

[技術報告]

大気中フタル酸エステル類の分析に関する検討

Studies on the Analytical Methods for Phthalates in Ambient Air

田部井昭子*、根津豊彦*、仲山伸次*

Akiko Tabei*, Toyohiko Nezu* and Shinji Nakayama*

【要約】 内分泌攪乱化学物質の疑いがあるとされるフタル酸エステル類は主に塩化ビニル樹脂等プラスチックの可塑剤として用いられており、我々の生活環境中に広く分布している。内分泌攪乱化学物質についてはごく低濃度で作用を及ぼすとの報告もあり、きわめて低いレベルでの測定が必要とされるが、大気中のフタル酸エステル類を分析する場合、捕集から分析にいたるあらゆる場面で測定対象物質による汚染をうけるおそれがある。各操作での汚染を最小限に抑え環境大気中のフタル酸エステル類の濃度を正確に測定するための検証を行った。その結果、フィルタの洗浄にジクロロメタンを用いることによってブランク値が下げられること、フォルダ輸送の際シリカゲルを緩衝剤として入れることでトラベルブランクを抑えられることがわかった。

キーワード：内分泌攪乱化学物質、フタル酸エステル、GC/MS 分析

1. はじめに

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）とは、「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」を意味する。近年、内分泌学を始めとする医学、生物学、環境科学等の研究者・専門家によって、環境中に存在するいくつかの化学物質が、動物の体内のホルモン作用を攪乱することを通じて、生殖機能を阻害するなどの悪影響を及ぼしている可能性があるとの指摘がなされている¹⁾²⁾。環境省では、1998年5月に「環境ホルモン戦略計画 SPEED '98」を発表し、内分泌攪乱作用の疑いがあるものとして約70種類の化学物質をあげ、環境中での検出状況、野生生物等への影響に係わる実態調査、環境リスク評価及び試験研究等に取り組んでいる³⁾。

SPEED'98で取り上げられている化学物質群の一つであるフタル酸エステル類は、主として塩化ビニル樹脂（塩ビ）等プラスチックの可塑剤として用いられており、プラスチックの消費と共に大量に生産、使用され、環境中に広く分布している。フタル酸エステル類は蒸気圧が高く、大気中に存在していることが報告されている⁴⁾。そのため、これらの物質の人体への曝露状況の把握の一

環として、環境大気中への汚染の現状を調査する必要がある。

フタル酸エステル類はその用途から大気比べて室内空気中に高濃度に存在していることが報告されている⁴⁾。中でもフタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジエチルは、高濃度に存在するため(図-1)⁴⁾、測定の途中で混入してくる危険性が高い。また、溶媒や捕集剤、実験器具等のブランクも問題となる。特に低濃度の分析では、環境大気の測定結果に影響を与えるおそれがあり、これをどう減らすかが課題となっている。

大気中フタル酸エステル類の分析法については活性炭繊維ろ紙捕集ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いる一斉分析法が小塚ら⁵⁾により詳細に報告されている。本報告では、この分析法をもとに、大気中フタル酸エステル類を測定する際に問題となるブランクの低減について検討を行った。

* (財)日本環境衛生センター・東日本支局環境科学部
Dept. of Environmental Science, East Branch, JESC

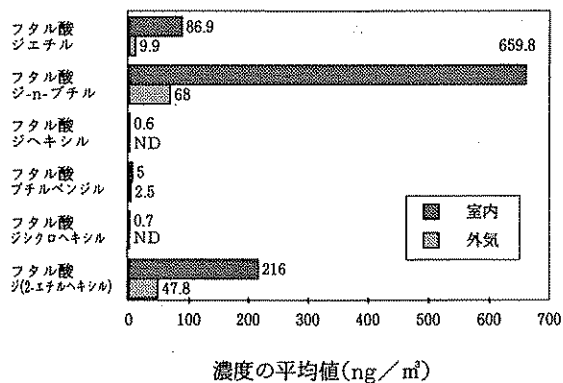


図-1 室内及び外気における濃度の平均値の比較

2. 実験方法

2.1 調査対象物質

本調査での対象物質を表-1に示す。また参考としてSPEED'98での物質番号を併記した。

表-1 調査対象物質

物質名	SPEED'98
フタル酸ジエチル	42
フタル酸ジ-n-プロピル	65
フタル酸ジ-n-ブチル	40
フタル酸ジ-n-ペンチル	63
フタル酸ジヘキシル	64
フタル酸ブチルベンジル	39
アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)	45
フタル酸ジシクロヘキシル	41
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	38
フタル酸ジイソノニル	-

2.2 試薬及び器具

ガラス繊維ろ紙

: GB-100R 47mmφ (東洋濾紙)

ソックスレ抽出器で24時間アセトン洗浄後、さらにソックスレ抽出器で24時間ジクロロメタン洗浄し、使用する直前に、あらかじめ200°Cで1時間空焼きした乾燥機を用い60~70°Cで乾燥したもの

活性炭素繊維ろ紙

: KF ペーパー P-175A 47mmφ (東洋紡績)

ガラス繊維ろ紙と同様に洗浄乾燥したもの

フィルタフォルダ

: ろ紙フォルダ EMI-47 (ジーエルサイエンス)

フタル酸エステル類混合標準溶液

: EPA Phthalate Esters Mix (フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジメチル、フタル酸ジ-n-オクチル) 2000 μg/ml ヘキサン溶液 (Supelco)

フタル酸ジ-n-プロピル

: 東京化成工業株式会社製特級

フタル酸ジ-n-ペンチル

: 関東化学株式会社製環境分析用

フタル酸ジヘキシル

: 関東化学株式会社製環境分析用

アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)

: 東京化成工業株式会社製特級

フタル酸ジシクロヘキシル

: 東京化成工業株式会社製特級

フタル酸ジイソノニル

: 和光純薬株式会社製特級

内標準物質

: フルオランテン-d₁₀ (Chambrige Isotope Laboratories, Inc.製) 1 μg/ml トルエン溶液

アセトン、ジクロロメタン、トルエン

: 残留農薬試験用1000倍濃縮検定品(和光純薬)1000倍程度の濃縮率でGC/MS分析を用いブランクのないことを確認したもの

2.3 試料採取方法

図-2のように洗浄済みのガラス繊維ろ紙と活性炭素繊維ろ紙を重ねてフィルタフォルダに装着した。フィルタフォルダをテフロン管でポンプ、積算流量計に接続し、7~8l/minの流量で24時間(10m³程度)大気試料を捕集した。試料捕集装置の概要を図-3に示す。

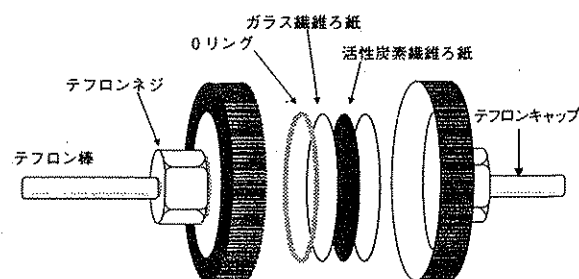


図-2 フィルタフォルダの概要

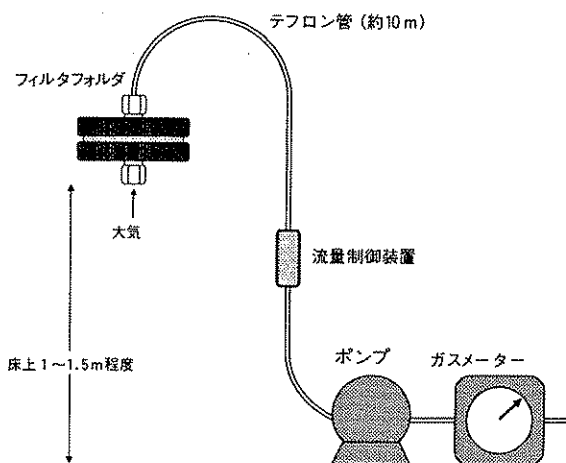


図-3 試料捕集装置

2.4 分析方法

ガラス繊維ろ紙および活性炭素繊維ろ紙をあわせて10ml遠沈管に入れ、ジクロロメタンを正確に10ml加え10分間超音波抽出を行った。ろ紙を取り除いた後、3000rpmで10分間遠心分離処理し、上澄み液を正確に5ml分取した。この抽出液に内標準物質フルオランテン-d₁₀を20μl添加し、窒素気流中で1mlに濃縮したものをGC/MS測定用試料とした。この試料1μlをGC/MSに注入し、クロマトグラムのピーク面積から内標準法によってフタル酸エステル類の定量を行った。このときの分析条件を以下に示す。

<GC/MS分析条件>

装置：島津製作所製ガスクロマトグラフ質量分析計QP-5000

使用カラム：DB-1、内径0.2mm、長さ30m、膜厚3μm

カラム温度：60℃(1min) → (20℃/min) → 200℃ → (10℃/min) → 300℃(10min)

注入口温度：250℃

試料導入法：スプリットレス方式(60sec)

イオン電圧：70eV

イオン化電流：300μA

検出方法：SIM法

定量イオン：

フルオランテン d₁₀:(m/e) 212

対象物質の測定質量数:(m/e)149

確認用イオン:(m/e)以下の通り

フタル酸ジエチル : 177

フタル酸ジ-n-プロピル : 209

フタル酸ジ-n-ブチル	: 223
フタル酸ジ-n-ペンチル	: 237
フタル酸ジヘキシル	: 251
フタル酸ブチルベンジル	: 167
アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)	: 129
フタル酸ジシクロヘキシル	: 167
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	: 167
フタル酸ジイソノニル	: 293

2.5 検量線

段階的に濃度を調整した各標準液1mlに内標準液20μlを加え、1μlをGC/MSに注入し、注入量と得られたクロマトグラムの標準物質と内標準物質のピーク面積比から検量線を作成した。

2.6 定量

試料液の1μlをGC/MSに注入し、得られた対象物質のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比を検量線と比較して試料液中の対象物質量を求めた。

大気中の対象物質の濃度は次式により算出した。

$$C = \frac{(Ms - Mb) \times Ve \times E}{Ve' \times V}$$

C ; 大気濃度(ng/m³)

Ms ; GC/MSに導入した試験液濃度(ng/ml)

Mb ; GC/MSに導入したトラベルブランク試験液濃度(ng/ml) トラベルブランク値が操作ブランク値と同等(等しいか小さい)とみなせる時には、移送中の汚染は無視出来るので、試料測定値から操作ブランク値を差し引いて濃度を算出する

Ve ; 抽出量(ml)

E ; 濃縮後の試験液量(ml)

Ve' ; 分取量(ml)

V ; 総通気量(m³)

3. 検討実験

3.1 洗浄効率の検討

小塚らの方法⁹⁾では、それぞれのろ紙をソックスレ抽出器を用い、アセトンで24時間以上洗浄するとなっている。しかし、実際この方法で洗浄を行ったところ、特にフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)のブランク値が落ちないことから、ろ紙の洗浄方法について検討を行った。

ガラス繊維ろ紙と活性炭素繊維ろ紙をそれぞれフタル酸エステル類ブランク分析済みアセトンに浸し、超音波洗浄を10分間行った。この操作を3回行った後、それぞれソックスレ抽出器により適宜アセトンを交換しながら10日間洗浄を行った。結果を図-4に示す。アセトンによる超音波洗浄のみおこなったものを未洗浄とした。以降の検討結果については、大気濃度換算値は総通気量を10m³に設定して計算した。

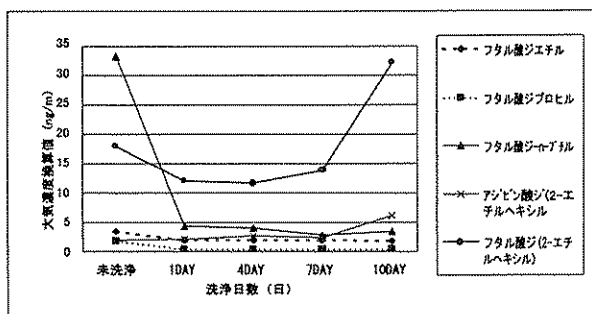


図-4 アセトンによる洗浄効率の検討

この結果から、ソックスレ抽出器を用いたアセトン洗浄では24時間以上行っても効果が上がらず、逆に長時間の洗浄では実験室中の雰囲気から汚染をうけるということがわかった。活性炭素繊維ろ紙に実試料を添加し回収率を求めた実験(表-2)⁹⁾からもアセトンでは活性炭素繊維ろ紙に含まれるフタル酸エステル類のブランクを十分に下げることが難しいことが示唆された。

表-2 活性炭素繊維ろ紙からの抽出率(%)

物質名	ジクロロメタン	アセトン
フタル酸ジ-n-ブチル	103.1	95.4
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	96.6	39.5
フタル酸ジイソノニル	95.7	31.7

試料添加量: 1μg

上記の方法で24時間アセトン洗浄した活性炭素繊維ろ紙をジクロロメタンを用いソックスレ抽出法により24時間洗浄した。結果を表-3に示す。

洗浄溶媒にジクロロメタンを用いた場合、アセトン溶媒単独による洗浄に比べフタル酸ジエチル、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)に対する洗浄効果が良好であった。

表-3 ジクロロメタンによる洗浄

物質名	未洗浄	24hr アセトン	24hr ジクロロメタン
フタル酸ジエチル	2.9	1.4	<0.46
フタル酸ジプロピル	1.3	<0.19	<0.19
フタル酸ジ-n-ブチル	32.3	3.9	3.5
アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)	1.4	1.6	<0.74
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	17.2	11.4	7.7

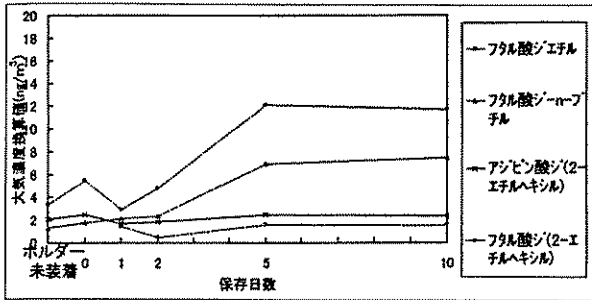
大気濃度換算値 (ng/m³)
総通気量を10m³として計算 (n=5)

ソックスレ抽出法による洗浄には大量の溶媒が必要であり、有害物質であるジクロロメタンを用いることは環境に対する負荷が高いことが懸念された。そこで、時間の短縮と使用溶媒の削減のために超音波による洗浄を検討した。上記の方法で24時間アセトン洗浄したろ紙を、フタル酸エステル類ブランク分析済みジクロロメタンに浸し、超音波洗浄を3分間行った。溶媒を交換しながら、この操作を3回繰り返した。その結果、超音波抽出で洗浄したのと同程度の洗浄効果が得られたが、活性炭素繊維ろ紙の繊維が崩れ全体的に薄くなってしまったことから、実試料を測定する際、捕集率の低下が懸念された。

したがって、今回はソックスレ抽出器を用いアセトンで24時間洗浄後、同じくソックスレ抽出器を用いジクロロメタンで24時間洗浄を行ったろ紙を以降の検討及びサンプリングに用いた。洗浄したろ紙は、すりあわせガラス容器中でフタル酸エステル類ブランク分析済みアセトンにひたし冷蔵庫内で保存した。

3.2 ブランク試料の保存性

ろ紙をフォルダにセットした後、試料を採取し実際に分析するまでの間の汚染の確認のために洗浄済みろ紙を図-2の様にフィルタフォルダにセットし、ブリキ缶に入れて密封後冷蔵庫に保管した。フィルタフォルダは使用前にアセトンによる超音波洗浄を行った。フォルダによる汚染を調べるため、装着後すぐ測定したものを0日とし調整日より1, 2, 5, 10日目にガラス繊維ろ紙と活性炭素繊維ろ紙をあわせてブランク試料についての測定を行い、ブランク試料の保存性について検討を行った。図-5にブランクが確認された物質についてブランク試料の保存性試験の結果を示す。



総通気量 10m³として計算 (n=5)

図-5 ブランク試料の保存性試験

5日目では1日目と比較してフタル酸ジ-n-ブチルで約3倍、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)で約6倍のブランクが検出された。また、フィルタ装着時には検出されなかったフタル酸ジエチルが検出された。5日目にかけて上昇していたブランク濃度レベルが5日目と10日目では明確な変化を見せないことから汚染源はブリキ缶内の空気によるものではないかということが示唆された。

以上の結果から、試料採取後はできるだけ外気との接触を断ち、速やかに分析を行う必要があることが認められた。

3.3 トラベルブランク試験

試料の輸送に伴う汚染を調べるために、操作ブランクとトラベルブランク試験を行った。操作ブランク試験として、洗浄済みろ紙を無作為に5組とりだし、試料と同様に前処理し分析した。トラベルブランク試験では、洗浄済みろ紙を図-2の様にフィルタフォルダにセットし、ブリキ缶に入れて冷蔵宅配便で18地点に輸送した。輸送地点でいったん缶を開封し再度密封したものを冷蔵宅配便で返送し、試料と同様に前処理し分析した。フォルダにろ紙をセットしてから分析するまでに要した時間は平均4~6日であった。両試験でブランクが確認されたものについて、操作ブランク試験の結果を表-4に、トラベルブランク試験の結果を表-5に示した。

表-4 操作ブランク値

物質名	平均値 (ng/m ³)	標準偏差(σ)	変動係数 (%)
フタル酸ジエチル	<0.46	-	-
フタル酸ジ-n-ブチル	3.4	0.23	6.7
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	2.7	1.2	44

大気濃度換算値
総通気量 10m³として計算(n=5)

表-5 トラベルブランク値

物質名	平均値 (ng/m ³)	標準偏差(σ)	変動係数 (%)
フタル酸ジエチル	1.1	0.57	53
フタル酸ジ-n-ブチル	12	6.7	57
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	28	11	40

大気濃度換算値
総通気量 10m³として計算(n=5)

操作ブランクと比較すると、トラベルブランクではフタル酸ジ-n-ブチルで約3倍、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)では約10倍の値が検出された。また、操作ブランク試験では検出されなかったフタル酸ジエチルが検出された。これら汚染の原因として、ブリキ缶内の大気等が推測された。そこで、フィルタフォルダをアルミホイルで包み、ブリキ缶の中に緩衝剤としてシリカゲル(粒度4, 000~850μm、洞海化学工業株式会社)を入れ、その中にフィルタフォルダを埋め込み密封した。これを先ほどと同じように全国20カ所に送付し、返送されたものを試料と同様に前処理し分析した。フォルダにろ紙をセットしてから分析するまでに要した時間は平均4~6日であった。結果を表-6に示した。

表-6 トラベルブランク値(再測定)

物質名	平均値 (ng/m ³)	標準偏差(σ)	変動係数 (%)
フタル酸ジエチル	0.45	0.49	110
フタル酸ジ-n-ブチル	3.9	0.88	24
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	3.3	1.4	42

大気濃度換算値
総通気量 10m³として計算(n=5)

操作ブランクと比較すると、フタル酸ジエチルが検出されたが、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)ではブランクの値に違いが見られず、この方法で汚染が抑えられることがわかった。

3.4 検出下限値及び定量下限値

トラベルブランク試験の結果、ブランクが全測定地点から検出されたフタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)については、トラベルブランク試料の測定結果から、標準偏差の3倍を検出下限値、10倍を定量下限値として算出した。それ以外の物質については、検量線の最低濃度の標準試料(フタル酸ジヘキシル・フタル酸

ジイソノニル; 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、その他; 0.010 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を5回繰り返し測定し、その標準偏差から検出下限値及び定量下限値を同様に算出した。結果を表-7に示した。

フタル酸ジヘキシル・フタル酸ジイソノニルは異性体混合物質であるが、異性体すべてのピークを定量するより、単一のピークを定量する方が再現性に優れていたことからこれらの物質については特定のピークのみを定量計算した。

表-7 検出下限値及び定量下限値

物質名	平均 (ng/m^3)	標準 偏差 (σ)	検出下 限値 (3σ)	定量下 限値 (10σ)
フタル酸ジエチル	2.0	0.15	0.46	1.5
フタル酸ジプロピル	1.8	0.06	0.19	0.62
フタル酸ジ-n-ブチル	3.9	0.88	2.6	8.8
フタル酸ジ-n-ペンチル	1.6	0.14	0.41	1.4
フタル酸ジヘキシル	75	5.2	16	52
フタル酸ブチルベンジル	1.9	0.36	1.1	3.6
アジピン酸 ジ(2-エチルヘキシル)	2.2	0.25	0.74	2.5
フタル酸ジシクロヘキシル	2.0	0.26	0.77	2.6
フタル酸 ジ(2-エチルヘキシル)	3.3	1.4	4.2	14
フタル酸ジイソノニル	94	3.6	11	36

4. 環境大気の測定結果

今回検討した方法に基づき、平成12年春期に全国20カ所で試料の採取を行った。分析結果を表-8に示す。フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-ブチルはすべての検体から検出された。フタル酸ブチルベンジルは全体の約8割、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)は約9割から検出された。それ以外の物質は検出されなかった。

フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の5物質の検出範囲はそれぞれ1.0~6.5 ng/m^3 、6.0~97.5 ng/m^3 、<1.1~5.3 ng/m^3 、<0.74~6.5 ng/m^3 、<4.2~55.8 ng/m^3 であった。

なお、検出下限値未満の値については、<検出下限、検出下限値以上、定量下限値未満の値については()内に値を示した。また、検出下限値

未満の値については、平均値の算出の際、検出下限値の1/2の値を使用し、検出下限値未満の値があるときはその値を最小値とした。検出数とは検出下限値以上のすべての検体数を指す。

表-8 測定結果

単位; ng/m^3

物質名	検出数	最小	最大	平均
フタル酸ジエチル	32/32	(1.0)	6.5	2.8
フタル酸ジプロピル	0/32	<0.19	<0.19	<0.19
フタル酸ジ-n-ブチル	32/32	(6.0)	98	29
フタル酸ジ-n-ペンチル	0/32	<0.41	<0.41	<0.41
フタル酸ジヘキシル	0/32	<16	<16	<16
フタル酸ブチルベンジル	25/32	<1.1	(3.6)	(2.3)
アジピン酸 ジ(2-エチルヘキシル)	30/32	<0.74	6.5	3.5
フタル酸ジシクロヘキシル	0/32	<0.77	<0.77	<0.77
フタル酸 ジ(2-エチルヘキシル)	30/32	<4.2	56	18
フタル酸ジイソノニル	0/32	<11	<11	<11

5. まとめ

大気中のフタル酸エステル類を分析する場合、捕集から分析にいたるあらゆる場面で測定対象物質による汚染をうけるおそれがある。各操作での汚染を最小限に抑え環境大気中のフタル酸エステル類の濃度を正確に測定するための検証を行った。

操作ブランクを下げるために、ろ紙の洗浄にジクロロメタンを使う方法を検討した。既報の方法であるアセトン洗浄と比較してフタル酸ジエチル、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)において良好な結果が得られた。操作ブランクとして確認されたもののうち、フタル酸ジ-n-ブチルはアセトン洗浄と同等の洗浄効率であった。

トラベルブランク試験では、輸送容器内にシリカゲルを入れることにより汚染を最小限に抑えることができた。

今回の検討において、ブランクを抑えることにより定量下限値ならびに検出下限値を下げ、環境大気中フタル酸エステル類のより低濃度の測定が可能になった。フタル酸エステル類の環境ホルモン作用については多くの報告が今までになされているが⁶⁾、その作用機構、毒性などについては未だ未解明である。環境ホルモンについてはきわめ

て低濃度で作用するとの報告⁷⁾もあり、環境大気中の低濃度のフタル酸エステル類の測定に関しては、今後さらなる検討が必要がある。

6. 参考文献

- 1) Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P. *Our Stolen Future*. A Dutton Book, New York, 1996
- 2) Cadbury, D., *The feminization of nature.*, Hamish Hamilton, London, 1997
- 3) 環境省：外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略
- 4) SPEED '98－,1998
- 5) 東京都環境局：平成11年度 室内環境中の内分泌攪乱化学物質の実態調査結果
<http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/horumon/kaigi/kaigi07/situnai.htm>
- 6) 環境庁環境保健部環境安全課：平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, 264-274, 1996
- 7) Fredricsson B, Moller L, Pousette A, Westerholm R, Human sperm motility is affected by plasticizers and diesel particle extracts. *Pharmacol Toxicol*, 72(2), 128-133,1993