

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—

吉岡敏行, 劔持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 前田大輔 (水質科)

【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

—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—

Study for Simultaneous Analysis Method of Toluidine and Methylnaphthalene in Water by GC/MS

吉岡敏行, 劔持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 前田大輔 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Katashi Kenmotsu, Hiroichi Fujiwara,

Motoharu Nakagiri, Daisuke Maeda

要 旨

トルイジンとメチルナフタレンの水質分析法について検討した。前処理法は、固相抽出又はジクロロメタンによる液々抽出を行い、必要に応じて5%含水シリカゲルカラムで精製した。市販の固相剤及びシリカゲルカートリッジカラムは、メチルナフタレンに汚染されていることが判明し、複数の製品を比較し、回収率が高く、できるだけ汚染が少ない製品を選定した。また、シリカゲルカートリッジカラムは、ハウジングがガラス製の製品でもテフロンフリッツが汚染されており、自家調製したものを使用した。測定は、GC/MS-SIMで行い、要求感度を十分満足する1ng/L未満の検出下限値が得られた。保存試料を分析したところ、低濃度であるがいずれの物質も検出された。

[キーワード：トルイジン, メチルナフタレン, GC/MS, 固相抽出, 汚染]

[Key words : Toluidine, Methylnaphthalene, GC/MS, Solid Phase Extraction, Contamination]

1 はじめに

当センターは、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を開発し、環境中の化学物質の濃度レベルの把握に努めている。今回、平成21年度化学物質環境実態調査でo-トルイジン及び1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレンの水質中の同時分析法について検討したので報告する。

され、最大濃度は12ng/Lであった³⁾。メチルナフタレンは、1-メチルナフタレンと2-メチルナフタレンの異性体

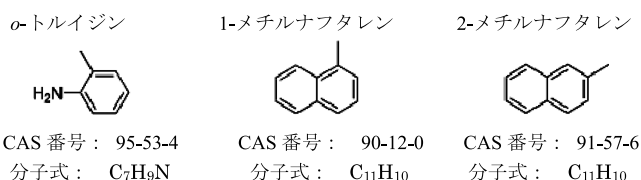


図1 対象物質の構造式等

2 実験方法

2.1 対象物質

対象物質の構造式等を図1に、物理化学的性状及び用途、毒性等を表1及び表2に示す。o-トルイジンは、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)で第三種監視化学物質に指定され、染料の中間体原料¹⁾等の用途があり、m-トルイジンとp-トルイジンの異性体がある。2003年の製造、輸入量は1,002t²⁾で、環境への排出はほとんどが大気(5t)への排出である。平成15年度に環境省が実施した要調査項目等の存在状況調査結果、o-トルイジンは公共用水域の水質50地点中10地点で検出

表1 物理化学的性状

物質名	分子量	沸点 (°C)	融点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
o-トルイジン	107.2	200~202	-21	16.6	1.32
1-メチルナフタレン	142.2	247.7	-30.43	25.8	3.87
2-メチルナフタレン	142.2	241.1	34.4	24.6	3.86

表2 用途・毒性等

	用途	魚毒性 (mg/L)	ADI (mg/kg/日)	急性毒性 (LD50) (げっ歯類経口投与等) (mg/kg)
o-トルイジン	染料中間体	13	23.7	750
1-メチルナフタレン	ナフトール原料、蛍光増白剤、界面活性剤原料	5.7	72	1,840
2-メチルナフタレン	ナフトール原料、ピタインK3用原料		50	1,630

があり、1-メチルナフタレンは化審法で第三種監視化学物質に指定されている。1-メチルナフタレンはナフトエ酸、蛍光増白剤、界面活性剤原料、2-メチルナフタレンはビタミンK3用原料、 β -ナフトエ酸原料の用途¹⁾があり、また、A重油等の燃料油に1.4%程度で含有されている。OECDへ報告されたメチルナフタレンの製造、輸入量は1,000t以上10,000t未満⁴⁾である。メチルナフタレンは1979年に環境庁が実施した調査⁵⁾では、検出限界0.2~1 μ g/Lで水質28地点を調査し、いずれの地点からも検出されなかった。

既存の分析法として、*o*-トルイジンは水質試料を固相抽出後GC/MS測定を行うもの⁶⁾があり、また、メチルナフタレンは大気試料を捕集管に吸着し、加熱脱着後、低温濃縮し、GC/MS測定を行うもの⁷⁾があった。今回の分析法開発を行う際の要求感度は、*o*-トルイジンが130ng/L、1-メチルナフタレンと2-メチルナフタレンが200ng/Lであり、既存の分析法を参考に固相抽出後にシリカゲルクリーンアップを行い、GC/MSで測定する分析法を検討した。

2.2 試薬

o-トルイジン、*p*-トルイジン、*m*-トルイジン：

特級 和光純薬工業製(99.0%)

o-トルイジン-*d*₉：CDN ISOTOPES製(98%)

1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレン：

特級 和光純薬工業製(97.0%, 96.0%)

1-メチルナフタレン-*d*₁₀、2-メチルナフタレン-*d*₁₀：

CIL製(98%)

ナフタレン-*d*₈：CIL製(99.5%)

ジクロロメタン、アセトン、ヘキサン：残留農薬・PCB試験用(5000倍濃縮品)

塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用固相カートリッジ：VARIAN製 absolut Jr NEXUS(200mg)等

シリカゲル：ワコーゲル(R)C-200 和光純薬工業製

精製水：Milli-Q Advantage Millipore製

2.3 GC/MSの測定条件

今回検討したGC/MSの測定条件を表3に示す。

2.4 分析フロー及び前処理工程における検討

今回検討した分析フローを図2に示す。

前処理工程では、抽出方法とカラムクリーンアップについて検討を行った。抽出方法はジクロロメタンによる液々抽出と固相抽出を比較した。カラムクリーンアップは、自家調製した5%含水シリカゲルカラムと5%含水フロリジルカラムを用いて標準物質の溶出パターンを確認した。

表3 GC/MSの測定条件

〔測定条件〕	
GC/MS	: GC: Agilent 6890, MS: JEOL JMS-Am II
カラム	: DB-WAX 30 m×0.25 mm×0.5 μ m (J&W)
カラム温度	: 50 °C (2 min) - 10 °C/min - 230 °C (10 min)
注入方法	: スプリットレス パージ開始時間 1.5 min
注入口温度	: 200 °C
注入量	: 1 μ L
キャリアーガス	: ヘリウム(1 mL/min)
インターフェース温度	: 200 °C
イオン源温度	: 200 °C
イオン化電圧	: 70 eV
イオン化電流	: 300 μ A
検出モード	: SIM
モニターイオン	<i>o</i> - <i>p</i> - <i>m</i> -トルイジン: 106.1(107.1) <i>o</i> -トルイジン- <i>d</i> ₉ : 112.1(114.1) 1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレン: 142.1(141.1) 1-メチルナフタレン- <i>d</i> ₁₀ 、2-メチルナフタレン- <i>d</i> ₁₀ : 152.1(150.1) ナフタレン- <i>d</i> ₈ : 136.1

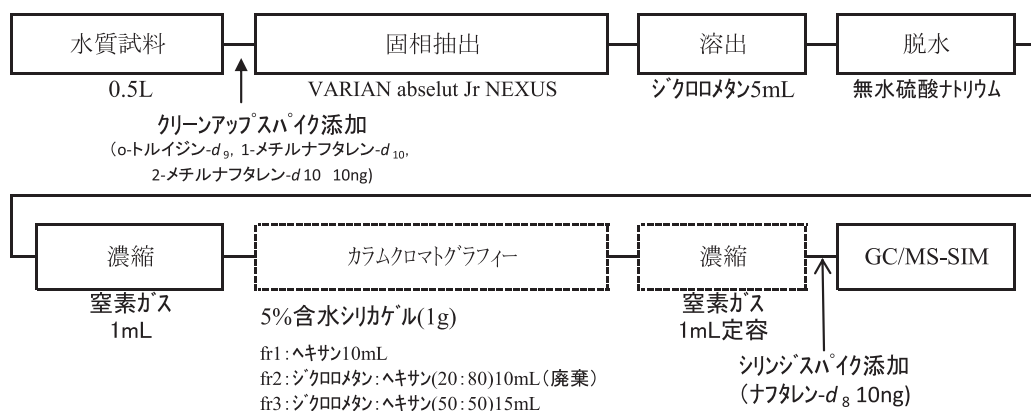


図2 分析フロー

2.5 分解性スクリーニング試験及び分解性試験

化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年3月)⁸⁾に基づき、分解性スクリーニング試験を実施した。試験液は精製水を用いてpH5とpH7、pH9のものを作成し、対象物質の濃度が0.1 μ g/Lになるように添加し、1時間後及び7日後(明所及び暗所に保存)にジクロロメタン抽出を行い、GC/MSで測定した。

保存性試験は、河川水に対象物質の濃度が0.1 μ g/Lになるように添加し、4時間後及び7日後及び14日後(冷暗所に保存)にジクロロメタン抽出を行い、GC/MSで測定した。

2.6 検出下限値及び定量下限値

分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)は、化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成20年度版)⁸⁾に従って実施した。旭川(乙井手堰)の水質試料0.5Lに標準物質を0.5ng添加した試料を7個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定し、MDLとMQLを算出した。

2.7 添加回収試験及び水質試料の分析

河川水は、旭川(乙井手堰)の水質試料0.5Lに標準物質を0.5ng添加し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定した。海水は、水島沖の水質試料1Lに標

準物質を25ng添加し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定した。ただし、抽出方法はジクロロメタン抽出とし、クリーンアップ操作は省略した。

また、公共用水域の保存水質試料を分析し、環境試料からの検出の有無を確認した。

3 検討結果及び考察

3.1 GC/MS測定条件の検討結果

標準物質のマスペクトルを図3に、GCカラムでの分離状況を図4に示す。微極性のDB-5MS(J&W社製)ではトルイジンの異性体が分離できなかったが、強極性のDB-WAX(J&W社製)ではトルイジンの異性体が完全に分離できたため、今回の分析法に採用した。他社のWAX系のカラムの分離状況を図5に示すが、DB-WAXと同等の分離状況を示した。

また、トルイジンと同じ分子式を持つジメチルピリジン(5異性体)及びエチルピリジン(3異性体)、ベンジルアミン、N-メチルアニリンとの分離状況を図6に示したが、いずれの物質もトルイジンよりリテンションタイムが早く、相互に分離できることを確認した。

検量線を図7と図8に示すが、0.30~5.0ng/mLの低濃度領域(図7)、0.30~100ng/mLの高濃度領域(図8)でも相関の高い直線性のある検量線が得られた。

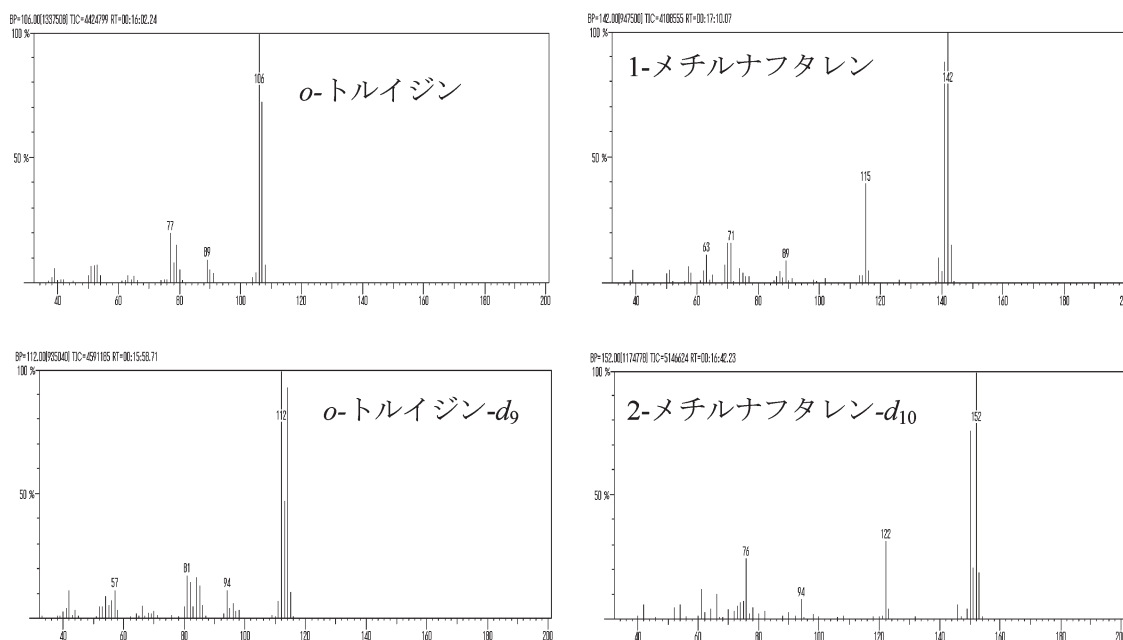


図3 標準物質のマスペクトル

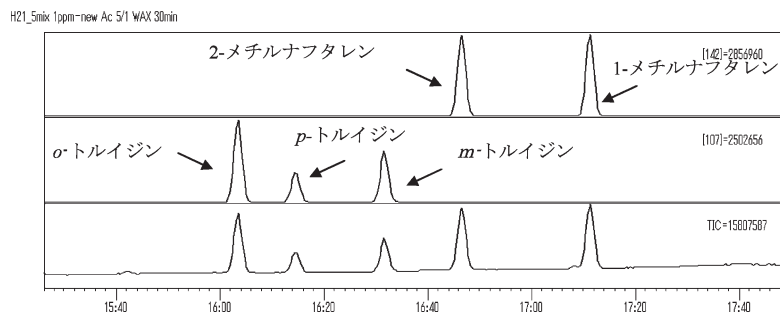
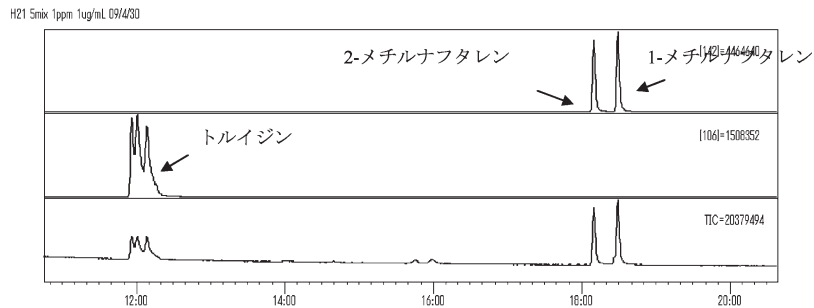


図4 標準物質の分離状況 (上段：DB-5MS(30m), 下段：DB-WAX(30m))

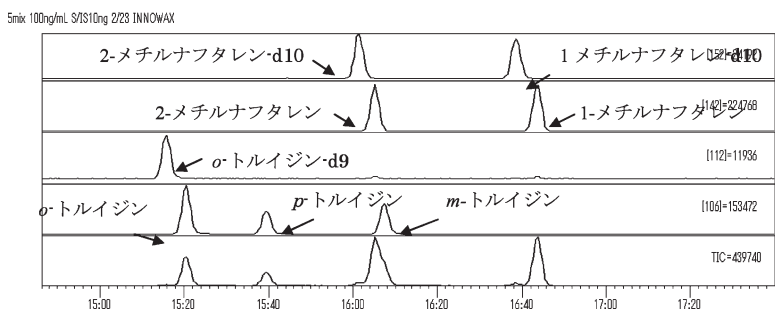
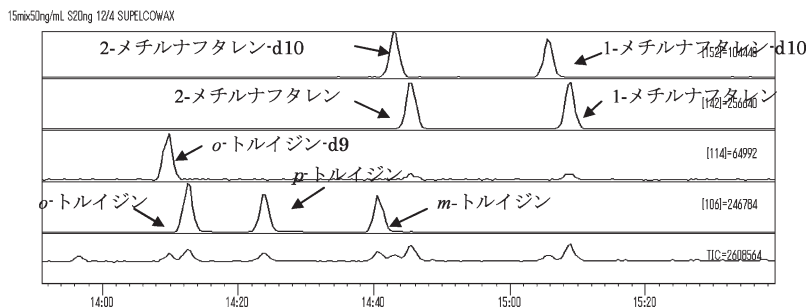


図5 標準物質の分離状況 (上段：SUPELCOWAX10(30m), 下段：HP-INNOWax(30m))

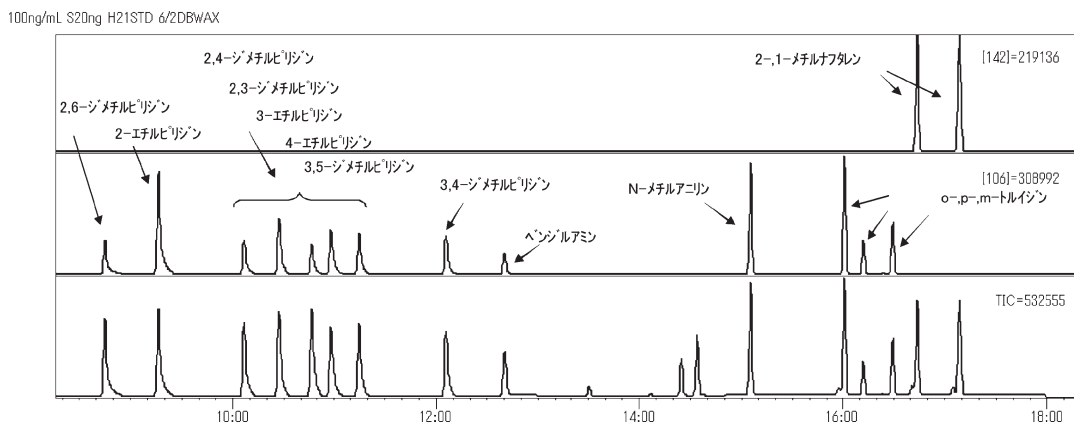


図6 トルイジンと同じ分子式(C₇H₈N)の物質との分離状況(DB-WAX(30m))

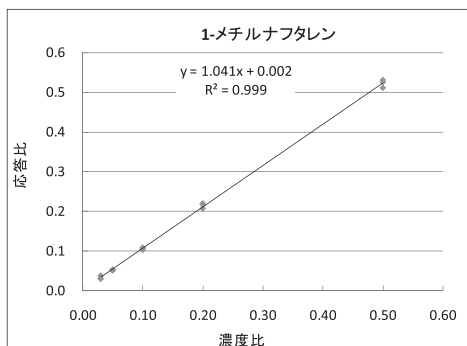
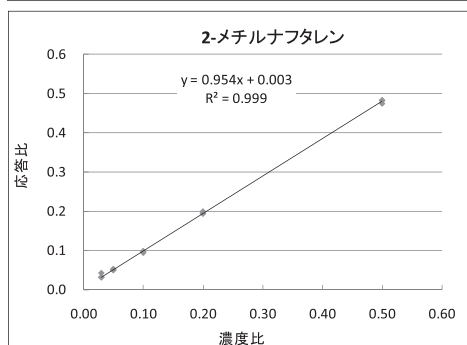
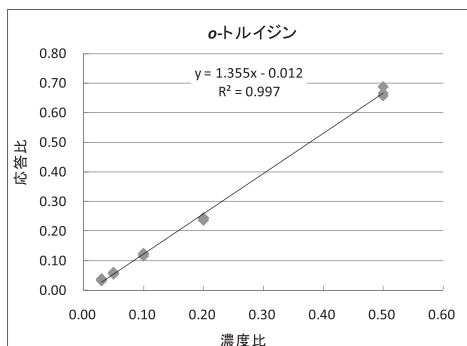


図7 検量線：o-トルイジン，2-メチルナフタレン，1-メチルナフタレン
 サロゲート物質 10.0ng/mL
 対象物質濃度範囲 0.30～5.0ng/mL

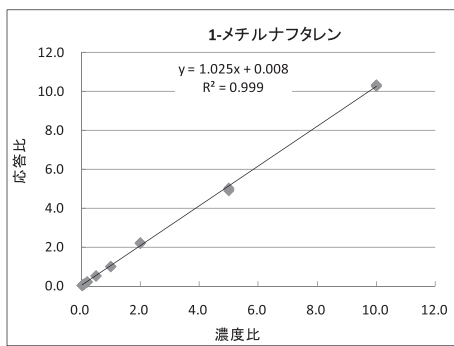
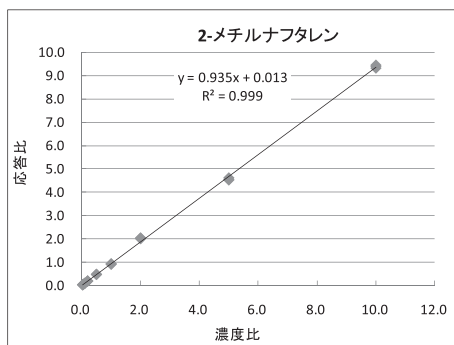
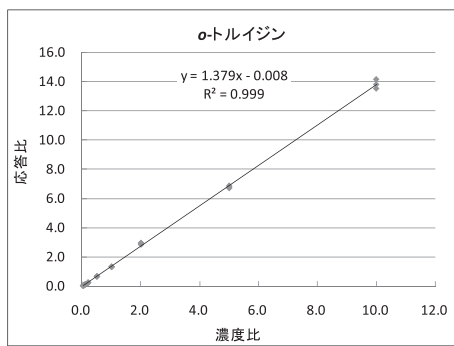


図8 検量線：o-トルイジン，2-メチルナフタレン，1-メチルナフタレン
 サロゲート物質 10ng/mL
 対象物質濃度範囲 0.30～100ng/mL

3.2 抽出方法の検討

溶媒抽出の検討結果を図9に示す。精製水0.1Lに標準物質を0.5 μ g添加し，塩化ナトリウムを5g添加し，各溶媒で2回(10mL，5mL)抽出し，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ロータリーエバポレーターで1mLまで濃縮した。ジクロロメタン抽出では，いずれの物質も回収率が80%以上であった。ヘキサン抽出では，メチルナフタレンの回収率に問題はなかったが，o-トルイジンの回収率は50%程度であった。このため，表4に示す固相剤について固相抽出を検討した(図10)。実験は，精製水0.1Lに標準物質を0.5ng添加し，固相抽出後，ジクロロメタン5mLで溶出し，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ロータリーエバポレーターで1mLまで濃縮して行った。miniRP-1，SPEC EDS-1及びABS ELUTE-NEXSで良好な回収率

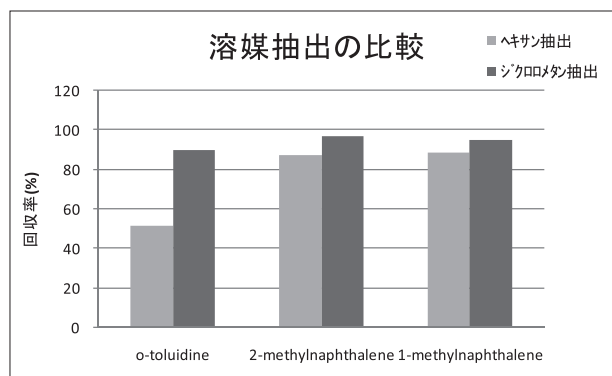


図9 溶媒抽出の検討結果

を示したが，Presep-C及びPLS-3 Jrは，o-トルイジンの回収率が若干低い傾向が認められた。一方，EnviChlom-Pは，メチルナフタレンの回収率が200%を超過し，無添加の固相からもメチルナフタレンの溶出が

認められたことから、固相材質にメチルナフタレンが含まれていると考えられた。このため、ブランクが低く安定した値を示したABS ELUTE-NEXSを選択した。

表4 検討した固相の種類

固相の種類	メーカー	容量
Presep-C RPP (short)	和光純薬	190 mg
ABS ELUTE-NEXUS	VARIAN	200 mg
PLS-3 Jr	GL サイエンス	230 mg
miniRP-1	GL サイエンス	230 mg
EnviChlom-P	SUPELCO	340 mg
SPEC EDS-1	Shodex	500 mg

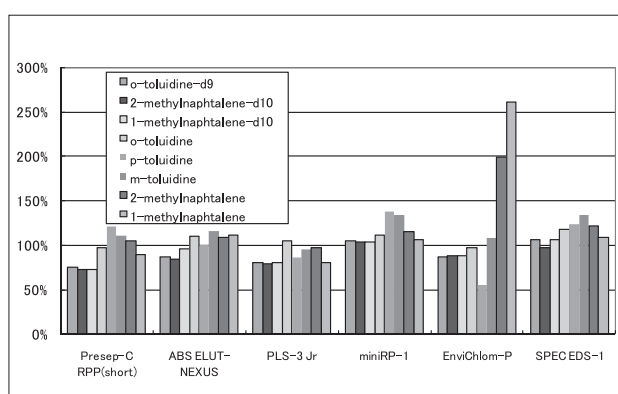


図10 固相抽出の検討結果 (添加量 0.5ng/100mL)

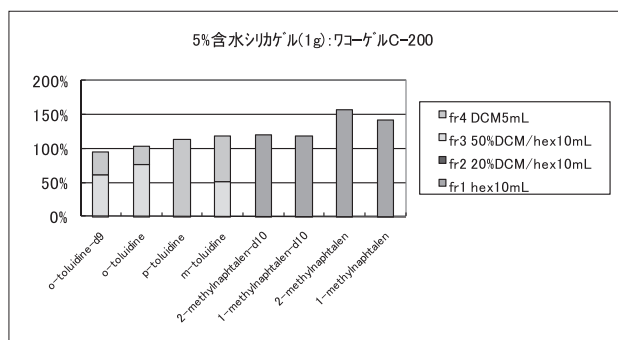


図11 5%含水シリカゲルの溶出パターン

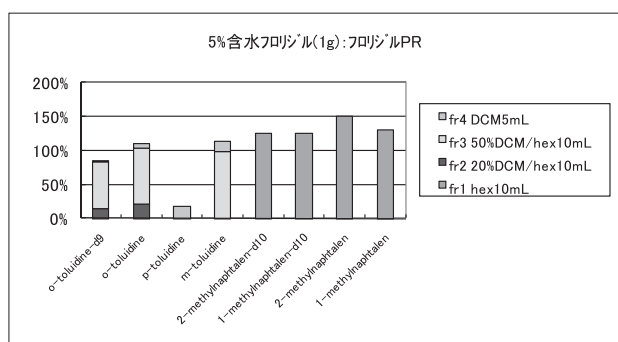


図12 5%含水フロリジルの溶出パターン

3.3 クリーンアップ方法の検討

カラムクリーンアップの検討結果を図11に示す。当初、市販のシリカゲルカートリッジカラムの検討を行ったが、ガラス製のものであってもメチルナフタレンの溶出が認められたことから、自家調製した5%含水シリカゲル(1g)又は5%含水フロリジル(1g)を内径10mmのガラス製のクロマト管に詰めたもので検討を行った。溶出溶媒は、クリーンアップ効果を考慮し、ヘキサンとジクロロメタンとした。シリカゲルの場合は、メチルナフタレンはヘキサン分画に溶出し、o-トルイジン、p-トルイジン、m-トルイジンはジクロロメタン：ヘキサン(50：50)から(75：25)の分画に溶出した。第4分画及び第5分画には、水質を抽出した場合の着色成分はほとんど溶出しなかった。なお、フロリジルの場合は、p-トルイジンがジクロロメタン5mL程度では溶出できないことから、フロリジルは採用せず、シリカゲルを採用した。

3.4 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5に示す。この条件下では液性や光の影響は受けず、分解性はほとんど認められなかった。

表5 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
o-toluidine	5	109	106	106
	7	104	101	102
	9	104	108	92
2-methylnaphthalene	5	92	97	93
	7	88	93	95
	9	87	93	93
1-methylnaphthalene	5	91	97	94
	7	89	93	93
	9	87	93	93

保存性試験結果を図13に示す。時間の経過とともに若干、濃度の減少傾向が認められたことから、試料採取後、1週間以内に分析することが望ましいと考えられた。

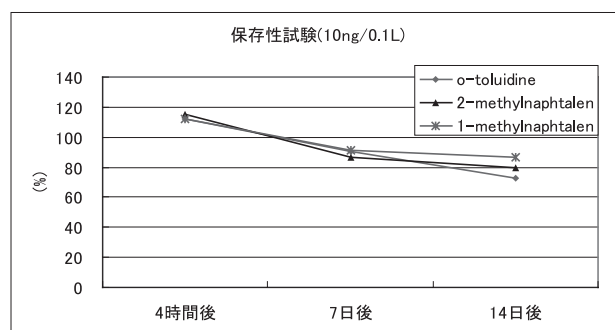


図13 保存性試験結果

3.5 分析法のMDL及びMQL

MDL及びMQLを表6に示す。MDLは0.26～0.34ng/L、MQLは0.68～0.88ng/Lであり、要求感度を十分満足できる分析方法を開発することができた。

表6 検出下限値及び定量下限値

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
o-トルイジン	0.5	1	0.29	0.74
p-トルイジン	0.5	1	0.31	0.80
m-トルイジン	0.5	1	0.28	0.73
2-メチルナフタレン	0.5	1	0.34	0.88
1-メチルナフタレン	0.5	1	0.26	0.68

3.6 添加回収試験及び水質試料の分析結果

添加回収試験結果を表7に示す。無添加の河川水には、o-トルイジンは検出されなかったが、2-メチルナフタレンが平均0.71ng/L、1-メチルナフタレンが平均0.56ng/L

検出された。添加回収率は103～137%であった。一方、無添加の海水には、o-トルイジンが平均2.53ng/L、2-メチルナフタレンが平均5.97ng/L、1-メチルナフタレンが平均5.77ng/L検出された。添加回収率は99～131%であった。

サロゲートの回収率は、2-メチルナフタレン-d10と1-メチルナフタレン-d10は河川水で77～82%、海水で82～90%と問題がなかった。しかし、o-トルイジン-d9は、シリカゲルクリーンアップを実施した河川水で50～56%とやや低く、クリーンアップ操作を省略した海水では74～84%であったことから、シリカゲルクリーンアップの操作でやや回収率が低下したと考えられた。添加回収試験時のクロマトグラムを図14～図19に示す。対象物質のリテンションタイム付近には、ほとんど妨害ピークは認められなかった。

表7 添加回収試験結果

試料	物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	サロゲート回収率(%)
河川水	o-toluidine	0.5	0	2	<0.29	-	56%
		0.5	0.5	7	1.69	137%	50%
	2-methylnaphthalene	0.5	0	2	0.71	-	80%
		0.5	0.5	7	1.51	112%	77%
	1-methylnaphthalene	0.5	0	2	0.56	-	82%
		0.5	0.5	7	1.32	103%	79%
海水	o-toluidine	1	0	2	2.53	-	74%
		1	25	5	31.1	114%	84%
	p-toluidine	1	0	2	<0.31	-	74%
		1	25	5	34.3	131%	84%
	m-toluidine	1	0	2	<0.28	-	74%
		1	25	5	28.8	113%	84%
	2-methylnaphthalene	1	0	2	5.93	-	82%
		1	25	5	30.7	99%	90%
	1-methylnaphthalene	1	0	2	5.77	-	83%
		1	25	5	30.9	100%	90%

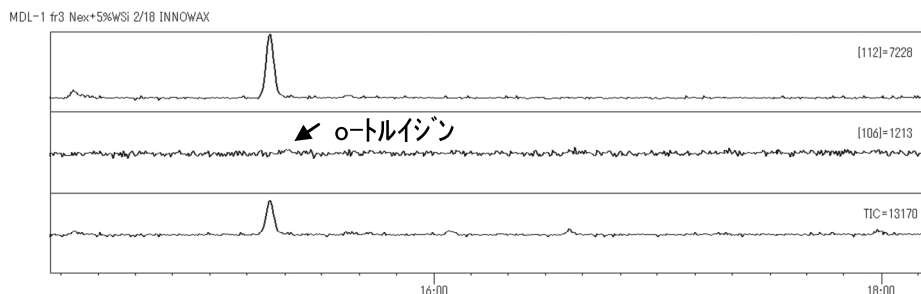


図14 河川水(無添加)のクロマトグラム(5%含水シリカゲル第2分画)

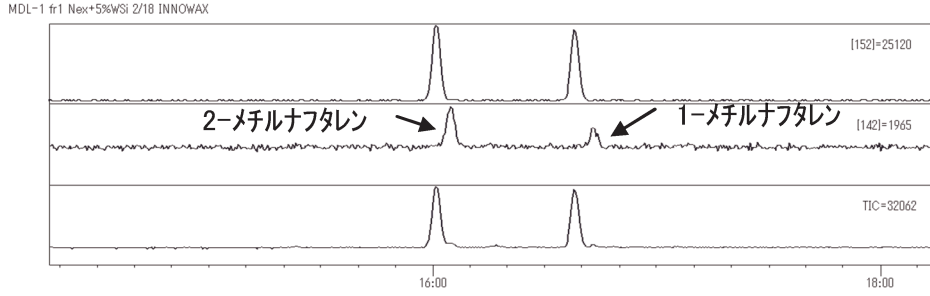


図15 河川水(無添加)のクロマトグラム (5%含水シリカゲル第1分画)

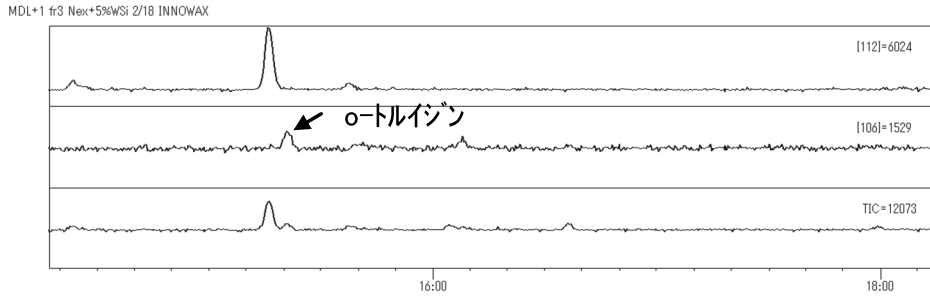


図16 河川水(添加)のクロマトグラム (5%含水シリカゲル第2分画)

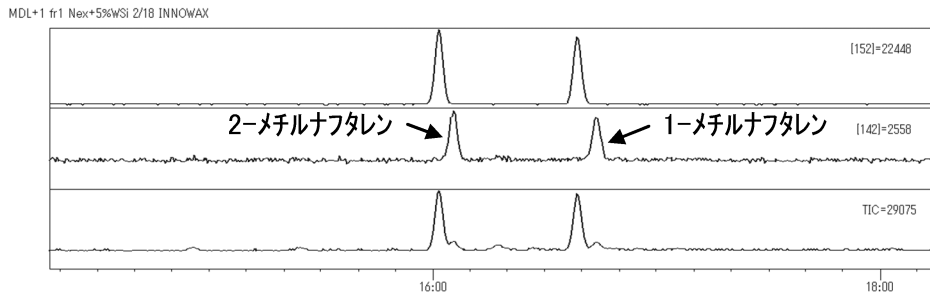


図17 河川水(添加)のクロマトグラム (5%含水シリカゲル第1分画)

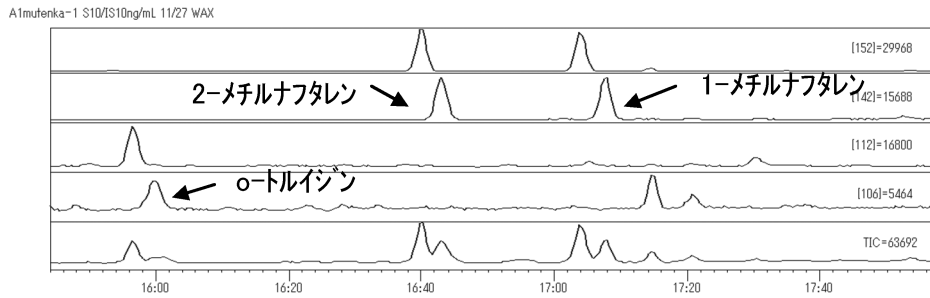


図18 海水(無添加)のクロマトグラム (クリーンアップ無し)

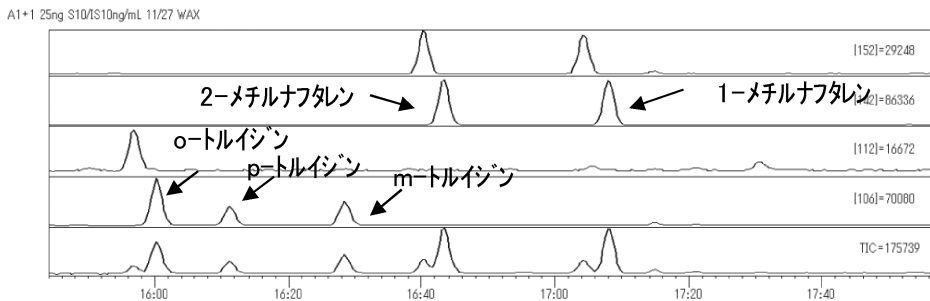


図19 海水(添加)のクロマトグラム (クリーンアップ無し)

公共用水域の分析結果を図20に示す。試料は、平成21年10月から11月に採取した冷蔵保存試料を平成22年1月に分析を行った。o-トルイジンは吉井川の熊山橋で10ng/L程度検出され、上流域に何らかの発生源があることが示唆された。p-トルイジンは倉敷川の倉敷川橋で5.5ng/L程度検出された。

一方、2-メチルナフタレン及び1-メチルナフタレンは

玉島港沖合で4.5ng/L程度検出された。メチルナフタレンはA重油に含まれていることから、各種鉱物油中のメチルナフタレンを測定したところ、図21に示すように沸点の高い潤滑油類を除いた燃料系の鉱物油にはメチルナフタレンが含まれていることが確認できた。したがって、メチルナフタレンは燃料油の汚染指標のひとつとなる可能性が考えられた。

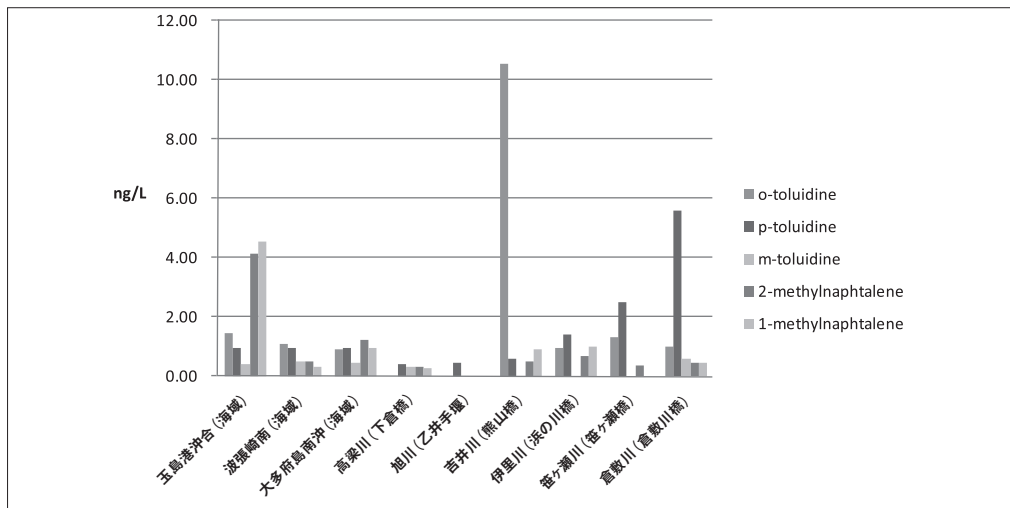


図20 公共用水域の分析結果

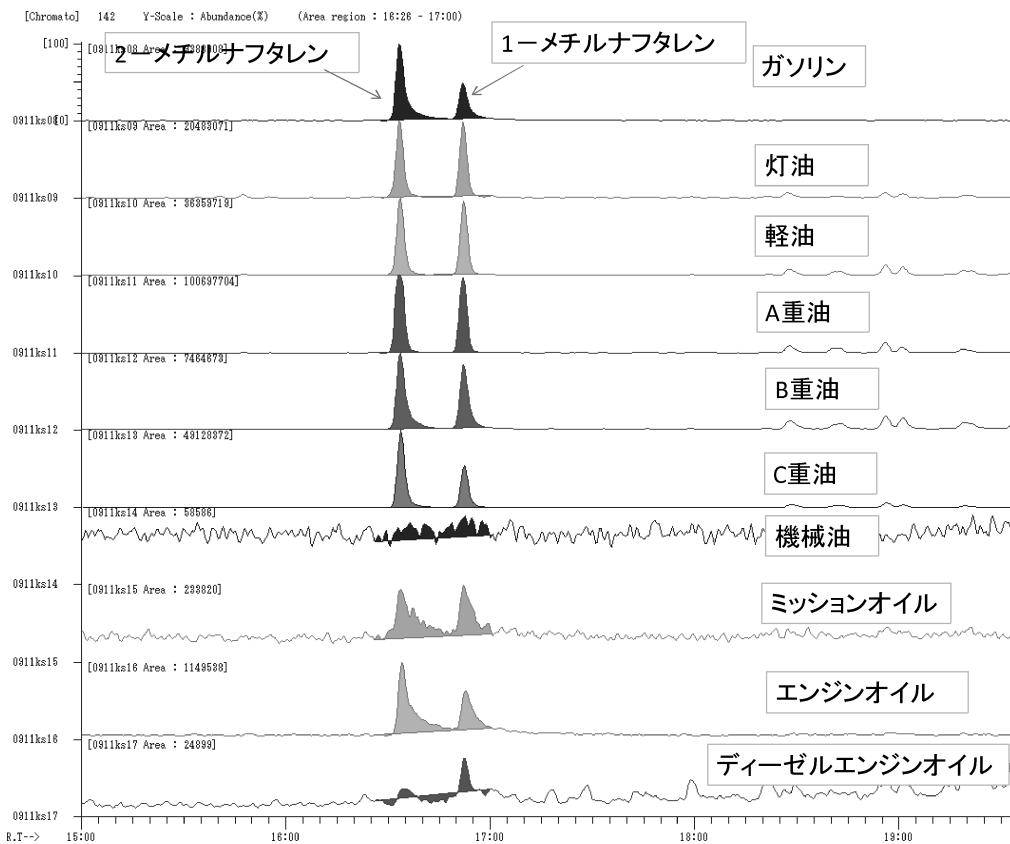


図21 各種鉱物油中のメチルナフタレン

4 まとめ

トルイジンとメチルナフタレンの水質分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) 水質試料0.5Lを固相抽出し、5%含水シリカゲルクリーンアップ後、最終液量1mLとし、GC/MS法で測定する方法でMDLはo-トルイジンが0.29ng/L、2-メチルナフタレンが0.34ng/L、1-メチルナフタレンが0.26ng/Lであった。既存の分析法に比較して検出限界を大幅に下げることができ、環境水中のo-トルイジン、2-メチルナフタレン及び1-メチルナフタレンが検出できる分析法が確立できた。
- 2) 市販の固相やシリカゲルカートリッジカラムにはメチルナフタレンを含有しているものがあることが判明し、汚染が少なかったABS ELUTE-NEXSを使用した。
- 3) 精製水での分解性はほとんど認められなかったが、河川水中での保存は7日以内程度が望ましいことが判明した。
- 4) 保存水質試料を分析した結果、o-トルイジンは河川水から最大10ng/L、p-トルイジンは河川水から最大5.5ng/L、2-メチルナフタレン及び1-メチルナフタレンは海水から最大4.5ng/L検出された。

なお、本研究は環境省委託の平成21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：14504の化学商品 2004
- 2) 化審法におけるリスク評価：独立行政法人製品評価技術基礎機構 HP
http://www.safe.nite.go.jp/risk/files/pdf_gaiyou/225gaiyou.pdf
- 3) 平成15年度要調査項目等存在状況調査結果：環境省 HP <http://www.env.go.jp/water/chosa/h15.pdf>
- 4) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第2巻 2003
- 5) 環境庁環境保健部保健調査室：昭和52年版ケミカルアセスメント 環境における化学物質の存在
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h15-01/pdf/chap01/02-3/65.pdf>
- 6) 環境省環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成9年度 化学物質分析法開発調査報告書 34-53 1998
- 7) 環境省環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成9年度 化学物質分析法開発調査報告書 306-315 1998
- 8) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版) 2009