GC/MSによる水環境試料中の 有機リン酸エステル類の分析

佐藤 健司, 門上希和夫
北九州市環境科学研究所アクア研究センター
(〒804 北九州市戸畑区新池1-2-1)

[平成7年8月16日受理]

Determination of Organophosphoric Acid Triesters in Aquatic Environmental Samples by GC/MS

Kenji SATO and Kiwao KADOKAMI
Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences, Aqua Research Center
(1-2-1 Shin-ike, Tobata-ku, Kitakyushu 804)

[Received August 16, 1995]

Summary

The authors have developed an analytical method for determining organophosphoric acid triesters (OPEs), tributyl phosphate (TBP), tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP), diethyl-p-nitrophenyl phosphate, tris (2-butoxyethyl) phosphate and tricresyl phosphate (TCP) in water, sediments and fish. OPEs in a water sample were extracted with dichloromethane; the extract was dehydrated and concentrated to 1ml.

OPEs in a sediment and fish were extracted with acetonitrile. The extract was concentrated and then diluted with 5% sodium chloride aqueous solution. After the aqueous solution was extracted with dichloromethane, the extract was concentrated. In order to remove substances which interfere instrumental analyses, florisil column chromatography and activated carbon column chromatography was performed for sediment and fish samples. After the internal standards were added to the final concentrate, quantitative analyses were performed by GC/MS-SIM.

Since GC/MS-SIM is a highly sensitive and selective technique, the developed method could not only simplify complicated pretreatment which was used in the former methods using GC-FPD, but also provide very low detection limits: 0.0095-0.12 $\mu\text{g/L}$ for water, 0.34-14 $\mu\text{g/kg}$ for sediments and 1.6-58 $\mu\text{g/kg}$ for fish. The method was applied to the analysis of real samples. TBP, TCEP, and TCP were detected at ppb levels. This method is useful to elucidate the fates and the concentration levels of OPEs in the aquatic environment.

Key words: organophosphoric acid triesters, GC/MS, aquatic environmental sample

1. はじめに

有機リン酸エステル類は、難燃加工剤、溶剤、合成樹脂可塑剤、金属抽出剤、消泡剤、重合触媒等、工業的に広く利用されている物質である¹⁾。そのため、以前より

炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FPD) を使用した環境試料 (水質、底質、生物) の分析法が検討されてきた²⁻⁷⁾。GC-FPDによる方法は、高感度測定は可能なものの、確実な同定が出来ない。そのため、底質や生物等の妨害物の多い試料の分析では、エステル結合

を有する有機リン酸エステルに効果的な方法である濃硫酸抽出操作や酸性物質を除去するアルカリ洗浄操作等^{2), 8)}の複雑な前処理を行わなければならない。一方、最近急速に普及してきたキャピラリー GC/MSを用いれば、煩雑な前処理の一部を省略する事が可能である。そこで著者らは、測定機器としてGC/MSを用い、それに合わせた簡便な前処理法の検討を行い、水質、底質及び生物試料中の5種類の有機リン酸エステル〔リン酸トリブチル：TBP；リン酸トリス（2 - クロロエチル）：TCEP；リン酸ジエチル - p - ニトロフェニル：DENP；リン酸トリス（2 - ブトキシエチル）：TBXP；リン酸トリクレジル：TCP〕の一斉分析法を開発したので報告する。

2. 実験

2. 1 試薬

TBP, TCEP, TBXP, TCP：和光純薬工業試薬特級。DENP：Aldrich 社製。フェナンスレン-d₁₀, フルオランテン-d₁₀, ベンゾ（a）ピレン-d₁₂：MSD ISOTOPES 製。ジクロロメタン, アセトニトリル, ヘキサン, メタノール, ベンゼン, アセトン：残留農薬試験用（1000倍濃縮保証品）。塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム：試薬特級を700℃で8時間以上加熱処理したものを使用。3%含水フロリジル：フロリジル PR（Floridin Co：和光純薬工業）を130℃で一夜活性してデシケーター内で30分間放冷後、97gを共栓付き三角フラスコに計り取り、フロリジルを振り混ぜながら精製水3mLを正確に滴下し含水させる。次に、振とう機で1時間以上振とう後、デシケーター中に保存したものを使用。活性炭：ダルコG60活性炭（Atlas Powder Co：和光純薬工業）。

2. 2 標準溶液の調整

各標準物質100mgを精秤し、それぞれにヘキサン100mLを加えて、1000mg/L溶液を調整した。この標準原液を適宜希釈、混合し、TBP：0.5mg/L, TCEP：2mg/L, DENP, TBXP：10mg/L, TCP：1.5mg/Lの混合標準液を調整した。この混合標準液を段階的（0～400 μ L）に取り、混合内標準溶液〔フルオランテン-d₁₀, フェナンスレン-d₁₀, ベンゾ（a）ピレン-d₁₂ 各1mg/L〕100 μ Lを加え、ヘキサンで1mLに希釈して検量線用の標準液を作成した。

2. 3 装置及び器具

GC/MS：ヒューレットパッカード社製5890型GC, 日本電子社製JEOL JMS-DX303型MS。

フロリジルカラム：内径1cm, 長さ30cmのクロマト管に3%含水フロリジルを高さ10cmまで湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを約1cm層積したもの。

活性炭カラム：内径1cm, 高さ30cmのクロマト管に無水硫酸ナトリウムを2cm層積した後、2.5%活性炭含有無水硫酸ナトリウムを10cm湿式充填し、さらに、その上部に無水硫酸ナトリウムを2cm層積したもの⁹⁾。

2. 4 分析方法

2. 4. 1 水質試料

試料1Lを分液ロートに取り、塩化ナトリウム50g, ジクロロメタン100mLを加え10分間振とう抽出する。静置してジクロロメタン層を分取した後、水層にジクロロメタン50mLを加え、抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン層を合わせる。次に無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレータで約1mLまで濃縮後、ヘキサンに転溶するため、ヘキサン数mLを加えて再びロータリーエバポレータで約1mLとする。混合内標準溶液100 μ Lを濃縮液に加え、GC/MSで測定する。

2. 4. 2 底質試料

試料20gを50mLの共栓付遠沈管に取り、アセトニトリル20mLを加え10分間振とう抽出する。抽出後、2500rpmで10分間遠心分離を行い、アセトニトリル層を分取する。残さにアセトニトリル20mLを加え、同様の操作をさらに2回繰り返し、アセトニトリル層を合わせる。次にロータリーエバポレータで5mL以下まで減圧濃縮し、5%塩化ナトリウム溶液500mLの入った分液ロートに加え、軽く振り混ぜた後、水質試料と同様にジクロロメタン（100mL, 50mL）で、2回振とう抽出を行う。ジクロロメタンを合わせ、以下、水試料と同様に脱水、濃縮、ヘキサン添加、濃縮を行い、約1mLのヘキサン溶液を得る。このヘキサン溶液をあらかじめ用意したフロリジルカラムクロマト管に移し、最初にジクロロメタン：ヘキサン＝1：1溶液30mLを流して妨害物を溶出させ、次に2%メタノール含有ジクロロメタン50mLで有機リン酸エステルを回収する。この溶出液をロータリーエバポレータで約1mLまで濃縮し、用意した活性炭カラムクロマト管に移し、2%メタノール含有ジクロロメタン：ベンゼン＝7：3溶液30mLで溶出する。溶出液をロータリーエバポレータで約1mLまで濃縮し、混合内標準溶液100 μ Lを加えGC/MSで測定する。

2. 4. 3 生物試料

試料10gを50mL共栓付遠沈管に取り、底質試料と同様にアセトニトリルで振とう抽出、遠心分離を行いアセトニトリル層を分取する。アセトニトリル層にヘキサンを滴下して飽和させた後、ヘキサン10mLを加え10分間振とうして、アセトニトリル層に含まれる脂質を除去する。脂質を含むヘキサン層を分取し、5%含水アセトニトリル20mLを加えて10分間振とうし、ヘキサンに一部

抽出されている有機リン酸エステルを回収する。次に、アセトニトリル層を合わせ、以下底質試料と同様の操作を行う。

2. 5 GC/MS測定

有機リン酸エステルの定量は、GC/MS-SIM法で行った。GC/MS測定条件をTable 1に示す。TCPは異性体混合物であるため、標準溶液を測定した際に4本のピークが確認された。しかし、環境試料のTCPのピークパターンは、標準溶液のそれと同じであったため、定量は最大面積のピーク1本で行った。

Table 2に対象物質と内標準物質の測定 m/z 、保持時間、また、内標準物質と測定対象物質との関係を示した。

3. 結果及び考察

3. 1 GC測定条件の検討

今回検討した5種類の有機リン酸エステルは、極性が強く、沸点範囲も相当に広い。そのため、一般分析に使用されるキャピラリーカラム（長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m）では、測定時間が長くなり、テーリングやカラムへの吸着による感度及び定量性の低下が認められた。そこで、Table 1に示すように、膜厚の薄い短カラムを用いたところ、ピーク形状及び定量性が改善され、測定時間の短縮も図ることが出来た。特に、TBXPは、10mの短カラムを使用した事によって、感度も向上し良好な結果が得られるようになった。

Table 1 GC/MS conditions for determination of organophosphoric acid triesters

Column	5% phenyl-95% methylsilicon fused silica capillary column, 10m×0.32mm i.d., 0.17 μ m film
Temperature	
Column	temperature programmed from 50°C(1min) to 270°C at the rate of 20°C/min
Injector	250°C
Inlet	250°C
Ion source	220°C
Injection method	splitless, 1 min for purge-off time
Carrier gas	He
Linear velocity	30cm/s
Ionization method	EI
Ionization energy	70eV
Emission current	300 μ A

Table 2 Retention time data, measured ions and internal standard references

No	Compound	Retention time/min	m/z	Internal standard reference ^a
Internal standards				
1	phenanthrene- d_{10}	6.50	188.1	—
2	fluoranthene- d_{10}	7.91	212.1	—
3	benzo(a)pyrene- d_{12}	11.15	264.2	—
Target compounds				
4	TBP	6.00	99.0	1
5	TCEP	6.60	249.0	1
6	DENP	7.38	109.0	2
7	TBXP	9.67	299.2	2
8	TCP	10.68	368.1	3

a. 1, phenanthrene- d_{10} ; 2, fluoranthene- d_{10} ; 3, benzo(a)pyrene- d_{12} .

また、検討物質の保持時間は、Table 2 に示したように大きく異なっている。水質試料について添加回収実験を行い、1 種類の内標準物質で定量したところ、平均回収率は89%であったが、平均相対標準偏差は17%と非常にばらついた値を示した。そこで、保持時間に合わせ3 種類の内標準を用いて測定することとした。その結果、平均相対標準偏差は5.5%となり大幅に精度が向上した。

3. 2 フロリジルカラムクリーンアップの検討

底質及び生物試料からの抽出液には多くの妨害物質が含まれており、クリーンアップせずに分析すると定量の妨げやカラムの劣化の恐れがあるため、カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを検討した。カラム担体としてはアルミナ、シリカゲル、フロリジルの代表的な3 種類が考えられるが、アルミナ、シリカゲルと比べて比表面積が比較的大きく、吸着容量の大きいフロリジルについて検討した。対象とした有機リン酸エステル類は、比較的極性が強くフロリジルをそのまま使用すると溶出されないため⁸⁾、3 %含水させたものを使用した。

洗浄液としてジクロロメタンとヘキサン：ジクロロメタン=1 : 1 を検討した結果、ジクロロメタンのみではTCP がカラムに保持されず、直ちに溶出してきた。一方、ヘキサン：ジクロロメタン=1 : 1 では30mL までにTCP は全く溶出されなかった。

次に洗浄液の検討結果を参考に溶離液を2 %メタノール含有ジクロロメタンとして対象物質の溶出を検討した。その溶出パターンをFig. 1 に示す。これによると、50mL の溶離液で全ての対象物質が溶出した。

以上の結果から、フロリジルカラムによるクリーンアップは、ヘキサン：ジクロロメタン=1 : 1 溶液30mL で妨害物質を除き、2 %メタノール含有ジクロロメタン溶液50mL で溶出することとした。

3. 3 活性炭カラムクリーンアップの検討

フロリジルカラムクリーンアップのみでは、汚濁の著しい底質や生物試料に於いて、妨害ピークが観察されたため、活性炭を使用したクリーンアップを検討した。

活性炭カラムからの溶離液は、2 %メタノール含有ジクロロメタン：ベンゼン=7 : 3 溶液30mL で行った。Fig. 2 に示すように、有機リン酸エステルは、20mL で完全にカラムから溶出されたが、安全を考えて溶離液は30mL とした。活性炭クリーンアップを行った結果、妨害ピークが消失しただけでなく、色素に由来すると考えられる試料液の色も消失した。色素は不揮発性物質でカラム劣化の原因物質であるため、活性炭クリーンアップは、測定妨害物質の除去だけでなく、カラム劣化の防止にも有効であると考えられる。

3. 4 添加回収実験と検出限界

水質試料として精製水、河川水、海水各1 L、底質試料は河川底質20g、生物試料は魚(カワハギ)10g を用い、添加回収実験を行った。各物質の添加量、回収率及び相対標準偏差をTable 3 に示す。水質、底質、生物各試料の平均回収率は、水質99.9%、底質83.9%、生物82.1%といずれも良好な結果を示した。しかし、生物試料についてはTCP の回収率が60%以下の低い値となった。これは、TCP のオクタノール／水分配係数が $5.1^{10)}$ と他の4 物質に比べて高く生物試料からの抽出率及びアセトリル分配での回収率が低かったためと考えられる。

また、平均相対標準偏差も、水質5.5%、底質6.8%、生物9.3%と10%以内の安定した結果であった。

以上の添加回収実験の結果を用い、統計的手法¹¹⁾により各物質の検出限界と定量限界値を求めた。結果をTable 3 に示す。水質、底質、生物各試料共、ppt からppb オーダーの検出限界が得られ、環境試料中の有機リ

Fig. 1 Elution patterns from 3% hydrous floril column chromatography

The composition of eluent is $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2(2+98)$. The volume of each fraction is 10ml.

Fig. 2 Elution patterns from 2.5% activated carbon in anhydrous sodium sulfate column chromatography

The composition of eluent is 2% of CH_3OH in CH_2Cl_2 -Benzene(7+3).

Table 3 Overall recoveries (%) of organophosphoric acid triesters from water, bottom sediment and fish

Sample	TBP				TCEP				DENP			
	Added (μg)	Recovery	(RSD*)	DL ^b	Added (μg)	Recovery	(RSD*)	DL ^b	Added (μg)	Recovery	(RSD*)	DL ^b
Water ^c												
Reagent water	0.02	107	(9.7)	0.0095	0.02	123	(11)	0.031	0.2	115	(7.6)	0.088
River water	0.1	93.2	(2.1)		0.4	96.8	(0.8)		2.0	97.8	(2.4)	
Seawater	0.1	91.1	(3.1)		0.4	98.0	(1.3)		2.0	97.7	(0.6)	
Bottom sediment ^d	0.05	78.0	(5.5)	0.34	0.2	84.1	(6.5)	1.7	1.0	89.8	(8.7)	12
Fish ^e	0.1	82.0	(6.1)	1.6	0.4	78.6	(6.1)	6.1	2.0	81.1	(9.2)	47

Sample	TBXP				TCP			
	Added (μg)	Recovery	(RSD*)	DL ^b	Added (μg)	Recovery	(RSD*)	DL ^b
Water ^c								
Reagent water	0.2	91.0	(12)	0.12	0.04	112	(15)	0.020
River water	2.0	96.6	(1.5)		0.3	89.1	(9.7)	
Seawater	2.0	98.4	(1.9)		0.3	92.7	(5.0)	
Bottom sediment ^d	1.0	90.8	(9.5)	14	0.15	76.9	(4.2)	0.77
Fish ^e	2.0	112	(8.2)	58	0.3	56.6	(17)	9.3

a: Relative standard deviation, %; b: detection limit, water($\mu\text{g/l}$), bottom sediment($\mu\text{g/kg}$) and fish($\mu\text{g/kg}$);

c: 1000ml, n=4; d: 20g, n=7; e: 10g, n=7

ン酸エステル類の濃度を十分評価できる値となった。

3. 5 環境試料への適用

本法の有効性を確認するため、北九州市の洞海湾と関門海峡の各3地点で海水、底質及び魚(3種類)を採取し分析を行った。各試料について有機リン酸エステル類の検出状況を示す。

水質は、洞海湾で、TBPとTCEPの2種類が、関門海峡からは、TCEPのみが検出された。検出濃度は、

TBP: $0.02\mu\text{g/L}$, TCEP: $0.13\sim0.46\mu\text{g/L}$ であった。

底質は、洞海湾でTBP, TCEP, TCPの3種類が、関門海峡からは、TCPのみが検出された。検出濃度は、TBP: $8.9\sim9.5\mu\text{g/kg}$, TCEP: $7.6\sim33\mu\text{g/kg}$, TCP: $3.9\sim180\mu\text{g/kg}$ であった。代表的な底質試料のSIMクロマトグラムをFig. 3に示す。図から判るように、開発した分析法を用いることにより、ピークの分離能が劣る10mの短カラムを用いても特に妨害を受けることなく測定することが出来た。

Fig. 3 Typical SIM chromatograms of a bottom sediment sample in Kitakyushu city. Compounds are as numbered in Table 2. The arrow indicates the peak position of each compound. TBP(4), TCEP(5) and TCP(8) were detected in the sample.

魚からは、TCEPのみが検出された。検出濃度は、17～290 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

以上より本法で十分環境試料が分析できることが確認された。

4. まとめ

GC/MSを用いた水質、底質及び生物試料中の有機リン酸エステルの分析法を検討して次のような結果を得た。1) リン酸エステルの測定に膜厚が薄く比較的短いキャピラリーカラムを用いることにより、感度及び再現性を向上する事が出来た。2) 底質及び生物試料の前処理では、抽出溶媒にアセトニトリルを採用し、フロリジルと活性炭カラムクロマトグラフィーを組み合わせることにより、妨害物質を効果的に除去することが出来た。3) 以上に加え、検出法として内標準法を用いたGC/MS-SIMを採用することにより、従来のGC-FPDを用いた方法に比較して分析操作が簡略化でき、さらに高感度で、正確かつ高精度に有機リン酸エステルを分析できた。4) 開発した方法を用いて北九州市内の環境試料を分析した結果、水質からTBPとTCEPが、底質からTBP、TCEP及びTCPが、生物からTCEPがそれぞれ妨害無く検出され、本分析法の有効性が確認された。

本研究は、平成4年度化学物質分析法開発調査として、環境庁環境保健部保健調査室（現環境保全課）から委託を受けて実施したものである。

要 約

水質、底質及び生物（魚）中の5種類の有機リン酸エステル類の一斉分析法を開発した。本法では、従来の方法に比べ簡略化した前処理法とGC/MSを組み合わせることで、ppt～ppbレベルの有機リン酸エステル類が、正確かつ高精度に分析できた。分析法は、水質はジクロロメタンで抽出、脱水、濃縮後、内標準物質を加えてGC/MS-SIMで定量した。底質及び生物試料は、アセトニトリルで抽出し、フロリジカラムと活性炭カラムでクリーンアップ操作を行った後、GC/MS-SIMで定量した。本法で、実際の試料を分析した結果、水質からTBPとTCEPが、底質からTBP、TCEP及びTCPが、生物からTCEPがそれぞれ検出された。

文 献

- 1) 11892の化学商品，化学工業日報社（1992）
- 2) 石川精一，重住研一，安田和彦，重森伸康：工場排水および生活排水中の有機リン酸エステル類の定量，水質汚濁研究，**8**，529-535（1985）
- 3) 剣持堅志，斉藤直己，荻野泰夫，松永和義：化学物質環境調査（分析法）に関する研究 第11報 有機リン酸トリエステル類の分析法，岡山県環境保健センター年報，**3**，175-191（1979）
- 4) 剣持堅志，松永和義，斉藤直己，荻野泰夫：化学物質環境調査（分析法）に関する研究 第17報 有機リン酸トリエステル類の同時分析法，岡山県環境保健センター年報，**5**，145-156（1981）
- 5) 剣持堅志，松永和義，斉藤直己，荻野泰夫，石田立夫：化学物質環境調査（分析法）に関する研究 第19報 有機リン酸トリエステル類の同時分析法（Ⅱ），岡山県環境保健センター年報，**6**，126-132（1982）
- 6) 福島実，小田國雄，東海明宏，川合真一郎：陸上と水中における有機リン酸トリエステル類（OPE）の存在状態の比較，第23回水質汚濁学会講演集 pp297-298（1989）
- 7) 森田一夫，渡辺正子，和田照美：水質及び底質中の化学物質の分離・濃縮方法の検討，東京都環境科学研究所年報，pp186-191（1992）
- 8) 剣持堅志，松永和義，石田立夫：魚肉，底質および水質中の有機リン酸トリエステル類の分析法，食品衛生学雑誌，**21**，18-31（1980）
- 9) 剣持堅志，鷹野洋，肥塚加奈江，荻野泰夫，森忠繁：水質、底質モニタリング調査の分析法，環境化学，**3**，279-293（1993）
- 10) 石川精一，重住研一，安田和彦，重森伸康：有機リン酸エステル類の各種水処理過程における挙動，水質汚濁研究，**8**，799-807（1985）
- 11) 環境庁環境保健部保健調査室：検出限界及び定量限界の算出方法，pp186-191，「化学物質分析法開発マニュアル」，（1987）