

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—

劔持堅志，前田大輔，吉岡敏行，中桐基晴，藤原博一（水質第二科）

【調査研究】

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—

Determination of Trioctyl Trimellitate in Water by LC/MS/MS

剣持堅志, 前田大輔, 吉岡敏行, 中桐基晴, 藤原博一 (水質第二科)

Katashi Kenmotsu, Daisuke Maeda, Toshiyuki Yoshioka, Motoharu Nakagiri, Hiroichi Fujiwara

要 旨

水質中のトリメリット酸トリオクチル(n-オクチル体及び2-エチルヘキシル体)についてLC/MS/MSを用いた分析法を検討した。対象物質は、高沸点のためGC保持時間が長く、GC/MSに対する感度も低い安定した分析は困難であったが、LC/MS分析ではいずれもESI Positiveモードでイオン化され、SRM(MS/MS)法によりGC/MSより千倍程度の高感度測定が可能であった。前処理法は固相抽出及び液々抽出法について検討したが、安定した回収率が得られた液々抽出法とフロリジルカラムを用いるクリーンアップ法を採用し、10ng/Lレベルの検出下限値を得た。

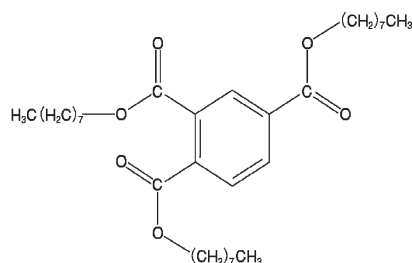
[キーワード：可塑剤, トリメリット酸トリオクチル, 固相抽出, 液々抽出, LC/MS/MS]

[Key words : Plasticizers, Trioctyl Trimellitate, Solid phase extraction, Liquid-liquid extraction, LC/MS/MS]

1 はじめに

可塑剤はビニル系合成樹脂, セルロースエステル, ゴム等の高分子物質に添加され, 高分子物質の柔軟性, 耐熱性, 耐光性, 電気的特性などを改善する目的で使用される¹⁾。従来から可塑剤としてフタル酸エステル類^{1,2)}, リン酸トリエステル類^{1,3)}等が主に使用されてきたが, 大量使用による環境汚染が明らかになり^{4,5)}, また, フタル酸エステル類は内分泌攪乱作用を有する可能性が報告⁶⁾されたこと, またリン酸トリエステル類は神経毒性が懸念³⁾されることなどから, 次第に新たな代替物質が開発・使用されるようになってきた。トリメリット酸トリオクチルはフタル酸エステル類の代替物質として開発され, 優れた耐熱性と価格メリットを有することからビニル被覆電線への用途が急増している物質¹⁾である。当センターは現在までにフタル酸エステル類⁷⁾, リン酸エステル類⁸⁾, 塩素化パラフィン類⁹⁾等の分析法を開発してきたが, 環境省委託の平成20年度化学物質環境実態調査において1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリ-n-オクチル(図1, 以下n-オクチル体と略す)の分析法開発を受託したことから, 本物質のn-オクチル基が2-エチルヘキシルに置換した異性体である1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリ-2-エチルヘキシル(以下2-エチルヘキシル体と略す)

との同時分析法を検討したので報告する。



トリメリット酸トリ-n-オクチル
trioctyl benzene-1,2,4-tricarboxylate
CAS番号 89-04-3

図1 対象物質及び構造式

2 実験方法

2.1 試薬

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリ-n-オクチル: DIC株式会社製

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリ-2-エチルヘキシル: DIC株式会社製

フタル酸ジオクチル-d₄: 林純薬工業株式会社製

フタル酸ジノニル-d₄: 林純薬工業株式会社製

フタル酸ジデシル-d₄: 林純薬工業株式会社製

ジクロロメタン: 残留農薬・PCB試験用, 5000倍濃縮検定品

無水硫酸ナトリウム：残留農薬・PCB試験用

精製水：ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製したもの。

LC-Florisil (1g/6mL)：SUPELCO (Glass Tube w/PTFE Frits)

その他試薬は、残留農薬分析用、LC/MS分析用または特級試薬を用いた。

2.2 測定法

2.2.1 LC/MSの測定条件

(LC条件)

カラム：Atlantis T3 3 μ m 2.1 mm ϕ \times 150 mm L (Waters社製)

移動相：A：水，B：メタノール

0～20min A：B = 2：98

流量：0.2mL/min

カラム温度：40℃

注入量：10 μ L

(MS条件)

使用機種：Micromass Quattro micro API

Cone：30V，Collision：46eV (n-オクチル体及び2-エチルヘキシル体)

Cone：20V，Collision：22eV (フタル酸ジオクチル-d₄)

Cone：25V，Collision：16eV (フタル酸ジノニル-d₄)

Cone：25V，Collision：16eV (フタル酸ジデシル-d₄)

SourceTemp：100℃，DesolvationTemp：500℃

DesolvationGas：600L/hr，ConeGas：50L/hr

イオン化法：ESI Positive

モニターイオン：547.66 \rightarrow 193.11 (n-オクチル体及び2-エチルヘキシル体)

395.57 \rightarrow 153.1 (フタル酸ジオクチル-d₄)

423.6 \rightarrow 153.1 (フタル酸ジノニル-d₄)

451.62 \rightarrow 153.1 (フタル酸ジデシル-d₄)

2.3 試料の前処理

分析法の概要を図2に示す。前処理法は、固相抽出法と液々抽出法について検討した。その詳細は下記のとおりである。

〔固相抽出法〕

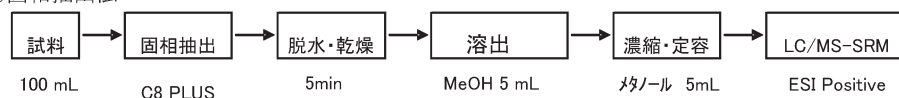
試料水100mLを予めメタノール10mL及び精製水20mLでコンディショニングした固相カートリッジに10mL/minで通水する。通水終了後、固相カートリッジを精製水20mLで洗浄した後、5分間通気して乾燥後、メタノール4.5mLを用いて溶出した。内標準液(2 μ g/mL)5 μ Lを添加後、メタノールを用いて5mLに定容し、試料液とした。

〔液々抽出法〕

試料水100mLを200mL容の分液ロートに採取し、塩化ナトリウム5gを溶解後、ジクロロメタン15mLを加え、約10分間振とうする。ジクロロメタン層を採取後、再度ジクロロメタン10mLで振とう抽出を行う。抽出液は合わせた後、ヘキサン10mLを添加し、無水硫酸ナトリウムで脱水する。抽出液は、ヘキサンで50mLナス型フラスコに洗いこみ、ロータリーエバポレーターを用いて乾固寸前まで減圧濃縮後、窒素ガスを吹き付けて軽く乾固し、ヘキサン1mLに溶解して試料抽出液を得た。

予めジクロロメタン5mL及びヘキサン15mLで洗浄したフロリジルカートリッジカラムに試料液を負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、ヘキサン2mL及び20%ジクロロメタンヘキサン5mLで濃縮容器及びカラム壁面を洗い込み(この洗浄溶出液は廃棄)、スピッツ型共栓付試験管をセットした後、ジクロロメタン5mLでカラムから目的物質を溶出する。溶出液を窒素吹きつけにより軽く濃縮乾固後、少量のメタノールに溶解し、内標準液(2 μ g/mL)5 μ Lを添加した後、メタノールを用いて2mLに定容し、測定用試料液とした。

①固相抽出法



②液々抽出法

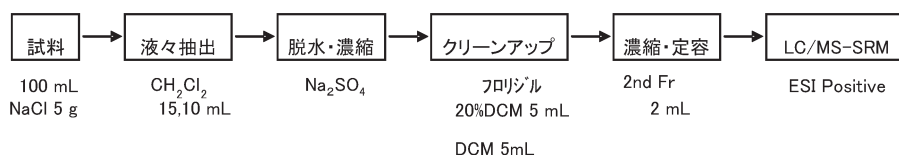


図2 分析法フローチャート

3 結果及び考察

3.1 GC/MS 測定の見直し

トリメリット酸エステル類と類似の構造を有するフタル酸エステル類は通常はGC/MSで測定⁷⁾されていることから、GC/MSによる測定を試みた。カラム長30mのキャピラリーカラム(スベルコPTE-5, 膜厚0.25 μ m)を用いた場合のマスクロマトグラムを図3に示したが、トリメリット酸エステル類は、高沸点フタル酸エステル類であるジ-n-デシルフタレートよりも保持時間が長く、極めて揮発しにくい性質を持つことが推定された。トリメリット酸エステル類のマスペクトルは、2-エチルヘキシル体のフラグメントイオンの種類が若干多い傾向があるものの、極めて類似していた(図4)。その感度は通常のフタル酸エステル類より一桁低く、検量線(図5)も安定しない傾向を示し、0.1 μ g/mL以下の測定は困難であった。

3.2 LC/MS 測定の見直し

構造が類似するフタル酸エステル類がESI Positiveモードで検出できるとの報告¹⁰⁾を基礎にLC/MSによる測定を検討した。トリメリット酸エステル類は、図6に示すようにESI Positiveモードで分子イオンに起因する明瞭なプロトン付加イオン(m/z 548)が検出された。またMS/MS分析では、強度の強いプロダクトイオン(m/z 193)が検出され、SRM法による高感度分析が可能であった。トリメリット酸エステル類のLC分離の状況を図7に示したが、n-オクチル体と2-エチルヘキシル体を相互に分離することができ、また内標準候補物質であるフタル酸エステル類重水素体とも分離可能であった。検量線を図8に示したが、いずれも0.1ng/mL~10ng/mLの範囲で直線性を示し、GC/MSによる測定と比較して千倍程度高感度であった。なお、トリメリット酸エステル類はグラジエント分析を行った場合には、ブランクまたはLCのオートサ

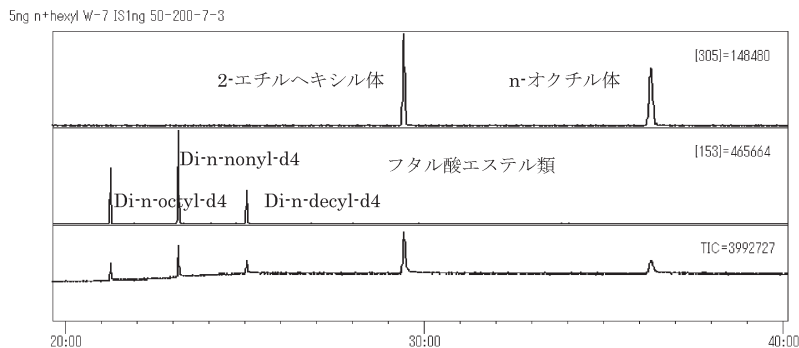


図3 トリメリット酸エステル類及びフタル酸エステル類のGC/MS測定 PTE-5(0.25 mm, 30 m, 50 $^{\circ}$ C (2min)-20 $^{\circ}$ C/min-200 $^{\circ}$ C -7 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (20min))

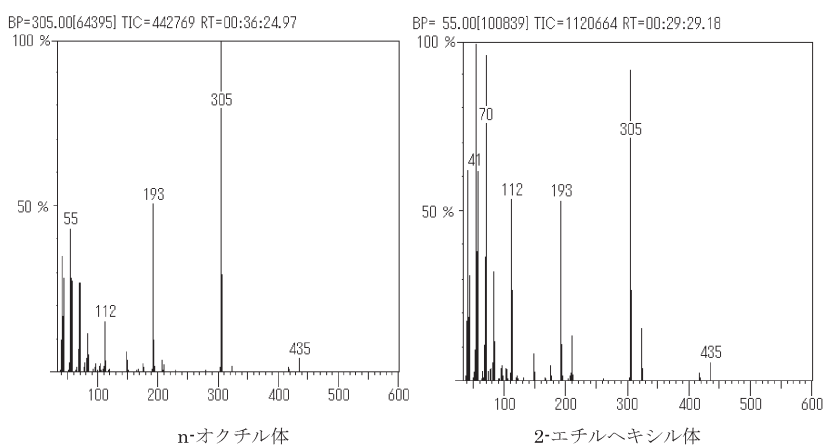


図4 トリメリット酸エステル類のGC/MSスペクトル

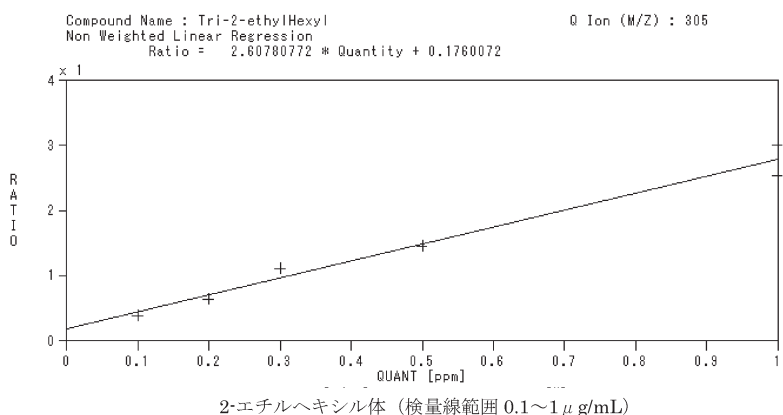
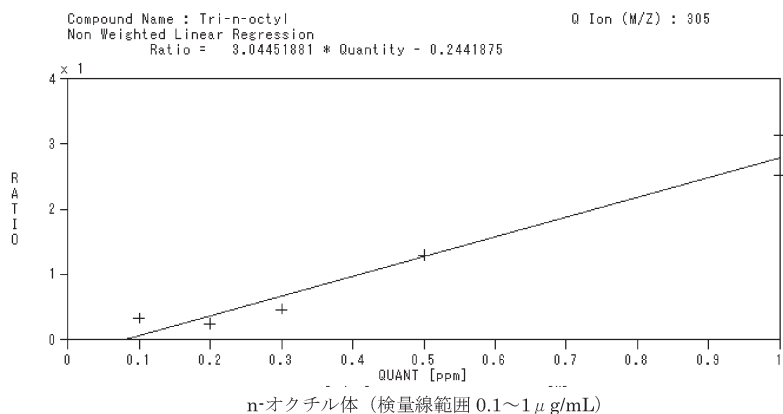


図5 トリメリット酸エステル類の検量線(GC/MS, 内標準: Di-n-nonylphthalate-d₄)

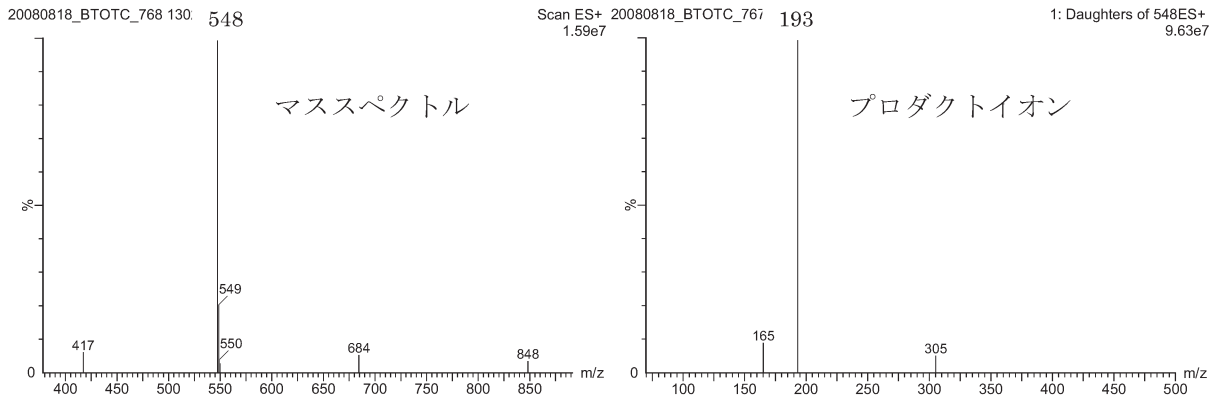


図6 n-オクチル体のマススペクトルとプロダクトイオンスペクトル (ESI Positive)

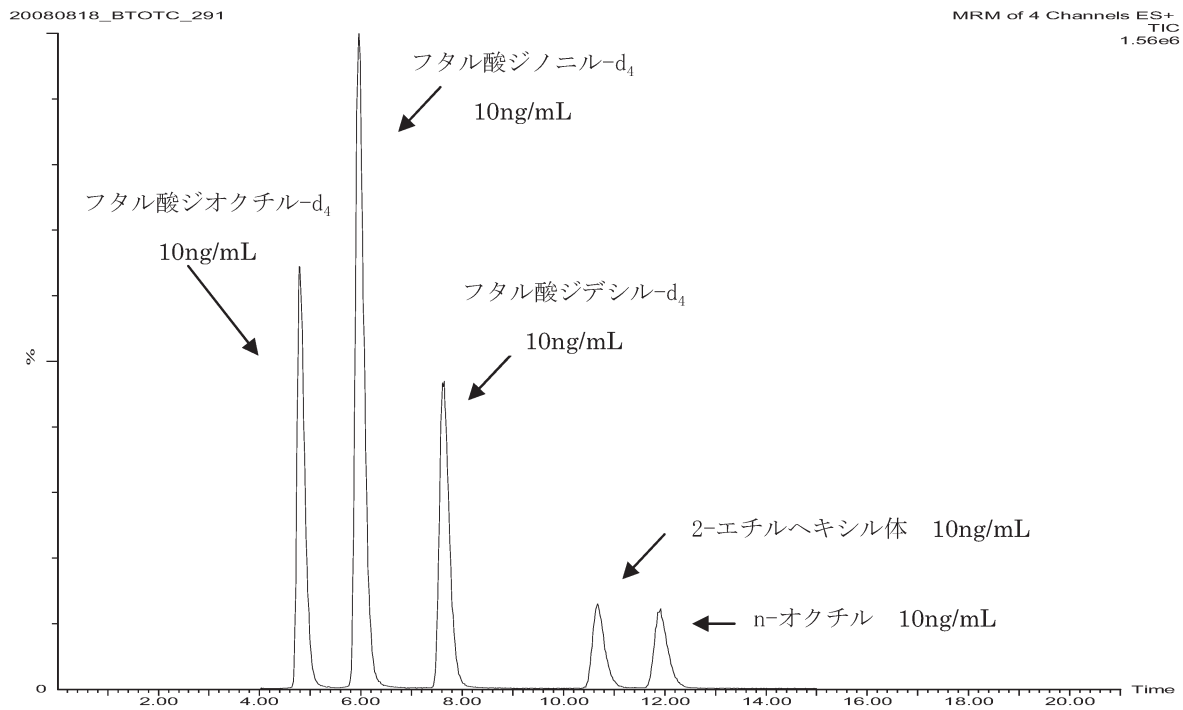


図7 トリメリット酸エステル類及びフタル酸エステル類のSRMクロマトグラム

Compound name: W755
 Correlation coefficient: $r = 0.998041$, $r^2 = 0.996086$
 Calibration curve: $6070.2 * x + 117.106$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Compound name: W705NB
 Correlation coefficient: $r = 0.999281$, $r^2 = 0.998562$
 Calibration curve: $5776.93 * x + 41.9998$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

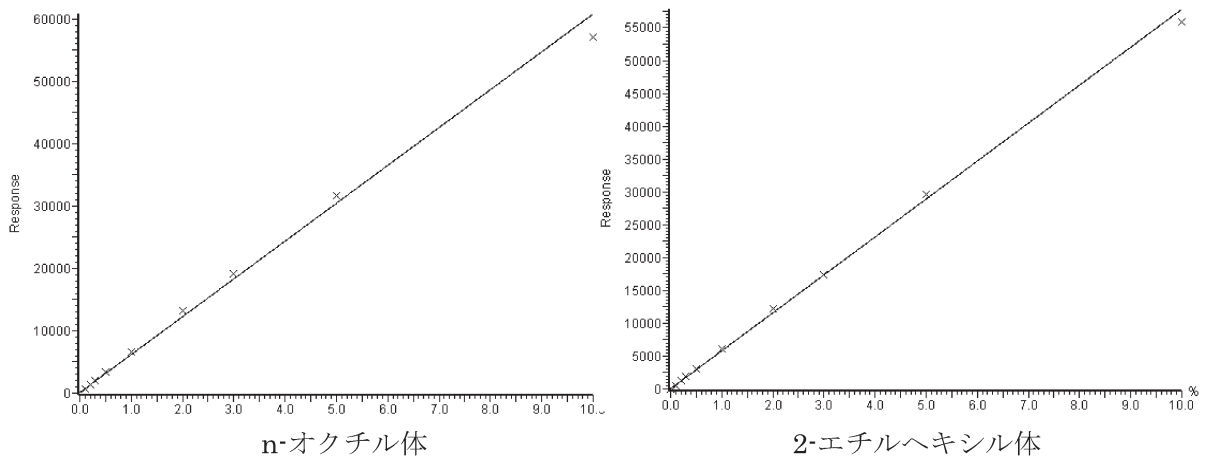


図8 検量線 (0.1ng/mL ~ 10ng/mL, 絶対検量線)

ンブラに起因するゴーストピークが検出されたため、アイソクラティック分析を行った。

対象物質は疎水性が高いため、LCの注入溶媒を含水するとバイアル容器やLCの配管系への吸着が懸念されたため、注入溶液の含水量の影響を検討した(図9)。目的物質は両異性体とも40%以上の含水率で定量値が低下する傾向を示した。

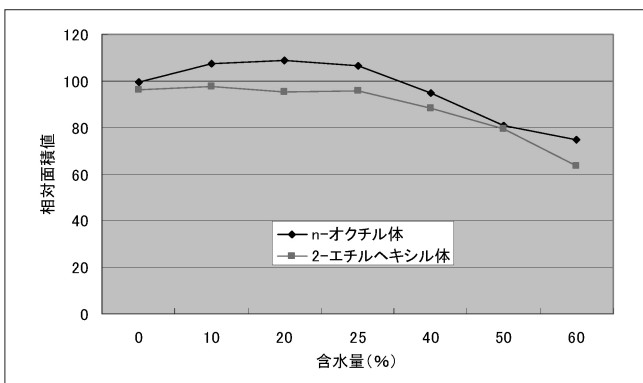


図9 LC注入溶液の含水量が相対感度(面積値)に与える影響

3.3 固相抽出法の検討

水質試料からの抽出法を各種固相抽出カートリッジを用いて検討した。実験は精製水100mLに標準品50ngを添加後通水し、固相カートリッジをメタノール、アセトン各5mLで溶出し、固相カートリッジを通過したろ液はジクロロメタンで抽出し、得られた溶出液及び抽出液は濃縮後、メタノール5mLに転容して測定した。その結果を図10に示したが、C8を固相材とするカートリッジが最も高い回収率を示した。C18, PS-2, HLB等の固相カートリッジの回収率は低く、添加した標準品の大部分がろ液に漏出していた(本実験では、ろ液の液々抽出を行う際に3.4項で述べる塩析を行わなかったため40%程度の低い回収率となっている)。対象物質が固相材に吸着しな

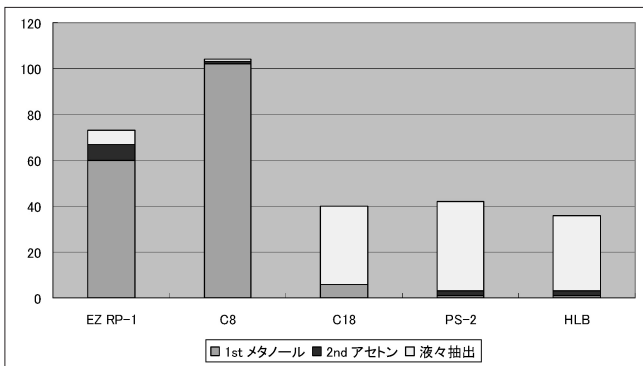


図10 各種固相カラムによる抽出 (n-オクチル体)

いでろ液に漏出する原因は、対象物質の水溶解度が極めて低いために、対象物質が水中で粒子状になり、固相に吸着されずに固相の隙間を通過する現象(チャンネル効果)が生じているものと考えられた。

3.4 液々抽出の検討

固相抽出法の検討(3.3項)において、C8以外の固相カートリッジの各分画(固相溶出液及びろ液)の回収率の合計が100%に達し無いことから、ジクロロメタンによるろ液からの抽出が不十分な可能性が示唆された。図11にジクロロメタンを用いた液々抽出の回収率を示したが、塩析を行わない場合には予想どおり40%程度の低い回収率となったが、塩析を行うと回収率が向上し、この効果は標準品を塩析前に添加しても、塩析後に添加しても変わらなかった。また、図12に示すとおり食塩(NaCl)を1%以上添加すると目的物質はほぼ100%回収されることが判明し、この現象は抽出溶媒をヘキサンに変更しても変わらなかった。

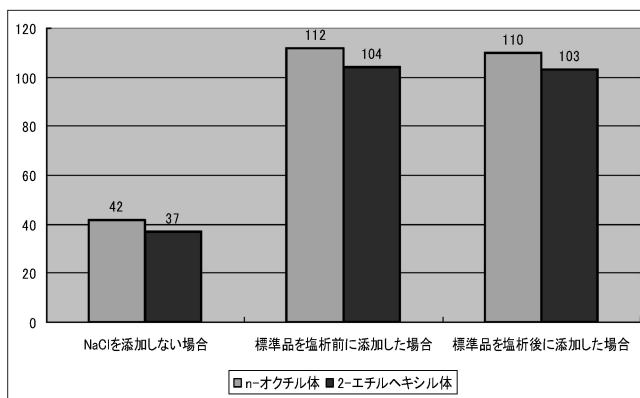


図11 液々抽出における塩析の効果

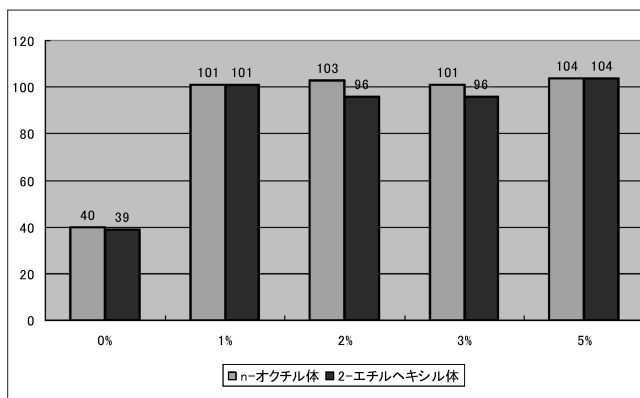


図12 塩析濃度の液々抽出率に対する影響 (抽出溶媒: ジクロロメタン)

3.5 クリーンアップの検討

液々抽出法では、固相抽出法に比較して夾雑物質の抽出量が増加するため、フロリジルカラム(1g, ガラス製注射筒タイプ)を用いたクリーンアップを検討し、その結果を表1に示した。

フロリジルカラムからは、ジクロロメタンを溶離溶媒としてシャープに溶出された。また、フロリジルカラムをジクロロメタンやアセトンで事前洗浄した後にヘキサンで再洗浄した場合では、事前洗浄を行わなかった場合と同等の溶離条件で溶出されていることから、ジクロロメタンやアセトンによる事前洗浄で低下した活性度がヘキサンによる再洗浄により回復することが判明した。なお、アセトンで事前洗浄した場合にはトリメリット酸エステル類の溶出が最も遅くなることから、脱水効果の高いアセトンがフロリジルの再活性化に効果的であることが判明した。また、トリメリット酸エステル類はカラム等のコンタミネーションが懸念されるが、この事前洗浄によりカラムから溶出する夾雑物の影響を軽減化することができた。

表1 フロリジルカートリッジカラムによるクリーンアップ

事前洗浄	分画	溶媒	溶媒量 (mL)	n-オクチル体回収率(%)	2-エチルヘキシル体回収率(%)
Hexane 5mLx2	fr.1	Hexane	0-5	0	0
	fr.2	30%DcmHex	0-5	0	0
	fr.3	Dcm	0-1	0	0
			1-2	0.7	1.9
			2-3	44	72.6
			3-4	63.2	36.0
4-5	7.9	1.5			
Dcm 5mL、 Hexane 5mLx3	fr.1	Hexane	0-5	0	0
	fr.2	30%DcmHex	0-5	0	3.2
	fr.3	Dcm	0-1	0.1	8.2
			1-2	64.9	73.5
			2-3	65.7	32.5
			3-4	1.7	0.9
4-5	0	0			
Dcm 5mL、 Hexane 5mLx3	fr.1	Hexane	0-3	0	0
	fr.2	20%DcmHex	0-5	0	0
	fr.3	Dcm	0-1	0	0
			1-2	78.6	87.1
			2-3	24.7	16.9
			3-4	0	0
4-5	0	0			
Acetone 5mL、 Hexane 5mLx3	fr.1	Hexane	0-5	0	0
	fr.2	30%DcmHex	0-5	0	0
	fr.3	Dcm	0-1	0	0
			1-2	0.6	2
			2-3	30.8	44.3
			3-4	52.6	42.9
4-5	35.5	15.6			

注: Ac:アセトン Dcm:ジクロロメタン

3.6 分解性スクリーニング及び河川水中保存性試験結果

水中における安定性を確認する目的で、分解性スクリーニング試験を実施した。標準品添加1時間後の残存率を100%とした試験結果を表2に示した。n-オクチル体は酸性下の明所で分解する傾向を示したが、2-エチルヘキシル体は全ての試験条件において安定であった。

化学物質の分析では試料採取後できるだけ早期に分析を開始し、目的物質を抽出する必要があるが、試料採取後直ちに分析を開始できない場合もあるため、新鮮な河川水に標準液を添加し冷暗所に保存して保存中における安定性を検討した。表3に示すように、n-オクチル体は冷暗所に1週間保存した場合には約85%が残存し、比較的安定であることが判明した。

表2 分解性スクリーニング試験

物質名	pH	初期濃度 (μg/L)	1時間後の残存率 (%)	5日後の残存率	
				暗所 (%)	明所 (%)
n-オクチル体	5	0.5	98	98	44
	7	0.5	100	92	103
	9	0.5	97	106	116
2-エチルヘキシル体	5	0.5	102	100	89
	7	0.5	107	98	97
	9	0.5	109	99	103

表3 保存性試験 (河川水)

物質名	添加量 (μg/L)	7日後残存率 (%)	CV (%)
n-オクチル体	0.1	84.1	2.5
2-エチルヘキシル体	0.1	103.9	3.5

3.7 添加回収率及び検出下限値 (MDL) の検討

河川水及び海水について固相抽出法及び液々抽出法を用いて添加回収率を検討した。固相抽出法の回収率は両異性体とも約70%と低く、また2-エチルヘキシル体の変動率が大きな傾向を示した。一方、液々抽出法の回収率は95~105%と高い回収率を示した(表4)。

検出下限値は液々抽出法でn-オクチル体が約10ng/L、2-エチルヘキシル体が約20ng/Lであった。

3.8 環境試料の分析例

固相抽出法及び液々抽出法による分析例を図13及び14に示す。測定に支障を生じる妨害ピークは検出されなかったが、液々抽出法では精製水に由来すると考えられるブランクが検出され、今後ブランクの低減化を図る必要が認められた。

4 まとめ

可塑剤であるトリメリット酸トリオクチル(n-オクチル体及び2-エチルヘキシル体)についてLC/MS/MSを用いた分析法を検討し、次に示す結果を得た。

- 1) 検討対象物質は、高沸点のためGC保持時間が長く、GC/MSに対する感度も低いため安定した分析は困難であった。
- 2) 検討対象物質は、LC/MS分析ではいずれもESI Positiveモードでイオン化され、SRM(MS/MS)法による測定が可能で、GC/MS法に比較して千倍程度高感度であった。
- 3) 検討対象物質は、逆相系カラム(Atlantis T3)で相互に分離できたが、グラジエント分析ではゴーストピークが生じるため、アイソクラティックな移動相条

件にする必要があった。

- 4) 固相抽出法では、検討対象物質が固相との相互作用なしに固相を通過する現象(チャンネル効果)が生じ、C8以外の固相では十分な回収率が得られなかった。
- 5) ジクロロメタン及びヘキサンを用いた液々抽出法では、塩析を行わない場合には回収率が40%程度と低かったが、1%以上の塩析で100%に近い回収率が得られた。
- 6) フロリジルカートリッジカラムを用いたクリーンアップでは、極性溶媒を用いた事前洗浄を行った後、ヘキサンによる再洗浄を行うことにより、活性度の復活とブランク値の低減化を図ることができた。
- 7) 液々抽出法は固相抽出法に比較して安定した高い回収率が得られたが、ブランク値が高い欠点があった。

表4 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出(水質)

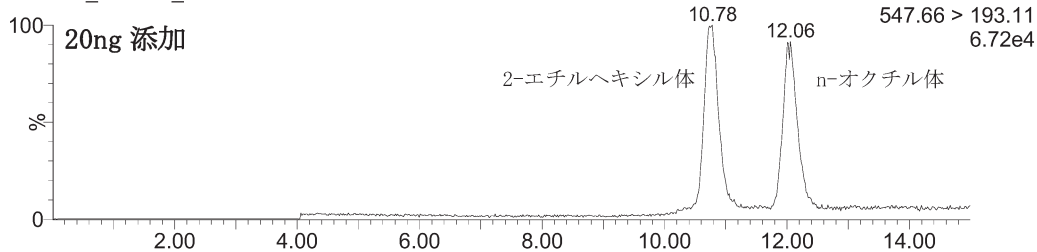
物質名	n-オクチル体		2-エチルヘキシル体		n-オクチル体		2-エチルヘキシル体	
	固相抽出(C8)		液々抽出		液々抽出		液々抽出	
前処理法	河川水		河川水		河川水		海水	
試料	河川水		河川水		河川水		海水	
試料量(mL)	100	100	100	100	100	100	100	100
標準添加量(ng)	20	20	10	10	10	10	10	10
試料換算濃度(ng/L)	200	200	100	100	100	100	100	100
最終液量(mL)	5	5	2	2	2	2	2	2
注入濃度(ng/mL)	4	4	5	5	5	5	5	5
装置注入量(μL)	10	10	10	10	10	10	10	10
操作ブランク平均(ng/L) ^①	0	0	3.4	14.2	3.4	14.2	3.4	14.2
無添加平均(ng/L) ^②	0	0	2.7	9.1	2.9	9.1	2.9	9.1
結果1(ng/L)	142	174	100	109	98	121	98	121
結果2(ng/L)	135	148	99	120	97	118	97	118
結果3(ng/L)	146	171	93	108	104	130	104	130
結果4(ng/L)	139	162	102	115	95	115	95	115
結果5(ng/L)	135	130	97	112	101	119	101	119
結果6(ng/L)	134	128	98	111	99	123	99	123
結果7(ng/L)	142	90	97	109	97	119	97	119
平均値(ng/L)	139.1	143.4	98.1	112.1	98.4	120.8	98.4	120.8
標準偏差(ng/L)	4.76	30.06	2.81	4.29	2.90	4.71	2.90	4.71
MDL(ng/L)	18.5	116.8	10.9	16.7	11.3	18.3	11.3	18.3
MQL(ng/L)	47.6	300.6	28.1	42.9	29.0	47.1	29.0	47.1
S/N								
CV(%)	3.4	21.0	2.9	3.8	2.9	3.9	2.9	3.9
回収率(%)	69.5	71.7	95.3	102.9	95.5	105.3	95.5	105.3

※MDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ ※MQL= $\sigma_{n-1} \times 10$

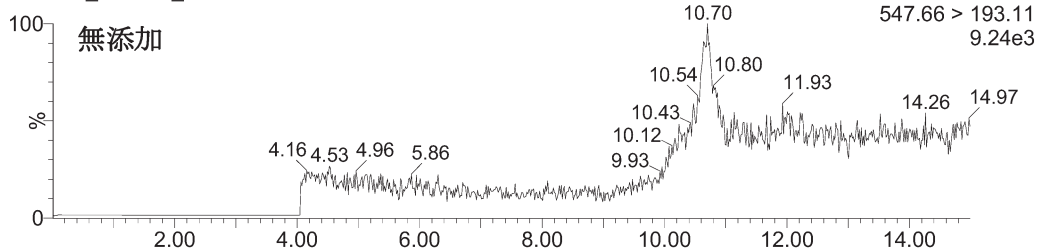
①操作ブランク平均: 試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値

②無添加平均: MDL算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

Add-1 River C8-Plus 20ng/5mL/100mL IS:10ng/5mL W755+W705NB Waters Atlantis T3 2.1
 20080818_BTOTC_659



20080818_BTOTC_656



20080818_BTOTC_654

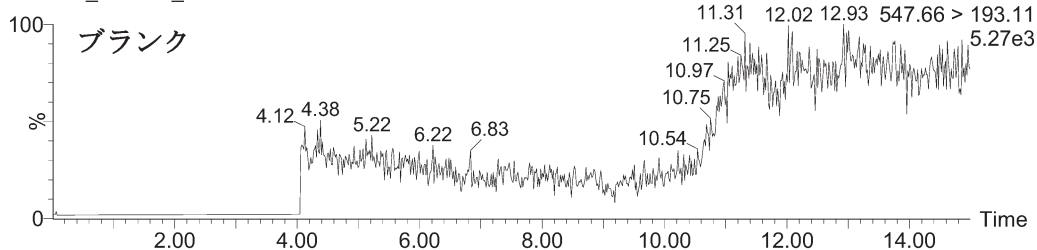
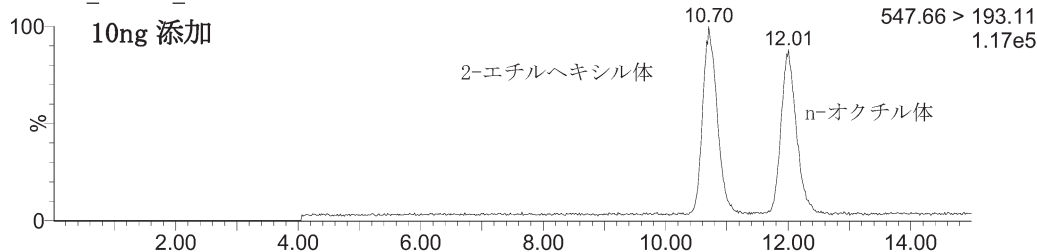
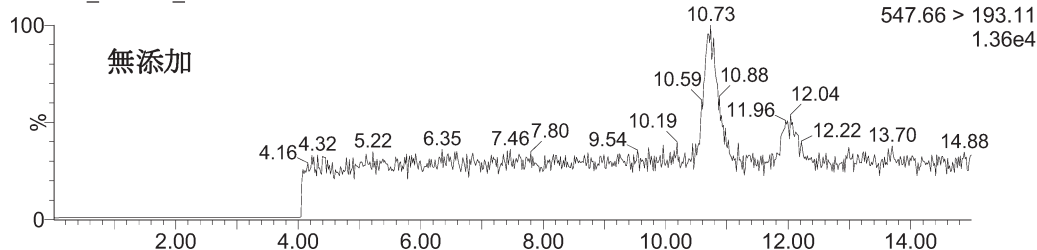


図13 河川水 (固相抽出法) のクロマトグラム

Add-1 River 10ng/2mL for Recovery IS:10ng/2mL W755+W705NB Waters Atlantis T3 2.1-
 20080818_BTOTC_734



20080818_BTOTC_749



20080818_BTOTC_747

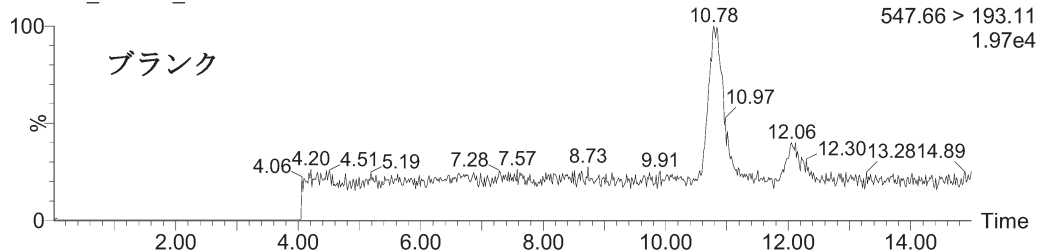


図14 河川水 (液々抽出法) のクロマトグラム

なお、本研究は環境省委託の平成20年度化学物質環境実態調査と連携して実施した。

文 献

- 1) 化学工業日報社：13398の化学商品，1017-1033，1998
- 2) 環境庁保健調査室：WHO環境保健クライテリア131 フタル酸ジエチルヘキシル，1993
- 3) 環境庁保健調査室：WHO環境保健クライテリア110・111・112 リン酸トリクレジル，リン酸トリフェニル，リン酸トリ-n-ブチル，1992
- 4) 環境省環境安全課：平成9年(1997年)版 化学物質と環境，1998
- 5) 土屋悦輝他編：水のリスクマネジメント実務指針，316-328，サイエンスフォーラム，東京，1998
- 6) 日本公衆衛生協会：外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書，1997
- 7) 環境庁環境安全課：平成7年度化学物質分析法開発調査報告書(フタル酸エステル類)，127-177，1996
- 8) 環境庁環境安全課：平成7年度化学物質分析法開発調査報告書(有機リン酸トリエステル類(OPEs)の分析法)，71-114，1999
- 9) 剣持堅志他：環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究—LC/MS法による中鎖及び短鎖塩素化パラフィン類の同時分析法—，岡山県環境保健センター年報，29，33-41，2005
- 10) 環境省環境安全課：化学物質環境実態調査におけるLC/MSを用いた化学物質の分析法とその解説，8-16，2006