環境試料中のテトラブロモビスフェノール A の分析

茨木 剛*, 家合 浩明, 田辺 顕子, 川田 邦明

新潟県保健環境科学研究所 (〒950-2144 新潟県新潟市曾和314-1)

*現在: 新潟県三条健康福祉環境事務所 (〒955-0046 新潟県三条市興野1-13-45)

[平成14年 5月10日受理]

Determination of Tetrabromobisphenol A in Environmental Samples

Tsuyoshi IBARAKI*, Hiroaki YAGOH, Akiko TANABE and Kuniaki KAWATA

Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences
(314-1 Sowa, Niigata, Niigata 950-2144)*Present Address: Office of Health, Welfare and Environment, Sanjo, Niigata Prefecture
(1-13-45 Kohya, Sanjo, Niigata 955-0046)

[Received May 10, 2002]

Summary

A GC/MS method for determination of tetrabromobisphenol A (TBBP-A) in environmental samples was developed. The target compound in water sample, adjusted to pH 3.5 with hydrochloric acid, was extracted with two styrene-divinylbenzene copolymer (Sep-Pak Plus PS-2) cartridges in a series and was eluted with ethyl acetate. After derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), the resulting trimethylsilyl derivative was determined by GC/MS. TBBP-A in sediment or fish sample was extracted with methanol, partitioned with hexane, and re-extracted with dichloromethane. TBBP-A in the extract was derivatized to ethyl derivative using diethyl sulfate. The derivative was extracted with hexane and was cleaned up by using a Florisil cartridge for GC/MS determination. Overall recoveries from water, sediment and fish were 89 %~101 %, 91 % and 82 %, respectively. The minimum detection limits were 0.055 $\mu\text{g}/\ell$ in water, 5.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in sediment and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in fish.

Key words: tetrabromobisphenol A, solid phase extraction, GC/MS, trimethylsilyl derivative, ethyl derivative

1. はじめに

テトラブロモビスフェノール A (TBBP-A, Fig. 1) は臭素系難燃剤としては最も多く製造されており, 難燃性の ABS, エポキシ及びポリカーボネート樹脂の製造における反応剤及び添加剤として多用されている¹⁾。TBBP-A による環境汚染は以前から知られており^{2,3)}, 熱分解によりポリ臭素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン及びジベンゾフラ

Fig. 1 Structure of TBBP-A

ンが生成するとの報告⁴⁾もある。また、平成10年には環境庁（当時）により「水環境保全に向けた取組のための要調査項目」の対象物質としても取り上げられている。

水試料からのTBBP-Aの抽出法としては、ベンゼン^{5,6)}及び石油エーテル⁷⁾による溶媒抽出法が報告されている。これに対して固相抽出法は、血漿及び血清中のTBBP-Aの分析に対する適用例^{8,9)}があるものの、環境水への適用例は見当たらない。また、TBBP-Aをガスクロマトグラフィー（GC）で測定するためには誘導体化の必要があるが、その方法として、ジアゾメタン⁸⁻¹⁰⁾若しくはトリメチルシリルジアゾメタン⁹⁾によるメチル化、臭化エチルによるエチル化^{2,3)}、無水ヘプタフルオロ酪酸によるフルオロアセチル化⁹⁾及び無水酢酸：ピリジン（1：1）によるアセチル化¹¹⁾が報告されている。これらのうち、メチル化については環境試料中にTBBP-Aのメチル化物が存在しうることからメチル化の前にTBBP-Aとそのメチル化物を分離しておく必要がある。また、メチル化以外の誘導体化法は操作が煩雑であるなどの問題があった。

そこで、環境水中のTBBP-Aを固相抽出後N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド（BSTFA）でトリメチルシリル（TMS）化してガスクロマトグラフ／質量分析計（GC/MS）で定量する方法を検討した。

一方、底質及び生物試料中のTBBP-Aを分析する場合にはクリーンアップ操作が必要となるため、BSTFAによる誘導体化法の適用は困難であった。そこで、ビスフェノールAやアルキルフェノール類の分析に用いられるジエチル硫酸によるエチル化法¹²⁾を適用したところ、良好に分析が可能であったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試薬

TBBP-AはAldrich製を用い、アセトンに溶解して1 mg/mLとしたものを標準原液とした。内標準溶液は、CDN Isotope 製クリセン-*d*₁₂をヘキサンに溶解して100 µg/mLとしたものを用いた。アセトン、酢酸エチル、メタノール、エタノール及びヘキサンは残留農薬試験用を用いた。塩酸は有害金属測定用を用いた。無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた。水は市販のミネラルウォーターを用い、1 M 塩酸でpHを3.5に調整したものを酸性精製水として使用した。

2. 2 装置及び器具

固相カートリッジは、Waters製Sep-Pak Plus PS-2及びSep-Pak Plus Florisilを用いた。固相抽出装置は、Waters製Sep-Pak コンセントレーターを用いた。1 µm ガラス繊維ろ紙は東洋濾紙製GA-100をアセトンで洗浄

して用いた。GC/MSは島津製作所製GCMS-QP5050Aを用いた。

2. 3 分析方法

2. 3. 1 水試料

水試料1000 mLを1 M 塩酸でpHを3.5前後に調整し、あらかじめアセトン及び酸性精製水各5 mLでコンディショニングしたSep-Pak Plus PS-2（2個連結）に10 mL/minで通水した。懸濁物質が多い試料については、あらかじめ試料をガラス繊維ろ紙でろ過した。ガラス繊維ろ紙はアセトン10 mLで超音波抽出（10分間）し、遠心分離によりアセトン層を分取した。この抽出操作を2回繰り返す、得られたアセトン層抽出液を先のろ液に加えてPS-2に通水した。PS-2を酸性精製水10 mLで洗浄後、通気乾燥し、酢酸エチル6 mLで溶出した。溶出液に窒素ガスを吹き付け1 mLに濃縮し、少量の無水硫酸ナトリウムで脱水した。内標準溶液10 µLを加えた後、BSTFA 200 µLを加え、室温で1時間放置し誘導体化したものをGC/MSで定量した。

2. 3. 2 底質試料

底質試料（湿泥）20 gを100 mL遠沈管にとり、メタノール50 mLで10分間振とう抽出後、3000 rpmで遠心分離を行い、メタノール抽出液を分取した。抽出操作は3回繰り返した。抽出液をあわせて300 mL分液ロートに入れ、メタノール飽和ヘキサン50 mLを加え振とうした。メタノール層をあらかじめ5 %塩化ナトリウム水溶液500 mLを入れた1 L分液ロートに移し、ジクロロメタン50 mLで2回抽出した。ジクロロメタン層を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濃縮後、10 mL共栓付試験管（目盛付）に移し入れ、更に窒素ガスを吹き付け乾固した。乾固した試料に1 M KOH/エタノール溶液0.5 mLとジエチル硫酸0.2 mLを加え、密栓をして軽く振り、室温で30分間放置しエチル化した。反応終了後、1 M KOH/エタノール溶液を5 mLの標線まで加え、密栓をして70℃の湯浴に入れ1時間放置した。水を8 mLの標線まで加え、ヘキサン1 mL及び内標準溶液10 µLを加えた後、密栓をしてはげしく振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたヘキサン溶液に窒素ガスを吹き付けて乾固し、4 %ジエチルエーテル／ヘキサン1 mLを加えた。この溶液をあらかじめ4 %ジエチルエーテル／ヘキサン8 mLで洗浄したSep-Pak Plus Florisilに負荷し、4 %ジエチルエーテル／ヘキサン8 mLで溶出した。溶出液に窒素ガスを吹き付けて1 mLに濃縮し、GC/MSで定量した。

2. 3. 3 生物試料

生物試料（粉碎魚）10 gを100 mL遠沈管にとり、メタノール50 mLを加え5分間ホモジナイズした。3000 rpm

で遠心分離後、メタノール抽出液を分取した。抽出操作は2回繰り返して行った。メタノール抽出液をあわせ、以下「2. 3. 2 底質試料」と同様の操作を行った。

2. 4 GC/MS 測定

GC/MS 条件を Table 1 に示す。TBBP-A (TMS 化物及びエチル化物) のマススペクトルを Fig. 2 に、標準溶液の SIM クロマトグラムを Fig. 3 に示す。

3. 結果及び考察

3. 1 水試料

3. 1. 1 抽出条件の検討

固相カートリッジ PS-2 から TBBP-A を溶出するための溶媒の検討を行った。酸性精製水 5 mL に TBBP-A 2 μ g を添加したものを PS-2 に通水し、通気乾燥後、各種溶媒 6 mL で溶出した。TBBP-A の回収結果を Table

Table 1 Conditions for gas chromatography/mass spectrometry

Column	HP-5 Trace Analysis 30m $\times$ 0.25mm i.d. d_f = 0.25 μ m
Column temperature	120 $^{\circ}$ C(1min) $\rightarrow$ 30 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 300 $^{\circ}$ C(8min)
Injection temperature	280 $^{\circ}$ C
Carrier gas	Helium
Column pressure	6kPa $\rightarrow$ 200kPa/min $\rightarrow$ 70kPa(1min) $\rightarrow$ 200kPa/min $\rightarrow$ 6kPa(0min) $\rightarrow$ 12kPa/min $\rightarrow$ 74.8kPa(8.13min)
Injection	Splitless (purge on time 0.5min)
Interface temperature	280 $^{\circ}$ C
Monitor ions	673, 675 (trimethylsilyl derivative) 529, 557 (ethyl derivative) 240 (chrisene- d_{12})

(a)

(b)

Fig. 2 Mass spectra of derivatives of TBBP-A

(a) Trimethylsilyl derivative, (b) ethyl derivative

2に示す。抽出溶媒としてジクロロメタンを用いた場合に最も良好な結果が得られ、次いで酢酸エチルであったが、有害物質を極力使用しないという観点から、溶出溶媒として酢酸エチルを用いることとした。

PS-2による捕集効率を検討するため、酸性精製水1000mℓにTBBP-A 1μgを添加したものをPS-2（2個連結）に10mℓ/minで通水し、通気乾燥後、酢酸エチル8mℓで溶出した。その結果、78%が1段目のPS-2から回収され、残り22%が2段目から回収された。TBBP-Aの水溶解度（ S_w ）及びオクタノール／水分分配係数（ $\log P_{ow}$ ）は、それぞれ0.72mg/ℓ及び4.5という値が知られており、疎水性が高いと考えられている⁹⁾。しかしながら、 $S_w=917\text{mg}/\ell$ 、 $\log P_{ow}=3.25$ とする実験結果⁸⁾もあり、

報告値に大きな差が見られる。よって今回の実験結果とこれらの値との関係について正確な議論はできないものの、2段目のPS-2からTBBP-Aが回収されたことからTBBP-Aが比較的水に溶けやすいという可能性も考えられた。以上のことから、PS-2は2個連結で使用するものとした。

更に、ガラス繊維ろ紙に捕集した河川水中のSSからのTBBP-Aの回収率を検討した。試料として、河川水に風乾した土壌を適量加えて作成した模擬河川水（SS濃度140mg/ℓ相当）を用いた。模擬河川水をガラス繊維ろ紙でろ過し、得られたろ紙上のSSにTBBP-A 1μgを添加後、アセトン10mℓで超音波抽出（10分間）し、遠心分離によりアセトン層を分取した。アセトン抽出液を

Fig. 3 SIM chromatograms of derivatives of TBBP-A
(a) Trimethylsilyl derivative, (b) ethyl derivative

Table 2 Desorption efficiencies of TBBP-A from PS-2 cartridge with 6 mℓ of solvent

Solvent	Desorption efficiency(%)
Ethyl Acetate	77
Dichloromethane	105
Hexane	43
Acetone	70
Methanol	45
Acetonitrile	60

Desorption efficiencies were determined by passing 5ml of water (pH3.5) spiked with 2μg of TBBP-A through PS-2 cartridges. The cartridges were air-dried, and then TBBP-A was eluted from the cartridge using 6ml of different solvents.

精製水1000mlに加え、以後「2. 3. 1 水試料」に示す操作を行った。その結果、回収率は89%, 変動係数11% (n = 4) と良好な結果が得られた。よって、SSが多い試料についても、あらかじめ試料をガラス繊維ろ紙でろ過し、ガラス繊維ろ紙をアセトン抽出し、得られたアセトン抽出液を先のろ液に加え、以後「2. 3. 1 水試料」の操作を行うことで分析可能と考えられた。

3. 1. 2 添加回収実験

精製水、河川水及び海水にTBBP-Aを添加し、添加回収実験を行った。結果をTable 3に示す。回収率は89%~101%, 変動係数4.3~12%と良好な結果が得られた。

検出限界 (LOD) を既報^{13,14)}と同様の方法により算出した。すなわち、

$$\text{LOD} = S \times T_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} \quad (1)$$

ここでSは測定値の標準偏差, $T_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ は自由度n-1, 信頼区間99%におけるT値である。得られた検出限界は0.055 $\mu\text{g/l}$ であった。

3. 2 底質及び生物試料

3. 2. 1 クリーンアップ方法の検討

底質及び生物試料の分析では、抽出液をクリーンアップする必要がある。そこで、シリカゲルクロマトグラフィーによるクリーンアップを試みたが、底質試料に適用した場合クリーンアップ後の溶液も茶色に着色していることから、クリーンアップ効果は不十分と考えられた。

そこで、ビスフェノールAの分析法¹²⁾で採用されている、ジエチル硫酸を用いたエチル化による分析法を検討した。この方法では、ビスフェノールAなどをジエチル硫酸でエチル化した後にフロリジルカラムに負荷できる

ことから、比較的極性の低い溶媒で溶出することにより極性の高い妨害成分を除去できるとともに、けん化処理による高いクリーンアップ効果も期待された。

Sep-Pak Plus Florisil カートリッジを用いて溶出試験を行った結果、カートリッジに負荷したTBBP-Aのエチル化物は4%ジエチルエーテル/ヘキサン8mlで溶出することにより良好に回収され、妨害物質の影響を受けないことが分かった。

3. 2. 2 誘導体化時間の検討

まず、TBBP-Aのエチル化の反応時間を検討した。すなわち、TBBP-Aの1 $\mu\text{g/ml}$ アセトン溶液1mlをとり、「2. 3. 2 底質試料」に準拠し、誘導体化時間を10分から120分に変化させて誘導体化を行い、エチル化物と内標準物質のピーク面積比を求めた。その結果、Fig. 4に示すように、反応時間30分でピーク面積比が最大に達し、以後大きく変化しなかったことから反応時間は30分とした。

3. 2. 3 添加回収実験

底質及び生物試料(ボラ)にTBBP-Aを添加し、添加回収実験を行った。その結果、回収率は底質試料で91%, 生物試料で82%といずれも良好であった(Table 3)。また、(1)式により算出した検出限界は底質試料で5.5 $\mu\text{g/kg}$, 生物試料で20 $\mu\text{g/kg}$ であった。

3. 3 環境試料への適用

信濃川で採取した河川水、東京湾で採取した底質及び新潟東港で採取したボラに対して本分析法を適用した。環境試料のSIMクロマトグラムをFig. 5に示す。いずれの試料でもTBBP-Aは検出限界以下であったが、クロマトグラム上の妨害なく測定が可能であったことから、本分析法は有効な方法であると考えられた。

Fig. 4 Effect of reaction time on ethylation

Table 3 Overall recoveries of TBBP-A from environmental samples

Sample	Added (μg)	n	Recovery(%)	RSD(%)
Purified water	0.1	4	99	12
	0.2	4	89	5.7
	0.3	4	91	11
River water	0.2	4	101	10
Sea water	0.2	4	101	4.3
Sediment	0.5	7	91	6.8
Fish	0.5	7	82	16

(a)

(b)

(c)

Fig. 5 SIM chromatograms of environmental samples

(a) river water from Shinano River, (b) sediment from Tokyo Bay, (c) mullet from Niigata East Port

要 約

環境試料中の TBBP-A の分析法として、水試料については固相抽出の後、BSTFA により TMS 化して GC/MS で測定する方法、底質及び生物試料については、メタノールで抽出し、ジエチル硫酸によりエチル化して GC/MS で測定する方法を検討した。その結果、水試料で 89% から 101%、底質試料で 91%、生物試料で 82% と

良好な回収率が得られた。

(この研究は平成 10～11 年度環境庁環境保健部環境安全課の「化学物質環境汚染実態調査」の一環として行ったものである。)

文 献

- 1) WHO: Environmental Health Criteria 172, Tetrabromobisphenol A and derivatives, Geneva (1995)

- 2) Watanabe, I., Kashimoto, T. and Tatsukawa, R.: Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 48-52 (1983)
- 3) Watanabe, I., Kashimoto, T. and Tatsukawa, R.: The flame retardant tetrabromobisphenol-A and its metabolite found in river and marine sediments in Japan. *Chemosphere*, **12**, 1533-1539 (1983)
- 4) Thoma, H., Rist, S., Hauschulz, G. and Hutzinger, O.: Polybrominated dibenzodioxins and -furans from the pyrolysis of some flame retardants. *Chemosphere*, **15**, 649-652 (1986)
- 5) 剣持堅志, 片山靖夫, 松永和義, 石田立夫: 化学物質環境調査に関する研究 第7報 2,2-ビス(3,5-ジブロム-4-ヒドロキシフェニル)プロパンの分析法, 岡山県環境保健センター年報, **2**, 174-177 (1978)
- 6) 荻野泰夫, 岡本泰明, 吉村 広: 化学物質環境調査(分析法)に関する研究 第26報 有機ブロム系化合物の分析法, 岡山県環境保健センター年報, **11**, 83-88 (1987)
- 7) Goodman, L.R., Cripe, G.M., Moody, P.H. and Halsell, D.G.: Acute toxicity of malathion, tetrabromobisphenol-A, and tributyltin chloride to mysids (*Mysidopsis bahia*) of three ages. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **41**, 746-753 (1988)
- 8) Thomsen, C., Janák, K., Lundanes, E. and Becher, G.: Determination of phenolic flame-retardants in human plasma using solid-phase extraction and gas chromatography — electron-capture mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, **750**, 1-11 (2001)
- 9) Thomsen, C., Lundanes, E. and Becher, G.: A simplified method for determination of tetrabromobisphenol A and polybrominated diphenyl ethers in human plasma and serum. *J. Sep. Sci.*, **24**, 282-290 (2001)
- 10) 斎藤 穰, 仲村智子, 大宮季宏, 辻本雄次, 大森光明, 山田明男: イオン交換樹脂による芳香族水酸基含有化合物の分析に関する研究 繊維製品中のテトラブロムビスフェノール A およびナフトール AS について, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報, **49**, 154-159 (1986)
- 11) Sellström, U. and Jansson, B.: Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples. *Chemosphere*, **31**, 3085-3092 (1995)
- 12) 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)
- 13) Tanabe, A., Mitobe, H., Kawata, K. Sakai, M. and Yasuhara, A.: New monitoring system for ninety pesticides and related compounds in river water by solid-phase extraction with determination by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **83**, 61-77 (2000)
- 14) Kawata, K., Ibaraki, T., Tanabe, A., Yagoh, H., Shinoda, A., Suzuki, H. and Yasuhara, A.: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt. *J. Chromatogr. A*, **911**, 75-83 (2001)