

<報 文>

環境水中のノニルフェノール測定における 試料前処理方法の簡略化*

市川 智宏**・吉田 恭司**・丹羽 智子**

キーワード ①ノニルフェノール ②クリーンアップ ③GC/MS ④公共用水域

要 旨

公共用水域における水生生物の保全に係る環境基準項目に新たに追加されたノニルフェノールの測定に関して、試料前処理方法の簡略化を検討した。試料のクリーンアップに市販のシリカゲルカートリッジを用いることで、公定法に示される従来のシリカゲルカラムによる方法と同等な結果が得られ、なおかつ溶媒使用量を約1/10に、前処理の作業時間を約1/8に削減することができた。

1. はじめに

ノニルフェノール(分子式 $C_{15}H_{24}O$, 分子量 220.35(以下, NP と示す。))は, アルキルフェノール類に分類される有機化合物であり, 主に工業用の非イオン界面活性剤の原材料やゴムおよびプラスチックの酸化防止剤などに用いられている。NP については従来から魚類に対する内分泌かく乱化学物質として各種調査が行われてきた¹⁾が, 2012年8月に環境基本法に基づく「水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準」のうち, 水生生物の保全に係る環境基準項目に追加された。そのため, 各都道府県では公共用水域水質調査の測定項目として常時監視を行っており, また, 全国の地方環境研究所等でも NP の測定方法について種々の検討や調査が行われている^{2)~11)}。

NP の測定方法は昭和46年12月28日付け環境庁告示第59号付表11(以下, 付表11と示す。)に規定されている。この方法は, JIS K 0450-60-10:2007¹²⁾や ISO24293:2009¹³⁾に準拠しており, NP の13種の異性体を個別に分離定量してその合計値

を NP の濃度として評価する方法である。この方法は前処理操作が煩雑であり, 分析に時間を要するのが難点である。

また, NP 測定には溶媒としてジクロロメタンおよびヘキサンを使用するが, ジクロロメタンは, 有害大気汚染物質の中でも優先取組物質として大気中濃度の環境基準が定められた物質である¹⁴⁾。さらに, 多量の有機溶媒を使用していた印刷企業従業員が胆管がんを多く発症したことに端を発し¹⁵⁾, 2014年11月に労働安全衛生法施行令が改正され, 業務上の取扱いについてもきびしい義務が課せられている¹⁶⁾。ノルマルヘキサンについても有機溶剤中毒予防規則の対象物質に指定されており, これらの有機溶媒の使用は必要最低限に留めることが望ましい。

本報では, NP の測定方法について, 市販のシリカゲルカートリッジを用いた試料のクリーンアップの簡略化により, 使用する有機溶媒の減量および前処理に要する作業時間の短縮を検討した結果を報告する。

*Simplification of the Pretreatment Method for Determination of Nonylphenol in Environmental Water

**Tomohiro ICHIKAWA, Kyoji YOSHIDA, Tomoko NIWA (愛知県環境調査センター) Aichi Environmental Research Center

2. 実験方法

2.1 試薬、器具および装置

NP 標準物質は4-ノニルフェノール(関東化学)、サロゲート物質は4-(3,6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール-¹³C₆(和光純薬工業)、内標準物質は4-n-ノニルフェノール-d₄(和光純薬工業)をそれぞれ用いた。アセトン、ヘキサンおよびジクロロメタンは残留農薬・PCB 試験用(和光純薬工業)、メタノールは LC/MS 用(和光純薬工業)、硫酸ナトリウム(無水)は PCB・フタル酸エステル試験用(和光純薬工業)を用いた。

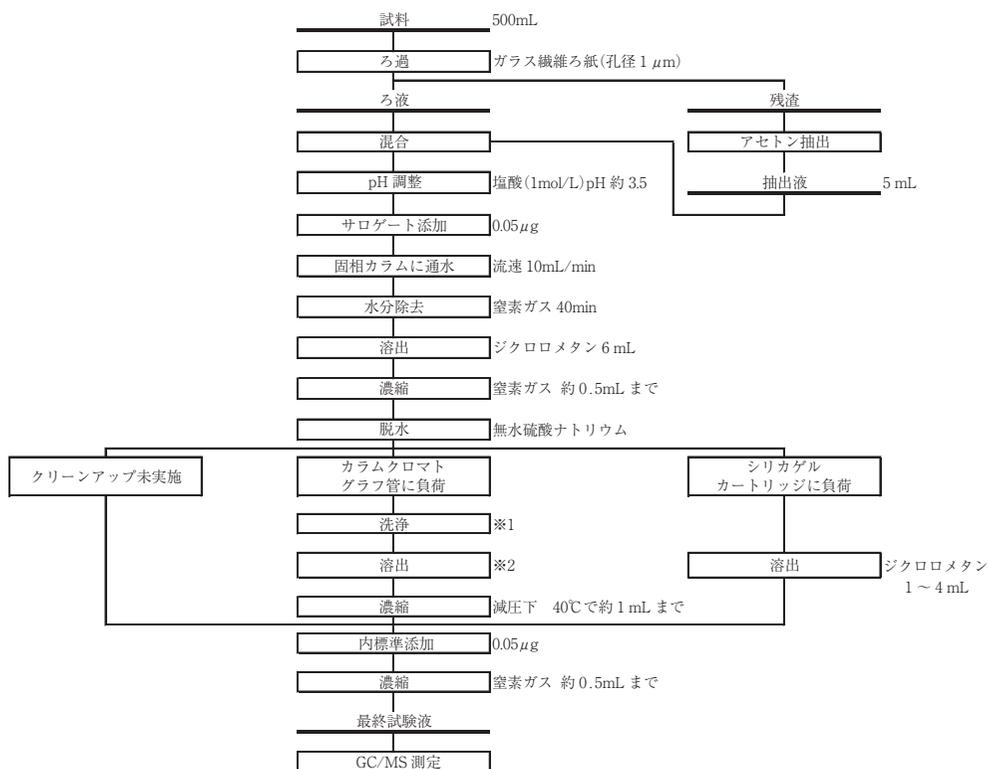
また、固相カラムはスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填した SepPak Plus PS-2 Short Cartridge(Waters)を用い、試料の固相への加圧送液や抽出および窒素吹きつけによる濃縮は、全自動固相抽出装置 AQUATRACE ASPE799(ジーエルサイエンス)を用いた。

試料のクリーンアップ用シリカゲルはカラムクロマトグラフ用シリカゲル(high-purity grade, 粒径150~250 μ m, シグマアルドリッチ)と、シリカゲルカートリッジ(InertSep SI(500mg/6mL, ジーエルサイエンス))を用いた。カラムクロマトグラフ用シリカゲルは、あらかじめ400 $^{\circ}$ Cで4時間焼成、130 $^{\circ}$ Cで15時間乾燥させた後、5%含水させて使用した。

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)は NP 標準物質の異性体組成比を求めるための FID 検出器も備えた7890GC/5977MSD(アジレント・テクノロジー)を用いた。

2.2 実験操作

NP の分析方法を図1に示す。付表11では固相カラムからアセトン4 mLで溶出し、ジクロロメタンに転溶しているが、われわれはジクロロメタン6 mLで溶出し、転溶操作を省略した。この方法でもとくに問題がないことは標準物質による添



※1 ジクロロメタン-ヘキサン混液(3+7)50mLを流下(1mL/分)

※2 ジクロロメタン-ヘキサン溶離液(3+2)75mLを流下(1mL/分)

図1 NPの分析方法フローチャート

加回収試験で確認しており、藤川らも同様の検討を行い、NPのピーク形状やピーク面積にはほとんど差がなく、妨害ピークはアセトン抽出の方が多かったと述べている⁹⁾。

固相抽出後の濃縮液のクリーンアップは、カラムクロマトグラフ管(内径10mm, 長さ300mm)のクロマトグラフ管にヘキサンでかゆ状にしたシリカゲルを8g充填し、上部に硫酸ナトリウム(無水)2cmを積層したものまたはシリカゲルカートリッジを用い、カラムクロマトグラフ管はヘキサン25mLで、シリカゲルカートリッジはジクロロメタン15mLであらかじめコンディショニング

したものを使用した。

GC/MSの分析条件および各対象物質の定量イオン、確認イオンは表1および表2のとおりであり、装置定量下限値は各異性体0.001~0.002 mg/L (NP12のみ0.005mg/L), NP合計として0.02mg/Lであった。

3. 結果と考察

3.1 シリカゲルカートリッジを用いた溶出量の検討

シリカゲルカートリッジに試料を負荷した後、溶出させるときに必要なジクロロメタン量を事前に把握しておく必要がある。シリカゲルカートリッジにNP0.2 μ gおよびサロゲート0.05 μ gを含むジクロロメタン溶液0.5mLを負荷し、その後上部からジクロロメタンを通液して、NPの溶出量を調べた。通液したジクロロメタン量に対するNP各異性体と内標準との面積比を図2に示す。

ジクロロメタン量が3mL以上であれば、NP各異性体の面積比が安定した。また、その時のサロゲート回収率はおおむね100%であった。そのため、溶出時に使用するジクロロメタン量は3mLとした。

表1 GC/MS分析条件

GC/MS(Agilent 7890GC/5977MSD)	
カラム	HP-5MS Ultra Inert (Agilent J&W) 30m×0.25mm×0.25 μ m
カラム温度	50°C (1min) -8°C/min -300°C (2min)
キャリアガス	He 圧力一定モード 22 psi
注入口	スプリットレス 250°C
注入力	2 μ L
トランスファーライン温度	280°C
測定モード	EI SIM
イオン源温度	280°C
イオン化電圧	70eV

表2 各物質の定量イオンと確認イオン

略称	物質名	定量イオン (確認イオン)
NP1	4-(2,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	121(163)
NP2	4-(2,4-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(220)
NP3	4-(3,6-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	135(107)
NP4	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(191)
NP5	4-(2,5-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(163)
NP6	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(191)
NP7	4-(3-エチル-2-メチルヘキサ-2-イル)フェノール	135(220)
NP8	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163(121)
NP9	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(107)
NP10	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163(121)
NP11	4-(2,3-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(220)
NP12	4-(3-メチルオクタン-3-イル)フェノール	191(163)
NP13	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(107)
サロゲート	4-(3,6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール- ¹³ C ₆	155(113)
内標準	4-n-ノニルフェノール-d ₄	111(224)

※ NP4とNP6, NP8とNP10, NP9とNP13はそれぞれ立体異性体

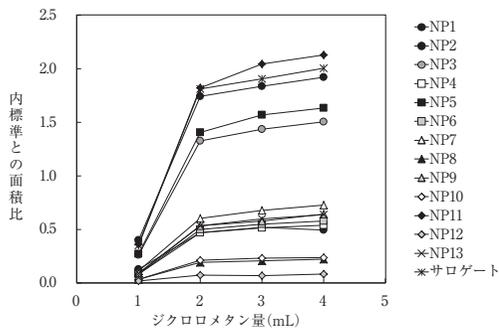


図2 ジクロロメタン量に対するNP各異性体と内標準の面積比

3.2 クリーンアップ効果

クリーンアップ効果を比較するため、ノニルフェノールが検出された河川水を試料として、固相抽出後に(a)クリーンアップ未実施、(b)カラムクロマトグラフ管によるクリーンアップ、(c)シリカゲルカートリッジによるクリーンアップの3種類の操作をそれぞれ実施した。

クリーンアップ方法別のGC/MSクロマトグラム(図3)を比較すると、 m/z 135, 220, 155等でクロマトグラムの形状に違いが見られた。(b)および(c)は(a)と比較して、夾雑物由来のピーク強度が相対的に小さくなっており、クリーンアップの効果が出ているのがわかる。しかし、(c)は(b)と比較してサロゲートの定量イオン(m/z 155)のピーク近郊の夾雑ピークが十分除去できておらず、定量に支障が出ることがわかった。サロゲートの確認イオン(m/z 113)では、面積値も定量イオンと同程度であり、なおかつ夾雑物の影響がほとんど見られなかったことから、以降(a)および(c)のクリーンアップ方法では、定量イオンを m/z 113、確認イオンを m/z 155として解析を行った。

NPの各異性体およびサロゲートのピーク面積は、どの m/z のピークも(b)と比較して(c)が1.8倍、(a)が4倍程度大きくなったが、内標準のピーク面積については、(b)と比較して(c)が約1.8倍、(a)が5.5倍程度あり、(a)の内標準のピーク面積の増加率のみが他と異なる傾向を示した。これらの面積の増加は河川水中に存在する物質によるマトリックスの影響¹⁷⁾を受けているためと考えられる。(a)については内標準のピーク面積の増加率

がNPとサロゲートの面積増加率よりも約1.4倍大きいことから、内標準のみがより強くマトリックスの影響を受けていると考えられる。

内標準のピーク面積はサロゲート回収率(試料中のサロゲート物質と内標準物質のピーク面積比と検量線標準液中のサロゲート物質と内標準物質のピーク面積比の平均値の百分率)に影響する。(a)は他のクリーンアップ方法と比較して操作が少なく、回収率が高いと考えられるにも関わらず、このマトリックスの影響により、見かけ上サロゲートの回収率が低下している可能性が高い。

次に、5つの河川水試料(A~E)について、それぞれのクリーンアップ方法を適用した結果を表3に示す。(a)はサロゲート回収率が低く、河川Bでは(b)とのNPの濃度差が大きくなった。一方、(c)は(b)の分析値とほぼ一致し、サロゲート回収率もおおむね良好な結果が得られ、市販のシリカゲルカートリッジを用いたクリーンアップでもカラムクロマトグラフ管によるクリーンアップと同等の効果を得られた。

3.3 クリーンアップの作業時間および溶媒使用量

1検体当たり要するクリーンアップの標準的な作業時間と溶媒使用量を表4に示す。

(b)のクリーンアップは、カラムの充填から最終試験液の調製までに165分の時間を要するが、(c)のクリーンアップは、市販のシリカゲルカートリッジを用いることで20分で操作を終了することができた。(b)に関しては事前にシリカゲルを調製し、汚染されないように保管しておかなければならないが、(c)の場合はカートリッジを開封してそのまま使用できるため、クリーンアップ操作以外でも作業時間を短縮できる。

また試料1検体当たりの溶媒使用量は、(b)がヘキサン110mL、ジクロロメタン63mLであるのに対し、(c)はジクロロメタン18mLのみであり、どちらの溶媒も大幅に削減できた。(a)はクリーンアップを実施しないため、当然作業時間も溶媒使用量も最低限で済むが、先に述べたように、夾雑成分がGC/MS分析に影響を与える場合がある。

なお最近、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて河川水中のNPを高感度で、しかもクリーンアップ操作なしで分析できる

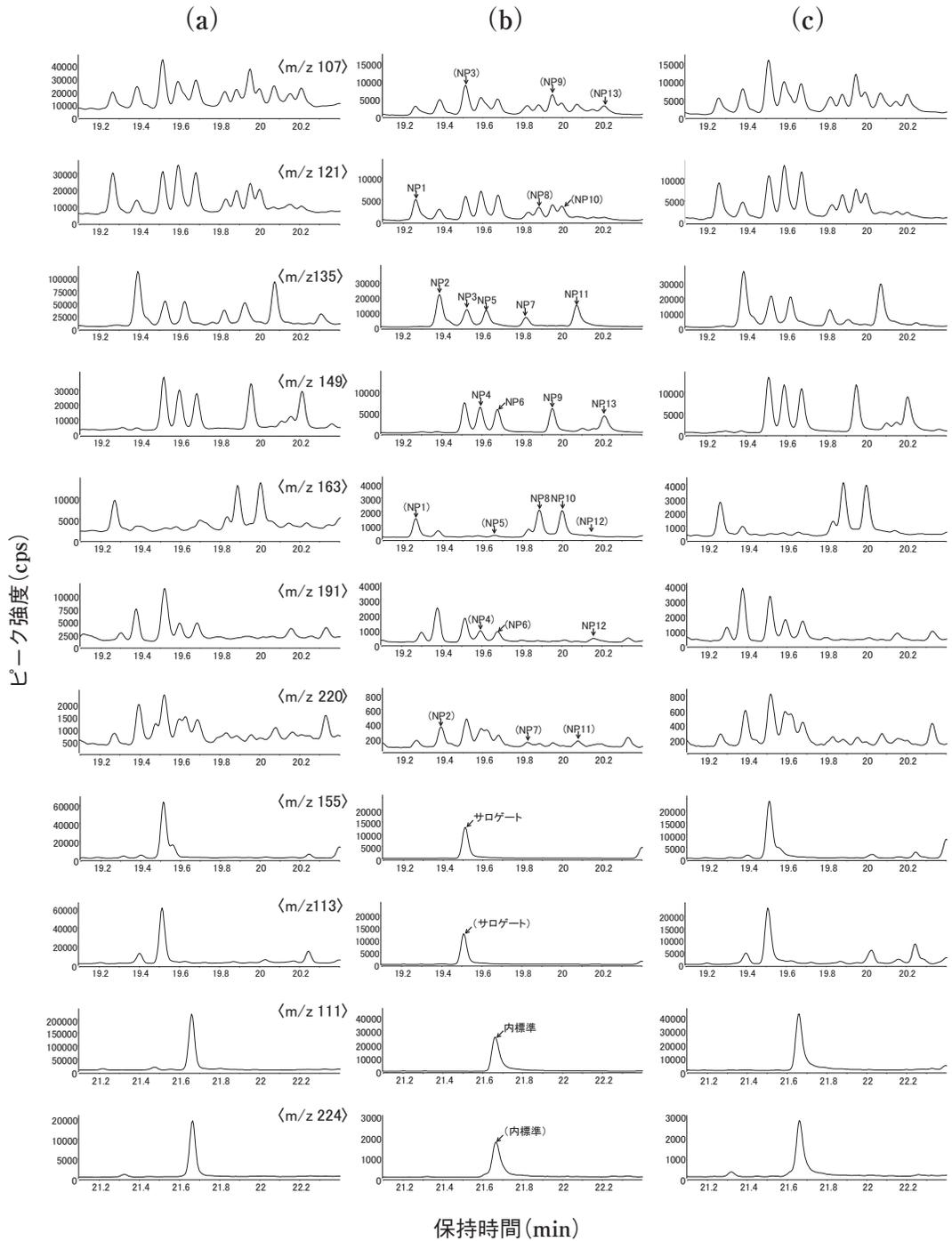


図3 クリーンアップ方法別 GC/MS クロマトグラム

(a) クリーンアップ未実施, (b) カラムクロマトグラフ管クリーンアップ, (c) シリカゲルカートリッジクリーンアップ

※(a)のピーク強度のスケールに注意

表3 クリーンアップ方法別の河川水中 NP 濃度とサロゲート回収率

河川	NP 濃度 (μg/L)			サロゲート回収率 (%)		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
A	0.18	0.18	0.18	25	59	44
B	0.64	0.53	0.58	44	61	69
C	—	<0.06	<0.06	—	64	77
D	—	0.22	0.22	—	71	85
E	—	0.28	0.24	—	66	91

※ (a) クリーンアップ未実施, (b) カラムクロマトグラフ管クリーンアップ, (c) シリカゲルカートリッジクリーンアップ

表4 クリーンアップ方法別の作業時間と溶媒使用量

	充填	シヨ ン ニ ユ ス	洗 浄	溶 出	濃 縮	合計 時間 (分)	溶媒使用量 (mL)	
							ヘキサ ン	ジクロ ロ メ タ ン
(a)	—	—	—	—	—	0	0	0
(b)	15	10	50	75	15	165	110	63
(c)	—	15	—	5	—	20	0	18

※ (a) クリーンアップ未実施, (b) カラムクロマトグラフ管クリーンアップ, (c) シリカゲルカートリッジクリーンアップ

とした報告^{18),19)}もあり, 今後の進展が注目される。

4. ま と め

河川水中のノニルフェノールの測定における, 試料前処理方法の簡略化を検討した。クリーンアップに市販のシリカゲルカートリッジを用いて, カラムクロマトグラフ管によるクリーンアップと同等の効果を達成することができた。

カラムクロマトグラフ管による方法では, 1検体当たり173mLのジクロロメタンおよびヘキサンを使用するのに対し, 今回検討した市販のシリカゲルカートリッジを用いたクリーンアップ方法ではジクロロメタン18mLであり, 有機溶媒の使用量を約1/10に低減することができた。さらに, クリーンアップに要する時間は165分から20分と約1/8まで短縮でき, 分析時の作業効率を向上することができた。

—引用文献—

1) 環境省: 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の

今後の対応方針について—ExTEND2005—, 2005

- 2) 古谷達夫, 河野里名: 固相抽出—GC/MSによる下水中のアルキルフェノール類一斉分析法の検討。東京都下水道局技術調査年報2000, 6-8, 2000
- 3) 山本昇司, 村田武史: ノニルフェノールの測定方法に関する検討。徳島県立保健製薬環境センター年報, **3**, 47-49, 2013
- 4) 東海敬一, 小関友紀子, 佐藤陸実, 白寄りか, 奈良美穂, 佐藤津子, 高畑寿太郎: ノニルフェノールの分析方法に関する検討。仙台市衛生研究所所報, **43**, 102-104, 2013
- 5) 戸渡寛法, 宇野映介, 豊福星洋, 松尾友香: 平成25年度ノニルフェノールおよびLASの調査結果。福岡市保健環境研究所報, **39**, 66-70, 2013
- 6) 豊福星洋, 小原浩史, 平野真悟, 松尾友香: 福岡市内の河川および博多湾におけるノニルフェノールの実態調査。福岡市保健環境研究所報, **38**, 59-62, 2012
- 7) 野末泰宏: ノニルフェノールの分析方法。浜松市保健環境研究所年報, **24**, 70-74, 2014
- 8) 野田和廣, 榎本正明, 飯尾祐子: 環境水中のノニルフェノールの採水器具及び分析方法の検討。環境と測定技術, **41**(6), 3-8, 2014
- 9) 藤川和浩, 永島聡子, 古閑豊和, 松本源生, 馬場義輝: ノニルフェノールの分析法の検討。福岡県保健環境研究所年報, **41**, 97-100, 2014
- 10) 佐来栄治, 寺本佳宏, 岩崎誠二: 三重県における4-ノニルフェノール(分岐型)および4-tert-オクチルフェノールの状況について。三重県保健環境研究所年報, **16**, 103-108, 2014
- 11) 市川智宏, 佐藤啓太, 吉田恭司, 丹羽智子: 環境水中ノニルフェノールの測定方法に関する検討。愛知県環境調査センター所報, **43**, 印刷中, 2015
- 12) 日本工業規格: JIS K0450-60-10:2007 工業用水・工場排水中の4-ノニルフェノールの異性体別試験方法, 2007
- 13) ISO24293:2009:Water quality —Determination of individual isomers of nonylphenol—Method using solid phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), 2009
- 14) 環境省: ジクロロメタンによる大気汚染に係る環境基準について (<http://www.env.go.jp/hourei01/000025.html>)2015.7.1閲覧
- 15) 厚生労働省: 印刷事業場で発生した胆管がんの業務外外に関する検討会」の報告書及び今後の対応について (<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r985200002x6at.html>)2015.7.1閲覧
- 16) 厚生労働省: 平成26年11月の特定化学物質障害予防規則・作業環境測定基準等の改正 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000057700.html>) 2015.7.1閲覧
- 17) 中西成子, 日野隆信: 固相抽出—GC/MSによる水中のフェノール類の分析方法の検討。千葉県衛生研究所研究報告, **24**, 16-21, 2000
- 18) 鳥津製作所: トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた河川水中のノニルフェノールの高感度分析。鳥津アプリケーションニュース, No.M262, 2014
- 19) 松井亮: 河川水中のノニルフェノール分析法の検討。第49回日本水環境学会年会講演集, 622, 2015