経木中のペンタクロロフェノールの分析法

(昭和 52 年 2 月 2 日受理)

岡 日出生* 永 井 勇* 田坂美和子*

Analytical Method of Pentachlorophenol in Wooden Chips

Hideo OKA, Isamu NAGAI and Miwako TASAKA

(Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health: 5-67, Aoi 2-chome, Yamaguchi)

A method for the determination of pentachlorophenol (PCP) in wooden chips was investigated.

PCP was distilled with steam and extracted with *n*-hexane from acidified distillate. PCP in *n*-hexane was extracted with 0.1 *M* sodium carbonate solution and then acetylated with acetic anhydride. PCP acetate was extracted with *n*-hexane and purified by silica gel column chromatography. The eluate was analyzed by gas chromatography using an electron capture detector.

Acetyl derivative of PCP gave higher recorder response than free PCP.

The recovery of PCP from PCP added wooden chips was 98.4%.

(Received February 2, 1977)

1. ま え が き

ペンタクロロフェノール (以下 PCP と略記) は従来から除草剤のほか、木材・紙・皮革などの防ばい剤としても使用されているが、食品包装材としての経木には使用が禁じられている。

PCP の分析法としては種々の方法があるが、特異性や検出感度などの点でガスクロマトグラフィー (GC) による方法が最も優れているものと思われる。GC による PCP の分析としては、直接分析する方法^{1)~4)}、メチル誘導体として分析する方法^{5)~10)} およびアセチル誘導体として分析する方法^{11)~13)} などがある。直接分析する方法は感度的にも後の 2 者より劣り、また、ガスクロマトグラムで左右対象的なピークを得るためには、極性の大きいカラム充てん剤を用いる必要がある。それに比べ、誘導体として分析する方法はいずれも感度がよく、ピークも左右対称的で、カラム充てん剤の種類も豊富である。しかし、ジアゾメタンでメチル誘導体とする方法は、毒性の強いジアゾメタンの取扱いに注意が必要であるほか、フェノール以外のカルボン酸系の殺虫剤などもメチル化され、PCP の分析を困難にする可能性もある。Chau ら¹²⁾ は炭酸カリウム溶液中で PCP をアセチル化し、ECD-GC により分析しているが、炭酸カリウムを

助剤としてアセチル化とすると、試薬中の不純物による PCP アセテートと同一の保持時間を有する妨害物質が生成され、その除去に多大の労力を必要とする。

PCP の抽出法には有機溶媒で直接振とう抽出する方法^{2), 11), 12)}、ソクスレー抽出器を用いる方法⁴⁾、アルカリ水溶液で抽出後、有機溶媒に転溶する方法⁸⁾、繰り返し蒸留する方法¹⁵⁾、水蒸気蒸留による方法¹⁰⁾ および加温して抽出する方法¹⁷⁾ などがある。

著者らは Chau らの方法¹²⁾ に準じて、炭酸ナトリウム溶液中で PCP をアセチル化し、カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ後、ECD-GC で定量する方法と、食品用容器として加工された経木中の PCP の抽出法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬および装置

PCP およびヘプタクロルエポキシサイド: 和光純薬(株) 製、残留農薬分析用標準品を用いた。

PCP アセテート標準品: PCP 2g をナス型フラスコにとり、ピリジン 20 ml および無水酢酸 25 ml を加えて還流冷却器を付け、沸騰水浴上で30分間加熱した。放冷後、水 50 ml を加えてベンゼン 50 ml ずつで3回抽出し、ベンゼン層を5%塩酸 100 ml、5%水酸化ナトリウム溶液 100 ml および水 50 ml で洗浄した。ついで無

* 山口県衛生研究所: 山口市葵 2-5-67

水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下でベンゼンを留去し、得られた結晶を *n*-ヘキサンで再結晶を繰り返し精製したものを用いた。この結晶の融点は149.5°で、ガスクロマトグラム上単一のピークを示した。

内部標準物質：ヘプタクロルエポキシサイドの 0.3 ppm *n*-ヘキサン溶液を用いた。

PCP ナトリウム：東京化成工業(株)製、この試薬の純度を GC で分析したところ72.0%であった。

シリカゲル：メルク社製、キーゼーゲル60, 30~70メッシュ, ASTM を用いた。

n-ヘキサンおよびベンゼン：残留農薬分析用試薬を用いた。

その他の試薬：特級試薬を用いた。

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-3BE, 電子捕獲型検出器付

2.2 操 作

2.2.1 PCP の抽出

約 5 mm 角に細切した経木 10 g を 500 ml の丸底フラスコに秤取し、水 100 ml およびリン酸 5 ml を加えて水蒸気蒸留を行い、留液 350 ml を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 10 ml 中に捕集した。この留液を塩酸酸性とし、*n*-ヘキサン 50 ml ずつで10分間、2回振とう抽出した。次に、抽出液に 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 40 ml を加えて10分間振とうし、PCP を水層に転溶した。同様の操作を炭酸ナトリウム溶液 30 ml ずつで2回繰り返す、抽出液を合わせ、アセチル化用試験溶液とした。

2.2.2 PCP のアセチル化

2.2.1で得られた試験溶液に無水酢酸 2 ml を加えて10分間振とうし、アセチル化した。これに *n*-ヘキサン 10.0 ml を加えて5分間振とうし、PCP アセテートを抽出した。

2.2.3 クリーンアップ

シリカゲルを130°で15時間活性化した後、水 5 % を加えて活性度を下げ、その 5 g を *n*-ヘキサンを用いて内径 15 mm, 長さ 30 cm の活センおよびガラスフィルター付きカラム管に充てんし、その上部に無水硫酸ナトリウム 5 g をのせ、*n*-ヘキサン約 100 ml を流してカラムを作製した。このカラムに2.2.2で得られた PCP アセテート・*n*-ヘキサン溶液 5.0 ml をのせ、*n*-ヘキサンで溶出した。最初の溶出液 80 ml を捨て、次からの 200 ml を集め、KD 濃縮器を用いて 5 ml 以下の一定量に濃縮した。これに等量の内部標準物質溶液を加えて、GC 用検液とした。

2.2.4 ガスクロマトグラフィーの条件

カラム管：内径 3 mm, 長さ 2~3 m のガラス製
充てん剤：5% DEGS+1% リン酸または 3% OV-17 (クロモソルブ W, AW-DMCS, 60~80メッシュ)

温度：注入口220°, カラム恒温槽180~220°

キャリアガス：窒素 60 ml/min

感度：10² MΩ×0.08~0.16 V

2.2.5 検量線の作成

PCP 標準品をアセトンに溶かして、0.5 ppm 溶液をつくり、この1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0および6.0 ml をそれぞれ 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 50 ml 中に加え、2.2.2の操作でアセチル化し、*n*-ヘキサン 10.0 ml で PCP アセテートを抽出した。この PCP アセテート・*n*-ヘキサン溶液各 5.0 ml をとり、0.3 ppm 内部標準物質溶液 5.0 ml を加えて標準系列溶液とした。このときの PCP 濃度はそれぞれ0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125 および 0.15 ppm となる。この標準系列溶液各 2 μl ずつをガスクロマトグラフに注入し、ヘプタクロルエポキシサイドとのピーク高比を求め、検量線を作成した。

3. 結果および考察

3.1 アセチル化条件の検討

3.1.1 アセチル化助剤としてのアルカリ溶液

PCP アセテートの生成に及ぼすアルカリ溶液の影響

Table 1. Effect of Acetylating Agent on Formation of PCP Acetate

Acetylating agent ^{a)}	Peak height ratio ^{b)}
Potassium carbonate	1.095
Sodium carbonate	1.000
Potassium hydroxide	0.998
Sodium acetate	0.990
Sodium hydroxide	0.973
Sodium bicarbonate	0.972
Boric acid	0.214

a) 0.1 M solution.

b) Peak height of PCP acetate formed using other acetylating agents at the reaction using sodium carbonate.

Fig. 1. Effect of amount of acetic anhydride on formation of PCP acetate

を調べるため、Table 1 に示した 6 種の 0.1 M アルカリ溶液および Rudling¹¹⁾ がアセチル化に使用した 0.1 M ホウ酸溶液各 100 ml に、PCP 1.0 μ g を添加し、2.2.2 の操作でアセチル化し、各 2 μ l ずつをガスクロマトグラフに注入した。得られた各クロマトグラムのピーク高を炭酸ナトリウム溶液のそれと比較した。その結果、Table 1 に示すように、炭酸カリウムを用いた場合が最高のピーク高を示した。しかし、空試験を行ったところ、炭酸カリウムを用いてアセチル化した場合のみ、PCP アセテートと同一の保持時間を有するピークが出現することが分かった。空試験については、Chau ら¹²⁾ および Zitko ら¹³⁾ は無水酢酸を蒸留して精製することにより、妨害ピークを除去できると報告している。そこで著者らは 3 回蒸留を繰り返し精製した無水酢酸およびベンゼンで洗浄した炭酸カリウム溶液を用いて空試験を試みたが、妨害ピークを除くことができず、無水酢酸よりも炭酸カリウムに問題があるのではないかと考えられた。炭酸カリウム以外のアルカリ溶液では、ほぼ同程度

の生成率が得られたが、ホウ酸溶液を用いてアセチル化したものは生成率が非常に悪かった。

Rudling¹¹⁾ はアセチル化剤として無水酢酸とピリジンの混液を使用して、PCP をホウ酸溶液中でアセチル化を行い、良好な結果を得たと報告しているが、これはアセチル化にはアルカリ性であることが必要なためと思われる。

3.1.2 無水酢酸量

収率よく PCP をアセチル化するための無水酢酸量を調べるために、0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 100 ml に PCP 1.0 μ g を添加し、2.2.2 の操作のうち無水酢酸量を 0.5~5 ml まで変えて PCP アセテートの生成率を調べた。その結果、Fig. 1 に示すように無水酢酸量は 2 ml で十分であることが分かった。

3.1.3 抽出溶媒としてのアルカリ溶液

留液から *n*-ヘキサンに抽出された PCP を転溶するアルカリ溶液の検討を行った。

n-ヘキサン 100 ml に PCP 1.0 μ g を添加し、Table

Table 2. Recovery of PCP from *n*-Hexane Extract

Alkali ^{a)}	PCP added (μ g)	PCP acetate		
		Calculated (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)
K ₂ CO ₃	1.0	1.1578	1.179	101.8
Na ₂ CO ₃	1.0	1.1578	1.151	99.4
CH ₃ COONa	1.0	1.1578	1.103	95.3
KOH	1.0	1.1578	1.094	94.5
NaHCO ₃	1.0	1.1578	1.094	94.5
NaOH	1.0	1.1578	0.978	84.5

^{a)} 0.1 M solution.

Fig. 2. Relationship between reaction time and formation of PCP acetate

Table 3. Repeat Experiments of Formation of Acetyle Derivative from PCP

Exp. no.	PCP added (μg)	PCP acetate		
		Caluculated (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
1	0.2	0.2316	0.228	98.45
2	0.2	0.2316	0.226	97.58
3	0.2	0.2316	0.231	99.74
4	0.2	0.2316	0.227	98.01
5	1.0	1.1578	1.128	97.43
6	1.0	1.1578	1.118	96.56
7	1.0	1.1578	1.099	94.92
8	1.0	1.1578	1.130	97.60
9	10.0	11.578	11.56	99.84
10	10.0	11.578	11.43	98.72
11	10.0	11.578	11.37	98.20
12	10.0	11.578	11.56	99.84
Mean				98.074
Standard deviation				± 1.437

2に示す6種類の0.1 M アルカリ溶液40, 30, 30 ml で3回振とう抽出し, 2.2.2によりアセチル化して内部標準物質を添加し, GC による分析を行ってアルカリ溶液による抽出における回収率を求めた。

その結果, Table 2 にみられるように, 炭酸カリウム溶液を用いた場合の回収率が最もよかったが, 3.1.1で述べたように炭酸カリウム試薬中の不純物に由来する妨害ピークが加算されるため, *n*-ヘキサンから PCP を抽出するアルカリ溶液として炭酸ナトリウム溶液を用いることとした。

3.1.4 反応時間

アセチル化に要する時間を調べるため, 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 100 ml に PCP 1.0 μg を添加し, 2.2.2の操作のうち振とう時間を1~60分まで変えて PCP アセテートの生成率を調べた。その結果, Fig. 2に示すように5分間の振とうで十分アセチル化できることが分かったが, いっそう確実を期するために, 10分間振とうすることとした。

3.1.5 再現性

0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 100 ml に PCP 0.2, 1.0 および 10.0 μg 添加し, 2.2.2の操作に従ってそれぞれ4回ずつ繰り返して実験を行い, ピーク高比から別に作成した検量線によって, PCP アセテート生成率の再現性について検討した。その結果, Table 3 に示すように, 12回の平均生成率98%, その標準偏差1.44であり満足すべき結果を得た。

3.2 カラムクロマトグラフィー

経木から PCP を溶媒で直接抽出した場合, ガスクロ

マトグラム上に多くのピークが出現し, PCP の定量を妨げるため, 特に微量の PCP を分析する場合には障害となってくる。そこで経木から抽出した PCP をフロリジル, シリカゲル, アルミナおよび活性炭などのカラム充てん剤を用いて, *n*-ヘキサン, ベンゼン, エーテル, アセトン, 酢酸エチル, エーテル・*n*-ヘキサン混液などを溶出液としてカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを試みた。しかし, いずれの場合も経木に由来する妨害ピークを除くことはできなかった。

Chau ら¹²⁾は非常に“きたない試料”について活性度を変えた中性アルミナを用いてクリーンアップを行っているが, いずれも PCP の回収率は20%以下であり, フロリジルを用いた場合, 75%以上の回収率を得たと報告している。

そこで PCP そのままの形でのクリーンアップは困難であると考え, PCP をアセチル化した後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを試みた。130°で活性化したシリカゲルに水を0, 3, 5および7%加えてよく混和したものを用いて, 操作2.2.3によってカラムをつくり, このカラムに PCP アセテート 10.0 μg をのせ, *n*-ヘキサンで溶出し, 溶出液を 20 ml ずつ分取して分析した。

5% 含水シリカゲルを用いたときの溶出パターンを Fig. 3 に示した。この結果から最初の 80 ml は捨て, その後の 200 ml を分取すれば 100% PCP アセテートが回収できることが分かった。3%および7%含水シリカゲルを用いた場合には, それぞれ溶出液の 200~480 ml および 40~200 ml の分画に PCP アセテートが溶

Fig. 3. Elution pattern of PCP acetate by column chromatography on silica gel with *n*-hexane

Fig. 4. Gas chromatograms of PCP acetate

A, gas chromatogram without clean up; B, gas chromatogram after clean up on silica gel column; 1, PCP acetate; 2, internal standard

Column: 3% OV-17, 3 mm×2 m glass column; column temp., 200°C; inj. temp., 230°C; detector, ECD

Table 4. Recovery of PCP Using Proposed Methods from Wooden Chips

Method	PCP—Na Added (μg)	PCP Acetate		
		Calculated (μg)	Found ^{a)} (μg)	Recovery (%)
Shaking method	1.08	1.155	1.003	86.8
Reflux method	1.08	1.155	0.859	74.4
Alkaline extraction method	1.08	1.155	0.984	85.2
Steam distillation method	1.08	1.155	1.137	98.4
Distillation method	1.08	1.155	1.101	95.3

^{a)} Mean value of three tests.

出ることが分かった。水を含まないシリカゲルの場合には、溶出液 500 ml を用いても PCP アセタートの溶出は認められなかった。この結果からシリカゲルの含水率は 5 および 7 % が適当と考えられたが、本実験では含水率 5 % を採用した。

経木抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作前と後のガスクロマトグラムを Fig. 4 に示したが、妨害物が除かれたことが知られる。

3.3 抽出法の検討

試料中の PCP の抽出法としては種々の方法があるが、経木などの木材から PCP を抽出する場合には、どのような抽出法が適しているかを調べるため、細切した経木 10 g に PCP ナトリウムの 1.5 ppm 水溶液 (純度 72.0 % で 1 ml 中 PCP ナトリウム 1.08 μg を含む) 1.0 ml を添加したものについて、次の五つの方法で抽出し比較検討した。

①振とう抽出法: 経木 10 g を分液漏斗に秤取し、*n*-ヘキサン 50 ml ずつで 30 分間、3 回振とう抽出する。

②還流法: 経木 10 g をナス型フラスコに秤取し、*n*-ヘキサン 100 ml を加えた後、還流冷却器を付け水浴上で 7 時間還流抽出する。

③アルカリ抽出法: 経木 10 g を分液漏斗に秤取し、0.1 *N* 水酸化ナトリウム溶液 50 ml ずつで 30 分間、3 回振とう抽出し、抽出液を合わせる。それに 10 % 塩酸 10 ml を加えて酸性とし、*n*-ヘキサン 50 ml ずつで 10 分間、2 回振とう抽出する。

④蒸留法: 経木 10 g を丸底フラスコに秤取し、水 300 ml およびリン酸 5 ml を加えて、直火でフラスコ中の水がほとんどなくなるまで蒸留する。留液は 0.1 *N* 水酸化ナトリウム溶液 10 ml 中に捕集し、蒸留終了後、10 % 塩酸 10 ml を加えて酸性とし、*n*-ヘキサン 50 ml ずつで 10 分間、2 回振とう抽出する。

⑤水蒸気蒸留法: 経木 10 g を丸底フラスコに秤取し、以下 2.2.1 の操作に従い、0.1 *N* 水酸化ナトリウム溶液 10 ml 中に捕集し、以下蒸留法と同様に操作し抽出する。

上記 5 通りの抽出法で得られた *n*-ヘキサン層から

2.2.1 により 0.1 *M* 炭酸ナトリウム溶液に PCP を転溶し、以下 2.2.2 および 2.2.3 の操作に従い PCP を定量した。その結果は Table 4 に示すように還流法が 74.4 % と低い回収率を示した。これは Bevenue ら¹⁴⁾が報告しているように、加熱により PCP が揮散するためと考える。

ついでアルカリ抽出法が 85.2 % とやや低い回収率を示したが、これは PCP を有機溶媒からアルカリ溶液に転溶する際に、エマルジョンを形成するための損失によるものと考えられる。

振とう抽出法では 86.8 % の回収率であった。この原因として PCP ナトリウムのまま *n*-ヘキサン抽出したことやエマルジョンを形成したことなどが考えられた。そこで PCP を添加したものについて、同様に操作して回収率をみたところ、ナトリウム塩を添加した場合とほとんど変わらなかった。したがってアルカリ抽出法と同様にエマルジョン形成による PCP の損失と考える。

蒸留法および水蒸気蒸留法ではそれぞれ 95.3 および 98.4 % と良好な回収率を示し、妨害物も前 3 者に比べて少なかった。このことより、経木からの PCP の抽出法としては、より簡単な水蒸気蒸留法が適当であると考えられる。

4. ま と め

経木から PCP を分析する方法について検討した。すなわち、経木中の PCP を水蒸気蒸留法により分離し、ついで *n*-ヘキサンで抽出し、さらに 0.1 *M* 炭酸ナトリウム溶液に転溶した。これに無水酢酸を加えて振とうすることによりアセチル化し、生成した PCP アセタートを *n*-ヘキサンで抽出して GC で定量した。アセチル化率は 98 % で、その標準偏差は 1.44 であった。また、妨害物の多いものはアセチル化した後、5 % 含水シリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーを行えばよいことが分かった。

謝 辞

本研究に際し、その機会を与えられ、かつ、御校閲をいただいた、当所 田中一成所長ならびに藤村暢男化学部長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ress, J., Higginbotham, G.R.: J. Chromatog., **47**, 474 (1970).
- 2) Barthel, W.F., Curley, A., Thrasher, C.L., Sedlak, V.A., Armstrong, R.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **52**, 294 (1969).
- 3) Higginbotham, G.R., Ress, J., Rocke, A.: *ibid.*, **53**, 673 (1970).
- 4) Van Langeveld, H.E.A.M.: *ibid.*, **58**, 19 (1975).
- 5) Yip, G.: *ibid.*, **47**, 1116 (1964).
- 6) Bevenue, A., Wilson, J.R., Potter E.F., Song, M.K., Beckman, H., Mallett, G.: Bull. Environ. Contam. Toxcol., **1**, 237 (1966).
- 7) Bevenue, A., Emerson, M.L., Casarett, L.J., Yauger, Jr. W.L.: J. Chromat., **38**, 467 (1968).
- 8) Stark, A.: J. Agric. Fd. Chem., **17**, 871 (1969).
- 9) Rivers, J.B.: Bull. Environ. Contam. Toxcol., **8**, 294 (1972).
- 10) Kanazawa, J.: Agr. Bio. Chem., **27**, 153 (1963).
- 11) Rudling, L.: Water Research, **4**, 533 (1970).
- 12) Chau, A.S.Y., Coburn, J.A.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **57**, 389 (1974).
- 13) Zitko, V., Hutzinger, O., Choi, P.M.K.: Bull. Environ. Contam. Toxcol., **12**, 649 (1974).
- 14) Bevenue, A., Beckman, H.: Residue Reviews, **19**, 83 (1967).
- 15) Monsanto Chemical Co.: Tech. Bull. SC-8 (1963): Residue reviews, **19**, 83 (1967).
- 16) 津田 勉, 狩谷貞二: 日水誌. **29**, 828 (1963).
- 17) Williams, A.I.: Analyst, **96**, 296 (1971).