

## 研究報告 河川水中のノニルフェノールおよびビスフェノール A の分析

佐来栄治、早川修二、市岡高男、加藤進

外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の疑いのあるノニルフェノールとビスフェノール A の固相抽出、誘導体化による同時分析の検討を行った。その結果、ノニルフェノールの平均回収率 91%、変動係数 4.8% であり、ビスフェノール A は 87% と 4.2% と良好な結果が得られた。

この方法を用いて三重県北部の 7 河川について調査を行った結果、ノニルフェノール、ビスフェノール A とともに微量であるが検出された。

### 1. はじめに

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、悪性腫瘍等を引き起こす可能性のある外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）による環境汚染は、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから注目されている。

環境庁においては、1997年 3月に「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班」を設置し、1998年 5月には「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（環境ホルモン戦略計画 SPEED'98）」を出し環境濃度の把握や対策などを行っている。

筆者らは、今回、環境ホルモンの疑いが持たれているノニルフェノール（非イオン系界面活性剤原料等）およびビスフェノール A（プラスチック樹脂原料等）について、分析の効率化のために固相抽出、TFA 誘導体化後、GC/M S (SIM) で同時定量する方法を検討し、三重県北部の河川について調査を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬および器具

固相抽出カートリッジ：Sep-Pak Plus  $tC_{18}$ （Waters社製）を使用前に、ヘキサン、ジクロロメタン各 5mL、メタノール 10mL および精製水 20mL でコンディショニングを行ったもの

精製水：全ガラス製蒸留装置で 2 回蒸留したもの

ノニルフェノール (mixture of compounds with branched sidechain)：東京化成

ビスフェノール A：試薬一級 東京化成  
ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、メタノール、無水硫酸ナトリウム：残留農薬用 和光純薬

N-メチルビストリフルオロアセトアミド (MBTFA)：ガスクロマトグラフ用 和光純薬

内部標準溶液：フルオレン- $d_{10}$  (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES 製) をアセトンで溶解、n-ヘキサンで希釈を行い 0.1mg/mL に調整したものをを用いた。

#### 2.2 分析方法

##### 2.2.1 分析装置および分析条件

分析装置および分析条件は表 1 に示した。

##### 2.2.2 前処理

コンディショニングした Sep-Pak Plus  $tC_{18}$  カートリッジに塩酸 (1+11) で pH 3.5 前後に調整した試料水 250mL を約 10mL/min で通水した。通水後、遠心分離による脱水 (3,000rpm, 10min) を行い、ジクロロメタン 4mL、次いでヘキサン 4mL で吸着物質を溶出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、窒素ガスを吹き付けて約 0.3mL まで濃縮した。その後 MBTFA 100  $\mu$ L を加え密栓し

表 1 GC / MS の分析条件

---

GC / MS 装置 :	HP 5980 + HP 5971A
カラム :	J & W DB-5 (30m × 0.25mm、膜厚 0.25 μ m)
カラム温度 :	50 (1.5min) - 30 /min - 150 - 5 /min - 270
キャリアーガス :	He 1mL/min (Const. Flow)
インターフェース温度 :	270
注入温度 :	Splitless (Purge On Time: 1min)
モニターイオン :	ノニルフェノール 231 (定量イオン), 203, 217, 245
	ビスフェノール A 405 (定量イオン), 420
	内部標準 (フルオレン-d <sub>10</sub> ), 176

---

80、80分間加熱し誘導体化を行った後、ヘキサン（少量のアセトン）で 0.5mL にメスアップ後、内部標準溶液（フルオレン-d<sub>10</sub>、0.1mg/mL）5 μL を添加し、その 1 μL を GC / MS に注入した。

### 2.3 調査地点

図 1 に示したとおり三重県北部の員弁川、朝明川、海蔵川、三滝川、大井川、鈴鹿川、金沢川の 7 河川を調査対象とした。天白川については、上流から下流についての河川調査も行った。



図 1 調査河川と採水地点

### 3. 実験結果

#### 3.1 誘導体化条件

誘導体化条件を求めるため、誘導体化時の試料容量（ノニルフェノール 2 μg、ビスフェノール A 1 μg を含む標準液 1mL に窒素ガスを吹き付け乾固寸前、0.2mL、0.4mL および 1mL としたもの）、MBTFA 添加量（50、100 μL）について検討を行った。反応温度は 80 とした。

その結果、図 2 に示すように、試料容量が乾固寸前から 0.4mL まではほぼ一定であったが、試料容量が 1mL の時は、乾固寸前時を 100% とした場合、MBTFA 量 100 μL ではノニルフェノール約 90%、ビスフェノール A が約 75%、MBTFA 量 50 μL ではノニルフェノール約 75%、ビスフェノール A が約 50% となり反応が十分ではなかった。

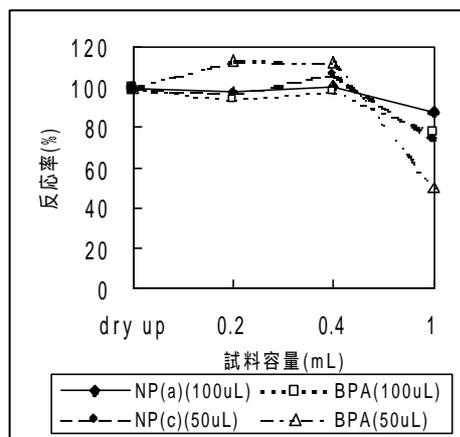


図 2 試料容量と反応率

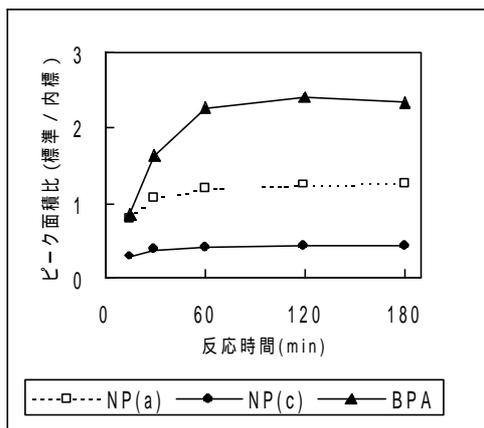


図 3 誘導体化反応時間

次に反応時間について検討を行った。同様にノニルフェノール、ビスフェノールAを含む0.4mLにMBTFA 100  $\mu$ L添加し反応時間を 15、30、60、120、180分で誘導体化を行った。反応温度は、80 とした。

誘導体化の反応時間については図 3に示すように加熱時間 60分以上でほぼ一定となることがわかった。

本研究では、反応時試料容量 0.3mL、MBTFA添加量 100  $\mu$ L、反応時間80分間でT F A化を行った。

### 3.2 標準物質のマススペクトル

T F A化したノニルフェノールのクロマトグラムは、図 4に示すとおりピークが測定された。そのマススペクトルは図 5に示すとおり異性体により異なっており、比較的共通な 203、217、231、245 をモニターイオンとした。全成分の代表ではないが、この中でイオン強度の高かった231を用いて定量した。ビスフェノールAは図 6のとおり強度の強い 405を定量イオン、420をモニターイオンとした。

図 7に標準物質 (約 1  $\mu$ g/mL) のS I Mを示す。ノニルフェノール ( $m/z=231$ ) は図 7に示すようにa~eのピークに分かれた。bは分離が不十分なため、2ピークの合計で定量した。

分析においての問題は、注入回数が増える(カラムが汚れてくると) 図 8に示したとおりビスフェノールAの検量線が直線から2次曲線になった。図 9に示したノニルフェノール

では、影響が少なかった。そのため試料と標準は、同時に誘導体化し、測定することとした。

### 3.3 誘導体化しない場合の結果

ノニルフェノール、ビスフェノールAとも誘導体化しなくてもピークが検出され分析が可能と考え検討を行った。図 10にノニルフェノールのT F A化前後のクロマトグラムを示した。ノニルフェノールについては、カラム状態の良い時において誘導体化した場合に比べ検出限界が5倍程度悪いが定量は可能であった。しかし、注入回数が増える(カラムが汚れると)とピークが検出されなくなった。ビスフェノールAについては、誘導体化を行わないとピークがブロードになり、再現性が悪く定量ができなかった。

### 3.4 河川水での回収率、検出限界

河川水 250mLに標準 1  $\mu$ gを添加し7回の繰り返し実験を行った結果、ノニルフェノールの平均回収率 91%、変動係数 4.8%であり、ビスフェノールAは 87%と 4.2%であった。

検出限界については、ピーク面積 3000として、ノニルフェノール、ビスフェノールAとも 0.04  $\mu$ g/Lであった。(ビスフェノールAは、カラム状態により数倍よくなることもある)。なお、標準偏差の3倍を以て検出限界とする場合は両物質とも 0.3  $\mu$ g/Lとなった。

### 3.5 調査結果

本法を用いて、三重県北部の7河川について10回の調査を行った。その結果を表 2、3に示す。7河川とも微量ではあるがノニルフェノール、ビスフェノールAが検出された。年間を通じた結果ではないが、春から夏にかけて両物質とも減少傾向にあった。今回の調査での最高値は、ノニルフェノールは 0.81  $\mu$ g/L、ビスフェノールAは 1.6  $\mu$ g/Lであった。

両物質とも比較的濃度が高かった天白川の濃度分布について調査を行った。

図 11にノニルフェノールの6月と7月の河川の濃度分布を示した。上流から下流に濃度の

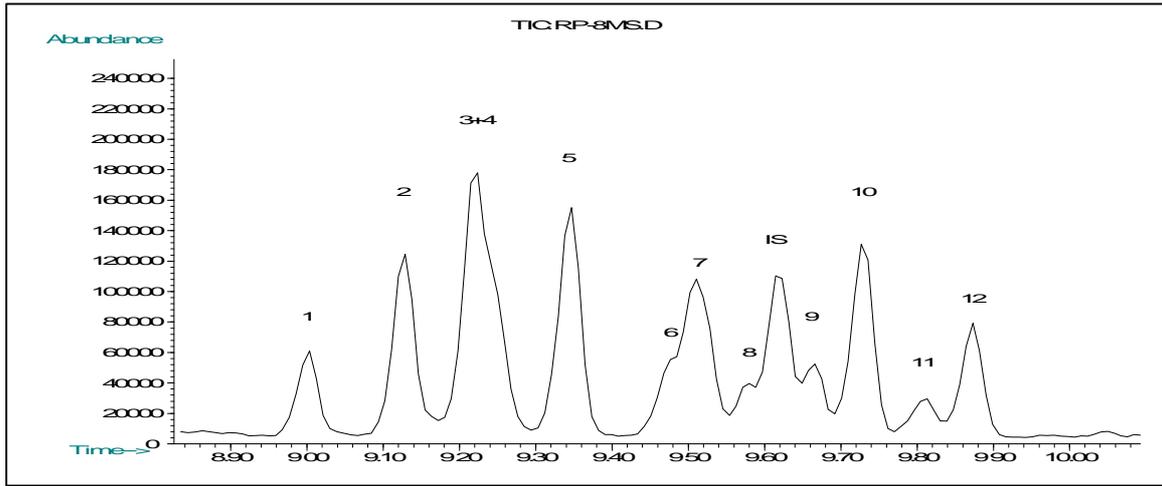
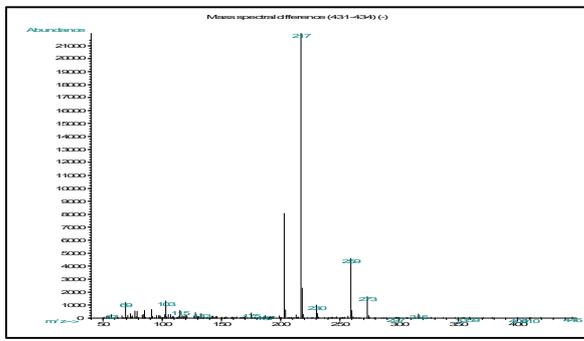
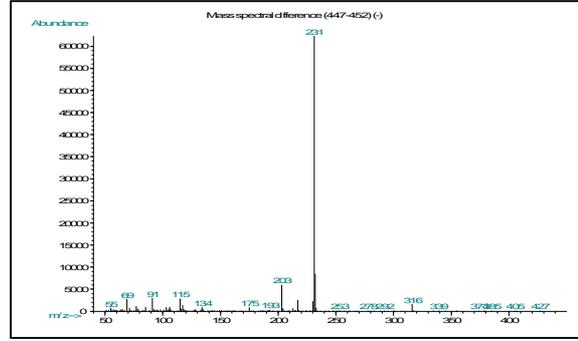


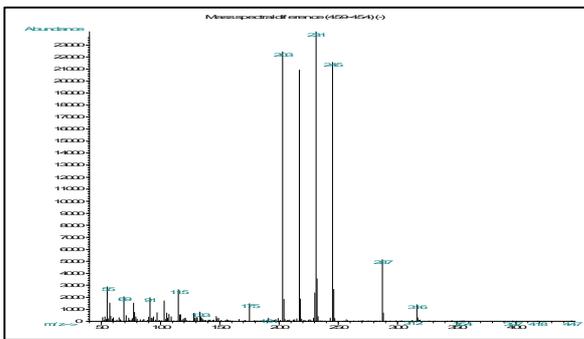
図 4 TFA化したノニルフェノールのクロマトグラム (TIC Scan)



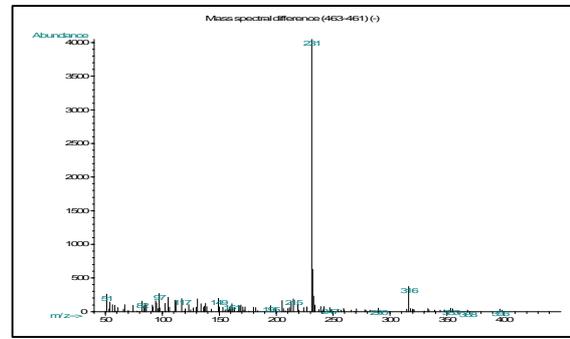
ピーク 1



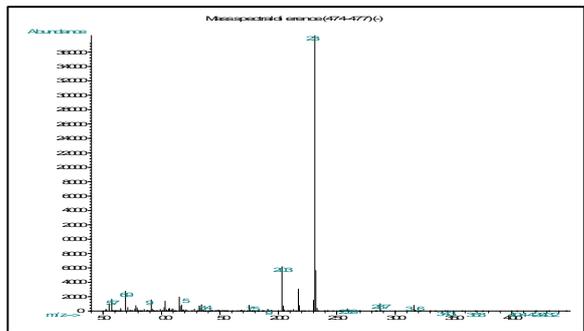
ピーク 2



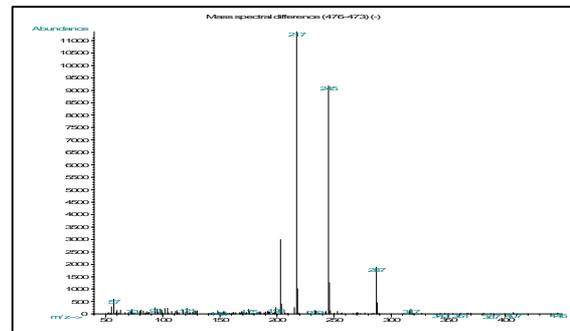
ピーク 3 + 4



ピーク 5

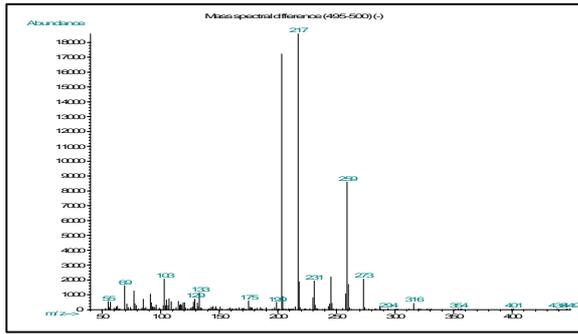


ピーク 6

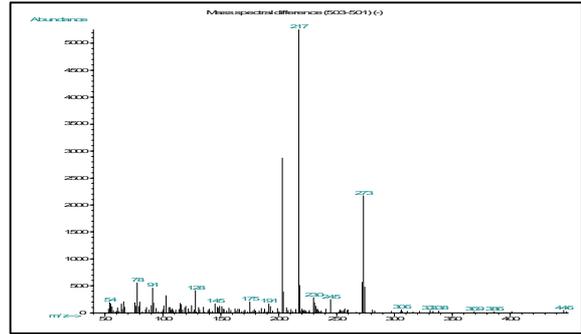


ピーク 7

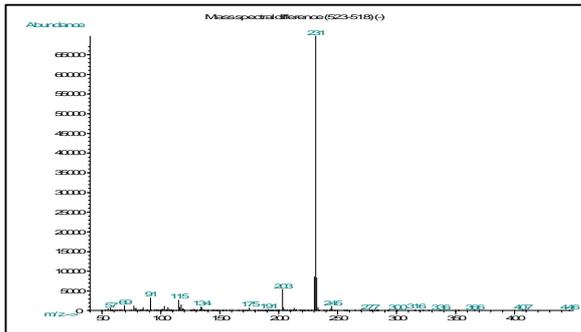
図 5-a TFA化したノニルフェノールのマススペクトル



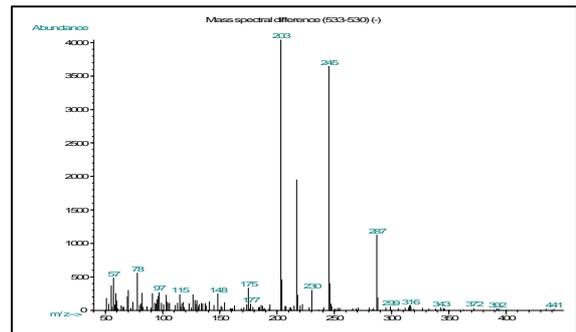
ピーク 8



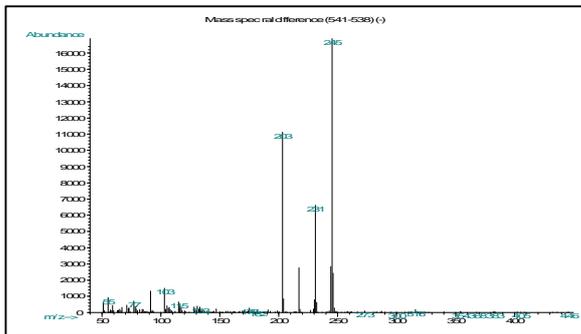
ピーク 9



ピーク 10



ピーク 11



ピーク 12

図 5-b TFA化したノニルフェノールのマススペクトル

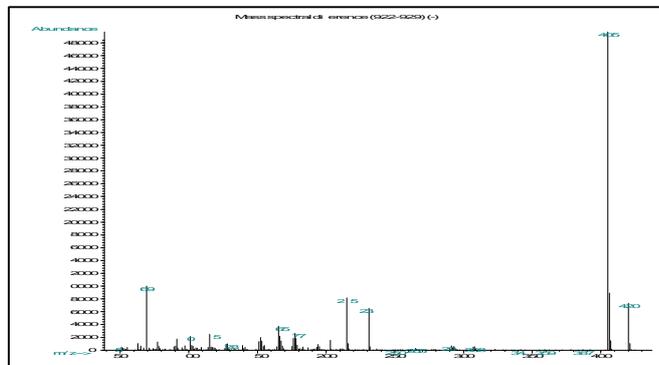


図 6 TFA化したビスフェノールAのマススペクトル



図 7 標準物質 (約 1 µg/mL) のSIM

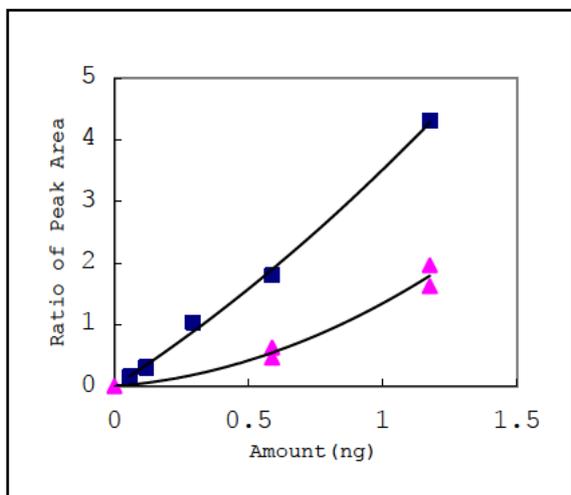


図 8 ビスフェノールAの検量線

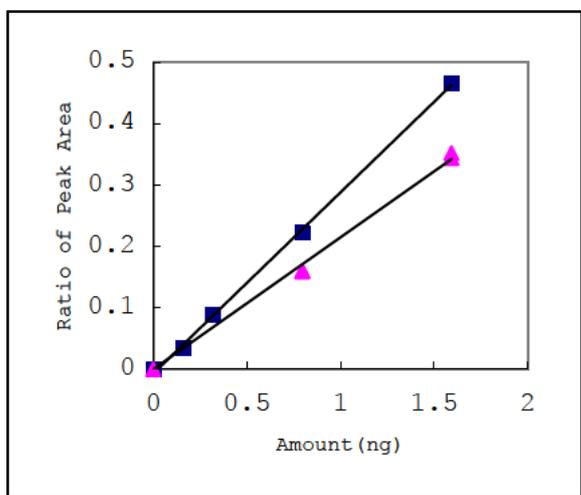
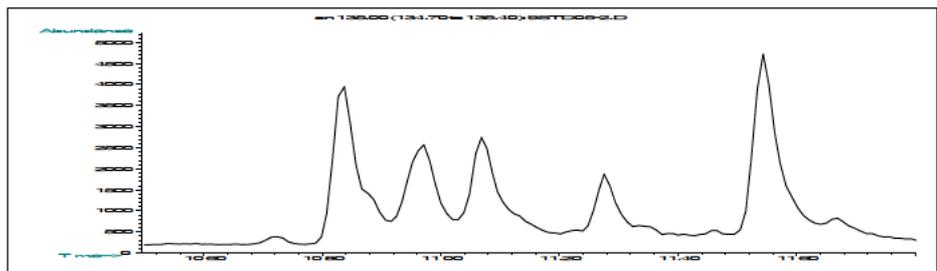
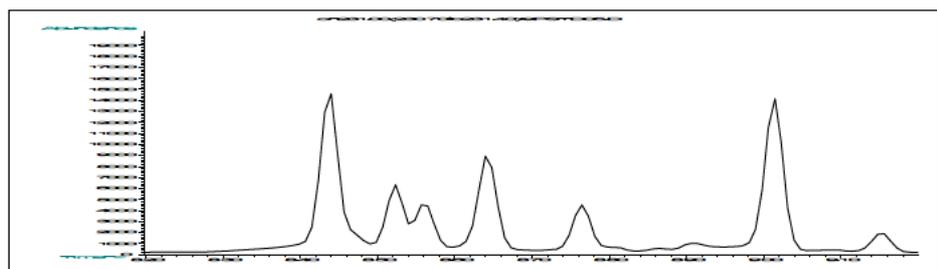


図 9 ノニルフェノールの検量線



T F A 化 前



T F A 化 後

図 10 ノニルフェノールのTFA化前後のクロマトグラム

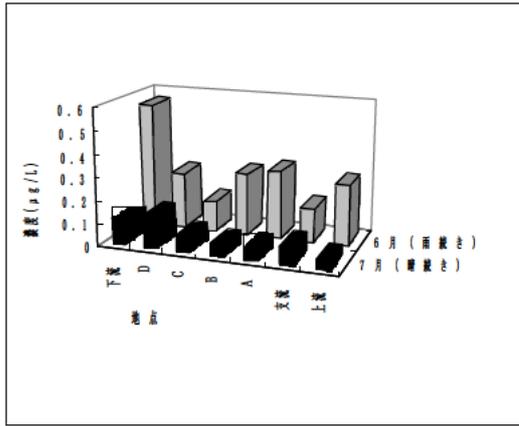


図 11 ノニルフェノールの濃度分布

上昇がみられた。同様に、図 12 にビスフェノール A の濃度分布を示した。ビスフェノール A は、ノニルフェノールと逆のパターンで上流部で濃度が高く下流に行くに従って低くなった。

天白川は、上流部に廃棄物処理場が、下流部に下水処理場があり、また、工場排水を含む支流もあり、これらが影響しているものと考えられる。

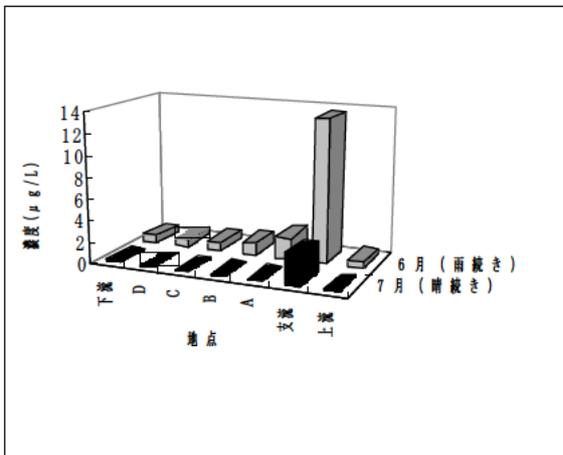


図 12 ビスフェノール A の濃度分布

#### 4. 考察とまとめ

(1) ノニルフェノールは異性体の混合物であるが標準試料と河川水試料のクロマトパターンはほぼ一致し、a~eの個々のピークから求めた定量値もほぼ同じであった。定量値は5本のピークの平均値として求め、検出下限値は河川水試料で5ピークとも検出される値とした。

なお、工場排水の混入している河川水の一部でピークb、dの後に妨害ピークが重なることがあったが、パターンは標準と類似しており、他の3ピークで定量すれば問題なく定量できた。

(2) この方法によりノニルフェノールとビスフェノール A の同時分析が可能であった。今後、オクチルフェノールなどのアルキルフェノール類の同時分析の検討や、誘導体化時におけるマトリックスの影響を考慮しサロゲート化合物の添加等の検討も必要と考える。

(本研究の一部を、第1回日本水環境学会シンポジウム(平成10年9月、滋賀県草津市)において発表した。)

#### 参考文献

- 1) 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 p.193-231
- 2) 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 p.58-77
- 3) 奥村為男：C<sub>18</sub> 固相カートリッジ補集・GC/MS法によるノニルフェノールの分析と河川水中濃度、第7回環境化学討論会 講演要旨集、p.74-75(1998)
- 4) 佐来栄治、早川修二、市岡高男、加藤進、高橋正昭：河川水中のノニルフェノールおよびビスフェノール A の分析、第1回日本水環境学会シンポジウム講演集、p.74-75(1998)

表 2 河川別ノニルフェノールの調査結果

河川名\採水日時	4/28	5/11	5/28	6/9	6/25	7/7	7/27	8/6	9/3	10/5
員弁川	0.15	0.086	0.090	0.13	0.16	0.058	0.13	0.063	0.060	nd
朝明川	0.077	0.093	0.23	0.23	0.17	0.040	0.019	0.053	nd	0.064
海蔵川	0.10	0.084	0.16	0.14	0.22	0.056	0.15	0.055	0.046	nd
三滝川	0.062	nd	0.15	0.13	0.14	0.047	0.058	0.067	0.057	0.063
天白川	0.29	0.81	0.69	0.52	0.66	0.49	0.50	0.15	0.20	0.37
鈴鹿川	0.13	0.055	0.15	0.11	0.25	0.069	nd	nd	0.069	nd
金沢川	0.18	0.23	0.48	0.34	0.59	0.23	0.34	0.27	0.35	0.30

単位 μg / L  
nd:<0.04

表 3 河川別ビスフェノールの調査結果

河川名\採水日時	4/28	5/11	5/28	6/9	6/25	7/7	7/27	8/6	9/3	10/5
員弁川	0.39	0.063	0.050	nd	0.17	nd	nd	nd	nd	nd
朝明川	nd	0.067	0.11	0.044	0.11	nd	nd	nd	nd	nd
海蔵川	0.58	0.11	0.096	0.083	0.25	0.14	nd	nd	nd	nd
三滝川	0.39	nd	0.15	0.10	1.6	0.044	nd	nd	nd	nd
天白川	0.98	0.61	0.88	0.46	0.45	0.34	0.42	nd	nd	0.23
鈴鹿川	0.37	0.10	0.14	0.13	0.19	0.051	nd	nd	nd	nd
金沢川	0.43	0.19	0.25	0.24	0.43	0.13	0.077	0.054	0.046	0.041

単位 μg / L  
nd:<0.04

## A Study on Simultaneous of Endocrine Disruptors in River Water

SARAI Eiji, HAYAKAWA Shuji, ICHIOKA Takao and KATO Susumu

The purpose of this study was to investigate, simultaneous determination of endocrine disruptors, such as nonylphenol and bisphenol A, solid phase extraction(Sep-Pak tC18), derivetization(TFA) and identification by GC/MS.

The average recovery and coefficeint of variation from spiked synthetic river water water are 91% and 4.8%, for nonylphenol and 87% and 4.2% for bisphenol A. River water in the northern area was analyzed using the proposed method. Trace amount of nonylphenol and bisphenol A were identified in seven major rivers.