

淀川流域における残留移動性有機化合物 ジフェニルグアニジン（DPG）の存在実態 ー環境水中 DPG 分析法の確立と濃度分布の把握

大阪市立環境科学研究センター 市原 真紀子

1. はじめに

近年、欧州では「残留移動性有機化合物（Persistent and Mobile Organic Compounds: PMOCs）が注目されている(Reemtsma et al., 2016)。PMOCs とは、残留性（Persistent）と同時に親水性（=水中での移動性, Mobile）を持つ化学物質の総称である。これまで問題とされてきた残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants: POPs）の多くは、残留性と同時に疎水性を持ち、水溶性が乏しいため水処理においては容易に除去されていた。しかし、今回問題提起された PMOCs は残留性と親水性を持つため、一旦水環境中に流入するとその高い水溶性のため上下水処理において除去されにくく、最終的に水道水源水質の脅威に成り得る。欧州委員会は PMOCs を新たな問題(emerging issue)と位置付け、ヒトの健康や環境に悪影響を及ぼすと警鐘を鳴らした(SCHEER, 2018)。一方、淀川は近畿 1700 万人の水道水源であるが、取水地点上流間近に大規模な都市があるなど、東京や名古屋などの他の大都市と比較して人間活動の影響を受けやすい。また、淀川は中流域で下水処理水が流入後、下流で水道原水として取水する繰り返しが利用が行われており、水道水源の潜在的な汚染リスクが他の主要河川よりも高いと言われている。このように脆弱な構造を抱えた淀川であるが、水源の脅威と恐れられる PMOCs について国内の調査事例は皆無であり、淀川流域についてもその実態は不明である。

Arp らは、欧州の REACH 規制に登録された高生産量物質の中から約 2000 の PMOCs (Arp らが定義した PMOC スコアが 4-5) をリストアップしている(Arp et al., 2017)。Schulze らはこれを元に、環境への排出量の観点から 936 の PMOCs を優先順位化し、ランク付けを行った(Schulze et al., 2018)。Schulze らは、さらにその中から 64 の PMOCs を選定して環境水中におけるスクリーニング調査を行い、今後調査すべき PMOCs を優先順位付けしている(Schulze et al., 2019)。本研究では、その中でも高頻度検出とされ優先度が高く、国内の調査事例がない 1,3-ジフェニルグアニジン（DPG, 図 1）に着目した。DPG はタイヤ等のゴム製品に用いられる加硫促進剤であり、2018 年度における製造輸入量は 1000-2000 トンである(化審法データベース)。難分解性を示し、水生生物に対して急性毒性が認められている(環境省, 2019)。しかし、Schulze らの研究は一斉分析による調査結果であり、著者が自らの調査結果を「半定量推定値である」と評している(Schulze et al., 2019)ように環境水中の DPG 濃度は精確に測定できていない。また、DPG の精確な測定法は未確立である。

そこで、本研究では液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて環境水中の DPG 分析法を検討し、確立した。また、DPG 以外にも PMOCs と定義されるグアニジン類化合物が存在するため、DPG を含めた 7 種のグアニジン類化合物に適用可能な分析法を開発することとした。なお、本報の表題は「環境水中 DPG 分析法の

確立と濃度分布の把握」であるが、分析法確立に時間を要したため、本報では DPG 分析法とその検討内容について報告する。

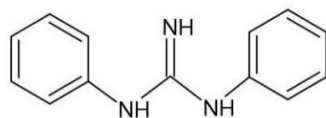


図1 1,3-ジフェニルグアニジンの構造式

2. 実験方法

2.1 分析対象物質

対象物質は、Arp ら(Arp et al., 2017)による PMOC スコアを参考に DPG を含む 7 種のグアニジン類化合物とした (略号、表 1)。このうち、TPG を除く 6 種が PMOCs と定義されている(Arp et al., 2017)。TPG は PMOCs ではないが、DPG と同様の用途である加硫促進剤として用いられるグアニジン類化合物であるため、分析対象に追加した。

表1 分析対象物質

化合物名	略号	化学式	CAS 番号
1,3-diphenylguanidine	DPG	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	102-06-7
1,3-di- <i>o</i> -tolylguanidine	DTG	C ₁₅ H ₁₇ N ₃	97-39-2
1,2,3-triphenylguanidine	TPG	C ₁₉ H ₁₇ N ₃	101-01-9
1-(<i>o</i> -tolyl)biguanide	TBG	C ₉ H ₁₃ N ₅	93-69-6
cyanoguanidine	CG	C ₂ H ₄ N ₄	461-58-5
1-(4-cyanophenyl)guanidine	CPG	C ₈ H ₈ N ₄	5637-42-3
<i>N,N'</i> -1,6-hexanediylbis(<i>N'</i> -cyanoguanidine)	HCG	C ₁₀ H ₁₈ N ₈	15894-70-9

2.2 本研究で確立した環境水中グアニジン類分析方法

まず、本研究で確立した環境水中のグアニジン類分析法を示し、次に前処理方法の各検討内容について述べる。

水試料 100 mL にサロゲート (DPG-*d*₁₀ 5 ng, CG-¹⁵N₄ 50 ng) を添加し、2 種類の固相 (Oasis WCX Plus, Sep-Pak AC2 Plus, いずれも Waters 製) を WCX が上流側となるように直列し、約 10 mL/min の流速で通水した。固相は、あらかじめ WCX は濃アンモニア：メタノール (5 : 95) 5 mL および超純水 5 mL、AC2 はアセトニトリル 10 mL および超純水 10 mL でコンディショニングしたものを使用した。通水後、固相は超純水 10 mL で洗浄した。溶出は、WCX は 2%ギ酸メタノール 5 mL、AC2 はアセトニトリル：超純水 (9 : 1) 10 mL で行い、AC2 は約 1 mL/min の流速で溶出した。WCX と AC2 の溶出液は合わせず、それぞれ濃縮操作を行い、窒素気流下で乾固した。これをアセトニトリル：超純水 (95 : 5) 0.5 mL に再溶解し、超音波を 5 分間照射後シリンジフィルター (DISMIC-13HP, ADVANTEC 製) でろ過し、試験液とした。これを LC-MS/MS (Xevo TQ, Waters 製) により測定し、WCX 画分は CG を除く 6 種のグアニジン類化合物、AC2 画分は CG について定量した。分析フローを図 2 に、LC-MS/MS 測定条件を表 2 に示す。

2.3 ギアニジン類分析方法の検討

2.3.1 LC カラムの検討

LC カラムは、PMOCs 先行研究(Köke et al., 2018, Schulze et al., 2019, Zahn et al., 2019, Müller et al., 2020)を参考に親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) 系 3 種 (Inertsil HILIC, GL Sciences 製、Nucleodur HILIC, MachereyNagel 製、BEH Amide, Waters 製)、ミックスモード系 1 種 (Trinity P1, Thermo Fisher Scientific 製)、逆相系 1 種 (HSS T3, Waters 製) の計 5 種について検討した。各 LC カラムについて先行研究を参考に LC 条件を設定し、SN 比 10 程度の混合標準液の連続 8 回分析結果から各化合物の装置検出下限値

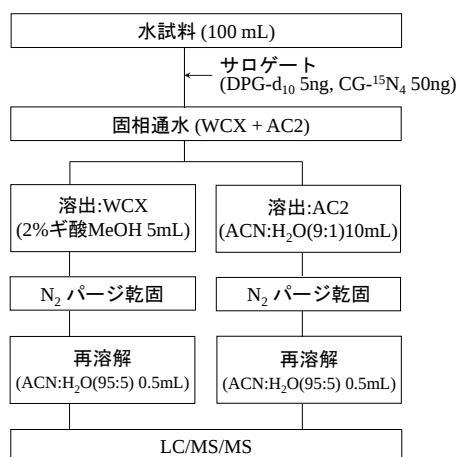


図 2 ギアニジン類分析フロー

表 2 LC-MS/MS 測定条件

分析装置	Waters ACQUITY UPLC/ Waters Xevo TQ			
分析カラム	MachereyNagel Nucleodur HILIC (2 mm×150 mm, 3 μm)			
移動相	A: アセトニトリル: 超純水 (5 : 95) 5 mMギ酸アンモニウム, pH3 B: アセトニトリル: 超純水 (95 : 5) 5 mMギ酸アンモニウム, pH3			
グラジエント	0–4 min; B=100 4–8 min; B; 100→60 リニアグラジエント 8–12 min; B = 60 12.1–30 min; B=100			
流速	0.2 mL/min (12.1–25 min; 0.4 mL/min)			
注入量	2 μL			
イオン化法	ESI-ポジティブ			
キャピラリー電圧	0.5 kV			
コーンガス流量	50 L/hr			
デゾルベーション温度	600 °C			
デゾルベーションガス流量	1000 L/hr			
モニターイオン (サロゲート)	DPG	212.1 > 119.1	212.1 > 94.0	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	DTG	240.2 > 133.0	240.2 > 108.0	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	TPG	288.2 > 92.1	288.2 > 195.1	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	TBG	192.2 > 60.0	192.2 > 133.0	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	CG	85.0 > 68.0	85.0 > 43.0	(CG- ¹⁵ N ₄)
	CPG	161.1 > 102.0	161.1 > 144.1	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	HCG	251.2 > 209.3	251.2 > 164.6	(DPG- <i>d</i> ₁₀)
	DPG- <i>d</i> ₁₀	222.2 > 124.1	222.2 > 99.1	
	CG- ¹⁵ N ₄	89.0 > 71.0	89.0 > 45.1	

(Instrument Detection Limit : IDL) を求めた。IDL の算出方法は、環境省の化学物質環境実態調査実施の手引き(環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, 2016)に記載された方法に従った。

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

$t(n-1, 0.05)$: 危険率 5%、自由度 $n-1$ の t 値 (片側), $n = 8$ の場合は 1.8946

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

v : 試料注入量 (mL)

2.3.2 固相の検討

前処理に用いる固相は、PMOCs 先行研究(Qiu et al., 2015, Schulze et al., 2019)を参考にミックスモード系 3 種 (Oasis WCX Plus, Oasis MCX Plus, Oasis WAX Plus, いずれも Waters 製)、逆相系 2 種 (Oasis HLB Plus, Sep-Pak PS2 Plus, いずれも Waters 製)、活性炭 2 種 (Supelclean ENVI-Carb, Supelco 製、Sep-Pak AC2 Plus, Waters 製) の計 7 種について検討を行った。超純水 10 mL に混合標準物質 25 ng (CG は 250 ng) を添加し、添加回収実験を実施した。

2.3.3 ブランクの検討

固相と超純水についてブランク試験を行った。超純水は、実験室超純水 (Purelab Flex-3, オルガノ製)、A 社超純水 (超高純度試薬)、B 社超純水 (超微量分析用) の 3 種とした。各超純水 100 mL にサロゲートを添加し、ブランク試験を実施した。固相ブランクは試料を通水せず、洗浄水 (実験室超純水) 10 mL のみ通水して溶出操作を行い、溶出液にサロゲートを添加して分析を行った。

2.3.4 精製処理の検討

10–70%含水メタノールを用いた精製処理について検討した。超純水 10 mL に混合標準物質 250 ng (CG は 500 ng) を添加し通水後、固相を 10–70%含水メタノール 20 mL で洗浄後に溶出操作を行い、各標準物質の回収率について検討した。

2.3.5 河川水を用いた添加回収試験

確立した分析法を用いて添加回収試験を実施した。標準物質の添加量は 0.5 ng (ただし CPG および HCG は 1 ng, CG は 10 ng) とした。この際の最終濃度は、無添加試料結果から 5 ng/L 増加 (ただし CPG および HCG は 10 ng/L, CG は 100 ng/L 増加) となる。なお、CG は無添加試料から 150 ng/L 検出されたため、他の化合物より設定濃度の高い 100 ng/L 増加とした。無添加試料 3 検体、標準液添加試料 7 検体について分析を行い、回収率および変動係数を求めた。

3. 結果および考察

3.1 各 LC カラムの IDL 値

各 LC カラムについて IDL 算出結果を表 3 に示す。逆相系カラムである HSS T3 は、他の LC カラムと比べていずれの化合物も IDL 値が高いか同程度の値であった。特に、今回ターゲットとした DPG の IDL 値は他の LC カラムと比べ 2–3 桁高い結果であったため、検討から除外した。また、化合物別に IDL 値を検討したところ、いずれの LC

表3 各LCカラムにおけるグアニジン類化合物のIDL

	(ng)				
	HILIC			MMLC	ODS
	Inertsil	Nucleodur	BEH Amide	Trinity P1	HSS T3
DPG	0.00015	0.00010	0.000051	0.000064	0.010
DTG	0.000062	0.000013	0.00014	0.000060	0.0082
TPG	0.00041	0.000020	0.00035	0.000098	0.013
TBG	0.0051	0.000061	0.00052	0.00020	0.0032
CG	0.091	0.069	0.062	0.28	0.037
CPG	0.00037	0.00030	0.00013	0.00079	0.0057
HCG	0.0038	0.00095	0.0011	0.032	0.0011

MMLC：ミックスモード系

ODS：逆相系

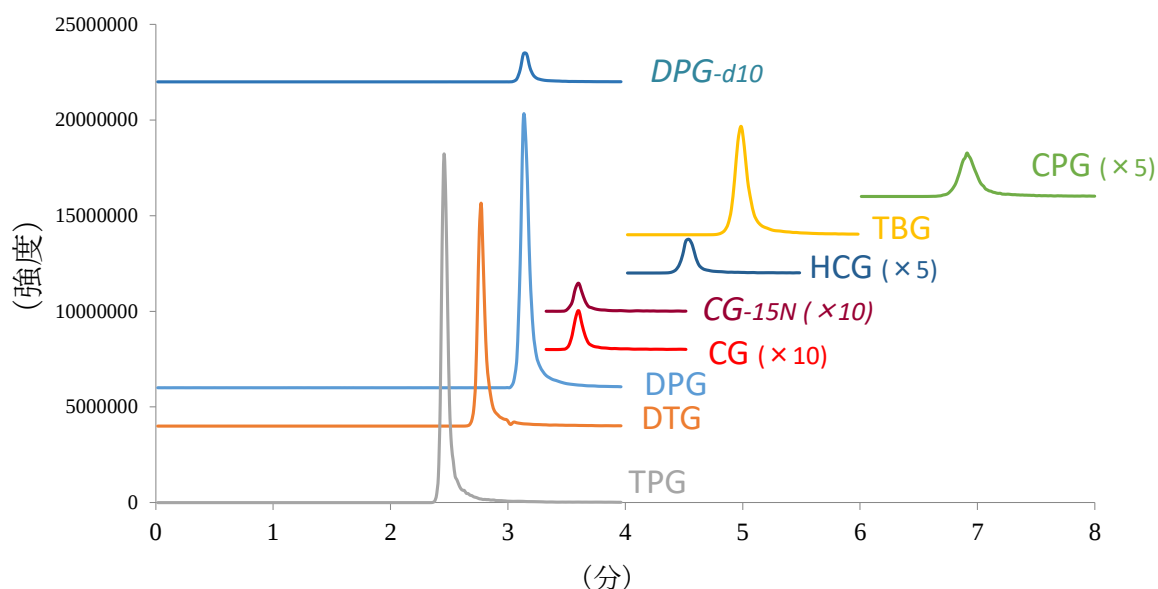


図3 グアニジン類のクロマトグラム 標準液 100 ng/mL (CG, 200 ng/mL)

カラムにおいてもCGのIDL値が高い結果であった。その中でも他のLCカラムと比べてCGのIDL値が1桁高い結果であった、ミックスモード系カラムであるTrinity P1は検討から除外することとした。これより、分析にはHILIC系カラムを用いることとした。

HILIC系カラムは3種について検討したが、それらのIDL値はほぼ同程度であった。そこで、その中でも比較的各化合物の保持が強かったNucleodur HILICカラムを用いることとした。Nucleodur HILICカラムで分析したグアニジン類のクロマトグラムを図3に示す。各化合物とも良好な分離が得られた。

3.2 各固相のグアニジン類標準液回収率

固相7種について検討したところ、CGを除く6種のグアニジン類化合物はWCXに

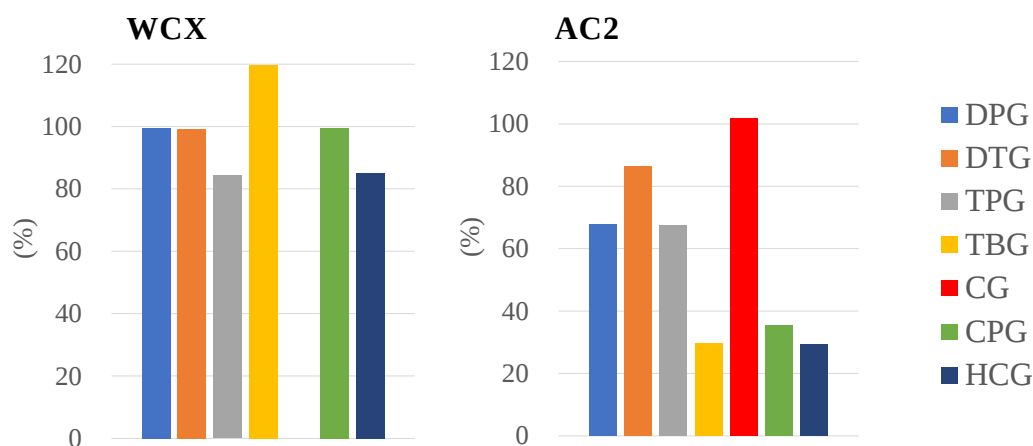


図4 各固相のグアニジン類標準液回収率

において保持が見られた。逆相-弱陽イオン交換固相である WCX の回収率を図 4 左に示す。WCX は、CG の回収率は 0%であったが、CG を除く 6 種の回収率は 84–120%と良好な結果であった。今回調査対象としたグアニジン類化合物の pK_a (Arp et al., 2017, *ChemicalBook* ホームページ)は、回収率が良好であった 6 種が 9.10–11.87 (ただし HCG は amphoprotic とされデータなし)であるのに対し、CG は 2.42 である。WCX は $pK_a > 10$ の強塩基性化合物の保持に使用される固相(Waters)であり、CG を除くグアニジン類化合物の保持に適していた。また、WCX 通過画分および通水後の洗浄画分からは CG が約 80%検出され、CG は WCX に保持されないことが分かった。

CG は、AC2 を用いて溶出液にアセトニトリル：超純水 (9:1) を用いた場合、回収率が 102%と良好であった (図 4 右)。そこで、固相は WCX と AC2 をタンデムで用いることとした。

3.3 ブランクからのグアニジン類の検出

ブランク試験の結果を図 5 に示す。ブランクからは HCG と CG が検出された。このうち、HCG は固相ブランク、各超純水とも同程度 (約 1,000 程度) の面積が検出されており、超純水では約 10 ng/L のブランク値を示した。

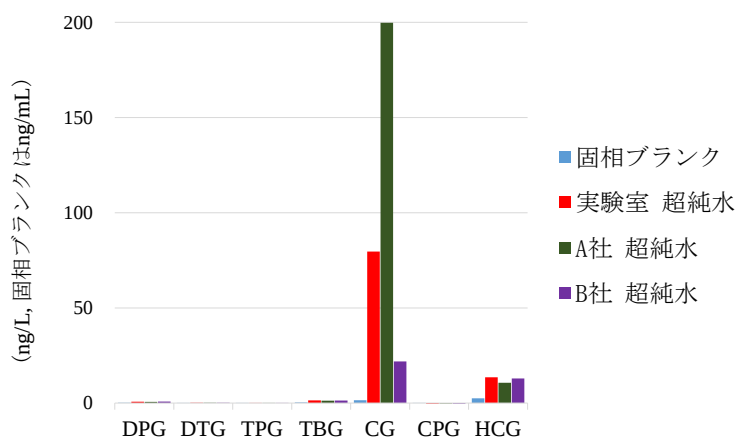


図5 固相、各超純水のブランク試験結果

一方、CG は各超純水から固相ブランクを上回る濃度が検出され、その濃度は最大 200 ng/L であった。このため、前処理には実験室超純水と比べて低値を示した B 社超純水を用いることとした。なお、LC-MS/MS 分析の移動相調製時は実験室超純水を使用した。溶媒ブランクから CG の検出は見られず、使用に際して問題は見られなかった。

3.4 含水メタノール精製処理によるグアニジン類標準液回収率の低下

標準液通水後の固相を 10–70%メタノールで洗浄した際の回収率を図 6 に示す。図 6 は CG および HCG の結果を示しているが、その他の 5 種については 10–70%メタノール洗浄により回収率の低下が見られなかったため、結果の記載を省略した。

比較対象として、超純水で洗浄した際の結果を各グラフの左端に示した。超純水で洗浄した結果と比較して、CG は 10%メタノールによる洗浄から回収率の低下が認められた。CG はメタノール比率が 40%までは急激な回収率の低下が見られ、その後 70%までは緩やかな低下が見られた（図 6 左）。HCG は 20%メタノールによる洗浄から回収率の低下が見られ、CG と同様にメタノール比率が 40%までは急激な回収率の低下が見られた（図 6 右）。HCG は、40–70%メタノール洗浄では回収率は同程度であった。これらの結果より、精製処理操作は実施しないこととした。

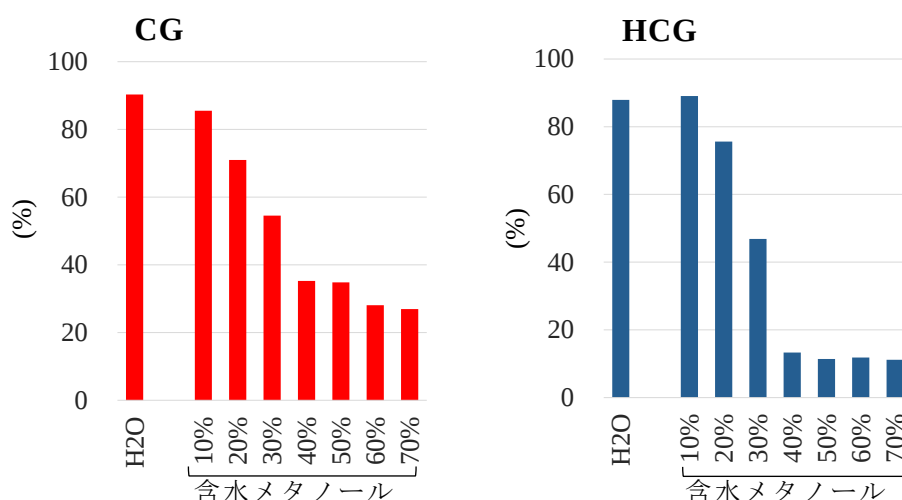


図 6 含水メタノール洗浄によるグアニジン類標準液回収率の低下

3.5 河川水を用いた添加回収試験結果

河川水への添加回収試験結果を図 7 に示す。河川水へのグアニジン類添加濃度と、添加試料から無添加試料を差し引いた濃度とを比較して回収率を求めた。その結果、TBG を除く 6 種は回収率 78–108%、CV 2.0–6.5% ($n = 7$) と良好な結果を示した。今回ターゲットとした DPG については、回収率 94%、CV 2.0%と極めて良好な結果であった。なお、TBG は再分析が必要であったが、分析条件を再検討した結果、LC-MS/MS の最終液にギ酸アンモニウムを添加することにより TBG の感度安定化および感度向上が見られることが分かった。そのため、今後最終液の組成を 5mM ギ酸アンモニウム アセトニトリル：超純水（95:5）に変更して再度添加回収試験を行う予定である。

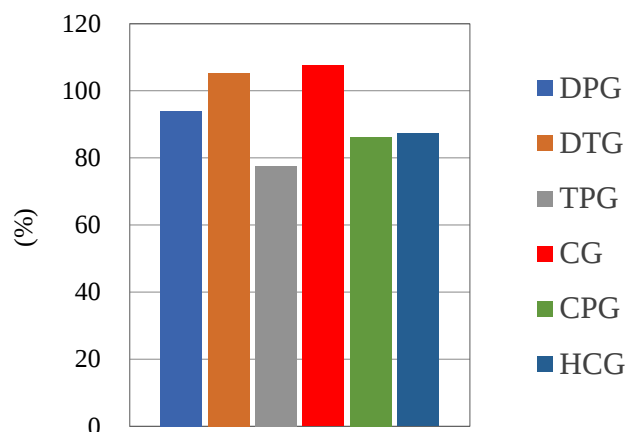


図7 河川水への添加回収試験結果（TBGを除く6種の回収率）

4. まとめ

DPGを含むグアニジン類化合物7種について、環境水中の分析法を確立した。

1. LCカラムはHILIC系3種、ミックスモード系1種、逆相系1種の計5種について検討した。その結果、IDL値が低値であり、かつ比較的保持力の強かったNucleodur HILICカラムを用いることとした。
2. 前処理に用いる固相は、ミックスモード系3種、逆相系2種、活性炭2種の計7種について添加回収試験を実施した。CGを除く6種のグアニジン類化合物はWCXを用いて84–120%の回収率が得られた。CGはAC2を用いて102%の回収率が得られた。よって、固相はWCXとAC2をタンデムで用いることとした。
3. 固相と各超純水のブランクについて検討したところ、ブランクからHCGとCGが検出された。HCGの超純水ブランクは固相由来であったのに対し、CGは超純水から固相ブランクを超える濃度が検出され、その最大濃度は200 ng/Lであった。CGを測定する際には、使用する超純水からのCG検出に注意を要することが分かった。
4. 含水メタノールを用いた精製処理について検討した。CG, HCGを除く5種については10–70%メタノール洗浄においても回収率の低下は見られなかった。それに対し、CGは10%メタノール洗浄、HCGは20%メタノール洗浄から回収率の低下が見られ、メタノール比率が上がるにつれて更なる回収率の低下が見られた。そのため、精製操作は行わないこととした。
5. 河川水を用いて添加回収試験を実施した。TBGを除く6種は回収率78–108%、CV 2.0–6.5% ($n=7$)と良好な結果を示した。TBGは、LC-MS/MSの最終液にギ酸アンモニウムを添加することにより感度の安定化および感度向上が見られることが分かった。

今後の検討課題として、淀川水系におけるグアニジン類濃度分布や挙動の解明が挙げられる。近畿の水道水源である淀川について、PMOCsであるグアニジン類化合物の濃度レベルを把握することにより、そのリスク評価を実施していきたい。

5. 謝辞

本研究は、令和2年度（公財）琵琶湖・淀川水質保全機構「水質保全研究助成」および JSPS 科研費 JP20K12214 の助成を受けて実施しました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- Arp, H. P. H., Brown, T. N., Berger, U., & Hale, S. E. (2017). Ranking REACH registered neutral, ionizable and ionic organic chemicals based on their aquatic persistency and mobility. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 19(7), 939–955.
<https://doi.org/10.1039/c7em00158d>
- ChemicalBook ホームページ 1,2,3-トリフェニルグアニジン.
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_JP_CB8344896.htm
 (2021.03.17アクセス)
- Köke, N., Zahn, D., Knepper, T. P., & Frömel, T. (2018). Multi-layer solid-phase extraction and evaporation—enrichment methods for polar organic chemicals from aqueous matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(9), 2403–2411.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0921-1>
- Müller, K., Zahn, D., Frömel, T., & Knepper, T. P. (2020). Matrix effects in the analysis of polar organic water contaminants with HILIC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(20), 4867–4879. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02548-1>
- Qiu, H., Sun, D., & Mlsna, T. (2015). Detection dicyandiamide in environmental water by liquid chromatography-mass spectrometry combined with solid phase extraction method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38(4), 501–505.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2014.913529>
- Reemtsma, T., Berger, U., Arp, H. P. H., Gallard, H., Knepper, T. P., Neumann, M., Quintana, J. B., & Voogt, P. De. (2016). Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds - Water Contaminants That Slip Through. *Environmental Science and Technology*, 50(19), 10308–10315. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03338>
- SCHEER. (2018). *Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks SCHEER Statement on emerging health and environmental issues (2018)* (Issue December).
- Schulze, S., Sättler, D., Neumann, M., Arp, H. P. H., Reemtsma, T., & Berger, U. (2018). Using REACH registration data to rank the environmental emission potential of persistent and mobile organic chemicals. *Science of the Total Environment*, 625, 1122–1128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.305>
- Schulze, S., Zahn, D., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Knepper, T. P., Reemtsma, T., & Berger, U. (2019). Occurrence of emerging persistent and mobile organic contaminants in European water samples. *Water Research*, 153, 80–90.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.008>
- Waters. OASIS リファレンスカード.
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005685ja.pdf> (2021.03.17 アクセス)
- Zahn, D., Mucha, P., Zilles, V., Touffet, A., Gallard, H., Knepper, T. P., & Frömel, T. (2019).

Identification of potentially mobile and persistent transformation products of REACH-registered chemicals and their occurrence in surface waters. *Water Research*, 150, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.042>

化審法データベース 1,3-ジフェニルグアニジン.

https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=102-06-7&mno=3-0480&request_locale=ja (2021.03.17アクセス)

環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課. (2016). 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成27年度版) .

<https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/tebiki/mat01.pdf> (2021.03.17アクセス)

環境省. (2019). 生態影響試験 (藻類、甲殻類、魚類) 結果一覧(平成31年3月版) .

[https://www.env.go.jp/chemi/y052-\[24\]/mat2_3103.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/y052-[24]/mat2_3103.pdf) (2021.03.17アクセス)