

## GC-MS 法による魚体中の化学物質の

分析方法の検討 第3報<sup>1)2)</sup>Evaluation of GC-MS analysis to the identification  
of chemicals in fish (3)仲山 伸次<sup>3)</sup> 河辺 安男<sup>4)</sup> 石黒 智彦<sup>3)</sup> 高橋 誠二<sup>5)</sup>

Shinzi Nakayama, Yasuo Kawabe, Tomohiko Ishiguro and Seiji Takahashi

## 1 緒 言

化学物質による環境汚染は、大気、水質、土壌および生体中にと広まっており、各対象についての分析法が検討され、調査も実施されている。魚体中の有機汚染質についても、PCB、BHC等の特定物質についての分析法はいくつか報告されている<sup>1)</sup>。しかし、汚染質全般に対する分析法は報告されていない。著者らは、魚体中有機汚染質全般についての分析法の確立を旨とし、検討を行い、既に本誌において報告してきた<sup>2,3)</sup>。すなわち、揮発性成分については、液体酸素により試料を凍結処理後粉砕してヘッドスペース法による分析方法、難揮発性成分については、クロロホルム-メタノール抽出後、クロロホルム留分については、プレカラム法によるクリンナップ法について検討を行った。

本報では、新たなクリンナップ方法として、気化法の検討を行った。魚体抽出留分のように脂質を多く含んだ試料のガスクロマトグラフ(GC)分析を行うと、脂質等の高沸点成分がカラム中に残存して、次の分析の支障となる。そのために、試料を加熱し、いったん気化させ

て、高沸点成分を分離し、気化した成分のみを再度溶媒に吸収させて分析試料とすることによりクリンナップすることを考え、気化法を検討した。また、定量方法として、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いてのマスフラグメントグラフィ(MF)およびマスキロマトグラフィ(MC)の適用を検討した。

生体中の化学物質に対するGC分析は、前述したように、PCB、PCTおよびフタル酸エステルのようにECD<sup>3,4)</sup>を用いての選択分析は報告されている。しかし、FIDによる分析は、生体成分と対象成分を通常のパックドカラムで分離することは困難であり、定量分析に際し誤差を生じやすいため、油汚染魚中のn-パラフィンの分析の他あまり行われていない。そのため、選択的高感度検出手段であるMF法およびMC法の定量手段としての適用を検討した。MF法は、GC-MS分析において磁場の強さを一定にして、ある特定の質量数のみを検出する方法としてSweely<sup>5,6)</sup>らにより報告された。本法の特色は、設定した質量数のイオンを持つ成分のみ検出するため、選択性にすぐれており、最高pgオーダの高感度検出手段となっている。このため、最近環境微量分析法として広く用いられるようになっている。

また、MC法は、一定の間隔で質量走査を行い、これらのマスペクトルを一たん磁気ディスクにストックさせ、後で特定質量数のイオン強度を呼び出し、連続的に記録させるコンピュータシステムを用いた分析方法である<sup>7)</sup>。本法の検出感度は、MF法に比べて $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ と悪いが、多成分を一度に分析できる利点がある。MC法は、定性分析法として用いられているが、定量方法としての報告は少ない<sup>8)</sup>。本報では、既報において検出された化学物質のうち、可塑剤として広く用いられているフタル酸エステル類(DMP, DEP, DBP, DHP, DOP)、食品中の油脂等の酸化防止剤として広く使われているジブ

- 1) 本調査は、昭和53年度環境庁委託研究“難分解性化学物質検索調査”によって実施された
- 2) 仲山伸次、河辺安男、石黒智彦、高橋誠二：本誌、No. 4：106~115、1977を第1報、河辺安男、仲山伸次、石黒智彦、高橋誠二、坂田衛：本誌、No. 5：76~84、1978を第2報とする。
- 3) 日本環境衛生センター公害部特殊公害課  
Odor Laboratory, Department of Environmental Pollution, Japan Environmental Sanitation Center
- 4) 日本環境衛生センター技監室  
Research & Technology Section, Japan Environmental Sanitation Center
- 5) 島津製作所  
Shimadzu Seisakusho Ltd.

Table 1: Operation condition of gas chromatograph

Column	OV-17 2% on chromosorb W AW, DMCS 60~80mesh 3m×3mmφ
Temperature	Column: 50°C→280°C 10°C/min. Injection port: 280°C Detector: 280°C
Carrier gas	N <sub>2</sub> 60ml/min.
Air	60ml/min.
Hydrogen	40ml/min.
Detector	FID

Table 2 Operation condition of GC-MS

Column	OV-17 2% on chromosorb W AW, DMCS
Temperature	60~80mesh, 3m×3mmφ Column: 220°C(for DEP, DBP, DHP, DOP) 180°C(for DMP, BHT) 50°C→260°C, 10°C/min(for MC) Injection port: 280°C Separator: 300°C Ion source: 310°C
Carrier gas	He 30ml/min.
Trap current	60μA
Accelerating voltage	3.5kV
Scan speed	8
Electron energy	30eV(for MF) 70eV(for MC)
Apparatus	Shimadzu LKB-9000, MID-PM, PAC-300DG

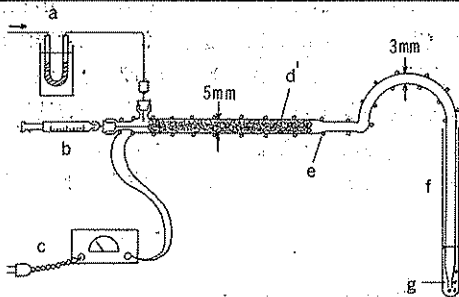


Fig. 1 Clean up apparatus of vaporizing method

- a : Carrier gas cleaner
- b : Syringe (1 ml)
- c : Thermoregulator
- d : Glass wool
- e : Heater
- f : Test tube
- g : Chloroform

Table 3 Effect of carrier gas flow rate on recovery

Sample	60ml/min	60ml/min	40ml/min
DMP	59	76	87
DEP	59	77	83
DBP	58	78	103
DHP	63	79	82
DOP	65	80	73

(%)

Table 4 Effect of inject rate on recovery

Sample	1ml/3min	1ml/6min	1ml/10min
DMP	77	77	87
DEP	81	65	83
DBP	99	95	103
DHP	60	47	82
DOP	52	52	73

(%)

Table 5 Reproducibility of phthalic acid ester from standard sample by vaporizing method

	DMP	DEP	DBP	DHP	DOP
	87	89	96	80	78
	86	94	94	95	80
Recovery (%)	78	84	76	70	69
	80	75	74	62	65
	87	83	103	82	73
Average (%)	83	85	87	78	73
Coefficient of variation (%)	5.2	8.5	14	16	8.8

テルヒドロキシトルエン (BHT) について検討した。東京湾で採取した魚試料について分析を行った結果、BHT, DBP, DHP, DOP について定量することができた。以下報告する。

## 2 試薬および装置

### 2-1 試薬

クロロホルム: 特級, 蒸留して用いる。

メタノール: 特級, 2回蒸留して用いる。

無水硫酸ナトリウム: クロロホルム+メタノール(1:1)を用い, ソックスレ抽出器で24時間洗浄後500°Cで

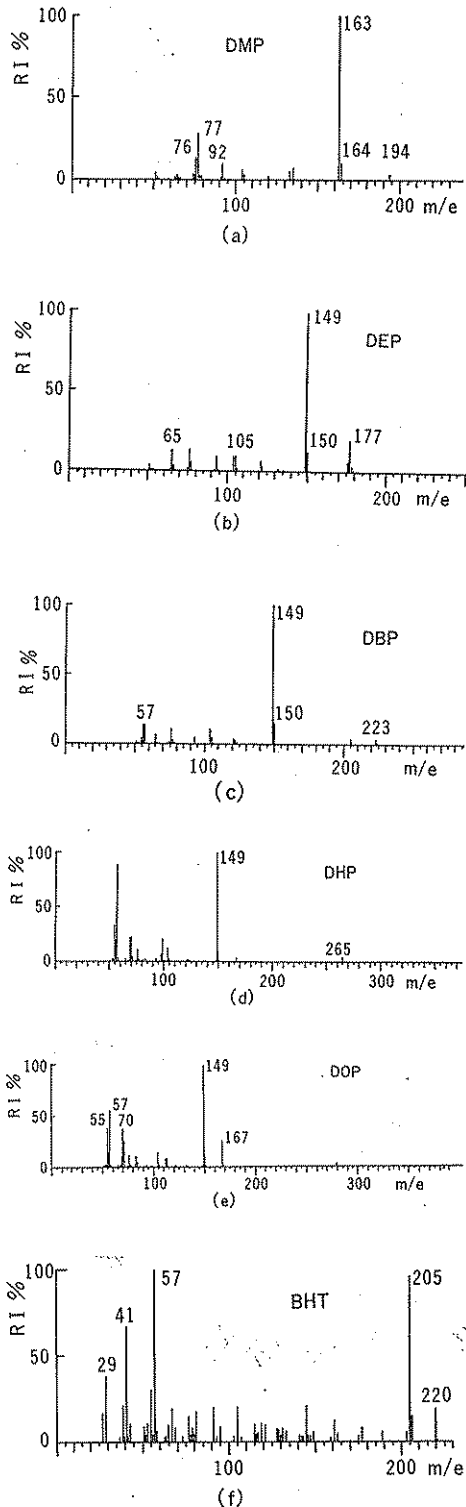


Fig. 2 Mass spectrum of phthalic acid ester and BHT.

Table 6 Recovery of standard sample by vaporizing method

Recovery of standard sample			
Nonane	100	Heptadecane	84
Decane	100	Octadecane	82
Undecane	97	Nonadecane	82
Dodecane	94	Eicosane	83
Tridecane	99	Docosane	81
Tetradecane	91	Tetracosane	82
Pentadecane	99	Hexacosane	82
Hexadecane	90	Octacosane	83
o-Dichlorobenzene		100	
Nitrotoluene		98	
$\beta$ -Methylnaphthalene		100	
BHT		98	
2,4-Dinitrochlorobenzene		100	

2時間加熱する。

#### 2-2 装置

ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器を備えた日立063を用いた。分析条件を Table 1 に示す。

ガスクロマトグラフ質量分析計：島津 LKB-9000, MID-PM 付, コンピュータシステム PAC-300DG, 分析条件を Table 2 に示す。

気化法によるクリンナップ装置：Fig. 1 に示す。気化部にはガラスウールをつめ、200°C に加熱して用いた。

### 3 分析方法

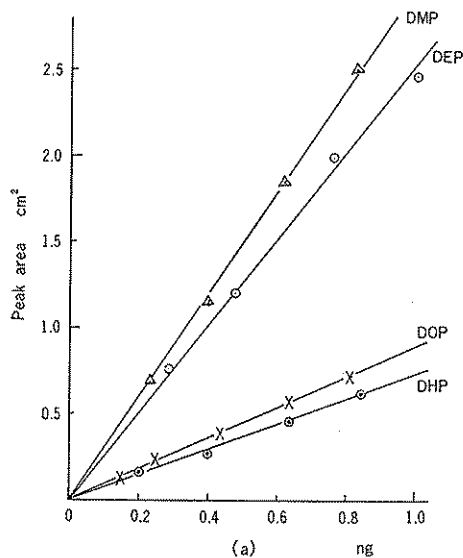
試料前処理—抽出—濃縮方法は既報<sup>1,2)</sup>と同じである。

Fig. 1 に示すように、ガラスウールをつめたガラス管(内径 5 mm) を 200°C に加熱し、ガラス管の先にクロロホルム 2 ml を入れた目盛付試験管を入れ、不純物を除去した窒素ガスを 40ml/min の速度で流す。注射器に 1 ml の抽出試料を採り、注入口より 10 分間かけて注入する。注入後 5 分間曝気させておき、試験管中の液量が 2 ml になったら窒素ガスを止める。マイクロシリンジで 10  $\mu$ l 試料を試験管から採り、GC-MS へ注入し分析を行う。

### 4 クリナップ方法の検討

#### 4-1 気化部温度の検討

魚体抽出試料を用いて、気化部温度を 200°C, 250°C, 300°C の 3 条件についてクリンナップ操作を行い GC 分析を行った結果、200°C の時は現われなかったが、250°C, 300°C と温度が高くなるに従い、クロマトグラム上に新しいピークの出現がみられた。生体成分の分解



△ : DMP      × : DOP  
○ : DEP      ⊙ : DHP

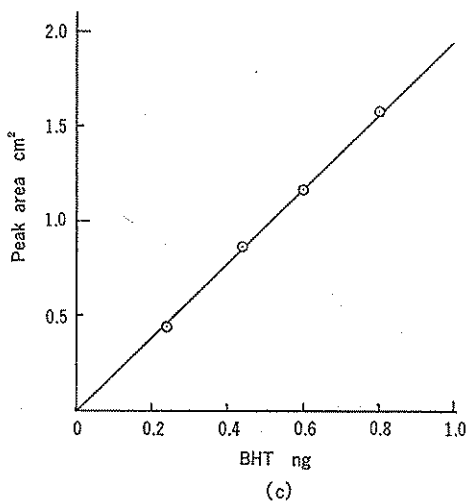


Fig. 3 Calibration curves

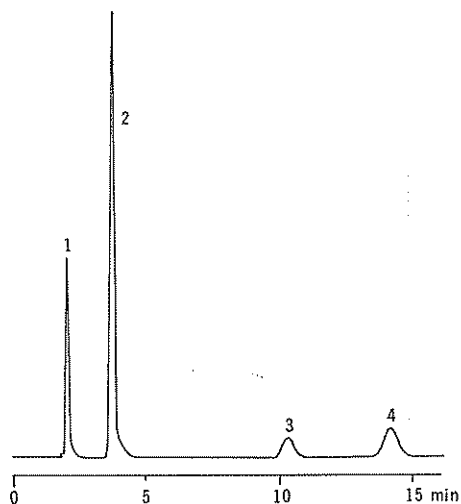
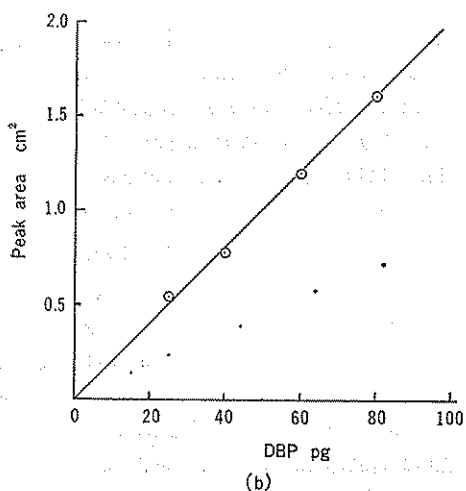


Fig. 4 Typical mass fragmentgram of phthalic acid ester  
1 : DFP 2 : DBP 3 : DHP 4 : DOP

生成物によるものとする。以上の所見により、気化部の温度は200°Cで行うようにした。

4-2 窒素流速の検討

ガラス管中を流す窒素流速を100ml/min, 60ml/min, 40ml/minに変化させ、各々について標準試料の回収率を検討した。なお、標準試料は、クロロホルム抽出液に、DMP, DEP, DHP, DOPを500ppm前後になるように添加したものをを用いた。以下の検討実験についても同様の試料を用いた。結果をTable 3に示す。流速が

おそいほど良好な回収率を得ることができた。

4-3 注射器による試料注入速度の検討

窒素流速40ml/minの状態では、試料注入速度を1ml/3min, 1ml/6min, 1ml/10minに変化させたときの回収率を求めた。結果をTable 4に示す。DMP, DEP, DBPの比較的の低沸点成分は大きな差はみられないが、DHP, DOPの高沸点成分は、注入速度の増加と共に回収率の低下する傾向がみられた。この結果より、10分間かけて1ml注入することを基準とした。

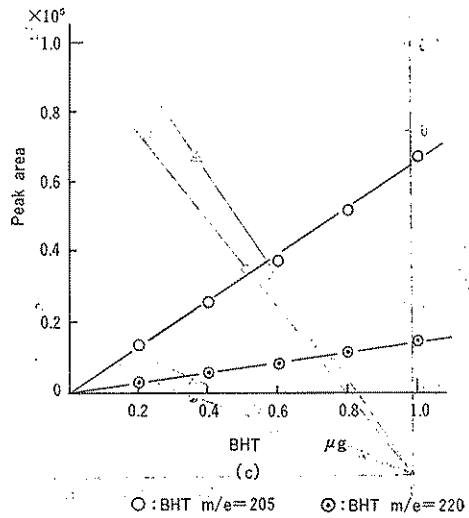
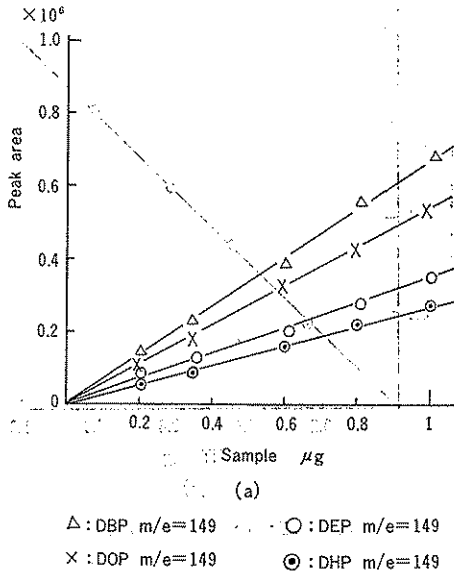
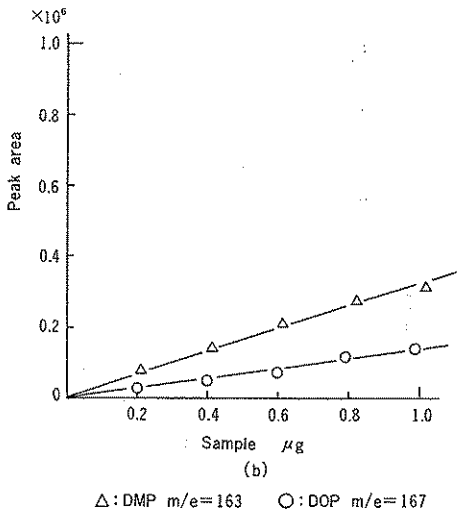
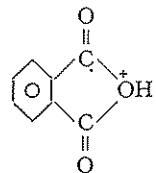


Fig. 5 Calibration curves



5 MF法の検討

MF法の分析条件を決定するに当っては、目的成分に対して感度が高く、カラム液相によるバックグラウンドが少く、また共存物質の少い m/e を選択する必要がある。本報の目的成分のうち DMP 以外のフタル酸エステルは、Fig. 2 に示すように、m/e=149である



のフラグメントピーグが高いイオン強度を示すため、これを用いた。DMP はメトキシ基脱離(M-31)による m/e=163 が大きなイ

オン強度を示すのでこれを用いた。BHT は、メチル基脱離(M-15)に基づく m/e=205を用いた。なお、イオン化電圧は被検成分については、30eV 以上では、それほどイオン強度が強くなかったため、すべて30eVで行った。以上の条件に基づき、各成分につき検量線を求めた。Fig. 3 (a), (b), (c) に示す。また、Fig. 4 にフタル酸エステルのマスフラグメントグラム例を示しておく。また、各成分の MF 法における検出限界を求めたところ、それぞれ DMP 6 pg, DEP 7 pg, DBP 0.7 pg, DHP 20pg, DOP 8 pg, BHT 7 pg であった。なお、この検出限界は、S/N 比を3とした場合である。

6 MC法の検討

マスクロマトグラムのピーク面積を測ることによる、

4-4 再現性

本法の再現性を調べるために、前記標準試料について、クリンナップ操作をくり返し行い、平均回収率およびくり返し精度を求めた。結果を Table 5 に示す。DBP, DHP の変動が少し大きい、ほぼ良好な結果を得ることができた。

4-5 回収率

フタル酸エステル以外の成分について同様の操作を行い回収率を求めた。結果を Table 6 に示す。これらの成分についても良好な回収率を得ることができた。

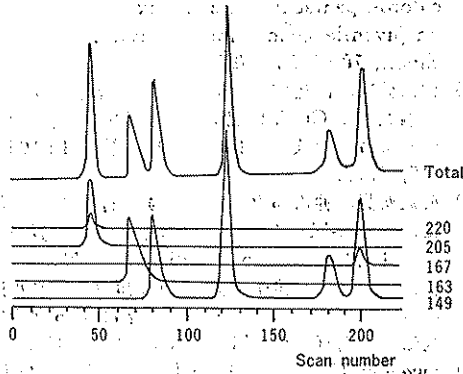
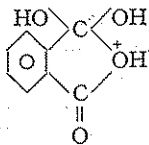


Fig. 6 Typical mass chromatogram of phthalic acid ester and BHT

MC 法による定量分析法の適用についての検討を行った。用いたイオンは、MF法と同様な  $m/e=149, 163, 205$  の他、DOP の特異なフラグメントイオンである



の  $m/e=167$  および BHT の親イオンである  $m/e=220$  を追加して検討の対象とした。本法の再現性をみ

るために、走査時間間隔を 5 秒、6 秒の 2 通りにした場合についてくり返し精度を求めた。結果を Table 7 に示す。走査時間間隔による影響がみられ、5 秒間隔の方がばらつきが少ない結果が得られた。良好な結果が得られた 5 秒間隔の走査時間の条件で、前記試料について検量線を求めた。結果を Fig. 5 (a), (b), (c) に示す。また、マスキンググラム例を Fig. 6 に示す。

7 応 用 例

東京湾の横浜本牧および川崎扇島沖で採取したサップおよびメバルについて、以上の検討結果に基づき MF 分析を行った。DBP, DHP, DOP, BHT を検出することができた。結果を Table 8 に示す。また、このときのクロマトグラム例を Fig. 7 (a), (b), (c) に示す。

8 ま と め

気化法による魚体抽出試料のクリンナップ方法の検討、および定量方法として、GC-MS による MF 法および MC 法の検討を行い良好な結果を得ることができ

Table 7 Reproducibility of phthalic acid ester and BHT from standard sample by MC

(a) Scan interval: 6 sec.

Sample	DMP	DEP	DBP	DHP	DOP		BHT	
m/e	163	149	149	149	149	167	205	220
Area ( $\times 10^5$ )	0.951	0.990	1.65	0.505	1.01	0.296	0.610	0.119
	1.12	0.887	1.65	0.574	1.04	0.273	0.498	0.111
	1.28	1.16	1.87	0.626	1.23	0.371	0.608	0.129
	1.15	1.12	1.88	0.631	1.08	0.271	0.654	0.133
	1.17	1.09	1.90	0.666	1.01	0.306	0.540	0.109
Average ( $\times 10^5$ )	1.13	1.05	1.79	0.600	1.07	0.303	0.582	0.120
Coefficient of variation (%)	10.5	10.5	7.2	10.4	8.6	13.4	10.7	8.8

(b) Scan interval: 5 sec.

Sample	DMP	DEP	DBP	DHP	DOP		BHT	
m/e	163	149	149	149	149	167	205	220
Area ( $\times 10^5$ )	1.14	1.28	2.04	0.725	1.29	0.405	0.758	0.164
	1.17	1.18	2.10	0.697	1.50	0.399	0.774	0.140
	1.03	1.22	1.99	0.723	1.31	0.378	0.770	0.148
	1.26	1.09	2.17	0.643	1.44	0.438	0.666	0.128
	1.22	1.24	2.19	0.660	1.47	0.366	0.753	0.163
Average ( $\times 10^5$ )	1.16	1.26	2.10	0.690	1.40	0.397	0.730	0.149
Coefficient of variation (%)	7.6	6.1	4.0	5.4	6.8	7.0	6.2	10.3

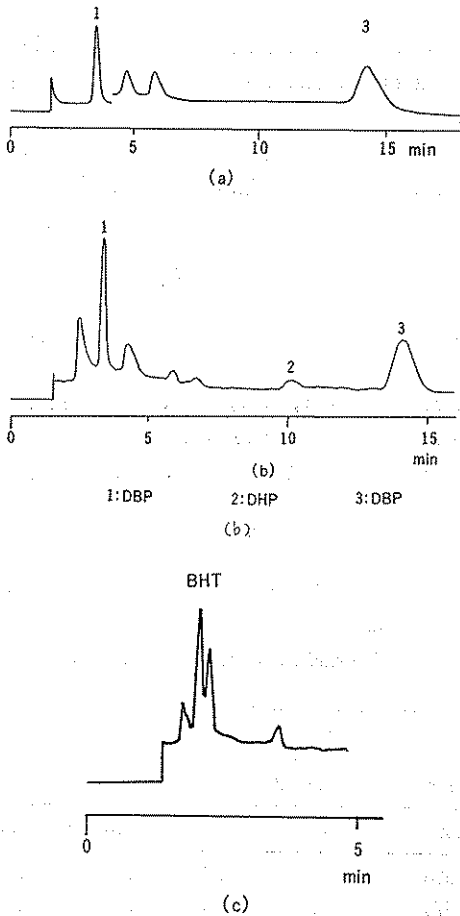


Fig. 7 Mass fragmentgram of phthalic acid ester and BHT in fish

(a) : Mebaru, (b), (c) : Sappa

Table 8 Phthalic acid ester and BHT in fishes

	DBP	DHP	DOP	BHT
Mebaru	0.52	Nd.	0.15	tr.*
Sappa	0.77	0.015	0.18	0.029

\* tr: 5<pg/g (ng/g)

た。また、検討した結果に基づき、東京湾で採取した魚を分析したところ、DBP, DHP, DOP, BHT を検出定量することができた。本試料のように、成分の多い試料に対しての MF および MC の適用は有効であった。

#### 引用文献

- 1) Gruger, H. G., T. Hruba & N. L. Karrick : Sublethal effects of structurally related tetra-

chloro-, pentachloro-, and hexachlorobiphenyl on juvenile coho salmon, Environ. Sci. Technol., 10 : 1033~1037, 1976.

- 2) 仲山伸次, 河辺安男, 石黒智彦, 滝本まゆみ, 高橋誠二 : GC-MS 法による魚体中の化学物質の分析方法の検討, 日環セ所報, No. 4 : 106~115, 1977.
- 3) 河辺安男, 仲山伸次, 石黒智彦, 高橋誠二, 坂田衛 : GC-MS 法による魚体中の化学物質の分析, 日環セ所報, No. 5 : 76~84, 1978.
- 4) 植田忠彦, 山添律子, 他 : 魚介類中のフタル酸エステルのガスクロマトグラフィによる微量定量法, 都衛研年報, 27-1 : 100~105, 1976.
- 5) Sweeley, C. C., W. H. Elliott, I. Fries, & R. Ryhage : Mass spectrometric determination of unresolved components in gas Chromatographic effluents, Anal. Chem., 38 : 1549~1553, 1966.
- 6) Hammar, C. C., B. Holmstadt, & R. Ryhage : Identification of chlorpromazine and its metabolites in human blood by a new method, Anal. Biochem, 25 : 532~548, 1968.
- 7) Hites, A. R., K. Biemann : Computer evaluation of continuously scanned mass spectra of gas chromatographic effluents, Anal. Chem., 40 : 855~860, 1970.
- 8) 岩永政也 : GC-MS とマススペクトロメトリの最近の動向, 島津評論, 34 : 5~17, 1977.

#### Summary

The experiments for evaluating the application of a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) to the identification of chemicals contained in fish had been reported in this Bulletin No. 4 (1976) and No. 5 (1977). This paper describes the new clean up method, vaporizing method, and the application of mass-fragmentgraphy (MF) and mass-chromatography (MC) to quantitative analysis. The extract of fish by chloroform was injected to a glass tube heated at 200°C by means of a-syringe and vaporized chemicals were absorbed by chloroform solution in a test tube. Then, the treated extract was injected to GC-MS by means of a microsyringe, then analyzed by MF or MC. The used fragment ions were  $m/e=205, 220$  for BHT,  $m/e=163$  for DMP,  $m/e=149$  for DEP, DBP, DHP, and  $m/e=149, 167$  for DOP. Detection limits of these chemicals by MF was a picogram order. This method was applied to some fish samples and BHT, DBP, DHP and DOP were detected in the range of 15~770 pg/g.