

## ディスク型固相を用いた環境水中のアルキルフェノール 及びビスフェノールAの分析法

矢口 久美子\*, 鈴木 俊也\*\*, 安田 和男\*\*

### Analysis of Alkylphenols and Bisphenol A in Environmental Water by Solid Phase Disk Extraction

Kumiko YAGUCHI\*, Toshinari SUZUKI\*\* and Kazuo YASUDA\*\*

A method for the simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A as endocrine disrupting chemicals was established.

The concentration by solid phase extraction (SPE) and determination by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) was examined for them. Shapes of chromatogram peaks in these compounds detected by GC/MS were improved by trimethyl silyl derivatization. The instrument detection limit of GC/MS was 0.003-0.006 ng, which depended on these chemicals. Recovery rates for two types of SPE disks and two types of SPE cartridges were examined. SDB-XD, a kind of SPE disks with divinylbenzene polymer was better than the others in recovery and swiftness. The recovery rate of each compound in well water using SDB-XD was above 70 %, and the coefficient of variation was less than 19 %.

**Keywords:** アルキルフェノール類 alkylphenols, ビスフェノールA bisphenol A, ディスク型固相抽出 disk type solid phase extraction, ガスクロマトグラフィー/質量分析計 GC/MS, トリメチルシリル化 trimethylsilylation

#### 緒 言

内分泌攪乱を起こす可能性のある化学物質 (EDCs) による環境及び食品等の汚染が問題となっている。環境庁は1997年7月, 内分泌攪乱作用を有すると疑われる70種類 (2000年に68種類に改訂) の化合物を提示した<sup>1)</sup>。これらの化合物の中で, 界面活性剤や合成樹脂の原料であるアルキルフェノール類及びビスフェノールAは, 生産量が年間数万トンから数十万トンと他の物質に比べて多く, 環境への負荷量も少なくないと考えられ<sup>1)</sup>, 環境庁 (現環境省), 建設省 (現国土建設省) をはじめ, 多くの自治体で実態調査が行われている<sup>2-4)</sup>。著者らもアルキルフェノール類及びビスフェノールAについて井戸水及び河川水を対象に実態調査を行っている。分析方法としては, 水試料からの抽出方法として溶媒抽出法及び固相抽出法<sup>5-7)</sup>, また測定機器として高速液体クロマトグラフ<sup>7,8)</sup>やガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS)<sup>9,10)</sup>を用いた方法が報告されている。今回, 環境水中のアルキルフェノール類及びビスフェノールAについて簡便に分析するために, 有機溶媒の使用量が少なく短時間で抽出できるディスク型固相を用い, 化合

物の選択性に優れているGC/MSにより測定する方法を検討した。他の固相及び液液抽出法との比較も行ったので併せて報告する。

#### 実験方法

##### 1. 対象化合物

Table1に測定対象としたアルキルフェノール12種 (No.1~12) 及びビスフェノールA (No.13) を示した。

##### 2. 試薬

標準品として *A-tert*-ペンチルフェノール及び4-*n*-オクチルフェノールは和光純薬工業 (株) 製, その他の化合物は東京化成 (株) 製を使用した。内部標準物質はフルオランテン-*d*<sub>12</sub> C/D/N Isotopes社)を用いた。標準液は1,000 mg/Lのアセトン溶液として調製し, それを適宜アセトンで希釈して用いた。塩化ナトリウム, ジクロロメタン, メタノール及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用 (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。また, トリメチルシリル (TMS) 化剤として *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。水は純

\* 東京都立衛生研究所精度管理室 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

\*\* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

\*\* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

Table 1. Detection Limits of the Instrument and the Correlation Coefficient of the Calibration Curve for Alkylphenols and Bisphenol A

No.	Compound	Monitoring ( $m/z$ )		Detection limit <sup>1)</sup> (ng)	Correlation coefficient of the calibration curve (0.06 ng - 1.0 ng)
		Quantification	Confirmation		
1	4-ethylphenol	179	194	0.004	0.9959
2	4-propylphenol	179	208	0.005	0.9961
3	4- <i>tert</i> -butylphenol * <sup>2)</sup>	207	222	0.004	0.9962
4	4- <i>sec</i> -butylphenol	193	222	0.004	0.9963
5	4- <i>n</i> -butylphenol	179	222	0.004	0.9959
6	4- <i>tert</i> -pentylphenol	207	236	0.004	0.9959
7	4- <i>n</i> -pentylphenol *	179	236	0.003	0.9959
8	4- <i>n</i> -hexylphenol *	179	250	0.004	0.9960
9	4- <i>tert</i> -octylphenol *	207	278	0.005	0.9961
10	4- <i>n</i> -heptylphenol *	179	264	0.004	0.9956
11	4-nonylphenol *	221	179	0.004	0.9965
12	4- <i>n</i> -octylphenol *	179	278	0.004	0.9965
13	bisphenol A *	357	372	0.006	0.9975

1) Detection Limit =  $3\sigma$ ,  $n=5$

2) \* : Compounds were listed as EDCs by Ministry of the environment.

水製造装置PURIC-MX (オルガノ社製) で精製した水を用いた。

### 3. 試験溶液の調製

1)抽出 ディスク型固相: スチレン-ジビニルベンゼン共重合体のエムポア™ディスクSDB-XD (径47 mm, スリーエム社製) 及びオクタデシル化学結合型シリカ含有のENVI-18DSK (径47 mm, スペルコ社製) について検討した。

各ディスク型固相をジクロロメタン10 mL, メタノール10 mL及び精製水10 mLの順でコンディショニングを行い, 水試料1 Lを100 mL/minで減圧法により通水した。その後5分間通気を行い, ジクロロメタン-アセトン(6:1)5 mLで溶出した。溶出液を無水硫酸ナトリウム約2 gを充填したガラス製ミニカラムに通して脱水し, 窒素気流下で1 mLに濃縮した。

カ-トリッジ型固相: ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を用いたSep-pak PS-2 (ウォーターズ社製) 及びオクタデシル化学結合型シリカを用いたSep-pak C18 (ウォーターズ社製) について検討した。

各カートリッジ型固相をジクロロメタン5 mL, メタノール5 mL及び精製水5 mLでコンディショニングした後, 水試料1 Lを15 mL/minの流速で加圧法により通水した。次に, それら固相の上部にあらかじめジクロロメタン10 mLで洗浄した活性炭カートリッジ (Sep-pak AC-1) を取り付け, 30分間通気し, ガラス製注射筒を用いジクロロメタン-アセトン(6:1)5 mLで溶出した。溶出液は無水硫酸ナトリウムを充填したガラス製ミニカラムを通して脱水し, 窒素気流下で1 mLに濃縮した。

液-液抽出法: 水試料1 Lを取り, 750 で6時間加熱処理した塩化ナトリウム50 gを加え, 1 mol/L塩酸でpH 4に調整後, ジクロロメタン100 mL 50 mLで順次振とう抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後 約40 で約10 mLに濃縮し, 窒素気流下で1 mLに濃縮した。

2)誘導体化 1 mLに濃縮した抽出液にBSTFAを0.1 mL添加し,

よく混和してTMS化を行った後, 内部標準物質としてフルオランテン- $d_{10}$ を最終濃度0.5 ppmになるように添加し試験溶液とした。

### 4. GC/MS条件

1)GC: HP5890 (ヒューレットパカード社製), 注入口温度; 220, スプリットレス注入; 注入量2  $\mu$ L, パージ時間; 1分, カラムヘッド圧; 80 kpa, カラム; HP5-MS, 0.25 mm I.D.  $\times$  30 m, 膜厚2.5  $\mu$ m, カラム温度; 50 (1分) - 10 /分 - 200 - 6 /分 - 300。

2)MS: Automass (日本電子(株)製), イオン源温度; 220, インターフェイス温度; 250, イオン化電流; 305  $\mu$ A, フォトマル電圧; -650 V, 分解能500。

### 結果及び考察

#### 1. TMS化によるGC/MS-SIMクロマトグラム

アルキルフェノール及びビスフェノールAをそのままGC/MSで測定した場合, ピーク形状にテーリングが認められたため, BSTFAによりTMS化して測定した。TMS化した試料のGC/MS-SIMクロマトグラムをFig.1に示した。Fig.1のピーク番号はTable 1の同番号の化合物に相当する。各化合物のピークの形状はTMS化することにより改善された。

#### 2. モニターイオン, 検出限界及び検量線

Table 1に示すように各化合物のモニターイオンは検出及び確認用として2つの $m/z$ を設定した。4-ノニルフェノール(No.11)は標準品が異性体の混合物であるため, 複数のピークが検出された (Fig. 1)。そのためモニターイオンはピーク強度が高く, 近接の化合物のマススペクトルグラムには認められない $m/z$  221とした。また, Table 1に示すように装置の検出限界は0.001 ~ 0.006 ngであったことから, 定量下限値0.01  $\mu$ g/Lまで測定するためには1,000倍濃縮すれば充分であることがわかった。いずれの化合物の検量線も0.06 ~ 1.0 ngの範囲で良好な直線性を示した。

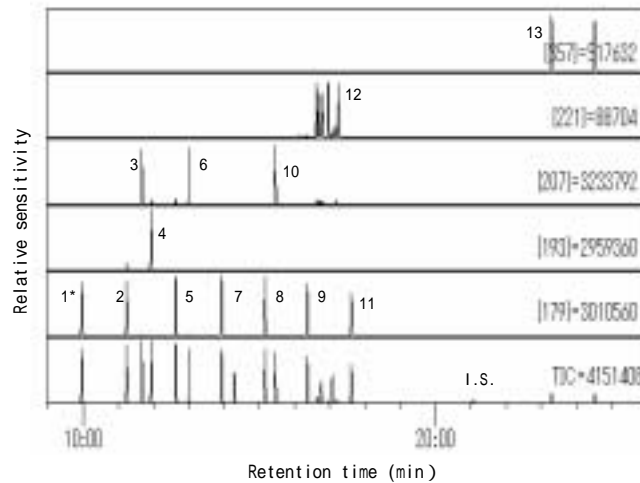


Fig.1. GC/MS-SIM Chromatograms of TMS Derivatives of Alkylphenols and Bisphenol A

\* Number expressed compounds which were numbered in Table 1.

### 3. ディスク型固相SDB-XDによる抽出条件の検討

SDB-XDによる抽出条件について、各標準液を1 ppbになるように添加した精製水を用い検討した。

1) pHの影響 添加試料を50 mMリン酸緩衝液でpH 3, 5, 7及び9に調整し、SDB-XDに負荷して抽出率を比較した。その結果、pH 3~7では各化合物の抽出率は91~122%であり、pH 9ではわずかに減少したものの83~91%であった。一般的にアルキルフェノール類及びビスフェノールAを抽出するときは酸性条件下で行われているが<sup>5-8)</sup>、C2以上のアルキル基を持つものは弱アルカリにおいてもほぼ良好に抽出可能なことがわかった。通常の井戸水や河川水のpHは5.5~8.5程度<sup>11,12)</sup>であることから、抽出時のpH調整は不必要であると思われる。

2) 通水速度 抽出時の試料の通水速度を100 mL/min, 166 mL/min及び200 mL/minの条件で検討した。その結果、1 Lの水試料を通水した場合100 mL/minが最も回収率が良好であった。カートリッジ型固相の場合は一般的に15 mL/minで通水するため60分以上かかるが、ディスク型固相の場合の通水時間は10分間と大幅に短縮できた。

3) 通気時間 試料を通水後、ディスクの水分をある程度除去するため、しばしば通気が行われるが、その通気時間が回収率に及ぼす影響を検討した。0分, 10分, 20分, 30分について回収率を比較した。いずれの時間においても回収率に大差は認められなかったことから、この後の無水硫酸ナトリウムによる脱水を容易にするために、5分間の通気を行い、ある程度の水分を除去することとした。

4) 溶出溶媒 固相からの溶出溶媒の検討をTable 2に示した4条件で行った。その結果ジクロロメタン-アセトン(6:1) 5 mLで溶出した場合、アセトン1 mL次いでジクロロメタン8 mLで溶出した場合の回収率が良かった。そこで、溶出時間を短くするためにジクロロメタン-アセトン(6:1)で溶出することとした。

### 4. 誘導体化時の水分及び反応温度の影響

TMS誘導体化におよぼす抽出液中の水分及び反応温度の

Table 2. Effect of Elution Solvents<sup>1)</sup> on Recovery by the Disk Type Solid Phase Extraction

Compound <sup>2)</sup>	Recovery (%)			
	1	2	3	4
4-ethylphenol	70	110	101	102
4-propylphenol	69	104	95	76
4- <i>tert</i> -butylphenol	73	104	96	72
4- <i>sec</i> -butylphenol	71	104	95	69
4- <i>n</i> -butylphenol	71	104	94	65
4- <i>tert</i> -pentylphenol	73	103	94	67
4- <i>n</i> -pentylphenol	72	105	92	62
4- <i>n</i> -hexylphenol	73	102	91	62
4- <i>tert</i> -octylphenol	73	102	91	68
4- <i>n</i> -heptylphenol	75	101	90	63
4-nonylphenol	76	102	90	70
4- <i>n</i> -octylphenol	74	103	90	63
bisphenol A	78	91	96	75

1) Elution solvents

1: Dichloromethane, 5 mL

2: Dichloromethane : Acetone (6:1), 5 mL

3: Acetone, 1 mL - Dichloromethane, 8 mL

4: Acetone, 1 mL - Dichloromethane, 6 mL - Hexane, 2 mL

2) Each compound was spiked to 1ppb in 500 mL pure water.

影響を検討するために、ジクロロメタン-アセトン(6:1)に溶かした標準溶液1 mLに0.5, 1.2及び3 µLの水を添加した後、TMS化したときの各化合物の反応率を調べた。水を添加しないときの誘導体の生成量と比較すると、水分添加量がいずれの場合も反応率はほぼ同程度であったことから、0.3%程度の水分の混入はTMS化に影響を及ぼさないと考えられた。

また、TMS化を行うとき加温(90 )することにより反応を進行させる方法<sup>13)</sup>、または室温で1時間放置する方法<sup>5)</sup>が報告されているため、室温及び反応温度80 で反応時間を3, 5, 10, 15及び30分にした場合の効果を検討した。80にした場合、反応率は室温で反応させたときと同じかあるいは反って低下し、室温での反応が良好な結果となった。また、反応時間を設ける必要もないことがわかった。

## 5. 誘導体の安定性

TMS化により生成した各誘導体の安定性を反応後4日間調べた。反応直後の測定値を100%とすると、ビスフェノールAは4日後に67%と減少したが、その他の誘導体は92~110%とほぼ安定であることがわかった。

## 6. ディスク型固相SDB-XDによる精製水、井戸水及び河川水での添加回収実験

精製水、井戸水及び河川水に0.1 ppbの濃度になるように

各化合物を添加したときのSDB-XDによる回収率をTable 3に示した。精製水での回収率は76~86%、井戸水では74~113%の回収率で、ほぼ良好な回収率を示した。変動係数は前者が8~9%、後者が9~19%であり、ほぼ満足できる結果であった。河川水に添加した場合の回収率は63~87%であったが、環境庁が測定対象とした物質 (Table3の\*印の化合物)は4-*tert*-ブチルフェノールを除いていずれも70%以上の回収率が得られた。本ディスクは井戸水及び河川水中の

Table 3. Recovery of Alkylphenols and Bisphenol A by Disk Type Solid Extraction SDB-XD

Compound <sup>1)</sup>	Mean of recovery, % (Coefficient of variation, %)		
	Pure water (n=4)	Well water (n=5)	River water (n=5)
4-ethylphenol	78 (8)	78 (13)	67 (6)
4-propylphenol	77 (8)	76 (12)	70 (5)
4- <i>tert</i> -butylphenol * <sup>2)</sup>	77 (8)	74 (12)	68 (5)
4- <i>sec</i> -butylphenol	76 (8)	76 (12)	67 (5)
4- <i>n</i> -butylphenol	79 (8)	79 (12)	71 (4)
4- <i>tert</i> -pentylphenol	77 (8)	76 (9)	63 (5)
4- <i>n</i> -pentylphenol *	79 (8)	85 (13)	74 (5)
4- <i>n</i> -hexylphenol *	81 (8)	83 (13)	75 (5)
4- <i>tert</i> -octylphenol *	77 (8)	78 (12)	74 (6)
4- <i>n</i> -heptylphenol *	83 (7)	81 (14)	80 (5)
4-nonylphenol *	85 (7)	113 (19)	87 (14)
4- <i>n</i> -octylphenol *	79 (7)	79 (13)	74 (7)
bisphenol A *	86 (8)	78 (16)	71 (13)

1) Each compounds was spiked to 0.1 ppb in each water.

2) \*:Compounds were listed as EDCs by Ministry of the environment.

Table 4. Recovery and Coefficient of Variation on Alkylphenols and Bisphenol A by Each Extraction Method (%)

Compound <sup>1)</sup>	Disk type solid		Cartridge type solid		Solvent <sup>2)</sup> extraction
	SDB-XD (n=4)	18DSK (n=4)	PS-2 (n=4)	C18 (n=5)	(n=5)
4-ethylphenol	78 <sup>3)</sup> (8) <sup>4)</sup>	9 (8)	79 (5)	26 (2)	62 (11)
4-propylphenol	77 (8)	46 (8)	77 (6)	76 (4)	82 (11)
4- <i>tert</i> -butylphenol	77 (8)	72 (7)	75 (6)	96 (2)	86 (10)
4- <i>sec</i> -butylphenol	76 (8)	75 (8)	78 (6)	104 (2)	85 (10)
4- <i>n</i> -butylphenol	79 (8)	78 (9)	82 (6)	106 (2)	85 (10)
4- <i>tert</i> -pentylphenol	77 (8)	77 (8)	81 (5)	103 (2)	84 (10)
4- <i>n</i> -pentylphenol	79 (8)	83 (11)	87 (6)	106 (1)	85 (10)
4- <i>n</i> -hexylphenol	81 (8)	85 (12)	87 (5)	103 (1)	86 (11)
4- <i>n</i> -heptylphenol	83 (7)	89 (12)	85 (5)	99 (2)	87 (11)
4- <i>tert</i> -octylphenol	77 (8)	83 (12)	79 (4)	93 (1)	87 (10)
4- <i>n</i> -octylphenol	79 (7)	89 (12)	74 (3)	88 (2)	88 (11)
4-nonylphenol	85 (7)	74 (48)	77 (5)	87 (8)	90 (12)
bisphenol A	86 (8)	90 (18)	101 (6)	89 (2)	77 (9)

1) Each compounds was spiked to 0.1 ppb in pure water.

2) Solvent is dichloromethane.

3) Mean of recovery

4) Coefficient of variation

アルキルフェノール類及びビスフェノールAの一斉分析に有用であることがわかった。

#### 7. ディスク型固相SDB-XDと他の抽出法との比較

精製水に0.1 ppbの濃度になるように各化合物を添加したときの各抽出法による回収率を比較し、結果をTable4に示した。ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体の固相であるSDB-XD及びPS-2においては、77～86%及び74～101%と良好な回収率が得られた。しかし抽出時間はSDB-XDで10分、PS-2で約60分とSDB-XDの方が勝っていた。オクタデシルシリカ系の固相である18DSK及びC18においては、アルキル基の短い4-エチルフェノールの回収率が18DSKでは9%、C18では26%と低かった。

液-液抽出法の回収率は62～90%とほぼ良好な結果を示したが、有機溶媒を多量に使用し、操作も煩雑で時間もかかるなどの難点がある。

内分泌かく乱化学作用が疑われる化合物を環境庁が発表して以来、これらの化合物の分析法を確立することが求められてきた。アルキルフェノール類及びビスフェノールAの分析法についても多くの報告がなされているが<sup>5-7,13)</sup>、これらの化合物の一斉分析法の報告は少ない。その中で、溶媒を多量に使用する液液抽出法<sup>14)</sup>及び抽出時間が比較的長いカートリッジ型固相<sup>15)</sup>による抽出法が報告されているが、ディスク型固相を用いての一斉分析法の報告はほとんど見られない。今回2種類のディスク型固相による抽出法を検討した結果、ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体の固相を用いる方法は、抽出時間が短く、回収率もほぼ満足できる値を示し良好な結果を得た。アルキルフェノール類及びビスフェノールAの一斉分析に効率的な方法であると考えられる。

#### ま と め

ディスク型固相SDB-XD及びGC/MSを用い、アルキルフェノール12種及びビスフェノールAの一斉分析を検討した。井戸水及び河川水に適用したところ、各化合物共、ほぼ満足できる回収率及び変動係数を示した。ディスク型固相で

の抽出は溶媒の使用量が少なく、抽出時間が短いため、多くのサンプルを効率的に分析できることから、環境水中のこれらの物質を分析するのに有効な方法であった。

#### 文 献

- 1) 環境庁環境保健部環境安全課，外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について，1998.
- 2) 環境庁環境保健部，水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態調査(夏季)結果について，1998.
- 3) 建設省，平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果，1999.
- 4) 東京都健康局，平成12年度飲用井戸水用の内分泌かく乱化学物質に関する実態調査，2001.
- 5) 環境庁水質保全局水質管理課，外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル，1998.
- 6) 茨木剛，田辺顕子，川田邦明他，第34回水環境学会年会講演集，219，2000.
- 7) 古谷博，小出光了，水道協会雑誌，71(2)，29-34，2002.
- 8) 米久保淳，佐々木俊哉，一木満貴子他，BUNSEKI KAGAKU，48，571-577，1999.
- 9) 環境庁環境保健部環境安全課，平成7年度化学物質分析法開発調査報告書，1996.
- 10) 環境庁環境保健部環境安全課，平成8年度化学物質分析法開発調査報告書，1997.
- 11) 五十嵐剛，矢口久美子，鈴木俊也他，東京衛研年報，47，270-273，1996.
- 12) 東京都環境局，平成12年度公共用水域及び地下水の水質測定結果，2001.
- 13) 上村仁，節田節子，神奈川県衛生研究所研究報告，30，83-88，2000.
- 14) 牧岡慎吾，斎藤良弘，福本真治他，島津評論，56，137-150，2000.
- 15) 宮田雅典，塩出貞光，大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績 第52集，53-63，2000.