

[ノート]

生物試料中の tert - ブチルフェノール類の分析

吉田光方子* 藤森一男 中野武

Analysis of tert - Butylphenols in Biological Samples

Mihoko Yoshida*, Kazuo Fujimori, Takeshi Nakano

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan

SUMMARY

The tert - Butylphenols are used widely as antioxidants for plastics.

We tried to examine extraction methods, cleanup methods, operational conditions of GC/MS, etc., in order to establish the analytical methods of these tert - Butylphenols in biological samples.

When we analyzed fish using the analytical methods acquired as a result, we could gain a reliable fixed quantity.

はじめに

前報¹⁾において、プラスチック製品の劣化を防ぐ目的で多用されている酸化防止剤のうち、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール、2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノール及び2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールこれら4物質の水質及び底質試料における分析法を報告した。そのなかで確立した分析法を用いて環境中の河川水、海水及び底質について測定を行ったところ、2種の物質が検出された。

また、2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノールは「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」の第一種特定化学物質であり、生物濃縮性を持つ。そのため生物試料中に残留するこれらブチルフェノール類の分析法を確立し、環境中での存在状況を広く把握することは極めて重要である。そこで本報では、簡易でかつ低濃度レベルでの

検出が可能な生物試料中の分析法を開発することを目的として検討を行った。本法を生物試料でのブチルフェノール類の測定に適用した結果、ppbレベルでの定量が可能であり、環境中における測定に有用であると認められたので報告する。

方 法

2.1 試料

2001年9月に姫路沖で採取したスズキ体長:59cm、体重1.7kg)を試料とした。この試料を採取後、骨、皮、内臓等を除いた可食部のみをフードプロセッサーを用いてミンチ状にし、蓋付きのガラス容器に密栓して-10℃以下で冷凍保存したものを分析に使用した。

2.2 試薬及び調製

分析法開発の対象とした物質及びその物性は前報¹⁾に示したとおりである。2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール及び2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールは、

安全科学部

* 別冊請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究所
安全科学部 吉田光方子

東京化成製，2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノールはアルドリッチ製を使用した．検量線作成のための標準溶液は，1 µg/mL になるよう各 *tert*-ブチルフェノール液を混合したものをヘキサンにより適宜希釈して調製した．また，内部標準物質として用いたヘキサクロロベンゼン - $^{13}\text{C}_6$ (以下，HCB - $^{13}\text{C}_6$ と略する) は，Cambridge Isotope Laboratories 製等，ほかの試薬についても被験物質の測定を妨害しないものを使用した．

2.3 器具及び装置

生物試料の高速溶媒抽出 (以下，ASE と略する) には，ダイオネクス社 ASE-200 を用い，高温，高圧下で魚試料から対象物質を抽出した．この装置で用いる抽出用セルはダイオネクス社 33mL セル，抽出液捕集バイアルはダイオネクス社 60mL バイアル，セルロースフィルターはダイオネクス社 P/N49458 であり，充填材 (ハイドロマトリクス) にはバリアン社の CHEM TUBE-HYDROMATRIX を使用した．

超音波発生装置は KAIJO 製の SONO CLEANER 200R を，遠心分離機は HITACHI 製の 05PR-22 を使用した．

抽出液のヘキサン転溶液を窒素ガスをを用い濃縮するのに Zymark 製の TurboVap LV または TurboVap を用いた．

分析には日本電子製 JMS-AM150 から成る GC / MS を，分離カラムには Agilent Ultra-2 (25m × 0.2mm ; 0.33 µm) を使用した．

また，濃縮液中に含まれる魚の脂肪などを除去するためにクリーンアップカラムの検討を行った．クリーンアップカラムには市販のミニカラムを使用した．このミニカラムは，被験物質の測定を妨害しないためにガラスハウジングを用いたフロリジルカラム (Supelco 社製 SUPELLEAN LC-Florisil(118J-051)) やアミノプロピルカラム (Supelco 社製 SUPELLEAN LC-NH2 (No.57040))，または酸性アルミナカラム (Supelco 社製 SUPELLEAN LC-Alumina-A (No.57082-U)) を用いた．

これらのカラムにおける対象物質の回収率を求めるために，各カラムに対象物質を 0.1 µg，もしくは 1 µg を添加し，ヘキサンで溶出し 2 mL ごとに分画した．得られた溶出液から対象物質の回収率を求めた．

2.4 生物試料の抽出法

生物試料の抽出法として，アセトニトリル溶媒抽出，ASE 抽出²⁾及びアルカリ分解抽出の3法を検討した．

アルカリ分解抽出は，生物試料 5 g を遠沈管に採取後，1N-KOH 溶液 50mL を加え十分混合し 24 時間静置した．その後，2000r.p.m で 5 分間遠心分離し上澄液を分取した．得られた上澄液を以下 2.5 の操作に用いた．

つぎにアセトニトリル溶媒抽出法は，以下のとおり行った．生物試料 5 g を遠沈管に採取後，アセトニトリル 50mL を加え約 10 分間超音波処理，ホモジナイズ，10 分間振とう後，2000r.p.m で 5 分間遠心分離した．

アセトニトリル層を分取後，残渣に再度アセトニトリル 50mL を加え，同様の操作を行った．得られた抽出液を合わせ，以下 2.5 の操作に用いた．

また ASE 抽出は，生物試料 5 g をハイドロマトリクスと混合し，均一になるようよく攪拌した．この生物試料混合ハイドロマトリクスをセルロースフィルター及びハイドロマトリクスを入れたセルに詰め，再びハイドロマトリクスで上端を覆い ASE 供試セルとした．抽出溶媒にアセトニトリルを用いて ASE で抽出を行い，得られた抽出液を以下 2.5 の操作に用いた．抽出条件³⁾は Table 1 に示す．

Table 1 : Extraction conditions of ASE (Accelerated Solvent Extraction)

Solvent	: acetonitrile
Oven Temperature	: 150
System Pressure	: 2000 psi
Oven heat-up Time	: 7 min
Static Time	: 10 min
Flush Volume	: 60 % of extraction cell volume
Static Cycles	: 3 times
Purge Time	: 90 sec
Total Extract Volume	: 30 ~ 50 mL
Total Extract Time	: 40 ~ 45 min

以上3種の抽出法のうち，アルカリ分解抽出法及び ASE 抽出法において，アルカリ中または高温，高圧下での対象物質の安定性をみるために生物試料が存在しない状態での各物質の残存率を確認した．

その方法としてアルカリ分解抽出法では，0.1N-KOH 溶液及び 1N-KOH 溶液それぞれ 50mL に対象物質 1 µg を添加して 1 時間及び 24 時間後の残存率を測定した．

また ASE 抽出法では，ハイドロマトリクスに対象物質 1 µg または 0.1 µg を添加して残存率を測定した．空試験として，ハイドロマトリクス及びガラスビーズのみをセルに充填し同様の操作を行った．

2.5 試料液の調製

上記の抽出法で得られた抽出液を、2%の塩化ナトリウム水溶液 500mL が入った 1 L の分液ロートに移した後、ヘキサン 100mL を加え、10 分間振とう後静置した。ヘキサン層を分取後、水層に再度ヘキサン 100mL を加え、同様の操作を行った。ヘキサン層を合わせ無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、TurboVap を用いて約 1 mL に濃縮した。得られた濃縮液に内部標準物質として HCB-¹³C₆ の 1 μg/mL 標準溶液を 0.1mL (0.1 μg) 添加後、2 μL を GC/MS に注入し、SIM 法により定量した。

2.6 測定条件

上記の調製法により濃縮した試料及び検量線作成用試料を Table 2 の測定条件のもと、GC/MS-SIM で定量を行った。

Table 2 : Operational conditions of GC-MS (SIM)

Gas chromatograph	: HP-5890 (Hewlett – Packard)
Mass spectrometer	: JEOL JMS-AM150
Column	: Agilent Ultra-2 (25m × 0.2mm ; 0.33 μm)
Temp. program	: 60 (2 min) - 20 / min - 180 - 3 / min - 240
Injection temp.	: 220
Interface temp.	: 250
Carrier gas	: Helium (Flow Rate ; 1 mL/min)
Injection mode	: Splitless (purge on time ; 1.5 min)
Ion source temp.	: 250
Ionization voltage	: 70 V
Ionization current	: 300 μA
Monitor ion (m/z)	: 2,6-di-tBP (191, 206), 2,6-di-tB-4MP (205, 220), 2,4,6-tri-tBP (247, 262), 2,6-di-tB-4EP (219, 234), Internal standard HCB- ¹³ C ₆ (290, 292)

結果と考察

3.1 クリーンアップカラムの検討結果

フロリジルカラムを用いた分画試験の結果を Fig.1 に示す。いずれもヘキサン 4mL までの分画で対象物質は溶出され、それ以降は検出されなかったことから、溶出量はヘキサン 5mL とした。

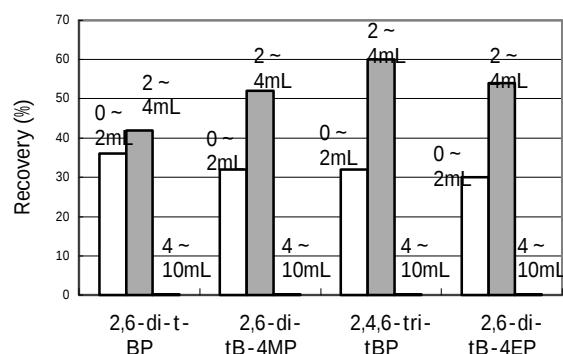


Fig.1 Elution pattern with Florisil Column

市販のミニカラムを用いた各物質の回収率を Table 3 に示す。ガラス製ハウジング材のフロリジルカラムは、対象物質の回収率が 78~92%と良好な値が得られた。ハウジング材がプラスチック製であったアミノプロピルカラムと酸性アルミナカラムでは、2,6-di-tB-4MP、及び 2,6-di-tB-4EP において、添加量以上の値が得られたため、正確な定量には適さないと考えられた。これは、前報¹⁾に示したようにハウジング材に酸化防止剤として、これらの物質が使用されていることが原因だと考えられた。これらのミニカラムを用いるに際し、事前にブランクや回収率を確認してから使用するのが望ましい。

Table 3 : Recovery of t-BP with clean-up column

	recovery(%)		
	florisil	amino propyl	alumina
2,6-di-t-BP	78	105	93
2,6-di-tB-4MP	84	-	-
2,4,6-tri-tBP	92	107	102
2,6-di-tB-4EP	84	-	-

3.2 アルカリ溶液中での対象物質の残存率

0.1N-KOH 及び 1N-KOH 溶液中での対象物質の残存率を Fig.2 に示す。0.1N-KOH 溶液中に対象物質を入れて 1 時間経過したものでは、対象物質が残っていたが、24 時間後には 2,6-di-tB-4MP 及び 2,6-di-tB-4EP の残存率が 60%程度にまで減少した。また 1N-KOH 溶液については、1 時間経過後に全ての対象物質の残存率が 80%程度となり、24 時間後には 2,6-di-tB-4MP 及び 2,6-di-tB-4EP はほとんど分解され、わずかしかなかった。

以上の結果からアルカリ分解では対象物質が不安定であるため、抽出法として不適であると考えられた。

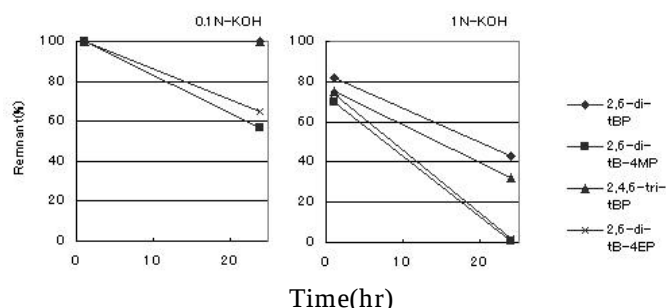


Fig.2 Resistance to 0.1N-KOH,1N-KOH

3.3 ASE抽出での対象物質の残存率

ASE抽出での対象物質の残存量を Table 4 に示す。対象物質をハイドロマトリックスに $1\mu\text{g}$ 添加したものの残存量は 2,6-di-tB-4MP が添加量よりも多く回収されているが、他の対象物質は添加量とほぼ同量が回収された。また対象物質無添加のハイドロマトリックス及びガラスビーズの充填材だけのものでも 2,6-di-tB-4MP が検出された。これら 2,6-di-tB-4MP の混入は、ASE 装置内に抽出溶媒が直接触れる可能性の高いチューブ等の付属品としてプラスチックが使用されていることによると推定される。

このような傾向を除けば、高温、高压条件下の ASE 抽出過程において対象物質は分解することなく安定して存在することが示された。

Table 4 : Stability of extraction with ASE

	$\mu\text{g/mL}$		
	Blank with Hydromatrix	Blank with Glassbeads	Addition of $1\mu\text{g}$ to Hydromatrix
2,6-di-tBP	0.00	0.00	0.94
2,6-di-tB-4MP	0.07	0.11	1.30
2,4,6-tri-tBP	0.00	0.00	1.04
2,6-di-tB-4EP	0.00	0.00	1.03

3.4 添加回収試験

生物試料に対象の標準物質 $0.1\mu\text{g}$ を添加したサンプルを本法により調製後、分析を行い回収率及び定量限界、検出限界を求めた⁴⁾。その結果を Table 5 に示す。

Table 5 : Recovery and detection limits

	Acetonitrile Extraction			ASE		
	Recovery (%)	C.V (%)	Detection limits($\mu\text{g / kg}$)	Recovery (%)	C.V (%)	Detection limits($\mu\text{g / kg}$)
2,6-di-tBP	71	7.4	16	106	13.9	24
2,6-di-tB-4MP	51	15.1	24	-	-	-
2,4,6-tri-tBP	50	13.4	21	112	14	20
2,6-di-tB-4EP	56	10.5	19	-	-	-

アセトニトリル溶媒抽出法では、回収率 50 ~ 71 % , 変動係数 7.4 ~ 15.1 % であり、検出下限値は 16 ~ 24 $\mu\text{g/kg}$ であった。アセトニトリルの溶媒抽出での回収率は ASE 抽出と比較して劣るものの、4 種類の対象物質の装置などからの混入がないため同時分析が可能であった。

一方、ASE 抽出法では回収率 106 ~ 112 % , 変動係数 13.9 ~ 14 % であり、検出下限値は 20 ~ 24 $\mu\text{g/kg}$ であった。この ASE 抽出法での分析では、2,6-di-tBP 及び 2,4,6-tri-tBP の添加回収率は良好であった。これは溶媒抽出と比較して、ASE 抽出の方が過酷な抽出条件であることからマトリクスも含め、効率的に抽出されているからだと考えられた。しかし 2,6-di-tB-4MP , 及び 2,6-di-tB-4EP については、回収率のばらつきが大きく、かつ空試験の結果を差し引いても添加した標準物質質量以上の回収量が確認され、正確な値を得ることが困難であった。これは ASE 抽出用セルの状態により抽出液量の変動したり、また対象物質が実試料中にも存在するために、回収量に影響を与えることによると考えられた。以上のことから ASE 抽出法においては 4 物質の一斉分析は困難であると思われた。

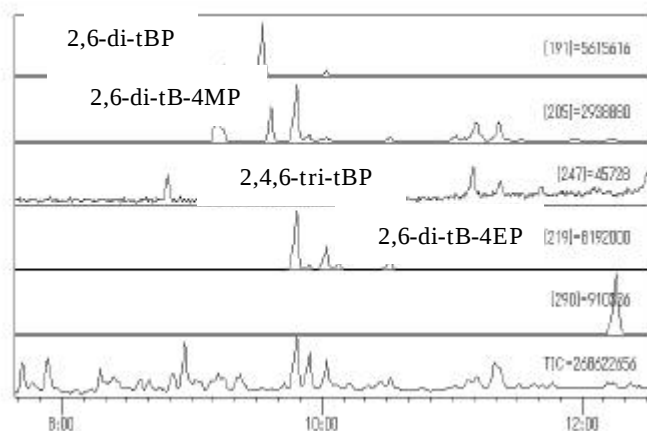
3.5 環境中の濃度レベル

本研究で得られた手法により、生物試料中の濃度を測定したところ Fig.3 に示すとおり、2,6-di-tB-4MP , 2,4,6-tri-tBP 及び 2,6-di-tB-4EP が検出された。

水質、底質試料では検出されなかった 2,4,6-tri-tBP が生物試料では検出されたことから、実際に生物濃縮が自然界で起こっている可能性が示された。

今後これら tert-ブチルフェノール類のモニタリングが必要だと思われる。

Fish (ASE , Internal standard 0.1 µg)



Fish (Acetonitril extraction , Internal standard 0.1 µg)

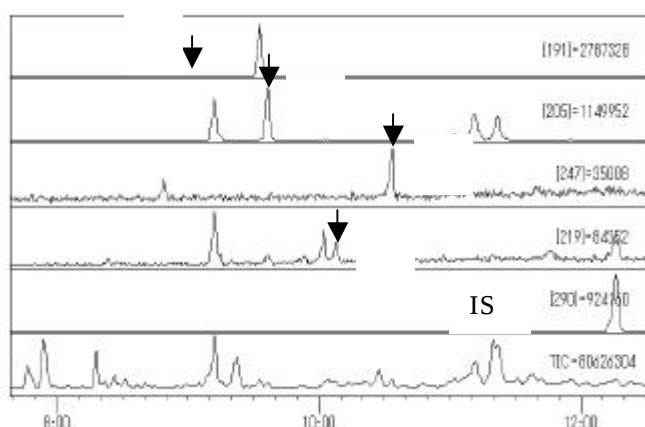


Fig.3 GC – MS (SIM) Chromatogram of sample

ま と め

本研究では、アセトニトリル溶媒抽出法及びASE抽出法を用いて魚試料中に存在するブチルフェノール類の同時分析を行うための検討を進め、以下の結果を得た。

1) 魚試料のクリーンアップを行う際に使用するカラムについて検討した結果、酸化防止剤による汚染の少ない

ガラスハウジングを用いたカラムが適している。回収率については、アミノプロピル等のミニカラムミニカラムの方が良好な結果が得られた。

2) 生物試料の抽出法について検討した結果、対象物質はアルカリ溶液中で不安定で分解され易いためアルカリ分解での抽出は不適である。したがって対象物質が安定して抽出されるアセトニトリル溶媒抽出及びASE抽出法を用い、分析法を確立した。

3) ASE抽出法では装置からの対象物質の混入が大きく 2,6-di-tB-4MP 及び 2,6-di-tB-4EP の定量が困難であるため、一斉分析には不適である。

4) 魚試料を分析したクロマトグラムには夾雑物の影響は見られず、ppb レベルで存在するブチルフェノール類の同時定量が可能であることが確認できた。

本報告は水中の化学物質分析法開発に関する平成 12, 13 年度の環境省委託研究として行ったものの一部である。

文 献

- 吉田光方子, 藤森一男, 中野武: 固相抽出法による水中 tert-ブチルフェノール類の分析法 . 兵庫県立公害研究所報告, **33**, 83-88(2001)
- 橋本俊次, 柴田康行ら: イカ肝臓を指標とした海洋におけるダイオキシン類モニタリング (続報). 第 8 回環境化学討論会講演要旨集, 242-243(1999)
- ダイオネクス社: ダイオネクス ASE レポート「高速溶媒抽出法による食品中残留農薬の抽出」「高速溶媒抽出法を用いた大量の魚組織試料からの PCB 抽出」「高速溶媒抽出法による魚組織中 CB の選択的抽出」など
- 環境庁環境保健部保健調査室: 化学物質分析法開発マニュアル, 186-191(1987)

(受理 2002 年 12 月 5 日)