

底質及び生物試料における 2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法

山口県環境保健研究センター
下尾和歌子・古谷典子・嘉村久美子

Determination of 2-(3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)benzotriazole in Sediment and Biological Samples

Wakako SHITAO・Noriko FURUYA・Kumiko KAMURA
Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health

はじめに

2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾール(別名 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール, CAS No.3846-71-7, 以下 DBHPB とする.)は主にプラスチック用の紫外線吸収剤として使用されているが, 自然的作用による化学変化を生じにくいもの(難分解性)であり, かつ, 生物の体内に蓄積されやすいもの(高蓄積性)であることが既に公表されている¹⁻⁴⁾. そのため, 2004 年 9 月に化学物質審査規制法の第一種監視化学物質に指定され, さらに 2005 年 11 月に開催された厚生労働省, 経済産業省及び環境省の合同審議会において「継続的に摂取される場合には人の健康を損なうおそれがある」可能性が示され, 第一種特定化学物質に指定する方針が出された⁵⁻⁷⁾.

このような危険性が明らかになりつつある状況にも拘わらず, その分析法はこれまで確立されていないため, 当センターでは昨年度, 水試料中の DBHPB の分析法の検討を LC/MS により行い⁸⁻¹⁰⁾, 水試料中に存在する DBHPB を数十 ng/L レベルで分析できることを確認した. この方法を用いて, 山口県内の河川水・海水を分析した結果, DBHPB の汚染は確認されなかった. しかし, DBHPB は水溶解性が非常に低く, また難分解性及び高蓄積性のため, 底質・生物中の汚染についても懸念される. そこで, 底質及び生物試料における DBHPB の分析法を前処理を含め検討した.

実験方法

1 試薬

実験に使用した DBHPB は東京化成工業(株)製を使用し, 標準溶液はメタノールで適宜希釈して調製した. アセトン, ジクロロメタン, エタノール及びヘキサンは和光純薬工業(株)製残留農薬試験・PCB 試験用, メタノール, 蒸留水は和光純薬工業(株)製液体クロマトグラフ用, 無水硫酸ナトリウム, 塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)製残留農薬試験用, 水酸化カリウムは和光純薬工業(株)製特級を使用した. 抽出液の精製に使用した固相カートリッジカラムは Varian 製 Bond Elut Jr. 及び Waters 製 Sep-Pak Plus を使用した.

2 LC/MS 装置及び分析条件

装置は Shimadzu 社製 LCMS2010, 分析カラムは Waters 社製 XTerra MS C₈(内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 5 μ m), 移動相はメタノール/水(85/15)を使用した. 分析カラム及び移動相以外は水試料の測定と同条件である⁸⁻⁹⁾.

3 試料の採取及び検体の調製

試料の採取及び分析試料の調製方法は原則として, 「化学物質環境実態調査実施の手引き」¹¹⁾に従った.

分析法の検討に使用した底質及び生物試料は 2005 年 9~10 月に徳山湾及び萩沖で採取した試料を用い, 生物試料としてはボラを使用した. 分析法の検出下限値(MDL)の算出に用いた試料は, 底質については財団法人日本環境衛生センターより送付された「MDL 測定用底質」を使用し, 生物については可能な限り対象物質を含まない試料として萩沖のボラを使用した.

4 試料の前処理

底質試料は, 乾燥重量から乾泥換算試料量として 5g 相当の試料を 50mL 共栓付遠沈管に分取した後, アセトン 20mL を加え 10 分間振とう抽出した. 3000rpm で 10 分間

遠心分離を行い、上澄み液を 50mL ナス型フラスコに移した。残渣にさらにアセトン 20mL を加え同様の操作を行い、上澄み液を合わせ、得られたアセトン抽出液はロータリーエバポレーターを用いて約 10mL になるまで濃縮した。この濃縮液を、予め 3%塩化ナトリウム溶液 200mL を入れた 300mL 分液ポートに移し、抽出容器をアセトン約 2mL とヘキサン 30mL を数回に分けて洗浄し、洗液を分液ポートに合わせた。10 分間振とう抽出し、ヘキサン層を分取し、さらに水層をヘキサン 30mL で抽出した後、合わせたヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたヘキサン層はロータリーエバポレーターを用いて数 mL まで濃縮し、スピッツ型共栓付試験管に移した後、さらに 1mL まで濃縮した。この溶液を Bond Elut Jr. -NH₂ に負荷し、洗液も含めてヘキサン 5mL で溶出した。溶出液を窒素パージにより濃縮乾固し、メタノール 1mL に溶解した溶液を LC/MS 測定溶液とした。

生物試料は、試料 5g を分取した 200mL 丸底フラスコに 1mol/L 水酸化カリウム / エタノール溶液 50mL を加え、水浴中 80 で 1 時間アルカリ分解を行った。反応終了後、室温まで冷却し、冷却管上部からヘキサン 50mL を加え洗浄した。アルカリ分解液を 300mL 分液ポートに移し、残渣を 50%エタノール / ヘキサン 20mL で数回に分けて洗った。精製水 50mL を加え、10 分間振とう抽出した後、ヘキサン層を分取し、水層はさらにヘキサン 50mL で抽出した。2 回目の抽出終了後、水層は廃棄し、ヘキサン層を分液ポートに合わせた。精製水 200mL を新たに加え、ヘキサン層を洗浄する作業を 2 回繰り返した。ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて数 mL まで濃縮し、スピッツ型共栓付試験管に移した後、さらに 1mL まで濃縮した。以下、精製操作は底質試料と同様である。

5 統計処理

装置検出下限値 (IDL) は S/N=10 程度の標準溶液 (2ng/mL) を 7 回測定し、その標準偏差の 2 倍値に Student の t 分布の 95% 値 (片側) を乗じて算出した¹¹⁾。MDL は測定用試料に IDL の 5 倍程度の濃度になるよう DBHPB を添加した試料を前処理後、分析する操作を 7 回繰り返し、IDL と同様に算出した¹¹⁾。分析方法の定量下限値 (MQL) は MDL 測定時の標準偏差の 10 倍値として求めた¹¹⁾。

結果及び考察

1 LC/MS 条件

DBHPB の分析における LC/MS 条件の最適化は水試料の分析の際に行っており、イオン化モードは APCI 正イオンモードで、定量イオンは m/z=324、確認イオンは m/z=325

とした。しかし、底質及び生物試料は水試料と比較すると夾雑物が多く、水試料と同条件では妨害ピークが多数認められたため、分離カラム及び移動相の検討を行った。

まず、妨害ピークとの分離度を上げるため、水試料の分析で使用した逆相系 ODS カラム Waters 社製 XTerra MS C₁₈ (内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 5µm) を用いて、メタノール / 水系での条件を検討した。その結果、メタノール / 水 (90/10) ではピークは確認でき、定量性もあるが、分離度は妨害ピークとの分離ができるほど上がらず、またピーク形がブロードとなった。さらに、メタノール / 水 (80/20) ではカラムから DBHPB が溶出せず、ピークは確認できなかった。そのため、分離カラムを XTerra MS C₈ より保持力が弱い XTerra MS C₈ を用いて移動相を検討した。その結果、メタノールのみよりはブロードになるもののピーク形が維持でき、なおかつ流速 0.2mL/min で保持時間が 7.5 分と妨害ピークとの分離がよい条件となったメタノール / 水 (85/15) を移動相とした (図 1)。

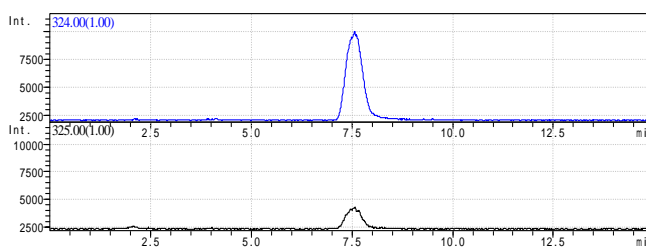


図 1 標準物質のクロマトグラム (10ng/mL)

2 LC/MS における検量線・装置検出限界

1~50ng/mL の DBHPB メタノール溶液を調製し、検量線を作成した (図 2)。分析に用いた Shimadzu 社製 LCMS2010 の IDL は 0.38ng/mL であり、その時の変動係数は 5.2% であった。

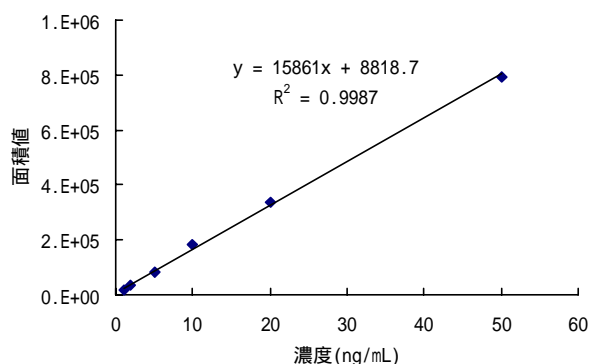


図 2 検量線 (1~50ng/mL)

3 底質及び生物試料からの抽出方法の検討

底質試料からの抽出については、DBHPB の溶解性が高

く、親水性の溶媒として、アセトンを使用して固液抽出をすることで、約 94%以上の良好な回収率が得られた。

一方、生物試料については、底質試料と同様にアセトン抽出を行うと、多量の脂質のためクリーンアップ後も妨害ピークが確認され、定量が不可能であった。そのため、生物試料については脂質の分解に有効であるアルカリ分解により DBHPB の抽出を行った。精製前のため妨害ピークの影響はあるが、回収率は約 100%以上であった。

今回の検討に使用した底質試料については、アセトン抽出により問題なく定量することができ、アルカリ分解より操作が簡便であることからアセトン抽出を行うこととしたが、有機物が多いような底質試料については生物試料と同様のアルカリ分解による前処理が妨害ピークの除去に有効であると考えられる。

4 精製方法の検討

精製に使用する固相カラムを検討するため、順相系及び逆相系の固相カートリッジに標準物質 20ng を添加し、ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、メタノール/水系を溶出溶媒として 5mL × 4 回の画分を行い回収率を確認した(図 3, 図 4)。この結果から、各カートリッジごとに最適な溶出条件を決定し(表 1)、底質試料の抽出液を使用して精製効果を確認した。精製後のクロマトグラ

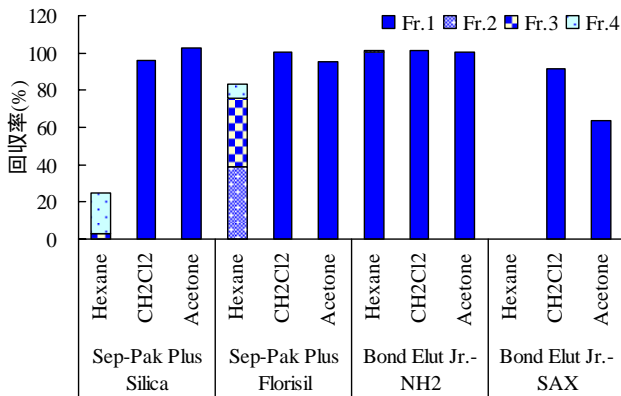


図 3 順相系固相カートリッジ溶出試験

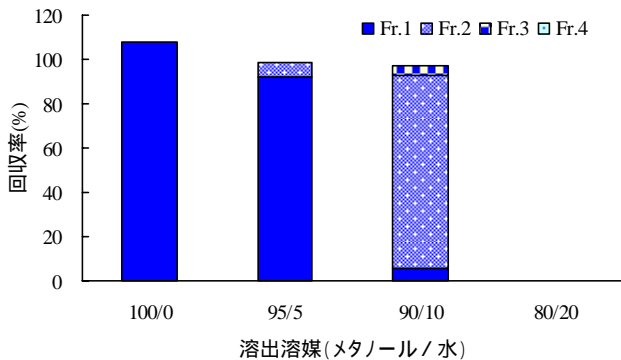


図 4 Sep-Pak C₁₈ カートリッジ溶出試験

ムを確認し、最も精製効果が高かった Bond Elut Jr.-NH₂ を用いてヘキサン 5mL で溶出する精製条件を決定した。

表 1 固相カートリッジの溶出条件

使用したカラム	第 1 画分 (洗浄)	第 2 画分 (溶出)
Sep-Pak Plus Silica	ヘキサン 10mL	ジクロロメタン 5mL
Sep-Pak Plus Florisil	ヘキサン 5mL	ジクロロメタン 5mL
Bond Elut Jr.-NH ₂	-	ヘキサン 5mL
Bond Elut Jr.-SAX	ヘキサン 10mL	ジクロロメタン 5mL
Sep-Pak Plus C ₁₈	MeOH/H ₂ O(80/20) 10mL	MeOH/H ₂ O(95/5) 10mL

5 分析方法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

底質試料の本分析方法による MDL は 0.16ng/g-dry, MQL は 0.41ng/g-dry であり、生物試料については MDL が 0.13ng/g-wet, MQL が 0.32ng/g-wet であった。

6 添加回収試験

徳山湾及び萩沖の底質試料 5g に DBHPB のメタノール溶液を MDL の 30 倍程度の濃度となるよう添加し (4ng/g)、添加回収試験を行った。測定回数 5 回で回収率は、徳山湾が 87 ~ 109%、萩沖が 90 ~ 101% であった。同様の条件における生物試料の添加回収試験結果は、徳山湾が 96 ~ 102%、萩沖が 88 ~ 107% といずれも良好な回収率であった。

7 実試料の分析

実試料として、徳山湾及び萩沖の底質・生物試料を測定した。底質試料からは検出されなかったが、徳山湾及び萩沖のボラから MDL 未満の痕跡が確認された(図 5)。

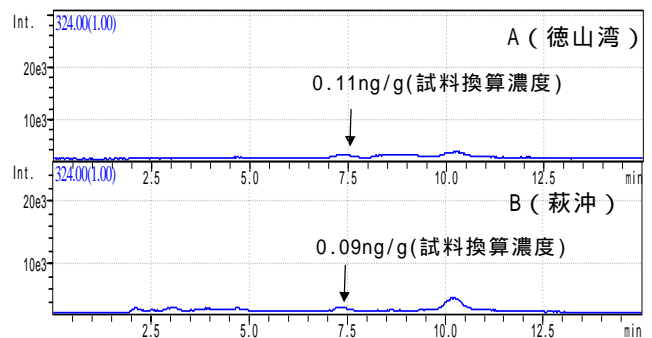


図 5 ボラのクロマトグラム

まとめ

底質及び生物試料中の DBHPB の分析方法について検討した。底質はアセトンによる固液抽出後、生物はアルカリ分解後、固相カートリッジカラムにより精製することで、検体中の DBHPB を 0.1ng/g レベルで分析することが

可能であった。今回試料として用いた徳山湾及び萩沖の底質から DBHPB は検出されなかったが、ボラからは両地点とも MDL 未満の痕跡が確認された。

なお、本研究は環境省委託の平成 17 年度化学物質環境実態調査化学物質分析法開発(LC/MS)の一環として実施した。

参考文献

- 1)官報, 5-3580, 5-3604(1998).
- 2)厚生労働省:<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/01/dl/s0113-5c.pdf>
- 3)経済産業省:http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/07/shinsabukai/0511/3-1-3.pdf
- 4)環境省: <http://www.env.go.jp/council/05hoken/y051-58/mat03.pdf>
- 5)厚生労働省:<http://www.mhlw.go.jp/topics/2006/07/tp0711-1.html>
- 6)経済産業省:http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/bentori/ittoku060113.pdf
- 7)環境省: <http://www.env.go.jp/council/05hoken/y050-14b.html>
- 8)環境省環境保健部環境安全課: 化学物質と環境 - 平成 16 年度化学物質分析法開発調査報告書 - , 286-299(2005).
- 9)古谷典子, 澄田和歌子, 嘉村久美子: LC/MS による 2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法, 山口県環境保健研究センター所報, **47**, 45-47(2004).
- 10)古谷典子, 鈴木茂他: LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(22), 第 14 回環境化学討論会講演要旨集, 822-823(2005).
- 11)環境省環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き(2005).