

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710030

研究課題名(和文)環境動態解析のためのハロゲン化ナフタレン分析法の高度化

研究課題名(英文)Congener-specific determination of polyhalogenated naphthalenes for prediction of their environmental fate

研究代表者

羽成 修康 (Hanari, Nobuyasu)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：10392648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、塩素化ナフタレン(PCN)の環境動態を把握するため、二次元ガスクロマトグラフ質量分析計(GCxGC/MS)を用いて、全PCN異性体の詳細分離を実施することである。得られた成果は、全75異性体中73異性体の分離をGCxGC/MSで実現し、また本法を光分解後のPCN製剤に適用したことで異性体毎の動態解析およびリスク評価の高度化を実現したことである。さらに、新規環境汚染物質である臭素化ナフタレンへの拡張も可能であったため、これらの一斉分析だけでなく、類似物質分析への応用に繋がる基盤技術になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to perform congener-specific determination of polychlorinated naphthalenes (PCN) using two-dimensional gas chromatography mass spectrometry (GCxGC/MS) for prediction of their environmental fate. As a result, 73 PCN isomers among all the 75 isomers could be separated with developed GCxGC/MS method. In addition, the accuracy of fingerprint and risk assessment was enhanced based on congener-specific data obtained by applying the developed method to several environmental samples. Moreover, this method was applicable to analysis of polybrominated naphthalenes (PBN). From the results in this study, comprehensive determinations of PCN/PBN could be performed, thereafter, it is expected that the scope of the method will be expanded to many related environmental contaminants including PCN/PBN.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：有害化学物質 塩素化ナフタレン 臭素化ナフタレン 二次元ガスクロマトグラフ質量分析計

## 1. 研究開始当初の背景

塩素化ナフタレン ( polychlorinated naphthalene : PCN ) は、PCB やダイオキシン類と同様、環境への高残留性、生物への高蓄積性・強毒性、さらには長距離移動性が懸念され、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 ( POPs 条約 ) の規制対象物質の候補にも挙げられる世界的にも有名な環境汚染物質の一つである。そのため、世界各地で環境モニタリングは継続され、海洋汚染が確認されており、また PCN は焼却由来の非意図的生成も考えられるため大気汚染も観測されている。構造はナフタレンに塩素が置換した化合物で、その置換位置や塩素数により、多くの異性体や同族体を持つ化合物群である。この PCN ( 三塩素化体以上 ) は化審法第一種特定化学物質に指定され、生産・使用が原則禁止されているが、1970 年代後半までは PCB 同様、電気絶縁剤等として工業用途に広く使用されていた。以上のような背景から、PCN 同族体別の詳細な環境モニタリングやリスク評価が行われており、得られた成分組成結果から環境媒体毎による成分組成パターンの識別や汚染源推定が行われている。さらに、異性体毎に毒性値 ( 毒性当量 ) が異なるため、正確なリスク評価を支援するために異性体別分析法の開発も実施されている。これら蓄積されたデータを基に、PCN の製造工程 ( 合成法 ) の違い、地域間差による同族体の存在比の違いや焼却由来・PCN 製剤由来等の異性体パターンの差異が認識され、環境汚染状況・経過の把握、汚染源特定等に大いに役立ってきた。

このアプローチは研究代表者も実施しており、いくつかの研究成果を発表し、異性体パターンを明らかにしているが、対応不十分な改善点も残されたままである。その一つは、PCN が物理化学特性の似た 75 種の同族体・異性体を有するため、異性体別の定量に多くの時間が浪費されることであり、もう一つは分離分析が未だ不十分で、異なる毒性値を持つ異性体が共溶出するため、成分組成パターンの識別やリスク評価のさらなる向上が図れることである。これら 2 つの改善点を解消するために、当所では二次元ガスクロマトグラフ質量分析計 ( GCxGC/MS ) を導入している。それは、GCxGC/MS が 2 つの分離カラムを装備でき、一次元目のカラムで分離困難な共溶出 PCN 異性体が存在しても二次元目のカラムで分離可能なことから、不十分な分離状況の劇的な改善に役立つと予測されたためである。また得られた結果は、横軸に一次元目カラムの PCN 溶出順、縦軸に二次元目カラムの PCN 溶出順がマッピングされるため、異性体別に定量せずに分析試料間の同等性を確認できる利点 ( 可視化 ) も有している。この GCxGC/MS の研究例としては、PCB やダイオキシン類での実績があり、研究代表者の予測と同様な知見が示されているが、PCN に関しては四塩素化体を除き、ほとんど検討されていない。さ

らに、RoHS 指令の特定臭素系難燃剤である臭素化ジフェニルエーテルが注目されるのに呼応して、PCN の塩素が臭素に置換された臭素化ナフタレン ( polybrominated naphthalene : PBN ) も関心を持たれ始めている。PBN も PCN 同様、異性体毎に異なる毒性値を持つことが明らかであるが、市販試薬種がほとんど無いため、環境動態解析に関する研究例が皆無である。そのため、PBN にも GCxGC/MS を適用し、PCN の溶出順を参照することにより、PBN に関する新規データの獲得が期待される。そして、分析条件の最適化により PCN・PBN 一斉分析を実現し、一回の試料注入から、より詳細な同族体・異性体パターンの同時取得も期待される。ただし、PBN 分析には結果の妥当性確認が必要となるため、PBN の合成実験等を参考にし、PBN 標品を自ら合成、構造決定後に GCxGC/MS での再評価が必須となる。

そこで研究代表者は科学研究費補助金において、共溶出する PCN 異性体を分離するため、かつ溶出パターンを可視化するために市販 PCN 試薬を GCxGC/MS で分析し、全 75 種の異性体の完全分離条件を確立する。これと同時に、種類が不足している PBN 標品を自ら合成し、PCN の分離条件に適用、PCN・PBN の一斉分析条件も確立する。そして最後に、確立した分析条件を市販の PCN や PBN 含有製剤、及び環境試料に適用し、それら詳細な成分組成解析を行い、特に PBN の成分組成パターンのデータ獲得を目指す。

## 2. 研究の目的

当該研究の目的は大きく 3 つに分けられる。一つめは GCxGC/MS で高分離が達成されていない PCN 異性体 75 種全てを、一塩素化体から八塩素化体まで完全分離し、かつ定性することである。これについては可能な限り市販試薬を入手し、さらに定性情報の不足している一部の二塩素化体ではそれらを合成することで 75 種全てを確定する。研究代表者のこれまでの研究業績において、高分離・高選択性を備えた高分解能質量分析計等で、すでに 50 種程度の異性体を定性しており、さらなる詳細な分析条件の検討を GCxGC/MS で行う。

二つめは検討した PCN の分離分析条件を基に、PBN を含めた一斉分析条件を確立することである。PBN に関しては市販試薬種がほとんど無いため、ナフタレン、又はモノプロモナフタレンを前駆物質とした光化学反応により、数種の標品を合成、得られた合成標品を精製し、その構造を核磁気共鳴スペクトル等から決定した後、PCN で定性した異性体との比較・検証を行い、PBN 分析条件の妥当性確認を行う。

目的の三つめは上記技術を用いて市販製剤、及び環境試料中の PCN や PBN の成分組成解析を行うことである。PCN 含有製剤に関しては、多くの研究報告があるため追試的な意

味合いが高くなるが、臭素系難燃剤（製剤）に不純物として含有するであろう PBN に関しては報告例がほとんど無いため、新たな知見を得ることが期待される。また、環境試料中の PBN 分析に関しても、研究代表者の知る限り、ほとんど未解明であるため、世界的にも初めて有益な分析データが得られるものと考えている。さらに、PBN のデータは RoHS 指令の特定臭素系難燃剤である臭素化ジフェニルエーテル等の污染源推定をサポートするデータへの拡張も目指す。

### 3. 研究の方法

全 75 種の PCN 異性体の完全分離において必須の、また PBN も含めた一斉分析のために、GCxGC/MS での分離・分析条件の検討を行った。これまで蓄積した 50 種程度の PCN 異性体の分析条件や定性情報を基に、現在市販されている未定性異性体等の購入、又は二塩素化体では合成品の利用、及び既存の研究報告等により分離条件をさらに詳細に検討した。GCxGC/MS に適用するカラムの選択に関しても、通常、一次元目：低・中極性カラム、二次元目：高極性カラムの組合せを反転する等の検討をし、分離条件の最適化を行う。また PBN 分析では、GCxGC/MS 注入時の熱分解が懸念されるため、臭素化物分析に適したオンカラム注入システム（本研究による購入品）による制御が必須と考えられ、加えて環境試料中で測定対象物質は極微量であることが予想されることから、大量注入システム（所有設備）の検討も併せて行う。さらに、市販試薬種の不足している PBN の合成実験条件を検討する。一斉分析では、精密質量数が近接している安定同位体標識体（ラベル体）四塩素化の PCN が二臭素化の PBN の妨害物質になることが予測されるため、それらの分析に関して相互干渉しないよう、溶出順位等の条件検討を行う。加えて、市販製剤及び環境試料中の PCN や PBN の成分組成パターンの可視化の実現を目指す。用いる市販製剤は製造企業（AccuStandard、Cambridge Isotope Laboratories、Wellington Laboratories）等から入手し、また環境試料（食品、光分解試験に供した水質試料）等も準備する。市販製剤では、PCN においては Hallowax（HW）シリーズを分析し、詳細な同族体や異性体の成分組成結果を得る。環境試料では、研究代表者が所属する研究室で所有の塩素系農薬分析用食品（スズキ）を試料とし、この試料中の PCN や PBN の同族体・異性体パターンを明らかにする。また、高山に静置し光分解試験に供した水質試料も研究協力者から提供頂き、POPs 条約の対象候補物質でもある PCN 異性体の分解挙動等のデータ蓄積を実施する。以下に、用いた試薬や装置等の詳細を示す。

#### (1) 試薬等

PCN 異性体 [一塩素化体：2-クロロナフタレン（東京化成工業）、二塩素化体：1,5-ジ

クロロナフタレン（LGC）、1,8-ジクロロナフタレン（関東化学）、2,6-ジクロロナフタレン（Chiron）] PBN 異性体 [一臭素化体：1-プロモナフタレン（和光純薬工業）、二臭素化体：1,4-ジプロモナフタレン（和光純薬工業）、1,5-ジプロモナフタレン（Apollo Scientific）、1,8-ジプロモナフタレン（Ark Pharm）、2,3-ジプロモナフタレン（Santa Cruz Biotechnology）、2,6-ジプロモナフタレン（Alfa Aesar）、2,7-ジプロモナフタレン（和光純薬工業）、六臭素化体：1,2,3,4,6,7-ヘキサプロモナフタレン（Apollo Scientific）、PCN 混合標準液 PCN-MXA（Wellington Laboratories）、tetra-octa PCN mixture（Cambridge Isotope Laboratories）、PCN 製剤（HW1000、1001、1014、1051、AccuStandard 又は Analabs）、臭素系製剤（FR-300BA、AccuStandard）、五塩化リン、デカリン（ともに関東化学）、ジクロロメタン、臭素（ともに和光純薬工業）

#### (2) GCxGC/MS 分析

PCN・PBN の分析には、GC×GC/MS（Agilent Technologies 製 6890 GC 及び 5973 MS）を使用した。注入部は不活性ガラスライナーを備えた Cooled Injection System CIS 4（GERSTEL 製）を使用した。スプリットレス注入モードを採用し、一定圧力モードでカラムヘッド圧 683 kPa、注入部温度は試料注入後 40 で 12 秒保持、その後 230 まで毎分 12 で昇温した。注入はマニュアルで行った。使用したキャピラリーカラムは、一次元目 Rt-DEXcst（Restek 製、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm）、二次元目 DB-WAX（J&W Scientific 製、長さ 2 m、内径 0.10 mm、膜厚 0.10 μm）キャリアガスはヘリウムを用い、流量は毎分 3.35 mL とした。オープン温度は 120 で 1 分保持、その後 230 まで毎分 1 で昇温した。イオン源温度は 230、電子衝突（EI）電圧は 70 eV とした。MS 条件はスキャンモード（ $m/z$ : 150-420、毎秒 21.28 スキャン）を採用した。ホットジェットガス温度は 200 で、その後 300 まで毎分 1 で昇温した。ホットジェットガス吹きつけ時間は 350 ミリ秒、モジュレーション時間は 10 秒とした。インターフェース温度は 230 とした。データ処理は包括的二次元 GC 用 GC Image ソフトウェア（Zoex 製）を使用した。定性は既報及び購入した市販試薬等を用いて行った。

#### (3) PCN 合成用塩素化反応

以下の置換基（スルホン酸基、水酸基、ニトロ基、ジアゾ基またはキノン）を持つナフタレンを、五塩化リンと加熱することにより、置換基を塩素に変えることができる。そこで、該当する原料試薬を入手し、少量（数十 mg 程度）をナス型フラスコ内で過剰の五塩化リンとともにオイルバスで還流し、合成物を  $n$ -ヘキサンで抽出して二塩素化体の異性体を得た。以下に使用した原料を列挙する。1,6-dihydroxynaphthalene、1,7-dihydroxy-

naphthalene, sodium 1-naphthol-3-sulfonate. 合成物の分析は、GC/MS (Agilent Technologies 製 6890 GC 及び 5975 MS) を使用した。スプリットレス注入モードを採用し、一定流量モードでカラム流量毎分 1.0 mL、注入部温度は 280 °C、注入はオートサンプラを用いた。使用したキャピラリーカラムは、DB-5MS (J&W Scientific 製、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm)、キャリアガスはヘリウムを用いた。オープン温度は 70 °C で 1 分保持、その後 180 °C まで毎分 15 °C で昇温、さらに 260 °C まで毎分 4 °C で昇温し、10 分保持した。イオン源温度は 230 °C、EI 電圧は 70 eV とした。MS 条件は選択イオンモニタリングモード ( $m/z$ : 196, 198) を採用した。インターフェース温度は 280 °C とした。

#### (4) PBN 合成用光化学反応

研究例によると 1-プロモナフタレン含有ジクロロメタン、又は四塩化炭素溶液 (他の報告ではナフタレン含有四塩化炭素溶液、又はデカリン) に臭素を加えた室温下での光化学反応実験 (ナフタレンやデカリン溶液では 120 °C での光化学反応) により PBN 合成が短時間で可能である。そこで、1-プロモナフタレン含有ジクロロメタン溶液、又はデカリンに臭素を加え、セン特殊光源製 VG-500\* 光化学反応容器を用いて PBN 合成を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 二塩素化体の定性

二塩素化体の合成を実施し、GC/MS により合成物の質量数 ( $m/z$  196) 及び同位体ピーク比 (196:198 = 100:65.4) を解析したところ、二塩素化体であることが確認された。原料から、合成物はそれぞれ 1,3-, 1,6-, 1,7-ジクロロナフタレンであることが示唆された。これらを以下の GCxGC/MS による分離・定性に用いた。

#### (2) PCN の GCxGC/MS による分離・定性

本分析条件の決定にあたり、複数のキャピラリーカラムを用いて、PCN 異性体の詳細分離の検討を行った。用いた試料は HW シリーズであったが、HW1000 には低塩素化体が、HW1051 には高塩素化体が含まれており、HW1014 にはその間の塩素化体が含まれているため、等量混合品を作製し、これを分析条件検討用試料とした。DB-5 等では最高使用温度が高く、分析時間の迅速化も図り易いが、PCN では満足な詳細分離結果は得られなかった。次に、複雑な化合物群で知られる PCB 及び多環芳香族炭化水素分析に優れた分離能を示すキャピラリーカラムである HT8-PCB、ICB-PAH を検討に用いたが、これらでも PCN ではより良い分離を得られなかった。さらに一次元目: 高極性カラム、二次元目: 低・中極性カラムの組合せでも適した結果を得られなかった。そこで、光学異性体分離に秀でた Rt-DEXcst を用いたところ、十分な詳細分離結果が得られた (図 1)。三塩素化体を除く、PCN 異性体において、詳細分離が実現

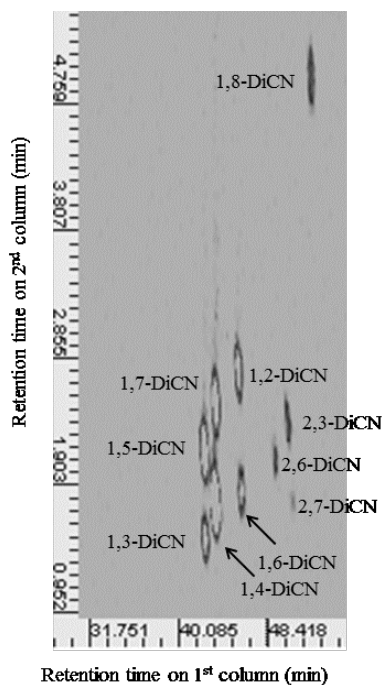


図 1 二塩素化体の二次元クロマトグラム

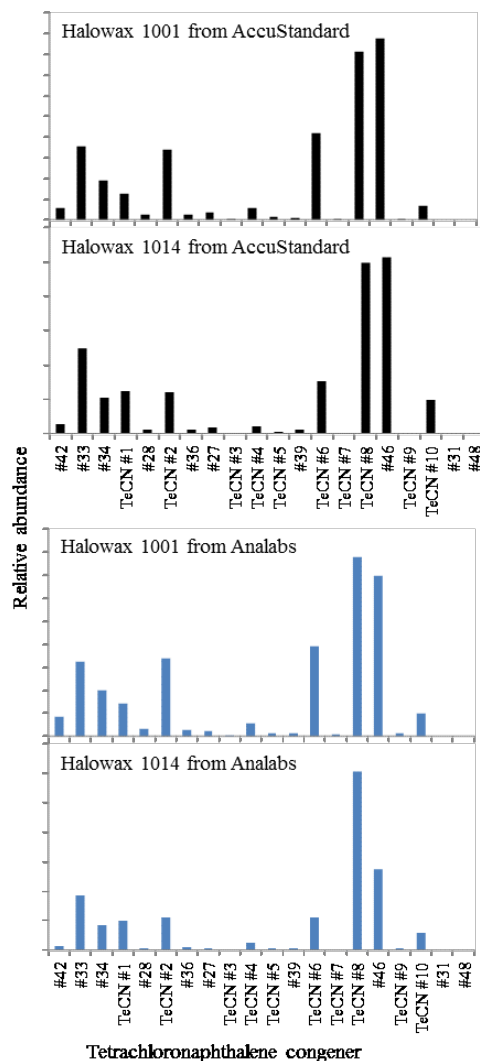


図 2 HW 中の四塩素化体の成分組成

した。特に二塩素化体では、既報、購入した異性体や上記合成体により全ての異性体の分離・定性が可能となった。また、四塩素化体でも同様に分離・定性が可能となった。これら異性体を詳細分離した結果は、我々が知る限り、初めての知見と考えられる。この知見を基に、製造企業の異なる HW1001 と 1014 (AccuStandard 製及び Analabs 製) の PCN 成分組成を比較したところ、これまでは共溶出し存在割合が定かでなかった #33 (1,2,4,6-テトラクロロナフタレン) と #34 (1,2,4,7-テトラクロロナフタレン) の比率が明らかとなり、企業間で差異が認められなかったことが確認できた (図 2)。さらに異性体 #38 (1,2,5,8-テトラクロロナフタレン、図中では TeCN #8) と #46 (1,4,5,8-テトラクロロナフタレン) を比較したところ、HW1001・1014 とともに AccuStandard 製では #46 の存在量が多いが、Analabs 製では #46 が少なかった。これは、企業間の差異を表していると考えられたため、汚染源推定の高度化に繋がると期待される。残念ながら詳細分離の実現しなかった三塩素化体では、既報での知見や市販試薬種の不足が問題点として挙げられた。結果として、定性が不十分となった三塩素化体が存在したが、75 異性体中 73 異性体の分離・定性が実現した。

### (3) PBN の分離

PBN への分析条件拡張のため、可能な限り市販試薬を購入し、確立した本分析条件に適用した。得られた試薬では、PCN が妨害物質にならず、問題なく分析が実施できた。懸念された熱分解の影響は、1-プロモナフタレンの分析で確認し、オンカラム及び CIS 4 で分析の標準偏差を比較したところ、オンカラムで再現性良いデータが得られた (相対標準偏差 2.3 %程度) ため、PBN 分析に適した注入法であることが示唆された。

PBN の光化学反応実験では、残念ながら、合成体を得ることができなかった。これは、実験に使用した光源の波長・強度や反応中の温度が合成に適切でなかったことが原因と推察される。

### (4) 光分解試験試料の分析

研究協力者から提供された水質試料を、本分析条件に適用した。水質試料の実験条件等の詳細は割愛するが、以下に概要を示す (HW を純水に添加し、パイレックス製試験管に小分け。密栓し、紫外線強度の高い山頂付近に 100 日間静置。回収後、水溶液から PCN を *n*-ヘキサンで液液抽出し、得られた抽出液を GCxGC/MS で分析。実験室に保管しておいた水溶液をブランクとして分解の有無を評価)。分析の結果、実験に供した HW1000・1014・1051 全てで、PCN の光分解が観測された。POPs 条約の対象候補物質である PCN が実環境下で光分解した知見は、非常に有用であると考えられる。HW 毎に見ていくと、低塩素化体の含有率の高い HW1000 が他の HW と比較して、分解率が低かった (表 1)。これは、それぞれの

表 1 光分解試験後の水試料中で検出された PCN 同族体の割合 (%)

	MonoCNs	DiCNs	TriCNs	TetraCNs
Halowax 1000	42.7	26.3	29.5	-
Halowax 1014	-	-	-	0.0
Halowax 1051	-	-	-	-
	PentaCNs	HexaCNs	HeptaCNs	OctaCN
Halowax 1000	-	-	-	-
Halowax 1014	3.7	0.7	0.0	-
Halowax 1051	-	-	12.7	0.0

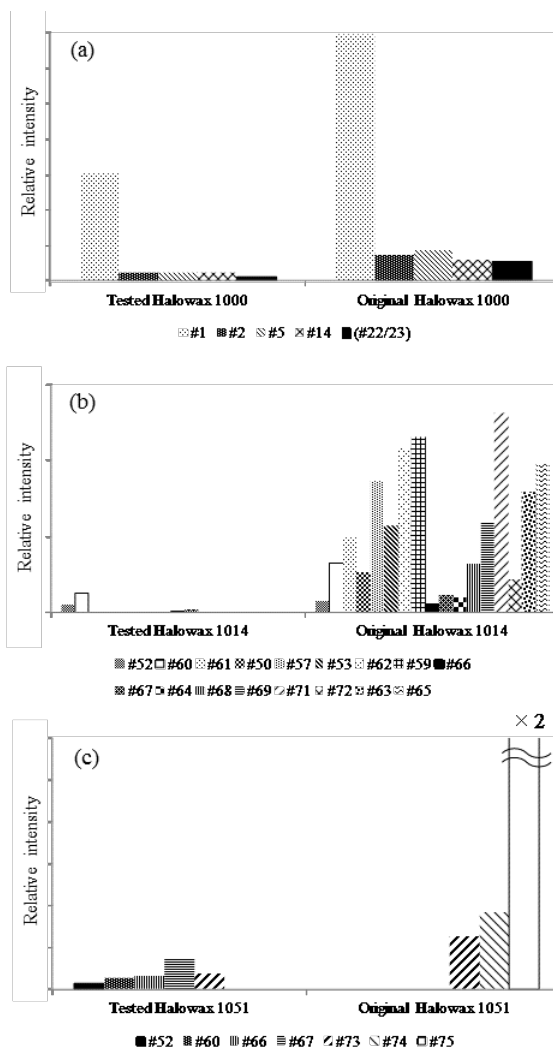


図 3 光分解試験前後の水試料中の PCN 異性体組成 (a : HW1001、b : HW1014、c : HW1051)

HW の持つ減衰係数の違いに依存するためだと考えられる。また、このような高山での光分解は既報でも確認されており、汚染源推定には重要な知見である。

一方、毒性に注目すると、ほとんどの PCN 異性体は光分解しており、実験前の濃度よりも低下していたことから、毒性等量も低下していた(図3)。ただし、高塩素化体の含有率の高い HW1051 では、毒性を示さない八塩素化体が、少量ではあるが、毒性の高い五塩素化体や六塩素化体に脱塩素化又は光分解により変化したため、毒性等量が増加した。この知見も、高精度なリスク評価には重要なものであると考えられる。

つまり、GCxGC/MS 分析により、PCN 異性体の詳細分離が可能になったことで、これまで不明だった共溶出異性体の存在比率の把握が可能になり、かつ製造企業間の差異も認識可能となったため、より高精度な汚染源推定の基盤技術になることが期待される。さらに、毒性等量も異性体毎に見積もりことが可能となり、かつ光分解により生成する、毒性を有する異性体の存在を確認したことから、異性体別の正確な評価を可能とする本研究の知見は有用であると考えられる。ただし、本分析法をスズキ試料に適用したところ、共雑物の影響により、PCN・PBN 異性体の定性が困難であったこと、加えて臭素系の製剤に適用したところ、不純物である PBN 濃度が非常に低かったため、検出下限以下で検出困難であったこと、など応用に関する問題点もいくつか明らかとなった。

今後は、三塩素化体の定性のために、高濃度に PCN を含有する飛灰試料の分析、PBN の知見を得るために、臭素系物質で汚染された試料の確保、さらには検出部である質量分析計の高選択性・高感度化のため、飛行時間型質量分析計への変更などを進めることで、さらなる研究内容の充実を図ることが可能となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計3件)

Hanari Nobuyasu, Falandysz J., Nakano T., Petrick G., Yamashita N., Separation of closely eluting chloronaphthalene congeners by two-dimensional gas chromatography/quadrupole mass spectrometry: An advanced tool in the study and risk analysis of dioxin-like chloronaphthalenes, Journal of Chromatography A, 査読有, Vol.1031, 2013, pp.209-214  
DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.070

Hanari Nobuyasu, Falandysz J., Petrick G., Nakano T., Yamashita N.,

Preliminary evaluation of environmental photodegradation of chloronaphthalenes by congener-specific determination with comprehensive two-dimensional GC/qMS, Organohalogen Compounds, 査読有, Vol.75, 2013, pp.5-8

[http://www.dioxin20xx.org/ohc\\_database\\_search.htm](http://www.dioxin20xx.org/ohc_database_search.htm)

Hanari Nobuyasu, Falandysz J., Petrick G., Yamashita N., Determination of congener-specific chloronaphthalenes using comprehensive two-dimensional GC/QMS, Organohalogen Compounds, 査読有, Vol.74, 2012, pp.32-35

[http://www.dioxin20xx.org/ohc\\_database\\_search.htm](http://www.dioxin20xx.org/ohc_database_search.htm)

### [学会発表](計2件)

Hanari Nobuyasu, Falandysz J., Petrick G., Nakano T., Yamashita N., Preliminary evaluation of environmental photodegradation of chloronaphthalenes by congener-specific determination with comprehensive two-dimensional GC/qMS, The 33<sup>rd</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - Dioxin 2013 (Daegu, Korea), Aug 26, 2013

Hanari Nobuyasu, Falandysz J., Petrick G., Yamashita N., Determination of congener-specific chloronaphthalenes using comprehensive two-dimensional GC/QMS, The 32<sup>nd</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - Dioxin 2012 (Cairns, Australia), Aug 27, 2012

### [図書](計0件)

### [産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### [その他]

ホームページ等

[https://www.nmij.jp/~org-chem/org-std-2/paper\\_jp.html](https://www.nmij.jp/~org-chem/org-std-2/paper_jp.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

羽成 修康 (HANARI, Nobuyasu)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号: 10392648