

GC/MS を用いたジイソプロピルナフタレンの高感度測定法の開発

鈴木元治* 松村千里 中野 武

Development of High Sensitive Analytical Method for Diisopropylnaphthalene by GC/MS

Motoharu SUZUKI*, Chisato MATSUMURA and Takeshi NAKANO

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

High sensitive analytical method for Diisopropylnaphthalene (DIPN) was developed by GC/MS. Contamination of DIPN was minimized due to the reduction of instruments and analysis time in pre-treatment. Detection limit and quantitation limit of this method were 0.71ng/L and 1.8ng/L. From this method, 8 isomers of DIPN were assigned and approximately ten times higher sensitivity than previous methods was obtained. This method was suitable for the analysis of DIPN in environmental water samples.

I はじめに

ジイソプロピルナフタレン (DIPN) は、ナフタレンの2つの水素原子がイソプロピル基に置換された構造をしており (Fig.1), ポリ塩化ビフェニル (PCB) の代替品として1970年頃からインク溶剤や熱媒体油など様々な分野で使用されている。しかしながらDIPNは、難分解性かつ高蓄積性であるため^{1,2)}, 2004年には化学物質審査規制法 (化審法) の第一種監視化学物質に指定された。日本での2004年度のDIPNの製造・輸入・使用量は608トンである。

DIPNには各種の生体影響があり、魚類に対する急性毒性は、OECD分類基準ではtoxicに相当する (ヒメダカに対する LC_{50} が4.3mg/L)。また、慢性影響として実験動物の肝臓肥大化や染色体異常の誘発などが報告されている³⁾。このようなことから、DIPNの健康や環境への影響が懸念されており、DIPNの汚染状況を把握することが求められている。

DIPNの環境調査は、環境省により1975年、1977年及び1980年に全国の水質、底質及び魚類を対象として行われた⁴⁾。当時の調査結果では、他府県の一部の底質及び魚類からそれぞれ1.9~190ng/g及び0.52~48ng/g検出され、兵庫県の測定地点であった姫路沖の水質、底質及び魚類からは全て検出されなかった。また、すべての地域の水試料からはDIPNが検出されなかった。当時の水試料に対する測定下限は10ng/L程度であり、環境水中のDIPNの動態を詳細に把握するためには更に高感度の測定方法が必要であった。また、当時の測定条件ではDIPNの異性体を十分に同定することができなかった^{4,6)}。

そこで、今回はガスクロマトグラフ質量分析器 (GC/MS) を用いて、環境水中の極めて低濃度で存在するDIPNに対して検出可能な測定感度を持ち、異性体をすべて同定できるDIPNの測定方法の開発を試みた。

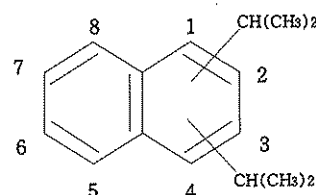


Fig.1 Constitutional formula of DIPN

安全科学部

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区平町3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究所
安全科学部 鈴木 元治

II 方 法

1. DIPN の標準および試薬

DIPN の標準液は、工業用の高純度 DIPN 原液をヘキサン溶媒に希釈して作成した。DIPN の異性体別の標準液は、Table1 に示したものを、それぞれヘキサン溶媒に希釈して作成した。2,6-DIPN 及び 2,7-DIPN の標準は東京化成より購入し、その他は Dr.Robert. Brzozowski (ICRI) 及び杉 義弘博士 (岐阜大学) から提供頂いた。

ヘキサン、ジクロロメタン (DCM) 及びアセトン は、残留農薬・PCB 試験用 (5000 倍濃縮) を用いた。塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた。硫酸 (>95%) は、試薬特級を用いた。これらは、すべて和光純薬より購入した。精製水は、純水装置 Elix の純水 (> 3MQ·cm) (Millipore 社) をヘキサン振とうにより不純物を更に除去して用いた。

固相吸着剤の検討には、Envi-18 及び Florisil (500mg in 8mL Glass Tube, SPELCO), PS2, C18 及び PS-Air (Sep-Pak Plus, Waters), C18 粉末 (BONDESIL) を用いた。

2. 使用機器

振とう器は、SR-2w (TAITEC 社) を用いた。濃縮器は EYEL4 (TOKYO RIKAKIKAI 社), Syncore (BUCHI 社), ターボバップ LV 及び II (Zymark 社) を用いた。ガスクロマトグラフ (GC) は、HP5890 (Agilent 社), 質量分析器 (MS) は JMS-AM II 150 (JEOL 社) を用いた。カラムは、Table2 に示した 3 本のカラムを検討した。

3. GC/MS の測定条件及び測定手順

GC/MS の測定条件は 剣持ら⁵⁾ を参考に、Table3 のように設定した。DIPN の定量は、すべての異性体の合計面積と内標準 (HCB-¹³C₆) との面積比から求めた。定量イオンは m/z 212 とした。

測定方法の基本手順は Fig.2 に示した。Fig.2 におけるヘキサン抽出とは、以下の操作をいう。すなわち、試料水 1L を採取した 1L 試薬瓶に直接ヘキサン 10mL を添加し、振とう器に逆さまにセットして 10 分間振とうする。静置後に精製水を加えることでヘキサン層を瓶口まで上昇させ、パスツールピペットでヘキサン層を分取する。

4. 検出下限、定量下限及び添加回収試験

検出下限 (MDL), 定量下限 (MQL) 及び添加回収試験の方法は、環境省の「化学物質環境実態調査の手引き (平成 17 年 3 月)」に従った。MDL 及び MQL は、精製水 1L に DIPN1ng を添加し、7 回測定した結果の標準偏差より求めた。添加回収試験は、精製水、河川水及び海水それぞれ 1L に DIPN10ng 及び 20ng を添加して 3 回測定し、その回収率を求めた。

5. 環境水試料の測定

姫路沖、揖保川及び神戸市の都市河川である妙法寺川から試料水 1L を採取し、Fig.2 に従って測定した。

Table 1 Standards of DIPN isomers

pure	2,6-DIPN	>99%
pure	2,7-DIPN	>95%
pure	1,3-DIPN	99.5%
pure	1,5-DIPN	99.1%
mixture1	1,3-DIPN	57%
	1,7-DIPN	40%
mixture2	1,3-DIPN	2.0%
	1,7-DIPN	2.7%
	2,3-DIPN+X	0.4%
	2,6-DIPN	31.9%
	2,7-DIPN	43.8%
	1,6-DIPN	15.8%
	1,4-DIPN	1.5%
	1,5-DIPN	1.9%

Table 2 Columns for peak isolation of DIPN isomers

Column	Liquid phase	Film thickness (µm)	Bore size (mm) × length (m)
Wax-10 (Supelco)	Polyethyleneglycol (polar)	0.25	0.32 × 30
Ultra-2 (Agilent)	5% difenylsiloxane (non-polar)	0.33	0.2 × 25
Equity-5 (Supelco)	5% difenylsiloxane (non-polar)	0.25	0.25 × 30

Table 3 Operating conditions of GC/MS

GC:HP-5890 II / MS:JMS-AM II	
Inj. mode: Splitless (Purge 1.5min)	
Inj. temp.: 270 °C	Inj. volume: 2 µL
Carrier gas: Helium (1.5mL/min)	
Ion source temp.: 210°C	Interface temp.: 240°C
Ionization: 70eV, 300 µA	
Detection mode: SIM	
Oven:	
50°C (1min) → 20°C/min → 100°C → 5°C/min → 210°C → 20°C/min → 270°C (1min)	

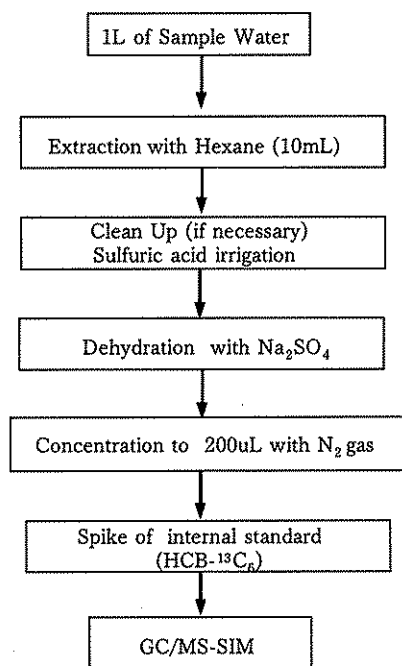


Fig.2 Sample preparation method for DIPN analysis.

III 結果及び考察

1. 異性体の分離及び同定

DIPNには構造上10種の異性体が存在する。1,2-DIPN及び1,8-DIPNの存在割合は、イソプロピル基の立体障害により他の異性体に比べて特に低い⁷⁾。そのため、それらを除く8種の異性体の分離及び同定を検討した。

最初に、異性体ピークの変離に適したカラムの選別について検討した。用いたカラムは、高極性カラムとしてWax-10、低極性カラムとしてUltra-2及びEquity-5であり、詳細はTable3に示した。Ultra-2及びEquity-5は膜厚が異なり、それぞれ0.33 μm 及び0.25 μm である。Wax-10の膜厚はEquity-5と同じく0.25 μm である。それぞれのカラムを用いてDIPN標準液100 $\mu\text{g/L}$ を測定した。

Fig.3にそれぞれのカラムにより測定したクロマトグラムを示す。Wax-10及びUltra-2では異性体ピークがそれぞれ8本検出された。しかし、Ultra-2ではピークのリーディング及び重なりが生じた。Ultra-2と同じ極性であるEquity-5では、ピークの著しい重なりによってピークが6本しか検出されず、膜厚の薄いものでもピークの重なりは改善しなかった。DIPNは $\log\text{Pow}4.90^8)$ であり、極性が低いため、これまでDIPNの測定には極性の低いカラムが用いられていた⁴⁻⁶⁾。しかしながら、本測定条件により異性体ピークを良好に分離できたのはWax-10であり、他

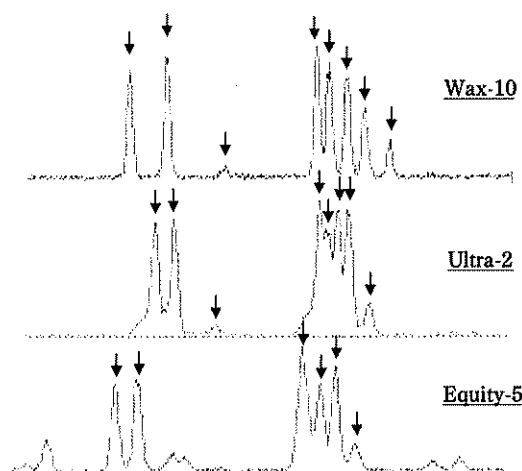


Fig.3 Separated DIPN isomer peaks by columns.

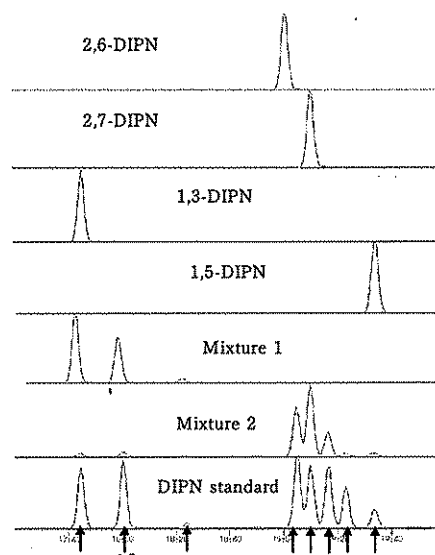


Fig.4 Chromatogram of DIPN isomers

のカラムよりも極性の高いカラムであった。このことは、Brzozowskiらの結果と一致した^{9,10)}。これらの結果から、カラムにはWax-10を用いることとした。

次に、DIPNの異性体ピークを同定するため、Table1に示した異性体別の標準液をそれぞれ測定した。クロマトグラムをそれぞれFig.4に示す。純度の高い2,6-, 1,3-及び1,5-DIPN標準液の検出強度は、同じ濃度ではほぼ同じであり、本測定条件でのDIPNの異性体の感度は同じことが分かった。これらの標準液の測定により、DIPN標準液の8つの異性体ピークは、保持時間の早い順から1,3, 1,7, 2,3, 2,6, 2,7, 1,6, 1,4及び1,5-DIPNと同定した。ただし、2,3-DIPNについてはBrzozowskiら^{9,11)}を参考に同定した。本条件によって1,2-及び1,8-DIPN以外の存在割合の高いすべての異性体を同定することができた。

2. 固相吸着剤における DIPN のコンタミネーション

試料の前処理として、固相抽出方法の検討を試みたが、固相吸着剤に DIPN のコンタミネーションが認められた。Table4 に検討に用いた吸着剤中のコンタミネーション量を示す。ガラスチューブやカートリッジに固相吸着剤が詰められているタイプでは、吸着剤の種類に関わらずコンタミネーション量は多かった。C18 カートリッジを C18 粉末と容器に分解して、それぞれに含まれる DIPN をヘキサンで抽出し測定した。その結果、粉末及び容器ともに DIPN が検出され、C18 粉末のコンタミネーション量は特に多いことが分かった。このことから、製造の過程で吸着剤に DIPN が吸着されていることが考えられた。

検討した6種すべての吸着剤からコンタミネーションが確認され、これらは DCM やアセトンを用いて洗浄してもすべて取り除くことは出来なかった。そのため、固相抽出方法は前処理には不適とし、溶媒抽出法を選択した。

3. バックグラウンドの低減の検討

DIPN の測定感度を上げるには、DIPN のバックグラウンドの低減が必要であった。そこで、溶媒抽出法におけるバックグラウンドの低減を検討した。検討した項目は、試料量（精製水 1, 2 及び 3L）、溶媒（ヘキサン、ジクロロメタン）、抽出容器（分液ロート、1L 試薬瓶）、溶媒量（10, 50, 100, 150mL）及び濃縮方法（窒素吹付け、真空気化）である。検討した項目以外はすべて Fig.2 の通りとした。また、クリーンアップには最もコンタミネーションの少ないと考えられる硫酸洗浄を行った。

結果を Table5 に示す。最もコンタミネーションが少なかったのは 1L 試薬瓶を用いる方法であった。そのバックグラウンドは、クリーンアップを行わない場合では 0.1 ± 0.1 ng であり、行った場合でも 0.6 ± 0.2 ng であった。この方法は当センター独自の方法であり、検討した中で処理行程が最も短く、使用器具及び溶媒量が最も少なかった。コンタミネーションの増加の原因は、別報¹²⁾ に示すようにラボ内のあらゆる場所に付着している微量の DIPN との接触頻度の増加によるものと考えられる。

また、DIPN は疎水性が高いため、採水した瓶の壁に DIPN が付着残留しやすい。1L 試薬瓶に精製水 1L を入れ DIPN を 1.5ng を添加して実験した結果では、瓶の内壁に DIPN が約 40% 残留した。そのため、採水瓶から抽出器具に試料水を移し変えると、採水瓶の壁を洗浄するための溶媒が更に必要となる。

Table 4 Contamination of DIPN in solid phase adsorbent.

Solid phase adsorbent		Contamination* (ngDIPN)
Envi-18	500mg in 6mL Glass Tube (SUPELCO)	1000
Florisil	500mg in 6mL Glass Tube (SUPELCO)	100
PS2	Sep-Pak Plus(Waters)	10~100
C18	Sep-Pak Plus(Waters)	10
PS-Air	Sep-Pak Plus(Waters)	10~100
C18 adsorbent	1g (BONDESIL)	1

*order of magnitude

Table 5 Contamination of DIPN in pre-treatment.

Extraction vessel	Solvent	Solvent volume(ml)	Concentration method	Sample volume(L)	DIPN (ng)	N (times)
1L glass bottle	Hexane	10	N ₂ blowing	1	0.1±0.1	3
		100+50**		1	0.6±0.2*	4
		50	N ₂ blowing	1	2.4±0.6	5
Separating funnel	Hexane	50	evaporation	2	1.8	1
				3	2.2±0.9	2
	DCM	100+50**	N ₂ blowing	1	2.3	1
				50+50**	1	0.7

*with clean up

** The sample is extracted twice.

以上のことから、前処理には 1L 試薬瓶を用いたヘキサン抽出法を選択し、試料を他の容器に移しかえずに抽出を行うこととした。

4. 検出下限、定量下限及び回収率

検出下限値 (MDL) 及び添加回収試験の結果を Table6 及び Table7 に示す。回収率は、いずれの水試料においても 90% 以上であり、良好であった。クリーンアップなしの MDL は 0.28ng/L となり、クリーンアップありの MDL は 0.71ng/L となった。一般的に、夾雑物を取り除くためにクリーンアップは必要であるが、明らかにきれいな試料水に対してはクリーンアップを行わないほうが DIPN のコンタミネーションが少ないため、高い測定感度を得られた。クリーンアップを行った場合でも本法の測定感度は従来法^{4,6)} の 10 倍以上であった。

5. 環境水試料への適用

開発した測定方法を海水及び河川水試料に適用し、DIPN を測定した。海水試料は姫路沖から採取し、河川水試料は揖保川及び妙法寺川から採取した。それぞれの水試料中の DIPN のクロマトグラムを Fig.5 に示す。なお、ここでは水試料に対する本測定方法の適正をみるための結果のみを示しており、地点の汚染状態などの考察については、別報¹²⁾ に示すこととする。

姫路沖の海水からは、DIPN が trace レベルで検出

Table 6 MDL and MQL of DIPN.

	with clean up	
sample(L)	1.0	1.0
concentration(ng/L)	1.0	1.0
Blank	0.24	0.35
result1	0.87	1.4
result2	0.94	1.4
result3	0.91	1.1
result4	0.72	1.3
result5	0.83	1.7
result6	0.87	1.4
result7	0.83	1.2
AVE. (ng/L)	0.85	1.4
STDEV (ng/L)	0.07	0.18
MDL (ng/L)*	0.28	0.71
MQL (ng/L)**	0.72	1.8
CV (%)	8.4	13

$$*MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

$$**MQL = \sigma_{n-1} \times 10$$

Table 7 Recovery of DIPN Analysis.

Sample	DIPN Amount (ng)	Times	Conc. in vial (μ g/L)	Recovery (%)	STDEV (%)
Distilled water	-	1	trace	-	-
	10	3	58.0	116	1.4
Sea water	-	1	3.97	-	-
	10	3	55.5	111	14
River water	-	2	5.33	-	-
	20	3	91.5	91.5	11.4

された。揖保川の河川水からは、DIPNが1.8ng/L検出された。妙法寺川下流の河川水は4回測定し、そのうち1回のみDIPNが2.1ng/L検出され、残りはtraceレベルで検出された。Fig.5には、DIPNが2.1ng/L検出された試料のクロマトグラムを示した。これらの結果から、本測定方法によって今までの測定方法では検出することができなかった水試料中の極微量のDIPNを測定することが可能となった。

妙法寺川の河川水の検出濃度にばらつきがみられたのは、妙法寺川の河川水は他の水試料に比べてにごりや浮遊物が多かったためと考えられる。生物や底質には、DIPNが0.1～100ng/gのオーダーで存在することが報告されているため⁹⁾、それらの混入が検出濃度に影響すると考えられる。そのため、SSの多い水試料を測定するには注意が必要である。

また、姫路沖の海水からは妨害ピークが検出された。この妨害ピークは、2,7-DIPNの保持時間あたりに検出され、スキャンモードで測定すると、そのマススペクトルからDIPNではない別の炭化水素であることが分かった。妨害ピークを排除するため、いくつかの検討を行ったが、現在のところ、妨害ピークの由来源も特定できていない。そのため、このような妨害ピークを排除することが今後の課題である。

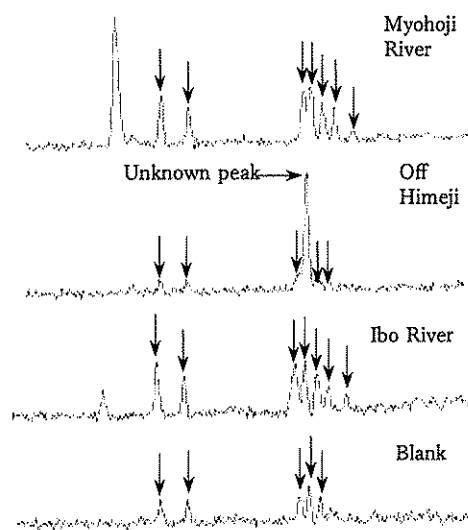


Fig.5 DIPN Chromatograms for River water and Sea water samples.

IV まとめ

GC/MSを用いて環境水中のDIPNの測定方法を検討した。キャピラリーカラムにPEG製のWax-10を用いることにより、DIPNの存在割合の高い8種の異性体をすべて同定し、定量することができた。前処理として、採水した瓶内で少量のヘキサン(10mL)により抽出することで、DIPNのコンタミネーションを最小限にした。検出下限は0.71ng/Lとなり、従来法の10倍以上の感度を得た。本測定方法は、水試料中のDIPNの測定に有用であると考えられた。

謝辞

本研究にあたり、測定方法の開発に協力頂きました環境省の関係者の方々、標準試料を提供頂きましたDr.Robert. Brzozowski (Industrial Chemistry Research Institute) 及び杉 義弘教授(岐阜大学)に感謝いたします。

文献

- 1) 羽賀孝英, 尾崎邦雄: 化学物質の水中における微生物分解性試験. 新潟県公害研究所研究報告, 9, 50-53 (1984)
- 2) 通産省化学品安全課監修, 化学品検査協会編, 化審法の既存化学物質安全性点検データ集, 日本化学物質安全・情報センター (1992)
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質対策室監修, 平成9年度既存化学物質安全性点検結果(概要) Vol.7

- 4) 環境庁環境保健部環境安全課監修, 化学物質と環境 (1980)
- 5) 平成9年度 化学物質分析法開発調査報告書, 環境庁 環境保健部 環境安全課, 176 (1998)
- 6) 児玉剛則: 水中のジイソプロピルナフタレンの分析. 愛知県公害調査センター所報, No.9, 34-39 (1981)
- 7) Brzozowski, R., Dobrowolski, J., Jamroz, M. H., Skupinski, W. : Studies on diisopropylnaphthalene substitutional isomerism. *Journal of Molecular Catalysis A*, Chemical 170 (2001).
- 8) Hazardous Substances Data Bank (HSDB) , U.S.National Library Medicine (1996)
- 9) Brzozowski, R., Skupinski, W., Jamroz, H., M., Skarzynski, M., Otwinowska, H. : Isolation and identification of diisopropylnaphthalene isomers in the alkylation products of naphthalene. *Journal of Chromatography A*, 946 (2002).
- 10) Brzozowski, R. : Shape-selectivity in diisopropylnaphthalene synthesis or analytical error? *Appl Catal A Gen.*, Vol.272, 1/2 215-218 (2004)
- 11) Jamroz, M. H., Brzozowski, R., Dobrowolski, J. C., : Search for IR spectral features of less-abundant diisopropylnaphthalenes based on comparison of theoretical and experimental spectra. *Spectrochim Acta PtA.*, Vol. 60A, 1/2, 371-375 (2004)
- 12) 鈴木元治, 松村千里, 中野武: GC/MS を用いた環境中のイソプロピルナフタレン類及びメチルナフタレン類の測定. 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要第3号, (2006) (投稿中)