

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
—脂肪酸の水質分析法の検討—

吉岡敏行, 浦山豊弘, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究

—脂肪酸の水質分析法の検討—

Study on the development of analytical techniques of chemicals at the time of the accident, such as emergency

—Study of water quality analysis method of fatty acids—

吉岡敏行, 浦山豊弘, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Toyohiro Urayama, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

脂肪酸の高感度水質分析法を検討した。水環境中には脂肪酸メチルエステルが検出される可能性があることから、誘導体化は臭化ペンタフルオロベンジル (PFBB) による方法を検討した。炭素数 8 から 22 の 16 種類の脂肪酸を PFBB により誘導体化し、前処理方法を工夫し、操作の簡略化等を図ったところ、感度及び定量性が向上し、定量下限値は 0.072 ~ 3.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ となる高感度分析法が開発できた。この分析法を応用して、公共用水域での動植物性油脂等に由来する脂肪酸の検出が期待できる。

[キーワード：脂肪酸, 誘導体化, 水質, GC/MS]

[Key words : Fatty acid, Derivatization, Water quality, GC/MS]

1 はじめに

脂肪酸は、油脂や脂質の構成成分で動物性油脂や植物性油脂に含まれている。炭素数が 4 以上のものが天然の脂肪に含まれ、炭素数 10 を超えるものが高級脂肪酸と呼ばれている。炭素鎖に二重結合がないものは飽和脂肪酸、ひとつ以上あるものは不飽和脂肪酸と呼ばれている。また、油脂中の脂肪酸は、動物や植物の種類に特有の構成比があり、脂肪酸を分析し、構成比が明らかになれば、油脂の種類がある程度推定できる。

近年、廃植物油等の生物由来の油脂からバイオディーゼル燃料 (BDF) を製造することが注目され、各種規模のプラントで BDF として脂肪酸メチルエステルが製造、利用されている。しかし、製造工程から廃液とグリセリンが発生し、廃棄物処理や廃液処理の問題等を抱えており、グリセリンの不法投棄事例も発生している。このため、脂肪酸メチルエステルは、水環境中から検出される可能性が考えられる。

脂肪酸は、GC/MS で直接測定すると、高極性物質のためピークがテーリングし、感度もあまり高くない。し

たがって、一般的には脂肪酸をメチル誘導体化して極性を減少させ、GC/MS で測定する。しかし、水環境中には微量の脂肪酸メチルエステルが検出される可能性があることから、水環境の脂肪酸を正確に分析するためには、メチル誘導体化による方法以外を検討する必要がある。

今回、脂肪酸を PFBB で誘導体化する方法を検討したところ、水質試料中の高感度分析法が開発できたのでその結果について報告する。

2 実験方法

2.1 検討物質

検討した脂肪酸を表 1 に示す。GC/MS 測定が可能で入手できた炭素数 8 から 22 の飽和脂肪酸 12 種類及び不飽和脂肪酸 4 種類について検討を行った。

2.2 GC/MS の測定条件

脂肪酸の測定条件を表 2、モニターイオンを表 3 に示す。対象物質の定量は、保持時間の近い内標準物質を用いた。GC カラムは、一般的に、脂肪酸メチルエステル分析等に使用される高極性の WAX 系カラムを選択し

表1 検討物質一覧表

| 慣用名 | 組織名 | 示性式 |
|---------|--------------------------------|---|
| カプリル酸 | オクタン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₆ -COOH |
| カプリン酸 | デカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₈ -COOH |
| ラウリン酸 | ドデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COOH |
| - | トリデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -COOH |
| ミリスチン酸 | テトラデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COOH |
| ペンタデシル酸 | ペンタデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₃ -COOH |
| パルミチン酸 | ヘキサデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH |
| マルガリン酸 | ヘプタデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -COOH |
| ステアリン酸 | オクタデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH |
| オレイン酸 | <i>cis</i> -9-オクタデセン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ -COOH |
| リノール酸 | <i>cis,cis</i> -9,12-オクタデカジエン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₂ (CH ₂) ₇ -COOH |
| リノレン酸 | 9,12,15-オクタデカントリエン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ -COOH |
| - | <i>n</i> -ノナデカン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -COOH |
| アラキジン酸 | エイコサン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₁₈ -COOH |
| ベヘン酸 | ドコサン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -COOH |
| エルカ酸 | <i>cis</i> -13-ドコセン酸 | CH ₃ -(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₁₂ -COOH |

表2 GC/MS測定条件

| 機種 | GC: Agilent7890A, MS: JMS-Q1000GCMk II |
|------------|---|
| GCカラム | HP-INNOWAX 30m×0.25mm×0.25μm |
| カラム温度 | 50°C(2min)-20°C/min-120°C(0min)-5°C/min-260°C(6min) |
| 注入口温度 | 240°C |
| 注入方法 | スプリットレス(パージ開始時間1.5min) |
| 注入量 | 1μL |
| キャリアーガス | ヘリウム1.5mL/min(定流量) |
| インターフェース温度 | 230°C |
| イオン源温度 | 210°C |
| イオン化電圧 | 70eV |
| イオン化法 | EI |
| イオン化電流 | 300μA |
| 検出モード | SCAN |

表3 モニターイオン

| 物質名 | RT | m/z | | |
|------------------------------|-------|-----|-----|-----|
| acenaphthene-d ₁₀ | 16:03 | 164 | - | - |
| phenanthrene-d ₁₀ | 25:17 | 188 | - | - |
| fluoranthene-d ₁₀ | 31:53 | 212 | - | - |
| カプリル酸 | 13:56 | 324 | 240 | 192 |
| カプリン酸 | 17:21 | 352 | 240 | 192 |
| ラウリン酸 | 20:44 | 380 | 240 | 199 |
| トリデカン酸 | 22:22 | 394 | 240 | 195 |
| ミリスチン酸 | 23:59 | 408 | 240 | 209 |
| ペンタデシル酸 | 25:32 | 422 | 241 | 223 |
| パルミチン酸 | 27:02 | 436 | 237 | 219 |
| マルガリン酸 | 28:30 | 450 | 251 | 269 |
| ステアリン酸 | 29:56 | 464 | 265 | 283 |
| オレイン酸 | 30:11 | 263 | 245 | 221 |
| リノール酸 | 30:52 | 460 | 279 | 195 |
| リノレン酸 | 31:47 | 458 | 402 | 221 |
| <i>n</i> -ノナデカン酸 | 31:19 | 478 | 279 | 297 |
| アラキジン酸 | 32:40 | 492 | 293 | 311 |
| ベヘン酸 | 35:30 | 520 | 321 | 339 |
| エルカ酸 | 35:56 | 319 | 337 | 301 |

た。GC/MS測定は、SCANモードで、定量用イオンは、原則として、分子イオンを選択した。

2.3 前処理方法

PFBB誘導体化は、要調査項目のフェノール類の分析方法²⁾等に採用されており、酸性下で水質試料から目的物質を抽出し、溶媒中でPFBB誘導体化し、誘導体化物をヘキサン抽出する方法である。今回検討した分析フローを図1に示す。脂肪酸は炭素数が多くなると、水溶解度が小さくなり、ガラス容器に吸着することが懸念されることから、試料採取したガラス容器の洗浄、洗い込みを考慮してアセトンを添加した。水質試料からの脂肪酸の抽出溶媒は、抽出効率等を考慮してヘキサンからジクロロメタンに変更した。また、PFBB誘導体化後の抽出は参考法と同様にヘキサンを用いて行ったが、抽出時には内標準を同時に添加し、1回抽出とし、脱水操作も省略した。静置後、上澄みのヘキサン層を分取し、GC/MS測定した。また、脂肪酸PFBB誘導体化物のクリーンアップについても併せて検討した。

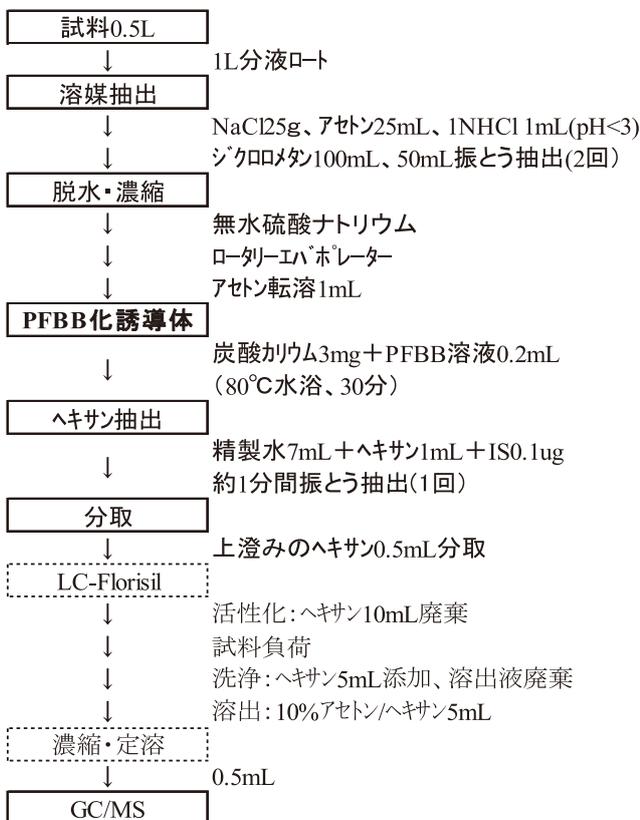


図1 分析フロー

2.4 装置検出下限値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下限値 (IDL) 及び分析方法の検出下限値 (MDL) と定量下限値 (MQL) の測定及び算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き (平成 20 年度版)」³⁾ に従った。IDL は、検量線に用いる最低濃度付近の標準液を 7 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL 試験には、河川水に IDL の 5 倍程度の標準物質を添加した試料を 7 個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MS で測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

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

$t(n-1,0.05)$: 危険率 5%, 自由度 $n-1$ の t 値 (片側)

$\sigma_{n-1,I}$: IDL 算出のための測定値の標本標準偏差

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

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

$t(n-1,0.05)$: 危険率 5%, 自由度 $n-1$ の t 値 (片側)

$\sigma_{n-1,M}$: MDL 算出のための測定値の標本標準偏差

3 検討結果及び考察

3.1 PFBB誘導体化の効果

脂肪酸を直接測定した場合と PFBB 誘導体化した場合のクロマトグラムを図 2 に示す。直接測定した場合は、特に、リテンションタイムが 30 分以降の脂肪酸はピークがテーリングし、ピーク強度が非常に小さくなった。また、ピークは 14 本しか確認できず、今回の GC/MS 条件では分子量の大きいベヘン酸とエルカ酸は測定できなかった。脂肪酸を PFBB 誘導体化した場合、極性が低くなり、ピークのテーリングが解消され、面積比で約 10 ~ 45 倍程度、感度が良くなり、定量性も向上し、16 種類の脂肪酸が測定できた。特に、炭素数が大きいものや不飽和脂肪酸の感度向上が見られた。低濃度の脂肪酸-PFBB 誘導体化物のクロマトグラムを図 3 に示す。感度向上とピーク形状の改善により、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で、いずれの物質も S/N が 10 以上であった。

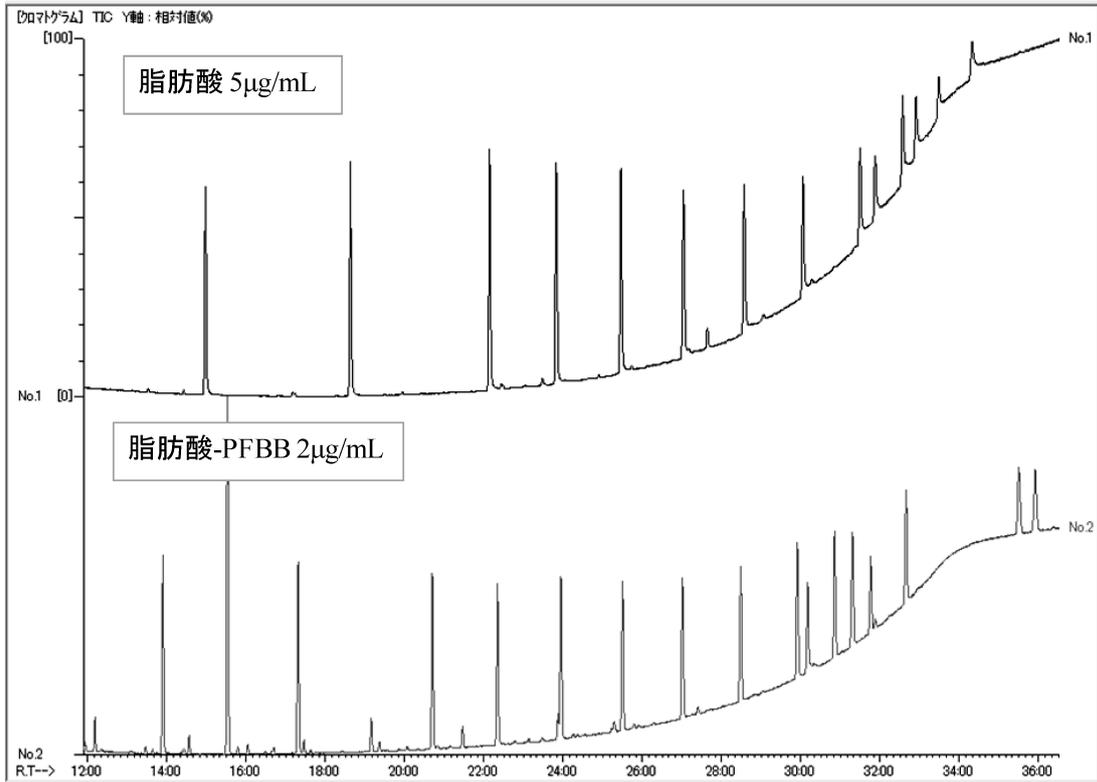


図2 誘導体化の有無のクロマトグラム比較

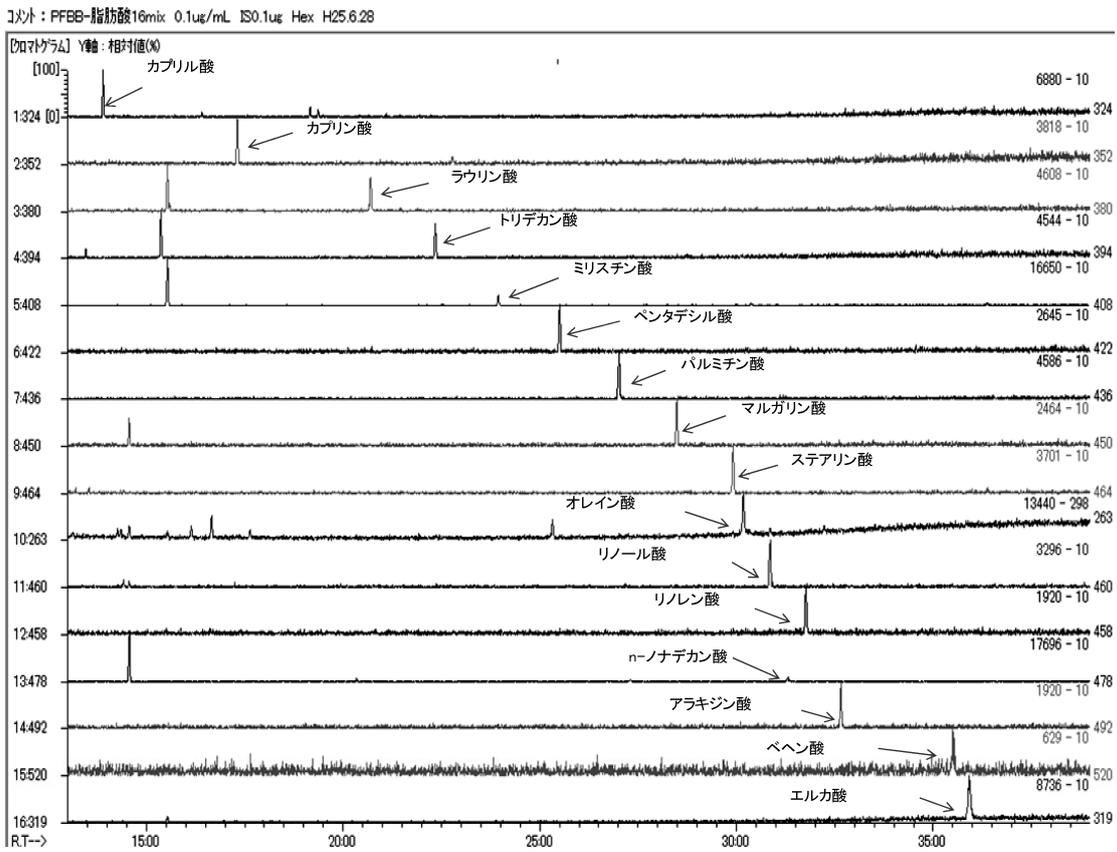


図3 脂肪酸-PFBB誘導体化物のクロマトグラム (0.1 µg/mL)

3.2 検量線

図4に検量線の一例を示す。リテンションタイムが最も遅いエルカ酸は、内標準物質としてフルオランテン-d₁₀を使用し、0.1～1 μg/mLの濃度範囲で直線性 ($r^2 > 0.9996$) が確認できた。そのほかの脂肪酸も同じ濃度範囲で、同様に直線性 ($0.9991 < r^2 < 0.9999$) が確認できた。

3.3 クリーンアップの検討結果

PFBB誘導体化後のヘキサン抽出では、脂肪酸-PFBB誘導体化物だけでなく、未反応なPFBBも同時に抽出さ

れることから、フロリジルによるクリーンアップを検討した。使用したフロリジルはSUPELCO製のLC-Florisil (1g/6mL)で、ヘキサンから順次、アセトン含有量を増加させた溶離液を流し、脂肪酸の分画試験を行った。フロリジル分画試験結果を表4に示す。各分画中のPFBBのクロマトグラムを図5に示す。PFBBの90%以上は、フロリジルに保持されず、ヘキサン画分に溶出した。一方、脂肪酸-PFBB誘導体化物はヘキサン画分には少し溶出するだけで、90%以上が10%アセトン/ヘキサン画分に溶出し、脂肪酸と大半のPFBBを分別することができた。

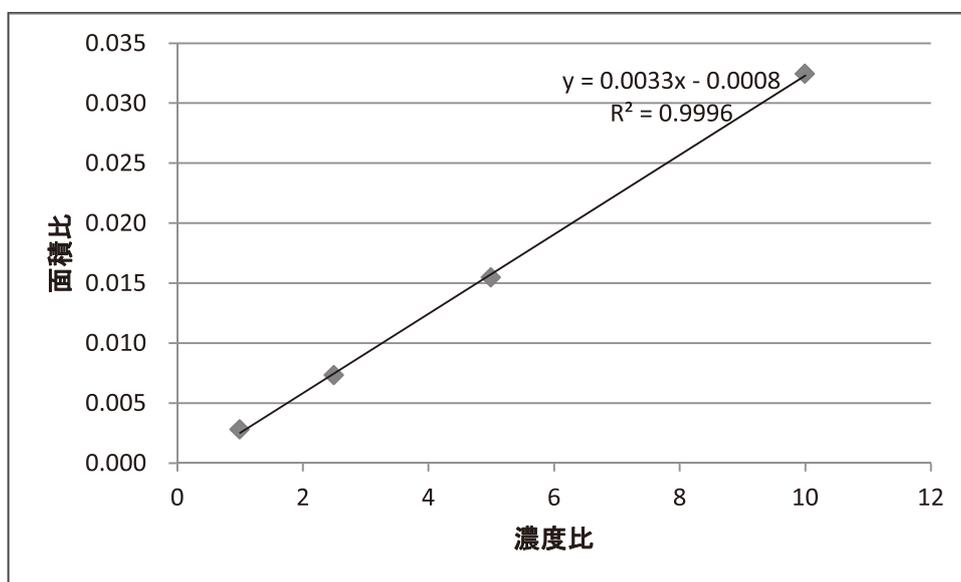


図4 エルカ酸の検量線

表4 フロリジル分画試験結果

| 物質名 | Fr1: Hex5mL | Fr2: 10% Ac/Hex5mL | Fr3: 20%Ac/Hex5mL | Fr4: 50%AC/Hex5mL |
|----------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| カプリル酸 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| カプリン酸 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| ラウリン酸 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| トリデカン酸 | 4 | 96 | 0 | 0 |
| ミリスチン酸 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| ペンタデシル酸 | 4 | 96 | 0 | 0 |
| パルミチン酸 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| マルガリン酸 | 4 | 96 | 0 | 0 |
| ステアリン酸 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| オレイン酸 | 1 | 99 | 0 | 0 |
| リノール酸 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| リノレン酸 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| n-ノナデカン酸 | 5 | 95 | 0 | 0 |
| アラキジン酸 | 5 | 95 | 0 | 0 |
| ベヘン酸 | 10 | 90 | 0 | 0 |
| エルカ酸 | 0 | 100 | 0 | 0 |

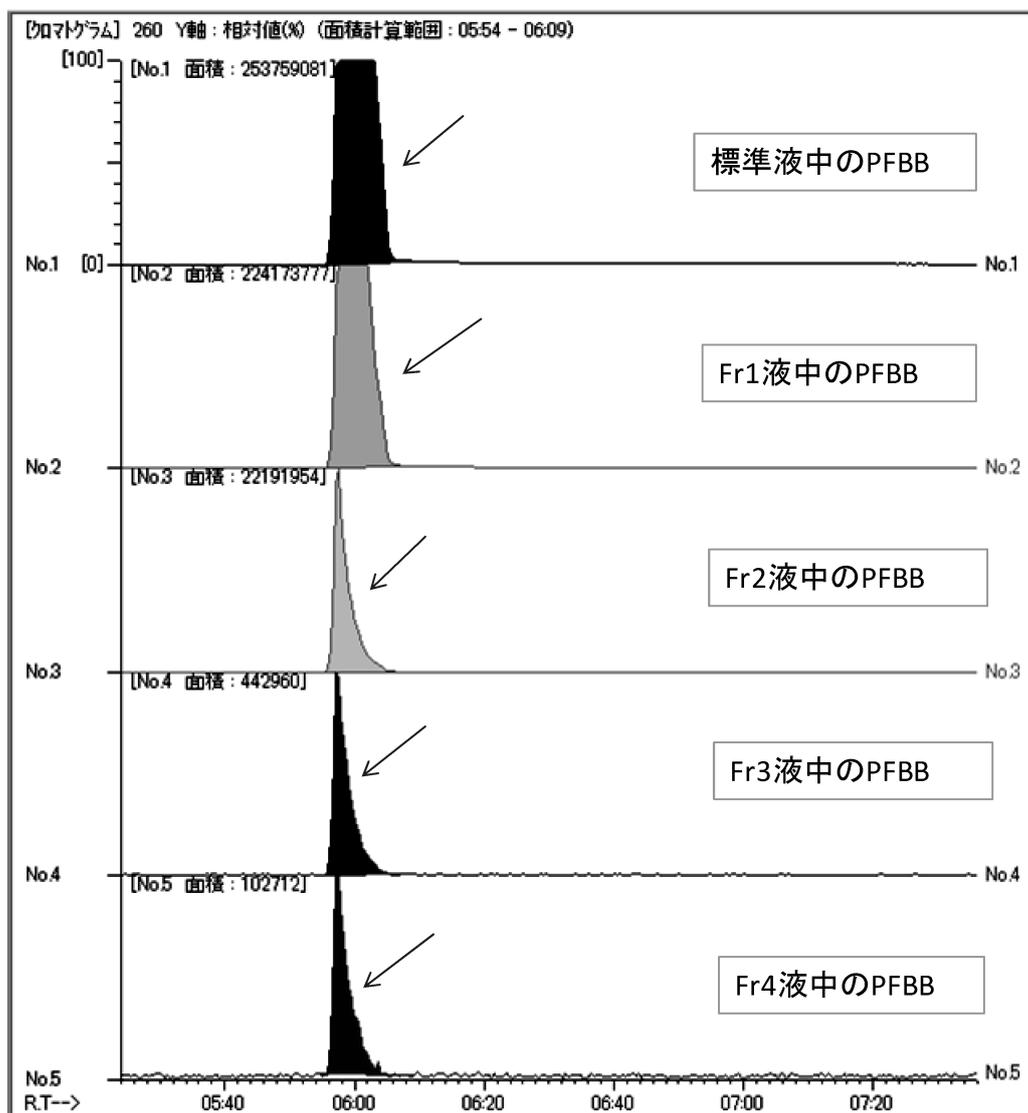


図5 フロルジル各分画中のPFBBクロマトグラム

3.4 IDL及びMDL, MQL

IDL及びMDL, MQLを表5に示す。IDLは0.026(カプリル酸)~0.092 $\mu\text{g}/\text{L}$ (ステアリン酸), MQLは0.072(カプリル酸)~3.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ (リノレン酸)であった。試料0.5Lを最終的に1mLにすることにより, 非常に高感度な分析法が開発でき, 環境水中の微量脂肪酸の分析が可能となった。なお, MDLが1 $\mu\text{g}/\text{L}$ を超過したリノレン酸とパルミチン酸は, MDL試験に使用した河川水中に添加濃度以上に対象脂肪酸が含まれていたため, MDLが高くなったが, これら脂肪酸を含まない河川水でMDL試験を実施すれば, 他の脂肪酸と同程度のMDLが得られ

ると考えられる。

MDL試験に使用した河川水の脂肪酸濃度を表6に示す。生活排水の影響を強く受けている地点の水質試料を使用した, 7種類の脂肪酸が検出された。最も濃度が高かったリノレン酸は3.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 検出され, その由来は植物油と推察された。パルミチン酸は1.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 検出され, その由来は植物油や界面活性剤と推察された。

また, 今回検討した分析法を応用して, 動物性油脂や植物性油脂が公共用水域へ流出した際に, 油脂をけん化し, 脂肪酸とし, その脂肪酸組成から, 原因油脂の究明が期待できる。

表5 IDL及びMDL, MQL

| 物質名 | 試料量 (L) | 最終液量 (mL) | IDL ($\mu\text{g/L}$) | MDL ($\mu\text{g/L}$) | MQL ($\mu\text{g/L}$) |
|----------|------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| カプリル酸 | | | 0.026 | 0.028 | 0.072 |
| カプリン酸 | | | 0.047 | 0.080 | 0.21 |
| ラウリン酸 | | | 0.048 | 0.19 | 0.50 |
| トリデカン酸 | | | 0.048 | 0.050 | 0.13 |
| ミリスチン酸 | | | 0.039 | 0.25 | 0.65 |
| ペンタデシル酸 | | | 0.042 | 0.098 | 0.25 |
| パルミチン酸 | | | 0.090 | 0.57 | 1.5 |
| マルガリン酸 | 0.5 | 1 | 0.045 | 0.058 | 0.15 |
| ステアリン酸 | | | 0.092 | 0.15 | 0.38 |
| オレイン酸 | | | 0.036 | 0.14 | 0.36 |
| リノール酸 | | | 0.043 | 0.18 | 0.46 |
| リノレン酸 | | | 0.051 | 1.5 | 3.8 |
| n-ノナデカン酸 | | | 0.050 | 0.053 | 0.14 |
| アラキジン酸 | | | 0.048 | 0.061 | 0.16 |
| ベヘン酸 | | | 0.052 | 0.080 | 0.21 |
| エルカ酸 | | | 0.058 | 0.069 | 0.18 |

表6 河川水の脂肪酸濃度

| 物質名 | 河川水 ($\mu\text{g/L}$) |
|----------|----------------------------|
| カプリル酸 | N.D |
| カプリン酸 | N.D |
| ラウリン酸 | N.D |
| トリデカン酸 | N.D |
| ミリスチン酸 | 0.52 |
| ペンタデシル酸 | 0.13 |
| パルミチン酸 | 1.6 |
| マルガリン酸 | N.D |
| ステアリン酸 | 0.30 |
| オレイン酸 | 0.39 |
| リノール酸 | 0.28 |
| リノレン酸 | 3.0 |
| n-ノナデカン酸 | N.D |
| アラキジン酸 | N.D |
| ベヘン酸 | N.D |
| エルカ酸 | N.D |

注:N.DはMDL未満、濃度はn=2の平均値

4 まとめ

脂肪酸のPFBB誘導体化による水質分析法を検討し、次の結果を得た。

- ① 直接測定法に比較してPFBB誘導体化測定法は、10倍以上の感度向上が見られた。
- ② フロリジルクリーンアップにより、未反応なPFBBを大部分除去することができた。
- ③ MQLは0.072～3.8 $\mu\text{g/L}$ となり、環境水中の脂肪酸の高感度分析法が開発できた。

文 献

- 1) 吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和大: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—GC/MSを用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—, 岡山県環境保健センター年報, 第37号, 29-40, 2013
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課: 要調査項目等調査マニュアル (水質, 底質, 水生生物) 平成12年12月, 100-107, 2000
- 3) 環境省総合環境政策局環境保険部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成20年度版), 平成21年3月, 2009