

# 固相マイクロ抽出 (SPME) / GC-MS 法を用いた 外因性内分泌かく乱化学物質の分析 (水試料中のアルキルフェノール類について)

渡辺由香里 小林規矩夫

Determination of Environmental Endocrine Disrupters Using Solid Phase  
Microextraction/GC-MS Method  
(Alkylphenols in River Water)

Yukari WATANABE and Kikuo KOBAYASHI

外因性内分泌かく乱化学物質 (環境ホルモン) は未解明な点も多く残されているが, 生殖異常という世代を超えて悪影響をもたらす怖れがあることから, にわかにクローズアップされてきた<sup>1,2)</sup>。

平成10年度は全国的に環境中のそれらの成分の調査が行われたが, 環境ホルモンは超微量で問題となっていることから, 測定方法には煩雑な分析手順と測定値に対する精度管理が強く求められた<sup>3)</sup>。また, それらの分析には主に溶媒抽出法が採用されており, 分析に使用した溶媒などによる環境汚染も危惧された。

当所も外因性内分泌かく乱物質として取り上げられている約70物質群<sup>2)</sup>の一部の30物質について調査を行ったが, 大量の有機溶媒を使用しそれらの危惧を実感した。そこで, 揮発性成分の分析や農薬の分析を試みて良好な結果を得ている, 固相マイクロ抽出 (SPME) 法<sup>4,5)</sup>を用いて外因性内分泌かく乱物質の分析を試みた。

SPME法は溶媒を全く使用しないので環境問題に関心が高まっている現在では, よりクリーンな分析法として, また, 操作が簡便なうえ微量な有機化合物の分析が可能であることから今日では多岐にわたり利用<sup>6)</sup>されている。

今回は環境中から比較的多く検出されている<sup>7)</sup>アルキルフェノール類の分析をこのSPME法を用いて検討を行った。その結果, 本法が水試料中のスクリーニング法として有用であることが認められたので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

#### (1) アルキルフェノール類標準品

検討したのは4-t-ブチルフェノール (BPと略す), 4-n-ペンチルフェノール (PP), 4-n-ヘキシルフェノール

(HP), 4-ヘプチルフェノール (HPP), 4-t-オクチルフェノール (t-OP), 4-n-オクチルフェノール (OP) およびノニルフェノール (NP) の7成分である。BP, t-OP, OPは和光純薬社製, PP, HP, HPPは関東化学社製, NPは東京化成社製を用いた。

#### (2) アルキルフェノール類標準混合液

各アルキルフェノールの標準品0.5mgをとり, アセトン50mlに溶解する (10 $\mu$ g/ml)。これをさらにアセトンで希釈し0.2 $\mu$ g/mlの7成分混合の標準液を調製した。

#### (3) 内部標準物質

Cambridge Isotope Laboratories社製のナフタレ-d<sub>8</sub>とフルオランテン-d<sub>10</sub>を0.2 $\mu$ g/mlの濃度になるようにアセトンで希釈して用いた。

#### (4) その他の試薬

塩化ナトリウムとアセトンは, 残留農薬試験用 (和光純薬社製) を用いた。

## 2. 器具および装置

固相マイクロ抽出ユニットは手動サンプリング用SPMEホルダー (スベルコ社製) に各種固相のファイバーアセンブリー (以下ファイバーと記す) を装着して用いた。検討したファイバーの種類は85 $\mu$ mポリアクリレート (PA), 100 $\mu$ mポリジメチルシロキサン (PDMS), 65 $\mu$ mポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン (PDMS/DB), 65 $\mu$ mカーボワックス・ジビニルベンゼン (CW) の4種である。

ガスクロマトグラフ質量分析計 (以下GC-MSと記す) は, ヒューレットパッカード社製ガスクロマトグラフ5890型を装着した日本電子社製AX505W型を用いた。

表1 各アルキルフェノールのSIM測定イオン

成分名	測定イオン	
	定量用	確認用
4-t-ブチルフェノール (BP)	135	107
4-n-ペンチルフェノール (PP)	107	164
4-n-ヘキシルフェノール (HP)	107	178
4-ヘプチルフェノール (HPP)	107	192
4-t-オクチルフェノール (t-OP)	135	107
4-n-オクチルフェノール (OP)	107	206
ノニルフェノール (NP)	135	107
ナフタレン-d <sub>8</sub>	136	
フルオランテン-d <sub>10</sub>	212	

### 3. 測定方法

#### (1) 標準試料の調整

塩化ナトリウム 5 g を 20 ml 用のバイアルビンに入れ 180 °C 2 時間加熱する。放冷後、マグネットを入れ蒸留水 20 ml を加える。これにマイクロシリンジで混合標準液を 5 ~ 80 μl 加え、さらに内部標準物質 10 μl をそれぞれに添加し、シリコンセプタムで栓をする。

#### (2) 各種ファイバーの吸着率の検討

標準物質を添加したバイアルビンにファイバーを挿入し、44 °C の水浴中で 45 分間マグネチックスターラーで攪拌する。その後ファイバーに付着した塩分を除くため蒸留水中にファイバーを浸したのち、ろ紙で水分を除き GC 注入口に入れる。ファイバーを 10 分間注入口に留め吸着している成分を熱脱離し、GC 分離カラムに導入し SIM 法で定量する。

### 4. GC-MS測定条件

#### ガスクロマトグラム条件

カラム: Ultra 2 (HP社製 長さ 25m 内径 0.32 mm 膜厚 0.17 μm)

オープン温度: 60 °C (1分間保持) - 10°C/分 - 230°C  
注入口温度: 250°C

注入法: スプリット・スプリットレス法 (ページ開始時間 10分)

キャリアーガス: ヘリウム (10 psi)

#### 質量分析計条件

インターフェイス温度: 280°C

イオン化法: EI法 (70 eV)

検出法: SIM法

測定イオン (m/z): 表1に示した。

表2 各ファイバーの吸着率

成分名	吸着率 (%) *			
	PA	PDMS	PDMS/DB	CW
BP	11.3	0.3	5.8	2.0
PP	17.3	27.7	3.5	3.9
HP	18.1	5.1	3.7	3.5
HPP	10.8	3.5	2.5	1.1
t-OP	14.3	5.2	3.0	2.4
OP	4.4	5.3	1.9	0.6
NP	4.0	2.0	1.3	0.6

PA : 85 μm ポリアクリレート

PDMS : 100 μm ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン

PDMS/DB : 65 μm ポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン

CW : 65 μm カーボワックス・ジビニルベンゼン

## 結果と考察

### 1. ファイバーの選択

標準試料のファイバーへの吸着率算定は、各ファイバーの吸着実験と、アルキルフェノール類標準混合液 (濃度 2 μg/ml) をマイクロシリンジで直接ガスクロマトグラムに 1 μl を注入したときのピーク面積とを用いた。結果は表2に示した。

アルキルフェノール類標準混合液を直接ガスクロマトグラムに 1 μl 注入したとき (注入量 2 ng) のピーク面積は、219 ~ 500 の範囲であった。SIM チャートを図1に示した。

各ファイバーへのアルキルフェノール類の吸着率は、PA 4.0 ~ 18.1 %, PDMS 0.3 ~ 5.3 %, PDMS/DB 1.3 ~ 5.8 %, CW 0.6 ~ 3.9 % であった。

PA ファイバーは他3種に比べて高い吸着率を示しており、また、成分別の吸着率も、BP, PP, HP, HPP および t-OP は 11.3 ~ 18.1 % の範囲を、OP, NP はそれぞれ 4.4, 4.0 % を示し、極性などの性状による差がみられたが、7成分とも感度良く吸着していた。この結果から、PA ファイバーを用いて下記の検討を行った。

### 2. 検量線の検討

試料 (20 ml) 中の各アルキルフェノール濃度を 0.005, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 ng/ml とし、これに内部標準物質を添加して検量線を作製した。代表的な検量線を図2に示した。

アルキルフェノール類7成分と内部標準物質の保持時間は 5分56秒 ~ 14分19秒の範囲であった (表3)。

検量線は各成分とも 0.005 ~ 0.8 ng/ml の範囲でほぼ良好な直線性が得られ、定量的な取り扱いも可能であった。

表3 検出下限値等

成分名	保持時間	PTRI *	下限値 ( $\mu\text{g/l}$ )
BP	5' 56"	1,306	0.001
PP	8' 03"	1,461	0.003
HP	9' 17"	1,522	0.001
HPP	10' 28"	1,668	0.01
t-OP	9' 46"	1,614	0.0001
OP	11' 36"	1,770	0.001
NP	10' 56"	1,669~1,801	0.006

\* 環境庁のマニュアル値を参照

### 3. 検出下限値

検出下限値は各アルキルフェノールの濃度が0.005ng/mlの試料のSIMクロマトグラムから、S/N比3を用いて算出した。結果を表3に示した。

検出下限値は0.0001~0.006 $\mu\text{g/l}$ の範囲であった。これは環境庁のマニュアルで示されている水質の目標検出限界、ノニルフェノール0.1 $\mu\text{g/l}$ 、それ以外のアルキルフェノール0.01 $\mu\text{g/l}$ を充分クリアするものであった。

なお、今回用いたPTRI(保持指標)は上記マニュアルの値を参照したが、SPME法でもこれと同様な値を示し、未知成分の同定に有効であると考えられた。

### 4. 添加回収試験の検討

水試料への適用を考え、蒸留水と河川水を用いて添加回収試験と再現性を検討した。用いた河川水のBODは1.6mg/lであった。

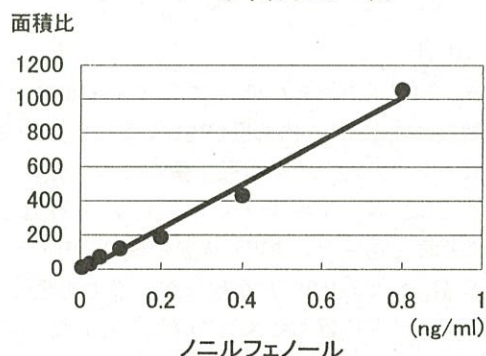
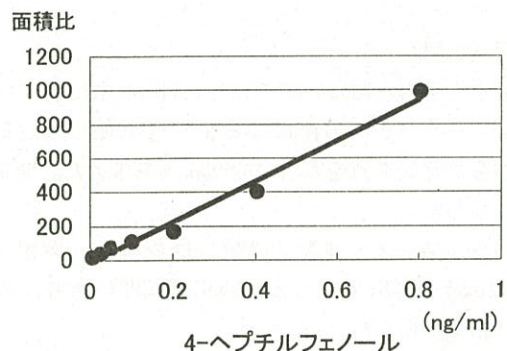
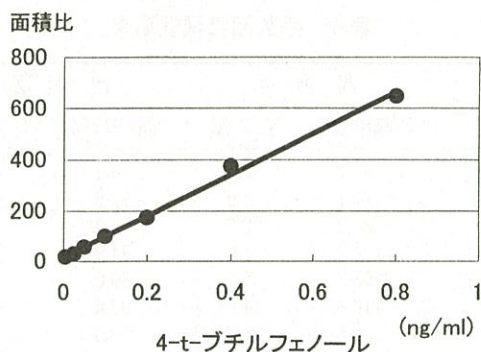


図2 検量線

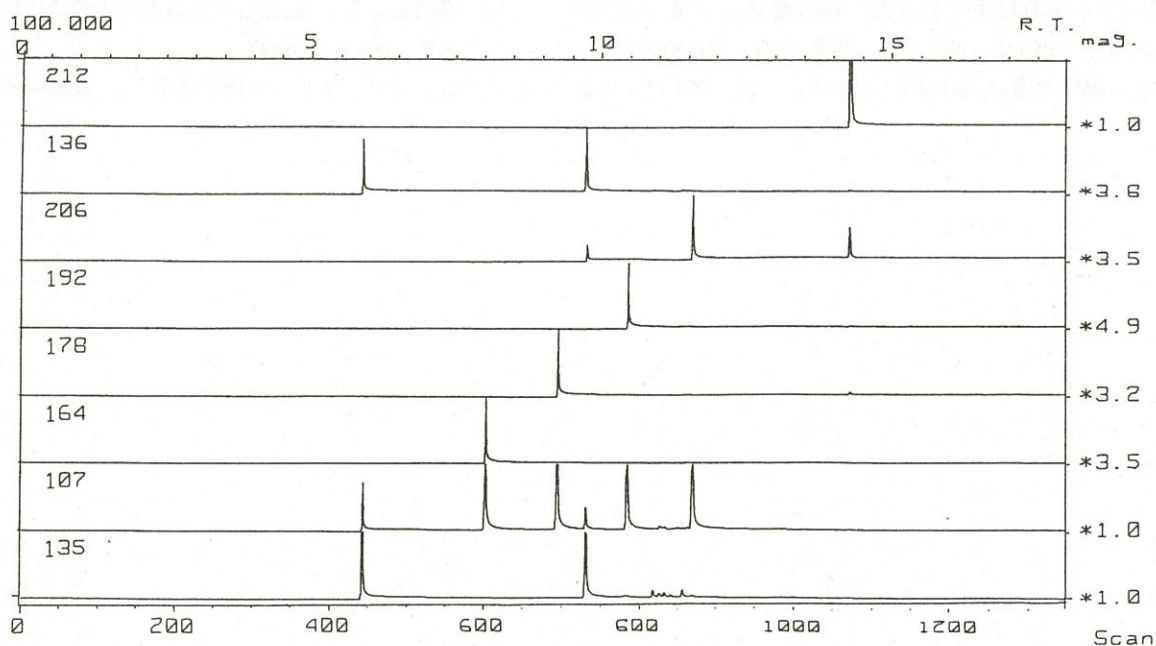


図1 標準液のSIMチャート

表4 添加回収試験結果

成分名	蒸溜水		河川水	
	回収率(%)	CV%	回収率(%)	CV%
BP	97.1	8.6	95.4	2.3
PP	70.1	4.9	91.8	4.0
HP	84.0	0.7	88.0	6.3
HPP	104.2	1.8	94.9	10.5
t-OP	103.8	2.2	89.3	9.5
OP	116.6	17.5	93.4	6.9
NP	132.5	20.7	78.6	19.5

(1) 回収率

蒸溜水と河川水についてそれぞれ20 ml 中に各アルキルフェノールが0.1 ng/mlになるように添加し、定量した値からブランク値を差引いて回収率を求めた。結果は表4に示した。

アルキルフェノール類7成分の回収率は、蒸溜水で70.1~132.5、河川水で78.6~95.4の範囲にあり、概ね良好な結果が得られた。

(2) 再現性

蒸溜水、河川水それぞれ20 ml に、アルキルフェノール類標準混合液10 µl と内部標準物質を添加してSPME法で測定した(n = 5)。その結果を表4に示した。

蒸溜水では、各アルキルフェノールのCV%は0.7~20.7%の範囲であった。再現性の良い成分はHP(0.7%)、HPP(1.8%)、t-OP(2.2%)であった。最も再現性の悪い成分はCV20%を超えたNP(20.7%)で、続いてOP(17.5%)であり、この2成分はファイバーへの吸着率の低い成分であった。

一方、河川水では各アルキルフェノールのCV%は2.3~19.5%の範囲であった。再現性の良い成分はBP(2.3%)、PP(4.0%)であった。20%を超えた成分はなく、最も再現性の悪い成分はNP(19.5%)、続いてHPP(10.5%)

%)で良好な再現性が得られた。なお、蒸溜水と河川水を比較すると、河川水でより良好な再現性を示す成分も多く認められた。この点については今後の検討課題である。

ま と め

固相マイクロ抽出(SPME)/GC-MS法を用いてアルキルフェノール類7成分の分析について検討した。

85 µmポリアクリレート、100 µmポリジメチルシロキサン、65 µmポリジメチルシロキサン・ジビニルベンゼン、65 µmカーボワックス・ジビニルベンゼンの4種類のファイバーを用いて抽出特性を比較した結果、85 µmポリアクリレートが最も高い吸着率を示した。

85 µmポリアクリレートファイバーを用いて、検量線、再現性、添加回収試験について検討したところ良好な結果が得られ、固相マイクロ抽出(SPME)法は環境水中のアルキルフェノール類の定量法として有用であることが認められた。

文 献

- 1) シーア・コルボーン他：奪われし未来，翔詠社 (1997)
- 2) 環境庁：環境ホルモン戦略計画 (SPEED '98)， (1998)
- 3) 環境庁：外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアル，平成10年度
- 4) 渡辺由香里ら：山梨県衛公研年報，40，38~42 (1996)
- 5) 渡辺由香里ら：山梨県衛公研年報，41，58~62 (1997)
- 6) 磯部友彦ら：第1回日本水環境学会シンポジウム講演集，8~9 (1998)
- 7) ボブ・シャイラー：環境化学，5，484~485 (1995)