〈論 文〉

環境試料中のけい光増白剤の 高速液体クロマトグラフィーによる定量

Determination of Fluorescent Whitening Agents in River Water and Sediment by High Pressure Liquid Chromatography

安部 明美*, 田中 克彦*, 深谷 勝久*, 竹下 三吉*
Akemi ABE Katsuhiko TANAKA Katsuhisa FUKAYA Sankichi TAKESHITA

Abstract

A method of determination of fluorescent whitening agents (FWA) in river waters and sediments by high performance liquid chromatography (HPLC) was studied.

Six kinds of FWA could be separated according to following conditions; column: ODS SS-10-B 4mm i.d.×250mm, mobile phase (a) 0.01M NaH₂PO₄-acetonitrile (75:25v/v), flowrate: 1.0ml/min.

FWA in the column effluent were monitored with fluorescent detector ($E_x=358\text{nm}$, $E_m=403\text{nm}$).

FWA in river waters were adsorbed on SEP PAC cartridge and eluted with methanol. FWA in river sediments were directly extracted by shaking with methanol successively three times.

Each extract was evaporated to dryness and dissolved in the solution of water-acetonitrile (70:30v/v) for HPLC.

From river waters and sediments of the Sagami river, two types of FWA (FWA I and FWA II), the same as used in the detergents, could be detected.

For the rapid quantitative analysis of FWA I and FWA II, it was found to be effective to use mobile phase (b) 0.1% tetraethyl ammonium perchlorate in water-acetonitrile (70:30v/v). Then peak heights were linear with FWA amounts in the range of 0~10ng for FWA I and 0~1ng for FWA II.

By the proposed method, FWA in river waters and sediments of the Sagami river were determined as follows; FWA I: 0.09~3.4 $\mu\text{g/g}$ in sediments, FWA II: 0.85~4.4 $\mu\text{g/g}$ in river waters, 0.14~10.7 $\mu\text{g/g}$ in sediments.

KEY WORDS: fluorescent whitening agents

1. はじめに

けい光増白剤(以下 FWA)は、合成洗剤や繊維、紙などに添加して使用されており、昭和55年度の国内生産量は約7,500トン、輸入量は約800トンであった。これらの FWA は、合成洗剤などの使用とともに、環境中に水系を通して排出されている。しかし、例えば合成洗剤には FWA は0.1~0.5%添加されているが¹⁾主成分である界面活性剤が15~25%含まれているのと比較すると量的にかなり少ないうえ、光によるトランス型とシス型の互変性があり、シス型ではけい光を失う²⁾などのために定量が困難である。このため環境中の FWA に関する報告³⁾⁴⁾⁵⁾は少なく、環境中における

FWA の実態、光分解、生分解、懸濁物質への吸着、沈降などについてもほとんど明らかにされていない現状である。

一方、FWA の安全性については、ジアミノスチルベン系の FWA の骨格構造が、発がん性のある4-アミノスチルベンと似ているが、各種の毒性試験の結果からは、国内で使用されている FWA の毒性は問題がないとされている⁶⁾⁷⁾⁸⁾。しかし、我々をとりまく環境中の化学物質は多種多様であり、これらの分解生成物などを含む複合作用など未解明な点の多い現在、化学物質による環境汚染は、極力抑制されなければならない。FWA は界面活性剤などと同様に、身近に使用され、広

* 神奈川県公害センター 〒241 横浜市旭区二俣川1-87-1, Kanagawa Prefectural Environmental Center, 1-87-1, Futamatagawa, Asahi-ku, Yokohama, 241 Japan

範に環境を汚染する可能性のある物質である。

そこで今回、環境中に存在する FWA の種類及び濃度を把握するため、環境試料からの FWA の抽出法及び高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）による定性、定量法について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 装 置

使用した主な装置は次のとおりである。

- 1) 高速液体クロマトグラフ；日本分光工業株式会社製ライロータ型 検出器；FP550
- 2) 遠心分離機；株式会社佐久間製作所製
- 3) 振とう機；株式会社杉山元理器製
- 4) エバポレーター；東京理化学器械製

2.2 試 薬

1) FWA 標準物質；化成品工業協会及び日本チバガイギー株式会社から入手したものを、そのまま使用した。

Table 1 に化学構造式を示す。なお、純度は保証されていないが、入手先からの情報により FWA I は100%，FWA II は90%として定量値を補正した。

2) 過塩素酸テトラエチルアンモニウム；和光純薬株式会社試薬特級

3) アセトニトリル，メタノール；和光純薬株式会社液体クロマトグラフ用

4) HPLC 用蒸留水；蒸留水を直径47mm，孔径0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したもの

5) セットバック C₁₈ カートリッジ；日本ウォー

ターズ株式会社

2.3 標準液の調製

FWA I と FWA VI は、それぞれ0.1g ずつ精秤し、ジメチルスルホキシドに溶かして全量を100ml とし、FWA II，FWA III，FWA IV，FWA V はそれぞれ0.1g を蒸留水に溶解して全量を100ml として、それぞれ1,000mg/l の標準原液を調製した。これを水/アセトニトリル（70：30v/v）の混合溶媒で順次希釈して、FWA II については0.1mg/l，FWA I，FWA III，FWA IV，FWA V，FWA VI については、1.0mg/l の標準液を調製した。

2.4 試料からの FWA の抽出

1) 水質試料

試料水に0.1%になるように過塩素酸テトラエチルアンモニウム（TEAP）を加えて溶解し、その20ml を正確に注射筒と先端にとりつけたセットバック C₁₈ カートリッジにゆっくり通し、次いでメタノール 3 ml を 2 回通して FWA を溶離した。

2) 底質試料，合成洗剤

底質試料は風乾後、2 mm メッシュのふるいを通して湿泥 2～10g を、合成洗剤は100mg をそれぞれ100 ml の共栓付遠沈管に取り、これにメタノール50ml を加え、振とう機を用いて20分間振とうしたのち、3,000 r.p.m で5分間遠心分離し、その上澄液を200ml のメスフラスコにデカンテーションして移した。次いで、再び遠沈管にメタノール50ml を加え、同様に操作し、上澄液を先のメタノール抽出液と合わせた。この操作を

Table 1 Chemical structures of fluorescent whitening agents

FWA I	R1: R2:
FWA III	R1: R2:
FWA IV	R1: R2:
FWA V	R1: R2:
FWA VI	R1: R2:
FWA II

Disodium 4,4'-Bis[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilbene-2,2'-disulfonate

Disodium 4,4'-Bis{[4-anilino-6-(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazin-2-yl]amino}stilbene-2,2'-disulfonate

Disodium 4,4'-Bis{[4-anilino-6-bis(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazin-2-yl]amino}stilbene-2,2'-disulfonate

Disodium 4,4'-Bis[(4-anilino-6-methoxy-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilbene-2,2'-disulfonate

Disodium 4,4'-Bis[(4-toluidino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilbene-2,2'-disulfonate
4,4'-Bis(2-sulfostyryl)biphenyl disodium salts

もう一度繰り返したのち、メタノール抽出液の全量を200mlとし、その一定量をメンブランフィルターでろ過した。

以上の操作で得られたメタノール抽出液（水質試料の場合は全量、底質試料の場合は5 mlを分取）をエバポレーターを用いて蒸発乾固したのち、水／アセトニトリル混合溶媒（70：30v/v）を正確に1 ml加えて溶解し、これをHPLC用試験溶液とした。

なお、以上の操作は実験室の窓際及び照明直下を避けて行い^{*}、ガラス器具は褐色のものを使用した。

2.5 HPLCによる分析条件

HPLCによる分析条件を検討し、次のとおりとした。

- 1) カラム；ODS SS-10-B 4 mmφ×250mm
- 2) 移動相；(a)0.01MNaH₂PO₄／アセトニトリル(75：25v/v)，(b)0.1%TEAP-水／アセトニトリル(70：30v/v)
- 3) 検出波長；E_x=358nm, E_m=403nm
- 4) 流速；1.0ml/min

3. 結果と考察

3.1 FWAの定性分析

移動相として0.01MNaH₂PO₄／アセトニトリル(75：25v/v)を用い、Table 1に示した6種類のFWA標準試料を分離することができた。得られたクロマトグラムをFig. 1に示した。そこで、河川水、底質、合成洗剤に含まれるFWAの種類を確認するため、上記の移動相を用いて分離したところ、Fig. 2に示すようなクロマトグラムが得られた。河川水ではFWA II、底質ではFWA I及びFWA IIに相当するピークが確認され、特に濃度の高かった一部の底質試料では、わずかにFWA VIに相当するピークの存在が認められた。このうち、FWA IIの標準試料と保持時間の一致するピークについて波長走査を行い、極大励起、けい光波長を求めたところ、E_x=358nm, E_m=430nmとなり、標準試料の場合と一致した。市販の合成洗剤のうち、合成洗剤AではFWA IとFWA II、合成洗剤BではFWA IIとFWA VIが混合添加されていることがわかった。これは中栄らの報告⁹⁾と同様であった。したがって、今回、環境試料から検出されたFWAは、主に合成洗剤に使用されているFWA I及び

Fig. 1 Typical HPLC chromatogram of a standard mixture of fluorescent whitening agents.

Condition-column; ODS SS-10-B (4mm i.d.×250mm)
eluent; 0.01M NaH₂PO₄/CH₃CN(75:25v/v)

flow rate; 1.0 ml/min

detector; Jasco FP 550 (E_x=358nm, E_m=403nm)

Fig. 2 HPLC chromatograms (1)detergent A (2)detergent B (3)river water (4)river sediment

* 窓際等の明所で行った予備実験では、特にFWAIについて、時間の経過とともにけい光強度の著しい減少がみられたので光の影響をなるべく避けることとした。

FWA IIであることがわかったので、この2種のFWAについて定量的な検討を行った。

3.2 FWAの定量分析

FWA IとFWA IIの定量分析には、展開時間を短くするために、HPLCの移動相として(b)0.1% TEAP-水/アセトニトリル(70:30v/v)を用いた。そのクロマトグラムをFig. 3に示した。この移動相は、展開時間が短くてすむだけでなく、分析後にアセトニトリルでカラムの洗浄を行うことにより、目詰まりやカラムの劣化を防ぐことができるなどの利点を有することが確かめられた。

Fig. 3 HPLC chromatogram
Conditions are the same as indicated in Fig. 1 except for the eluent; 0.1% TEAP-water/ CH_3CN (70:30v/v).

Fig. 4 Calibration curves.

ピーク高さによる検量線はFig. 4に示したとおりであり、FWA Iは0~10ng, FWA IIは0~1 ngの範囲で、それぞれ原点を通る直線性を示した。また、再現性については、同一カラムを用い、注入量 $10\mu\text{l}$ として10回連続測定した場合の保持時間とピーク高さについて変動係数を求めたところ、FWA Iでは各々2.2%, 1.9%, FWA IIでは1.8%, 3.1%となり良好であった。しかし、この移動相水分含量を変化させてもFWA IIとFWA Vを分離することができなかったため、あらかじめ、(a)0.01M NaH_2PO_4 /アセトニトリル(75:75v/v)の移動相を用いて定性的確認をする必要がある。

3.3 環境試料中のFWAの抽出

1) セップバック C_{18} カートリッジ濃縮におけるTEAP濃度の影響

試料をセップバック C_{18} カートリッジに通水するときに、FWAの対イオンとして添加するTEAP濃度の影響について検討したところ、Table 2に示す結果を得た。逆相系の C_{18} カートリッジでは、対イオンを加えることによって陰イオンであるFWAの吸着性が向上することが予想されたが、メタノールによる溶離を効率良く行うためには、TEAPは0.1%程度の添加が適当であった。なお、今回調査した河川水は、比較的汚濁の程度が低く、塩、懸濁物などの共存物質は少ないと思われるが、これらの多量に共存する試料では、FWAの C_{18} カートリッジへの吸着、溶離に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

2) 底質試料におけるメタノール抽出回数の検討

底質試料中のFWAをメタノールで抽出するときの抽出回数と累積抽出率の関係をFig. 5に示した。底質2~10g(湿重量)を用いた場合、メタノール抽出は原則として3回繰り返せば充分であった。

3) 添加回収実験

河川水にFWA I及びFWA IIを $5\mu\text{g}/\text{l}$ または $10\mu\text{g}/\text{l}$ になるよう添加して回収実験を行い、その回収率を求めたところ、Table 3に示す結果を得た。また

Table 2 The effect of TEAP concentration on the extraction by the SEP PAC C_{18} cartridge

TEAP %	(%)			
	FWA I		FWA II	
	$5\mu\text{g}/\text{l}$	$10\mu\text{g}/\text{l}$	$5\mu\text{g}/\text{l}$	$10\mu\text{g}/\text{l}$
0	82	77	78	64
0.1	87	87	94	96
0.2	85	77	86	99

Fig. 5 Efficiency of methanol extraction.

Fig. 6 Sampling points at the Sagami river.
 ①～⑦ ; river waters
 △ 1～5 ; river sediments

Table 3 Recoveries of FWA added to river water samples

No	FWA I				FWA II			
	Present ($\mu\text{g/l}$)	Added ($\mu\text{g/l}$)	Found ($\mu\text{g/l}$)	Recovery (%)	Present ($\mu\text{g/l}$)	Added ($\mu\text{g/l}$)	Found ($\mu\text{g/l}$)	Recovery (%)
3	N.D	5.0	5.0	100	5.2	5.0	9.8	99
		10.0	9.0	90		10.0	13.9	95
6	N.D	5.0	4.3	86	1.2	5.0	5.8	94
		10.0	8.8	88		10.0	10.7	97

Table 4 Recoveries of FWA added to river sediments

No	FWA I				FWA II			
	Present (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	Present (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
1	2.7	10.0	9.8	71	6.9	10.0	15.5	86
4	4.1	10.0	13.3	92	14.3	10.0	23.4	91
5	1.1	1.0	2.0	90	1.4	1.0	2.4	100

底質 2~10g (湿重量) に FWA I 及び FWA II を 1 μg または 10 μg 添加し、充分攪拌した後、分析を行い回収率を求めたところ Table 4 に示す結果を得た。FWA I では河川水が 74~93%, 底質が 71~92%, FWA II では、河川水が 90~99%, 底質が 86~100% と、ほぼ満足できる回収率を得ることができた。

3.4 環境試料中の FWA の定量

1980年~1981年にかけて、相模川河口域において河川水及び底質を採取し、分析を行った。採取地点は Fig. 6 に示したとおりである。

採取した試料の FWA 含量を Table 5 及び Table 6 に示した。表からわかるように、すべての試料において FWA II は FWA I より濃度が高く、FWA II では河川水中の濃度が ppb オーダーであるのに対し、底質中からは 0.14~10.7 $\mu\text{g/g}$ 検出された。これは相模川河口域の底質で直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) が、3.77~10.11 $\mu\text{g/g}$ 検出されている報告¹⁰⁾と比較すると、割合高い値であり、FWA II が底質中で比較安定であることを示唆している。また、FWA I と FWA II では、水への溶解性、光や塩素に対する安定性に差があるため¹¹⁾、環境中でかなり異なった挙動をすると考えられるので、これらについては今

後検討する予定である。

4. ま と め

環境試料中に存在する FWA の抽出法及び高速液体クロマトグラフィーによる定性、定量法の検討を行い、次の結果を得た。

1) 高速液体クロマトグラフィーにより、6 種の FWA を分離することができたが、環境試料から検出されたのは FWA I と FWA II で、主に合成洗剤に用いられている種類と一致した。

2) FWA は、水質試料の場合はセップバック C₁₈ カートリッジを用い、また底質試料の場合にはメタノールを加えて振とうする操作を行うことにより、光の影響を避けて迅速に抽出することができた。

3) 相模川河口域付近の河川水では FWA II が 0.85~4.4 $\mu\text{g/l}$, 底質では FWA I が 0.09~3.4 $\mu\text{g/g}$, FWA II が 0.14~10.7 $\mu\text{g/g}$ 検出された。

謝 辞

本研究に際し、試料の採取に御協力いただいた神奈川県衛生研究所、内藤昭治氏及び神奈川県試験研究連絡協議会環境部会、自然浄化能の利用分科会の方々に深謝いたします。

(原稿受理：昭和58年 6 月14日)

Table 5 Contents of FWA in river waters

No	FWA I ($\mu\text{g/l}$)	FWA II ($\mu\text{g/l}$)
1	<1.3	3.4
2	"	2.2
3	"	4.4
4	"	2.5
5	"	1.5
6	"	0.85
7	"	4.2

Table 6 Contents of FWA in the sediments

No	FWA I	FWA II ($\mu\text{g/g dry wt.}$)	I.L (%)
1	0.67	1.6	11.6
2	0.29	1.1	10.0
3	0.34	0.81	5.0
4	3.4	10.7	21.3
5	0.09	0.14	1.6

引 用 文 献

- 1) 化成品工業協会 (1976) 蛍光増白剤, p. 2.
- 2) 松尾昌季, 坂口忠夫 (1972) 4,4'-(1,3,5-トリアジン-2-イルアミノ) スチルベン-2,2'-ジスルホン酸ナトリウム誘導体の光退色, 日本化学会誌, 10, 1994-1996.
- 3) 安部明美 吉見洋 (1978) 河川水に観測されるけい光物質について, 水質汚濁研究, 1 (3) 216-222.
- 4) M. Uchiyama (1979) Separation and Determination of fluorescent whitening agent and alkyl benzenesulfonate in water. *Water Res.*, 13 847-853.
- 5) R. Zinkernagel (1975) Fluorescent Whitening Agents, p. 129, Georg Thime Verlag, Stuttgart
- 6) B.J. Kilbey, L.G. Zetterberg, (1975) Fluorescent Whitening Agents, p. 264, Georg Thime Verlag, Stuttgart.
- 7) Sturm, R.N., Williams, K.E. and Macek, K.J. (1975) Fluorescent Whitening Agents: Acute fish toxicity and accumulation studies. *Water Res.*, 9 211-219.
- 8) 日本石鹼洗剤工業会, 石けん・合成洗剤に関する質問回答集, p.148.
- 9) 中栄篤男, 森田まり子, 山中実 (1980) 高速液体

クロマトグラフィーによる洗剤中のけい光増白剤の
分析, 分析化学, 29, 69-73.

- 10) 宇都宮暁子ら (1980) 直鎖アルキルベンゼンスル
ホン酸ナトリウム (LAS) に関する研究 (第 1 報)
相模川河口域底質中の LAS について, 衛生化学,
26, 159-166.
- 11) シーエムシー (1976) ファインケミカル, p. 25.

「水質汚濁研究」次号 (Vol. 7 No. 1) の予定目次

〈論 文〉

放線菌によるカビ臭の発生に及ぼす藻類の影響

.....杉 浦 則 夫他

沿岸海域における海水の光学的性質およびそれらの季節変動

.....向 井 徹 雄他

誘導結合高周波プラズマ発光分析法による水中の微量ホウ素の定量

.....北 村 秀 樹他

タンパク質と塩素との水中における反応による有機塩素化合物の生成

.....名 川 吉 信他

水質の監視点位置の決定に関する一考察

—湖沼を例として—

.....松 岡 譲他

水質監視システムの費用便益分析

.....松 岡 譲他

〈講 座〉

水質汚濁現象の数理モデル

(その 4) 水供給計画モデルによる分析の方法について

.....春 名 功