

# 食餌試料を通したフタル酸エステル類の魚体への蓄積性

木下 誠<sup>1</sup>・松原 英隆<sup>1</sup>

Accumulation of Phthalic Acid Esters by Fish via Food

Makoto KINOSHITA, Hidetaka MATSUBARA

## 要 旨

フタル酸エステル類は広い範囲で環境中に分布しているため、魚への蓄積性を調べるとき通常のフタル酸エステル類を用いた実験ではバックグラウンドの影響が大きく調査は困難である。そこでフタル酸エステルの芳香族環の水素を重水素に置換したものをを用いて実験したところ、これらの化合物は非常に代謝されやすいことがわかった。

**Key Words** : フタル酸エステル類 Phthalic Acids, コイ Carp ,  
マイクロ固相抽出 Solid Phase Microextraction (SPME)  
GC/MS/MS Gaschromatography / mass spectrometry / mass spectrometry

## I はじめに

筆者らは第 33 回日本水環境学会年会で、フェノール類やフタル酸エステル類の魚類への蓄積性について報告し<sup>1)</sup>、そこでフタル酸エステル類については、フタル酸ブチルベンジルはほとんどコイの体内に蓄積しないことを確認したが、フタル酸ジブチルはバックグラウンドの影響が大きく、蓄積性を検討することはできなかった。これは、フタル酸ジブチルは使用量が多く、環境中に広く分布するためと考えられる。そこで本研究では、バックグラウンドの影響を抑えるため、フタル酸エステル類の重水素置換体 (3,4,5,6-d<sub>4</sub> 体) を用いてコイへの蓄積性を調べた。フタル酸エステル類はフタル酸ブチルベンジルの他、使用量が多いフタル酸ジブチル、フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) について検討した。

## II 実験方法

### 1. フタル酸エステル類の鯉への投与

フタル酸エステル混合溶液〔フタル酸ジブチル-3,4,5,6-d<sub>4</sub>、フタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d<sub>4</sub>、フタル

酸ジ (2-エチルヘキシル) -3,4,5,6-d<sub>4</sub> の 2000mg/l ヘキサン溶液〕10 μl を、マイクロシリンジを用いて 5 μl ずつ 2 個の浮上性粒状食餌試料 (φ 3 ~ 4mm) に注入しフタル酸エステル添加試料を調整した。

実験には 5 匹のコイを用い、そのうちの 3 匹にフタル酸エステル添加試料を与え、2 匹にはコントロールとして通常の餌を与えた。コイは通常それぞれのグループ毎にろ過器とエアレーション装置を装着した容量 150 l の 2 台の水槽で飼育したが、フタル酸エステル添加試料を与える時は、3 匹のコイそれぞれを個別に 20 l の水槽に隔離し、1 日に 1 回、1 匹のコイに対して 2 個のフタル酸エステル添加試料を与えた。コイがフタル酸エステル添加試料を摂取したことを確認した後、150 l の水槽に戻した。3 匹のコイにはフタル酸エステル添加試料を 5 日間連続して与え、その後は通常の食餌試料に戻した。フタル酸エステル類の投与をやめて 1 週間経過後、フタル酸エステル類を与えたコイ 3 匹と与えなかったコイ 2 匹を処理し、体長と体重を測定した後可食部を採取し、分析試料とした。

### 2. フタル酸エステル類の分析

フタル酸エステル類の分析は環境庁平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書に記載された方法<sup>2)</sup>に準拠して分析した。

1. 福岡市保健環境研究所 環境科学課

コイの可食部 10g にアセトンと内部標準溶液を加えてホモジナイズし、アセトン 20ml で2回抽出した。その後、抽出液をロータリーエバポレーターを用い、40℃以下で水が留去され始めるまで濃縮した。濃縮液を精製水液 10ml とヘキサン 20ml で洗い込みながら 100ml の共栓付遠沈管に移し、10分振とう抽出した。これを-20℃の冷凍庫に一夜静置してヘキサン層を分離した。ヘキサン層を 50ml 分液ロートに移し、精製水 5ml を加えてゆるやかに振とうし、ヘキサン層を洗浄した。水層を捨てた後、同様に 0.1N 水酸化カリウム溶液 5ml、精製水 5ml、pH3 リン酸緩衝液 5ml の順でヘキサン層を洗浄した。洗浄後、ヘキサン層を 200ml 分液ロートに移し、アセトニトリル 50ml を加え振とうし、ヘキサン/アセトニトリル分配を行った。ヘキサン層をアセトニトリル 25ml で更に2回抽出した。アセトニトリル層を合わせた後、ロータリーエバポレーターを用い 40℃以下で約 3ml まで濃縮し、アセトニトリルで 10ml にメスアップした。1ml を分取し、精製水で 10ml に希釈した。

この溶液を SepPakC8 次に Envicarb となるように直列につないだカラムに負荷した。50%アセトニトリル/精製水 10ml で洗浄後、アセトニトリル 6ml で溶出した。その後、Envicarb に残留するフタル酸エステル類を 30%ジクロロメタン/ヘキサン 5ml で溶出させ、アセトニトリル溶出液と合わせた。ロータリーエバポレーターを用い 40℃以下で 2ml まで濃縮し、精製水 18ml で洗い込みながらバイアル瓶に移した。攪拌させながら SPM E 装置に吸着させ、GC/MS/MS 分析を行った。

分析機器は finnigan mat GCQ を用いた。カラムは Ultra 2 (0.32mmi.d.×25m,df=0.17 μm) を用い、60℃(5min)~(20℃/min)~300℃(1min) の条件で GC/MS/MS モードで分析した。一次イオン化エネルギーは 70eV、二次イオン化エネルギーは 1.2eV を用いた。定量用 2次フラグメントイオンは、フタル酸エステル (-3,4,5,6-d<sub>4</sub>) 類は m/z 125、内標のフタル酸ブチルベンジルは m/z 121 を用いた。

### III 結果及び考察

フタル酸エステル混合溶液を与えたコイの可食部を分析した結果、3匹のコイとも図1に示すようにいずれの化合物も検出されなかった。しかしマイナス妨害の可能性も考えられたので、存在しないかどうかの確認のために標準添加法による定量を試みた。試験溶液にそれぞれ 2ng のフタル酸エステル (-3,4,5,6-d<sub>4</sub>) 類を添加したときの結果を図2に示す。フタル酸ジブチル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> とフタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は検出されたが、

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は検出されなかった。この結果から少なくともフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は負の妨害を受けていたことが明らかになった。そこで、試験溶液にそれぞれ 8ng のフタル酸エステル (-3,4,5,6-d<sub>4</sub>) 類を添加して分析を行ったその結果を図3に示す。今度はフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> も検出された。以上の結果から本分析法を用いる場合には標準添加法が必要なことが明らかとなった。

標準添加法を用いて分析した結果を図4に示す。フタル酸ジブチル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> とフタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> ではほぼ原点を通る直線が得られたが、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> の検量線は負の方向にシフトした。これはフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> の疎水性が他の2化合物に比較して強く、試料溶液の極性がアセトニトリル等の有機溶媒の混入で水よりも小さくなったため、より疎水性の強いこのフタル酸エステルが吸着樹脂に移行しにくかったためと推察される。しかし、一定濃度以上ではプロットは直線上にのった。この結果をもとに、フタル酸エステル(-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類のコイの可食部への蓄積率についてまとめたものを表1に示す。フタル酸エステル類分析における S/N=10 から定量限界を求めたところ、フタル酸ジブチル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は 0.4 μg/kg、フタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は 1.0 μg/kg、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は 5.0 μg/kg となり、検出量はいずれもこれらの値以下であった。コイ1匹あたりに5日間で投与したフタル酸エステル-3,4,5,6-d<sub>4</sub> の量はいずれも 100 μg であることから、コイの可食部へのフタル酸ジブチル-3,4,5,6-d<sub>4</sub>、フタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d<sub>4</sub>、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> の蓄積率はそれぞれ 0.014%未満、0.034%未満、0.17%未満となった。

以上の結果から、フタル酸エステル類はコイに吸収されても速やかに分解され、蓄積しにくいことが明らかとなった。

### IV まとめ

コイへのフタル酸エステル類〔フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)〕の蓄積性を調べる際に、バックグラウンドからの妨害を除去するため、これらのフタル酸エステル類の重水素置換体(3,4,5,6-d<sub>4</sub>体)を餌に添加して実験を行った。餌は1日1回5日間連続して与え、その後1週間通常の餌に戻した後、コイの可食部を分析した。

100% = 2316990

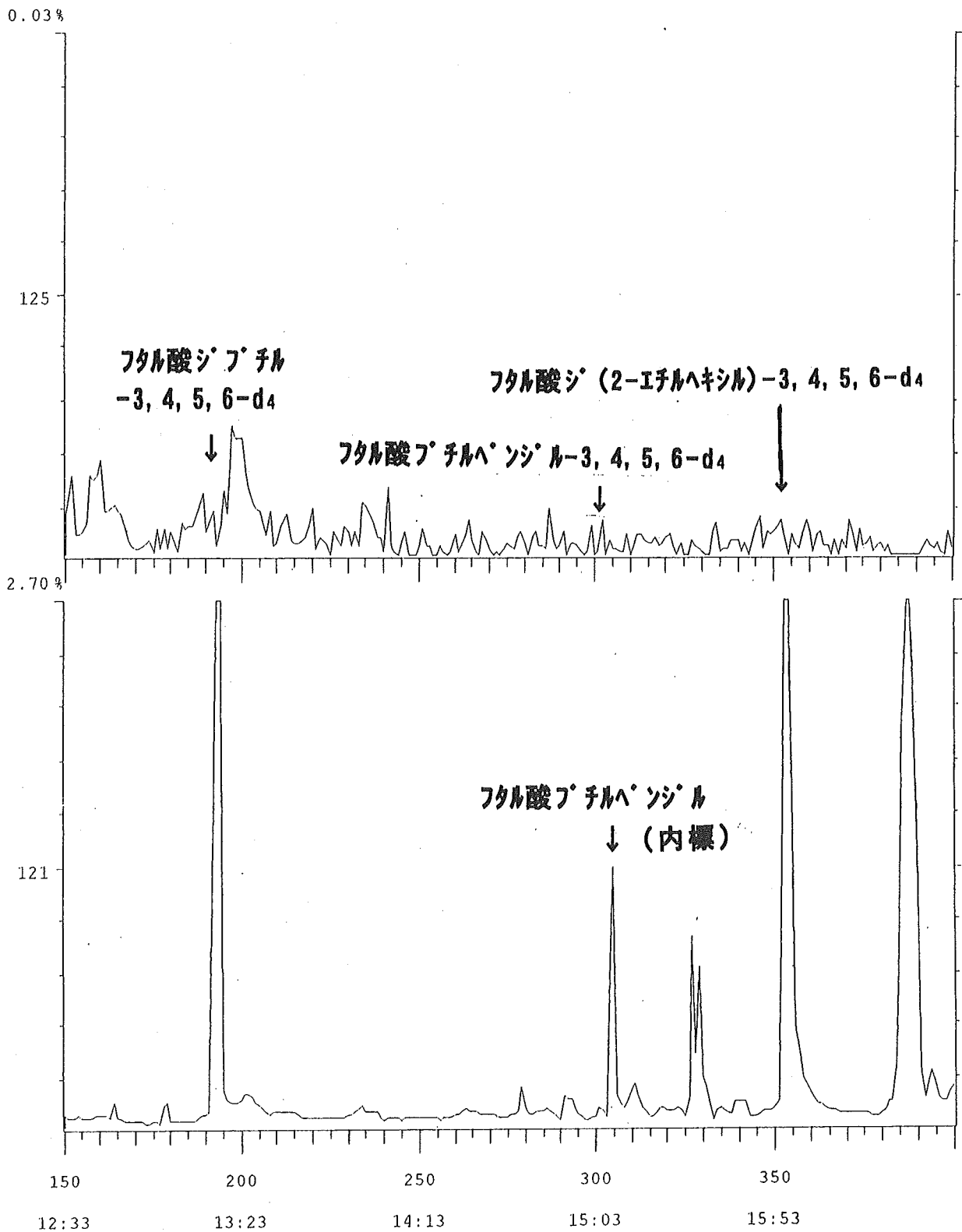


図1 コイ1の可食部中のフタル酸エステル(-3,4,5,6-d4)類の分析結果

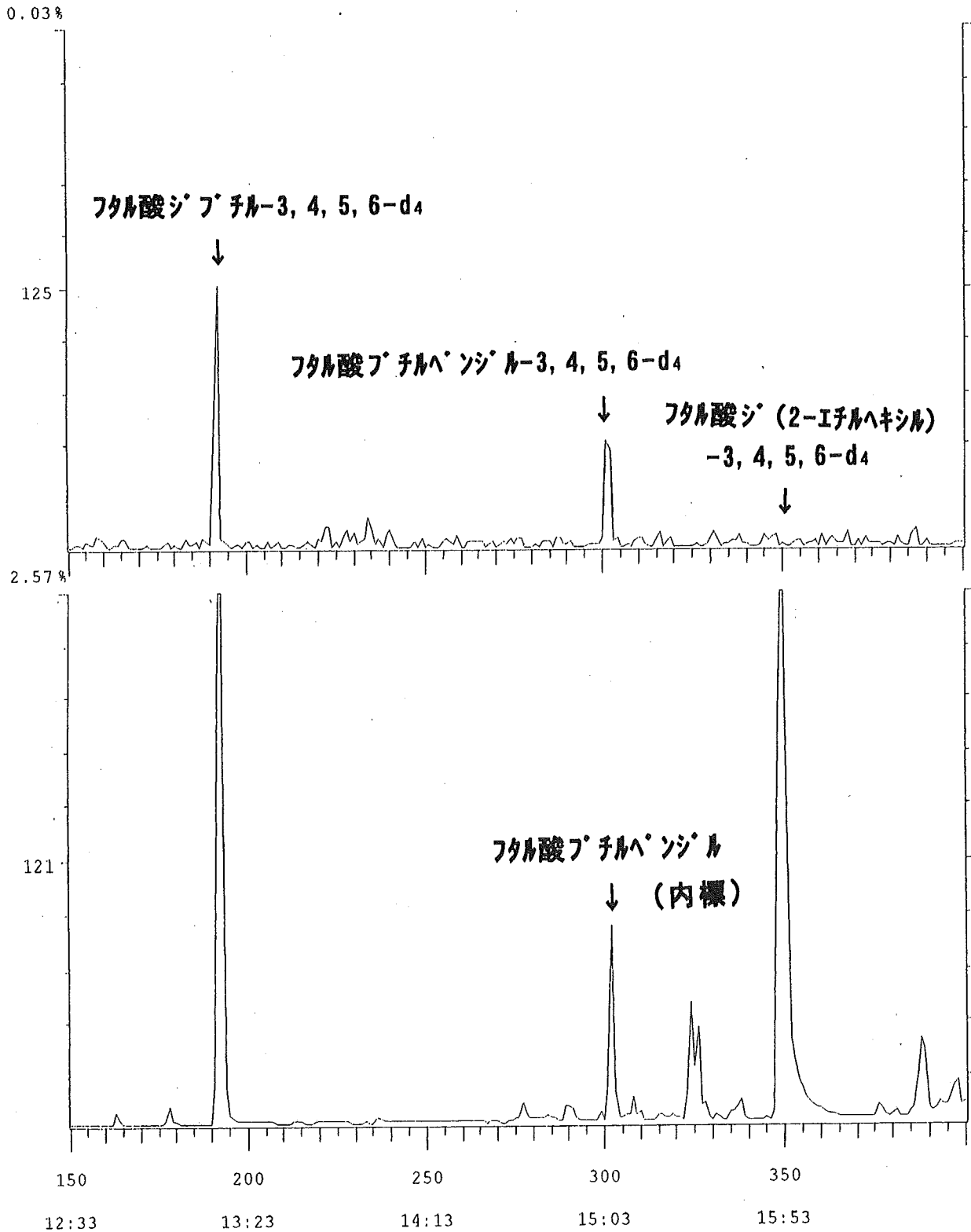


図2 コイ1の可食部中の試験溶液にそれぞれ2ngのフタル酸エステル(-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類を添加したときの分析結果

100% = 9500143

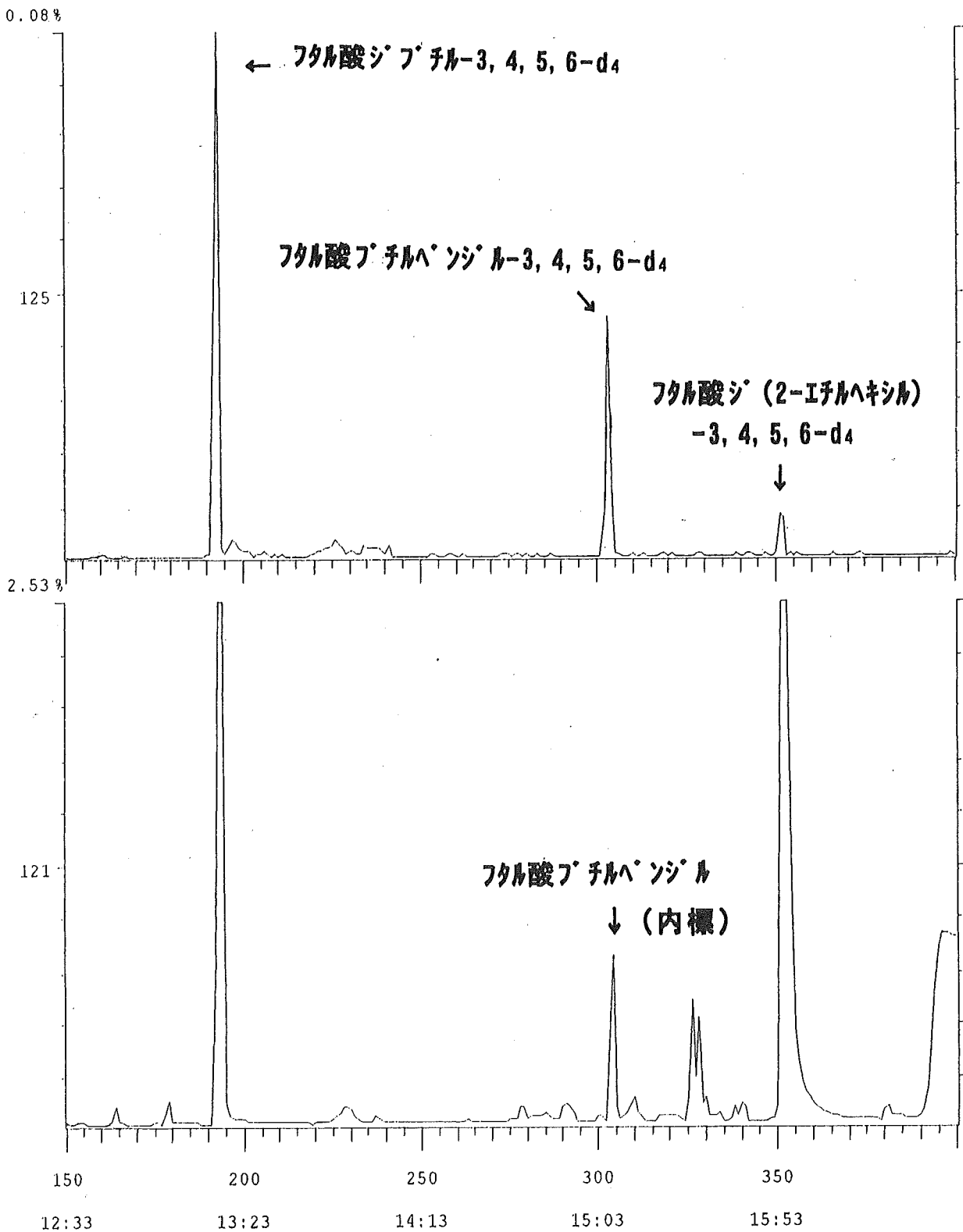


図3 コイ1の可食部中の試験溶液にそれぞれ8ngのフタル酸エステル(-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類を添加したときの分析結果

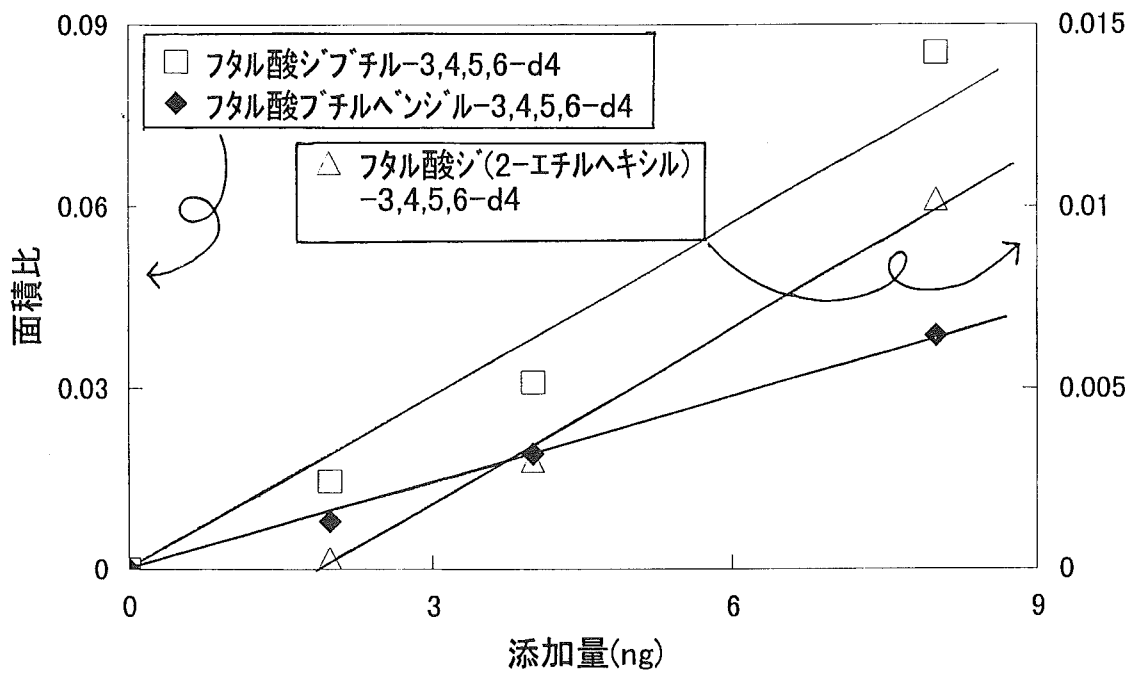


図4 コイ1の可食部中のフタル酸エステル (-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類の標準添加法による定量直線

表1 フタル酸エステル (-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類  
のコイの可食部への蓄積率

	定量限界値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		可食部の重量 (g)	蓄積率 (%)
フタル酸ジブチル-3,4,5,6-d <sub>4</sub>	0.4	コイ1	36.0	< 0.014
		コイ2	19.0	< 0.0076
		コイ3	31.9	< 0.013
フタル酸ブチルベンジル-3,4,5,6-d <sub>4</sub>	1.0	コイ1	36.0	< 0.034
		コイ2	19.0	< 0.019
		コイ3	31.9	< 0.031
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d <sub>4</sub>	5.0	コイ1	36.0	< 0.17
		コイ2	19.0	< 0.095
		コイ3	31.9	< 0.16

$$\text{蓄積率 (\%)} = 100 \times (\text{コイの可食部に含まれるフタル酸エステル量} / \text{フタル酸エステルの投与量})$$

その結果を以下に示す.

(1) 高感度かつ妨害の少ないマイクロ固相 (100  $\mu$ m ポリジメチルシロキサン) 抽出法を用いて分析を行ったところ, フタル酸エステル類を感度よく分析できた. ただし, フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-3,4,5,6-d<sub>4</sub> は生物試料の分析では SPME に移行しにくいため, 標準添加法で定量する必要があった.

(2) コイの可食部からはいずれのフタル酸エステル(-3,4,5,6-d<sub>4</sub>)類も検出されなかったことから, フタル酸エステル類はコイに吸収されても速やかに分解され, 蓄積しにくいことが明らかとなった.

## 文 献

- 1) 松原英隆, 中牟田啓子, 木下誠, 浦野敏平: 食餌試料を通したフェノール類, フタル酸エステル類の魚体へ取り込み, 第33回日本水環境学会年会講演集, 288, 1999
- 2) 環境庁平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, 127~177