—技術報告—

フタル酸エステル類の不純物として検出される油識別剤のクマリン

倉田正治, 伊與泉剛, 平野治夫

警視庁科学捜査研究所, 〒100-8929 東京都千代田区霞ヶ関2-1-1

Oil Marker of Coumarin Detected as a Trace of Impurity of Phthalate Esters

Shoji KURATA, Takeshi IYOZUMI, and Haruo HIRANO

*Criminal Investigation Laboratory, Metropolitan Police Department,
2-1-1 Kasumigaseki, Chiyoda, Tokyo 100-8929, Japan**(Received 20 May 2003; Accepted 27 June 2003)*

The purpose of this study is to apply coumarin as an oil marker to discriminate oils in forensic sciences. Phthalate esters and diethyl ethereal extracts of polyvinyl chloride covers of electric cords, which contain the compounds as plasticizers, were tested for coumarin using fluorescence spectrophotometry and high performance liquid chromatography with photodiode array detector. The analytical results showed that coumarin was detected as a trace of impurity in the phthalate esters such as di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) and the concentrated extracts of the covers of the cords. Accordingly, coumarin must not be used as the oil marker for forensic discrimination of kerosene, gas oil, and fuel oil A when the solvent extracts of plastics containing phthalate esters are concentrated and analyzed for proof of arson caused by use of the oils. However, coumarin can be applied as the oil marker to liquid oil samples analyzable without extracting and concentrating because the compound is not detected as an impurity in the samples.

Key words: coumarin, phthalate ester, fluorescence spectrophotometry, oil marker, high performance liquid chromatography

緒 言

軽油識別剤のクマリン (Fig. 1(a)) は, 灯油および A 重油に約 1 ppm 添加されており¹⁾, その分析法として蛍光分光光度法が行われている^{2,3)}. この方法は, ディーゼル車の燃料油に用いられる不正軽油の検査法として考案され効果をあげている. クマリンの検査法は法科学分野でも, 灯油, 軽油, A 重油を用いた放火の証明のために, 放火現場で採取

された物件の抽出物から検出される油の種類の間接的な識別法として応用できると期待される. しかしながら, ポリ塩化ビニルのようなプラスチックに可塑剤として添加されているフタル酸エステル類⁴⁾ (Fig. 1(b)) の中には不純物としてその遊離酸, アルコール, モノエステルが報告されており⁵⁾, 他に本研究で微量のクマリンが不純物として含まれている場合のあることが蛍光分光光度法等から認められ

Fig. 1 Structural formula of coumarin(a), phthalate ester (b), and *o*-coumarate ion (c).

た。そこで、生活圏でプラスチックの可塑剤として多く用いられているフタル酸エステル類およびそれらを含むポリ塩化ビニル製電気コード被覆の抽出物を試料として、蛍光分光光度法によるクマリンの含有の有無の検査法が法科学分野における抽出された油の種類の識別法として応用可能か否か検討した。

材料および方法

1 試薬

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は 3 点 (A 社製 1 点および B 社製 2 点 (ロットの異なる 2 点で以下, ロット 1 およびロット 2 で示す)) の特級試薬を, フタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) は B 社製特級試薬を, そして対照用試薬のクマリンは和光純薬工業製特級試薬を用いた。軽油は都内のガソリンスタンド (C 社) で購入したものを用いた。灯油は石油メーカーの S 社から提供のクマリン無添加のものを用いた。ジエチルエーテル, ならびに蛍光分光光度計によるクマリンの含有の有無の検査に用いたヘキサン, ドデカン, エチルアルコール, ブチル

アルコール, 水酸化ナトリウム, 硝酸ナトリウムはいずれも和光純薬工業製特級試薬を用いた。高速液体クロマトグラフの移動相として和光純薬工業製高速液体クロマトグラフ用試薬のアセトニトリル, 蒸留水, *n*-ヘキサンおよび酢酸エチルを用いた。

2 試料調製

試料として, 試薬の DEHP および DBP ならびにポリ塩化ビニル製平型電気コード被覆 3 点 (K 社製 1 点, O 社製 2 点) のジエチルエーテル抽出物および軽油抽出物を用いた。なお, 電気コード被覆のジエチルエーテル抽出物は被覆 2 g を長さ 5 mm 程度に細かくチップ状に切りジエチルエーテル 30 ml 中に 12 時間漬けて得た抽出液を 1 ml に濃縮して用いた。また, 軽油抽出物はチップ状にしたコード被覆 1.8 g を軽油 1 ml に 4 日間漬けて得た抽出液を用いた。また, 蛍光分光光度法の対照用試料としてクマリンを 1 ppm に調製した灯油およびそれを軽油で希釈した混合物を用いた。高速液体クロマトグラフィー用の対照用試料としてクマリン 100 ppm を含有するヘキサン溶液を用いた。

3 試料の前処理³⁾

蛍光測定前に, 各試料 0.25 ml それぞれをドデカン 1.5 ml, ブチルアルコール-エチルアルコール (体積比 4 : 3) 混合溶液 2 ml および 2.5 M の水酸化ナトリウムと 2.4 M の硝酸ナトリウムの混合アルカリ性水溶液 1.25 ml とともにねじ口試験管に入れ 3 分間振盪混合する。静置後即時に 3 層に分離し最下層のアルカリ性水溶液層にクマリンの加水分解物の *o*-クマリン酸イオンが抽出される。このアルカリ性水溶液層に 5 分間励起波長 365 nm の紫外光を照射して, *cis* 体の *o*-クマリン酸イオンから *trans* 体の *o*-クマリン酸イオン (Fig. 1(c)) へ異性化させたアルカリ性水溶液層を蛍光測定用試料とした。

4 分析条件

(1) 蛍光分光光度計

日立製 F-4500 蛍光分光光度計で前記の「3 試料の前処理」に基づき 3 次元蛍光スペクトルを測定した。励起, 蛍光バンド幅はいずれも 10 nm に設定し, ホトマル電圧は 700 V で測定した。3 次元蛍光スペクトルは等高線図で示し, 等高線間隔は蛍光強度 50 に設定した。*o*-クマリン酸イオンの蛍光強度は

励起波長360 nm に固定して測定した蛍光極大強度を用い、その検量線からクマリンの濃度を推定した^{2,3)}。検量線は、調製した灯油と軽油の混合物を試料として求め Fig. 2 のようになった。なお、本条件におけるクマリンの検出限界は0.01 ppm 程度であった。

(2) 高速液体クロマトグラフ⁶⁾

DEHP の25%ヘキサン溶液およびクマリンの100 ppm ヘキサン溶液それぞれ20 μ l を試料として、高速液体クロマトグラフ（日本分光製 LC2000Plus シリーズおよび LC1500シリーズ）で以下に示す2つの分析条件でクマリンの含有の有無の検査を行った。分析条件1；カラムは逆相系 ODS カラム Finepak Sil C18S（長さ150 mm，内径4.6 mm，粒径5 μ m），移動相はアセトニトリル，蒸留水（体積比7：3）混合溶液を用い，流速は毎分1 ml に設定して測定した。検出器はマルチフォトダイオードアレー検出器 MD-2010Plus，ポンプはデガッサー付きの PU-2089 Plus を用いた。カラムオーブンは CO-2065Plus で40℃に保って測定を行った。分析条件2；カラムは順相系カラム Finepak Sil 5（長さ250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μ m），移動相は *n*-ヘキサン，酢酸エチル（体積比8：2）を用い，流速

は毎分1 ml に設定して測定した。検出器はマルチフォトダイオードアレー検出器 MD-1510，ポンプは PU-1580，デガッサーは DG-1580-53 を用いた。カラムオーブンは CO-1560 で40℃に保って測定を行った。いずれの分析条件もフォトダイオードアレー検出器の測定波長範囲は220–500 nm に設定した。なお、本条件におけるクマリンの検出限界は0.5 ppm 程度であった。

結果および考察

1 フタル酸エステル中のクマリンの分析

DEHP（B社のロット1）およびDBP（B社）の各3次元蛍光スペクトルを Fig. 3(a)および(b)に示す。DEHP（B社）2点およびDBP（B社）1点は、いずれも励起波長360 nm および蛍光波長500 nm に極大蛍光ピークを示し、クマリンから生成する *o*-クマール酸イオンの3次元蛍光スペクトル（Fig. 3(c)）と一致するスペクトルが得られた。蛍光強度から DEHP（B社）のロット1 およびロット2，ならびに DBP（B社）はそれぞれ約2.2 ppm，約0.04 ppm および約0.22 ppm 相当のクマリンを含有すると推定された。さらに，蛍光分光光度法の測定結果から，高速液体クロマトグラフィーの検出限界以上のクマリンを含む DEHP（B社のロット1）についてマルチフォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフィーで前記の2つの分析条件下で検査した。B社のロット1のDEHPのクロマトグラムは逆相系カラムを用いた分析条件1および順相系カラムを用いた分析条件2のそれぞれの条件下で，Figs. 4(a)および5(a)のようになった。分析条件1のクロマトグラム中の保持時間2.5分および分析条件2のクロマトグラム中の保持時間10.6分の各ピークは Figs. 4(b)および5(b)に示すように同様な紫外・可視吸収スペクトルが得られた。2つの分析条件下でそれぞれ得られた保持時間2.5分および10.6分に，いずれもクマリンのピークが Figs. 4(c) および5(c)に示すように得られ，各ピークの紫外・可視吸収スペクトルは Figs. 4(d)および5(d)に示すように Figs. 4(b)および5(b)のスペクトルと一致し，B社のロット1のDEHPからクマリンが検出された。なお，A社製のDEHPからは *o*-ク

Fig. 2 Correlation between the concentration of coumarin and the fluorescence intensity (Ex 360 nm/Em 500 nm) of *o*-coumarate ions extracted in alkaline aqueous solutions from mixtures of kerosene and gas oil.

Fig. 3 Contour plots of three dimensional fluorescence spectra of *o*-coumarate ions extracted in alkaline aqueous solutions from samples; (a): di-2-ethylhexyl phthalate, (b): di-*n*-butyl phthalate, (c): 1 ppm coumarin in kerosene.

Fig. 4 Reversed-phase liquid chromatograms and ultraviolet-visible absorption spectra for peaks at 2.5 min of retention time in the chromatograms by high performance liquid chromatography with UV-VIS photodiode array detector. Chromatographic conditions; Finepak Sil C18S column (150 mm $\times$ 4.6 mm); mobile phase isocratic at 30% water in acetonitrile at 1.0 ml/min. (a): the chromatogram of 25% di-2-ethylhexyl phthalate in hexane, (b): the spectrum for the peak at 2.5 min of retention time in the chromatogram (a), (c): the chromatogram of 100 ppm coumarin in hexane, (d): the spectrum for the peak at 2.5 min of retention time in the chromatogram (c).

Fig. 5 Normal-phase liquid chromatograms and ultraviolet-visible absorption spectra for peaks at 10.6 min of retention time in the chromatograms by high performance liquid chromatography with UV-VIS photodiode array detector. Chromatographic conditions; Finepak Sil 5 column (250 mm×4.6 mm); mobile phase isocratic at 20% ethyl acetate in hexane at 1.0 ml/min. (a): the chromatogram of 25% di-2-ethylhexyl phthalate in hexane, (b): the spectrum for the peak at 10.6 min of retention time in the chromatogram (a), (c): the chromatogram of 100 ppm coumarin in hexane, (d): the spectrum for the peak at 10.6 min of retention time in the chromatogram (c).

マル酸イオンの3次元蛍光スペクトルは検出されなかった。これらフタル酸エステル類は銘柄によりクマリンが不純物として含まれている場合と含まれていない場合があり、同一銘柄でもロットの違いによりクマリンの含有量も異なることがわかった。

2 ポリ塩化ビニル製電気コード被覆のジエチルエーテル抽出成分中のクマリンの分析

放火現場から採取された物件に付着の油について分析する場合、通常、溶媒で抽出した後、濃縮して得た抽出物の分析を行う。そこで、付着油の抽出・濃縮処理と同様に DEHP を含有するポリ塩化ビニル製平型電気コード被覆3点についてジエチルエーテルで抽出後、30倍濃縮した抽出物について蛍光分光光度法で分析した。コード被覆3点いずれからもクマリン由来の *o*-クマル酸イオンの3次元蛍光ス

ペクトルが得られた。コード被覆3点からの抽出液を30倍濃縮した後のクマリンの濃度は、蛍光強度から0.09~0.14 ppmと推定された。このように、フタル酸エステル類を多量に含むプラスチック製品等に付着した油を溶媒により抽出し、濃縮して得た抽出物について分析する場合は、検出されたクマリンは添加された油識別剤由来かフタル酸エステル類の微量不純物由来か判断できない。したがって、このような場合、クマリンは油の種類を識別する目的には使用できないと考えられる。

3 ポリ塩化ビニル製電気コード被覆の漬かった軽油中のクマリンの分析

放火に用いた液体の油について分析する場合、通常、2で示した抽出油と異なり濃縮せずに分析を行う。そこで、2で用いたポリ塩化ビニル製平型電気

コード被覆を4日間漬け込んだ軽油について濃縮せずに、蛍光分光光度法によりクマリン由来の*o*-クマル酸イオンが検出されるか否か分析を行った。コード被覆を漬け込んだ軽油からは*o*-クマル酸イオンは検出されなかった。濃縮せずに分析したため蛍光分光光度法の検出限界以下しか抽出されなかったため検出されなかった可能性がある。この実験から、濃縮しなければ、たとえプラスチック製品から溶出するフタル酸エステル類に汚染された油でも蛍光分光光度法によるクマリンの検査法には汚染物の影響はほとんど受けないと考えられた。

結 語

蛍光分光光度法によるクマリンの検査法は、不正軽油の識別法として既に活用されている²⁾ように、抽出-濃縮処理をする必要のない液体の油試料に対しては、法科学分野においても、油の種類の間接的な識別法として有効と考えられる。しかしながら、放火現場等から採取されたフタル酸エステル類を多量に含有するポリ塩化ビニル等のプラスチック製品から溶媒抽出し濃縮した抽出物については、本研究で明らかにしたように、クマリンがフタル酸エステル類の微量不純物として検出されることがあるため

クマリンを油の種類識別剤に応用することは困難と考えられる。

文 献

- 1) 西川輝彦：動き出した軽油マーカー．*Petrotech*, **13**, 611-615 (1990)．
- 2) 軽油識別剤分析方法標準委員会：軽油識別剤標準分析法．pp. 60-65, 全国石油協会 (1994)．
- 3) 倉田正治, 相澤直之, 平野治夫, 永井正敏：3層分離抽出/蛍光分光光度法によるクマリンを含む油類の簡易識別分析．*Bunseki Kagaku*, **52**, 187-194 (2003)．
- 4) 後藤邦夫：増補プラスチックおよびゴム用添加剤実用便覧．pp. 3-145, (株)化学工業社, 東京 (1987)．
- 5) 有機合成化学協会：溶剤ポケットブック．pp. 471-473, (株)オーム社, 東京 (1967)．
- 6) R. M. S. Celeghini, J. H. Y. Vilegas, F. M. Larcas: Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *mikania glomerata* spreng. ("guaco") leaves. *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**, 706-709 (2001)．