

報 文

内分泌攪乱化学物質の現場固相抽出法の構築

氏家久美子¹, 半戸 里江¹, 佐藤 記一¹, 安保 充^{®1}, 大久保 明¹

On-site solid phase extraction method for endocrine disrupters

Kumiko UJIE¹, Rie HANDO¹, Kiichi SATO¹, Mitsuru ABO¹ and Akira OKUBO¹¹ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657

(Received 27 July 2004, Accepted 6 October 2004)

A compact, lightweight, and portable solid-phase extraction system without a power supply was designed and constructed for the on-site pretreatment of water samples. First, the recovery rates of endocrine disruptors, such as alkylphenols and bisphenol A from a solid-phase adsorbent, were examined. The recovery rates of each analytes were almost unchanged after one-day storage. We also proposed an on-site addition of a surrogate in water samples. By this procedure it was possible to calculate recovery rates even for on-site extraction. This method was evaluated using water samples from Arakawa River. Because the quantitative value of nonylphenol (mix) by this method was higher than that by the usual method, this pretreatment method is useful and reliable for field analyses.

Keywords : endocrine disrupters; bisphenol A; nonylphenol; solid phase extraction; on-site extraction.

1 緒 言

環境中の内分泌攪乱^か化学物質の分布や動態を調べるには多検体の定期的観測が必要である。その際、すべての試料を試料水の状態で実験室へ運搬して抽出操作を行うことは多くの問題が伴う。まず、大量の試料水を遠方から運搬するには、多大な労力とコストがかかる。また、保存・運搬中になんらかの理由によって試料水中の測定対象物質濃度が増減する可能性が考えられる。そういった問題を解決する方法として、現場^か抽出/吸着法に着目した。現場^か抽出/吸着法とは、試料採取したその場で試料水を吸着剤(固相抽出剤を使用)に通水し、試料水中の測定対象物質を吸着剤に吸着させ、その吸着剤のみを実験室へ運搬して分析を行う方法である。固相抽出剤としては、ポリスチレン・ジビニルベンゼン系あるいはアクリル酸エステル系の樹脂が利用され、数十～数百lの水を通過/吸着させる方法が比較的早くから使用されてきた^{1)~3)}。近年、海水中に

捕集装置を沈めて、微量有機物質を選択的に採集する現場^か抽出/吸着装置 (*in-situ* filtration/extraction water sampler)が開発されている⁴⁾⁵⁾。また類似法として、海水に沈めたポンプ等によって海水をくみ上げ、船上に設置した抽出/吸着装置にオンラインで海水を導入する方法が開発されている⁶⁾⁷⁾。

現場^か抽出/吸着装置は市販製品が存在するが、現在まで有機化学物質の環境分析には一般的には使用されてこなかった。一般化を妨げる要因として、機械ポンプを用いた大型の装置であることや、測定対象物質の吸着効率(回収率)を知ることが非常に難しい点が挙げられる。現場^か抽出/吸着装置を用いてオンラインで試料水を吸着剤に通水する場合には、試料水へのサロゲート物質の添加が難しく、回収率の確認は困難である。吸着剤にサロゲートをあらかじめ染み込ませて定量する方法もあるが、試料水中の成分とは条件が異なるため正確ではない。実験室に試料水を運搬してから抽出操作を行うのであれば、抽出操作前にサロゲート物質を添加し、その回収率から測定対象物質の回収率を推測することができる。また、上述のように、ポンプで試

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科: 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

料水をくみ上げる方法では、試料水がポンプ内部を通過する際に機械油などで汚染される危険性がある。

以上のような問題を解決するため、本研究では、採水直後にサロゲート物質を添加した後、機械ポンプを用いずに抽出操作を行う現場沝過/吸着法を考案した。この方法により、ポンプ等実験器具由来の汚染を防止することができ、加えて測定対象物質の吸着効率（回収率）を求めることができる。この現場沝過/吸着を実現するために、固相抽出剤の操作途中での保存に関する検討、サロゲート物質の添加方法に関する検討を行った。

また、現場沝過/吸着システムについて、多数の機関が共同で一つの調査を行い、比較同等性のある結果を得るためには、共通の装置・操作方法が必要になるが、それはどこでもだれでも行える簡便で低コストの装置・操作であり、かつ、測定結果にある程度の信頼性が保証されるものであることが望ましい。

そのような視点から、容易に購入できる器材を使用し、フィールドワークにおいてどこにでも持ち運ぶことが可能で、一人でもサンプリングを行えるような分析法、つまり、大型の器材や電源などを必要としない方法の構築を試みた。また、試料水を用いて現場沝過/吸着を行い、実験室での通常処理での値と比較し、構築したシステムの有用性を評価した。

本研究では、環境水を調査対象とし、測定対象物質としては 4-*tert*-ブチルフェノール、4-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-オクチルフェノール及びノニルフェノール（構造異性体混合物）などアルキルフェノール類とビスフェノール A を選択した。

抽出法としては固相抽出法を選択した。微量環境分析において信頼性の高い分析値を算出するために、分析機器としてはガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いた。

2 実 験

2.1 装 置

GC/MS: SHIMADZU QP5050A

測定条件は以下のとおりである。

カラム: DB 5 内径 0.25 mm × 30 m, 膜厚 0.25 μm.

キャリアーガス: He 56.7 kPa (3.0 min) - 2.0 kPa/min - 70 kPa (1.39 min).

カラム温度: 60°C - (40°C/min) - 240°C (2.2 min) - (30°C/min) - 260°C (2.67 min) - (40°C/min) - 300°C (3 min).

気化室温度: 300°C.

試料注入量: 3 μl.

試料注入法: スプリットレスサンプリング時間 1 min.

カラム流量: 1.2 ml/min.

インターフェース温度: 270°C.

検出器ゲイン: 1.5 kV.

固相抽出剤としてスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填剤とした Empore™ High Performance Extraction Disks SDB-XD 47 mm (ディスク厚 0.5 mm) を使用した (以降ディスク型固相と呼ぶ)。茨木らにより、本研究における測定対象物質に対して、ディスク型固相はカートリッジ型固相よりも回収率が高く、中でも SDB-XC, SDB-XD が適しているとの報告がある⁸⁾。XC と XD は充填密度が異なる。環境水の通水に際して、充填密度が比較的小さく流量を確保しやすい SDB-XD を採用した。

2.2 実験室処理法⁹⁾¹⁰⁾

試料水の採取には、実験室においてアセトンとヘキサンで洗浄した金属器具と採水瓶 (1 l) を用い、試料水で 2~3 回洗浄してから採水を行った。採水直後に試料水に L-アスコルビン酸 1 g と濃塩酸 1 ml を添加しかくはんした。実験室へ運搬後、サロゲート物質 (ビスフェノール A-*d*₁₆ を使用) を添加した。その方法として、サロゲート物質のジクロロメタン溶液をシリンジで量り、メタノール溶液に加えピペットでかくはんし、試料水に添加した後洗い込みを行う方法を採用した。続いてディスク型固相を用いて抽出操作を行った。通水の際には、水中の浮遊物質による詰まりを防ぐためのガラス繊維沝紙を重ねて用いた。使用直前にジクロロメタンで洗浄し、メタノールでコンディショニングを行った。ディスク型固相に試料水を通水後、溶出溶媒をガラス繊維沝紙を重ねたままディスク型固相に通液することで目的成分の溶出を行った。溶出液を窒素吹き付けによって濃縮し、無水硫酸ナトリウムで脱水を行った。その後内部標準物質 (ナフトレン-*d*₈, フェナントレン-*d*₁₀ 及びピレン-*d*₁₀ を使用) を添加し、窒素吹き付け濃縮を行った。試料に *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) を加えてトリメチルシリル誘導体化を行い、GC/MS-選択イオンモニタリング (SIM) 測定に供した。

2.3 ディスク型固相の保存法の検討

試料採取現場にディスク型固相を運搬し、通水するまでの保存法について検討を行った。ディスク型固相は実験室においてコンディショニングを行った後、メタノールの入ったステンレス製スクリュー缶にディスク型固相を浸して密閉保存した。ガラス繊維沝紙は、ジクロロメタン通液により洗浄した後乾燥させ、ガラス製ふた付きシャーレに入れて粘着テープで密閉保存する両方法を考案した。いずれもその状態で運搬し、使用直前にピンセットで取り出し、ディスク型固相の上にガラス繊維沝紙を重ねて使用し、添加回収実験を行った。

また、現場で試料水を通水した後のディスク型固相の保

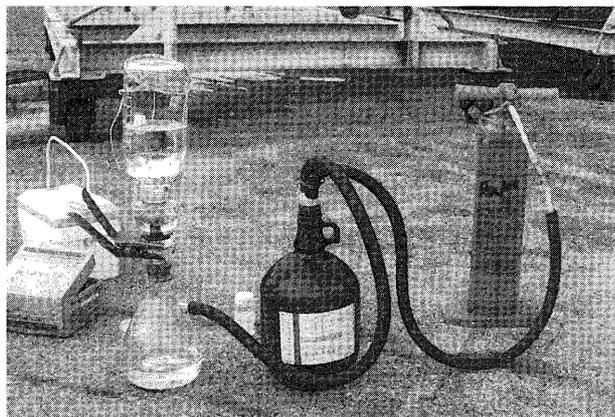


Fig. 1 Produced equipment

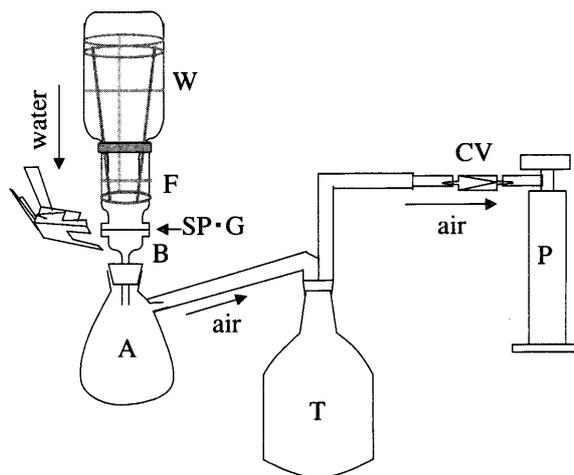


Fig. 2 Schematic diagram of produced equipment

W: water in bottle; F: funnel; SP: solid phase; G: Glass fiber filter; B: base; A: aspiration bottle; T: trap; CV: check valve; P: hand-operated pump

存法について検討を行った。試料水通水後のディスク型固相は、通水後すぐにガラス繊維沓紙とともにガラス製ふた付きシャーレに入れてアルミホイルで覆って遮光し、実験室に運搬する方法を考案し、添加回収実験を行った。

添加回収実験は、精製水に標準物質とサロゲート物質を加え、途中上述のようにディスク型固相とガラス繊維沓紙を保存する以外は2・2の実験室処理法のとおりとし、実験室処理法で処理を行った値と比較した。保存時間は24時間とした。

2・4 現場沓過/吸着装置の構築

本研究にて作製した装置の写真・模式図を Fig. 1, Fig. 2 に示す。現場沓過/吸着法においても、通常処理と同じディスク型固相とガラス繊維沓紙を使用した。ガラス繊維沓紙とディスク型固相はガラスファンネル（試料受け）とベースの間にセットし、クランプでガラスファンネルとベースを挟んで固定した。手動脱気ポンプと逆止弁を用い、系内を陰圧に保ち、沓過を行う構造とした。

2・5 サロゲート物質添加法の検討

サロゲート物質を試料水に添加する方法として、サロゲート物質のメタノール溶液をバイアルにて運搬し、バイアルごと試料瓶に入れてかくはんするという方法を考案した。サロゲート物質のジクロロメタン溶液をバイアル中でメタノール2mlと混合し、バイアルの外壁はアセトンとヘキサンを用い洗浄した後アルミホイルでくるみ、外部に触れないようにした。試料水への添加時にはアルミホイルからバイアルを絞り出す要領でバイアルに触れずに試料瓶にバイアルごと入れ、よくかくはんした。この方法を評価するために、添加回収実験を行った。

添加回収実験は、実験室処理法での方法と、上述のように試料瓶にサロゲート溶液入りのバイアルを入れかくはんする方法の2種を比較した。サロゲート添加以外の操作

は2・2の実験室処理法のとおりとした。

2・6 現場沓過/吸着装置を用いた実試料処理

ここまで検討、作製した装置・方法を用い、実際に採水現場で実試料の現場沓過/吸着を行った場合と、同一の試料水を実験室に運搬して実験室処理を行った場合とで、その測定結果を比較した。

試料採取・現場処理は東京都北区荒川で行った。試料水は同一地点で3検体を採取し試料瓶に注ぎ入れL-アスコルビン酸、濃塩酸を添加し、サロゲート溶液入りバイアルを瓶内に入れ、よくかくはんした。ガラス繊維沓紙とディスク型固相を現場沓過/吸着装置にセットした後、吸引により通水を行った ($n=3$)。また、現場沓過/吸着法におけるブランク測定のため、実験室から精製水を2本の試料瓶に入れ運搬し、現場でL-アスコルビン酸、濃塩酸、サロゲート添加、かくはんを行い、通水した。空試験の通水は試料水の通水の前後に1回ずつ行った。すなわち、ブランクA→試料水a→試料水b→試料水c→ブランクB、の5セットの処理を行った。通水後のガラス繊維沓紙とディスク型固相を実験室に運搬し、溶出操作以降の処理をし、GC/MS測定を行った。また、時間経過による影響を評価するために、同一の試料水を入れた試料瓶を、L-アスコルビン酸、濃塩酸、サロゲート添加、かくはんまで現場で行った後、実験室に運搬し、採水から24時間後に実験室処理法にて分析した ($n=3$)。

3 結果と考察

3・1 ディスク型固相の保存法

実験室処理法での添加回収実験 (usual method) と途中

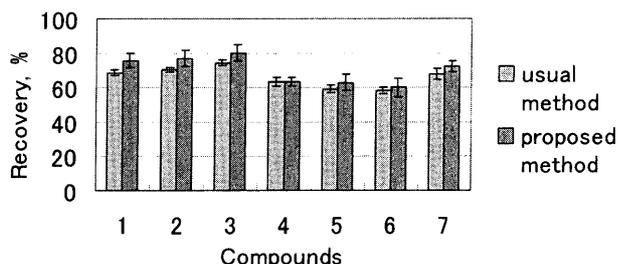


Fig. 3 Comparison of recovery between the usual method and the proposed method

The numbers of the x-axis indicate compounds—1: 4-*tert*-Butylphenol; 2: 4-Pentylphenol; 3: 4-*n*-Hexylphenol; 4: 4-*n*-Heptylphenol; 5: Nonylphenol; 6: 4-Octylphenol; 7: Bisphenol A. The y-axis indicates the recovery of compounds.

ディスク型固相を保存した方法での測定対象物質の添加回収実験 (proposed method) の結果を Fig. 3 に示した. 二つの方法での結果について検定を行ったところ, ディスク型固相を途中で装置から取り外し, 保存・運搬することによる吸着能や溶出効率の低下は見られなかった (*t*-検定, $\alpha = 0.05$). 回収率についても, 既存の報告と比較して妥当な値が得られた¹¹⁾.

また, この方法は, 通水前の保存中にも溶媒和が保たれており, 現場ですぐに通水が可能である. 更に携帯が容易で, 現場沝過/吸着に適した方法である. 採水後, 試料採取現場にてサロゲート物質を添加し, その場でガラス繊維沝紙を重ねたディスク型固相に試料水を通水し, 試料水中の測定対象物質を吸着させ, その後, ガラス繊維沝紙とディスク型固相のみを実験室へ運搬し, 溶出以降の操作を行うことによって, 多量の試料水を持ち運ぶことによる労力, コストが大幅に削減された.

3・2 現場沝過/吸着装置の構築

装置の総重量は約 3 kg と軽量であり, サイズはポンプを取り外すと 30 × 18 × 30 cm の箱に収まる. 電源不要であり, ポンプ由来の排気ガスによる試料の汚染の心配もなく, 持ち運びも容易, という目的に沿った装置を構築することができた. また, 精製水通水時, 150 ml/min 程度の十分な流量が得られ, 短時間での処理を可能とした.

3・3 サロゲート物質の添加法

実験室処理法と考案した方法でのサロゲート物質回収率と相対標準偏差 (RSD) を Table 1 に示した. ばらつきは大きくなるものの, 回収率は向上し, 実用可能な方法であることが確認された. この方法により, 洗い込みといった通常法の煩雑な操作が不要となり, 現場における汚染の危険性も小さくなった. 回収率の向上は, 通常法での煩雑な

Table 1 comparison of recovery between the usual method and the proposed method

	Recovery, %	RSD, %
Usual method	68.7	4.3
Proposed method	87.6	11.6

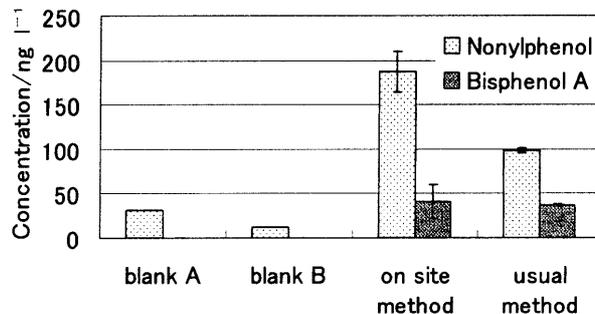


Fig. 4 Evaluation of on site method comparing to usual method

The sample was extracted in Arakawa river. The x-axis indicates the used method. The blank was measured before and after processing of river water in the extraction spot. The y-axis indicates concentration in water (ng/l).

操作中のサロゲート物質の飛散によるロスや, サロゲート物質の添加から抽出までの時間が減少したことにより, 試料瓶壁面への吸着が抑えられたためと考えられる.

3・4 現場沝過/吸着法の検証

現場沝過/吸着法 (on site method) と実験室処理法 (usual method) の対象物質の定量結果を Fig. 4 に示した. Fig. 4 中空試験は現場にて精製水を通水して得られた定量値であり, 今回のシステムを環境中で行う際の環境からの汚染, あるいは操作上の汚染を確認するために測定した. 中空試験からはノニルフェノールのみが, 試料水を現場沝過/吸着法あるいは実験室での通常法処理で処理したものからはビスフェノール A とノニルフェノールが検出された. 河川水の定量値と比較して中空試験値は有意に低い値であった (*t*-検定, $\alpha = 0.05$).

また, 現場沝過/吸着と通常法処理を比較すると, ノニルフェノールにおいて, 有意に現場沝過/吸着のほうが値が高い (*t*-検定, $\alpha = 0.05$, $P = 0.0026$). これは, 水に溶解した状態での保存・運搬により測定対象物質の濃度変化が生じたためと考えられ, より正確な環境中濃度を知るためには, 現場沝過/吸着のほうが実験室処理よりも適当であることが示唆された.

また, Fig. 5 にサロゲート物質として加えたビスフェノール A-*d*₁₆ の回収率を示した. 現場沝過/吸着法, 実験室

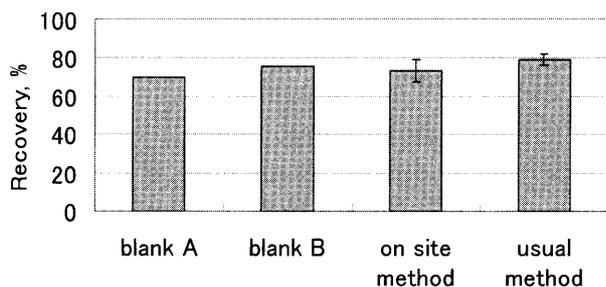


Fig. 5 Comparison of recovery between the on site method and the usual method

The x-axis indicates the used method. The blank was measured before and after processing of river water in the extraction spot. The y-axis indicates the recovery of surrogate compound (Bisphenol A- d_{16}).

処理法を比較すると, 有意な差はなく (t -検定, $\alpha = 0.05$), 十分な回収率が得られた。

4 結 言

環境中内分泌攪乱化学物質を定量するに当たり, 試料水の運搬のコスト, 労力が大きいこと, 対象物質の運搬中濃度変化の可能性, といった問題を解決, 検討するため現場汙過/吸着法について検討を行い, 装置を作製し, 実試料を用いた現場処理を行った。

現場汙過/吸着のシステム構築のため, ディスク型固相の保存の可否を確認し, サロゲート物質の簡便な添加法を考案した。

現場汙過/吸着システムについては, 容易に購入できる器材を使用し, 大型の器材や船舶, 電源などを必要とせず, かつ, 操作や処理が簡便である軽量・コンパクトな現場汙過/吸着装置を作製した。これにより, 試料水のサンプリングにおける労力, 運搬コストが大幅に削減され, 単身で

の多検体サンプリングも可能となった。

この装置を用いた実試料処理を行ったところ, 対象成分の測定が十分可能であり, 連続通水による装置への吸着も問題にならず, 装置の実用性が示された。更に同一試料水を使用した現場汙過/吸着と実験室処理方法の測定結果を比較したところ, 実験室処理では値が小さくなる成分があり, 環境中のより正確な対象成分濃度を知る上での現場汙過/吸着法の有用性が示された。

文 献

- 1) G. A. Junk, J. J. Richard, M. D. Grieser, D. Witiak, J. L. Witiak, M. D. Arguello, R. Vick, H. J. Svec, J. S. Fritz, G. V. Caldrt: *J. Chromatogr.*, **99**, 745 (1974).
- 2) D. J. Schaeffer, D. C. Tiswell, S. M. Somani, K. J. Janardan: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 569 (1980).
- 3) G. Lebel, D. T Williams: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 21 (1990).
- 4) P. L. Sachs, T. R. Hammar, M. P. Bacon: *Tech. Rep. Woods Hole Oceanogr. Inst.*, WHOI-89-55 (1989).
- 5) G. Petrick, D. E. Schulz-Bull, V. Martens, K. Scholz, J. C. Duinker: *Mar. Chem.*, **54**, 97 (1996).
- 6) T. Matsumura, M. Fukami, H. Tsubota, K. Tsutsumi, K. Kumamoto, H. Ito, T. Yamamoto, M. Morita: *Organohalogen Compounds*, **24**, 353 (1995).
- 7) 切刀正行, 藤森一男, 中野 武, 原島 省: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 1001 (2002).
- 8) 茨木 剛, 小熊千佳子, 雅楽川憲子, 川田邦明, 坂井正昭: “固相抽出-GC/MS法による環境試料中のビスフェノール A の定量”, 新潟県保健環境科学研究所, 第 2 回日本水環境学会シンポジウム講演要旨集, p. 10 (1999).
- 9) 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 (水質・底質・水生生物)”, (1998).
- 10) 半戸里江, 安保 充, 大久保 明: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 695 (2003).
- 11) M. I. H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga: *Anal. Chim. Acta*, **428**, 227 (2001).

要 旨

内分泌攪乱化学物質であるアルキルフェノール類・ビスフェノール A 等の分布, 動態を知るには多検体の分析が必要であり, 実験室で前処理及び分析を行うためには, 水試料の運搬に多大な労力とコストがかかる。そこで, 採水サンプルを現場にて固相抽出するための, 電源不要, 小型で持ち運びが容易な装置を考案, 作製した。まず, 固相吸着剤の保存・運搬によるアルキルフェノール類及びビスフェノール A の保持能に変化がないことを確認した。また, サロゲート物質の添加法を検討することで, 現場処理での回収率を算出できる方法を提案した。更に実試料として荒川の河川水を現場固相抽出法と実験室処理法により処理し, 結果を比較したところ, 本法では通常法よりも高いノニルフェノールの定量値が得られ, 本法が環境中のより正確な成分濃度を知る上で有効であることが示された。