 混合液

Cambridge Isotope Laboratories 社製の DEP-d₄, DBP-d₄, BBP-d₄, DCHP-d₄, DEHP-d₄ を 0.2 μ g/ml の濃度になるようにアセトンで希釈した。

4) その他の試薬

塩化ナトリウムとアセトンは残留農薬試験用 (和光純薬社製) を, 精製水は蒸留水をミリポア社製の Milli-Q Plus で処理したもの, VOC 測定用蒸留水は住友精密社製を用いた。

2. 器具および装置

固相マイクロ抽出ユニットは手動サンプリング用 SPMEホルダー (スペルコ社製) に各種固相のファイバーアセンブリー (以下ファイバーと記す) を装着して用いた。検討したファイバーの種類は 65 μ m ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン (PDMS/DB), 85 μ m ポリアクリレート (PA), 100 μ m ポリジメチルシロキサン (PDMS), 65 μ m カーボワックス・ジビニルベンゼン (CW) の4種である。

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) は, ヒュー

表1 各物質のSIM測定イオン, 保持時間, 検出下限値

No	物質名	SIM測定 m/z		保持時間 (同サロゲート)	検出下限値 (μg/l)
		同定用	定量用		
1	フタル酸ジエチル (DEP)	177	149	11'33" (11'31")	0.008
2	フタル酸ジプロピル (DPrP)	209	149	13'37" —	0.004
3	フタル酸ジ-n-ブチル (DBP)	223	149	15'37" (15'34")	0.01
4	フタル酸ジペンチル (DPeP)	237	149	17'25" —	0.006
5	フタル酸ブチルベンジル (BBP)	206	149	18'59" (18'56")	0.01
6	フタル酸ジヘキシル (DNHP)	251	149	19'08" —	0.04
7	フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)	167	149	20'20" (20'19")	0.007
8	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)	167	149	20'52" (20,50")	0.007
9	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA)	129	147	19'47" —	0.02

表2 各種ファイバーへの吸着率 (%)

物質名	PDMS/DB	PA	PDMS	CW
DEP	69.1	85.3	34.5	41.4
DPrP	98.4	97.6	96.3	79.8
DBP	109.0	107.2	100.3	97.1
DPeP	42.1	26.6	24.9	19.1
BBP	90.5	106.1	89.9	80.2
DNHP	28.9	21.8	17.3	4.5
DCHP	42.7	35.6	33.7	36.8
DEHP	19.9	14.5	9.8	4.4
DEHA	26.5	16.5	12.0	0.3

PDMS/DB: 65 μm ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン
 PA: 85 μm ポリアクリレート
 PDMS: 100 μm ポリジメチルシロキサン
 CW: 65 μm カーボワックス・ジビニルベンゼン

レットパックカード (HP) 社製ガスクロマトグラフ 5890 型を接続した日本電子社製 AX505W 型を用いた。

3. 測定方法

1) 標準試料の調整

分析作業は綿製手袋を着用して行い, ガラス器材はアセトン洗浄後に使用した。

予め塩化ナトリウム 5g を入れた 20ml 用のバイアルビンに 200°C 2 時間加熱する。放冷後, マグネットを入れ精製水 20ml を加える。これにマイクロシリンジで混合標準液を 5~100 μl (1~20ng) 加え, さらにサロゲート物質混合液 10 μl (2ng) を添加し, シリコンセプトラムで栓をする。

2) 各種ファイバーの吸着率の検討

標準物質を添加したバイアルビンにファイバーを挿入し, 44°C の水浴中で 45 分間マグネチックスターラーで攪拌する。ファイバーを取り出し付着した塩分を落とすため精製水中にファイバーを浸したのち, ろ紙で水分を除き GC 注入口に入れる。ファイバーを 30 分間注入口に留め, 吸着している物質を熱脱離し, GC カラムに導入し SIM 法で定量する。

表3 各種水のブランク値 (μg/l)

物質名	精製水	水道水	VOC 用
DEP	n.d.	n.d.	n.d.
DPrP	n.d.	n.d.	n.d.
DBP	0.0003	0.0005	0.0006
DPeP	n.d.	n.d.	n.d.
BBP	n.d.	n.d.	n.d.
DNHP	n.d.	0.0001	0.0003
DCHP	n.d.	0.0003	n.d.
DEHP	0.001	0.002	0.02
DEHA	0.0001	0.0003	0.003

表4 添加回収試験結果

物質名	精製水 (%)		河川水 (%)	
	相対回収率	CV	相対回収率	CV
DEP	90.7	13.8	94.8	13.9
DPrP	100.1	10.1	113.9	9.3
DBP	90.9	9.0	96.6	11.9
DPeP	98.6	13.1	87.1	16.6
BBP	119.3	9.9	99.4	12.4
DNHP	111.7	15.8	80.1	15.5
DCHP	105.2	8.7	93.1	3.4
DEHP	79.8	14.5	70.2	10.5
DEHA	98.9	14.7	63.4	17.8

4. GC-MS 測定条件

ガスクロマトグラフ条件

カラム: Ultra2 (HP 社製 長さ 25m 内径 0.32mm 膜厚 0.17 μm)

オーブン温度: 50°C (2 分間保持) -10°C/分 -270°C (10 分)

注入口温度: 250°C

注入法: スプリット・スプリットレス法 (ページ開始 時間 10 分)

キャリアーガス: ヘリウム (5psi)

質量分析計条件

インターフェイス温度: 280°C

イオン化法: EI 法 (70eV)

検出法: SIM 法

測定イオン (m/z): 表 1 に示す。

結果と考察

1. ファイバーの選択

標準物質のファイバーへの吸着率算定は、4種のファイバーを3. 2)の操作をした後、測定したピーク面積と混合標準液(濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)をマイクロシリンジで直接ガスクロマトグラフに1 μl (1ng)を注入したときのピーク面積とを用いた。結果は表2に示す。

混合標準液を直接ガスクロマトグラフに1 μl (1ng)注入したときのSIMクロマトグラムを図1に示す。フタル酸エステル類のピーク面積は、40.3~350.8の範囲であった。

各ファイバーへの標準物質の吸着率はPDMS/DB 19.9~109.0%, PA 14.5~107.2%, PDMS 9.8~100.3%, CW0.3~97.1%で、検討した4種のファイバーの中ではPDMS/DBが最も高い吸着率を示した。

さらにPDMS/DBは各ファイバーへの吸着率の低いDNHP, DEHP, およびDEHAの3物質が他のファイバーと比べて比較的良く吸着していたことから、以下PDMS/DBファイバーを用いて検討を行った。

2. 各種水を用いた空試験

フタル酸エステル類のブランク値の低減化を図るため精製水、水道水およびVOC測定用の蒸留水を用いてブランク値の検討を行った。結果を表3に示す。

ブランク値を示したのは9物質のうち、精製水は3物質DBP, DEHP, DEHAに0.0003~0.001 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、水道水は5物質DBP, DNHA, DCHP, DEHP, DEHAに0.0001~0.002 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、VOC測定用蒸留水は4物質DBP, DNHA, DEHP, DEHAに0.0003~0.02 $\mu\text{g}/\text{l}$ の範囲で認められた。DBP, DEHP, DEHAについては他の分析法でも高いブランク値を示す¹²⁾ことが示されているが、SPME法ではVOC用の蒸留水を用いたDEHPの値以外は全て検出下限値(表1)以下の低い値であった。

また、今回のブランク値は全て水に起因するとは考えられないが、同一条件で操作した3種類の水のうちで精製水が最も低い値を示したことから、以後精製水を用いて検討を行った。

3. 検量線

フタル酸エステル類の濃度を0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0ng/mlとし、これにサロゲート物質混合液2ngを添加し3. 2)の操作を行い、各物質の示すピーク面積とサロゲート物質の示すピーク面積の比を用いて検量線を作成した。なお、サロゲート物質のないDPrPはDBP-d₄を、

DPePはBBP-d₄を、DNHPはDCHP-d₄を、DEHAはDCHP-d₄を内標準物質として検量線を作成した。代表的な検量線DCHPとDEHPを図2に示す。

フタル酸エステル類とサロゲート物質の保持時間は11分31秒~20分52秒の範囲であり(表1)、サロゲート物質が標準物質より早く溶出する傾向を示した。

検量線は各物質とも0.05~1.0ng/mlの範囲ではほぼ良好な直線性が得られ、定量的な取り扱いが可能であった。

4. 検出下限値

検出下限値は各フタル酸エステル類(0.05ng/ml)のSIMクロマトグラムからS/N比3を用いて算出した。結果を表1に示す。

検出下限値は0.004~0.04 $\mu\text{g}/\text{l}$ の範囲であった。環境庁のマニュアル⁴⁾で示されている水質の目標検出下限値(DNHP, DEHPは各0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、その他のフタル酸エステル類は0.2 $\mu\text{g}/\text{l}$)を充分クリアするものであった。しかし、DEHAについては本法では0.02 $\mu\text{g}/\text{l}$ で環境庁の目標値0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ をクリアできなかった。

5. 添加回収試験

水試料への適用を考え精製水と河川水を用いて添加回収試験と再現性を検討した。この試験に用いた河川水のBODは1.3mg/lであった。

1) 相対回収率

精製水と河川水20mlに各フタル酸エステル類を2ng、サロゲート物質2ngを添加し、相対回収率を求めた(n=5)。結果は表4に示す。

精製水の相対回収率は79.8~119.3%で、河川水は63.4~113.9%であった。精製水は概ね良好な結果が得られたが河川水についてはファイバーへの吸着率の低いDEHPとDEHAの2物質がやや低い相対回収率を示した。

2) 再現性

精製水、河川水それぞれ20mlに、混合標準液10 μl (2ng)とサロゲート物質混合液(2ng)を添加し測定した(n=5)。その結果を表4にCV%で示す。

精製水のCV%は8.7~15.8%の範囲でありCV20%を超えた物質はなかった。また河川水についてもCV%は3.4~17.8%の範囲でありこちらもCV20%を超えた物質はなく概ね良好な再現性が得られた。

なお、今回のフタル酸エステル類の分析に於いても前報^{6, 7, 8)}と同様に精製水よりも河川水でより良好な再現性を示す物質が認められたが、その原因については今後の検討課題である。

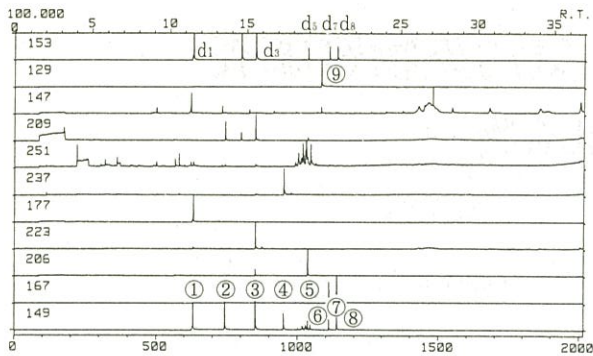


図1 混合標準液のSIMクロマトグラフ
(ピーク上の番号は表1の物質番号に対応)
(d₁~d₈はサロゲート物質)

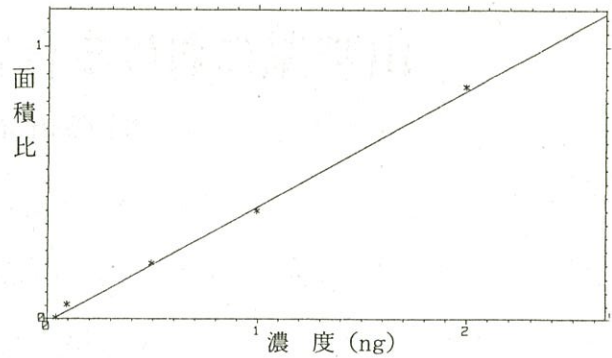


図2-1 フタル酸ジシクロヘキシルの検量線

ま と め

固相マイクロ抽出 (SPME)/GC-MS法を用いて水試料中のフタル酸エステル類 8 物質とアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの分析について検討した。

65 μ m ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン (PDMS/DB), 85 μ m ポリアクリレート (PA), 100 μ m ポリジメチルシロキサン (PDMS), 65 μ m カーボワックス・ジビニルベンゼン (CW) の 4 種類のファイバーを用いて抽出特性を比較した結果, 65 μ m ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン (PDMS/DB) が最も高い吸着率を示した。

65 μ m ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン (PDMS/DB) を用いて精製水と河川水について各種検討を行ったところ, ブランク値, 検量線, 再現性については概ね良好な結果が得られた。検出下限値については, アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルが環境庁の目標値をクリアできなかった。また, 添加回収試験についてはファイバーへの吸着率の低いフタル酸ジ-2-エチルヘキシルとアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルが河川水でやや低い回収率を示したが, 他の物質は精製水と同様に概ね良好な結果が得られた。

固相マイクロ抽出法 (SPME法) はブランク値が低く, 感度も良好で, 操作が簡便であることから環境水中のフタル酸エステル類の定量法として有用であると考えられた。

文 献

- 1) シーア・コルボーンら：奪われし未来, 翔詠社 (1997)
- 2) 環境庁：環境ホルモン戦略計画 (SPEED'98), (1998)

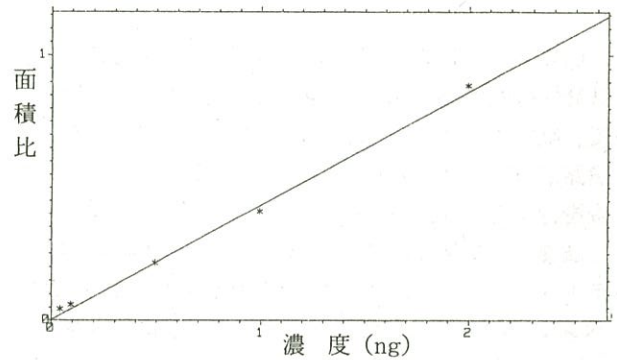


図2-2 フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの検量線

- 3) 山梨県：環境首都・山梨づくり推進本部「外因性内分泌かく乱化学物質対策専門部会」資料 (1999)
- 4) 環境庁：外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアル (1998)
- 5) 磯部友彦ら：第1回日本水環境学会シンポジウム講演集, 8~9 (1998)
- 6) 渡辺由香里, 小林規矩夫：山梨県衛公研年報, 42, 65~68 (1998)
- 7) 渡辺由香里, 小林規矩夫：山梨県衛公研年報, 40, 38~42 (1996)
- 8) 渡辺由香里, 小林規矩夫：山梨県衛公研年報, 41, 58~62 (1997)
- 9) 蔵本和夫：石川県保健環境センター年報, 34, 181~183 (1997)
- 10) 三好広志ら：静岡県衛生環境センター報告, 38, 89~96 (1996)
- 11) 環境庁：平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, 127~176 (1996)
- 12) 高橋哲夫ら：北海道衛生研究所年報, 49, 119~122, (1999)