

[内分泌攪乱化学物質のGC分析]  
(第229回 ガスクロマトグラフィー研究会特別講演会)

於；国立公衆衛生院 講堂

1998年12月4日

日本分析化学会  
ガスクロマトグラフィー研究懇談会



# 「内分泌攪乱化学物質のGC分析」

第229回ガスクロマトグラフィー研究会特別講演会（平成<sup>10</sup>年12月4日）

主催 日本分析化学会 ガスクロマトグラフィー研究懇談会

於：国立公衆衛生院 講堂

## 目次

### I. プログラム

### II. 基調講演

1. 内分泌攪乱物質問題の概要 ..... 1  
(国立公衆衛生院) 内山巖雄
2. 外因性内分泌攪乱物質と分析科学 ..... 15  
(星薬科大学) 中澤裕之

### III. 主題講演

1. 環境水中のフタル酸エステル, アルキルフェノールおよびビスフェノールAの分析 ..... 23  
(都立衛生研究所) 鈴木俊也
2. ノルフェノールおよびクロルフェノールの生物濃縮実験とGC-MS分析 ..... 39  
(滋賀県環境センター) 津田泰三
3. ムラサキイガイ中の有機塩素化合物の分析 ..... 49  
(神奈川県環境科学センター) 飯田勝彦

### IV. 技術講演

1. エストラジオール17- $\beta$ の分析 ..... 59  
(環境管理センター) 鳥貝 真
2. 内分泌攪乱物質の標準品について ..... 69  
(林純薬) 木村良夫
3. 内分泌攪乱物質分析における固相抽出法とGC大量注入法の利用 ..... 79  
(GLサイエンス) 佐々野僚一
4. 内分泌攪乱物質分析のGC条件 ..... 95  
(横河アナリカルシステムズ) 佐久井徳広
5. 内分泌攪乱物質分析における負化学イオン化法GC-MSの応用 ..... 103  
(島津製作所) 宮川治彦
6. 内分泌攪乱物質分析の磁場型及び四重極MSにおけるデータ比較 ..... 113  
(日本電子) 上田祥久

### V. 広告

### VI. 会員名簿



## プログラム

開会挨拶 10:00～10:20

### 【基調講演】

1. 内分泌攪乱物質問題の概要 10:20～11:00  
(国立公衆衛生院) 内山巖雄
2. 外因性内分泌攪乱物質と分析科学 11:00～12:00  
(星薬科大学) 中澤裕之

### 【主題講演】

1. 環境水中のフタル酸エステル, アルキルフェノールおよびビスフェノールAの分析 13:00～13:30  
(都立衛生研究所) 鈴木俊也
2. ノニルフェノールおよびオクチルフェノールの生物濃縮実験とGC-MS分析 13:30～14:00  
(滋賀県環境センター) 津田泰三
3. ムラサキイガイ中の有機塩素化合物の分析 14:00～14:30  
(神奈川県環境科学センター) 飯田勝彦

### [休憩]

### 【技術講演】

1. エストラジオール17- $\beta$ の分析 14:45～15:15  
(環境管理センター) 鳥貝 真
  2. 内分泌攪乱物質の標準品について 15:15～15:35  
(林純薬) 木村良夫
  3. 内分泌攪乱物質分析における固相抽出法とGC大量注入法の利用 15:35～15:55  
(GLサイエンス) 佐々野僚一
  4. 内分泌攪乱物質分析のGC条件 15:55～16:15  
(横河アナリィカルシステムズ) 佐久井徳広
  5. 内分泌攪乱物質分析における負化学イオン化法GC-MSの応用 16:15～16:35  
(島津製作所) 宮川治彦
  6. 内分泌攪乱物質分析の磁場型及び四重極MSにおけるデータ比較 16:35～16:55  
(日本電子) 上田祥久
- 質疑応答 16:55～17:30

展示コーナー； 関連メーカーによるカタログ展示(3-1講義室；無料)  
懇親会； 17時30分より食堂にて開催。



## 基調講演の部

内分泌攪乱物質問題の概要

(国立公衆衛生院)

内山巖雄

外因性内分泌攪乱物質と分析科学

(星薬科大学)

中澤裕之





# 内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の概要

国立公衆衛生院 労働衛生学部 内山 巖雄

## 1. 内分泌攪乱化学物質の概念

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）という概念は、まだ科学的に定まったものではない。最初にその概念を提唱し世に知らしめたのは「Our Stolen Future」(邦題「奪われし未来」)[1]であろう。この著書の一人であるコルボーンは、1991年の「野生生物や人に対する合成化学物質の影響」に関する国際会議で「Endocrine Disrupting」(内分泌攪乱)という用語が初めて採択されたと述べている。環境庁の「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」の中では、「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」を意味するとしており、さらに、「環境中に存在するいくつかの化学物質が、動物の体内のホルモン作用を攪乱することを通じて、生殖機能を阻害したり、悪性腫瘍を引き起こすなどの悪影響を及ぼしている可能性がある」との指摘がなされていることを「外因性内分泌攪乱化学物質問題」と呼んでいる。また米国EPAは、もう少し内分泌作用とその過程を具体的に表現し、「生体の恒常性、生殖、発育、行動に關与する正常なホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、作用またはその消失などの諸過程を阻害する外来性の物質」と定義している。

用語としては、最初に注目されたエストロジェン作用から、英語では“Environmental Estrogens”, “Environmental Hormones”などが使用され、さらに前述の国際会議以降、“Endocrine Disruptors”, “Endocrine Disrupting Chemicals (Substances)”などが使用される様になっているが、「環境ホルモン」という用語がわが国の

マスコミに紹介されて、この用語が一躍ポピュラーになってしまった。環境庁は正確を期す意味で「外因性」をつけているが、厚生省はその後「内分泌攪乱化学物質」を正式名とし、環境庁は一般に普及した環境ホルモンを生かして、必要な場合は「内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)」と表現している。先日東京で行われた国際シンポジウムでも、多くの外国の参加者が略語としてEDCsを使用していたが、内分泌系だけではなく、免疫系を攪乱する可能性を持つ物質もあることから、用語はまだ流動的といえるかもしれない。

## 2. 内分泌攪乱化学物質の四つのカテゴリー

内分泌攪乱化学物質は一般的に以下の四つのカテゴリーに分けて考えると理解しやすい。

- 1) 医薬品として使用するために意図的に合成されたもの：合成女性ホルモン、ピルなど
- 2) 人間以外に使用するために意図的に合成されたもの：家畜用合成成長ホルモンなど
- 3) 結果的にホルモン作用を持つもの：農薬、合成化学物質、ダイオキシン類など
- 4) 天然に存在する植物エストロジェン：大豆製品など

1) の例としては医薬品として開発されたジエストルベストロール (DES) がある。DESは夢の合成女性ホルモンともてはやされ、1940年以降主に米国で切迫流産の治療に多用された。しかし、1953年にその効果を否定する論文が発表され、それ以後は使用頻度が低下したという歴史を持つ。ところが、妊娠初期に母体にDESが投与された場合、その子供(20歳前後)に発生する生殖器あるいは性腺の異常が注目されるようにな

った。さらに通常高齢者にしか見られない比較的希な  
 膵腺がんが若年婦人に発症するのに注目したHerbstら  
 [2] が、1971年に8名の膵腺がんを発症した患者の母親  
 のうち7人が妊娠初期にDESを投与されていたことを報  
 告し、その因果関係を示唆して大きな反響を呼んだ。  
 FDAは直ちに妊娠中の女性にDESを投与することを禁  
 止したが、1978年までの統計で膵腺がん213例中347例  
 にDES摂取歴があることが確認され、DESの使用頻度  
 が減少した後は、膵腺がんの発症頻度は低下している  
 ことが示されている [3] (図1)。これはDES症候群と  
 よばれるが、医薬品として開発された化学物質が、内  
 分泌攪乱作用を示した例である。幸いなことにDESは  
 わが国では流産防止の目的で使用されていなかったの  
 で、大きな被害は出ていない。

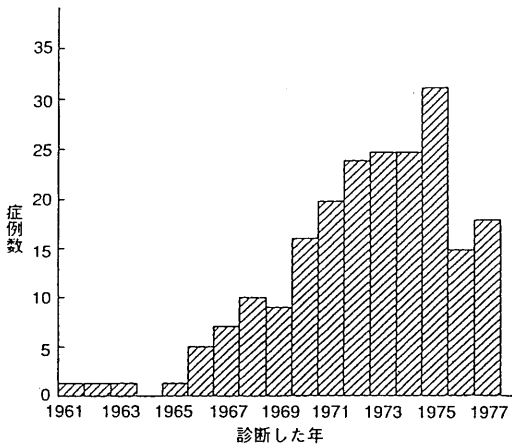


図1 DESに関係した膵がんと診断された症例数の年次  
 推移 (A. L. Herbstら、1979より)

自然界には古くから女性ホルモンである植物エスト  
 ロジェンの存在が知られていた。これらは  
 Phytoestrogensと呼ばれているもので、代表的なものは  
 大豆およびその製品に含まれるイソフラボン類や、亜  
 麻仁油に含まれるリグナン類である。特に大豆を多く  
 食するアジアの国では、欧米に比べて乳がんが少ない  
 のもこれらの植物性エストロジェンが関与していると  
 の説もある。その理由は、乳がんはエストロジェン量  
 に依存するがんとして知られているが、自然なエスト  
 ロジェンよりも作用の弱い植物エストロジェンが先に

エストロジェン受容体と結合してしまうために、本来  
 の作用の強いエストロジェンが活性化されないためと  
 考えられている。しかし大量に摂取すれば、女性ホル  
 モンバランスに影響を与えることも考えられる。事実、  
 大量の植物エストロジェンを含むクローバのみを飼料  
 として食べさせられたオーストラリアの羊に流産や死  
 産の影響が出たことが知られている。植物とそれを食  
 べる動物は、それぞれの進化の過程で、適当なバラン  
 スを保ってお互いを利用してきた経緯があり、植物性  
 エストロジェンと現在問題となっている内分泌攪乱化  
 学物質とを同等に扱うわけにはいかないであろう。

我々が現在問題としているのは、3) のカテゴリーで  
 ある、本来別の目的のために合成された化学物質、あ  
 るいはダイオキシン類のように非意図的に生成する化  
 学物質の中に、エストロジェン作用を持つものあるい  
 はその疑いがある物質があり、それらが我々の身の周  
 りの一般環境の中にも存在しているということである。

### 3. ホルモン攪乱作用の可能性とメカニズム

ホルモンは古典的な定義では、生体の特定の器官で  
 作られて直接血液中に放出され、血流によって遠隔の  
 標的組織まで運ばれて、微量で種々の生理作用を引き  
 起こす有機化合物である。図2に代表的な内分泌器官と  
 その役割を示した。しかし、最近の研究によって現在の  
 定義では、生体内で作られ、血液、リンパ液、組織  
 液を介して微量で細胞・組織に種々の生理作用を引き  
 起こす物質 (有機化合物とは限らない) ということに  
 なる。従って生体の外部環境で作られたもの (自然の

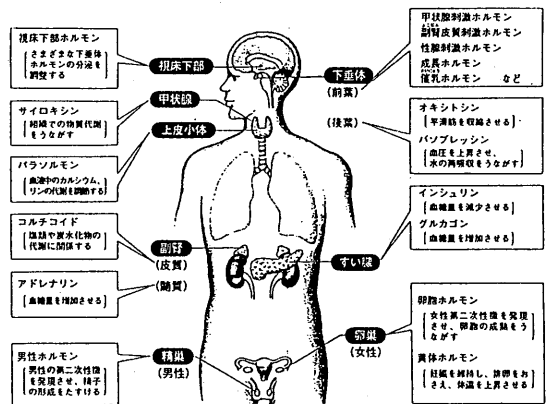


図2 おもな内分泌器官とホルモンの働き

ものまたは人工的な化学物質が生体内に取り込まれてホルモンに似た作用を引き起こすことは十分に考えられる。内分泌攪乱作用を起こす部位とそのメカニズムの可能性はEPAの概念に従って以下の様に分けて考えると理解しやすい。

1) ホルモン合成の異常

- \*ステロイド合成に特異的な酵素過程の阻害
- \*タンパクホルモンのグリコシレーションの過程の変化
- \*非タンパク、非ステロイド系ホルモンの合成阻害

2) 貯蔵または放出の異常

- \*生体内のホルモン標準濃度の維持に重要な貯蔵を阻害
- \*放出のメカニズムの阻害

3) ホルモンの輸送の異常

- \*ホルモンは遊離、または結合体として血中を輸送されるが、脂肪親和性ホルモンは、肝臓で合成された特異的輸送タンパクによって運ばれる。これら輸送蛋白の血中濃度の調節を阻害

4) クリアランスの異常

- \*ホルモンは不要になれば体内から消失(クリアランス)するが、内分泌攪乱化学物質はクリアランスに関与する肝臓の酵素系の変動を引き起こす。例えば、肝臓のミクロソーム・モノオキシゲナーゼ活性の誘導 (DDT)、UDP-グルコシルトランスフェラーゼの増加 (ダイオキシン) などが知られている。

5) 受容体の識別または結合の異常 (後述)

- \*受容体機能の障害
- \*受容体との親和性による競合作用
- \*受容体との親和性による拮抗作用

6) 受容体結合後のシグナル伝達過程の異常

- \*カルシウムイオン依存の細胞反応の阻害 (鉛、カドミウムなど)
- \*プロテインキナーゼCの活性低下、亢進 (タモキシフェン)

以上のうち、ホルモン攪乱作用のメカニズムとして細胞・分子レベルで知られているのが5)のレセプター(受容体)の識別または結合の異常である [4]。生理的エストロジェンであるエストラジオール-17βは、細胞の核内でエストロジェン受容体と結合してこれが遺伝

子を活性化させ女性ホルモン作用が起こる (図3)。これが正常の生理作用であるが、DDTやDES (合成エストロジェン) などの内分泌攪乱化学物質もこのエストロジェン受容体にピッタリ合ってしまうので、生体は生理的エストロジェンと間違えて同じ様な反応を起こしてしまう (図4)。従ってこれらの物質はエストロジェン作用を持つ物質とも言える。一方ダイオキシンやPCBの場合は、エストロジェン作用というよりはエストロジェン攪乱作用である。図5の様に細胞内に入ったダイオキシンはアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) に結合する。これが核内に入って遺伝子を活性化し、チトクロームP-450酵素の合成を促し女性ホルモンの攪乱を起こすと考えられている。また、DDTの代謝物質であるDDEには抗男性ホルモン作用があることが知られているが、図6に示したように、DDEはアンドロジェン受容体と結合するが、DNAとは結合しないために男

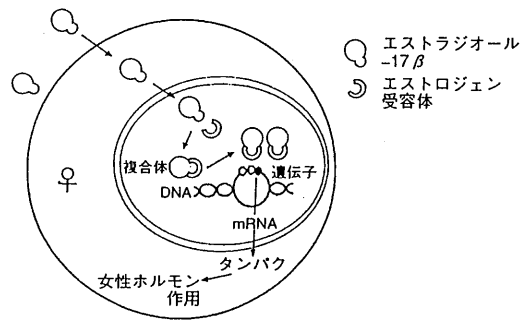


図3 ホルモン作用のメカニズム (エストラジオール-17βの場合) (文献 [4] より)

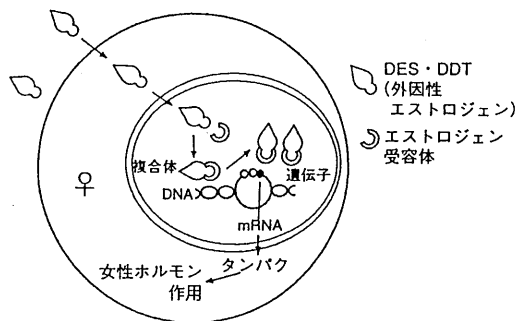


図4 ホルモン作用のメカニズム (外因性エストロジェンの場合) (文献 [4] より)

性ホルモン作用を引き起こす事はなく、生理的男性ホルモンの作用を妨害するのである。これは男性ホルモン阻害作用と言える。

#### 4. 野生生物への影響

これまでに、貝類、魚類、は虫類、鳥類、哺乳動物といった野生生物の生殖機能異常、生殖行動異常、雄の雌性化、孵化能力の低下など多数の報告がある [5] (表1)。これらの報告は1990年代に入ってから急増して

いるが、これは1991年の前述の国際会議の影響が大きいと思われる。

これらの中で最も有名なのが、フロリダのアポプカ湖のワニに見られた生殖異常であろう。これは1980年に事故により大量のDDTや農薬が湖に流れ込み、その後1m前後の幼若のワニの数が激減し、現在でも回復していない。事故後の卵の孵化率の低下に加え、雄のペニス非常に小さく正常な生殖ができないばかりでなく男性ホルモン濃度も低く正常な性行動もとらないた

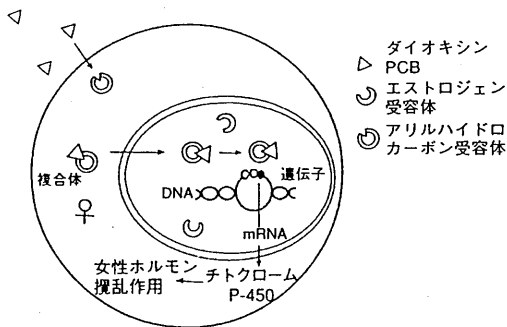


図5 ホルモン作用のメカニズム (ダイオキシン, PCB の場合) (文献 [4] より)

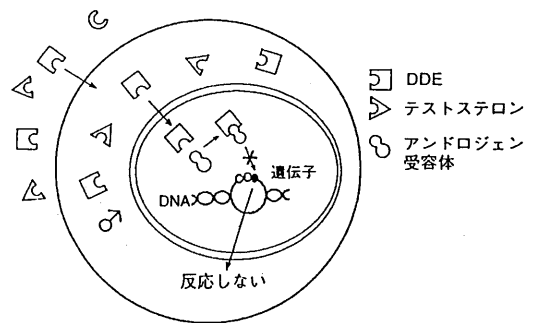


図6 ホルモン作用のメカニズム (DDEの場合) (文献 [4] より)

表1 野生生物への影響に関する報告

生物	場所	影響	推定される原因物質	報告した研究者	
貝類	イボニシ	日本の海岸	雌性化、個体数の減少	有機スズ化合物	Horiguchi et al. (1994)
魚類	ニジマス	英国の河川	雌性化、個体数の減少	ノニルフェノール * 断定されず	Sumpter et al. (1985)
	ローチ (鯉の一種)	英国の河川	雌雄同体化	ノニルフェノール * 断定されず	Purdom et al. (1994)
	サケ	米国の五大湖	甲状腺過形成、個体数減少	不明	Leatherland (1992)
	ワニ	米フロリダ州の湖	雄のペニスの矮小化、 卵の孵化率低下、個体数の減少	湖内に流入したDDTなど 有機塩素系農薬	Guillette et al. (1994)
鳥類	カモメ	米国の五大湖	雌性化、甲状腺の腫瘍	DDT、PCB * 断定されず	Fry et al. (1987) Moccia et al. (1986)
	メリケンアジサシ	米国ミシガン湖	卵の孵化率の低下	DDT、PCB * 断定されず	Kubiak (1989)
哺乳類	アザラシ	オランダ	個体数の減少、免疫機能の低下	PCB	Reijnders (1986)
	シロイルカ	カナダ	個体数の減少、免疫機能の低下	PCB	De Guise et al. (1995)
	ビューマ	米国	精巣停留、精子数減少	不明	Facemire et al. (1995)
	ヒツジ	オーストラリア (1940年代)	死産の多発、奇形の発生	植物エストロジェン (クローバ由来)	Bennetts (1946)

備考 引用文献はすべて、「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書」による。

めである。しかし、古い大きなワニは正常であるので、子供は産れてくるのである。

また、魚類の明渠から出る女性ホルモンはエストラジオール-17 $\beta$ であり、これは人間のものと共通である。エストラジオール-17 $\beta$ は肝臓のビテロジェニンという卵黄蛋白の生成を促すが、雄の体内には通常このビテロジェニンは少量しか検出されない。しかし、雄の体内にこのビテロジェニンが増加していれば、その魚の生息する川や海に女性ホルモン作用をする物質が含まれていることを示唆する。イギリスの環境庁とブールネル大学の行った調査では [6]、イギリスの五つの河川にある下水処理場の上流と下流 (F~J)、その他の河川にある下水処理場の下流 (K~M) に生息する野生ローチという魚を採取し、雄のメス化 (雌雄両性) の割合を調べたところ、対照群と比べて下水処理場の下流ではメス化が高率に生じていた (図7)。その原因として界面活性剤や可塑剤として使われるノニフェノールなどの関係が強く疑われたが、その後エストラジオール-17 $\beta$ やエストロンも検出され、人体から出る女性ホルモン或いは経口避妊薬のピルに使用されている合成エストロゲンとの疑いが強まった。わが国でも本年4月から使用が解禁される予定であったピルの使用が、事実関係がはっきりするまでという条件で解禁が延期になったのはこの事実がその一因である。

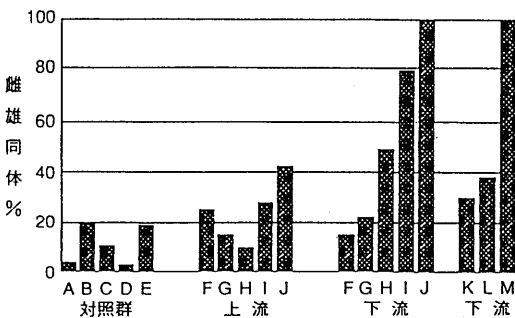


図7 メス化の兆候を示す雄ローチの比率 (UKER, 1998より)

これらの野生生物に関する報告では直接の原因や量-反応関係が明らかにされていないが、異常が認められた生物が生息する環境中のDDT、PCBやある種の農薬が関与しているのは明らかな様である。

## 5. 人の健康への影響

エストロゲン作用を攪乱する化学物質が人にも影響を与える可能性がある事を示す原点となる事実は、先にも述べた様に、1938年に合成されたジエチルスタイルベストール (DES) がその後流産防止などのために妊婦に多用された結果、それらの妊婦から生まれた女兒が成長して思春期に達した後に生殖異常や、腫瘍がんを多発しているという疫学調査であった。腫瘍がんは比較的珍しいがんで、しかも高齢になってからの発症例がほとんどであったので、若い女性に多発した原因として胎児期に母体に投与されたDESとの関連が強く示唆されたのであった。

乳がんもエストロゲンの曝露はリスクファクターとなり得ることが良く知られている。実験的には多くの環境ホルモンがヒト乳がん細胞MCF-7に対して増殖を促進し、DDTでは実験動物でプロモーション作用が認められている。人の乳がんについても疫学調査が行われており、DDTの代謝物のDDEやPCBの血中濃度との関連が調べられている。Wolffら [7] は、患者数58人の血液中のDDE濃度が11.9~44.3ppbの高濃度群では、対照群とのオッズ比は3.58 (95%信頼限界: 1.01~13.50) で乳がんの発症に有意差が認められたがPCB濃度とは有意差はなかったとしている。しかしKriegerら [8] (Wolffも共著として参加している) は、150人の乳がん患者の患者-対照研究で、患者と対照者の血液中の濃度差をプロットしていくと、図8の様にはほぼ左右対称の曲線となり、血液中のDDE、PCB濃度と乳がん発症とのリスクには有意な関係は見られなかったとしており、乳がんに関してはまだはっきりとした結論は出ていない。

実験的には微量のダイオキシンを長期に投与されたアケゲザルが高い頻度で子宮内膜症を発症することも、ダイオキシンの内分泌攪乱作用を強く疑わせるものであり、環境庁のダイオキシンのリスク評価にはこれらの可能性も考慮されている。しかし一方で否定的な意見もあり、最近増加していると言われている人の子宮内膜症の原因として、初潮の若年化と閉経の高齢化、初産年齢の高齢化と少子化、現代のストレスによるホルモンバランスの崩れなどがその原因として指摘されている。しかし多少なりともダイオキシンがその原因となり得る可能性があるならば、その対策は十分になされなければならないと考える。

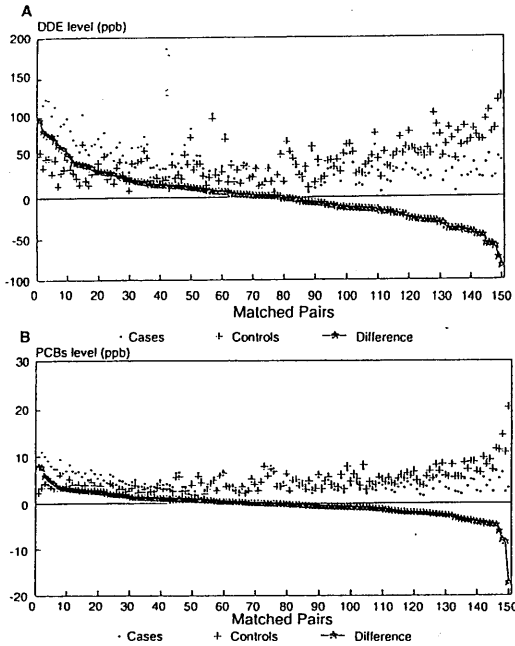


図8 DDE、PCB血中濃度と乳がんリスクの患者対照研究 (150組)  
(N. Kriegerら、J. N. Cancer. Inst., 1994より)

一方過去50年間において人の精子の量が減少しているという報告が1992年に発表されてから、それに対する賛否両論が出されている。現在わが国を含めて、統一した手法で精子数の変化に関する疫学調査が進められており、最終的な結論が得られることが期待される。実験的には、フタル酸エステル、ビスフェノールAを投与したラットやマウスで精巣停留や、雄の子供の精子数の減少、ディーゼル排出粒子を曝露したラットの精子数の減少などが報告されている。また、前立腺がんや精巣がんの増加も内分泌攪乱化学物質との関連が注目されており、今後の研究が待たれる。

これらの生殖系に関する影響に関しては、共通のメカニズム、すなわち胎児期の生殖系の分化の時期に内分泌攪乱化学物質に曝露されたことによる本来のホルモンバランスの乱れによるものであるという仮説が提唱されている [9] (図9)。人に限らずほ乳類では、胎児期の初期には性的に未分化であり、ミューラー管とヴォルフ管の両者を同時に持っている。ミューラー管抑制物質 (MIS) が適切な時期に適切な量を分泌されるとミューラー管が退化し、初めて雄の正常な表現型となる。

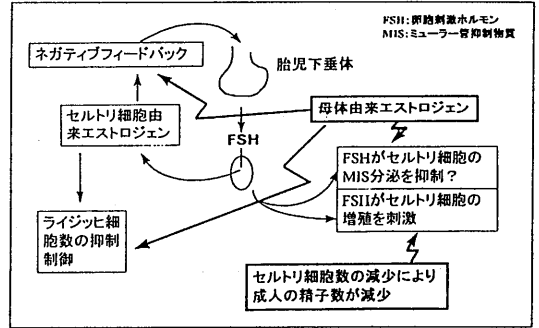


図9 胎児の睾丸のホルモンコントロール  
(R. M. Sharpeら、Lancet, 1993より)

すなわち、それに続いてヴォルフ管が雄に必要な生殖器官系を形成する。この際には胎児のライジッヒ細胞で産生される男性ホルモンであるテストステロンがこれらの分化を制御している。ミューラー管の退化が不十分な場合は、生殖器の奇形が起こる可能性、精巣の腹腔内での下降が不十分で停留精巣を引き起こす可能性、また将来腫瘍になりやすい細胞ができやすいことなどが考えられる。また、セルトリ細胞は将来の精子産生に重要な役割を果たすが、セルトリ細胞の増殖を促進する卵胞刺激ホルモン (FSH) はエストロゲンによって負のフィードバックを受けているので、胎児期に外来性のエストロゲンによってFSHの分泌が抑制されると、セルトリ細胞の増殖が抑えられ、将来の精子産生能力の低下につながる。このように胎児期の外来性のエストロゲンの作用によって、これまで指摘されてきた生殖系の異常が一元的に説明できるとされるが、動物実験では生後に内分泌攪乱化学物質を投与した場合でも、精子減少などの現象も起こっているため、全てが胎児期の曝露の影響とは言えない。しかし胎児期における内分泌攪乱化学物質への曝露が人の健康影響として最も重要なことと思われる。

また、胎児期、新生児期においては甲状腺ホルモンが脳・神経系の発達に重要な役割を果たしている。人の疫学調査において最もよく調査されているのがPCBとダイオキシンである。台湾油症事件でPCBに曝露した妊婦から生まれた子供達には、甲状腺機能低下症のためとみられる身体的、精神的発達の遅れが認められ、IQの低さは5歳~7歳になってもまだその傾向が持続していたと報告されている [10] (図10)。わが国におい

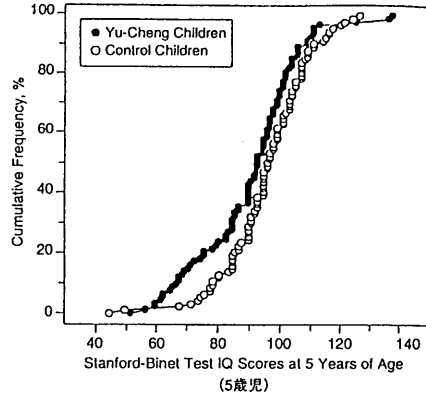
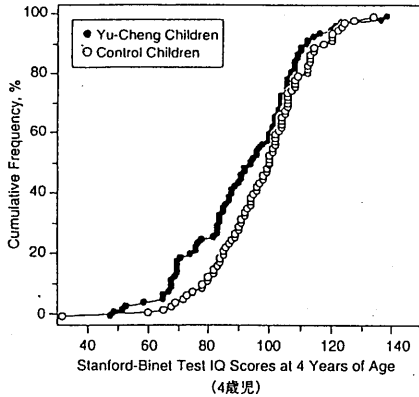


図10 IQスコアの累積度数分布 (Y-CJ. Chenら、JAMA, 1992より)

ても、Nagayamaら [11] によるとバックグラウンドレベルの曝露を受けている母親の母乳からのダイオキシン類の総摂取量と、子供の甲状腺ホルモン（サイロキシン、T4）の濃度との間に負の相関が認められると報告している（図11）。幸いT4の濃度はいずれも正常範囲内の値であるが、ダイオキシンの母乳からの摂取により、新生児の甲状腺ホルモンの減少を引き起こす可能性はあると考えられる。

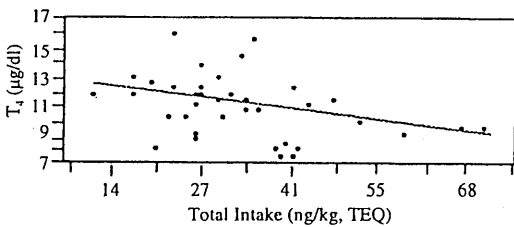


図11 母乳からのダイオキシン類の摂取と甲状腺ホルモンT4レベル (Nagayama et al., 1997より)

## 6. リスク評価の困難性

これまで述べてきたように、野生生物に対する影響はほぼ確実なものもあるが、人への影響がはっきりしたものはDESを除いてはないと言ってよいのが現状であろう。野生生物に関してもいわゆる用量-反応関係が明らかにされたものはほとんどなく、少なくともリスク評価に耐えうるデータは不十分である。リスク評価をする上での留意点を以下に列挙したが、内分泌攪乱化学物質のリスク評価には発がん物質とは多少異なる

る、新たなリスク評価手法の開発が必要と思われる。

- ①野生生物の影響の報告のほとんどが水生動物や水辺で生活する動物であり、内分泌攪乱化学物質の摂取は水系からのものが主と思われる。人の場合、食品、水の他に大気からの摂取がどの程度影響するのかが不明である。ちなみにダイオキシンの場合、大気からの摂取量は全体の摂取量の10%以下と推定されている。
- ②環境中には多数の内分泌攪乱化学物質があると推測されるが（環境庁は69の化学物質をリストアップしている）、それらが相加的に作用すると考えて良いか。
- ③例え相加的に影響するとしても、内分泌攪乱作用の強さは物質によってエストロジェンの100万分の1の強さしかないものもある。ダイオキシンの場合と同様に毒性等価係数（TEF）のようなものを定める必要があるかもしれない。
- ④これまでの報告の多くは、エストロジェン攪乱作用に関するものであるため、胎児期、新生児期の投与実験や、遅発性の影響評価を目的としたプロトコルのもとに実験や疫学調査を行うことが必要である。
- ⑤これまでの毒性学では、用量-反応関係はS字カーブを描く右上がりの曲線を考えれば良かった。しかし、内分泌攪乱作用は発がん作用やその他の一般毒性を示す投与量とは相当かけ離れた低い濃度でおこること、用量-反応曲線は、逆U字型を示す可能性があること、その影響にはいき値がないと考えるべきなのか、と言った問題が解決されないと適切なリスク評価を行うことはなかなか難しいと言わざるをえない。

⑥低濃度慢性曝露の影響よりは、胎児期の一回の曝露でも影響が出る可能性がある。この場合、成長してからその原因物質を体内から検出することは困難である。

以上の様なリスク評価の困難性はあるが、私としては内分泌攪乱化学物質対策は有害化学物質対策の一環として包括的な対策として行っていくべきと考えている。ただし、従来の有害化学物質対策のためのリスク評価が発がん性に偏っていたきらいのあったことは認めざるをえない。これからは、評価のエンドポイントをさらに一般毒性、生殖毒性、内分泌攪乱作用と広げて考えていくことで対応していくべきと考える。ダイオキシン対策や、内分泌攪乱化学物質対策を別々に考えていくことは、無駄が多いし、全体としての方向性を見失ってしまう恐れがあらう。

## 7. 英国での取り組み

米国とはやや異なる対応をしている英国では、1998年1月に環境庁が国民に対して、「環境中の内分泌攪乱物質：何をなすべきか」[6] という国民との意見交換のための報告書を出し、優先的に取り組むべき研究分野などを提示するとともに、産業界が内分泌攪乱化学物質とされる化学物質の環境への排出を抑制し、代替品の導入などに取り組むことを提案し、広く国民に対して意見を求めている。この報告書では、問題点がわかりやすくまとまっているので以下にその主な点を紹介してみたい。

### 1) 優先取り組み物質のカテゴリ

- \*ポリ塩化有機化合物：PCB、ダイオキシン類
- \*農薬
  - 有機塩素系農薬：DDT、ドリン類、リンデン
  - その他の農薬：アトラジン、シマジン、トリブチルチルなど12種
- \*アルキルフェノールおよびアルキルフェノール・エトキシレート：
  - ノニフェノール、ノニフェノール・エトキシレート、オクチルフェノール、オクチルフェノール・エトキシレート
- \*ステロイド類：(避妊薬)
  - エチニル・エストラジオール、17 $\beta$ -エストラジオール、エストロン
- \*その他の合成化学物質

ビスフェノールA：(ポリカーボネートとエポキシ樹脂の成分)

フタル酸化合物：(プラスチック可塑剤)

### 2) 重要な問題点

- \*どの化学物質に我々は関心を払うべきか？
- \*それらの化学物質に曝露されている範囲と程度は？
- \*それらの化学物質への曝露は悪影響を引き起こすのか？
- \*もし影響を受けるとすればその程度と結果は？
- \*どうしたら環境を最もうまく保護できるのか？

### 3) 特に優先すべき研究事項

- \*ホルモン攪乱のプロセスを明らかにする
- \*スクリーニング基準とテスト手法の確立
- \*リスク評価手法に改善
- \*複合影響の解明
- \*従来の毒性のみでなく複合効果の可能性の解明
- \*影響判断のためのバイオマーカーの開発
- \*内分泌攪乱効果を考慮した環境基準策定に必要な情報の提供
- \*環境中の微量測定法の開発
- \*環境媒体中の化学物質の変化と運命の調査
- \*環境中への排出抑制技術と代替物の開発

## 8. 終わりに

現代の科学の発達と化学物質文明は確かに我々の生活を豊かに暮らしやすいものとしてきた。そして、我々はより安全に過ごし易いように自然の厳しさを克服し、生活環境を変えてきたつもりだった。よくわかる環境ホルモン学(環境新聞社)の中で養老孟司教授はこう述べている【環境ホルモンとは、そう言えば、要するにジョギングの害に過ぎない。現代生活の必然なのである。—中略— だからそれが「わからない」ので、「調査して、善処します」と政府はいうのであろう。本当はそういう問題ではない。自分たちが生活しやすい環境とはどういうものか。それをはっきり考えればいいのである】。ここでいう「自分たち」とは決して人間だけの事ではない。ましてや日本人、自分の家族だけのことでもない。地球に生息する生物全てにとって生活しやすい環境と考えたい。この長引く消費活動の低迷は、昨年京都で開催されたCOP3での議論が大きく影響した日本人の賢い選択の一つかもしれない



と私は思っている。減税をしても、価格が下がっても国民が一向にものを買おうとはしないのは、老後や雇用の不安からだけでなく、大量消費を反省し、少しでも生活しやすい環境を作ろうとしている過渡期なのだと思います。

最後に内分泌攪乱化学物質に関するインターネットでの情報公開が以下の公的機関で行われているので、

興味のある方は、アクセスしてみることをお勧めする。

\* 国立医薬品食品衛生研究所：

[http// www.nihs.go.jp/hse/environ/endocrin.html](http://www.nihs.go.jp/hse/environ/endocrin.html)

\* 米国EPA：[http//www.epa.gov/endocrine/](http://www.epa.gov/endocrine/)

\* OECD：[http//www.oecd.org/ehs/endocrin.htm](http://www.oecd.org/ehs/endocrin.htm)

#### 参 考 文 献

- 1) シーアコルボーン他：奪われし未来，翔泳社，東京 (1997)
- 2) Herbst AI et al.: N. Engl. J. Med. 284, 878-881 (1971)
- 3) Herbst AI et al.: Am. J. Obstet. Gynecol. 135, 876-886 (1979)
- 4) シーアコルボーン他：よくわかる環境ホルモン学，環境新聞社，東京 (1998)
- 5) 環境庁：外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書 (1997)
- 6) U. K. Environ. Agency: Endocrine-disrupting substances in the environment: What should be done? (1998)
- 7) Wolff MS et al.: J. Nat. Cancer Inst. 85, 648-652 (1993)
- 8) Krieger N. et al.: J. Nat. Cancer Inst. 86, 589-599 (1994)
- 9) Sharpe RM et al.: Lancet 341, 1392-1395 (1993)
- 10) Yong-Cheng JC et al.: JAMA 288, 3213-3218 (1992)
- 11) Nagayana J. et al.: Organohalogen Compounds, 33, 446 (1997)

(生活衛生 42. 219-227, 1998 5)

参考資料

表1 平成8年度 環境調査(水系)結果(総括表) (水質)

(A/B:検出数/検体数、C/D:検出地点/調査地点)

	物質名	水質 (ng/ml)			
		A/B	C/D	検出範囲	統一限界値
1	フェノール	76/136	34/46	0.030-1.47	0.03
2	o-クロロフェノール	0/33	0/11		0.05
3	m-クロロフェノール	0/33	0/11		0.05
4	p-クロロフェノール	0/33	0/11		0.05
5	p-プロモフェノール	0/33	0/11		0.07
6	2,3-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
7	2,4-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
8	2,5-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
9	2,6-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
10	3,4-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
11	3,5-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.07
12	2,4,5-トリクロロフェノール	0/33	0/11		0.2
13	2,4,6-トリクロロフェノール	0/33	0/11		0.15
14	2,4,6-トリプロモフェノール	0/33	0/11		0.35
15	2,3,4,6-テトラクロロフェノール	0/33	0/11		0.25
16	ペンクロロール	0/33	0/11		2
17	ヒドロキノン	0/168	0/56		0.36
18	p-クレゾール	1/33	1/11	0.67	0.4
19	p-tert-ブチルフェノール	0/168	0/56		0.714
20	2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	0/33	0/11		0.3
21	4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	0/33	0/11		0.3
22	p-tert-ブチル安息香酸	2/33	1/11	0.2-0.6	0.2
23	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	0/33	0/11		0.2
24	メコプロップ	0/33	0/11		0.2
25	フタル酸ジブチル	5/30	3/10	0.21-1.4	0.2
26	フタル酸ジイソブチル	0/33	0/11		0.2
27	フタル酸ジヘブチル	0/33	0/11		1
28	フタル酸ジオクチル	0/33	0/11		0.2
29	フタル酸ジイソノニル	0/33	0/11		4
30	フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	4/33	2/11	4.3-6.8	3.9
31	テトラヒドロフラン	0/33	0/11		1
32	フルフラール	0/33	0/11		0.4
33	ヘキサクロロフェン	0/33	0/11		0.05
34	ビスフェノール A	41/148	18/50	0.010-0.268	0.01
35	デカブロモジフェニルエーテル	0/33	0/11		0.2
36	フサライド	0/33	0/11		0.05
37	ヘプタクロルエボキシド	0/33	0/11		0.05

表2 平成8年度 環境調査 (水系) 結果 (総括表) (底質)

(A/B : 検出数/検体数、C/D : 検出地点/調査地点)

	物質名	底質 (マイクロg/g・dry)			
		A/B	C/D	検出範囲	統一限界値
1	フェノール	110/129	45/49	0.0055-0.94	0.0054
2	o-クロロフェノール	0/33	0/11		0.009
3	m-クロロフェノール	0/33	0/11		0.0095
4	p-クロロフェノール	0/33	0/11		0.009
5	p-ブロモフェノール	0/33	0/11		0.011
6	2,3-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
7	2,4-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
8	2,5-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
9	2,6-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
10	3,4-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
11	3,5-ジクロロフェノール	0/33	0/11		0.011
12	2,4,5-トリクロロフェノール	0/30	0/10		0.0063
13	2,4,6-トリクロロフェノール	1/33	1/11	0.012	0.009
14	2,4,6-トリブロモフェノール	0/33	0/11		0.009
15	2,3,4,6-テトラクロロフェノール	0/33	0/11		0.009
16	ベンクロロール	2/33	2/11	0.011-0.014	0.01
17	ヒドロキノン	36/164	17/55	0.02-0.76	0.017
18	p-クレゾール	9/27	3/9	0.028-1.23	0.028
19	p-tert-ブチルフェノール	0/168	0/56		0.1
20	2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	0/33	0/11		0.071
21	4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	1/33	1/11	0.103	0.09
22	p-tert-ブチル安息香酸	8/33	4/11	0.021-0.06	0.02
23	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	0/33	0/11		0.022
24	メロプロップ	0/33	0/11		0.02
25	フタル酸ジブチル	7/30	3/10	0.2-0.58	0.14
26	フタル酸ジイソブチル	0/33	0/11		0.026
27	フタル酸ジヘプチル	0/33	0/11		1.5
28	フタル酸ジオクチル	3/33	1/11	1.41	0.13
29	フタル酸ジイソノニル	0/33	0/11		3.5
30	フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	16/33	6/11	0.18-22	0.15
33	ヘキサクロロフェン	0/33	0/11		0.015
34	ビスフェノール A	79/163	33/55	0.0059-0.60	0.005
35	デカブロモジフェニルエーテル	15/33	6/11	0.030-0.58	0.025
36	フサライド	0/33	0/11		0.02
37	ヘプタクロルエポキシド	0/33	0/11		0.021

表3 平成8年度 環境調査 (水系) 結果 (総括表) (魚類)

(A/B:検出数/検体数、C/D:検出地点/調査地点)

	物質名	魚類 (マイクロg/g・wet)			
		A/B	C/D	検出範囲	統一限界値
1	フェノール	63/133	27/45	0.020-0.586	0.02
20	2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	0/33	0/11		0.04
21	4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	0/33	0/11		0.058
25	フタル酸ジブチル	9/30	3/10	0.05-0.30	0.04
30	フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	9/27	4/9	0.15-0.96	0.06
34	ビスフェノール A	7/159	3/51	0.015-0.287	0.013
37	ヘプタクロルエポキシド	0/32	0/11		0.005

表4 平成8年度 環境調査 (大気系) 結果 (総括表) (大気)

(A/B:検出数/検体数、C/D:検出地点/調査地点)

	物質名	大気 (ng/m <sup>3</sup> )			
		A/B	C/D	検出範囲	統一限界値
1	フェノール	40/47	15/16	50.1-760	50
2	2,3-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
3	2,4-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
4	2,5-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
5	2,6-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
6	3,4-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
7	3,5-ジクロロフェノール	0/18	0/6		10
8	p-tert-ブチルフェノール	0/18	0/6		11
9	4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	5/18	3/6	40-70	32
10	フタル酸ジブチル	13/15	5/5	10-140	10
11	フタル酸ジイソブチル	1/18	1/6	3.3	2.5
12	フタル酸ジヘプチル	3/15	1/5	10-17	6
13	フタル酸ジオクチル	0/18	0/6		12
14	フタル酸ジイソノニル	0/18	0/6		72
15	フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	11/18	5/6	8-323	6
16	エチレンオキシド	42/51	15/17	30-300	25
17	プロピレンオキシド	30/46	12/16	16-210	16
18	テトラヒドロフラン	5/18	2/6	220-810	110
19	ビスフェノールA	0/18	0/6		24
20	フルフラール	6/15	2/5	42-120	40
21	ビス(2-クロロエチル)エーテル	0/18	0/6		56





# 外因性内分泌かく乱物質と分析科学

星薬科大学薬品分析化学教室

教授 中澤裕之

## 1 はじめに

私達は多くの化学物質を作り出し、その恩恵に預かって、快適かつ便利な生活を享受している。しかし、その一方で、我々の生きている現在の地球環境にはすでに多くの化学物質が放出され、また、現在もその行為が続いているのは紛れもない事実である。その化学物質の急性毒性や発ガン、催奇形性、変異原性などの中・長期毒性について、開発の段階においてこれまでも様々な視点から動物などを用いて研究や毒性試験がなされ、その安全性を保証している。

### 化学物質の毒性試験

暴露形態と物質例	毒性試験	内容と目的
すべての物質	急性毒性 変異原性	一回暴露による50%致死量(LD <sub>50</sub> )など 微生物を用いる試験(Ames試験など)や哺乳類培養細胞を用いた突然変異試験や染色体異常試験
長期低濃度暴露：消費者(住民)が長期にわたり低濃度の暴露を受けると予想される物質 (例) 食品添加物 残留農薬 環境汚染物質 食品混入可能自然毒	体内動態 短期毒性 長期毒性 催腫瘍性 催奇形性 繁殖毒性 遅延性神経毒性(有機リン剤のみ)	吸収、分布、代謝、排泄、蓄積の特徴 3か月程度の暴露、体重・一般症状の変化、死亡率の観察や血液学的、生化学的、病理学的検査など 3か月～一生涯の暴露 一生涯にわたり暴露、発癌性 胎児の器官形成への影響 数世代にわたり暴露、動物の繁殖能(生殖能、妊娠率、出産率など)や後世代に及ぼす影響(出産仔の発育など) 末梢神経の特異的障害作用
短期暴露： ①作業者が高濃度あるいは中程度の短期暴露を受ける可能性のある物質 (例) 製造工程の化学物質 農薬 ②消費者が同様の暴露を受ける可能性のある物質 (例) 家庭用殺虫剤 化粧品	吸入毒性 経皮毒性 皮膚・粘膜毒性 感覚器毒性	吸入暴露による50%致死量(LC <sub>50</sub> )などの一般毒性 経皮暴露による50%致死量(LD <sub>50</sub> )などの一般毒性 皮膚・粘膜への刺激性や過敏反応を生じる感作性 耳・眼などの感覚器に対する毒性

[白須泰彦, 吐出豊秋, "毒性学概論," 朝倉書店, p. 204 を参考に作成]

最近の週刊誌、新聞、TV等のマスメディアに「環境ホルモン」という用語を見ない日はない。ゴア米国副大統領が序文を記したこともあってホルボーン等の上梓した

## 内分泌かく乱化学物質と関連の出来事

- 
- 1940年代 北米・五大湖で化学物質による大規模汚染が野生生物の繁殖力減少との関連を指摘
- 1947 Bittner がホルモンとがんの関係を提唱
- 1950 DDT にエストロゲン様作用のあることが判明
- 1960年代 PCB にエストロゲン様作用のあることが判明
- 1962 「沈黙の春」(レ切尔・カーソン)
- 1970 DES (合成エストロゲン-流産防止に使用) に女兒の腫瘍
- 1979 マクララン博士 (NIEHS) らが哺乳動物の生殖、ガン化に対するエストロゲンの影響に関する会議(No.1)をスタート
- 1980 フロリダのアポプカ湖で dicofol, DDT 代謝物による汚染とワニへの影響
- 1991年7月 コルボーン博士 (世界野生生物基金) - 環境中の化学物質の野生動物、実験動物、ヒトへの影響を議論
- 1992 Carlsen 博士他 (デンマーク) が精液量と精液中の精子数が有意に減少 (1938 - 1990 年にかけて、次いで精子の運動量の低下、精子奇形率の増加が英国より発表)
- 1994年1月 No.3 会議で環境ホルモン問題を取り上げる
- 1995年7月 「化学物質による魚類の発生・生殖の変化」に関する会議 (ウイグスプレッド)
- 1996年3月 「Our Stolen Future」が出版 (コルボーン他)
- 1997年1月 Endocrine Disruptor Workshop (ワシントン DC)
- 1997年3月 「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する調査研究班」(環境庁) 発足  
「内分泌系に作用する化学物質に関する調査研究班」(通産省)  
「化学物質のクライスマネジメントに関する調査研究班」(厚生省)  
「The Feminization of Nature, Our Future at Risk」(Cadbury D)  
(訳本「メス化する自然」集英社、BBC TV 番組 Assault on the Male-  
精子数の半減)
- 1997年11月21日 NHK スペシャル「生殖異常」
- 

「Our Stolen Future」やNHK等のTVスペシャル番組が一つの契機となり、(外因性) 内分泌かく乱化学物質の生体影響や環境動態がクローズアップされた。その用語も様々で Endocrine Disruptor、Environmental Hormones、Environmental Endocrine Disruptors、Endocrine-Disrupting Chemicals 等と定まっておらず、「環境ホルモン」という用語をめぐる関連学会の発足時には紛糾する事態となった。広辞苑最新版 (1998年11月刊行) には「環境ホルモン」の項目が掲載され、「生体に性ホルモンと類似した作用をもたらす化学物質の通称。DDT、PCB、ビスフェノールAなど。内分泌攪乱物質」と明記されている。

話題の内分泌かく乱物質の特徴は、ホルモン様作用に基づいて複雑な生体機能を



微量で混乱させ、生体に傷害を及ぼす危険性が指摘されていることであろう。化学物質の安全性や暴露量評価において、これまでホルモン作用の視点で化学物質の影響を検証したケースは少なかったと言えよう。

「奪われし未来」と先の原著題名は和訳されているが、いささか過剰にマスコミにクローズアップされていると言わざるを得ないのが現状である。

今、大切なことは、この問題に対する客観的かつ科学的な認識と地道な調査研究が国家プロジェクトレベルで実施されるべきことである。「我が国では内分泌かく乱化学物質による生体影響は魚介類に見られるだけで、ヒトにはその影響は見られない」と発言する方もいるが、水俣病、カネミ油症等の過去の公害事例について新たな視点で精細な検証をなすべきではないかと思われる。

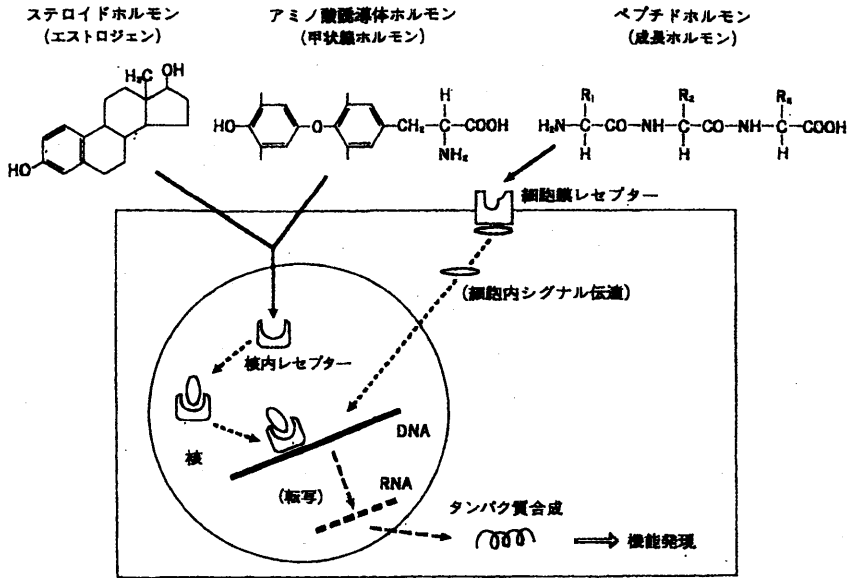
### 水質汚濁の主な事例

事件名	原因物質	発生源および場所	発生条件	健康被害の状況	備考
水俣病 (水俣昭31～、新潟昭40～)	メチル水銀	アセトアルデヒド製造工場 熊本県水俣湾(チッソ水俣工場) 新潟県阿賀野川流域(昭和電工鹿瀬工場)	工場排水→藻類プランクトン、魚介類に生物学的に濃縮、汚染魚介類の多重摂取が原因(漁民に多発)	ハンター-ラッセル(Hunter-Russell)症候群を呈す求心性視野狭窄、構音障害、運動失調、知覚異常、神経性難聴 認定患者(昭58.3末) 熊本 1360人 新潟 566人	*ほかに死亡者熊本、鹿児島549人(法施行前45人) 新潟119人(同5人) 認定申請中(昭58.3) 熊本・鹿児島5,368人 新潟63
イタイイタイ病	カドミウム	亜鉛製錬所 富山県神通川流域(三井金属神通製錬所)	鉱山の精錬排液および鉱さいと精錬時排出されたSO <sub>2</sub> との反応によるCdの溶出、鉱さい流失土壌→農作物汚染	ファンコニー(Fanconi)症候群 腎原細管再吸収障害 β <sub>2</sub> -ミクログロブリン排泄増加、骨再吸収率低下 骨軟化症による骨改変層、多発骨折 認定患者(昭58.3末) 116人(うち死亡77人)	*ほかに法施行前死亡24人以上 要観察者昭58.3末現在52人

内分泌かく乱化学物質については、ヒトへの生体影響が世代を越えて及ぼすことが懸念されており、自分達の子孫に残すべきことは、現代における化学物質による環境汚染の実態及び生態系への影響に関して、科学的なアプローチに基づくデータの蓄積である。

## 2 化学物質のホルモン様作用

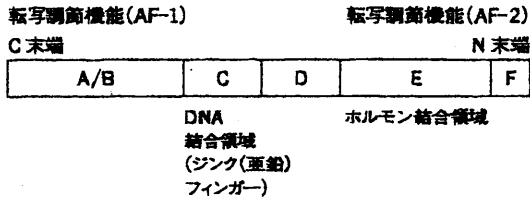
ホルモンと称される我々の生体内にある化学物質は分泌器官(松果体、視床下部、下垂体、甲状腺、消化管、膵臓、副腎、腎臓、精巣、卵巣等)から、体の恒常性を維持するために微量分泌される。血液により体内に運搬されて標的器官・細胞に作用にする——化学伝達物質の総称である。アミノ酸が連なっているペプチドホルモン、コレステロールからなるステロイドホルモン等が存在する。一方、環境ホルモンといわれている化学物質の多くはエストロゲン様作用を含めた複雑なホルモン様作用を発揮して、生殖系、免疫系、神経系などに影響を及ぼすと言われているものである。



### 代表的なホルモンの構造と作用機構

[金子秀雄他、「科学」Vol. 68, p598(1998) ]

このホルモンレセプターは特定の内分泌かく乱化学物質に対して1対1の対応(鍵と鍵穴)でなく、70種以上の合い鍵が存在するとも言われ、成体には可逆的に作用(原因物質の除去などで改善の可能性)するものの、胎児及び新生児期では不可逆的に作用する恐れが指摘されている。



### 女性ホルモンレセプターの構造

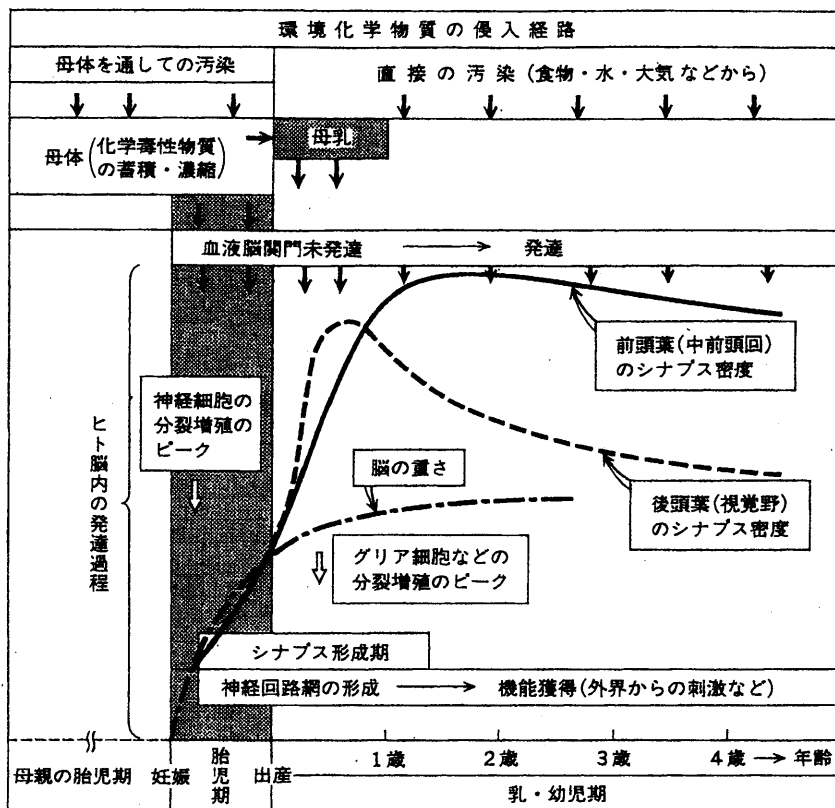
[ B.E.Gillesby et al.: Environ. Toxicol. Chem., 17, 3(1998) ]

#### 女性ホルモンレセプターαのホルモン結合領域のアミノ酸配列の種差

動物	相同性
ヒト	100%
ブタ	95
ヒツジ	95
ラット	96
マウス	96
ニワトリ	93
カエル	82
魚(ニジマス)	60

ヒトのアミノ酸配列を100%とする

[ M.R.Fielden et al.: Environ. Health Perspect., 105, 1238(1997) ]



[黒田洋一郎、「科学」Vol. 68, p582(1998) ]

### 3 生態系への影響

様々な化学物質による野生生物を含む生態系への影響が報告されている。海産巻き貝（イボニシ）、ローチ（コイ科の魚）、爬虫類（ワニ）、鳥類等に雌の雄化、雌雄同体、孵化率の低下などの影響が報告されている。ヒトに対しては腫ガンの誘導、精子数の減少、運動率の低下、奇形率の増加、乳癌の増加などが内分泌かく乱物質の関連で論じられている。これらの影響が様々な内分泌かく乱化学物質によるのではないかと指摘され、支持する調査研究もあれば、否定する内容の報告もなされ、一つの事象を断定できる状況にはない。

多くの調査研究は生殖系に及ぼす内容に関する報告であり、免疫系に及ぼす影響も指摘されているが、神経系に与える影響に関しては少なく、今後の研究成果が待たれるところである。

野生動物に対する環境ホルモンの影響

動物種	観察された影響	原因と考えられる環境ホルモン
<b>魚類</b>		
サケ	早熟、性徴がでない、胚の死亡率増加 受精率低下、エストラジオール低下、 ジヒドロテストステロン低下	PCBs、DDT、ダイオキシン、 フラン、重金属
カダヤシ	雄性化、尻鰭 <sup>ヒソビ</sup> の変化、性行動の変化	製紙工場排水
マス	オスの血中ビテロジェニン発現	下水処理場排水、ノニルフェノール、 エストラジオール、エチニルエストラジオール
ホワイトクローカー	胚の死亡率増加、閉鎖卵胞の増加	DDT
<b>は虫類</b>		
スッポン	胚の形成異常増加	PCBs、ダイオキシン、フラン
アメリカワニ	オスのテストステロン減少 メスのエストラジオール増加 多卵性卵胞、多核卵 卵の質の低下	DDE
<b>鳥類</b>		
アメリカオオセグロカモメ	ミューラー管の残遺、生殖腺の形態異常 メス同士のペアー、性行動の異常	DDT、DDE
ハクトウワシ	胚の死亡率増加、胚の形態異常 受精率の低下	PCBs、DDE、ディルドリン
ニホンウズラ	性成熟前のエストラジオールの低下 産卵数の減少	PCBs
<b>ほ乳類</b>		
ネズミイルカ	血中テストステロンの低下	p,p'-DDE
シロイルカ	卵胞の機能低下、乳がん	DDT、PCBs、マイレックス

「よくわかる環境ホルモン学」一井口泰泉、p67(1998)

#### 4 内分泌かく乱物質の検出と分析

内分泌かく乱物質の測定には培養細胞（エストロゲンレセプターを持つ細胞）の増殖を指標としたり、魚類や爬虫類、両生類を用いるバイオアッセイが次々と報告されている。一方、食品、環境試料、生体試料中の存在量は従来、当該の残留基準や使用基準をクリアする分析法でカバーできていたものの、微量での作用を論じる内分泌攪乱物質の場合、超高感度な分析法が要求されている。GC/MS、LC/MS 等のハイブリッドな機器分析法が応用されつつある。

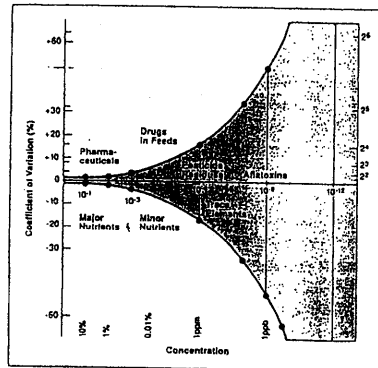
これらの分析には先の食品等の試料のように複雑なマトリックスの中から微量の測定対象物質を効率よく抽出し、共存物質を除去するような試料調製法が要求される。測定対象の内分泌かく乱化学物質の中にはこの試料調製の段階でロスするばかりでなく、試薬等からの汚染に十分留意しなければならないケースも存在する。

データだけが一人歩きする風潮の中で分析法及び分析値の信頼性をどのように確保し、保証するかも大きな課題であり、精度管理、分析法のバリデーションも重要な検討項目と言えよう。

#### 分析法のバリデーション

— 評価項目 —

- 1) 精密度 (precision)  
再現性 (バラツキ) の程度。標準偏差またはその指定した倍数で表した値。  
JIS Z8103
- 2) 正確度 (accuracy)  
かたよりの小さい程度。既知試料との比較で分析法の正確度を測定。  
JIS Z8103
- 3) 検出限界 (detection limit)  
S/N比により測定。
- 4) 定量限界 (quantitation limit)
- 5) 選択性 (selectivity)  
(例: HPLC)
  - ・ 分離能—ピーク間の分離の測定
  - ・ 理論段数—システム効率の測定
  - ・ テーリングファクター—ピーク形状の計算
  - ・ Capacity factorの測定—保持能の計算
- 6) 範囲 (定数) (range)
- 7) 直線性 (linearity)
- 8) 堅牢性 (ruggedness)
  - ・ USP (United States Pharmacopoeia) XIII Section 1225, method validation
  - ・ Step 2 of ICH (International Conference on Harmonization) process



分析施設間の変動係数と測定対象物質の濃度  
Horwitz, W. et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 1344 (1980)

#### 食品衛生検査施設における試験検査の業務管理基準

事項	現行	検討結果
1. 適用対象	・ 指定検査機関が対象	・ 国、都道府県、指定検査機関が対象
2. 信頼性保証部門について	・ 一定の資格を有する信頼性保証責任者を置く	・ 試験検査実施から独立した信頼性保証者を配置
3. 施設、機械器具、試験系の管理について	・ なし	・ 検査室の配置維持及び管理基準を規定 ・ 試験系の管理基準を規定
4. 各種標準操作手順書について	・ 指定検査機関独自で精度管理実施要領を作成	・ 試験検査等、各種の標準操作手順書の作成など試験検査実施に関する基準を規定
5. 内部精度管理について	・ なし	・ 検査の目的に応じ、技能についての評価を定期的に行うよう規定
6. 外部精度管理について	・ 食品衛生指定検査機関協議会を指定検査管理機関として指定し、年1回実施	・ 試験検査施設は外部精度管理を定期的を受け、客観的な技能評価を受けることを規定

## 化学物質毒性評価の新しい概念

従来一個々の生物への危険性を評価（急性、発ガン性等の慢性毒性試験）  
新しい概念—世代を越えて評価

### 内分泌攪乱物質の検出

#### (1) *In vitro* の系

- ①培養細胞（エストロゲンレセプターを持つ細胞）の増殖を指標
  - ・エストロゲンに対して増殖する細胞—ヒト乳癌細胞株（MCF-7,ZR-75-1,T-47-D）
  - ・例）エストロゲン— $10\text{nM}$ 、ビスフェノールA— $25\text{nM}$  で細胞増殖、プロゲステロンレセプターを誘導
  - ・代謝物が偽陰性になる傾向
- ②エストロゲン反応プロモーターや受容体遺伝子を組み込んだ分裂酵母の系

#### (2) 魚類を用いる系

- ①ニジマス—飼育、肝臓でのビテロゲニンの測定
- ②メダカ—精巣、卵巣の両方を持つ個体の確認

#### (3) 爬虫類・両生類

- ・ビテロゲニンがエストロゲン活性のバイオマーカー

## 5 因果関係の解明

生態系に報告されつつある様々な異変や、我々自身の身近にも見られるアトピー、花粉症、若年層の短絡的行動を内分泌攪乱物質との関係で論じられることも多くなった。それを否定したり、肯定する証拠は現時点において限られており、両者の因果関係を明快に言及する状況ではない。

この領域での研究は始まったばかりで、今後の課題として次のような内容が挙げられる。

- 1) 野生生物の生殖異常等の実態調査
- 2) 水、空気、土壌、生物試料などの環境モニタリングの充実と継続調査
- 3) ヒトの健康影響調査—リスク評価、疫学研究の実施
- 4) 化学物質の体内代謝及び作用機構の解明
- 5) スクリーニング法、高感度・高精度分析法の開発
- 6) 化学物質（75000種類）の複合汚染の影響の解明
- 7) 長期的調査研究の必要—一次世代への影響
- 8) 情報交換の必要—ワークショップ、学際的研究の必要性
- 9) 過去の公害事例等の再検証

## 主題講演の部

- 環境水中のフタル酸エステル, アルキルフェノールおよびビスフェノールAの分析  
(都立衛生研究所) 鈴木俊也
- ノニルフェノールおよびオクチルフェノールの生物濃縮実験とGC-MS分析  
(滋賀県環境センター) 津田泰三
- ムラサキイガイ中の有機塩素化合物の分析  
(神奈川県環境科学センター) 飯田勝彦





# 環境水中のフタル酸エステル、アルキルフェノール およびビスフェノールAの分析

東京都立衛生研究所多摩支所水質化学研究室  
鈴木俊也、矢口久美子

## 〔はじめに〕

近年、外因性内分泌攪乱化学物質（以下、環境ホルモン）による環境および食品汚染が社会問題となっている。昨年7月、環境庁から出された環境ホルモンのリストには農薬、プラスチック用可塑剤、樹脂原料、アルキルフェノール類等68成分が掲載されており<sup>1)</sup>、現在、これら環境ホルモンの環境中濃度の実態を把握することが急務となっている。環境ホルモンの中で、プラスチックの可塑剤等に使用されるフタル酸エステル類、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およびビスフェノールAはその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る<sup>2)</sup>。

当研究室では飲料水の原水である井戸水及び河川水中のフタル酸エステル、アジピン酸エステル、アルキルフェノールおよびビスフェノールAの濃度調査を行うための効率の良い一斉分析法を現在検討中である。これら化合物の分析法については既に多くの方法が報告されており、水試料からのフタル酸エステルおよびアジピン酸エステルの抽出は溶媒抽出法<sup>3)</sup>、カートリッジ型<sup>4)</sup>およびディスク型固相抽出法<sup>5)</sup>により行われている。また、アルキルフェノールおよびビスフェノールAについては、溶媒抽出法及び固相抽出法<sup>6,7)</sup>が挙げられる。測定機器としては、フタル酸エステルおよびアジピン酸エステルの場合には主にガスクロマトグラフー質量分析計（GC-MS）が用いられており、アルキルフェノールおよびビスフェノールAでは高速液体クロマトグラフ<sup>8)</sup>やGC-MS<sup>6,7)</sup>を用いた方法が報告されている。

今回は有機溶媒の使用量が少なく、抽出時間が短いディスク型固相により抽出し、化合物の選択性に優れているGC-MSを用いた方法を検討し、他の抽出法との比較を行ったので紹介する。

## フタル酸エステルおよびジカルボン酸エステルの分析

### [方法]

#### 1. 対象化合物

15種類のフタル酸エステルおよび6種類のアジピン酸エステルについて検討した(表1)。表中\*印のついている化合物は環境庁の環境ホルモンのリストに掲載されているものである。ただし、ジ-*n*-ペンチルフタレートおよびジヘキシルフタレートは検討時点では入手できなかったため省略した。

#### 2. 試薬

フタル酸エステルおよびアジピン酸エステルの標準品はジーエルサイエンスから購入した。標準液は1000 ppmのアセトン溶液として調製し、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、メタノールおよび硫酸ナトリウムは残留農薬試験用(和光純薬)を用いた。塩化ナトリウムおよび硫酸ナトリウムは350℃で8時間の熱処理をした。精製水は水道水から純水製造装置PURIC-MX(HPLC用、オルガノ)を用いて調製した。

#### 3. 抽出

固相の洗浄またはコンディショニングはこれまでに農薬等の分析時に行われている方法に準じて行った。

##### ① ディスク型固相抽出法

エムポアディスク SDB-XD (スリーエム製) : 予めソックスレー抽出装置中でジクロロメタンを用いて8時間予備洗浄したディスクをバキュームマニホールドに取り付け、ジクロロメタン5 mL、メタノール5 mL、精製水5 mLの順でコンディショニングした。水試料1 Lを流速約100 mL/minで減圧法により通水後、5分間吸引した。対象物質は溶出溶媒のジクロロメタン:アセトン(6:1, v/v)5 mLを添加し、3分間放置後溶出し、さらに、溶出溶媒2 mLと1 mLで溶出した。受器中の水をパスツールピペットで取り除き溶出液とした。

ENVI-18DSK (スペルコ製) : 上記のエムポアディスクの方法に準じて行った。ただし、ソックスレーによる予備洗浄は行わなかった。

##### ② カートリッジ型固相抽出法

セツパック PS-2 (ウォーターズ製) : ジクロロメタン5 mL、メタノール5 mL、精製水5 mLの順でコンディショニングした。水試料1 Lを流速15 mL/minでセツパックコンセントレーターを用いて加圧法により通水した。PS-2の上部に活性炭カートリッジ(AC-1、ウォーターズ製、ジクロロメタン10 mLで洗浄したもの)を取り付けバキュームマニ

ホールド（J & W社製）を用いて30分間吸引することにより脱水した。対象物質の溶出はガラス製の注射筒を用いてジクロロメタン：アセトン（6:1, v/v）5 mLで約1分間かけて行った。

### ③ 液-液抽出法

ジクロロメタン抽出：水試料1 Lに塩化ナトリウム（350℃で8時間加熱処理）50 gを加え、塩酸でpH4に調整後、はじめにジクロロメタン100 mL、次いで50 mLを用いて抽出した。

### 3. 脱水および濃縮

溶出液中の水は予めジクロロメタン10 mLで洗浄したセツパック Dry（ウォーターズ製）を用いて脱水後、窒素気流下1 mLに濃縮した。ただし、液-液抽出の場合にはジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム（750℃で6時間加熱処理）で脱水後、ロータリーエバポレーター（40℃）および窒素気流下で1 mLに濃縮した。内部標準物質（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た。

### 4. GC-MSの分析条件

GC：HP5890 II（横河アナリティカルシステムズ）、注入口220℃、スプリットレス注入法（注入量2μL、ページ時間1min）、カラムヘッド圧80 kPa、カラムHP5-MS（0.25 mmID×30 m、2.5 μm）、カラムオープン温度50℃（1 min）-10℃/min-200℃-6℃/min-300℃、分析時間32.67 min。

MS：Automass II（日本電子）、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 μA、フォトマル電圧-650 V、分解能約500。各化合物のモニターイオンは表1に示すとおりであった。

### [結果]

#### 1. フタル酸エステルおよびアジピン酸エステルのGC-MS-SIMクロマトグラム

GC-MS-SIMクロマトグラムを図1に、上記の分析条件下での各化合物の保持時間、検出限界および検量線を表1に示した。ジ- $n$ -ヘプチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートは完全に分離できなかったため、定量用モニターイオンはそれぞれ265および167とした。アジピン酸エステル類はカラムや注入口が汚れてくるとピークのテールングや保持時間のずれが認められようになる。また、この分析条件下での各化合物の検出限界は11~69 pgであり、環境庁から出されたフタル酸エステル類の目標検出限界0.2 ppbを達成するためには、水試料は500~1000倍濃縮する必要がある。

表1. フタル酸およびアジピン酸エステルのモニターイオン、保持時間、検出限界および検量線の直線性

	化合物名	モニターイオン <sup>注1)</sup>	保持時間 (min)	検出限界 (ng)	検量線 <sup>注2)</sup>
		(m/z)			(相関係数)
1	ジエチルアジベート	157, 111	11:42	0.023	0.998
2	ジイソプロピルアジベート	129, 171	12:38	0.019	0.996
3	ジメチルフタレート	163, 194	12:44	0.014	0.997
4	ジメチル- <i>p</i> -フタレート	163, 194	13:19	0.011	0.998
5	ジエチルフタレート*	149, 177	14:32	0.015	0.998
6	ジエチル- <i>p</i> -フタレート	177, 222	15:14	0.016	0.997
7	ジイソプロピルフタレート	149, 209	15:19	0.017	0.997
8	ジフェニルフタレート	189, 149	16:22	0.018	0.996
9	ジ- <i>n</i> -ブチルアジベート	129, 185	16:30	0.029	0.995
10	ジ- <i>n</i> -プロピルフタレート*	149, 209	16:41	0.007	0.997
11	ジエチルセバケート	213, 171	16:45	0.019	0.997
12	ジイソブチルフタレート	149, 223	17:48	0.020	0.998
13	ジ- <i>n</i> -ブチルフタレート*	149, 223	18:59	0.020	0.997
14	ベンジルブチルフタレート*	149, 206	24:06	0.037	0.993
15	エチルヘキシルアジベート*	129, 147	24:37	0.047	0.991
16	ジブトキシエチルフタレート	149, 193	25:41	0.045	0.992
17	ジシクロヘキシルフタレート*	167, 149	26:19	0.066	0.993
18	ジ- <i>n</i> -ヘプチルフタレート	265, 149	26:29	0.069	0.992
19	ジ-(2-エチルヘキシル)フタレート*	167, 149	26:35	0.050	0.995
20	ジ- <i>n</i> -オクチルフタレート	149, 279	28:54	0.040	0.991
21	エチルヘキシルセバケート*	185, 112	29:45	0.055	0.985

注1) 左側のイオンは定量用、右側のイオンは確認用。

注2) 100 pg - 1000 pgを注入した場合。

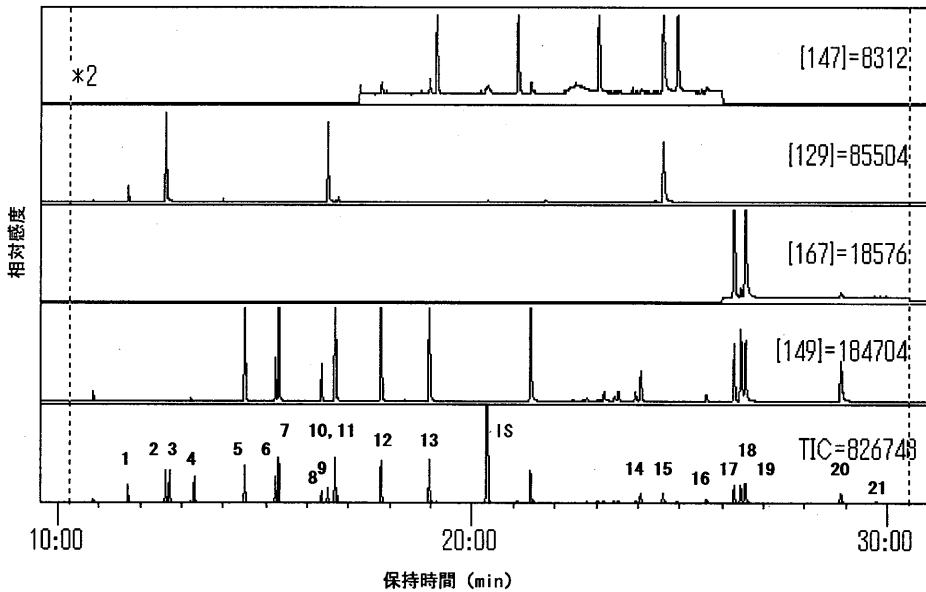


図1. フタル酸およびアジピン酸エステルのGC-MS-SIMのイオンクロマトグラム  
クロマトグラム上の番号は表1の化合物番号に同じ。

## 2. 回収率に及ぼす水試料の pH、通水速度、乾燥時間の影響 (エムポアディスク SDB-XD)

### 1) 抽出時の pH の影響

抽出時の pH の影響を検討するために、50 mM リン酸緩衝液で pH 3, 5, 7, 9 に調製した試料で抽出率を比較した。PH 3~7 までは各化合物 (ジ-n-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートは除く) とも回収率が約 80% 以上で、pH 9 においてはわずかに減少したが、pH 3~9 の範囲では抽出への pH の影響はないものと考えられた (表 2)。そこで一般的な井戸水や河川水の分析では、抽出時の pH 調整は不必要であると思われる。

### 2) 抽出時の流速の影響

抽出時の試料を吸引する速度を 100 mL/min、166 mL/min および 200 mL/min の条件で検討した結果、100 mL/min および 166 mL/min の流速で吸引した場合の回収率は良好であった (表 2)。

### 3) 通水後の通気時間の影響

試料を通水した後、ディスクの水分を除去する目的で行う通気時間の影響を検討した。0 分、10 分、20 分、30 分の通気時間について回収率を比較したが、差は認められなかった。そこで後の脱水操作を容易にするために、5 分間通気を行うこととした (表 2)。

表2. フタル酸エステルおよびアジピン酸エステルの回収率に及ぼす pH、流速および乾燥時間の影響(エムポアディスク SDB-XD)

化合物	回収率 (%) <sup>注1)</sup>										
	pH <sup>注2)</sup>				流速 (mL/min) <sup>注3)</sup>			乾燥時間 (min) <sup>注4)</sup>			
	pH3	pH5	pH7	pH9	100	166	200	0	10	20	30
ジエチルアジベート	87	79	98	69	78	79	62	90	93	109	85
ジイソプロピルアジベート	92	85	105	73	83	83	65	88	93	107	87
ジメチルフタレート	96	86	107	80	89	88	72	86	88	103	80
ジメチル-p-フタレート	89	83	98	70	82	81	63	86	90	100	80
ジエチルフタレート	99	92	109	80	89	88	70	87	86	104	80
ジエチル-o-フタレート	93	87	104	73	82	82	64	85	87	100	80
ジイソプロピルフタレート	100	93	112	79	82	82	64	104	117	102	103
ジフェニルフタレート	96	90	110	74	84	83	65	91	92	105	85
ジ-n-ブチルアジベート	91	85	96	69	79	81	62	84	98	100	92
ジ-n-プロピルアジベート	92	87	105	73	82	82	64	84	85	98	80
ジエチルセバケート	91	85	97	70	80	80	64	85	96	98	88
ジイソブチルフタレート	94	87	103	72	83	83	65	78	88	89	83
ジ-n-ブチルフタレート	254	180	228	162	189	267	186	136	146	157	154
ベンジルブチルフタレート	103	97	116	74	86	85	66	97	128	98	112
エチルヘキシルアジベート	100	93	90	71	74	74	57	90	110	98	100
ジブチルアジベート	97	92	107	68	82	82	63	103	152	99	128
ジシクロヘキシルフタレート	91	89	101	69	82	80	62	80	104	80	93
ジ-n-ヘプチルフタレート	89	84	94	70	77	77	62	92	118	90	100
ジ-(2-エチルヘキシル)フタレート	303	227	213	152	112	106	101	113	146	139	166
ジ-n-オクチルフタレート	98	95	107	72	74	75	52	100	145	96	116
エチルヘキシルセバケート	92	91	90	69	68	74	44	104	161	100	122

注1) 各化合物の添加濃度: 1 ppb、水試料 500 mL を 1 mL に濃縮、2 回の平均値。

注2) 水試料: 50 mM リン酸緩衝液、流速: 100 mL/min、乾燥時間: 5 min。

注3) 水試料: 精製水、乾燥時間: 6 min。

注4) 水試料: 精製水、流速: 100 mL/min。

#### 4) 精製水、井戸水および河川水での添加回収率

ディスク型固相抽出法による添加回収実験の結果を表3に示す。エムポアディスク SDB-XD を用いた場合のジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートの回収率はいずれの水試料においても悪かった。これは操作中の汚染によるためであるが、その汚染原因は特定できなかった。これに対して、その他の化合物の回収率は大部分が70%以上であり、標準偏差も20%以内であり、比較的良好な結果が得られた。ENVI-18DSK の場合にもジ-*n*-ブチルフタレートとジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートは SDB-XD と同様に操作中の汚染が認められ、これらの分析は良好に行えなかった。また、エチルヘキシルセバケートの回収率は約50%とSDB-XDに比べて低かった。

表3. 各抽出法における環境水中からのフタル酸およびアジピン酸エステルの添加回収率の比較

化合物名	回収率(%、平均±標準偏差) <sup>注1)</sup>						
	エムポアディスク(SDB-XD)			ENVI-18DSK			液-液抽出
	精製水 (n=4)	井戸水 (n=5)	河川水 (n=3)	精製水 (n=4)	精製水 (n=4)	井戸水 (n=6)	精製水 (n=5)
ジエチルアジベート	79 ± 3	76 ± 11	77 ± 2	87 ± 2	81 ± 6	87 ± 18	96 ± 7
ジイソプロピルアジベート	84 ± 3	79 ± 11	85 ± 4	101 ± 8	95 ± 10	93 ± 12	101 ± 6
ジメチルフタレート	81 ± 2	73 ± 10	81 ± 4	75 ± 7	76 ± 5	82 ± 13	100 ± 7
ジメチル- <i>p</i> -フタレート	92 ± 4	93 ± 16	76 ± 2	81 ± 12	79 ± 6	81 ± 13	93 ± 6
ジエチルフタレート	89 ± 3	89 ± 11	85 ± 3	94 ± 2	96 ± 6	88 ± 12	98 ± 6
ジエチル- <i>p</i> -フタレート	85 ± 3	84 ± 11	81 ± 2	92 ± 3	95 ± 8	89 ± 10	97 ± 6
ジイソプロピルフタレート	95 ± 3	84 ± 11	79 ± 4	93 ± 4	87 ± 8	87 ± 9	92 ± 4
ジフェニルフタレート	100 ± 3	99 ± 14	83 ± 2	100 ± 2	112 ± 9	94 ± 9	96 ± 6
ジ- <i>n</i> -ブチルアジベート	93 ± 7	94 ± 17	79 ± 4	110 ± 26	95 ± 11	72 ± 10	95 ± 5
ジ- <i>n</i> -プロピルアジベート	90 ± 3	88 ± 11	79 ± 3	94 ± 1	98 ± 7	89 ± 8	98 ± 6
ジエチルセバケート	92 ± 7	81 ± 19	88 ± 3	116 ± 16	98 ± 9	98 ± 18	96 ± 5
ジイソブチルフタレート	90 ± 5	97 ± 18	83 ± 3	100 ± 7	92 ± 6	84 ± 6	98 ± 5
ジ- <i>n</i> -ブチルフタレート	1103 ± 340	-383 ± 103	70 ± 25	-150 ± 216	-75 ± 29	104 ± 62	247 ± 38
ベンジルブチルフタレート	97 ± 22	129 ± 17	94 ± 5	106 ± 7	117 ± 5	95 ± 11	96 ± 1
エチルヘキシルアジベート	62 ± 13	70 ± 24	81 ± 6	126 ± 40	55 ± 6	45 ± 12	99 ± 1
ジブトキシエチルフタレート	96 ± 24	117 ± 27	102 ± 2	93 ± 10	92 ± 10	87 ± 15	89 ± 5
ジシクロヘキシルフタレート	124 ± 15	127 ± 28	91 ± 4	96 ± 3	105 ± 7	80 ± 13	95 ± 3
ジ- <i>n</i> -ヘプチルフタレート	88 ± 13	83 ± 24	92 ± 6	93 ± 31	77 ± 12	37 ± 6	94 ± 3
ジ-(2-エチルヘキシル)フタレート	254 ± 211	194 ± 39	134 ± 32	130 ± 464	55 ± 27	30 ± 65	483 ± 367
ジ- <i>n</i> -オクチルフタレート	94 ± 23	109 ± 17	96 ± 7	95 ± 26	47 ± 2	52 ± 12	89 ± 3
エチルヘキシルセバケート	69 ± 9	120 ± 21	91 ± 6	52 ± 6	49 ± 9	65 ± 15	88 ± 5

注1) 添加濃度は0.1ppb。ただし、エムポアディスクの河川水および液-液抽出の精製水の場合は1ppb。

#### 3. カートリッジ型固相抽出法および液-液抽出法の回収率

カートリッジ型固相抽出法のセツパック PS-2 を用いた場合には、ジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートについては操作中の汚染が認められた(表3)。また、フタル酸エステルおよびアジピン酸エステルともアルキル鎖の炭素数が8以上のものの回収率は低い傾向にあった。液-液抽出法の場合にもジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートは操作中の汚染が認められたが、その他の化合物の回収率は良好であった(表3)。

#### 4. ジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートの試薬中濃度または器具等からの溶出

汚染原因を特定するために上記2化合物の試薬中濃度および器具等からの溶出濃度を調べた(表4)。パスツールピペットに取り付けるシリコンゴムキャップからはジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートがジクロロメタンに高濃度で溶出され、他にも数種類のフタル酸エステルが検出された。しかし、ジクロロメタンを接触させずにピペティングをした場合にはジクロロメタン中にこれら化合物は検出されなかった。

GCの注入口に取り付けるセプタムからはジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートがジクロロメタンに溶出したことから、GCこれら化合物の溶出が少ないGC用セプタムを使用する必要がある。オートサンプラー用サンプルピンのキャップからこれら化合物は殆ど検出されなかった。

表4. ジ-*n*-ブチルおよびジ-(2-エチルヘキシル)フタレートの試薬中濃度または器具からの溶出

試薬、器具	操作 <sup>注1)</sup>	検出濃度 (ppm) <sup>注2)</sup>	
		ジ- <i>n</i> -ブチルフタレート	ジ-(2-エチルヘキシル)フタレート
シリコンゴムキャップ	内部にジクロロメタン1000 1mLを入れ、5分間放置	4600	88000
GC用セプタム	ジクロロメタン1000 2mLにセプタム1個入れ5分間放置	0.12	0.70
オートサンプラー用サンプルピン用キャップ	ジクロロメタン1000 2mLにセプタム1個入れ5分間放置	ND	ND
アセトン300	5mLを1mLに濃縮	ND	ND
メタノール300	5mLを1mLに濃縮	ND	ND
<i>n</i> -ヘキサン1000	5mLを1mLに濃縮	ND	ND
ジクロロメタン1000	5mLを1mLに濃縮	ND - 0.03	ND - 0.05
溶出溶媒	ジクロロメタン:アセトン(6:1)5mLを1mLに濃縮	ND	ND
セツバックDry	ジクロロメタン1000 5mLを1mLに濃縮	0.03-0.04	ND-0.05
PS-2	ジクロロメタン1000 0-5mLを1mLに濃縮	0.16	0.29
	ジクロロメタン1000 5-10mLを1mLに濃縮	0.02	ND
	ジクロロメタン1000 10-15mLを1mLに濃縮	0.02	ND
	コンディショニング後、溶出溶媒 5mLを1mLに濃縮	0.280-0.360	ND
ENVI-18DSK	ジクロロメタン1000 0-5mLを1mLに濃縮	0.32	0.26
	ジクロロメタン1000 5-10mLを1mLに濃縮	0.05	0.05
	ジクロロメタン1000 10-15mLを1mLに濃縮	0.05	0.06
SDB-XD	予備洗浄後、溶出溶媒5mLを1mLに濃縮	0.26-0.70	0.10-0.80
液-液抽出	ブランク	0.80-3.10	0.40-3.80

注1)濃縮は超高純度窒素ガス気流下で行った。注2)NDはジ-*n*-ブチルフタレート0.02ppm未満、ジ-(2-エチルヘキシル)フタレート0.05ppm未満。

今回実験で使用した各種有機溶媒中のジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートの濃度は添加回収時の回収率に影響を与えるような濃度ではなかった。各種固相および脱水用カートリッジからはジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートが検出され、今回のジクロロメタンによる洗浄でブランク値をコント

ロールできなかつたことから、別の溶媒による洗浄またはコンディショニング法を検討する必要がある。

[まとめ]

15 種類のフタル酸エステルと 6 種類のジカルボン酸エステルの抽出法を検討した。ジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートはいずれの抽出法においても操作中の汚染が認められ、回収率および再現性の良い正確な分析は行えなかつた。その他の対象化合物を一斉分析する上で、回収率および再現性ともに良好であったのは液-液抽出法であり、固相抽出法の中ではエムポアディスク SDB-XD であった。

エムポアディスク SDB-XD については、ジ-*n*-ブチルフタレートおよびジ-(2-エチルヘキシル)-フタレートのサロゲート化合物を用いた添加回収実験では、これら化合物の回収率は添加濃度 0.1 ppb で 90% 以上であった。よって、この 2 化合物は他のフタル酸エステルと同様に水試料からの抽出は効率よくされていると考えられ、操作中の混入を減らしブランク値のコントロールが可能となれば、この抽出法でも信頼性の高い分析が可能であると思われる。現在、これら化合物の操作中の汚染を少なくするために下記の点について検討中である。

項 目	対 策
ディスクの予備洗浄およびコンディショニング法	アセトン、アセトニトリルの使用
プラスチック製品の使用をできる限り減す	ガラス器具に変更
水試料の吸引時に埃等の混入防止	クリーンベンチでの作業
手からの汚染	溶媒、水の接触部には触れない
G C のセプタムの選択	マイクロシールセプタムの使用



## アルキルフェノールおよびビスフェノールAの分析

### [方法]

#### 1. 検討化合物

表5に示した13化合物について検討した。\*印は昨年環境庁から提示された化合物、その他は学術論文に掲載された内分泌攪乱物質リスト<sup>6)</sup>中の化合物である。

#### 2. 試薬

標準品として4-*tert*-ペンチルフェノールおよび4-*n*-オクチルフェノールは和光純薬から、その他の試薬は東京化成から購入した。塩化ナトリウム、ジクロロメタン、メタノールおよび硫酸ナトリウムは残留農薬試験用(和光純薬)を用いた。また、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)を用いた。精製水は純水製造装置PURIC-MX(HPLC用、オルガノ)を用いて調製した。

#### 3. 分析方法

抽出は、固相抽出法としてディスク型固相であるエムポアディスクSDB-XD(スリーエム製)およびEnvi-Disk 18DSK(スペルコ製)を用いた方法、カートリッジ型固相であるPS-2(ウオターズ製)を用いた方法ならびに溶媒抽出法により行った。それぞれの抽出、脱水及び濃縮操作は上記の「フタル酸及びジカルボン酸エステルの分析」と同様に行った。1 mLに濃縮した試料にBSTFAを0.1 mL添加しTMS化を行い、GC-MSにより定量した。GC-MSの分析条件はフタル酸エステルの場合と同様である。ただし、各化合物のモニターイオンは表5に示すとおりであった。

### [結果]

#### 1. アルキルフェノールおよびビスフェノールAのGC-MS-SIMクロマトグラム

アルキルフェノールおよびビスフェノールAのトリメチルシリル化合物のクロマトグラムを図2に、この分析条件下での各化合物の保持時間、検出限界および検量線を表5に示した。環境水におけるこれらの化合物の検出限界は0.01  $\mu$ g/L(4-*n*-ニルフェノールは0.1  $\mu$ g/L)を求められており、本装置の検出限界から換算すると、水試料1 Lを1000倍濃縮する必要がある。また、0.06~1 ngの範囲での検量線は全ての化合物において良好であった。

表5. アルキルフェノールおよびビスフェノールAのモニターイオン、検出限界および検量線の直線性

化合物	モニターイオン <sup>1)</sup> (m/z)	保持時間 (min)	検出限界 (ng)	検量線の直線性 (0.06ng - 1.0 ng)
1 4-エチルフェノール	179,194	4:55	0.004	0.9959
2 4-プロピルフェノール	179,208	11:13	0.005	0.9961
3 4-tert-ブチルフェノール*	207,222	11:39	0.004	0.9962
4 4-sec-ブチルフェノール	193,222	11:53	0.004	0.9963
5 4-n-ブチルフェノール	179,222	12:37	0.004	0.9959
6 4-tert-ペンチルフェノール	207,236	12:58	0.004	0.9959
7 4-n-ペンチルフェノール*	179,236	13:54	0.003	0.9959
8 4-n-ヘキシルフェノール*	179,250	15:09	0.004	0.9960
10 4-n-ヘプチルフェノール*	179,264	16:21	0.004	0.9956
9 4-tert-オクチルフェノール*	207,278	15:26	0.005	0.9961
11 4-n-オクチルフェノール*	179,278	17:35	0.004	0.9965
12 4-ニルフェノール*	221,179	16:55	0.003	0.9965
13 ビスフェノールA*	357,372	23:17	0.006	0.9975

1) 左側のイオンは定量用、右側のイオンは確認用

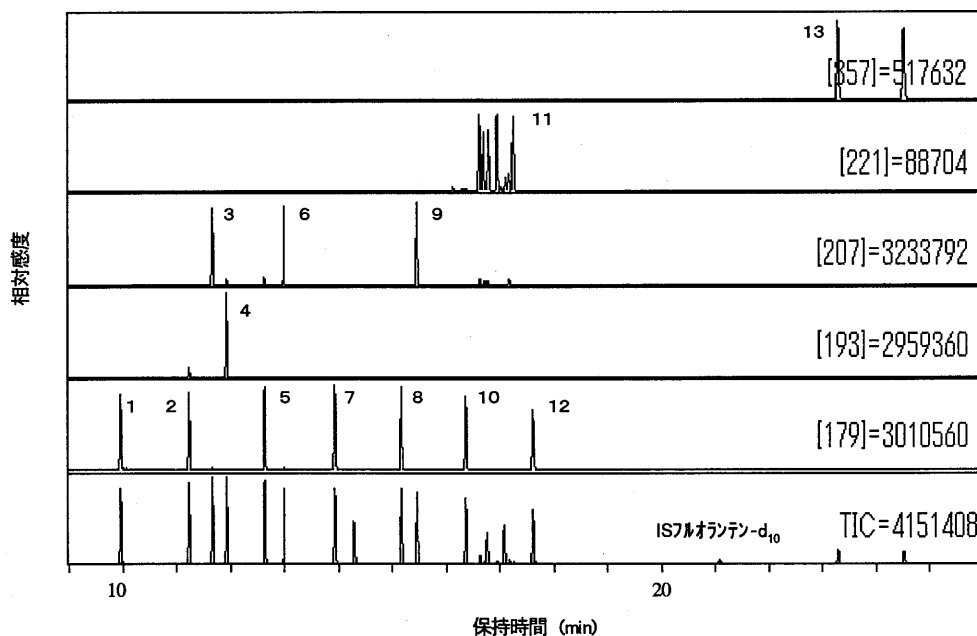


図2. アルキルフェノールおよびビスフェノールAのトリメチルシリル化物のGC-MS-SIMクロマトグラム  
クロマトグラム上の番号は表5の化合物番号に同じ。

## 2. 回収率に及ぼす水試料の pH、通水速度、乾燥時間の影響 (エムポアディスク SDB-XD)

### 1) 抽出時の pH の影響

抽出時の pH の影響を検討するために、50 mM リン酸緩衝液で pH 3, 5, 7, 9 に調製した試料で抽出率を比較した。pH 3~7 までは各化合物とも抽出率が 91~122% で、pH 9 においてもわずかに減少はしたものの 83~93% の範囲で抽出されており (表 6)、pH 3~9 の範囲では抽出への pH の影響はないものと考えられた。そこで一般的な井戸水や河川水の分析では、抽出時の pH 調整は不必要であると思われる。

### 2) 抽出時の流速の影響

抽出時の試料を吸引する速度を 100 mL/min、166 mL/min および 200 mL/min の条件で検討した結果、100 mL/min および 166 mL/min の流速で吸引した場合の回収率が良好であった (表 6)。

### 3) 通水後の通気時間の影響

試料を通水した後、ディスクの水分を除去する目的で行う通気時間の影響を検討した。0 分、10 分、20 分、30 分の通気時間について回収率を比較したが、差は認められなかった。そこで後の脱水操作を容易にするために、5 分間の通気を行うこととした (表 6)。

表6. アルキルフェノールおよびビスフェノールAの回収率に及ぼす水試料のpH、流速および乾燥時間の影響 (エムポアディスク SDB-XD)

化合物	回収率 (%) 注1)										
	pH 注2)				流速(mL/min) 注3)			乾燥時間 (min) 注4)			
	3	5	7	9	100	166	200	0	10	20	30
4-エチルフェノール	96	95	110	87	90	87	66	87	84	98	90
4-プロピルフェノール	101	92	108	85	89	85	66	81	83	91	83
4-tert-ブチルフェノール	101	92	108	85	90	85	66	81	82	91	85
4-sec-ブチルフェノール	101	92	109	85	90	85	65	81	82	91	84
4-n-ブチルフェノール	103	92	110	86	91	86	66	81	83	92	84
4-tert-ペンチルフェノール	100	91	107	83	91	85	66	80	81	91	85
4-n-ペンチルフェノール	106	95	114	88	94	90	67	82	85	92	84
4-n-ヘキシルフェノール	109	96	117	89	97	89	68	82	86	94	86
4-tert-オクチルフェノール	105	93	112	86	94	87	67	77	84	88	86
4-n-ヘプチルフェノール	111	98	120	89	96	88	68	78	88	87	86
4-ニルフェノール	112	109	118	87	98	100	74	73	85	81	85
4-n-オクチルフェノール	107	96	114	84	92	85	65	71	88	77	85
ビスフェノール A	99	96	122	91	100	92	69	87	92	85	96

注1) 各化合物の添加濃度: 1 ppb, 水試料 500 mL を 1 mL に濃縮。2回の平均値。

注2) 水試料: 50 mM リン酸緩衝液, 流速: 100 mL/min, 乾燥時間: 5 min。

注3) 水試料: 精製水, 乾燥時間: 5 min。

注4) 水試料: 精製水, 流速 100 mL/min。

#### 4) 誘導体化後の試料の安定性の検討

試料を TMS 化した後、4℃で暗所に 30 時間後及び 4 日後の各化合物の残存性を調べた (表 7)。30 時間後ではいずれの化合物も 92~95% 残存していた。4 日後もほとんどの化合物において安定であったが、ビスフェノール A のみ 67% に減少が認められた。ビスフェノール A については誘導体化後できるだけ早く測定する必要がある。

#### 5) 誘導体化時の水分含量および反応温度の影響

予め試料 1 mL に 1~3 µL の水を添加し、BSTFA による誘導体化を行い各化合物の生成量を比較した結果を表 7 に示した。各化合物の反応率は水を添加しない場合を 100% とした。水分含量が 3µL/mL の場合には、各化合物の反応率は水を添加しない場合と殆ど同じであったことから、溶出液または抽出液は完全に脱水しなくてもよいと言える。また、反応温度については、0 分 (室温) と 80℃ で 5~30 分加熱した場合の生成率には殆ど差が認められなかったことから、誘導体化時に加熱する必要はないと思われる。

表7. アルキルフェノールおよびビスフェノールAの誘導体化に及ぼす溶液中の水分含量および反応時間の影響

化合物	生成率 (%) <sup>注1)</sup>										
	水分含量 (µL/mL) <sup>注2)</sup>					反応時間 (min) <sup>注3)</sup>					
	0	0.5	1	2	3	0	5	10	15	20	30
4-エチルフェノール	100	118	114	111	105	100	94	86	83	85	97
4-プロピルフェノール	100	119	113	110	102	100	96	90	84	85	99
4-tert-ブチルフェノール	100	118	112	109	102	100	101	94	87	88	104
4-sec-ブチルフェノール	100	119	112	109	102	100	100	93	87	88	104
4-n-ブチルフェノール	100	118	112	109	102	100	98	91	88	89	103
4-tert-ペンチルフェノール	100	119	113	109	102	100	102	95	88	89	105
4-n-ペンチルフェノール	100	118	112	109	102	100	99	91	88	89	101
4-n-ヘキシルフェノール	100	117	113	109	102	100	98	91	89	90	99
4-tert-オクチルフェノール	100	118	112	109	102	100	103	95	89	93	103
4-n-ヘプチルフェノール	100	114	110	107	101	100	99	90	89	91	99
4-ニルフェノール	100	119	114	107	102	100	105	97	87	92	102
4-n-オクチルフェノール	100	112	110	106	100	100	98	91	89	91	99
ビスフェノール A	100	111	105	103	94	100	103	97	95	93	99

注1) 水分含量 0 µL/mL を 100%、反応時間 0 min を 100%。

注2) 各化合物の濃度: 0.1 ppm、反応溶媒: ジクロロメタン: 7セトン(6:1) 1 mL、反応温度: 室温。

注3) 各化合物の濃度: 0.1 ppm、反応溶媒: ジクロロメタン: 7セトン(6:1) 1 mL、反応温度: 80℃。

### 6) 精製水、井戸水および河川水での添加回収率

3種類の水に 0.1ppb あるいは 1.0ppb 濃度に各化合物を添加したときの回収率を表 8 に示した。井戸水、河川水共ほぼ 75~85% の回収率で、変動は殆どの化合物で 10%前後であったが、4-ノニルフェノールの変動が大きかった。

表 8. ディスク型固相 SDB-XDによる各化合物の回収率

化合物	回収率の平均値, % (変動係数, %)			
	精製水		井戸水	河川水
	0.1ppb (n=4)	1.0ppb (n=3)	0.1ppb (n=5)	1.0ppb (n=3)
4-エチルフェノール	78.1 (8.2)	92.3 (6.2)	78.3 (13.0)	79.4 (8.3)
4-プロピルフェノール	76.7 (7.5)	91.4 (5.4)	75.5 (11.7)	79.1 (7.5)
4-tert-ブチルフェノール	77.3 (7.8)	93.7 (4.6)	73.9 (11.8)	80.1 (7.2)
4-sec-ブチルフェノール	76.5 (7.6)	92.4 (5.2)	76.3 (11.8)	80.1 (7.9)
4-n-ブチルフェノール	79.3 (7.8)	91.4 (5.3)	78.9 (11.9)	81.2 (8.4)
4-tert-ペンチルフェノール	77.2 (8.1)	93.4 (4.2)	76.1 (9.0)	78.8 (8.9)
4-n-ペンチルフェノール	78.5 (7.9)	91.3 (5.3)	85.3 (12.7)	79.8 (6.6)
4-n-ヘキシルフェノール	81.2 (7.6)	91.1 (5.4)	82.6 (13.0)	75.8 (5.7)
4-n-ヘプチルフェノール	83.2 (7.3)	89.8 (5.0)	81.3 (13.7)	75.1 (6.6)
4-tert-オクチルフェノール	77.2 (7.6)	92.7 (4.1)	78.5 (12.1)	75.3 (6.8)
4-n-オクチルフェノール	79.4 (6.9)	86.5 (4.7)	78.6 (13.2)	70.4 (6.8)
4-ノニルフェノール	84.7 (7.4)	88.7 (2.6)	113.4 (19.1)	78.5 (12.7)
ビスフェノール A	85.6 (8.2)	116.7 (16.5)	77.9 (15.8)	73.1 (3.8)

### 3. カートリッジ型固相抽出法および液-液抽出法の回収率

各抽出法による精製水溶液での回収率の比較を表 9 に示した。添加濃度 1ppb では溶媒抽出での回収率が最も良好であったが、添加濃度 0.1ppb では SDB-XD を用いた場合の回収率が液-液抽出よりも全体的に高かった。4-ノニルフェノールについては 18DSK および PS-2 での変動が大きかった。18DSK では 4-エチルフェノールの回収率は 10% と他の抽出法に比べて低かった。

[まとめ] ディスク型固相 SDB-XD を用いてのアルキルフェノール及びビスフェノール A の一斉分析を検討した。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、効率的に分析できることから、多くのサンプルを分析する場合、有効な方法である。今回検討した SDB-XD は各化合物共、ほぼ満足できる回収率を示し、変動も 10% 前後であったことから井戸水および河川水のモニタリングに応用できるものと考えられる。

表9. 各抽出法による回収率の比較

化合物	回収率の平均値, % (変動係数, %)						
	ディスク型固相 SDB-XD		ディスク型固相 18DSK	カートリッジ型固相 PS-2		溶媒抽出	
	0.1ppb (n=4)	1.0ppb (n=3)	0.1ppb (n=4)	0.1ppb (n=4)	1.0ppb (n=4)	0.1ppb (n=5)	1.0ppb (n=5)
4-イソルフェノール	78.1 (8.2)	92.3 (6.2)	9.0 (7.7)	79.1 (5.2)	100.1 (8.4)	61.5 (11.0)	92.7 (2.9)
4-プロピルフェノール	76.7 (7.5)	91.4 (5.4)	46.0 (7.6)	77.5 (6.1)	95.7 (7.9)	82.0 (10.7)	94.8 (4.6)
4-tert-ブチルフェノール	77.3 (7.8)	93.7 (4.6)	71.6 (6.7)	75.1 (5.7)	96.3 (8.8)	85.7 (9.5)	97.5 (5.0)
4-sec-ブチルフェノール	76.5 (7.6)	92.4 (5.2)	75.3 (7.6)	77.7 (5.8)	96.2 (8.4)	84.9 (10.4)	96.3 (5.1)
4-n-ブチルフェノール	79.3 (7.8)	91.4 (5.3)	78.0 (8.7)	82.0 (6.1)	95.7 (8.3)	85.0 (10.4)	96.6 (4.7)
4-tert-ペンチルフェノール	77.2 (8.1)	93.4 (4.2)	77.1 (8.0)	80.6 (5.4)	97.0 (9.1)	84.4 (10.1)	97.6 (5.0)
4-n-ペンチルフェノール	78.5 (7.9)	91.3 (5.3)	82.7 (11.2)	87.1 (5.9)	94.0 (8.2)	84.7 (10.3)	97.0 (4.7)
4-n-ヘキシルフェノール	81.2 (7.6)	91.1 (5.4)	85.0 (11.9)	87.2 (5.2)	91.6 (7.9)	86.1 (10.6)	97.4 (4.4)
4-n-ヘプチルフェノール	83.2 (7.3)	89.8 (5.0)	89.3 (12.3)	84.7 (5.0)	83.4 (7.5)	87.3 (11.1)	98.1 (4.1)
4-tert-オクチルフェノール	77.2 (7.6)	92.7 (4.1)	83.2 (12.0)	78.9 (4.4)	87.4 (8.5)	86.9 (10.4)	99.1 (4.5)
4-n-オクチルフェノール	79.4 (6.9)	86.5 (4.7)	89.3 (12.4)	69.0 (4.5)	66.4 (14.5)	87.5 (11.2)	96.6 (4.0)
4-ニルフェノール	84.7 (7.4)	88.7 (2.6)	74.2 (47.9)	121.8 (39.5)	77.0 (11.9)	89.5 (12.1)	99.6 (4.5)
ビスフェノール A	85.6 (8.2)	116.7 (16.5)	89.8 (17.9)	101.1 (5.5)	77.0 (14.9)	77.1 (9.2)	104.7 (9.9)

[参考文献]

- 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に関する研究班の中間報告 (1997)
- 2) 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)
- 3) 第 24 回 日本環境化学会講演会試料「環境ホルモンのモニタリング手法」
- 4) US EPA Method 506 Determination of Phthalate and Adipate Esters in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction or Liquid-Solid Extraction and Gas Chromatography with Photoionization detection
- 5) US EPA Method 525.2 Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography
- 6) 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)
- 7) 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)

8) Ahel, M. et. al. , *Anal. Chem.*, 57, 1577 (1985)

9) 第22回日本環境化学会 予稿集 (1997)

本要旨は第35回全国衛生化学技術協議会で発表したデータをまとめたものである。





## ノニルフェノールおよびオクチルフェノールの生物濃縮実験とGC-MS分析

津田泰三（滋賀県立衛生環境センター）

### 【はじめに】

近年、様々な化学物質が生物の内分泌系を攪乱し、生物の生殖能低下を起こすことが報告されている。これらの内分泌攪乱化学物質は、一般に「環境ホルモン」という言葉で瞬く間に社会に浸透した。アルキルフェノール類は合成洗剤、塗料、農薬、化粧品等に幅広く使用されている非イオン界面活性剤アルキルフェノールポリエトキシレートの微生物分解物であり、下水を通じて広く水環境中に放出されている。これらは比較的安定であり、陸水系に入ると生体の脂肪中に取り込まれるとされており、水棲生物への残留が懸念される。しかしながら、エストロゲン活性が高いとされている4-ノニルフェノールおよび4-オクチルフェノールについては魚類等の生物濃縮データは数少ない。

当センターでは、1987年以来種々の化学物質（有機スズ化合物、農薬、農薬分解物等）について魚類による濃縮・排泄実験を実施し、陸水系における魚類の化学物質汚染評価および安全性評価を行ってきた。

今年度からは、最近問題になっている内分泌攪乱物質を順次取り組んでおり、今回の研究懇談会では4-ノニルフェノールおよび4-tert-オクチルフェノールに関する研究結果を紹介する。

### 【濃縮実験】

#### ヒメダカによる4-ノニルフェノールおよび4-tert-オクチルフェノールの濃縮実験

供試魚としてヒメダカ（体長2.2 - 2.7cm, 体重0.16 - 0.24g）を用いた。実験期間中1日1回、市販の複合飼料を2.0mg/匹の割合で与えた。本実験は流水式で7日間行った（図1. 濃縮実験装置）。

4-ノニルフェノール(400 $\mu$ g/l)および4-tert-オクチルフェノール(400 $\mu$ g/l)の各水溶液を脱塩素水道水で連続的に50倍希釈し、200匹の魚を入れた各水槽に流し入れた。試験期間中、試験水の流速は100ml/minとし、温度については19 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cとした。水槽中の化学物質濃度（平均測定値）は4-ノニルフェノール3.6 $\mu$ g/l(実験1)および4-tert-オクチルフェノール4.7 $\mu$ g/l(実験2)であった。一定期間ごとに20匹ずつの魚を採取し、分析に供した。

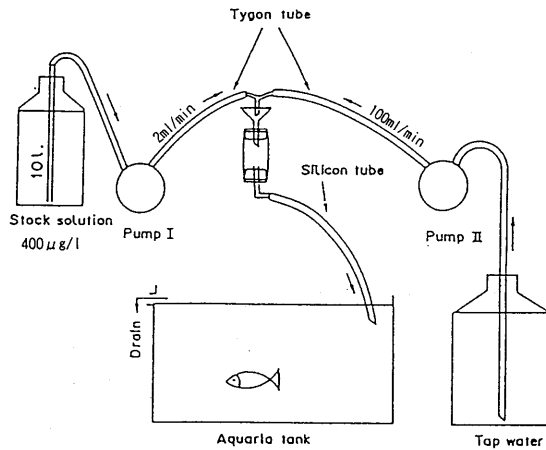


図1. 濃縮実験装置

## 分析方法

### 《水試料》

水槽中の化学物質濃度は以下の方法により定量した。一定量の試料水 (200ml) に 10gの食塩を添加後、ヘキサン50mlで抽出した。この有機層をロータリーエバポレーターにて濃縮し、ヘキサン溶液2mlに調整してGC-MSにより測定した。

### 《魚試料》

ヒメダカ試料 (3g) に無水硫酸ナトリウム5gを添加後、アセトニトリル30mlでホモジナイズ抽出し、アセトニトリル層を無水硫酸ナトリウム積層グラスロートにて濾過した。再度、アセトニトリル30mlによりホモジナイズ抽出を繰り返し、合わせた濾液をロータリーエバポレーターにて濃縮乾固する。残渣をヘキサン10mlに溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル30mlにて2回抽出する。合わせたアセトニトリル層をロータリーエバポレーターにて濃縮乾固し、残渣をヘキサン5mlに溶解させる。この溶液をSep-Pakフロリジルに付加し、ヘキサン10mlで洗浄後エーテル+ヘキサン(10+90) 10mlにて溶出させる。溶出液はロータリーエバポレーターにて濃縮後、試験溶液 1mlに調整してGC-MSにより測定した。

### 《GC-MS測定条件》 GC-MS: Finnigan mat MAGNUM (Jet Separator付)

Ion mode: EI    Manifold temperature: 220°C    Multiplier voltage: 1600 V

Emission current: 10 μA

GC column: J&W DB-1701 (0.53mmφ x 30 m, film thickness 1.0 μm)

GC temperatures: injection 250°C; column 60°C (1min) 10°C/min to 200°C (0min)  
2°C/min to 220°C (0min) 10°C/min to 270°C (10min)

Carrier: He 10ml/min

## 濃縮実験試料の分析例

ヒメダカ(Killifish)に濃縮された4-ノルフェノール(NOs)のGC-MS分析の一例として、濃縮実験7日(168h)後のクロマトグラムを図2に示した。

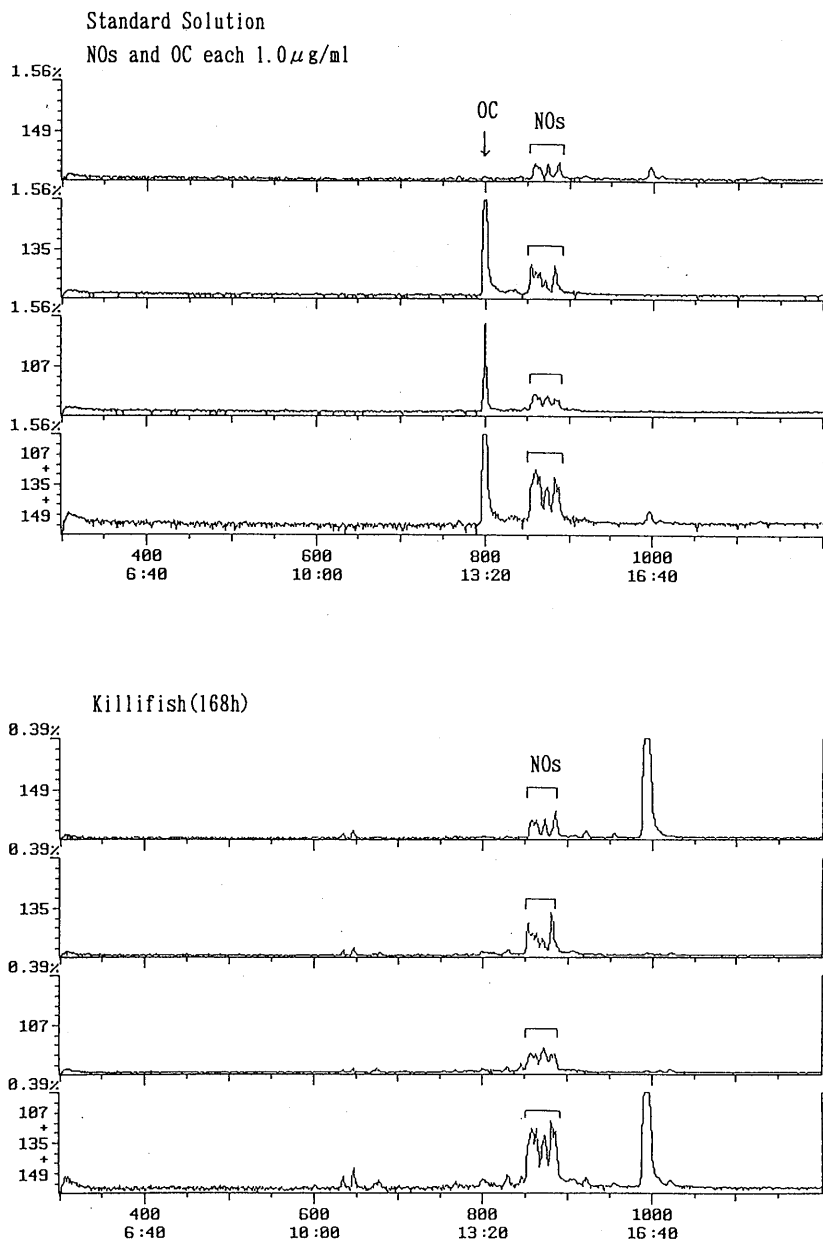


図2. ヒメダカに濃縮されたNOsのGC-MS分析クロマトグラム

## 濃縮係数（BCF）の計算

$BCF = \text{魚体中の化学物質濃度} / \text{水中化学物質濃度}$   
BCFの計算には各試料採取時の水中化学物質濃度を用いた。

## 濃縮実験結果

濃縮実験の結果を表1にまとめた。4-ニルフェノール(NOs)については48hで平衡に達し、BCF値167となった。また、4-tert-オクチルフェノール(OC)についても48hで平衡に達し、BCF値261となった。これらのBCF値は既報のヒメダカによる農薬の実験結果(フェンチオン154, フェニトチオン122, ベンチカブ 295)<sup>1)~3)</sup>と同程度であり、陸水環境中の魚類についてこれらの農薬と同程度の汚染が予測される。

一方、海外におけるNOsの生物濃縮の文献によると二枚貝、甲殻類および魚類でBCF値 3300, 100および1300が報告されている<sup>4)</sup>。また、実際の河川環境では淡水魚でBCF=13-410程度の生物濃縮が観測されている<sup>5)</sup>。

琵琶湖産および琵琶湖流入河川生息魚類について、現在、NOsおよびOCの汚染調査を実施中であり、室内濃縮・排泄実験の結果による評価を行う予定である。

表1. ヒメダカによる4-ニルフェノールおよび4-tert-オクチルフェノールの濃縮係数

化学物質	魚体中のBCF値						
	6h	12h	24h	48h	72h	120h	168h
4-ニルフェノール	57	97	103	149	200	142	176
4-tert-オクチルフェノール	38	63	128	271	326	158	287

### 【生物試料中のNO<sub>s</sub>およびOCの分析法】<sup>6)</sup>

#### 検量線

NO<sub>s</sub> : 濃度範囲 (0.2-2.0 μg/ml) で m/z=107, 135, 149 および (107+135+149) について作成した。

OC : 濃度範囲 (0.02-0.2 μg/ml) で m/z=135 について作成した。

図3に示したとおりNO<sub>s</sub>およびOCいずれについても直線を示した。

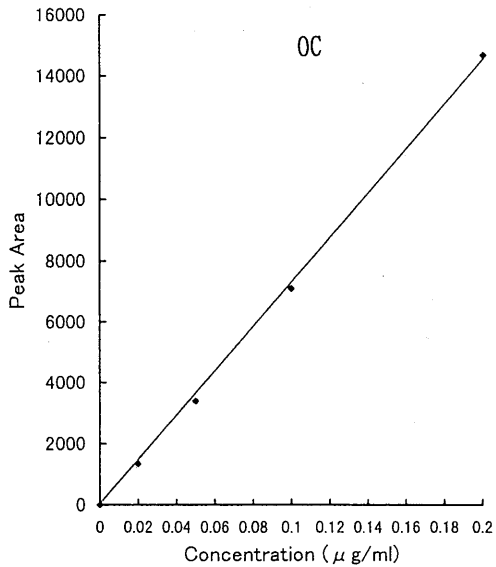
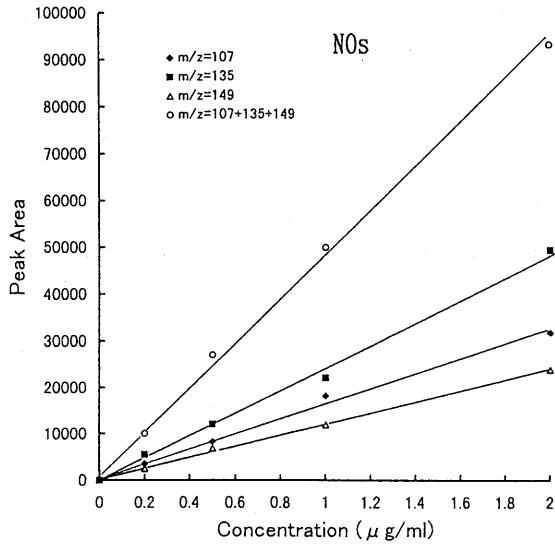


図3. NO<sub>s</sub>およびOCの検量線

## 魚体中のNOsおよびOCの分析法検討

ヒメダカ(全体)およびフナ(筋肉)についてはSep-Pakフロリジルにより充分精製が可能であり、添加回収実験の結果(表2)も良好であった。フナ(Crucian carp, 筋肉)についての分析例を図4に示した。しかしながら、河川生息魚類のアユあるいはオイカワ(全体)については夾雑物が多く、Sep-Pakフロリジルでは精製不十分であった(オイカワ Pale chubについても図4に示した)。この点についてはフロリジルPRを使用することにより改良された。

すなわち、130°Cで16時間活性化したフロリジルPR 5gをヘキサンでカラムクロマト管(30cm x 1.0cm I.D.)に充填(無水硫酸ナトリウム積層)した後、ヘキサン抽出液5mlを付加し、エチル-テル+ヘキサン(10+90)で溶出させた。最初の20mlは捨て、次の20-70mlを採取した。溶媒を留去後、ヘキサン溶液1mlに調整した。本試料液をGC-MSで測定した。

オイカワについて行った添加回収実験のGC-MSクロマトグラムを図5に示した。m/z=149, 135, 107および(107+135+149)のいずれについても充分精製された。

表2にはフナの筋肉(Fish1)、ヒメダカ全体(Fish2)、オイカワ全体(Fish3)およびシジミ(Shellfish)についての添加回収実験結果をまとめた。m/z=149, 135, 107および(107+135+149)のいずれで定量しても良好な結果を得たが、最終的には最も高感度なm/z=(107+135+149)を採用することにした。

滋賀県内の河川で採取したオイカワ(Pale chub)および琵琶湖で採取したシジミ(Corbicula)についてのGC-MS分析クロマトグラムを図6に示した。

検出限界はNOs 20ng/g、OC 2ng/gとなった。

## 【文献】

- 1) T. Tsuda et al. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 45 - 49 (1996)
- 2) T. Tsuda et al. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 603 - 610 (1997)
- 3) T. Tsuda et al. Chemosphere 35, 939 - 949 (1997)
- 4) R.A. Ekelund et al. Environ. Pollut. 64, 107 - 120 (1990)
- 5) M. Ahel et al. Environ. Pollut. 79, 243 - 248 (1993)
- 6) T. Tsuda et al. J. Chromatogr., in press

表2

RECOVERY OF 4-NONYLPHENOLS AND 4-TERT-OCTYLPHENOL FROM BIOLOGICAL SAMPLES

Sample	Added amount ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%) * of 4-nonylphenols				Added amount ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%) * of 4-tert-octylphenol	
		$m/z=149$	$m/z=135$	$m/z=107$	$m/z=\text{Summed}$		$m/z=135$	$m/z=149$
Fish 1 <sup>a</sup>	1.0	-	-	-	102 $\pm$ 4.2	0.1	92.3 $\pm$ 8.8	
Fish 2 <sup>b</sup>	1.0	-	-	-	87.0 $\pm$ 5.0	0.1	87.3 $\pm$ 7.7	
Fish 3 <sup>c</sup>	1.0	95.4 $\pm$ 7.3	106 $\pm$ 10	82.3 $\pm$ 4.9	86.0 $\pm$ 2.7	0.1	95.8 $\pm$ 2.5	
Shellfish <sup>d</sup>	1.0	103 $\pm$ 1.6	105 $\pm$ 4.5	99.2 $\pm$ 6.9	93.4 $\pm$ 6.7	0.1	96.4 $\pm$ 1.1	

\* Mean $\pm$ SD, n=5 GC-MS determination was carried out using  $m/z=149$ , 135, 107 and summed (107+135+149).

<sup>a</sup> Crucian carp muscle, 5g

<sup>b</sup> Killifish whole body, 5g

<sup>c</sup> Pale chub whole body, 5g

<sup>d</sup> Corbicula whole body, 5g

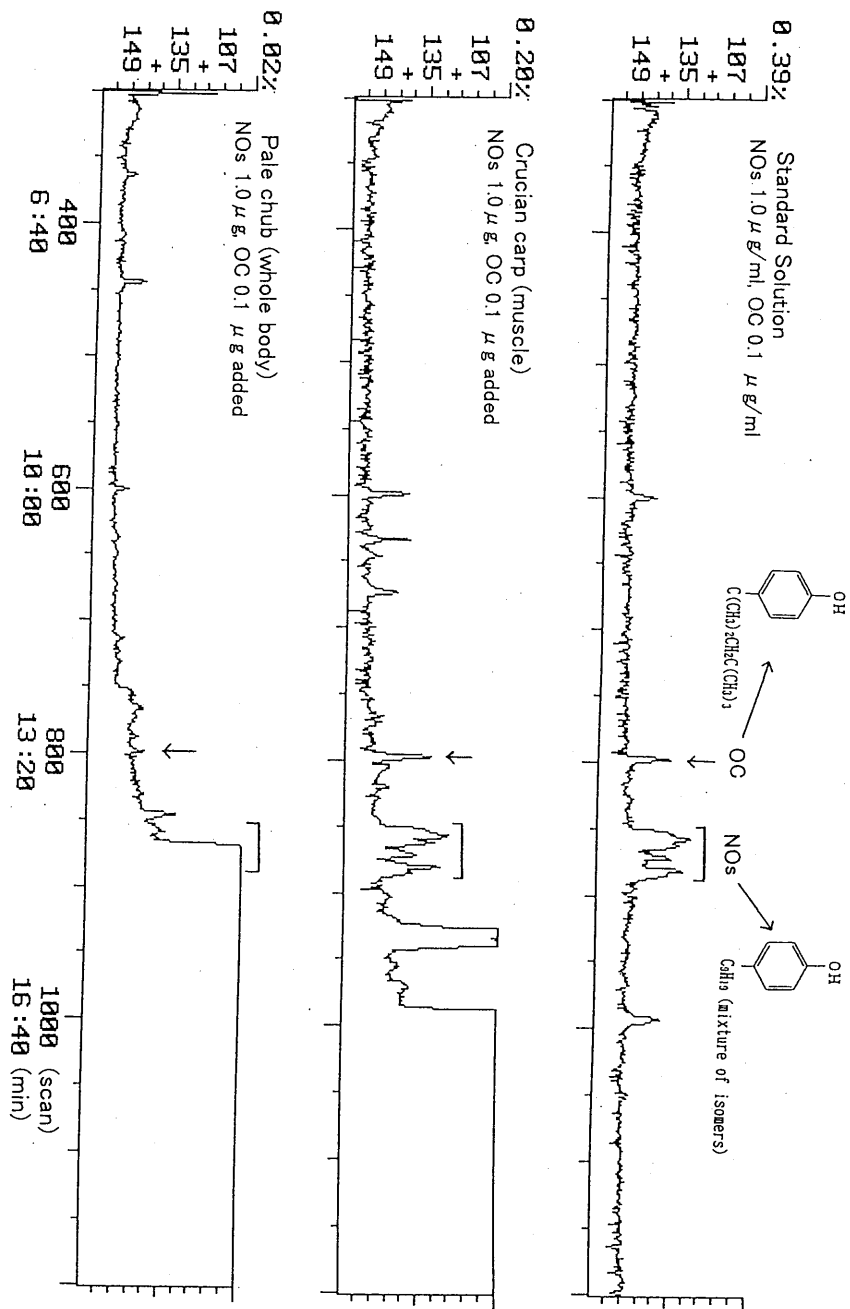


図4. Sep-Pakカラムによるフナ(筋肉)およびオイカワ(全体)のクリーンアップ



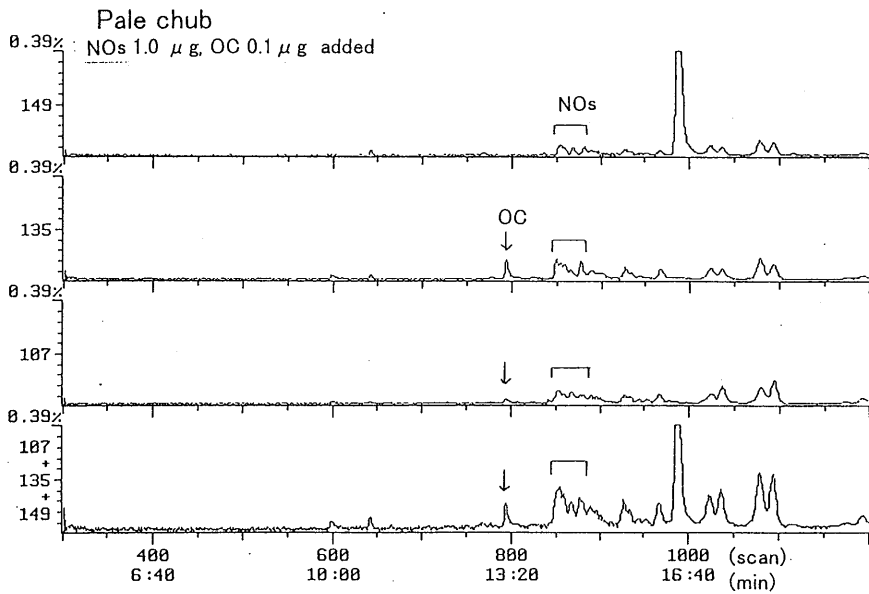
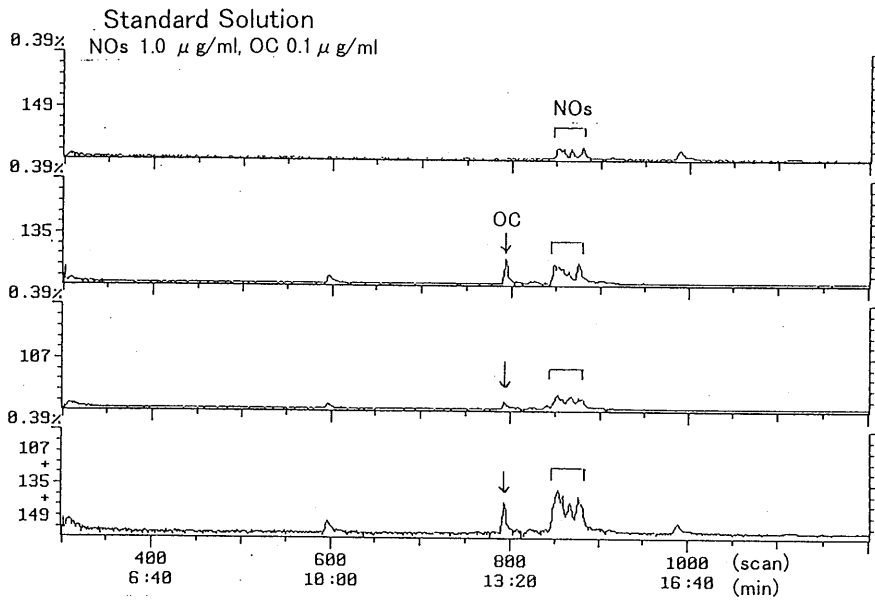


図5. オイカワを用いたNOsおよびOCの添加回収実験のGC-MSクロマトグラム

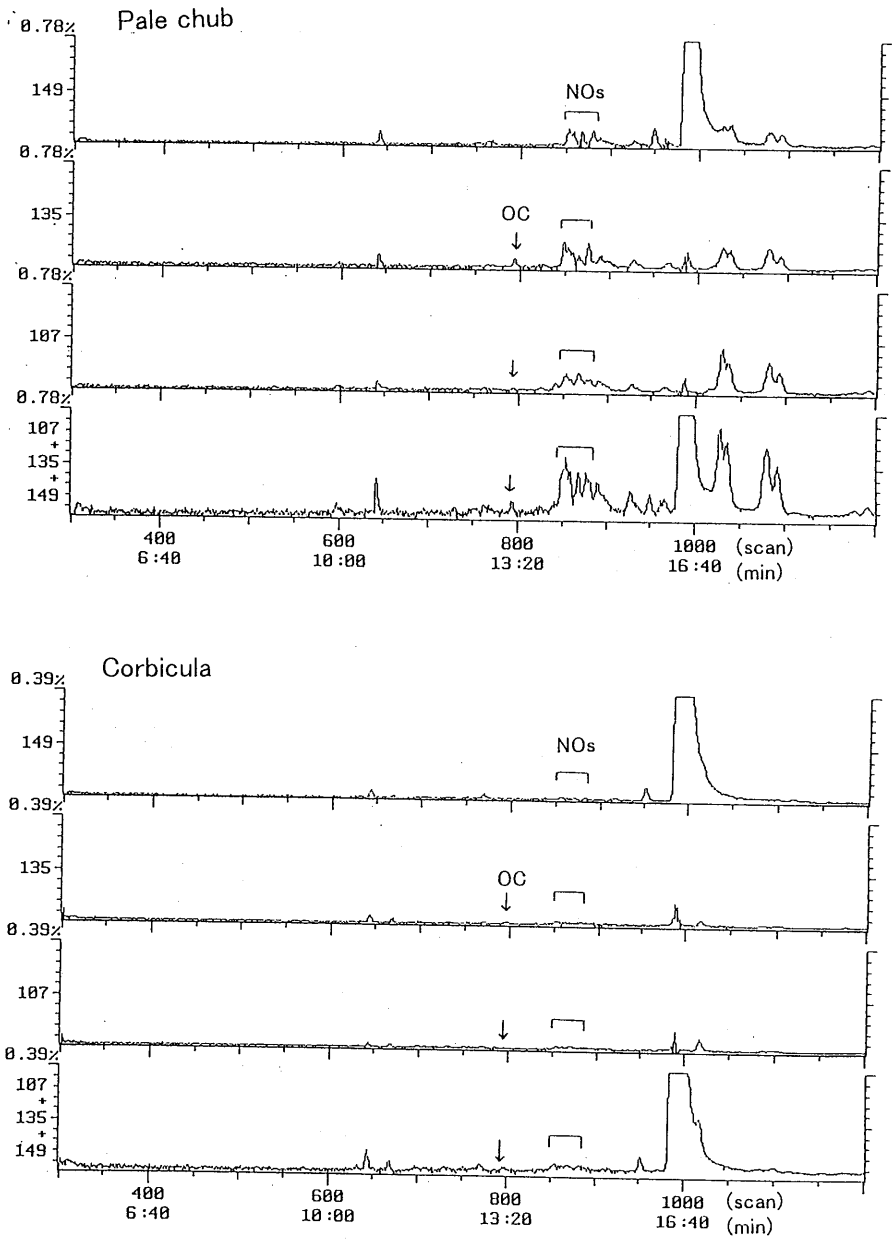


図6. 陸水環境中生物試料のGC-MS分析例

## 1 はじめに

大気中や水域など環境中の化学物質の濃度は極めて低いものの、魚介類などの生物に特定の化学物質が濃縮蓄積され、環境濃度と比べて高いことが知られている。蓄積される化学物質の中には人の健康や生態系に影響を及ぼす可能性が高いものもある。近年、有機塩素化合物は内分泌攪乱作用が懸念されているものもある。生物に濃縮蓄積された化学物質を定期的に測定し、汚染物質の環境での汚染レベルの推移を監視する必要がある。

生物の中でも、ムラサキイガイは沿岸域に生息し、周辺の海水から汚染物質を濃縮するので周辺水域の汚染レベルの推移を反映する生物として用いられている。

神奈川県では、1981年から、ムラサキイガイ中の有機塩素化合物の汚染実態を把握するために三浦半島における調査を実施してきた。今回、1997年までの結果について報告する。

## 2 調査方法

### 2.1 調査期間及び試料

1981～1997年までの17年間、ムラサキイガイを試料として、横須賀市久里浜港の岸壁からかき取り、それぞれをむき身にして、ミキサーで均一化して分析試料とした。

### 2.2 調査物質

- ・HCH類（殺虫剤、第一種特定化学物質）
- ・DDT類（殺虫剤、第一種特定化学物質）
- ・ドリノ類（殺虫剤、第一種特定化学物質）
- ・クロルデン類（シロアリ駆除剤、第一種特定化学物質）
- ・PCB（熱媒体、第一種特定化学物質）

### 2.3 分析方法

分析方法は、環境庁の「生物モニタリング調査マニュアル」に従って、試料からヘキサン、アセトン混液で脂肪分を抽出し、有機塩素化合物はアセトニトリル分配で脂肪分を除去し、フロリジルカラムで精製して3分画に分けてECD-GC、GC/MSで定量した。

PCBはアルカリ分解で脂肪分を除去して、シリカゲルカラムで精製してECD-GCで定量した。

### 3 結果

#### 3.1 試料の概要

調査対象とした試料のムラサキイガイの概要は、各年度とも、大きさは殻長で3.7~9.1cmと個体差があったが、年度間で大きな差はなかった。

脂肪分は2%前後であり、ほとんど個体差はなかった。

また、脂肪分と殻長とは相関がなかった。

#### 3.2 検出濃度

1981~1997年においてムラサキイガイ中の有機塩素化合物について調査した結果、PCBと総クロルデンの検出濃度が高く、PCBが0.01~0.06ppm、総クロルデンが0.006~0.057ppmの範囲で検出された。

#### 3.3 検出濃度の経年変化

比較的高濃度に検出されたPCB及び総クロルデンの検出濃度の経年変化を見ると、PCBと総クロルデンは検出濃度レベルも同様に、相関係数が0.640と検出濃度に相関があり、汚染のピークは1980年代となっている。

これらの物質は化審法により、特定化学物質に指定されて使用が制限され、年々減少の傾向にある。

#### 3.4 クロルデンの成分割合

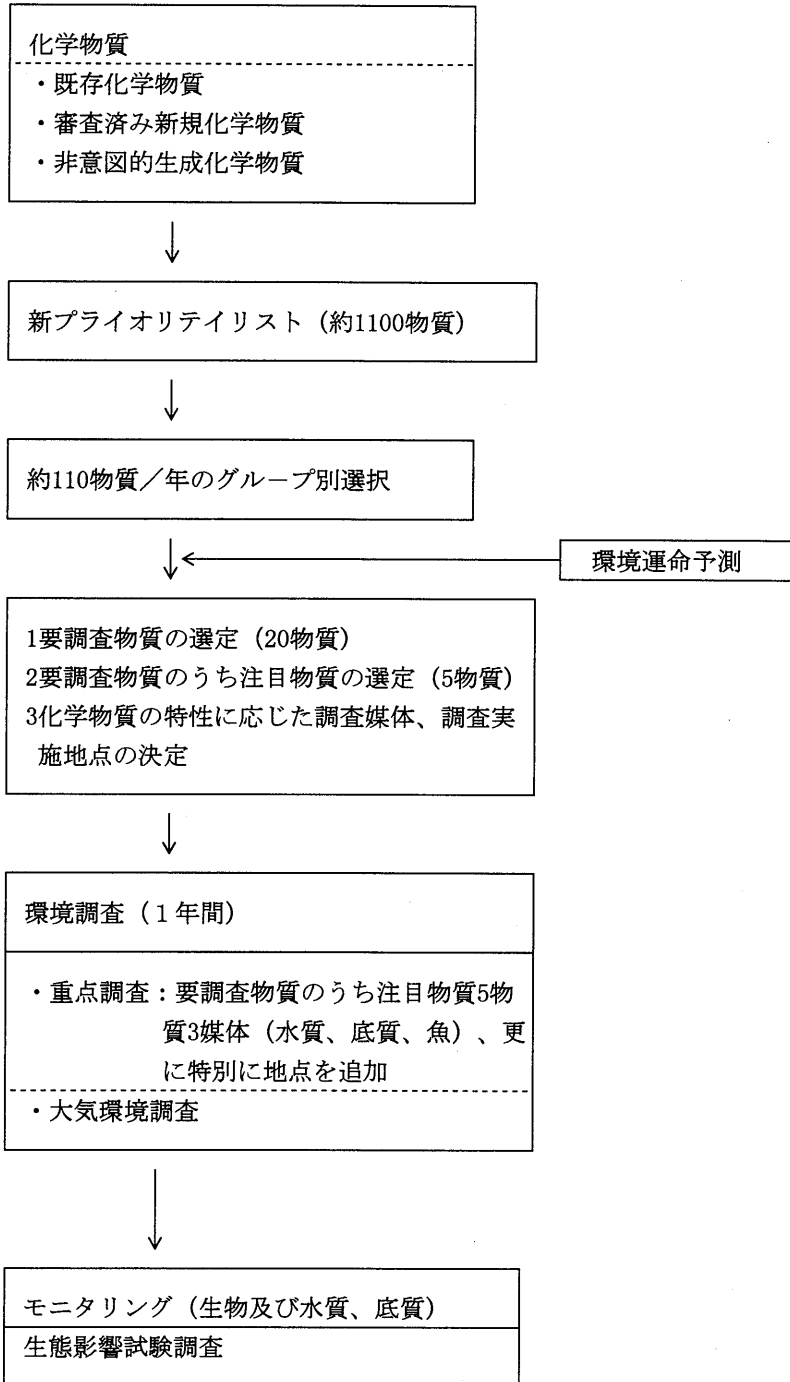
クロルデンは混合物でシロアリ駆除に使用されていたので、クロルデン濃度の成分別経年変化を見てみた。ムラサキイガイ中のクロルデンは1985年をピークに年々減少しているが、各成分の割合はほぼ一定しており、trans-クロルデン:cis-クロルデン:trans-ノナクロル:cis-ノナクロルは2:2:2:1である。これを媒体別のクロルデンの成分割合で見ると、工業用クロルデンから河川水、貝類、魚類そして高等動物へと食物連鎖の上位に行くに従って、低塩素化合物のクロルデンが代謝され、高塩素化合物のノナクロル及び代謝物のオキシクロルデンが多くなっている。

PCBについて、1990年から塩素数別に分析したのでその経年変化を見ると、年数が経つにつれて塩素数の多いものが主体となり、同様の傾向が見られた。

#### 3.5 DDT類の検出濃度と代謝物の経年変化

DDT類は低レベルで検出された。その代謝物別検出濃度と経年変化を見ると、1980年代は、DDT、DDE、DDDの3物質が検出されていたが、1990年代になると、次第に濃度が減少すると共に、DDTが検出されず、ほとんどDDEに変わってきた。これは殺虫剤として使用されたDDTがその有害性により、1970年に使用禁止となり、長期間環境中に存在する間に代謝され、DDDやDDEに変化したためと思われる。

「第2次総点検調査体系」



## ムラサキイガイについて

- ・学名 *Mytilus edulis* (LAMARCK)
- ・沿岸域に生息して熱帯を除き世界中に分布している
- ・内海内湾の潮間帯に足糸で岸壁などに付着し、群落を形成している。
- ・植物プランクトンをろ過して補食する。
- ・世代交代が早い。  
従って、特定地域の汚染レベルの把握に用いられる。

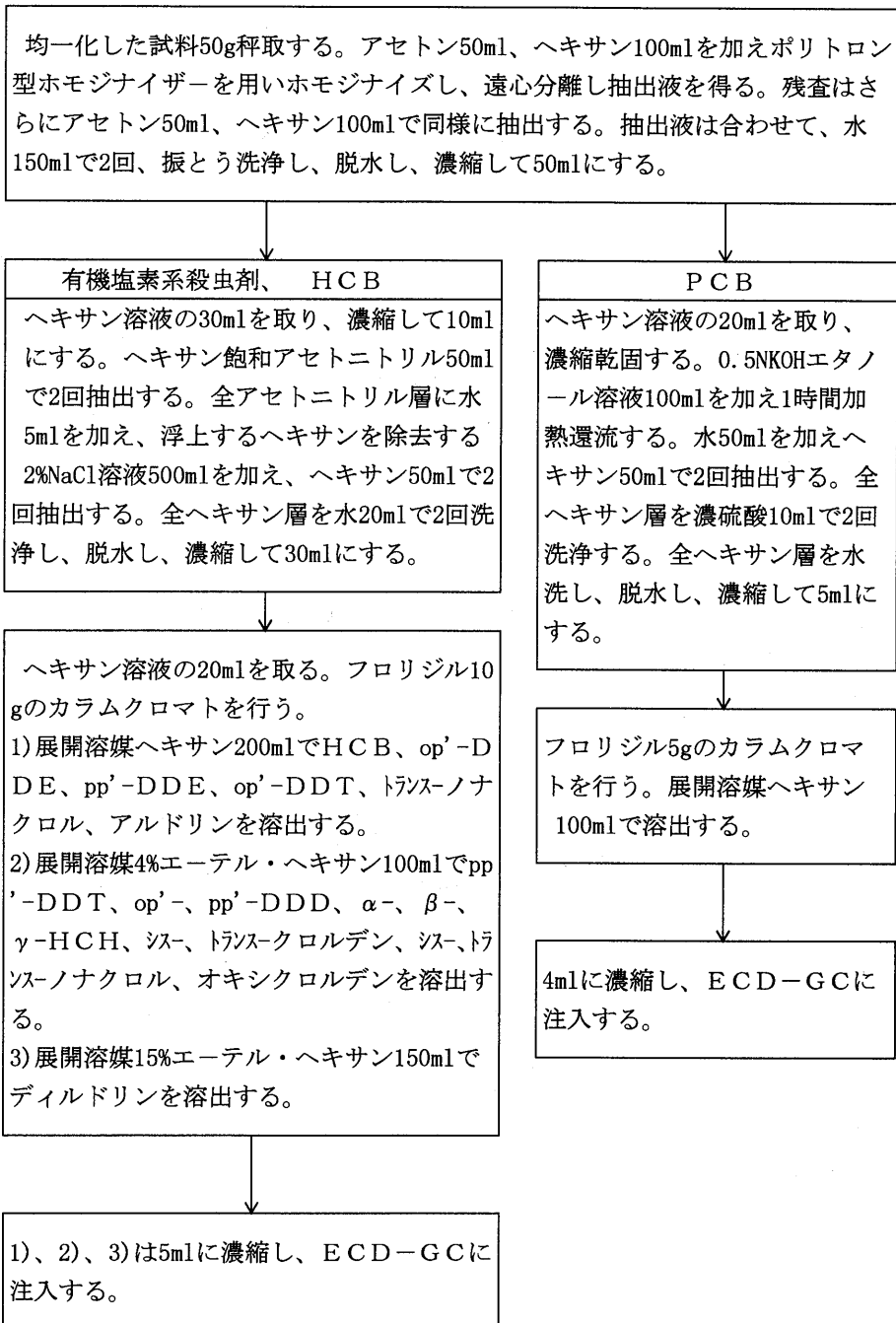
### ○採取方法

ムラサキイガイは港湾の岸壁に付着している場合が多く、この時の採取方法としては、潮間帯に生息しているので、干潮時採取にするのがよい。さらに、一人では難しいので二人で採取するのが最良である。一人がムラサキイガイの群落の下に手網を伸ばしそこに固定し、もう一人の人がその上から、先端が板状の金属棒でかき落とし、手網に受ける。

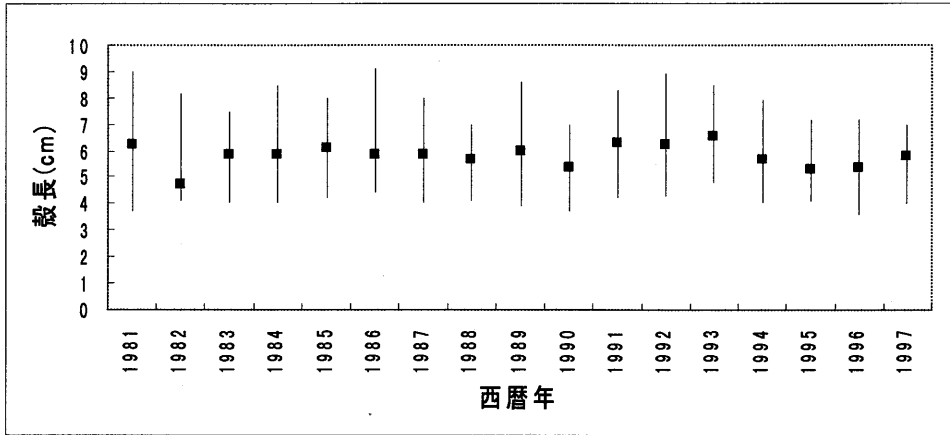
### ○試料の前処理

かき取って集めたムラサキイガイを実験室に持ち帰りむき身にする。ナイフで2枚貝を切り開き、はさみで足糸を切り取り、可食部のみさじでかき取りビーカーに集める。この状態では海水が多いので、ビーカーに集めたむき身をステンレス製の2mmの篩にあけて10分間放置して海水を除く。最後に、ミキサーで混合して試料とする。

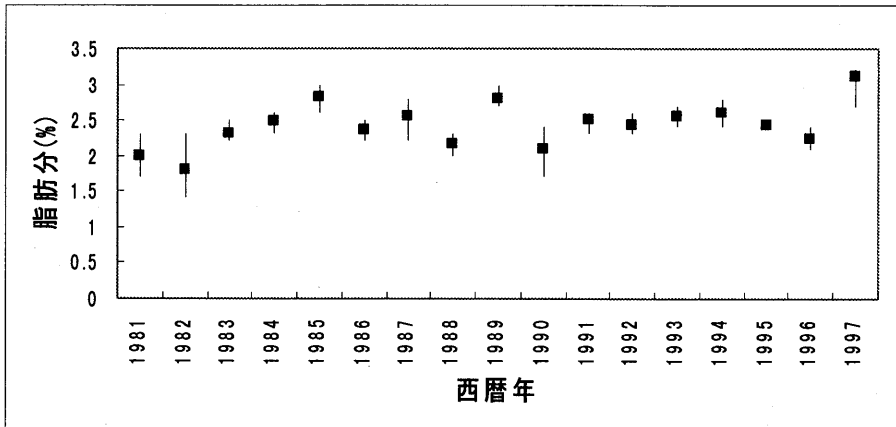
## 分析方法



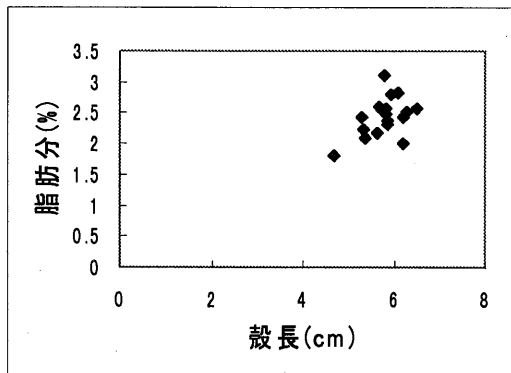
試料の概要 (穀長)



試料の概要 (脂肪分)

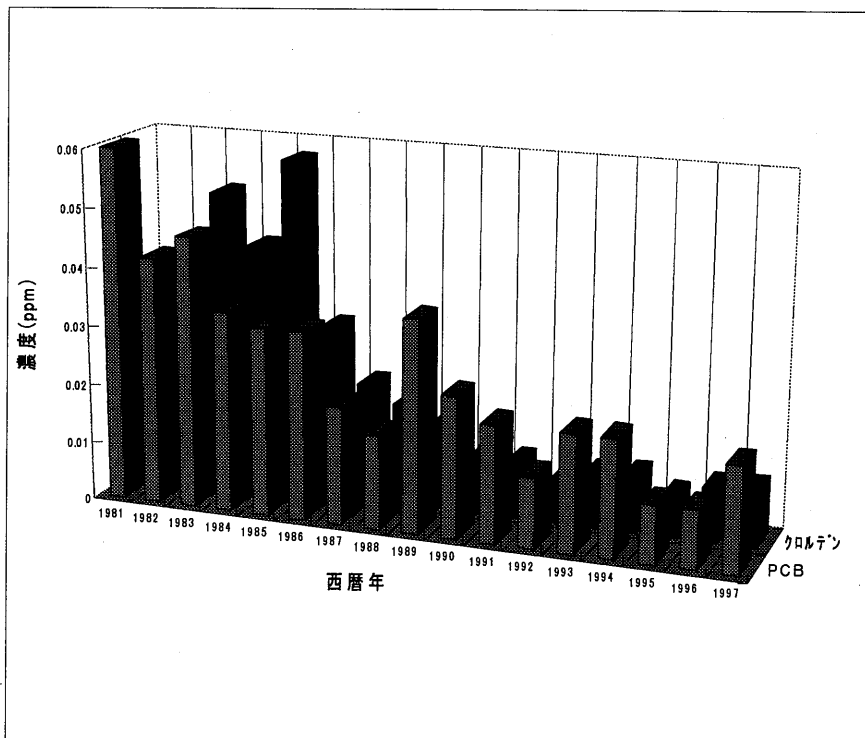


試料の概要 (穀長と脂肪分)

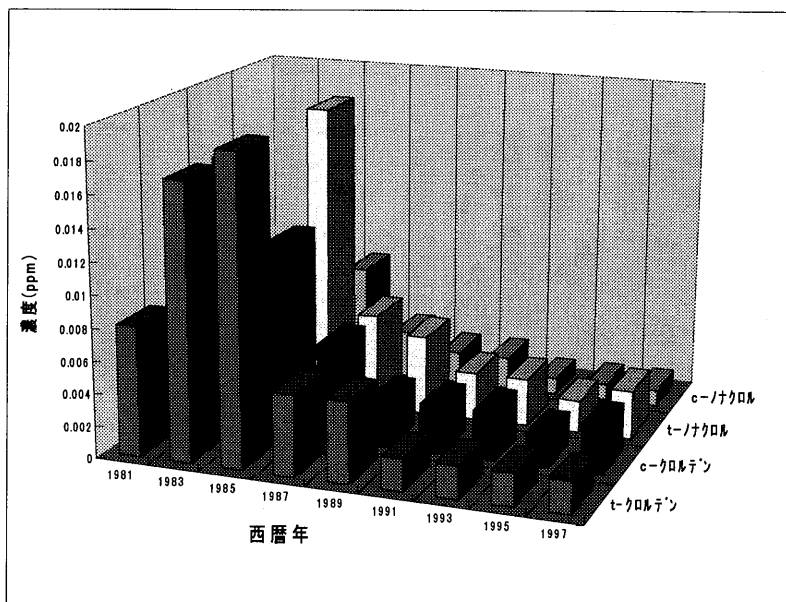




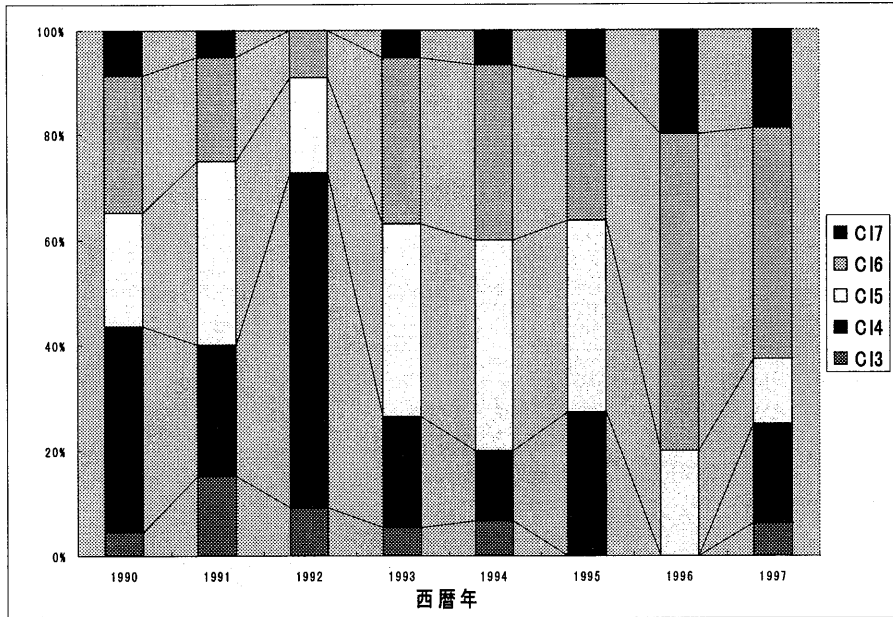
PCBとクロルデンの検出濃度の経年変化



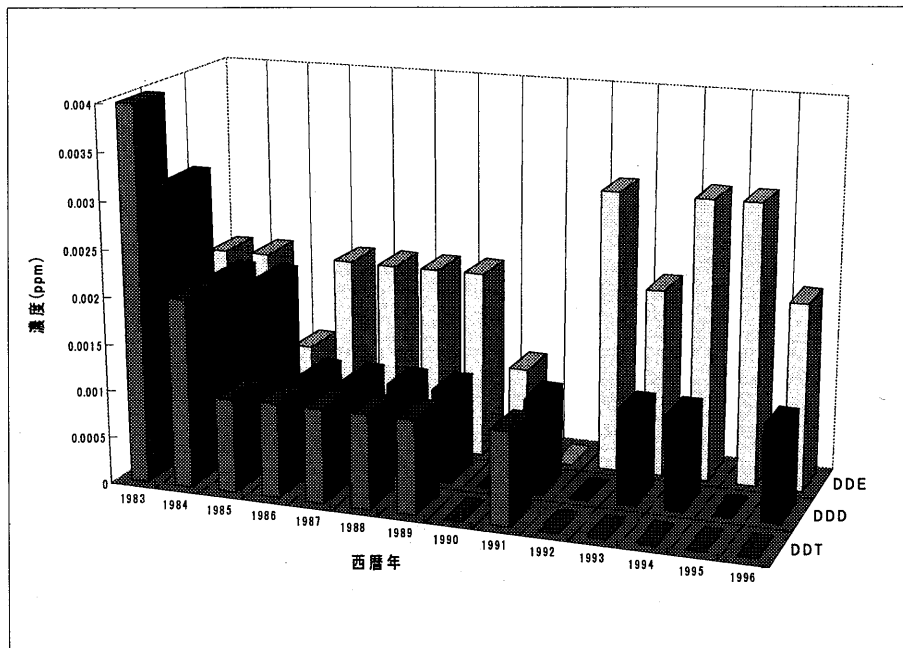
クロルデン濃度の成分別経年変化



PCBの塩素数別濃度の割合の経年変化

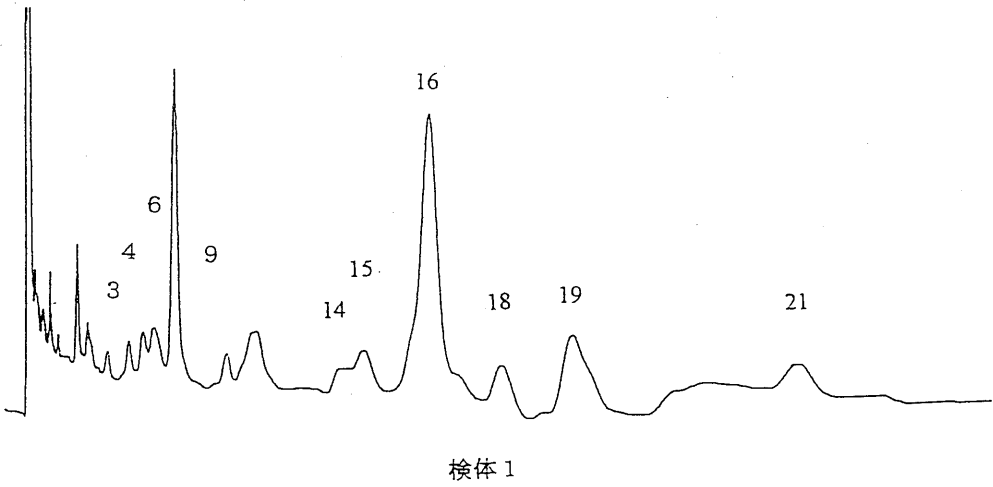
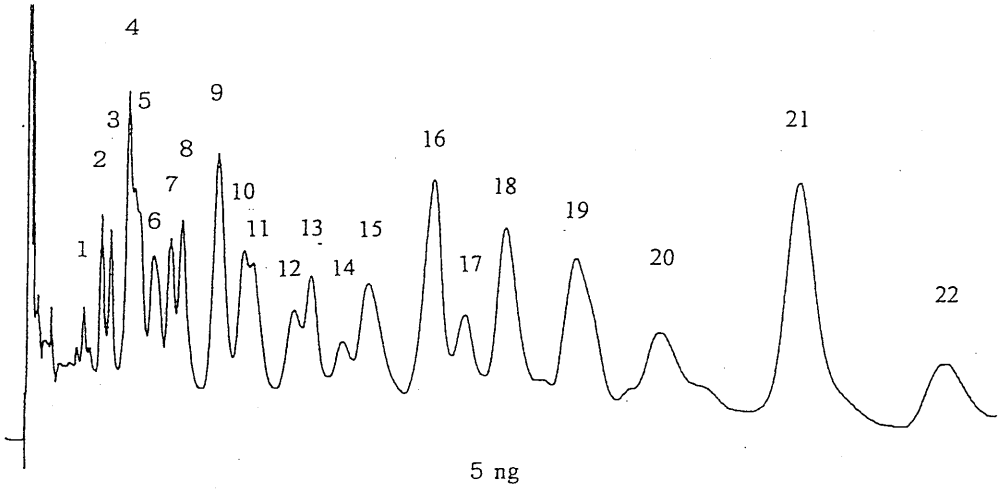


DDT類の代謝物別検出濃度の経年変化

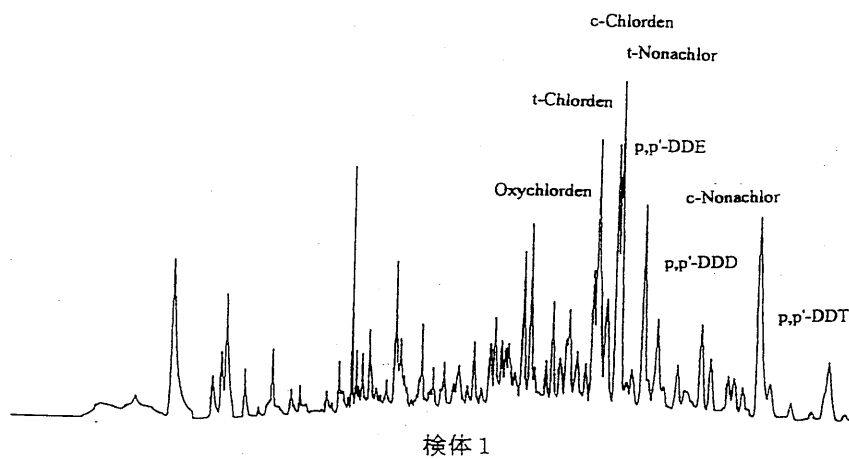
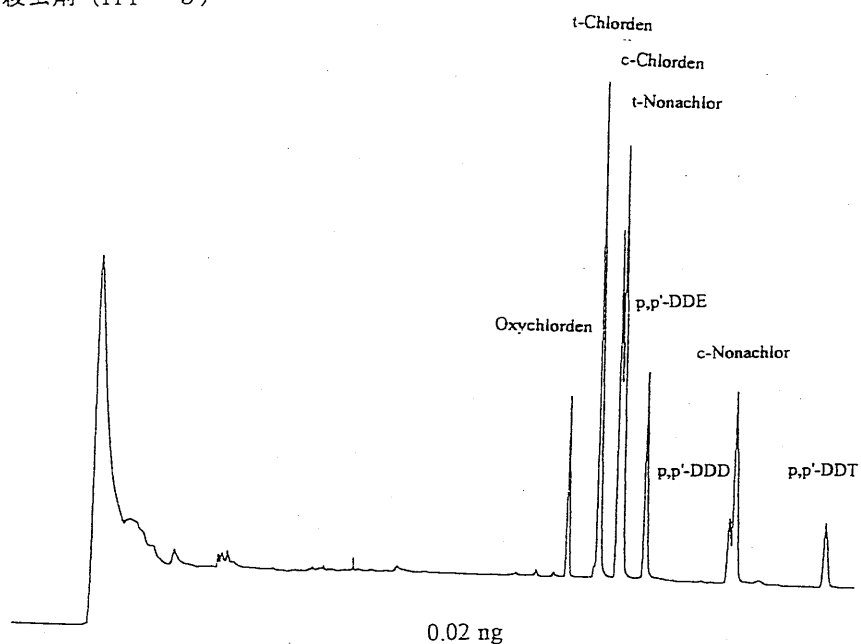


ガスクロマトグラム

PCB (OV-1)



有機塩素系殺虫剤 (HP-5)



## 技術講演の部

エストラジオール17- $\beta$ の分析

(環境管理センター) 鳥貝 真

内分泌攪乱物質の標準品について

(林純薬) 木村良夫

内分泌攪乱物質分析における固相抽出法とGC大量注入法の利用

(GLサイエンス) 佐々野遼一

内分泌攪乱物質分析のGC条件

(横河アナリィカルシステムズ) 佐久井徳広

内分泌攪乱物質分析における負化学イオン化法GC-MSの応用

(島津製作所) 宮川治彦

内分泌攪乱物質分析の磁場型及び四重極MSにおけるデータ比較

(日本電子) 上田祥久



## 17 $\beta$ -エストラジオールの分析

株式会社 環境管理センター  
環境基礎研究所 鳥貝 真  
尹 順子

### 1.はじめに

現在、全国規模での調査分析が行われている外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）には、環境庁が指定する約 70 物質があり、それらは農薬や界面活性剤等の原料、分解生成物であるアルキルフェノール類、フタル酸エステル等のプラスチック可塑剤、非意図的生成物としてのダイオキシン類などである。この中で、17 $\beta$ -エストラジオールは天然に存在する人畜由来の女性ホルモンであるが、環境中に放出される中でその放出量が多く活性の高いホルモンであるために、また化学物質の影響を正確に把握するために調査の対象となった物質である。

その分析法には、現在、ELISA 法 (Enzyme-linked immunosorbent assay) と誘導体化-GC/MS 法が採用されている。ELISA 法は簡便な方法ではあるがその精度には限界があり、一方、GC/MS 法では精度は高いものの操作過程が複雑であり分析に長時間を要する。このため、これら 2 つの分析法はその調査目的によって使い分けられる必要がある。平成 10 年 7 月から 8 月に建設省が行った全国一級河川の実態調査（河川における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査）では ELISA 法が用いられ全調査地点 256 地点のうち 87%の地点で検出されている。本報告では、これら 2 つの分析法の比較検討および LC-MS を用いた検討結果について報告する。

### 2.実験方法

#### ①試料

試料は多摩川およびその流入河川において採取し、GF/C でろ過をしたろ液を用いた。試料採取地点を分析結果と共に表 1 に示した。

#### ②試薬および ELISA キット

試薬は残留農薬試験用または試薬特級以上のものを用いた。ELISA キットは R-Biopharm 社製のものを使用した。サロゲート物質(D<sub>4</sub>-標準品)は Cambridge Isotope Laboratories, Inc の  $\beta$ -Estradiol-2,4,16,16-D<sub>4</sub>を用いた。

#### ③分析方法

分析フロー図（「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」：環境庁水質保全局水質管理課）を Fig.1 に示した。

### 3. 実験結果

- ①誘導体化-GC/MS 法により標準品およびサロゲート物質(D<sub>4</sub>-標準品) のマススペクトルを確認し、Fig.2, 3 に示した。
- ②標準品およびサロゲート物質(D<sub>4</sub>-標準品) について SIM 法による検量線を作成し Fig.4 に示した。
- ③ELISA 法による検量線を Fig.5 に示した。
- ④標準品を添加した河川水ろ液中の 17 $\beta$ -エストラジオールを ELISA 法、GC/MS 法でそれぞれ分析しその結果を表 1 に示した。
- ⑤LC-MS 法による検量線を作成し Fig.6 に示した。

### 4. 考察

- ①誘導体化-GC/MS 法で分析を行った場合、添加回収試験の結果から判断して、サロゲート物質(D<sub>4</sub>-標準品) の回収率が低下する傾向が認められ、抱合体を分解する過程で特に顕著であった。
- ②簡便で精度の高い分析法として LC-MS 法の有効性が示唆された。



表1 GC/MS法およびELISA法による標準品添加河川水の分析結果

採取地点名	分析値 (ng/L)	
	GC/MS法	ELISA法
標準品添加/多摩川(日原川合流前)	45	21
標準品添加/多摩川(羽村堰)	36	24
標準品添加/下水処理場放流水	135	63
標準品添加/多摩川(二ヶ領)	89	35

環境水中のエストラジオール定量の概略

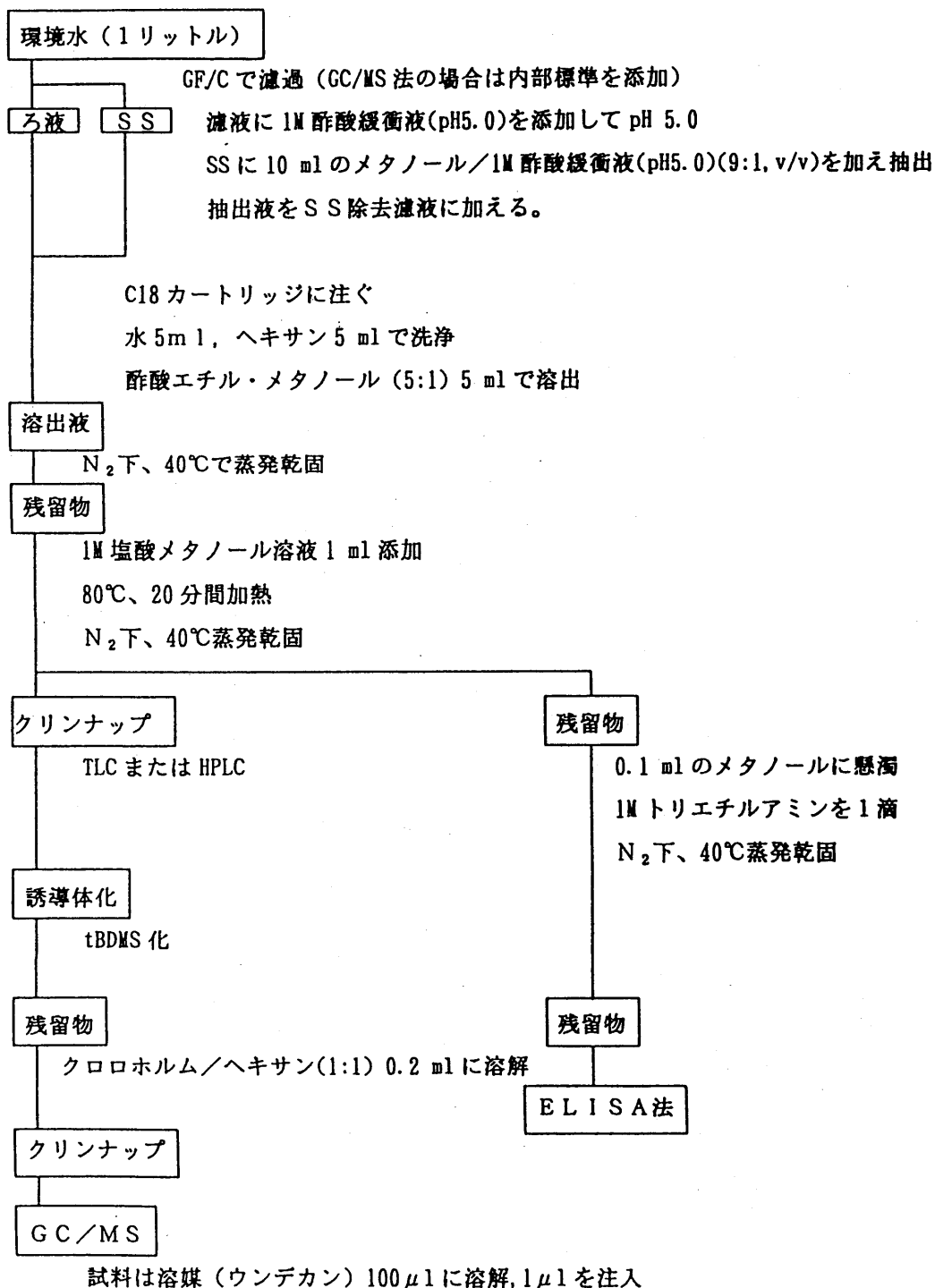


Fig. 1 エストラジオールの分析フロー図

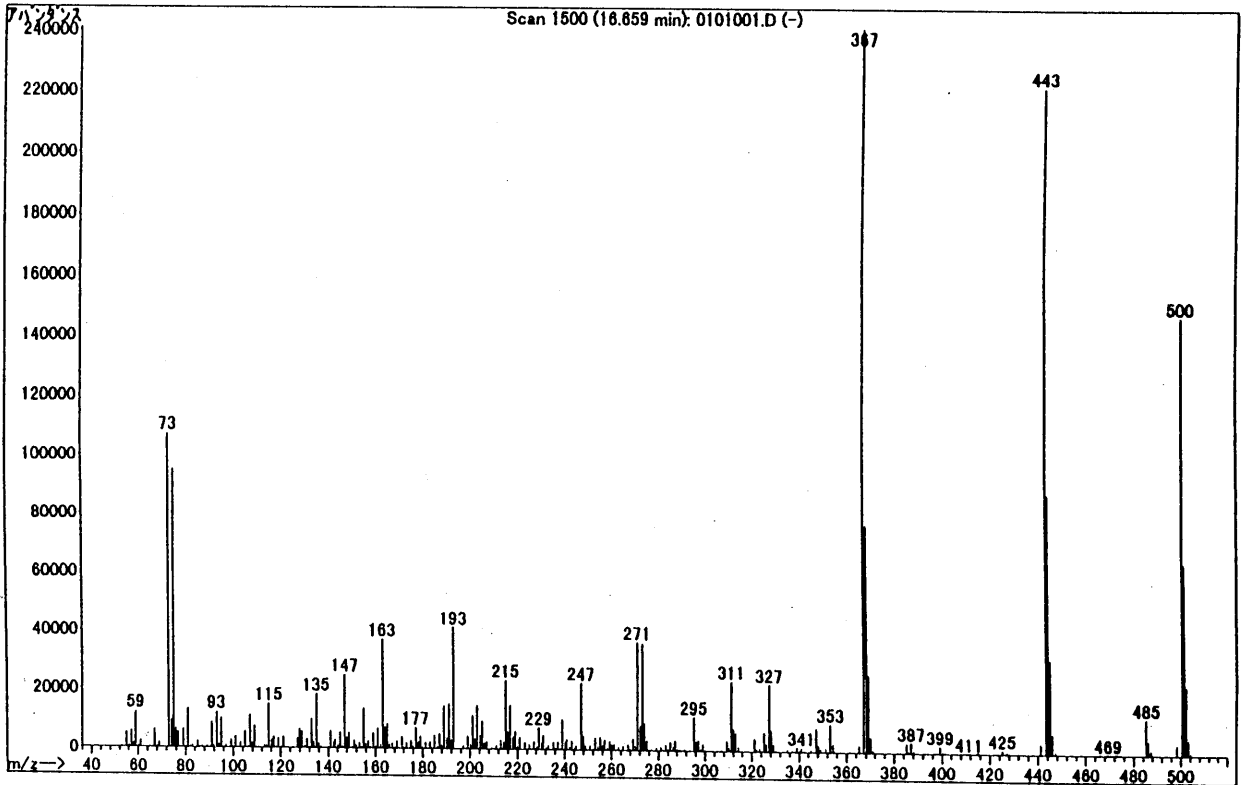
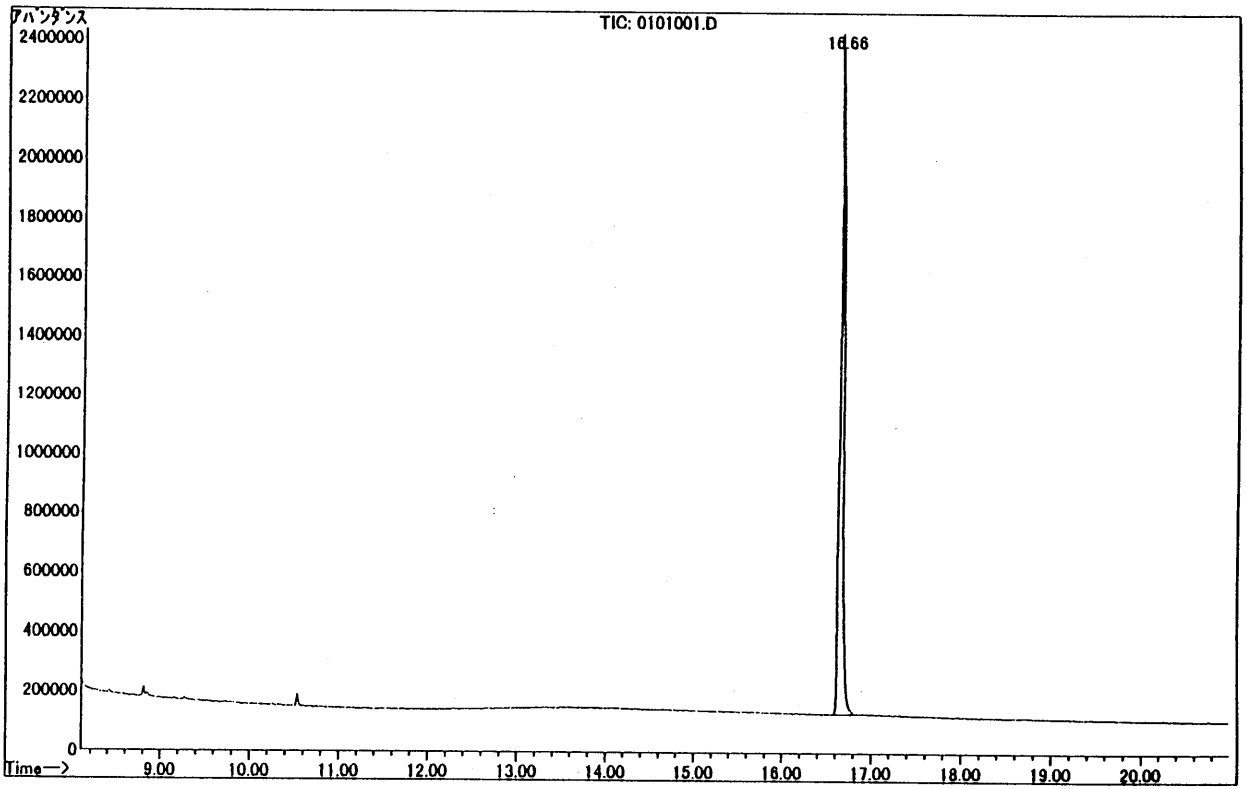


Fig. 2 誘導体化 (tBDMS 化) した標準品のクロマトグラムおよびマススペクトル

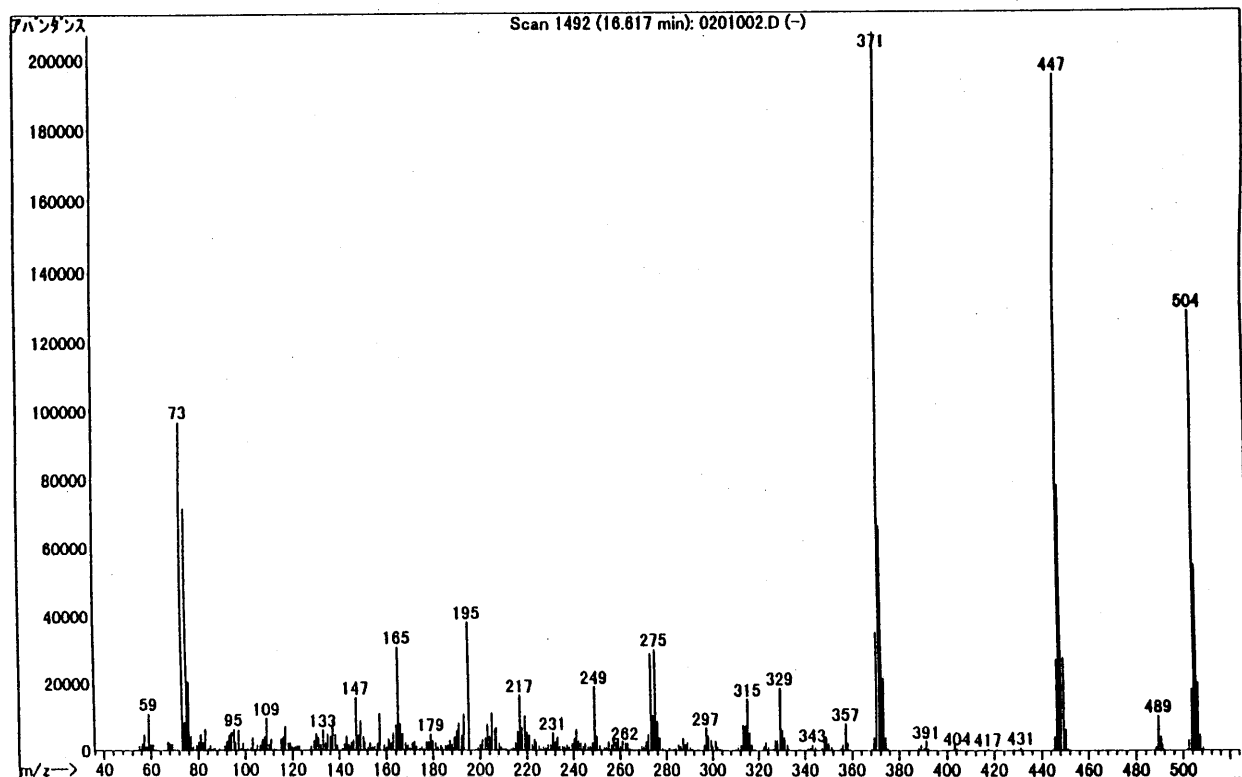
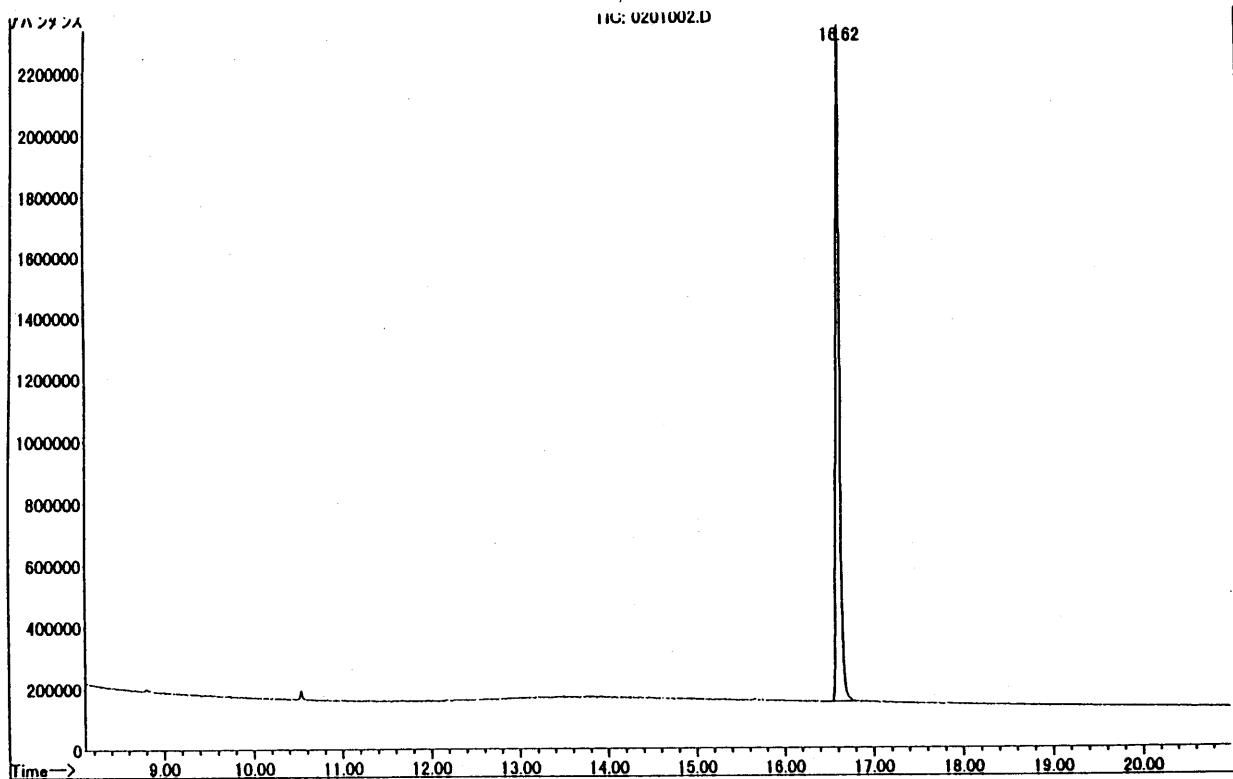
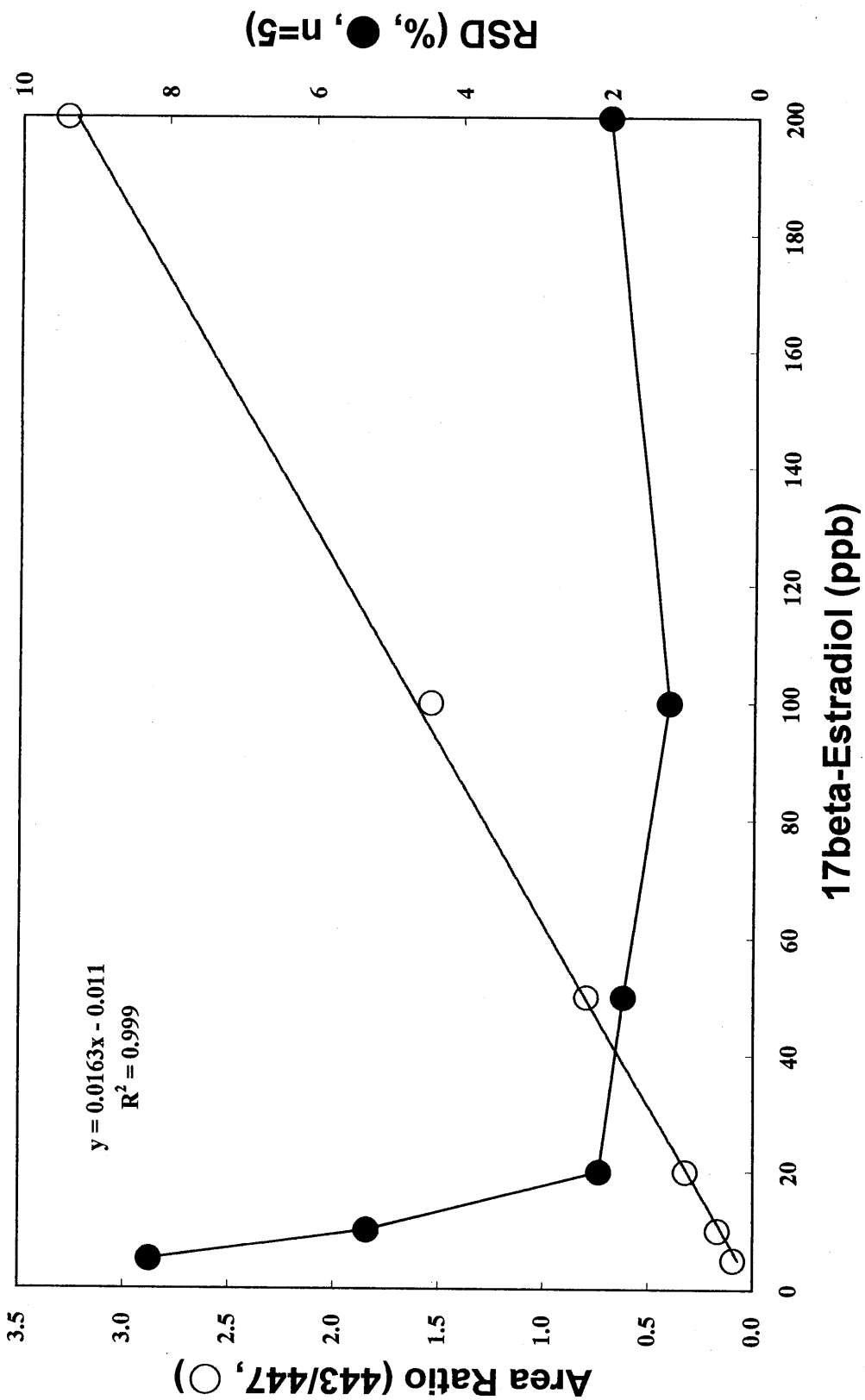
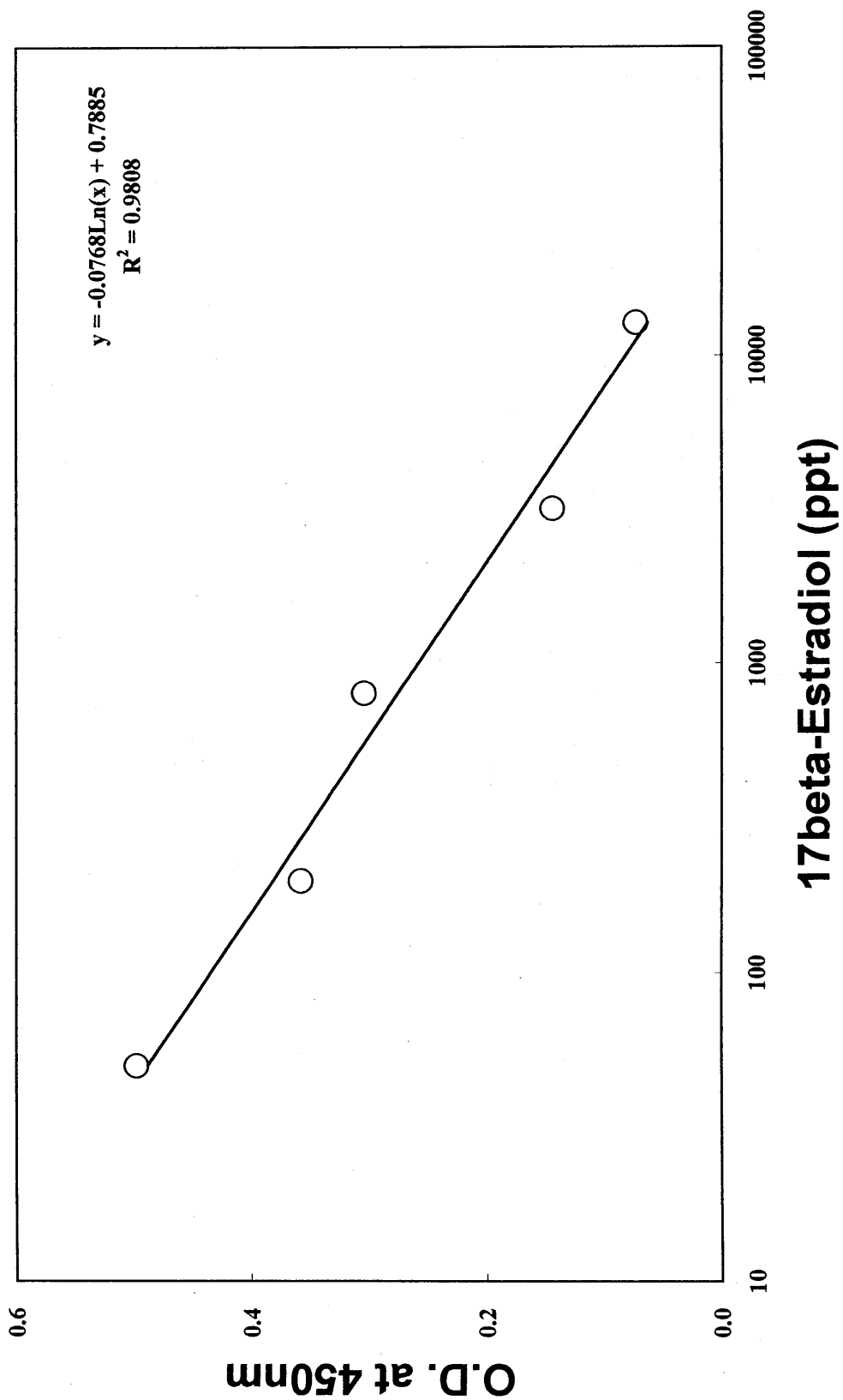


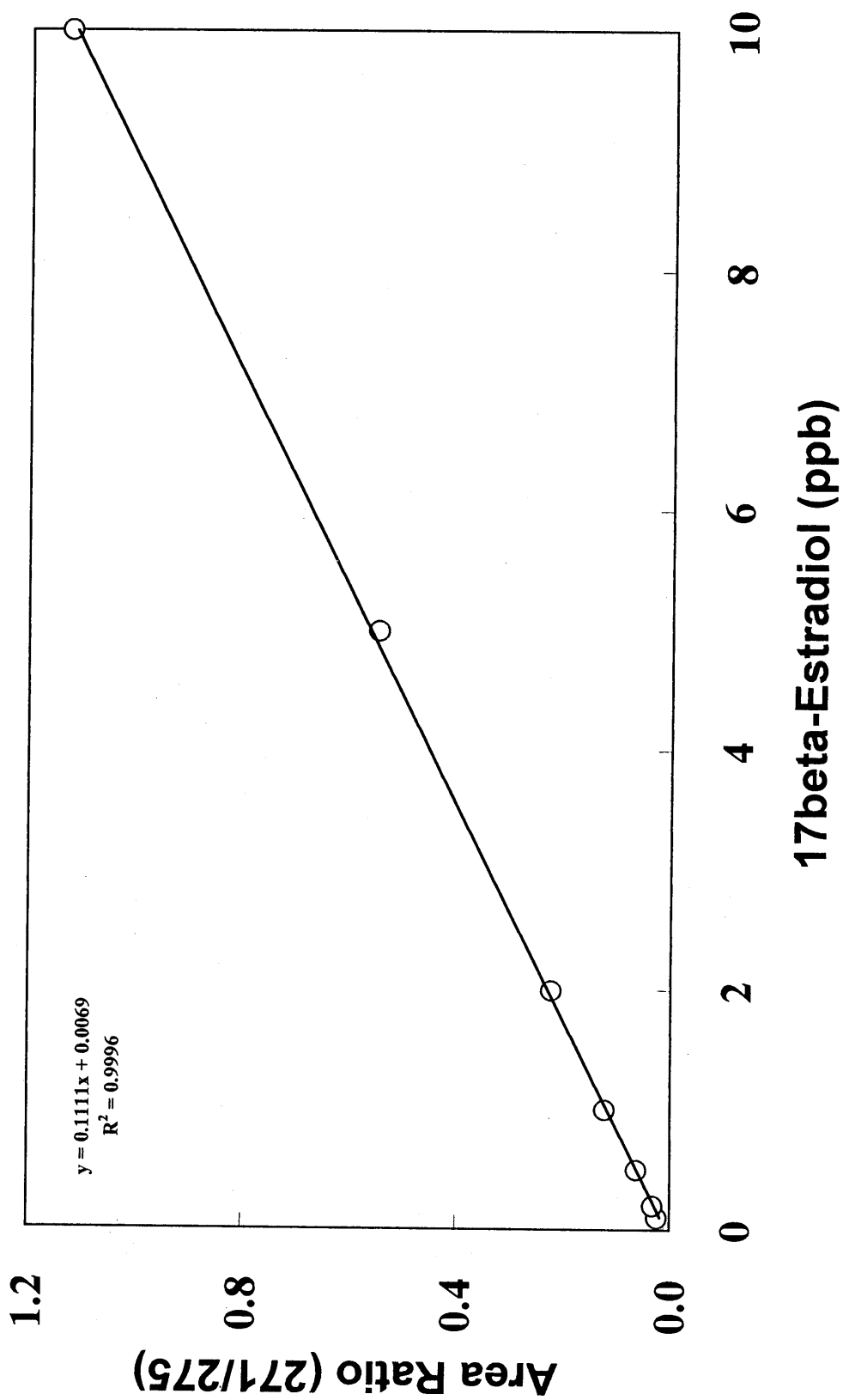
Fig. 3 誘導体化 (tBDMS 化) したサロゲート物質のクロマトグラムおよびマススペクトル



**Fig. 4 Calibration curve of 17beta-Estradiol by GC/MS**



**Fig. 5 Calibration curve of 17beta-Estradiol by ELISA kit**



**Fig.6 Calibration curve of 17beta-Estradiol by LC-MS**





# 内分泌攪乱物質の標準品について

林 純薬工業(株) 木村良夫

## はじめに

最近、内分泌攪乱物質の分析における関心が高まっています。それに伴ない標準品の重要性が指摘されています。

そこで、標準品の種類、保存法、サロゲート物質など最近の話題について報告します。

## 内分泌攪乱作用を有すると疑われている化学物質

- プラスチック関連物質
- 可塑剤
- 工業化学物質
- 環境汚染物質
- 農薬
- 重金属類
- 合成エストロゲン類
- 植物エストロゲン類
- その他

## プラスチック関連物質

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| ● ビスフェノールA         | ● オクチルフェノールエトキシレート |
| ● 4-n-ブチルフェノール     | ● 4-ペンチルフェノール      |
| ● 4-sec-ブチルフェノール   | ● 4-tert-ペンチルフェノール |
| ● 2-t-ブチルフェノール     | ● 4-tert-プロピルフェノール |
| ● 3-t-ブチルフェノール     | ● スチレンモノマー         |
| ● 4-ノニルフェノール       | ● スチレンダイマー         |
| ● ノニルフェノールエトキシレート  | ● スチレントリマー         |
| ● オクチルフェノール        |                    |
| ● 4-オクチルフェノール      |                    |
| ● 4-tert-オクチルフェノール |                    |

## □ 可塑剤

- フタル酸 n-ブチルベンジル (BBP)
- フタル酸ジ-n-ブチル (DBP)
- フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)
- フタル酸ジエチル (DEP)
- アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHA)
- フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP)
- フタル酸ジ-n-ヘキシル (DnHP)
- フタル酸ジ-n-ペンチル (DPP)
- フタル酸ジ-n-プロピル (DprP)

## □ 工業化学物質

- ベンゾフェノン
- 6-ブロモナフトール-2
- ブロモキシニル
- 4-ブトキシフェノール
- ブチルベンゼン
- ブブロモ酢酸
- 2,4-ジクロロフェノール
- 4-ドデシルフェノール
- 4-ニトロトルエン

## □ 環境汚染物質

- ベンゾ(a)ピレン
- オクタクロロスチレン
- PBB
- PBBs
- PCDDs
- PCDFs

## □ 農薬

- アラクロール
- アルディカルブ
- アルドリシ
- アミトロール
- アトラジン
- アザディラクチン
- ベノミル
- カルベンダジム
- カルバリル
- クロルデン
- クロルジメホルム
- クロフェンテジン
- シペルメトリン
- 2,4-D
- DDE
- DDD
- DDT
- 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン
- ジクロルボス
- ジコホール
- ディルドリン
- ジフルベンズロン
- ジノゼブ
- エンドスルフアン
- エンドリン
- エスフェンバレレート
- エチオジン
- 二臭化エチレン
- チオ尿素エチレン
- フェノキシカルブ
- フェンバレレート
- フルアジホップブチル
- ヘプタクロール
- ヘプタクロール エポキシド
- HCB
- HCH
- リンデン
- ヘキサコナゾール
- アイオキシニル
- イプロジオン
- クロルデコン
- リニューロン
- マラチオン
- マンゼブ
- マンネブ
- メソミル
- メトキシクロル
- パラチオンメチル
- メチラム
- メトリブジン
- ミレックス
- モリネート
- ニトロフェン
- トランスノナクロール
- オリザリン
- オキシクロルデン
- オキシデメトンメチル
- パラチオン
- ペンディメタリン
- PCP
- ペルメトリン
- フェノリン
- o-フェニルフェノール
- プロピザミド
- シマジン
- 2,4,5-T
- トキサフェン
- トリフラリン

- トリホリン
- ビンクロゾリン

- ジネブ
- ジラム

## □ 重金属類

- カドミウム
- 鉛
- 水銀
- 水酸化トリブチルすず
- 酸化トリブチルすず
- 塩化トリブチルすず
- 塩化トリフェニルすず
- トリブチルすず化合物
- トリフェニルすず化合物

## □ 合成エストロゲン類

- セントクロマン
- エチニルエストラジオール
- DES
- ヘキサエスロール
- 2-ヒドロキシエストラジオール
- モキシエストロール
- ノキシノール
- プロゲステロン
- タモキシフェン
- ラロキシフェン

## □ 植物エストロゲン類

- ビオカニン A
- クメステロール
- ダイゼイン
- ホルモネチン
- ゲニステイン
- ゼアラレノール
- ゼアラレノン

## □ その他

- BHA
- エクオール
- エンテロラクトン
- 4,4'-ジヒドロキシビフェニル

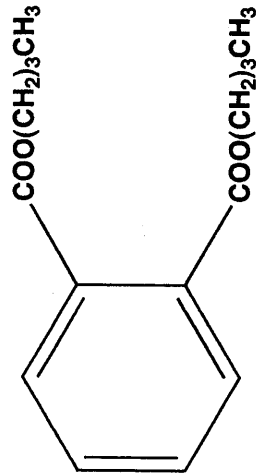
## 標準品の問題点

- 有機溶剤の選択
- 保存法
- サロゲート物質

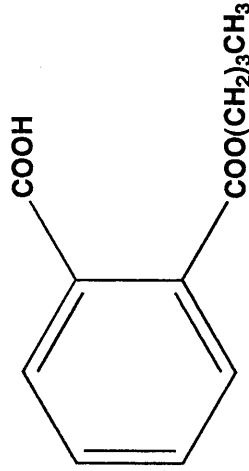
## 最近の話題

- フタル酸モノエステル
- スチレンダイマー、トリマー
- アルキルフェノールエトキシレート
- サロゲート物質

# フタル酸エステル

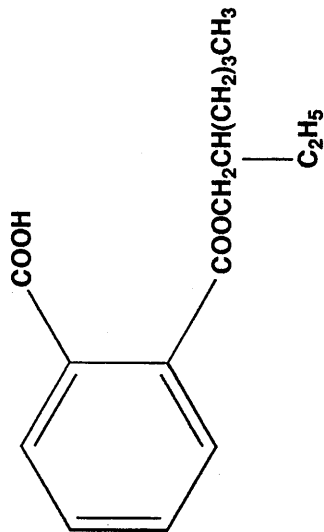
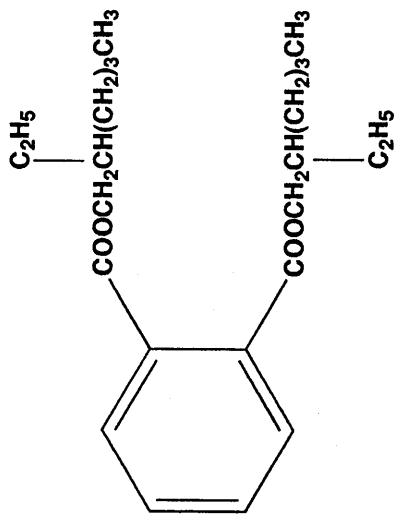


フタル酸-ジ-*n*-ブチル



フタル酸-モノ-*n*-ブチル

# フタル酸エステル

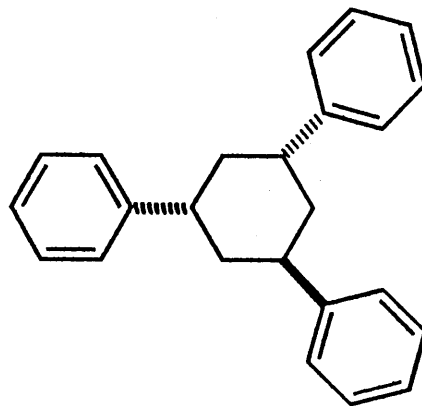


フタル酸-ジ-(2-エチルヘキシル)

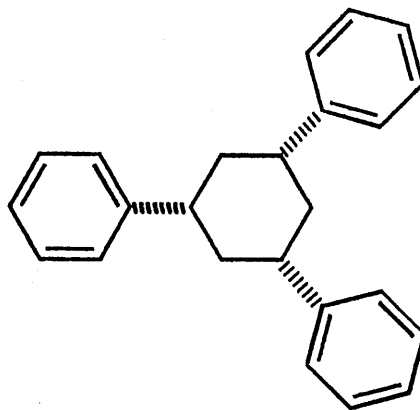
フタル酸-モノ-(2-エチルヘキシル)

# Styrenetrimer

## (1) triphenylcyclohexane



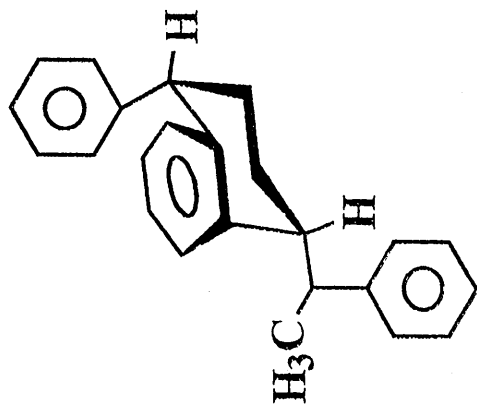
**1e, 3e, 5a-triphenylcyclohexane**



**1e, 3e, 5e-triphenylcyclohexane**

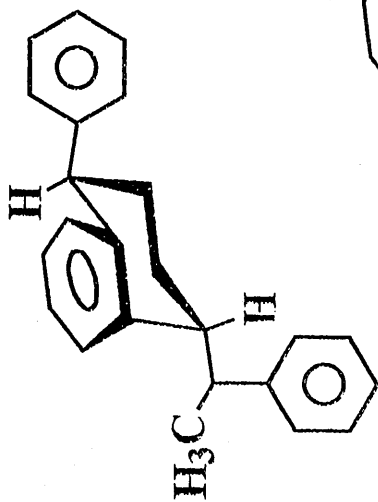


# (2) 1-phenyl-4-(1'-phenylethyl)tetraline

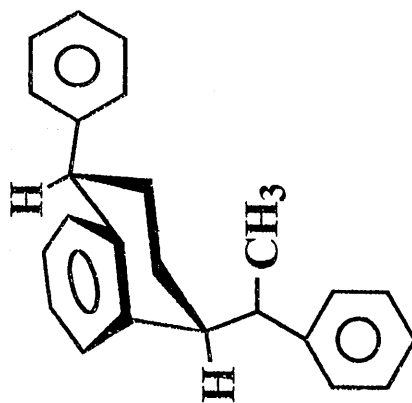


1 (1-eq, 4-eq)

3 (1-eq, 4-ax)

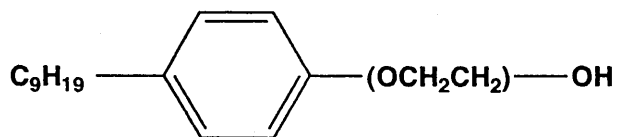


2 (1-ax, 4-eq)

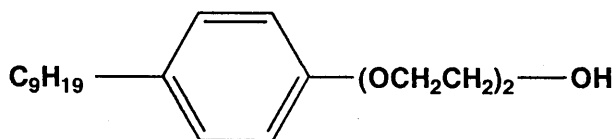


4 (1-ax, 4-ax)

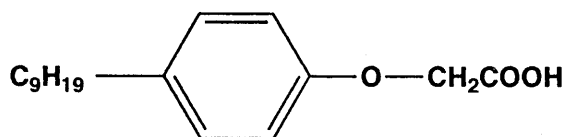
# アルキルフェノールエトキシレート



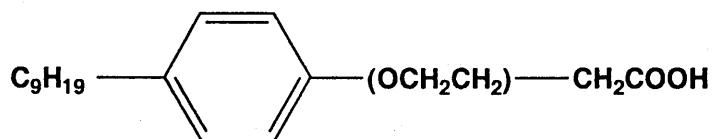
ノニルフェノールモノエトキシレート



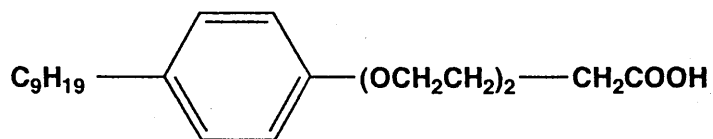
ノニルフェノールジエトキシレート



ノニルフェノキシ酢酸



ノニルフェノールモノエトキシ酢酸



ノニルフェノールジエトキシ酢酸

# 内分泌攪乱化学物質分析における固相抽出法と GC 大量注入法の利用

ジーエルサイエンス (株) 佐々野 僚一

## 【はじめに】

これまでに環境中には多種多様な化学物質が放出され、人の健康に影響を与えてきた。ここ数年来は、それら有害物質の長期暴露による発ガン性などを含めた健康影響が懸念され、大気、水質、土壌など環境中への排出抑制の対策が取り組まれてきている。ところが、最近になって、内分泌機能を攪乱させる作用を持つ化学物質（環境ホルモン）による人の健康影響や野生生物への影響の可能性が指摘され、多くの事例も見出されている。

日本における内分泌攪乱物質に関する調査研究は極めて少なく、まだ未解明な点が多いものの、世代を超えた深刻な影響を及ぼすおそれがあるため、様々な、角度からの早急なる調査研究が要望されている。そこで、環境庁では平成 9 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、同年 7 月の中間報告書を踏まえ、「外因性内分泌攪乱化学物質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—」を平成 10 年 5 月に公表した。

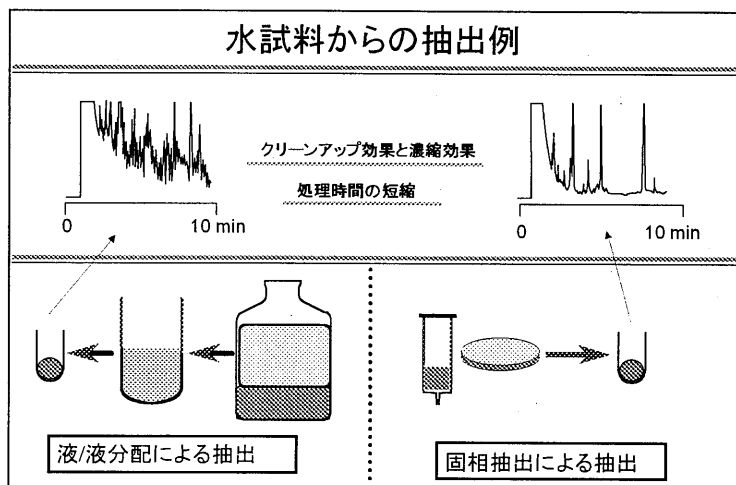
内分泌攪乱物質は極微量においても問題を生じると言われており、環境中の動態を的確に捉える事が必要であり、そのための正確で信頼性の高い分析手法が望まれている。第 24 回日本環境化学会「環境ホルモンのモニタリング手法」（後日一部修正有り）、環境庁水質保全局水質管理課編「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」、第 26 回日本環境化学会「水質、底質及び生物の内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の分析法」などの分析法指針が提案されているが、測定値には厳密な精度管理が要求されており、精度管理が容易(可能?)な測定法の改良が進められている。しかしながら、期待する検出下限値が極めて低いために一部の測定対象物質ではブランクや実験室環境からのコンタミネーションの問題も多く、測定者の技術の問題もあるかもしれないが、ハードルは高い。

上述の測定法指針では、固相抽出法が幅広く採用されている。また、作物残留農薬のクリーンナップで利用されているサイズ排除(ゲル浸透)クロマトグラフィーが利用されている。ここでは、これらの前処理操作において演者らの得た幾つかの知見を報告するとともに提案を述べる事にする。

## 【固相抽出法】

固相抽出法は液液抽出に比べエマルジョンができない、溶媒使用量が少ないなどのメリットがあり、また使用するゲルの特性を利用する事により選択的な抽出が可能でクリーンナップ効果も期待できる<sup>1) 2)</sup>。

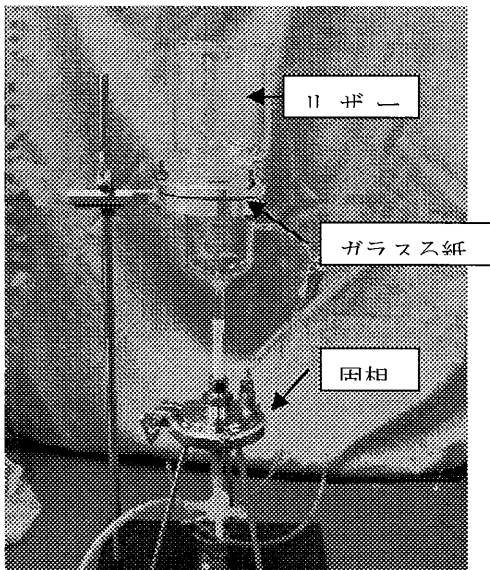
固相には注射筒にゲルを詰め、シリンジバレル型とカート



リッジ型、そしてディスク状のものがある。容器には高密度ポリエチレンやポリプロピレンが通常使用されているが、フタル酸エステルなどの分析のためにガラス/テフロン製の物も用意されている。ガラス製の固相を使用する場合は、それに付属して使用するストップバルブなども 3 弗化や PFA 製のものより 4 弗化製のテフロンが望ましい。

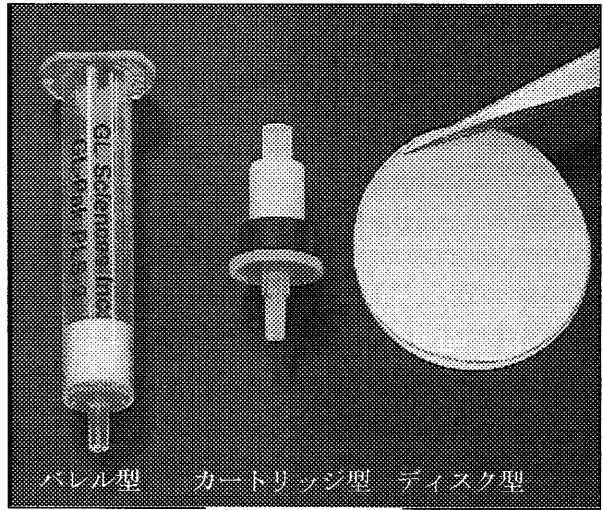
ディスク状の固相は C18 やポリマービーズなどの充填剤をテフロン(3M製)やガラス繊維(スバル製など)で固定化している。3M製エムポアディスクの電子顕微鏡写真を右下に示す。大量の試料水を比較的短時間で処理できるために、EPAでは多くの公定法に採用されており、国内でもキレートによる金属の回収<sup>3)</sup>やアルキルフェノールの回収に利用されている<sup>4)</sup>。

懸濁物が有るような試料の大量処理では目詰まりが問題になるため、渡辺

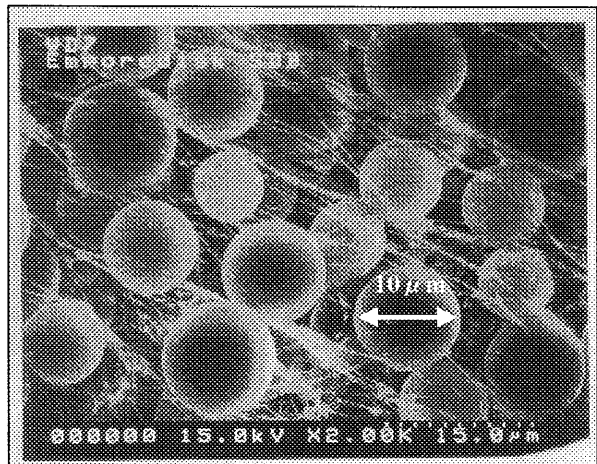


SSのある試料の大量処理の例

環境中のリスク化学物質のモニタリングにおける固相抽出法の有効性	
● <u>大気、室内大気試料</u>	○ ディスク型固相による高速捕集が可能。半揮発性成分から不揮発性成分に対して有効
● <u>環境水、排水試料</u>	◎ ディスク型固相による高速捕集が可能。多成分スクリーニング、低濃度物質の高濃縮に有効 △ カートリッジ型固相による自動化が可能
● <u>土壌試料</u>	△ 目的に応じて水や溶媒による振とう抽出、ろ過後、固相抽出系へ



固相の種類



テフロン繊維でSDBを固定化したディスク状固

(大阪府公衛研)らは、ガラスろ紙と直列に配置できるような装置(写真前ページ左下)を考案し、水中ダイオキシン類の抽出に利用している。この場合、C18などの疎水性の強い固相は通水中に空気が混入すると、流れにチャンネルができ、回収率が低下するので注意を要する。

### EPAにおけるディスク型固相の利用例

EPA Method	分析物質	試料マトリクス	分析方法
506	フタル酸およびアジピン酸エステル	飲料水	GC/PID
550.1	多環芳香族	飲料水、原水	HPLC/UV、FD
525.1	有機化合物	飲料水、原水	GC/MS
513	ダイオキシン	飲料水	GC/MS
515.2	塩素化酸	飲料水、原水	GC/ECD
548.1	エンドサル	飲料水、原水	GC/MS
549.1	ジクワット、バラクワット	飲料水、原水	HPLC/UV
552.1	ハロ酢酸、ダラボン	飲料水、原水	GC/ECD
553	ベンジジン、含窒素農薬	飲料水	HPLC/PBMS
554	アルデヒド類	飲料水、原水	HPLC
555	塩素化酸	飲料水、原水	HPLC/DAD
8061	フタル酸エステル	廃液、固体廃棄物	GC/ECD
525.2	有機化合物	飲料水、原水	GC/MS
508.1	有機塩素系農薬	飲料水、原水	GC/ECD
608	有機塩素系農薬、PCB	廃水	GC/ECD
1613	PCDDs/PCDFs	水試料	同位体希釈、GC/MS
1664	オイル、グリース、炭化水素	水試料	重量法
507.1	含窒素、含リン農薬	飲料水、原水	GC/NPD

詳細は後述するが、近年、ディスク型固相の流れやすさを利用し、石英ろ紙と2枚重ねにして大気中有害物質の捕集に応用されている<sup>5) 6) 7)</sup>。粒子状物質を石英ろ紙で捕捉し、ガス状物質をスチレンージビニルベンゼンのディスク型固相で捕集する。鈴木らは多環芳香族の測定に利用しているが、ベンズ(a)ピレンなどが捕集の際に酸化して変成する事を示している<sup>6)</sup>。一般大気の捕集では24時間捕集が一般的になっているが、短時間大量捕集などの工夫が必要かもしれない。また、鈴木らは大気中のフタル酸エステルの捕集に活性炭繊維ろ紙を利用した報告を行っている<sup>8)</sup>。ろ紙から回収には超音波やソックスレー抽出を用いる事ができるが、活性炭繊維ろ紙は極性物質が回収しにくいので注意を要する。同じ意味で、使用前の洗浄にも配慮が必要である。

### <珪藻土カラムの利用>

作物・食品・生物等中の有害有機物質の抽出には、珪藻土カラムの利用が便利である。珪藻土カラムはChemelut(Varian),Extrelut(Merck)などが市販されている。残留農薬分析では試料数十グラムにアセトンを加えてホモジナイズした後、珪藻土カラムに流し、その後酢酸エチル等で溶出する訳であるが、この時の珪藻土の役目は水分除去と試料の担持である。簡便な方法であるが、容器にプラスチックを用いておりフタル酸エステル類や炭化水素のパックグラウンドが出るおそれがある。

演者らは再利用できるガラス製注射筒とテフロンフィルターを利用し、フタル酸エステルフリーの抽出治具の試作を試み良い結果を得ている。

#### <クリーンアップ>

環境分析において、きょう雑物を取り除くクリーンアップ操作は、不可欠なものとなっている。その中で、成分によっては、より微量検出の必要性が示唆されてきており、クリーンアップもより精度の高いことが要求されてきている。

固相抽出後、溶出液を濃縮したものをガスクロマトグラムに注入すると、一緒に溶出されたきょう雑物のため測定が不可能になることがあり、その妨害物の除去操作が必要となる。そこで目的成分のみ、より極性の弱い溶媒へ再抽出して、水溶性のきょう雑物から分離する方法が転溶であり、クリーンアップの最初に行われる方法である。転溶溶媒としてはヘキサンが一般的である。試料溶液のクリーンアップ法でもっとも用いられる方法がカラムクロマト分離で、吸着剤を充填したクロマト管を通して不純物質を吸着分離するものである。代表的な充填剤としてシリカゲルやフロリジルなどが挙げられる。<sup>9)</sup>

農作物などの残留農薬を分析するためには、妨害物質を除去するのに GPC (ゲル浸透クロマトグラフィー) が用いられている。この GPC によるクリーンアップにより農作物に由来する色素や油脂成分などの妨害物質が除去され、農薬の多成分一斉分析が可能となった。

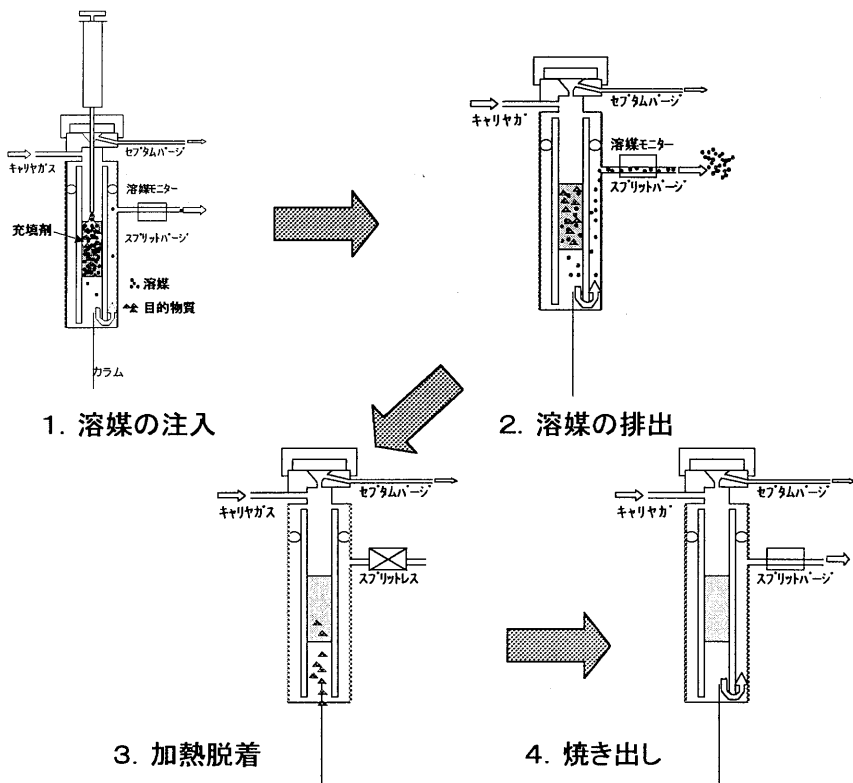
#### <濃縮操作>

通常、溶媒が多い場合はロータリーエバポレーターで、溶媒が少ない場合は窒素ページで濃縮を行う。ロータリーエバポレーターによる濃縮は特に注意を払う必要があり、目的成分の蒸気圧により回収率が異なることがある。PCB や DDVP (農薬) のような濃縮中に揮散しやすい化合物では揮散損失を防ぐために、キーパー (Keeper) としてジエチレングリコール又はトリエタノールアミンの 1%アセトン溶液を数滴加えるとよい。

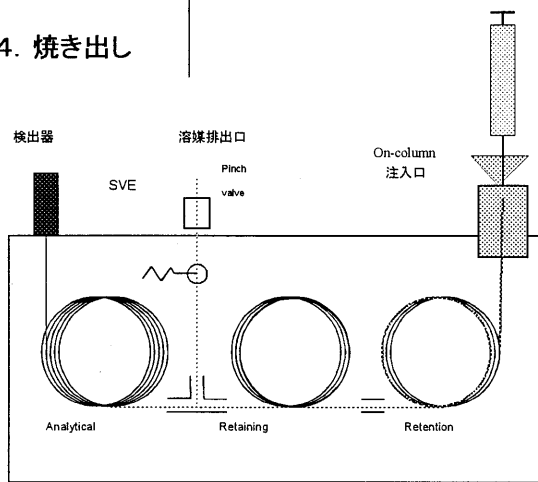
抽出した溶媒には微量の水分が溶け込んでいる場合があり濃縮する前に脱水する必要がある。脱水には中性の無水硫酸ナトリウムを用いるが、予め使用溶媒で洗浄するか 500~600℃で数時間加熱して妨害物質を取り除いておく必要がある。<sup>9)</sup>

【大量注入法】

従来用いられている大量注入法には、①充填剤を用いた溶媒排出 PTV 大量注入法と②オンカラム大量注入法の二通りがある。前者は充填剤に目的成分を保持させて、スプリットパージより溶媒のみを除去していき、溶媒が排出されたら、注入口の温度を上げて目的成分を充填剤から加熱脱着させ、カラムへ導入させる方法である。後者はオンカラム注入口を用いて、直接プレカラムにサンプルを注入する方法である。プレカラムは液層のコーティングされていない空カラムと液層を接続しており、このプレカラムと分離カラムの間に設けた溶媒排出ラインから溶媒を排出する。



① 充填剤を用いた溶媒排出 PTV 大量注入法



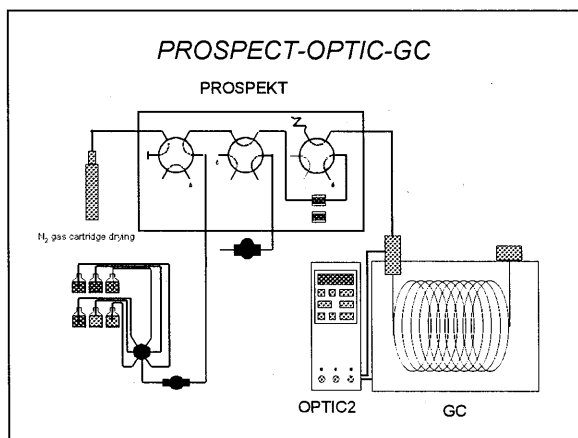
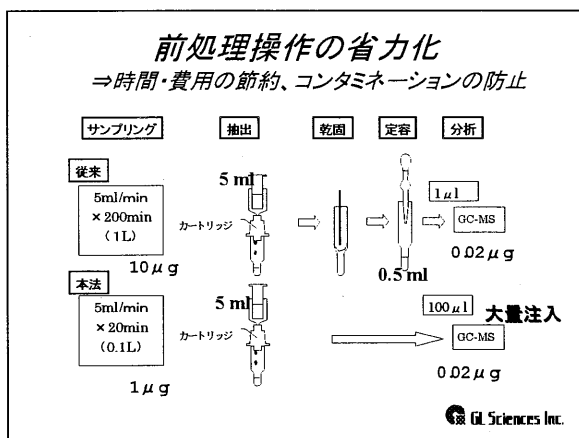
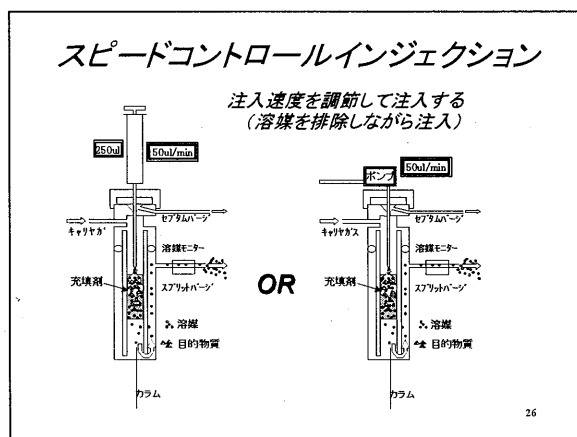
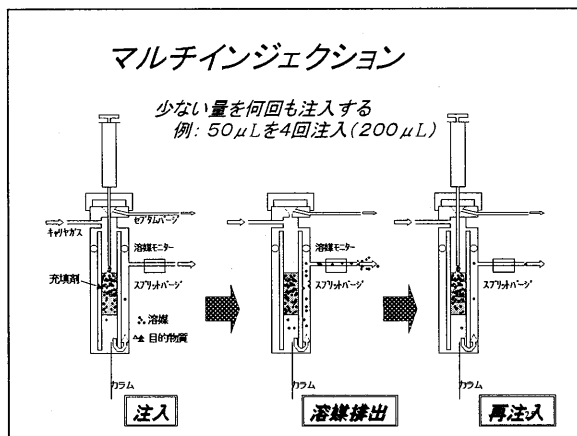
② オンカラム大量注入法

### <注入法式>

注入方法においては、おもに比較的早いスピードで1回注入するラピッドインジェクションと少ない量を何回も注入するマルチインジェクションそして注入速度を調節して（溶媒を除去しながら）連続的に注入するスピードコントロールインジェクションの3通りがある。最後の注入法はOn-Line GCの原理となる。

### <大量注入法の利点>

大量注入法の利点として、第一に感度向上が挙げられる。通常注入法（スプリットレスやオンカラム注入法）だと $2\mu\text{L}$ までしか注入できなかったのに対して、大量注入法を用いれば $100\mu\text{L}$ 以上の注入が可能となり、当然感度も100倍以上向上することになる。第二に、この感度向上により前処理操作の省略が可能となり、時間・費用の節約、コンタミネーションの防止につながる。第三に、スピードコントロールインジェクションを用いたSPE-GC、LC-GC等のハイフネーション技術のインターフェースとしての利用である。





### 【アットカラム大量注入法】

前述した溶媒排出 PTV 大量注入法（資料①）においては、サンプル濃縮に充填剤を使用しているために、溶媒を排出した後、注入口の温度を上げて目的成分を加熱脱着しなければならず、この過程で一部の目的成分は熱分解等を起こすことが知られている。そこで、演者らは、溶媒の蒸気圧を利用して充填剤を用いない溶媒排出 PTV 大量注入法（以後、アットカラム濃縮大量注入法）を開発した。<sup>10)</sup>

#### <アットカラム理論>

図1に示すように溶媒沸点付近の温度勾配をかけたカラムの中に溶媒を注入し、キャリアーガス圧力と溶媒の蒸気圧が平衡に達する温度のところで溶媒の静止が起こる。この理論を用いて、注入口温度をサンプル溶媒沸点以下に、オープン温度をサンプル溶媒沸点以上に設定して図2のようにプレスフィット式になっているライナーにサンプルを注入する。

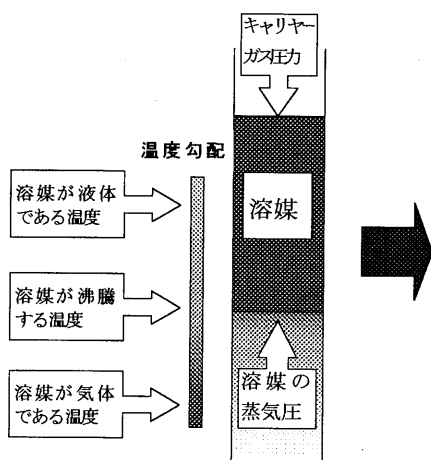


図1. 圧力の平衡状態による溶媒の静止

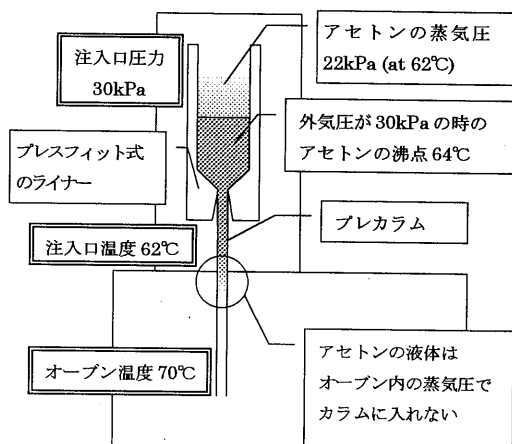


図2. ガスクロマトグラフへの応用

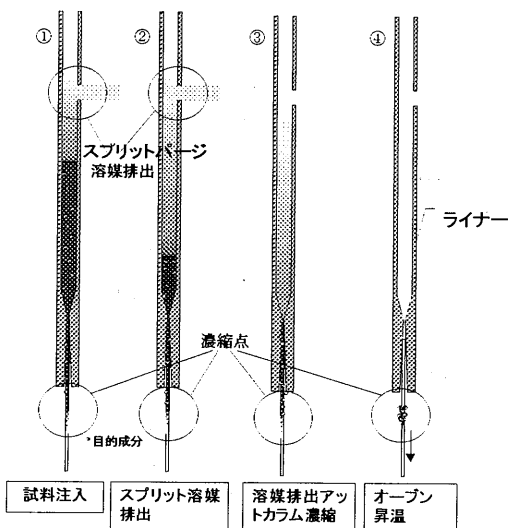


図3. 溶媒除去とアットカラム濃縮

この様にサンプルをライナー及びカラム中に液体のまま留めておくとサンプル溶媒は注入口の温度により一定の蒸気圧で揮発しようとする（温度と蒸気圧の関係）。ここでライナーに設けた溶媒排出口から揮発してくるサンプル溶媒を排出（スプリットパージ）しライナー中の溶媒を除去していく（図3）。サンプル中の溶媒を除去する事で最終的にカラム入り口部に目的成分が濃縮される。その後注入口とオープンの温度を上げる事により大量の溶媒を含む目的成分の分析を行う事が可能となる。

<注入口及び GC 条件>

アットカラム濃縮大量注入法の PTV 及び GC 条件の概念図を図 4 に示す。溶媒排出段階では、注入口温度は溶媒の沸点より低めに（注入口内で溶媒が沸騰を起こさないように）、オープン温度は溶媒の沸点より高めに（溶媒が液体の状態メインカラムに入っていないように）設定する。溶媒排出が終了したら通常の分離条件になるように設定する。尚、溶媒の沸点はキャリヤーガスの圧力に依存するが、周知の Antoine 式 (I) を用いて容易に求めることができる。

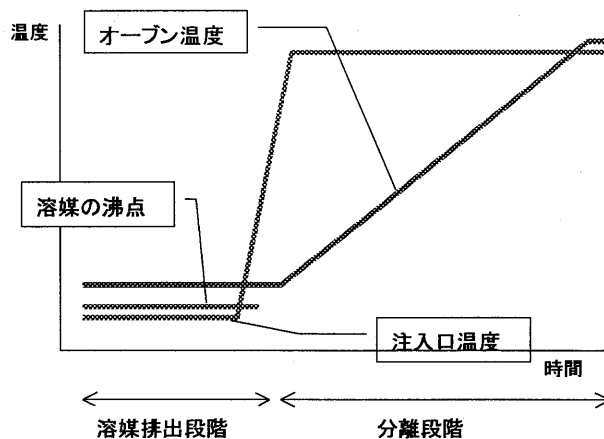


図 4. 条件の概念図

$$\text{Log}(p / \text{mmHg}) = A - \frac{B}{C + (t / ^\circ\text{C})} \quad \text{--- (I)}$$

p; 圧力、 t; 溶媒の沸点  
A,B,C は物質に固有な定数

<アットカラム濃縮大量注入法の評価>

分析時に熱分解し易い農薬への応用を試み、その評価を行った。また、従来の注入法との比較検討を行った。

標準試料は左の 17 成分の農薬に分解比較のための内標として Tetradecane (C14) を加えて Acetone で希釈して作成した。

Table 1. Operating conditions of GC/MS and Optic 2-200

PTV injection devic Optic 2-200	
Gas Chromatograph HP 6890	
Mass spectrometer HP 5973	
Pre-column	Deactivatid silica capillary tube 0.53mm× 0.5m
Column	CP-Sil 8CB 0.25mm I.d. × 20m, 0.25 μm
Carrier gas	He; 15kPa(2min) - 30kPa - 4kpa/min - 150kPa;
Oven Temp	65°C(3.5min) - 15°C/min - 200°C - 3°C/min - 225°C - 10°C/min - 280°C(4.8min)
Injection Temp	58°C(2min) - 60°C/min - 280°C
Injection Mode	Split
Interface Temp	280°C
Method	Scan(50-550m/z)

No.	Pesticides
①	Dichlorvos
②	Dimethoate
③	γ-BHC
④	Diazinon
⑤	Pirimicarb
⑥	Metalaxyl
⑦	Malation
⑧	MEP(Fenitrothion)
⑨	Chlorpyrifos
⑩	Chinomethionate
⑪	Prothiofos
⑫	Endrine
⑬	Iprodione
⑭	Pyridafention
⑮	EPN
⑯	Phosalone
⑰	Fenvalinate

<大量注入法の評価>

ピーク形状: 0.1ppm の混合標準試料を 100 μl 注入したときのクロマトグラムを図 5 に示す。結果から、きれいなピーク形状のクロマトグラムが得られることがわかった。

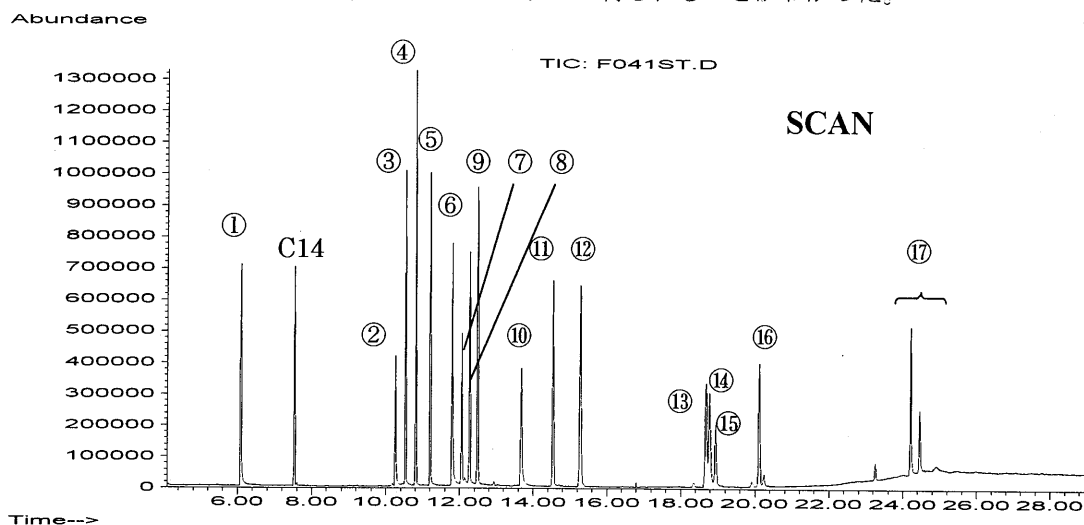


Fig. 5 Gas Chromatograms of standard solution (0.1ppm) with 100 μl injection

注入量と応答: 同じ濃度の標準サンプルの注入量を 10、20、50、100 μl と変えて注入した時の応答(面積、高さ)との関係の一例を図 6 に示す。注入量と面積および高さとの間には良好な直線関係が得られ、今回の大量注入法は感度向上の効果が十分にあることがわかった。従って従来 GC に注入できる量が最大 2 μl であったが、今回 100 μl 注入できたことから感度がおおよそ 50 倍近く向上したと言える。

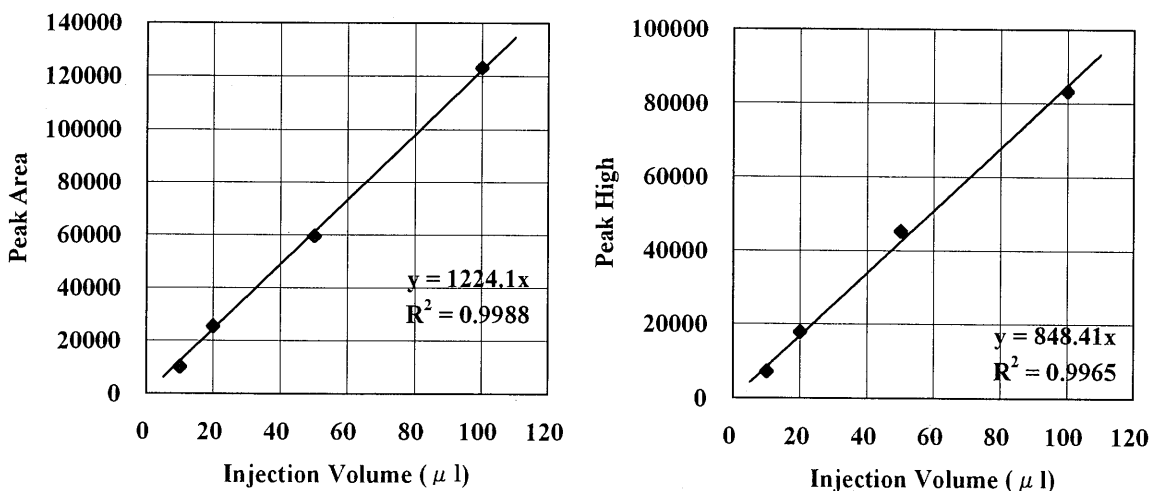
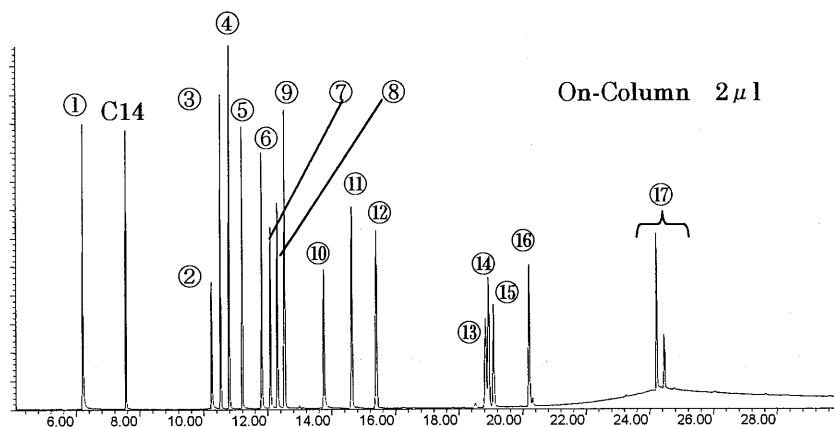


Fig. 6 Relationship between Injection Volume and Responses (Peak Area and High), MEP( 0.5ng/μl )

<各注入法の比較>

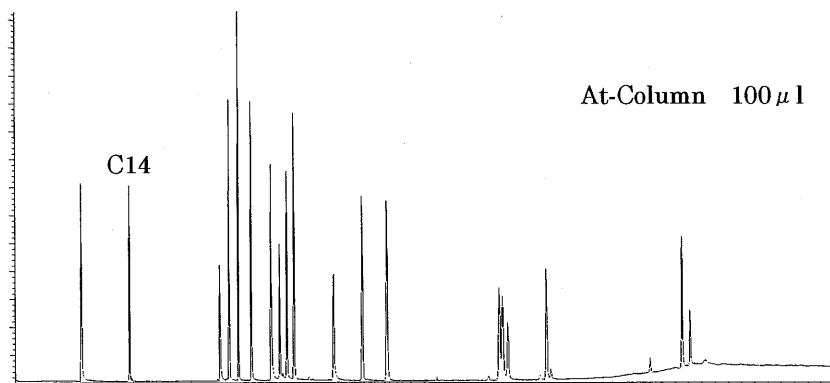
注入口はPTV注入口(Optic2-300)を使用し、オンカラム注入法(2 $\mu$ l)、アットカラム濃縮大量注入法(100 $\mu$ l)、充填剤を用いたPTV大量注入法(100 $\mu$ l)で分析をそれぞれ行い、それらの注入法による農薬の分解性の比較検討を行った。尚、PTV充填剤には保持力の強いTenax TA 60-80mesh 45mgと、充填剤の中では分解がおきにくいと報告<sup>11)</sup>されているDexsil 300 GC Uniport HP 2% 60-80mesh 40mgの二通りを用いた。

各注入法による農薬の分解性の比較クロマトグラムを図7に示した。



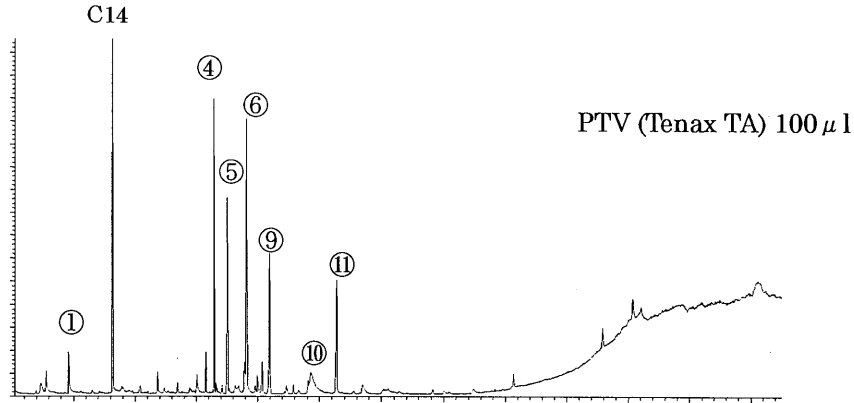
7-1. オンカラム注入法 (2 $\mu$ l)

Carrier gas He: 30kPa(2min) - 4kpa/min - 150kPa  
 Oven Temp 60°C(1min) - 15°C/min - 200°C - 3°C/min -  
 225°C - 10°C/min - 280°C(5.8min)  
 Injection Temp 62°C - 60°C/min - 280°C



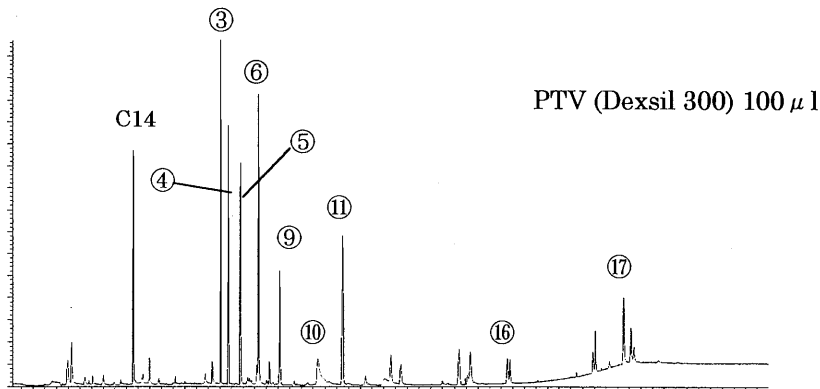
7-2. アットカラム濃縮大量注入法 (100 $\mu$ l)

Carrier gas He: 15kPa(2min) - 30kPa - 4kpa/min - 150kPa  
 Oven Temp 65°C(3.5min) - 15°C/min - 200°C - 3°C/min -  
 225°C - 10°C/min - 280°C(4.8min)  
 Injection Temp 58°C(2min) - 60°C/min - 280°C



7-3. 充填剤(Tenax TA)を用いた大量注入法 (100 μl)

Carrier gas He; 30kPa(1min) - 120kPa (4min) - 30kPa - 3.6kpa/min - 150kPa  
 Oven Temp 50°C(5min) - 15°C/min - 200°C - 3°C/min - 225°C -  
 10°C/min - 280°C(5.2min)  
 Injection Temp 62°C(1min) - 300°C/min - 320°C



7-4. 充填剤(Dexsil 300)を用いた大量注入法 (100 μl)

Carrier gas He; 30kPa(1min) - 120kPa (4min) - 30kPa - 3.6kpa/min  
 Oven Temp 50°C(5min) - 15°C/min - 200°C - 3°C/min -  
 225°C - 10°C/min - 280°C(5.2min)  
 Injection Temp 62°C(1min) - 300°C/min - 320°C

### 図7. 各注入法での農薬のクロマトグラム比較

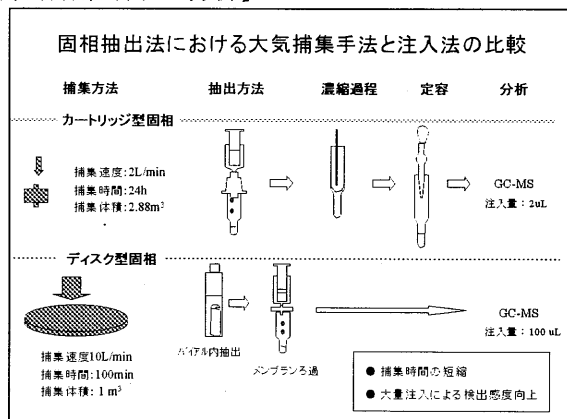
これらの結果から、充填剤を用いた PTV 大量注入法は充填剤の種類により若干変わるものの、今回選択した農薬の大部分が熱分解を起こしていることがわかる。ところが、アットカラム濃縮大量注入法を用いた場合は、ほぼオンカラム注入法と同じような値を示し、今回の農薬においてはほとんど分解が見られなかった。これは、アットカラム濃縮大量注入法が原理的に溶媒排出過程を除いてオンカラム注入法と同じであるからだと考えられる。よって、このアットカラム濃縮大量注入法は分析時に熱分解しやすい物質においても大量注入高感度分析に適しているといえる。

これまで述べてきた固相抽出法と大量注入法を利用した分析の数例を以下に挙げる。

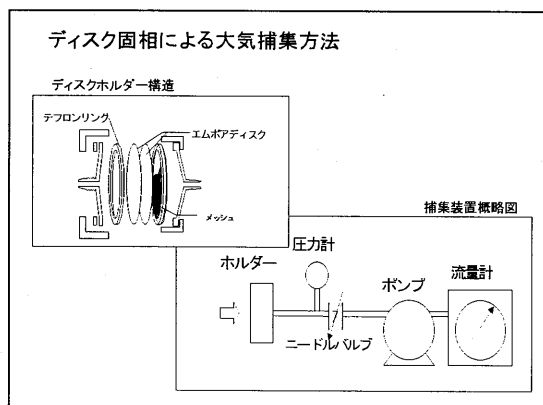
【ディスク型固相を用いた室内空气中的有害有機化合物の分析】

室内における有害有機化合物の迅速および高感度分析法の開発を目的とし、大量高速捕集が可能なディスク型固相と溶媒濃縮過程を必要としない GC-MS への大量注入法を組み合わせた分析法の検討を行った。また、この時の抽出法にはディスク型固相の抽出に最も簡易だと思われるバイアル内抽出法を用いた。<sup>5)</sup>

この分析法は大気中フタル酸エステル類の分析へ応用できる。<sup>12)</sup>



①捕集フィルター：ディスク型固相である Empore™ Disk C18 (3M 製 47mm) を予めアセトンとジクロロメタンで洗浄し、乾燥させたものを用いた。②試料の捕集：ダイアフラムポンプを用いて捕集流量 10L/min で 100min (1 m<sup>3</sup>) 捕集した。③分析方法：捕集が終わったディスクをろ紙ホルダーから取り出し、軽くたたんでスピッツ管に挿入する。そこへアセトン 4ml を入れ栓をし、10 回ぐらい上下に振動した後、5 分以上放置して溶出させる。再度、上下に振動した後、その抽出溶液を注射筒の上から注ぎ入れ前処理フィルターでろ過する。アットカラム式 PTV 注入口を取り付けた GC-MS にその溶出溶液 100 µl を注入して分析を行った。



ディスクに各標準物質 1 µg を添加後、アセトンでのバイアル抽出による添加回収と、ディスクを 2 枚重ねて設置し一枚目に各標準物質 1 µg を添加後、純空気を流量 10L/min で 1m<sup>3</sup> 通気させた時の破過試験、そしてこの測定法を用いて空気 1m<sup>3</sup> を捕集した場合の大気中濃度としての検出限界 (S/N=3) および一般のアパート (築 2 年) で測定した結果を表 2 に示す。

Table 2.

Compounds	a. Recoveries from the membrane disk		b. Evaluation of breakthrough		c. Method Detection limit (ng/m <sup>3</sup> )	d. Measurement results at a certain apartment (ng/m <sup>3</sup> )
	Recovery(%)	C.V.(%, n=5)	1st Disk Recovery(%)	2nd Disk Recovery(%)		
TBP	97.3	2.33	98	N.D.	0.04	12.3
TCEP	96.7	3.94	102	N.D.	0.16	1.1
Diazinon	92.2	2.55	92	N.D.	0.12	N.D.
MEP	95.2	3.27	99	N.D.	0.32	N.D.
MPP	91.7	5.32	94	N.D.	0.06	N.D.
Chlorpyrifos	90.5	3.16	94	N.D.	0.20	4.8
TPP	93.3	3.73	98	N.D.	0.10	0.8
Pyridaphention	99.6	1.98	99	N.D.	0.18	N.D.
TCP	96.6	3.47	101	N.D.	0.16	0.6

【GPC クリーンアップー大量注入 GC/MS 法による作物残留農薬分析】

農作物中の残留農薬基準が設定され、しかもその対象物質は年々追加され最終的には200種以上になると言われており、迅速で高感度な多成分一斉分析法が望まれている。GC/MS-SCAN 法による農薬一斉分析法は、きょう雑物の多い分析でも同定が比較的容易であり、また予期しなかった対象物質を再解析できることから注目されてきている。<sup>13)</sup> そこで、クリーンアップとして移動相にジクロロメタンを使用しない GPC とその分取液の精製にグラファイトカーボンカートリッジを使用し、高感度分析を可能とし農薬が分解しにくいアットカラム濃縮大量注入を用いた GC/MS-SCAN 法を組み合わせた分析法を検討した。<sup>14)</sup>

各操作における農薬の回収率：それぞれの結果を表 1 に示す。1-A. グラファイトカーボンカートリッジ精製によって色素はほぼ完全に除去されたが、キノメチオネートの回収率が悪かった。1-B. GPC における回収率はメタミドフォスとジクロロボスが少し悪いがこれは濃縮する際に揮発したためだと思われる。1-C. は実際にホウレンソウに添加して得られた回収率を示した。

GPC 分取の検討：流出時間を確かめるため、標準試料及び実試料（ホウレンソウ）を GPC に注入し、UV で測定したときのクロマトグラムを

図 3 に示す。この図からわかるように標準試料の色素①β-カロチンと②Fluvalinate（農薬）は分離できているが、実サンプルでは分離できず、分取区画に色素④・⑤が大きく入り込んでいることがわかる。そこでグラファイトカーボンで精製することで色素を完全に除去できたが Chinomethionat の回収率が下がった。ところが、この③Chinomethionat は後ろの方で溶出してくるのでフラクションを2つに分けて、前方はグラファイトカーボンを通して、後方はカートリッジを通さないようにすることでこの問題は解決できる。

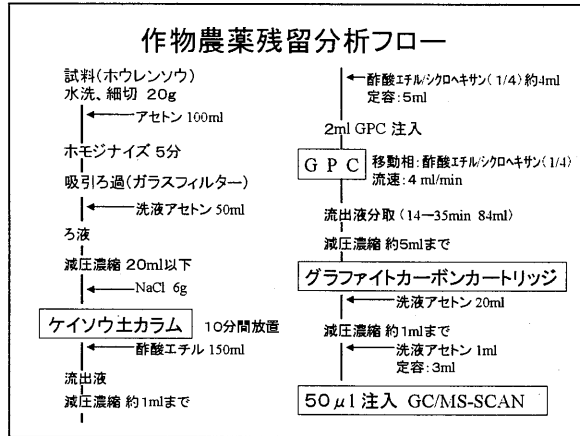


Table.1 Recoveries of pesticides (%)

Nc Compound Name	1-A from Graphite	1-B from GPC	1-C from spinach
① Methamidophos	91.5	71.4	65.9
② Dichlorvos	93.9	70.4	73.3
③ Propoxur	93.7	93.5	93.1
④ Dimethoate	94.9	89.6	119.8
⑤ γ-BHC	92.7	83.4	95.9
⑥ Diazinon	96.1	91.3	88.4
⑦ Metalaxyl	95.9	95.0	86.2
⑧ Malathion	94.0	95.4	94.4
⑨ Chlorpyrifos	91.5	90.0	89.2
⑩ Chinomethionat	N.D.	87.0	N.D.
⑪ Prothiofos	91.1	94.5	90.9
⑫ Iprodione	103.5	103.5	100.8
⑬ Fenvalerate	102.6	111.5	99.0
⑭ Fluvalinate	107.2	114.2	97.1

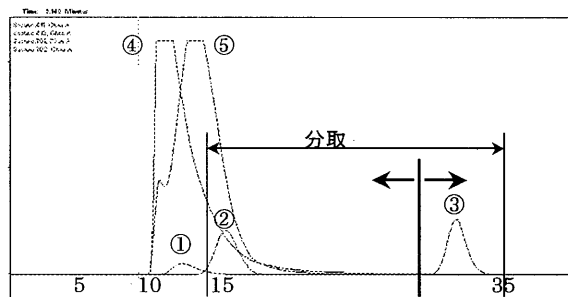


Fig. 3 Elution profile from GPC

- ① β-Carotene (469nm) ② Fluvalinate (254nm) ③ Chinomethionat (254nm)
- ④ Spinach (651nm) ⑤ Spinach (459nm)

【河川中のアルキルフェノール類の分析法について】

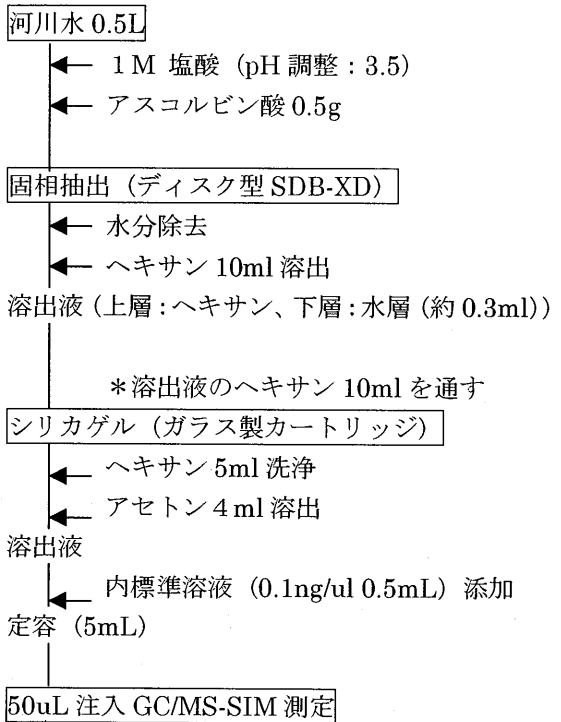
河川中のアルキルフェノール類の簡易で迅速な高感度分析法の開発を目的とし、固相の特性と大量注入を利用して濃縮操作を必要としない分析方法を試みた。

採取してきた河川水 0.5L を酸性にして標準試料を目標検出限界と同じ濃度になるように添加してディスク型固相に通水しヘキサンで溶出後、そのままシリカゲルでクリーンアップして、アセトンで抽出した。そして、それを濃縮せずに 50  $\mu$ L を GC/MS に大量注入して測定しその回収率を求め、評価を行った。

対象物質

- ①4-t-ブチルフェノール、②4-n-ペンチルフェノール、③4-n-ヘキシルフェノール、④4-ヘプチルフェノール、⑤4-t-オクチルフェノール、⑥4-n-オクチルフェノール、⑦ノニルフェノール

目標検出限界	水質
ノニルフェノール	100ng/L (0.1ppb)
それ以外	10ng/L (0.01ppb)



分析フロー図

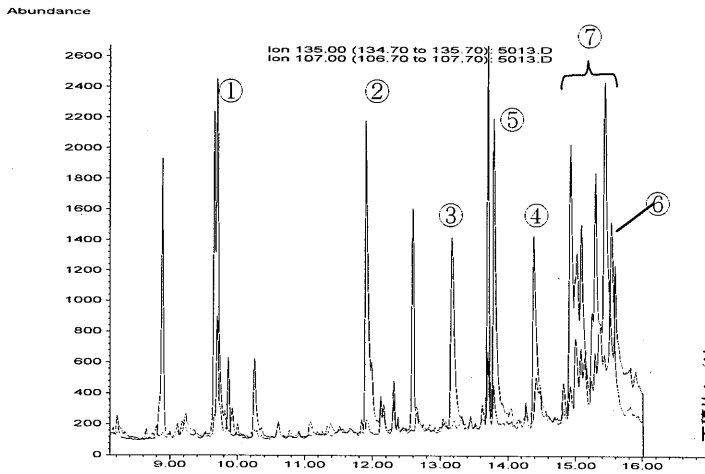
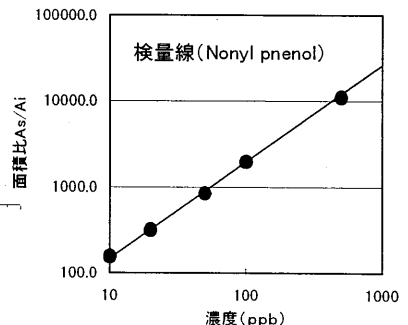
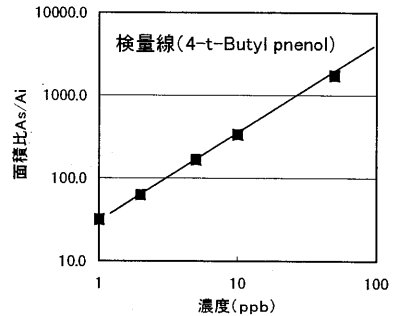


図 河川水に添加して分析した時のイオンクロマトグラム (SIM 法)





## 参考文献

- 1) N.Simpson, K.C.van Horne 編：最新固相抽出ガイドブック(1996) Varian/ジーエルサイエンス
- 2) E.M.Thurman, M.S.Mills: Solid Phase Extraction (1998) John Wiley & Sons
- 3) 栗山清二, 欧陽 通, 王 寧, 古庄義明；工業用水 Vol.481、29(1998)
- 4) 小椋登志明, 奥村為男, 西川嘉範；大阪府公害監視センター報告
- 5) 松村年朗, 佐々野僚一, 古庄義明；第16回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会要旨集301(1998)
- 6) 鈴木 茂, 浦木陽子, 岩淵芳香；大気環境学会要旨集510(1998)
- 7) 浜田美香, 松村年朗, 関田 寛, 安藤正典, 磯崎徳昭；大気環境学会要旨集345(1998)
- 9) 日本環境測定分析協会編：環境分析技術手法
- 10) 佐々野僚一：第21回農薬残留分析研究会講演資料集, 50 (1998)
- 11) Hans G. J. Mol et al. : J. High Resol. Chromatogr., 18, 124-128 (1995)
- 12) 佐々野僚一, 山崎一彦, 栗山清治：第7回環境化学討論会講演要旨集, 38 (1998)
- 13) 山口ほか：分析化学, 46, 905-914 (1997)
- 14) 佐々野僚一, 濱田孝之, 高橋正和：日本食品衛生学会第76回画術講演会講演要旨集, 46 (1998)



## 内分泌攪乱物質分析のGC条件

横河アナリティカルシステムズ(株)

佐久井 徳広

### はじめに

外因性内分泌攪乱化学物質の分析法は、第24及び26回日本環境化学会講演会にて各カテゴリー別に水質、底質及び生物のモニタリング手法が示されている。GC等の機器分析の条件についても詳細に示されており、ここでは、各分析条件に従って行った分析において気付いた点やその応用例を紹介する。

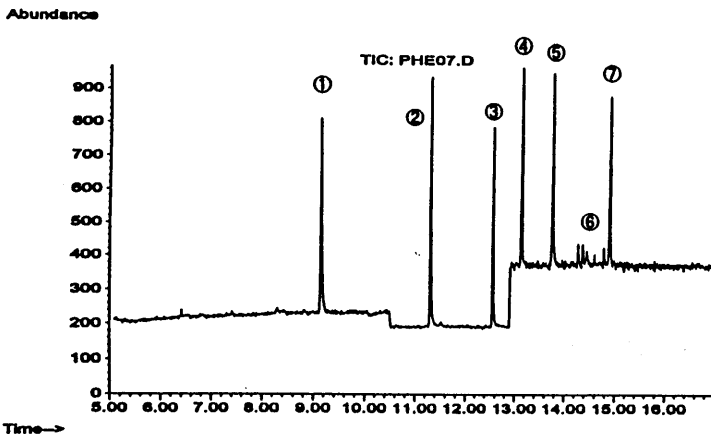
### 実験

実験には Hewlett-Packard 社製 HP6890 ガスクロマトグラフ及び HP5973 質量分析計を用いた。GC条件及びMS条件についてはその都度記載する。

### 各論

#### 1. フェノール類の分析

フェノール類の分析では、直接分析を行うアルキルフェノール類と誘導体化分析を行うクロロフェノール類及び bisphenol Aに分けられる(図1~3、表1~3)。アルキルフェノール類はカラムの劣化により感度低下が見られる。また nonylphenol は異性体が多く存在するため、スタンダード分析では他のアルキルフェノール類に比べ感度が1/10以下となるが、実サンプル分析を行うと、nonylphenol が量的に多く検出されるため、スタンダード分析では見過ごしてしまう4-tert-octylphenol との重なりが見られることがある。さらに他のアルキルフェノール類も、今回の分析で指定されていないフェノール類と重なることがある。



#### 分析条件

GC  
カラム: HP-5MS 30m x 0.25mm x 0.25 μm  
注入口温度 : 250°C  
インターフェース温度 : 280°C  
オープン温度 :  
60°C(1分)-10°C/分-280°C(5分)

#### MS

イオン源温度 : 230°C

#### 化合物名リスト

#### SIMモニターイオン

1. 4-tert-ブチルフェノール	135	107
2. 4-ペンチルフェノール	107	164
3. 4-ヘキシルフェノール	107	178
4. 4-tert-オクチルフェノール	135	107
5. 4-ヘプチルフェノール	107	192
6. ノニルフェノール	135	107
7. 4-オクチルフェノール	107	206

図1. アルキルフェノール類の分析

-10ppb, SIM, 1 μ注入-

表1. アルキルフェノール類の分析条件

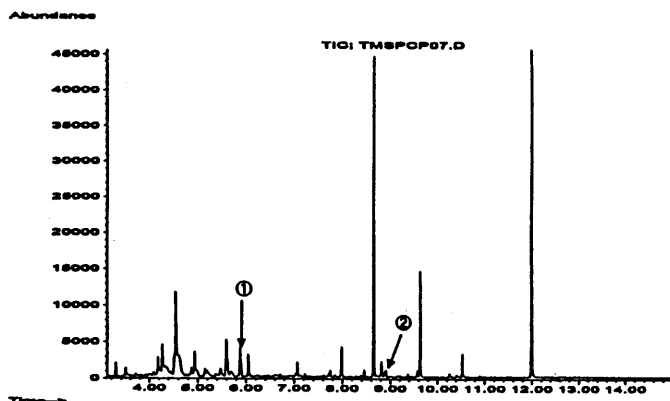


図2. TMS化したトリクロロフェノール類の分析  
-10ppb, SIM, 1 $\mu$ 注入-

誘導体化  
TMS化  
サンプル 1ml  
↓ +BSTFA 200 $\mu$ l 室温放置  
N<sub>2</sub>で0.2mlまで濃縮  
(※乾燥させないのはPCPが分解してしまうため)  
↓  
溶液(ジクロロメタン)で1mlとする

分析条件  
GC  
カラム:HP-5MS 30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m  
注入口温度 :250 $^{\circ}$ C  
インターフェース温度:280 $^{\circ}$ C  
オープン温度 :  
80 $^{\circ}$ C(1分)-20 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(3分)  
MS  
イオン源温度:230 $^{\circ}$ C

化合物名 SIMモニター

① 2,4-DCP TMS	219 234
② PCPTMS	323 338

表2. TMS化したトリクロロフェノール類の分析条件

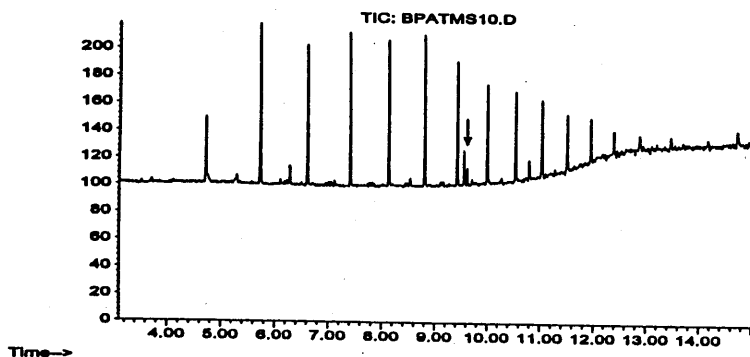


図3. TMS化したビスフェノール A の分析  
-0.1ppb, SIM, 1 $\mu$ 注入-

誘導体化  
TMS化  
サンプル 1ml  
↓ +BSTFA 200 $\mu$ l 室温放置  
N<sub>2</sub>で0.2mlまで濃縮  
(※乾燥させないのはPCPが分解してしまうため)  
↓  
溶液(ジクロロメタン)で1mlとする

分析条件  
GC  
注入口温度 :250 $^{\circ}$ C  
インターフェース温度:280 $^{\circ}$ C  
オープン温度 :  
80 $^{\circ}$ C(1分)-20 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(3分)  
MS  
イオン源温度:230 $^{\circ}$ C

SIMモニター

357 372
---------

表3. TMS化したビスフェノール A の分析条件

クロロフェノール類及び bisphenol Aは、直接分析を行うと、注入口の汚れやカラムの劣化により顕著な感度低下、メモリー効果の存在が挙げられる。これは、カラムをフェノール分析用のものに変更するとかなり軽減されるようである。また bisphenol Aでは、バイアルキャップ及びセプタムの材質により定量イオン m/z : 213 において顕著な妨害が見受けられることがある(図4)。誘導体化分析では、顕著な感度低下やメモリー効果の存在はないが、同様に bisphenol Aにおいて定量イオン m/z : 357 に誘導体化剤由来と思われる妨害が見られることがある(図5)。

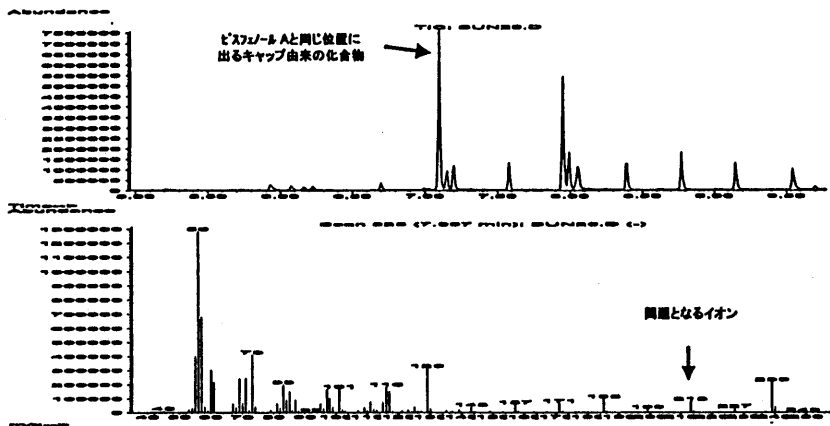


図4. パイアルキャップによる妨害ピーク

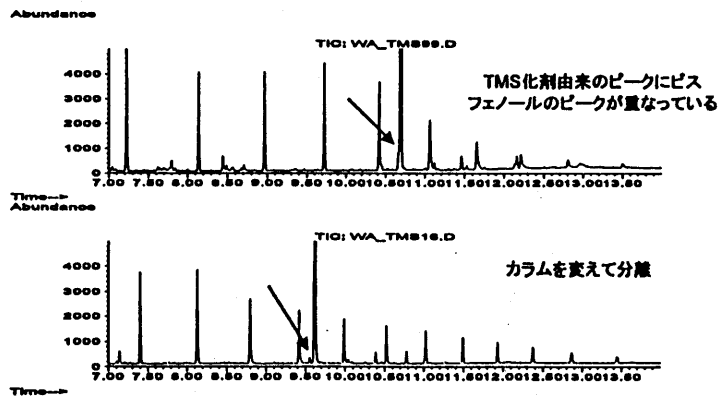
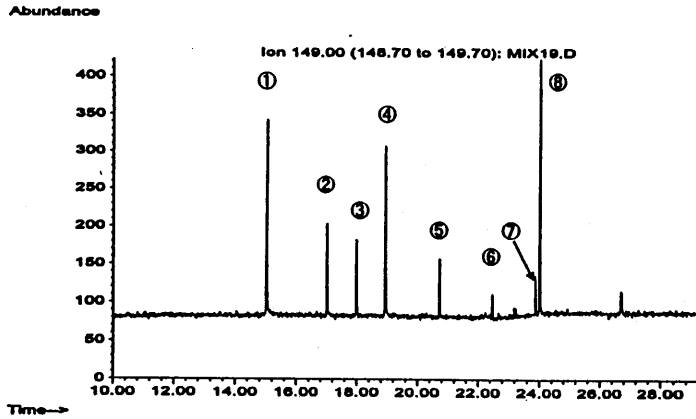


図5. TMS化による妨害ピーク

## 2. フタル酸及びアジピン酸エステル類の分析

フタル酸エステル類の分析 (図6、表4) では、カラムの劣化によりピークのテーリングが見られるものの、GC条件での注意点は少ない。しかし、特に diethyl phthalate (DEP)、dibutyl phthalate (DBP)、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP、DOP) 及び di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) においてコンタミネーションが多く、装置、器具、使用溶媒には格別注意する必要がある (図7)。装置においては、セプタム、ガラスインサートはもとより、パージラインの汚染が挙げられ、パージフロー等の調節によりライン中のコンタミネーションを出来るだけ除去しなければならない (図8)。



分析条件  
 GC  
 カラム: HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25 μm  
 注入口温度: 250°C  
 インターフェース温度: 270°C  
 オープン温度  
 50°C(2分) → 10°C/分 → 280°C

MS  
 イオン源温度: 230°C

化合物名	SIMモニターイオン
1. フタル酸ジエチル(DEP)	149 177
2. フタル酸ジプロピル(DPP)	149 209
3. フタル酸ジイソプロピル(DIBP)	149 223
4. フタル酸ジブチル(DBP)	149 223
5. フタル酸ジペンチル(DAP)	149 237
6. フタル酸ジヘキシル(BBP)	149 206
7. フタル酸ジシクロヘキシル(DCP)	149 167
8. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)	149 167

図6. フタル酸エステル類の分析  
 -1ppb, SIM, 1 μ注入-

\*今回の分析ではフタル酸ジヘキシルの標準が入手できなかったため分析していません。

表4. フタル酸エステル類の分析条件

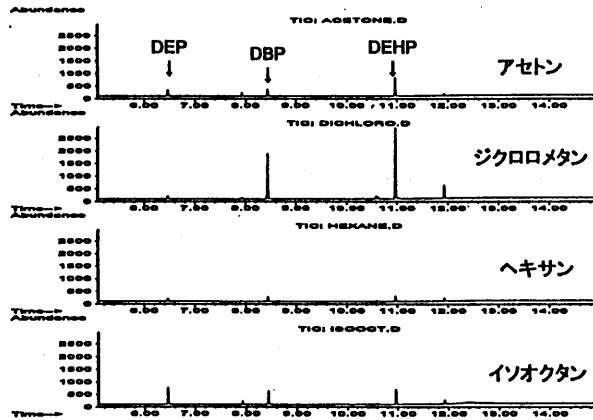


図7. 溶媒の種類によるブランクの違い

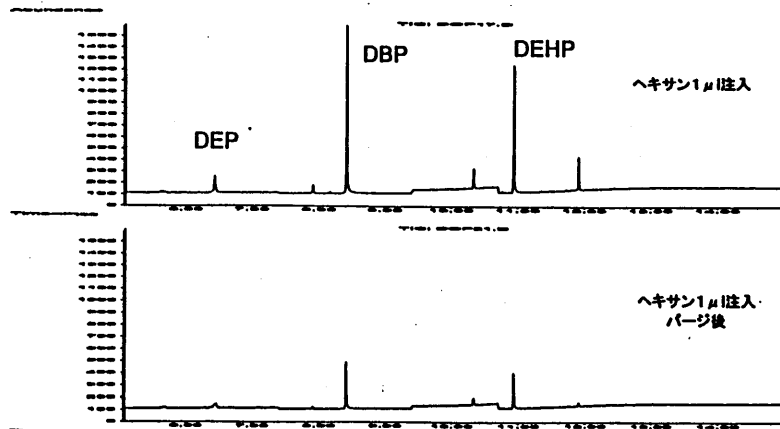


図8. バージによる汚染の軽減

### 3. 芳香族炭化水素化合物類の分析

芳香族炭化水素類 (図9~10、表5~6) では、ヘッドスペース及びパージ&トラップ分析で行う styrene 等と直接分析を行う benzophenone 等に分かれる。直接分析では、styrene trimer 及び benzo(a)pyrene が比較的沸点が高いため、カラムの劣化によりピークのテーリングが見られるものの、感度も良好で、特に注意点は少ない。しかし、styrene、butylbenzene のヘッドスペース分析でのセプタムからのコンタミネーション及び benzophenone の溶媒からのコンタミネーションが見られたり、styrene dimer 及び trimer の定量イオン m/z : 91 及び 207 に妨害が見られるので注意が必要である。

また、styrene dimer 及び trimer においては、ヘッドスペース分析も可能となってきた。

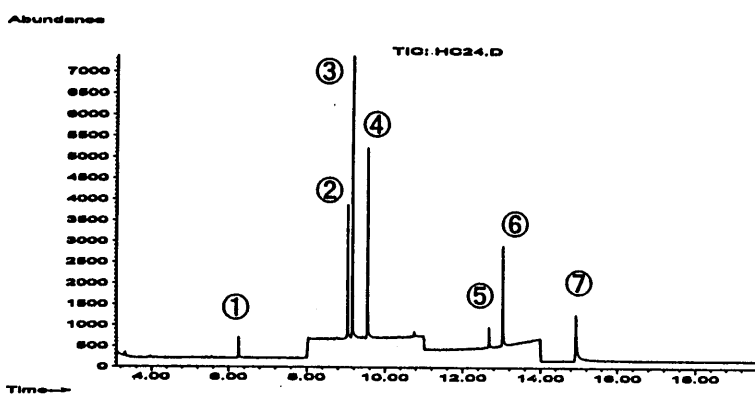


図9. 芳香族炭化水素類の分析  
-1ppb, SIM, 1 $\mu$ 注入-

分析条件  
GC  
カラム: HP-5MS 30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu$ m  
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C  
インターフェース温度: 280 $^{\circ}$ C  
オープン温度 :  
50 $^{\circ}$ C(1分)-20 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(10分)  
MS  
イオン源温度 : 230 $^{\circ}$ C

化合物名	SIMモニターイオン
1. 4-ニトロトルエン	137 91
2. ベンゾフェノン	105 182
5. アジピン酸ジ(2-エチルヘキテル)	129 147
7. ベンゾ(a)ピレン	252 250

(追加)

3. 1,3-ジフェニルプロパン	92 198
4. 2,4-ジフェニル-1-ブタン	91 208
6. 2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン	91 207

表5. 芳香族炭化水素類の分析条件

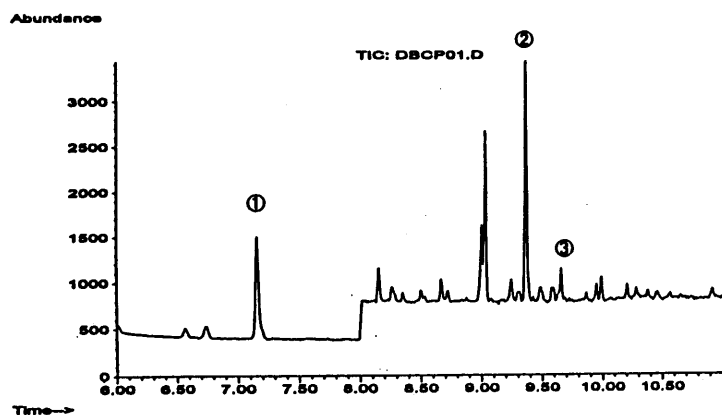


図10. ヘッドスペースによる芳香族炭化水素類の分析  
-10 ppt-

分析条件  
GC  
カラム: HP-5MS 30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu$ m  
注入口温度 : 200 $^{\circ}$ C  
インターフェース温度: 280 $^{\circ}$ C  
オープン温度 :  
40 $^{\circ}$ C(5分)-20 $^{\circ}$ C/分-280 $^{\circ}$ C(3分)  
スプリット比 : 15:1

MS  
イオン源温度 : 200 $^{\circ}$ C

HSS  
ヘッドスペースサンブラ: HP7874  
バイアルビン : 20ml  
サンプル量 : 15ml  
塩化ナトリウム : 4g  
恒温槽温度 : 60 $^{\circ}$ C  
加熱温度 : 30分  
ループ温度 : 130 $^{\circ}$ C  
トランスファー温度 : 200 $^{\circ}$ C  
サンプルループ : 3ml

化合物名	SIMモニターイオン
1. スチレンモノマー	104 78
2. フチルベンゼン	154 91
3. 1,2-ジプロモクロロプロパン	157 155

表6. ヘッドスペースによる芳香族炭化水素類の分析条件

#### 4. その他の化合物

GC分析可能な農薬及び有機塩素系農薬では、ピレスロイド系農薬が沸点等の問題でカラムは薄膜（例えば、0.1 $\mu$ m）のものが良いと思われる。スズ化合物では、選択イオンの関係でトリブチルスズ化合物の感度が低く検出される（図11、表7）。

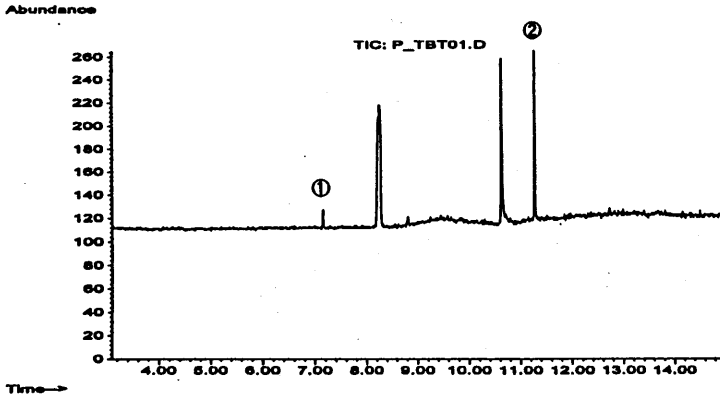


図11. プロピル化した有機スズ化合物の分析  
-1ppb, SIM, 1 $\mu$ 注入-

陸揚体化  
プロピル化  
サンプル 1ml(ヘキサン)  
↓  
n-プロピルMgBr 1ml添加後、室温で30分放置  
水冷しながら0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ml添加  
↓  
MeOH10ml+H<sub>2</sub>O10mlで分液ロートに渡し込む  
↓  
ヘキサン 4mlで2回抽出  
脱水後、ヘキサンで10mlにする

分析条件  
GC  
カラム: HP-5MS 30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m  
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C  
インターフェース温度 : 280 $^{\circ}$ C  
オープン温度 :  
80 $^{\circ}$ C(1分)-20 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(3分)

MS	化合物名	SIM比率(付)
イオン源温度: 230 $^{\circ}$ C	① TBT	291 289
	② TPT	351 349

表7. プロピル化した有機スズ化合物の分析条件

#### 5. 一斉分析

条件が整えば、一斉分析が可能である。ピレスロイド系農薬が存在すれば薄膜カラムでの分析が望ましい。また、styrene, butylbenzeneが存在すれば、溶媒により左右されるが、低い温度（40 $^{\circ}$ C等）からの昇温分析が必要である（図12、表8）。

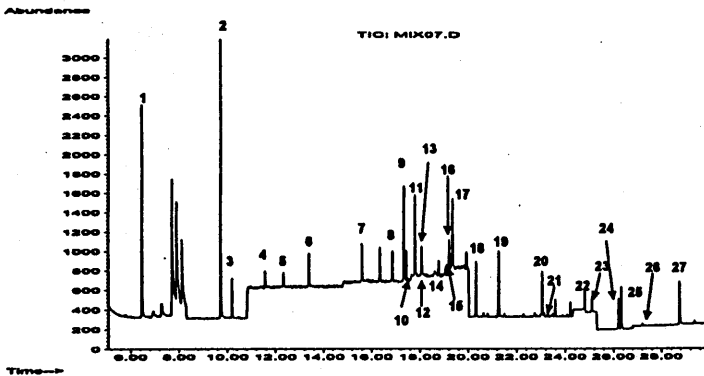


図12. 一斉分析  
-10ppb, SIM, 1 $\mu$ 注入-

分析条件  
GC  
カラム: HP-5MS 30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m  
注入口温度 : 250  
インターフェース温度 : 280  
オープン温度 :  
40 $^{\circ}$ C(3分)-10 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(5分)

MS  
イオン源温度: 230 $^{\circ}$ C

#### 化合物名

- |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| 1: スチレン               | 18. ジイソブチルフタレート       |
| 2: ブチルベンゼン            | 19. ジブチルフタレート         |
| 3: 1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン | 20. ジペンチルフタレート        |
| 4: 2,4-ジクロロフェノール      | 21. ビスフェノール A         |
| 5: 4-ニトロトルエン          | 22. ブチルベンジルフタレート      |
| 6: p-tert-ブチルフェノール    | 23. アジピン酸ジエチルヘキシル     |
| 7: 4-ペンチルフェノール        | 24. ジシクロヘキシルフタレート     |
| 8: 4-ヘキシルフェノール        | 25. ジエチルヘキシルフタレート     |
| 9: ジエチルフタレート          | 26. $\beta$ -エストラジオール |
| 10: 4-tert-オクチルフェノール  | 27. ベンゾ[a]ピレン         |
| 11: ベンゾフェノン           |                       |
| 12: トリブチルスズ           |                       |
| 13: 4-ヘプチルフェノール       |                       |
| 14: ノニルフェノール          |                       |
| 15: ペンタクロロフェノール       |                       |
| 16: 4-オクチルフェノール       |                       |
| 17: ジブチルフタレート         |                       |

表8. 一斉分析条件



## 6. 大量注入

大量注入法の一つである PTV (Programmable Temperature Vaporizer) を利用すれば、注入口の温度コントロールとマルチプルインジェクションでの 1 回当たりの注入量の具合により 100 $\mu$  程度の注入が可能で、インサートにテナックス等の吸着剤を充填すればそれ以上の注入が可能である。ただし、styrene、butylbenzene 等の沸点の比較的低い成分は、回収率が悪くなる。また、吸着剤を用いた場合は、コンタミネーションやメモリー効果に注意が必要である。なお、フタル酸エステル類及び芳香族炭化水素類の多くが 0.1ppb 以下の領域でバックグラウンドとして存在するようである (図 13~14、表 9~10)。

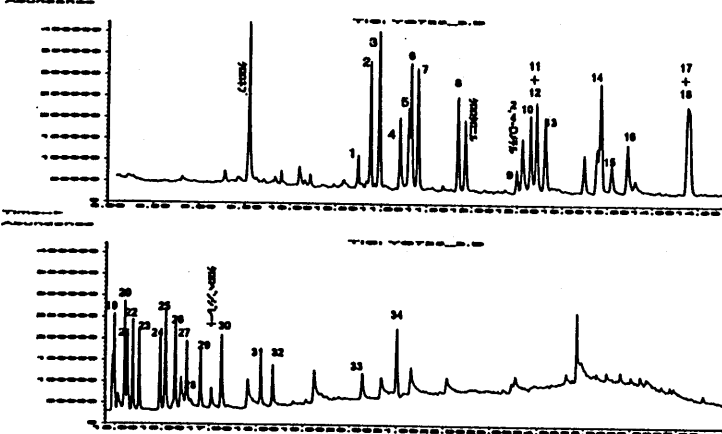


図 13. 農薬類の一斉分析(PTV)  
-10 ppb, SCAN, 5  $\mu$  x 8 回注入-

### 分析条件

GC : HP-5MS 30m x 0.25mm x 0.1  $\mu$ m  
 カラム : PTV  
 注入法 : 11psi(constant flow 1.2ml/分)  
 注入口圧力 : 10 $^{\circ}$ C(1.3分)-310 $^{\circ}$ C/分-320 $^{\circ}$ C(4.7分)  
 注入口温度 : -20 $^{\circ}$ C/分-200 $^{\circ}$ C  
 注入量 : 40  $\mu$ l(6  $\mu$ l x 8)  
 インターフェース温度 : 285 $^{\circ}$ C  
 オープン温度 : 70 $^{\circ}$ C(4.5分)-20 $^{\circ}$ C/分-170 $^{\circ}$ C(0分)  
 -5 $^{\circ}$ C/分-240 $^{\circ}$ C(0分)-15 $^{\circ}$ C/分-285 $^{\circ}$ C(3.5分)

MS :  
 イオン源温度 : 180 $^{\circ}$ C  
 スキャン範囲 : 50-570

表 9. 農薬類の一斉分析条件(PTV)

No	化合物名	T-ten	Q-ten	測定値	No	化合物名	T-ten	Q-ten	測定値		
1	トリフルアリン	309	264	309	335	22	2,4-ジクロルベンゼン	372.6	374.8	375	375
2	$\alpha$ -BHQ	180.9	218.9	181	219	23	1,2-ジクロルエタン	408.7	409.7	409	407
3	HCB	283.7	285.7	284	289	24	フェニルピリン	242.8	279.8	79	283
4	シマジン	201	189	201	189	25	<i>o,p'</i> -DDE	245.9	247.9	246	318
5	アトランジン	200	215	200	215	26	<i>o,p'</i> -DDD	234.9	239.9		
6	$\beta$ -BHQ	180.9	218.9	181	219	27	エンドリン	262.8	264.8	263	281
7	$\gamma$ -BHQ	180.9	218.9	181	219	28	エンドロフェン	262.8	264.8	263	292
8	$\delta$ -BHQ	180.9	218.9	181	219	29	$\beta$ -エンドスルファン	184.9	239.9	239	241
9	メトリアジン	199	144	199	144	30	<i>o,p'</i> -DDD	234.9	239.9	239	237
10	ペンタクロリン	284.9	211.9	199	212	31	エンドスルファンサルファー-1	271.7	275.7	287	229
11	ヘプタクロリン	271.7	100	272	100	32	<i>o,p'</i> -DDT	234.9	239.9	239	237
12	カルバチル	144	115	144	115	33	ジキシルクロル	227	229	227	182
13	アラコロール	180	189	180	189	34	マイレックス	271.7	275.7		
14	アルドリン	262.8	264.8	184	281	35	ペルメチリン-A	183	183	183	183
15	マクソオン	173	127	173	127	36	ペルメチリン-B	183	183	183	183
16	ジコホル	138.9	249.9	138	280	37	ペルメチリン-A	183	183	183	181
17	ヘプタクロリンエポキシド	352.8	354.8	353	355	38	ペルメチリン-B	181	181	181	181
18	オキシクロルベンゼン	389.8	389.8	115	185	39	ペルメチリン-O	183	181	183	181
19	1,2-ジクロルベンゼン	372.8	374.8	375	373	40	ペルメチリン-D	183	181	183	181
20	<i>o,p'</i> -DDE	245.9	247.9			41	フェンバシレート-A	187	125	125	187
21	$\beta$ -エンドスルファン	184.9	239.9	185	241	42	フェンバシレート-B	187	125	125	187

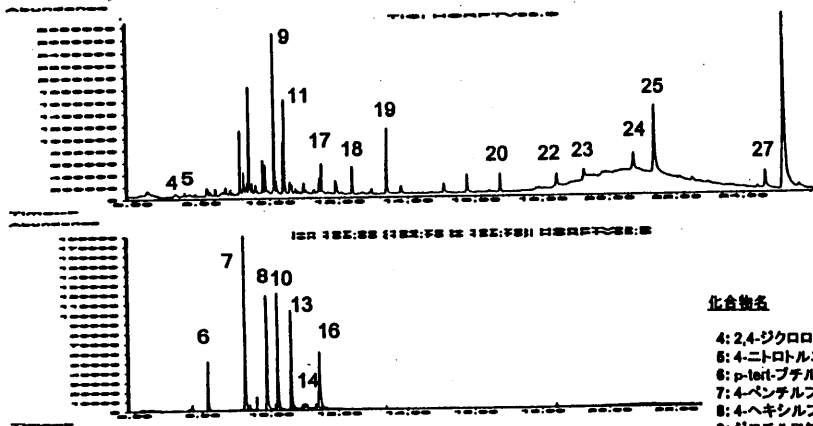


図14. 一斉分析(PTV)  
-10ppb, SCAN, 5μ x 8回注入-

分析条件

GC  
 カラム:HP-5MS 30m x 0.25mm x 0.25μm  
 注入法:PTV  
 注入口温度:20°C(4.5分)-300°C/分-  
 320°C(5分)-20°C/分-  
 250°C  
 インターフェース温度:280  
 オープン温度:70°C(4.5分)-  
 10°C/分-300°C(5分)  
 注入量:40μ (5x8μ)  
 MS  
 イオン源温度:230°C  
 スキャン範囲:45-450

化合物名

- |                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| 4: 2,4-ジクロロフェノール     | 18. ジイソブチルフタレート   |
| 5: 4-ニトロトルエン         | 19. ジブチルフタレート     |
| 6: p-tert-ブチルフェノール   | 20. ジペンチルフタレート    |
| 7: 4-ペンチルフェノール       | 22. ブチルベンジルフタレート  |
| 8: 4-ヘキシルフェノール       | 23. アジピン酸ジエチルヘキシル |
| 9: ジエチルフタレート         | 24. ジシクロヘキシルフタレート |
| 10: 4-tert-オクチルフェノール | 25. ジエチルヘキシルフタレート |
| 11: ベンゾフェノン          | 27. ベンゾ[a]ピレン     |
| 13: 4-ヘプチルフェノール      |                   |
| 14: ノニルフェノール         |                   |
| 16: 4-オクチルフェノール      |                   |
| 17: ジプロピルフタレート       |                   |

まとめ

表10. 一斉分析条件(PTV)

外因性内分泌攪乱化学物質の分析は現在のところ70種弱となっているが、今後は急速に測定成分が拡大していくと思われる。測定機器もGC、GC/MS、LC、LC/MS等、多岐に渡り、前処理技術とあいまって、さらに複雑なものとなると思われる。我々は出来るだけ実際に即した分析を行い、実サンプルを含めた形でその難しさや注意点を見出していきたいと考えている。

## 内分泌かく乱物質分析における負化学イオン化法 GC-MS の応用

－負化学イオン化法を用いた GC/MS による食品中残留農薬の分析－\*

(株)島津製作所 分析機器事業部 宮川 治彦

### 要旨

食品中残留農薬の分析では、規制対象となる農薬の数や食品の種類が増加する傾向にあり、前処理を含めた測定方法の省力化と迅速化が求められている。1997 年に厚生省から食品中残留農薬の迅速分析法が示され、前処理の簡略化のためにゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によるサンプルの精製法が採用された。ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) はガスクロマトグラフ (GC) の検出器として多成分同時分析法が可能であること、マススペクトルによる目的成分の確認が可能であることから、食品中残留農薬測定の簡略化と信頼性向上のための方法として期待されている。特に、負化学イオン化法 (NCI) を用いた GC/MS は選択性の高いイオン化法であるため、夾雑物の多い食品中の残留農薬分析への適用が注目されている。

今回著者らは、GPC により精製した実試料を GC/MS で測定した結果を検討し、特に負化学イオン化法が有効であることを確認した。

### 1. はじめに

農作物の生産に農薬が重要な役割を担っている一方で、農作物への農薬の残留に対する危険性が問題となっている。現在、国内では約 300 種類、世界では約 700 種類の農薬が使用されているといわれている。国内における食品中の残留農薬は食品衛生法により規制されており、1997 年 3 月現在では約 130 種類の農作物で 138 種類の農薬の残留基準が設定されている。また、我が国における食品の輸入依存度は年々増加傾向にあり、国内では使用されていない農薬が含まれている可能性や、残留基準値が国内の規制値とは一致していないものがあるなどの理由から、厚生省では 2000 年までに 200 種類の農薬について基準値を設ける検討がなされている。

このように農薬や食品の多様化が進む一方、現在の残留農薬の告示分析法は個別分析法である。個別分析法で多くの種類の農薬を検査する場合、結果を得るまでに膨大な労力と時間が必要であり、今後の農薬の監視はますます困難となる。近年、厚生省をはじめとする各衛生研究所で、迅速分析法の開発が行われ、1997 年度の食品衛生研究 47 巻 (5-6 月号) にその詳細が紹介された。迅速分析法では試料の精製操作が容易で、自動化も可能なゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) が採用された。また、測定機器としてはガスクロマトグラフが採用された。

一方、分析操作の迅速化にガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による多成分同時分析法が注目を集めており、食品中の残留農薬分析にも使用されてきている。しかし食品中の夾雑成分の影響を受けやすいことや、一部の農薬で感度が不十分な場合もあることから、まだ分析方法の確立には至っていない。最近では選択性と感度に優れた負化学イオン化法 (NCI) の検討が行われ、その有効性が確認されている<sup>1)</sup>。

\* 北川幹也、堀伸二郎、宮川治彦、広岡恵、御石浩三、中川勝博：島津評論 Vol.54 No.4 281-288 (1997) より引用

今回著者らは、迅速分析法に従って GPC 法により実試料を得たのち、GC/MS を用いて食品中残留農薬を分析し、GC/MS の有効性について検討を行った。イオン化の方法としては、一般的に使用されている電子衝撃イオン化法 (EI) と NCI 法を用いて比較検討を行った。

## 2. 実験

### 2.1 試料の前処理方法

以下に迅速分析法に示された食品の前処理方法を示す<sup>2)</sup>。この方法に従い実験用の試料を得た。

#### 2.1.1 抽出

穀類、豆類の試料については、検体を 420 $\mu$ m の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その 10.0g を測りとり、水 20ml を加え、2 時間放置する。野菜、果実等の試料については、検体 1kg を精密に測り必要に応じ適量の水を測って加え、細切均一化した後、検体 20g に相当する量を測り取る。抹茶については、検体 5.0g を測りとり、水 20ml を加え、2 時間放置する。

これにアセトン 100ml を加え、3 分間粉碎した後、けいそう土を 1cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすりあわせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン 50ml で洗い、洗液を吸引ろ過する。ろ紙を減圧濃縮器中に合わせ、40 $^{\circ}$ C 以下で 20ml 以下に濃縮する。

これに塩化ナトリウム 6g を加えた後、けいそう土カラム (ChemElut1020:Varian) に注入し、約 10 分間放置する。酢酸エチル 150ml を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い洗液を上記のケイソウ土カラムに注入する。流出液をすりあわせ減圧濃縮器中にとり、40 $^{\circ}$ C 以下で溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル/シクロヘキサンの混液 (1 : 1) 4~10ml を加えて溶かす。

#### 2.1.2 精製方法

##### ・ GPC による精製

上記の溶液 1/2 量を GPC カラムに注入する。ついで、酢酸エチル/シクロヘキサンの混液 (1 : 1) を注入し、2.5~5ml/min の流速で溶出して、農薬の流出分画をすりあわせ減圧濃縮器中にとり、40 $^{\circ}$ C 以下で溶媒を除去する。この残留物にアセトン/ヘキサン (1 : 1) を加えて溶かし、4ml とする (抽出液 A)。

抽出液 A の 1ml をとり、溶媒を除去した後、残留物をメタノール 1ml に溶解する。その 0.3ml をとり、pH = 3 の塩酸を加えて 3ml とした後、孔径 0.5 $\mu$ m のメンブランフィルターを用いてろ過し、これを N-メチルカーバメイト農薬の試験溶液とする。残りのメタノール溶液をピリミカートの試験溶液とする。

##### ・ シリカゲルカラムによる精製

抽出液 A の 2ml をシリカゲルミニカラム (Sep-PakPlus:Waters) に注入した後、

アセトン/ヘキサン (1:1) 20ml を注入する。流出液をすりあわせ減圧濃縮器中にとり、40℃以下で溶媒を除去する。この残留物にエーテル/ヘキサンの混液 (3:17) を加えて溶かし 4ml とする (抽出液B)。

抽出液Bから下記・に使用する 2ml を分取し、残りの抽出液を除去した後、残留物にアセトンを加えて溶かし、2ml (穀類, 豆類は 1ml) として、これを有機リン系農薬および窒素系農薬の試験溶液とする。

・ フロリジルカラムによる精製

抽出液Bの 2ml をフロリジルミニカラム (Sep-PakPlus:Waters) に注入した後、エーテル/ヘキサンの混液 (3:17) 18ml を注入し、流出液をすりあわせ減圧濃縮器中にとる。ついでフロリジルミニカラムにアセトン/ヘキサンの混液 (3:17) 15ml を注入し、流出液を別のすりあわせ減圧濃縮器中にとり、各流出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。これらの残留物にヘキサンを加えて溶かし、2ml (穀類, 豆類は 1ml) としてこれらを有機塩素系農薬およびピレスロイドの試験溶液とする。

## 2.2 測定方法

迅速分析法では前処理により得られた試料を、各農薬のグループごとに選択性のある検出器を持つガスクロマトグラフ (GC) を用いて残留農薬成分の定性および定量試験を行う。有機塩素系農薬およびピレスロイドは GC-ECD, 有機リン系農薬は GC-FPD, 窒素系農薬は GC-NPD または GC-FTD を用いて定量および定性を行う。GC によって農薬が検出された場合は、GC/MS により測定し、スペクトルやイオン強度比などを使って農薬の確認をすることが推奨されている。

GC/MS は多成分同時分析が可能であり、さらに目的成分を確認するための定性情報を得やすいため、残留農薬分析に多く用いられている。しかし、一般によく用いられている EI 法では夾雑成分のピークと誤認する危険性や、一部の農薬で感度が不十分な場合があり、まだ検討の余地が残されている。EI 法は、GC から溶出する成分のほとんどをイオン化して正イオンを生成するため、多くの農薬をイオン化する方法として使用することができる。しかし、食品中での農薬分析の場合は試料中の炭化水素等の夾雑成分も同時にイオン化されてしまうため、微量な農薬成分を検出するのにそれらが妨害をする場合があり、ピークの認識や、定量結果に誤りをまねくことになる。

夾雑成分の影響と感度不足の問題を解決する方法として、NCI 法が注目されている。NCI 法では、ハロゲン化合物やリン酸化合物などが選択的にイオン化されるため、夾雑成分の影響を受けにくく、食品中の残留農薬分析に有効であることが明らかになっている<sup>1)</sup>。以下に NCI 法の原理について簡単に説明する。

### 2.2.1 NCI 法の原理<sup>3)</sup>

正化学イオン化法 (PCI) では、イオン化室内にメタン、イソブタン、アンモニアなどの反応ガスが導入され、熱電子が照射される。イオン化された反応ガスは、サン

プル分子とイオン-分子反応し、サンプル分子をイオン化する。

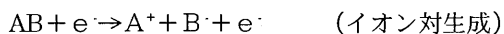
NCI 法では PCI 法と同じく、イオン化室にメタン、イソブタン、アンモニア等の反応ガスを導入し熱電子が照射される。反応ガスの圧力は PCI より低めに設定する。電子は反応ガスに衝突することによりエネルギーを失い、熱平衡化（熱化）される。熱化した電子は、ハロゲン化合物のような電子親和性のある特定の化合物に捕捉され、その化合物を負にイオン化する。このようなイオン化を電子捕獲イオン化という。

反応ガスとして、笑気ガスなどが使用される場合がある。この場合のイオン化の機構は、[NO]<sup>-</sup>イオンと試料分子の、イオン-分子反応である。

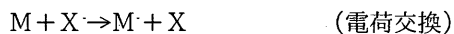
塩素系やリン系農薬に対して選択性と高感度が期待できるものは、電子捕獲による負イオンの生成である。

以下に、電子捕獲およびイオン-分子反応によるイオン化の反応式を示す。

電子捕獲によるイオン化



イオン-分子反応によるイオン化



### 3. 結果

#### 3.1 NCI 法を用いた農薬分析

現在国内において規制が行われている塩素系農薬、有機リン系農薬とピレスロイド系農薬のなかから数種類選択し NCI 法の検討を行った。実験には次の装置とカラム、NCI 反応ガスを使用した。

GC/MS : GCMS-QP5050A (島津製作所)

Auto Injector : AOC-20i (島津製作所)

Column : DB-5(30m,0.32mmI.D.,df=0.25μm,J&W)

NCIGas : メタン

##### 3.1.1 塩素系農薬

γ-BHC および p,p'-DDT の NCI マススペクトルを図 1 および図 2 に示す。それぞれの成分において、m/z35 (Cl<sup>-</sup>) や m/z71 (HCl<sup>2-</sup>) が強くなっており塩素原子を持ったイオンが生成していることがわかる<sup>4)</sup>。分子イオンも認められるが、相対強度は小さい。これら以外の塩素系農薬でも、ほとんどが m/z35 と m/z71 のイオン強度が強く、分子イオンは強度的に小さくなりマススペクトルは単純であった。また、SIM 測定法を用いたときの検出感度は非常に高く、濃度 ppb レベル以下の検出が可能で

あった。m/z35 と m/z71 をモニタイオンとした場合の各塩素系農薬の検出感度と再現性を表 1 に示す。

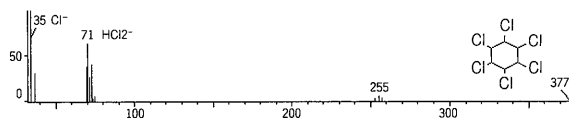


図 1  $\gamma$ -BHC NCI スペクトル  
NCI mass spectrum of  $\gamma$ -BHC

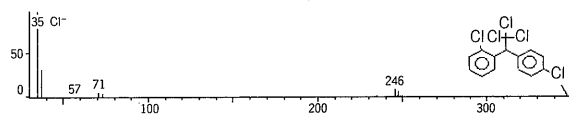


図 2 p, p'-DDT NCI スペクトル  
NCI mass spectrum of p,p'-DDT

表 1 塩素系農薬再現性と感度 (NCI 法)  
Repeatability and sensitivity in determination of organo-chlorine pesticides

農薬名	注入量 (pg)	モニタマス (m/z)	CV (%) n = 7	検出感度 S/N > 3 (pg)
$\alpha$ -BHC	1	71	4.3	0.1
$\beta$ -BHC	1	71	3.6	0.1
$\gamma$ -BHC	1	71	3.4	0.1
$\delta$ -BHC	1	71	2.8	0.1
aldrin	0.2	35	3.0	0.1
dieldrin	0.2	35	2.2	0.1
endrin	0.2	35	9.8	0.1

### 3.1.2 有機リン系農薬

有機リン系農薬の多くは図 3 に示すような共通の構造から, phosphates, phosphorothiolates, phosphorothionates, phosphoro-dithiolates の 4 種に分類される。それぞれの構造によって, 特徴的なイオンが生成される<sup>5)</sup>。実験で得られたマススペクトルを図 4 に示す。また, SIM 測定法を用いた場合の検出感度を表 2 に示す。ほとんどの成分で EI 法を上回る感度を確認した。

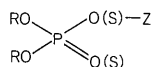


図 3 有機リン系農薬の構造  
Chemical structures of organophosphorus pesticides

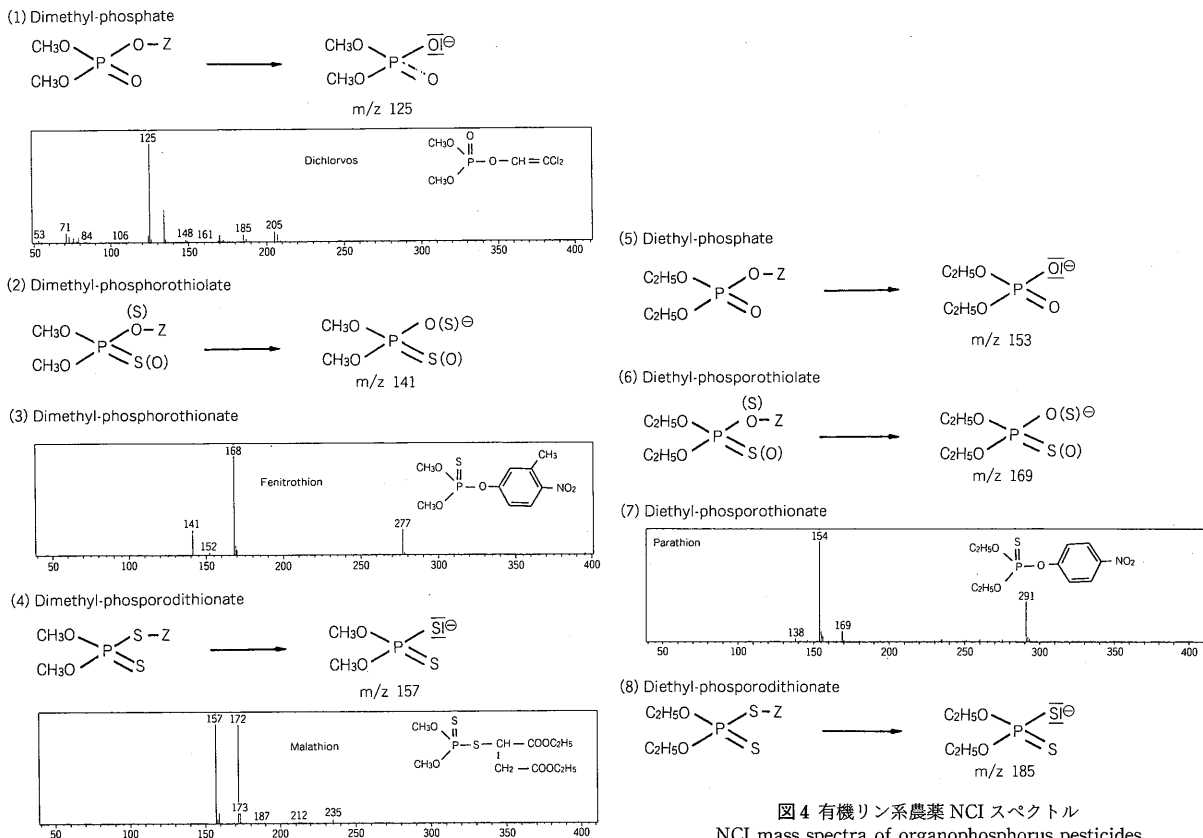


図4 有機リン系農薬 NCI スペクトル  
NCI mass spectra of organophosphorus pesticides

表2 有機リン系農薬の感度 (NCI 法)  
Sensitivity in determination of organophosphorus pesticides

農薬名	モニタマス (m/z)	検出感度 S/N>3 (pg)	農薬名	モニタマス (m/z)	検出感度 S/N>3 (pg)	農薬名	モニタマス (m/z)	検出感度 S/N>3 (pg)
dichlorvos	125	2	chlorpyrifos-methyl	141	0.2	methidathion	157	0.2
ethoprophos	200	0.2	parathion-methyl	154	2	butamifos	196	0.2
salithion	216	2	fenitrothion	168	2	prothiofos	237	0.2
dimethoate	157	0.2	malathion	157	0.2	isoxathion	169	2
cyanophos	134	0.2	chlorpyrifos	212	0.2	ethion	185	0.2
diazinon	169	2	parathion	154	2	edifenphos	109	0.2
etrimphos	141	2	pirimiphos-methyl	169	2	pyridaphenthion	169	0.2
iprobefos	197	2	isophenphos	182	2	EPN	138	0.2
dichlorfenthion	278	0.2	phenthoate	157	0.2	phosalone	185	0.2

### 3.1.3 ピレスロイド系農薬

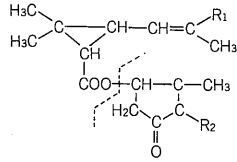
ピレトリンは除虫菊の天然殺虫成分で、その構造は図5の6成分が明らかになっている。

図6(1)~(6)にピレトリンのNCIスペクトルを示す。スペクトルは単純であり、それぞれの成分が判別可能であった。

表3にその他のピレスロイド系農薬の再現性と感度を示す。ピレスロイド系農薬は、EI法では感度が不足する場合があったが、NCI法では数ppbあるいはそれ以下を検出することができ、飛躍的な感度の向上がみられた。

Cypermethrinの検量線を図7に示す。検量線も良好であった。



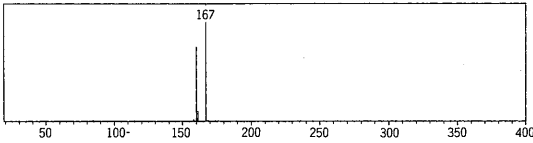


(ピレトリン成分の基本骨格)

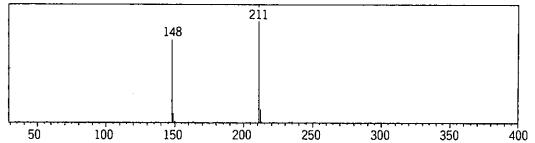
成分	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
ピレトリン I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH=CH <sub>2</sub>
ピレトリン II	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH=CH <sub>2</sub>
シネリン I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>3</sub>
シネリン II	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>3</sub>
ジャスモリン I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
ジャスモリン II	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

図5 ピレトリンの構造  
Chemical structures of pyrethrins

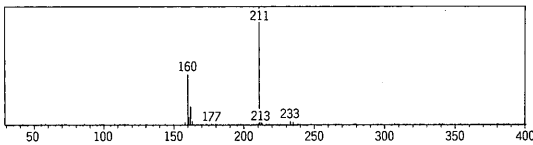
(1) ピレトリン I



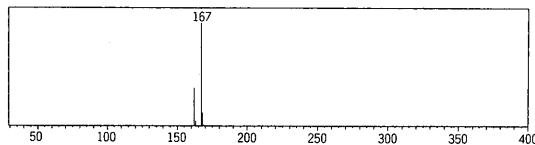
(4) シネリン II



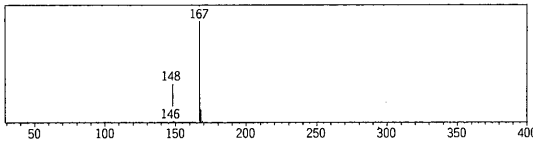
(2) ピレトリン II



(5) ジャスモリン I



(3) シネリン I



(6) ジャスモリン II

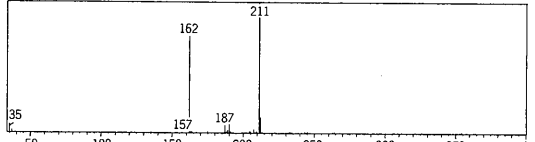


図6 ピレトリンの NCI スペクトル  
NCI mass spectra of pyrethrins

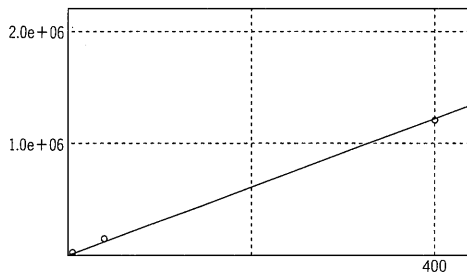


図7 Cypermethrin 0.4~400 pg 検量線  
Calibration curve for cypermethrin

表3 ピレスロイド系農薬の再現性と感度 (NCI 法)  
Repeatability and sensitivity in determination of other pesticides of pyrethroid type

農薬名	注入量 (pg)	モニタマス (m/z)	CV (%) n=7	検出感度 S/N>3(pg)
cyhalothrin	1	205	7.5	0.1
cypermethrin	4	207	4.7	0.4
flucythrinate	4	243	6.1	0.4
fenvalerate	4	211	3.4	0.4
fluvalinate	4	294	5.5	0.4

### 3.2 GC/MS による実試料の分析

米とキャベツを迅速分析法に示された方法で前処理して農薬が含まれていないことを確認したあと、農薬を目的濃度まで添加して実試料分析のサンプルとした。

サンプルは、GC/MS により分析し、農薬の確認および定量を行った。GC/MS のイオン化法には、EI 法と NCI 法を用いて、結果の比較検討を行った。

#### 3.2.1 SIM 測定による定量分析

食品中の残留農薬は、実試料中で数十 ppt レベルから数 ppm で検出されることが多い。このような低濃度の農薬を定量分析するために、通常は SIM 測定を用いて特定イオンのクロマトピークを検出する。SIM 法でモニタされるイオンは、その成分のマススペクトル中で比較的強度が強い高質量のイオンが選択される。イオンを適切に選択することによって、夾雑成分の影響を受けずに高感度に目的ピークを検出することができる。また、目的成分のピーク検出をより正確にするために、定量用のイオンとは別に確認用のイオンが数個測定される。この場合、目的成分を正確に検出するためには、すべての選択イオンにおいて夾雑成分の影響を受けにくいイオンを選択する必要がある。

米の抽出液に塩素系農薬を添加（濃度 1ppb）した実試料を、まず EI 法によるイオン化で SIM 法により測定を行った。 $\delta$ -BHC の検出モニタイオンとして  $m/z$ 183.219.109.111 を選択した場合、 $m/z$ 219.109.111 に夾雑ピークが重なり、ピークの同定が難しくなった（図 8）。モニタイオンとして  $m/z$ 183,181.217 を選択した場合は、夾雑成分のピークが小さく目的成分を正確に同定することができた（図 9）。次に同じ実試料を NCI 法によるイオン化を用いて、SIM 法により測定を行った。モニターイオンとしては、強度の強いイオン、 $m/z$ 35 と 71 を選択した。NCI 法では夾雑ピークがほとんど見られないことや、感度がよいため容易にピークの検出、同定ができた（図 10）。

また、米の抽出液にピレスロイド系の農薬を添加した実試料の分析において、クロマト面積値の繰り返し再現性を調べたところ、標準試料での再現性（表 3）と比較すると多少の再現性の悪化は見られたものの、実用上問題がないことを確認した（表 4）。

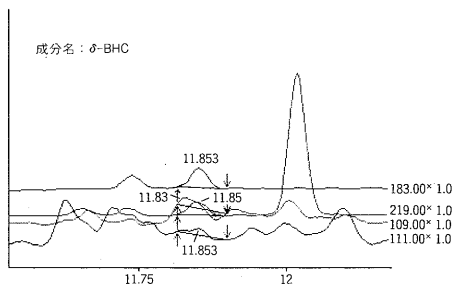


図 8 EI 法 SIM 測定結果 I  
Data by SIM analysis using EI ionization method (I)

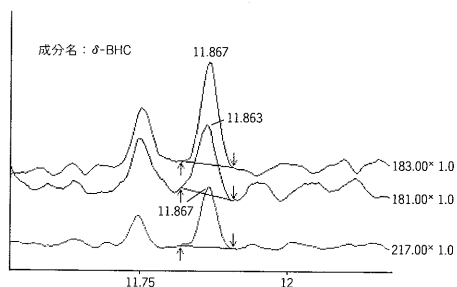


図 9 EI 法 SIM 測定結果 II  
Data by SIM analysis using EI ionization method (II)

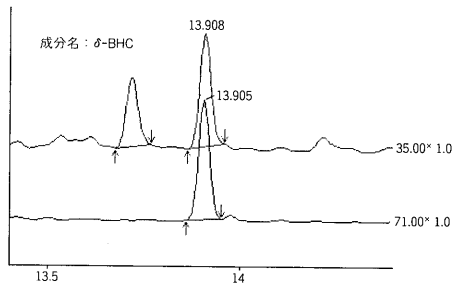


図 10 NCI 法 SIM 測定結果  
Data by SIM analysis using NCI method

表 4 ピレスロイド系農薬の実試料分析での再現性  
Repeatability in determination of pesticides of pyrethroid type

農薬名	注入量 (pg)	モニタマス (m/z)	CV (%) n = 7
cyhalothrin	1	205	7.7
cypermethrin	4	207	12.5
flucythrinate	4	243	7.6
fenvalerate	4	211	6.1
fluvalinate	4	294	10.1

### 3.2.2 スキャン測定による目的成分の確認

目的成分の確認のために、スキャン測定によるマススペクトルの測定が行われる場合が多い。EI 法によるイオン化法では、多くの農薬はフラグメンテーションが起りやすいため、およそ 50~400amu の質量範囲で測定される。しかし、農作物からの実試料中には炭化水素等の夾雑成分が多く、100amu 以下の質量数にそれら由来のイオンが大量に生成する。そのためスキャン測定での実試料の測定では、微量な農薬成分のマススペクトルを正常に検出できない場合がある。

キャベツから抽出した実試料に塩素系農薬を濃度 10ppb になるように添加したサンプルを、EI 法でイオン化しスキャン法で測定を行った (図 11)。クリーンアップによる効果は認められるが、マススペクトル上で低マス側の妨害イオンが多く存在した。さらに一般的にスキャン法での検出感度は SIM 法より悪くなるため、微量な農薬の検出が難しくなる。

同じ試料を NCI 法でイオン化し、スキャン法で測定を行った (図 12)。NCI 法では炭化水素系等の夾雑成分はほとんどイオン化されないため、EI 法で見られた夾雑成分による大きな妨害ピークはみられない。また 10ppb という低濃度においても、それぞれの農薬が高感度に検出された。さらに妨害成分のマススペクトルが重ならないため、実試料中の農薬成分のマススペクトルは標準試料で得られたマススペクトルとほとんど同じであった。

塩素系農薬の場合は、ほとんどの成分で m/z35 や m/z71 のイオンが大きく、分子イオンなどの他のイオン強度が小さいため、成分間で特徴的なスペクトルの差はあまりない。そのためマススペクトルによる成分の確認の他に、リテンションタイムによって目的成分の確認をすることが必要であった。

図 13 はキャベツの抽出液にピレスロイド系農薬を添加した試料を NCI 法を用いて、スキャン法で測定した結果である。ピレスロイド系農薬では、それぞれ成分により特徴的なスペクトルを示すため、マススペクトルによる目的成分の確認が容易であった。

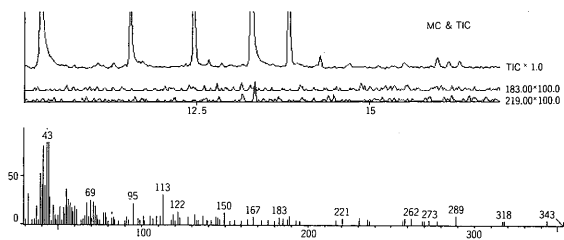


図 11 キャベツ抽出液塩素系農薬添加試料の EI 法スキャン測定結果

EI mass spectrum of actual sample extracted from cabbage, spiked with organochlorine pesticides

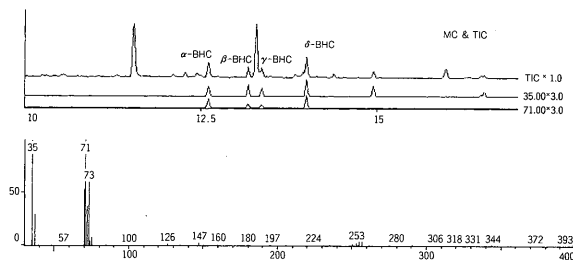


図 12 キャベツ抽出液塩素系農薬添加試料の NCI 法スキャン測定結果

NCI mass spectrum of actual sample extracted from cabbage, spiked with organochlorine pesticides

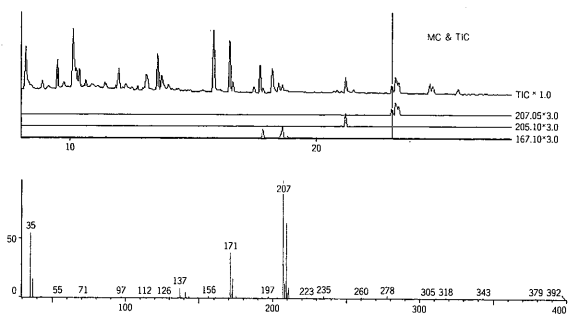


図 13 キャベツ抽出液ピレスロイド系農薬添加試料の NCI 法スキャン測定結果

NCI mass spectrum of extract from cabbage spiked with pyrethroid pesticides

#### 4. むすび

迅速分析法で示されている GPC 法によるサンプル精製は精製効率がよく、しかも自動化が期待できるため、多くの食品試料を処理するのに有効な手段である。さらに、測定の迅速化とデータ信頼性の向上のために GC/MS を用いた測定が期待されている。特に、今回はイオン化法として NCI 法を用いて食品中残留農薬分析に対する適用性について評価を行った。その結果、次のような結論を得た。

- ・ NCI 法では、塩素系、有機リン系、ピレスロイド系のほとんどの農薬において、EI 法と比較して感度が優れていることを確認した。
- ・ NCI 法では、多くの塩素系農薬で質量数 35, 71 のイオンが強いので  $m/z$ 35, 71 をモニタすることによって塩素系農薬のスクリーニングができることが明らかとなった。有機リン系、ピレスロイド系農薬では構造情報を反映した特有のスペクトルが得られた。
- ・ 負化学イオン化法では、農薬成分が選択的にイオン化されるため、食品中のマトリクスの影響を受けにくく、しかも高感度な残留農薬測定が可能であった。

#### 参考文献

- 1) H.Obana, S.Hori, M.Okimashi and T.Nishimune : Jpn.J.FoodChem..1(1994)
- 2) 食品衛生研究, 47 巻, (5-6 月号), (1997)
- 3) 有機質量分析法, 丸善 (1995)
- 4) E.A. Stemmler and Ronald A. Hites:Anal. Chem.. 60, 787(1988)
- 5) H.-J. Stan and G. Kellner:Biomed. Mass Spectrom.. 9, 483(1982)

## 内分泌攪乱物質分析の磁場型及び四重極型 MS におけるデータ比較

(日本電子株式会社 応用研究センター) 上田 祥久

### 【はじめに】

1996 年に「奪われし未来 ( Our Stolen Future )」<sup>1)</sup> が出版されて以来、科学者のみならず一般の人々の外因性内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン物質) に関する関心が非常に高まり、連日のようにテレビや新聞報道などによりさまざまな情報が伝えられている。

我が国でも 1998 年 5 月には環境庁から「外因性内分泌攪乱化学物質への環境庁の対応

表 1-1 内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質 ( -SPEED 98 - より )

化合物名		Cat-1	Cat-2	化合物名		Cat-1	Cat-2
1	ダイオキシン類			36	トリフルラリン	5	a
2	ポリ塩化ビフェニール類 (PCBs)	1	a	37	アルキルフェノール	2	a
3	ポリ臭化ビフェニール類 (PBBs)	1	b	38	ビスフェノールA	2	b
4	ヘキサクロロベンゼン (HCB)	1	c	39	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	3	a
5	ペンタクロロフェノール (PCP)	2	b	40	フタル酸ブチルベンジル	3	a
7	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	5	b	42	フタル酸ジシクロヘキシル	3	a
8	アミトロール	5	d	43	フタル酸ジエチル	3	a
9	アトラジン	5	a	44	ベンゾ (a) ピレン	4	a
10	アラクロール	5	a	45	2,4-ジクロロフェノール	2	b
11	シマジン	5	a	46	アジベン酸ジ-2-エチルヘキシル	3	b
12	ヘキサクロロシクロヘキサン	1	c	47	ベンゾフェノン	4	a
13	エチルパラチオン	5	a	48	4-ニトロトルエン	4	a
14	カルバaryl	5	a	49	オクタクロロスチレン	1	c
15	クロルデン	1	c	50	アルディカーブ	10	
16	オキシクロルデン	1	c	51	ベノミル	5	c
17	trans-ノナクロル	1	c	52	キーボン(クロルデコン)	10	
18	1,2-ジブromo-3-クロロプロpan	4	b	53	マンゼブ(マンコゼブ)	9	
19	DDT	1	c	54	マンネブ	9	
20	DDE & DDD	1	c	55	メチラム	9	
21	ケルセン	1	c	56	トリブジン	5	a
22	アルドリin	1	c	57	シベルメトリin	5	a
23	エンドリin	1	c	58	エスフェンバレレート	5	a
24	ディルドリin	1	c	59	フェンバレレート	5	a
25	エンドスルファン(ベンゾエピン)	1	c	60	ベルメトリin	5	a
26	ヘブタクロル	1	c	61	ピンクロソリin	5	a
27	ヘブタクロルエポキシaid	1	c	62	ジネブ	9	
28	マラチオン	5	a	63	ジラム	9	
29	メソミル	5	e	64	フタル酸ジベンチル	3	a
30	メトキシクロル	1	c	65	フタル酸ジヘキシル	3	a
31	マイレックス	10		66	フタル酸ジプロピル	3	a
32	ニトロフェン	5	a	67	スチレン 2量体 3量体	4	a
33	トキサフェン	10		68	n-ブチルベンゼン	4	b
34	トリブチルスズ	6		69	スチレン	4	b
35	トリフェニルスズ	6		70	β-エストロジオール	7	

方針について「環境ホルモン戦略計画 SPEED '98-2」が発表され、その中で、「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」として68種類の化学物質がリストアップされた。これら化学物質の分析方法に関しては、ダイオキシンなどの一部の化学物質を除いては未だに統一された手法が確立されていないのが現状である。1998年7月、「第24回日本環境化学会講演会<sup>3)</sup>」及び1998年10月、「第26回日本環境化学会講演会<sup>4)</sup>」において、前述のSPEED'98において提示された「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」に対する一応の分析法が示された(今後、「第24回日本環境化学会講演会」及び「第26回日本環境化学会講演会」により提示された分析方法を「暫定分析法」と呼ぶ)。

SPEED'98により提示された化学物質はそのほとんどが有機化学物質であるため、暫定分析法では最終的な測定手段としてGC/MSを主要分析法と位置づけた手順が紹介されている。暫定分析法では、ダイオキシン類を除く68種類の化学物質群を7つのカテゴリーに分類し、各々について分析方法を提示している。表1-1にはSPEED'98において提示された68種類の化学物質とそのカテゴリー分類を示した。表中の「Cat-1」は、それぞれは暫定分析法により分類されているカテゴリー分けであり、「Cat-2」は「Cat-1」の同一のものでも異なった分析方法を用いる必要があるものを順にa,b,c...としたものである。また、各カテゴリーに相当する分析方法の概略を表1-2に示した。前述の通り一部の農薬類を除いてはほとんどがGC/MSを用いることとなっているが、場合によっては煩雑な誘導体化などの処理が必要となるものもある。この暫定分析法を基本とし、現在我々はGC/MSとLC/MSを最終的な測定手段としてより簡便な分析方法を検討中である。また、MSとしてはここ5年間で広く普及した「四重極型質量分析計」と高感度高分解能を有する「二重収束型質量分析計」の双方を用いて環境ホルモン類の分析を行い、分解能の差による測定結果の違いを検討している。

今回、上述のカテゴリーで3のフタル酸類、及び2のアルキルフェノール類・クロロフェノール類・ビスフェノールA、1の有機塩素系農薬類について、その測定に関して、低分解能条件(分解能500もしくは四重極型MS測定)と中分解能条件(分解能3000程度)双方の条件での測定を行い、それぞれの測定結果からのいくつかの考察を報告する。

表 1-2 カテゴリー別分析方法一覧

Cat-1	Cat-2	分析方法
1	a	濃縮-精製-GC/MS
1	b	濃縮-精製-GC/MS
1	c	濃縮-精製-GC/MS
2	a	濃縮-GC/MS
2	b	濃縮-(TMS化)-GC/MS
3	a	溶媒抽出濃縮-GC/MS
3	b	溶媒抽出濃縮-GC/MS
4	a	濃縮-精製-GC/MS
4	b	HS(P&T)-GC/MS
5	a	濃縮-GC/MS
5	b	濃縮-分解-メチル化-GC/MS
5	c	濃縮-洗浄-メチル化-GC/MS
5	d	誘導体化-濃縮-HPLC(蛍光)
5	e	濃縮-分解-誘導体化-HPLC(蛍光)
6		溶媒抽出濃縮-誘導体化-GC/MS
7		濃縮-精製-誘導体化-GC/MS
9		分析方法の記載なし
10		日本国内で使用実績はない

## 【1. フタル酸エステル類の分析】

### ・概要

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として使用されており、我々の身の周りのいたるところに存在する。それ故分析に際しては周囲からの汚染に細心の注意を払う必要がある。

SPEED '98 では、このカテゴリーに属する化学物質として表 2-1 に示した 9 種類のフタル酸エステルがあげられている。この中で「フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル」についてはそれぞれ複数の異性体の混合物である。今回標準品の入手の都合上、フタル酸エステル類として表 2-2 に示した 8 種類の化合物について測定を試みた。

表 2-1 フタル酸エステル類 分析対象物

分析対象化合物
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
フタル酸ブチルベンジル
フタル酸ジ-n-ブチル
フタル酸ジシクロヘキシル
フタル酸ジエチル
フタル酸ジペンチル
フタル酸ジヘキシル
フタル酸ジプロピル

表 2-2 フタル酸エステル類の目的成分とモニターイオン

目的成分	モニターイオン m/z		
Di-(2-ethyl hexyl) phthalate	149.0238	167.0344	279.1596
Di-n-butyl phthalate	149.0238	204.0786	222.0898
Di-n-ethyl phthalate	149.0238	177.0551	222.0892
Benzyl n-butyl phthalate	149.0238	91.0548	206.0579
Dicyclohexyl phthalate	149.0238	167.0344	249.1127
Dihexyl phthalate	149.0238	233.1178	251.1283
Di-n-pentyl phthalate	149.0238	219.1021	237.1127
Di-n-propyl phthalate	149.0238	191.0708	209.0814

### ・測定

暫定分析法で示されたフタル酸エステル類の分析方法の手順を図 2-1 に示した。基本的には n-ヘキサンによる液々抽出法が採用されている。ただし、通常に分液ロートを使った振とう法ではなく、マグネチックスターラーによって攪拌することとなっている。表 2-2,2-3 には測定時の GC の条件と SIM 測定を行う場合のモニターイオンの m/z を示した。測定には GCmate を使い、低分解能測定（分解能 500）と高分解能測定（分解能 3000）の双方の条件で測定を行いその結果を比較した。

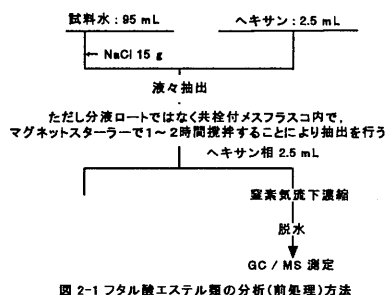


表 2-3 フタル酸エステル類 GC 条件

使用カラム	スベルコ SPB-5 30m×0.25mm 膜厚 0.25 μm
	50°C (2min) → 5°C/min → 150°C (0 min) → 20°C/min → 280°C (6.5 min)
注入口温度	250°C
注入口圧力	Pulsed Splitless Mode ( Pulse Time 1.1min 30psi ) Purge On Time : 1.0 min
ガス流量	1 mL / min 定流量 Mode

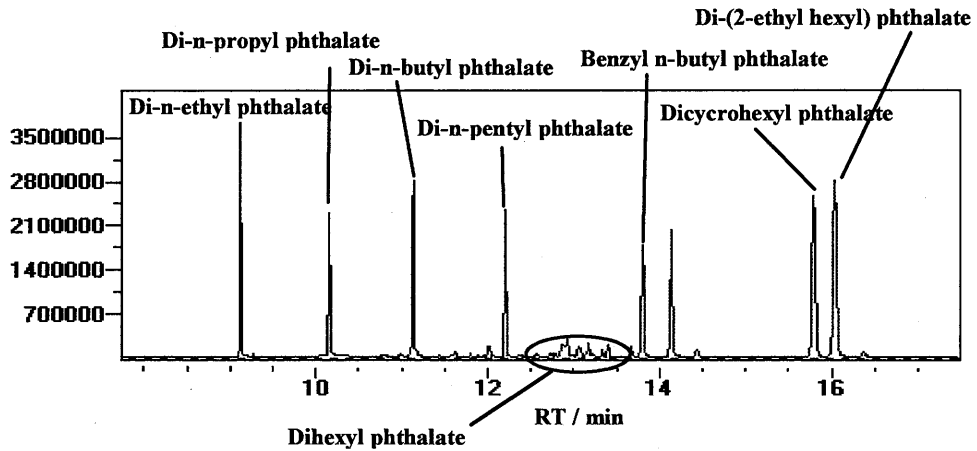


図 2-2 フタル酸エステル類のクロマトグラム

#### ・分析結果

図 2-2 にフタル酸エステル類の典型的なクロマトグラムを示した。アルキル鎖の短いフタル酸ジエチルが最初に検出されその後アルキル鎖の炭素数の増加に伴って溶出時間が長くなっている。なお、複数の異性体の混合物である「フタル酸ジヘキシル」は、図中の○で囲んだ部分に複数のピークとして検出されている。

図 2-3a, b にヘキサン溶液として 10 ppb の標準溶液を分解能 3000、及び 500 で測定した結果を示した。分解能 3000 及び 500 の双方において 10ppb の濃度で各フタル酸エステル類が検出可能であった。そこで実試料の測定を行う目的で、某市下水処理場放流水を実試料とし暫定分析法に従って 100 倍濃縮したサンプルについて測定を行った。その結果を図 2-4a, b に示した。今回測定を行った試料については数種類のフタル酸エステル類が濃縮溶液として 数 ppb～数百 ppb レベルで検出された。よって濃縮を行う前の試料水としては数十 ppt～数 ppb ということになる。分解能 3000 及び 500 での測定結果では、妨害ピーク S/N などあまり差が見られず、感度という面から考えれば分解能 500 での測定の方が有利である。このようにフタル酸エステル類の分析に関しては、今回測定対象とした下水処理場放流水では、分解能を高くすることによるメリットは明確には現れなかった。

一般的にフタル酸エステル類の分析に際して最大の問題と考えられているのが、前処理操作での“汚染”である。図 2-5 には今回測定を行ったフタル酸エステル類のうちフタル酸ジ-n-エチル(DnEP)、フタル酸ジ-n-プロピル(DnPropP)、フタル酸ジ-n-ブチル(DnBP)、フタル酸ジ-n-ペンチル(DnPenP)の検量線(1 ~ 300ppb)を示した。DnPropP 及び DnPenP に関してはほぼ原点を通る直線の検量線が選られているが DnEP、DnBP については切片を持つ形の検量線が得られた。これは検量線溶液調製時の溶媒・ガラス器具・実験室雰囲気からの汚染が原因であると考えられる。使用する器具は基本的に高温で加熱するかフタル



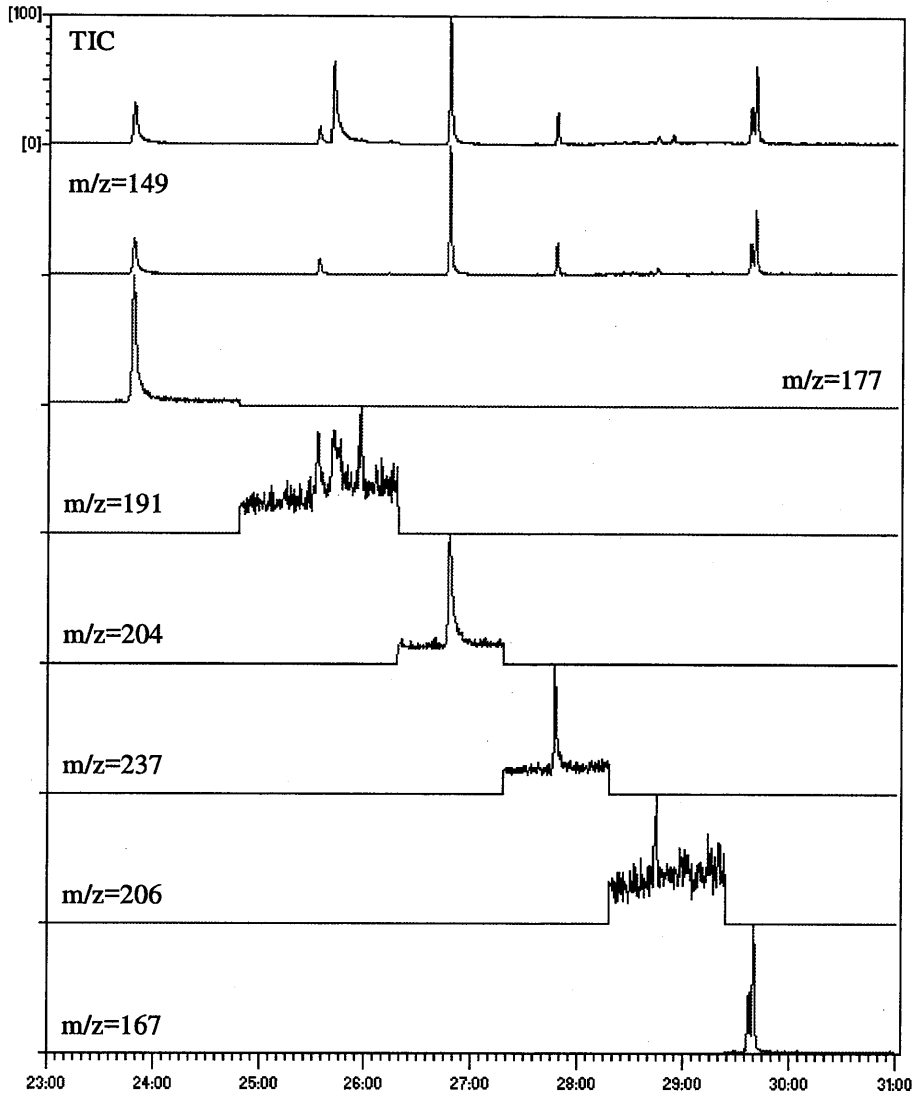


圖 2-3a 標準溶液 10 ppb ( 2  $\mu$  L ) 測定結果  
( GCmate : 分解能 3000 )

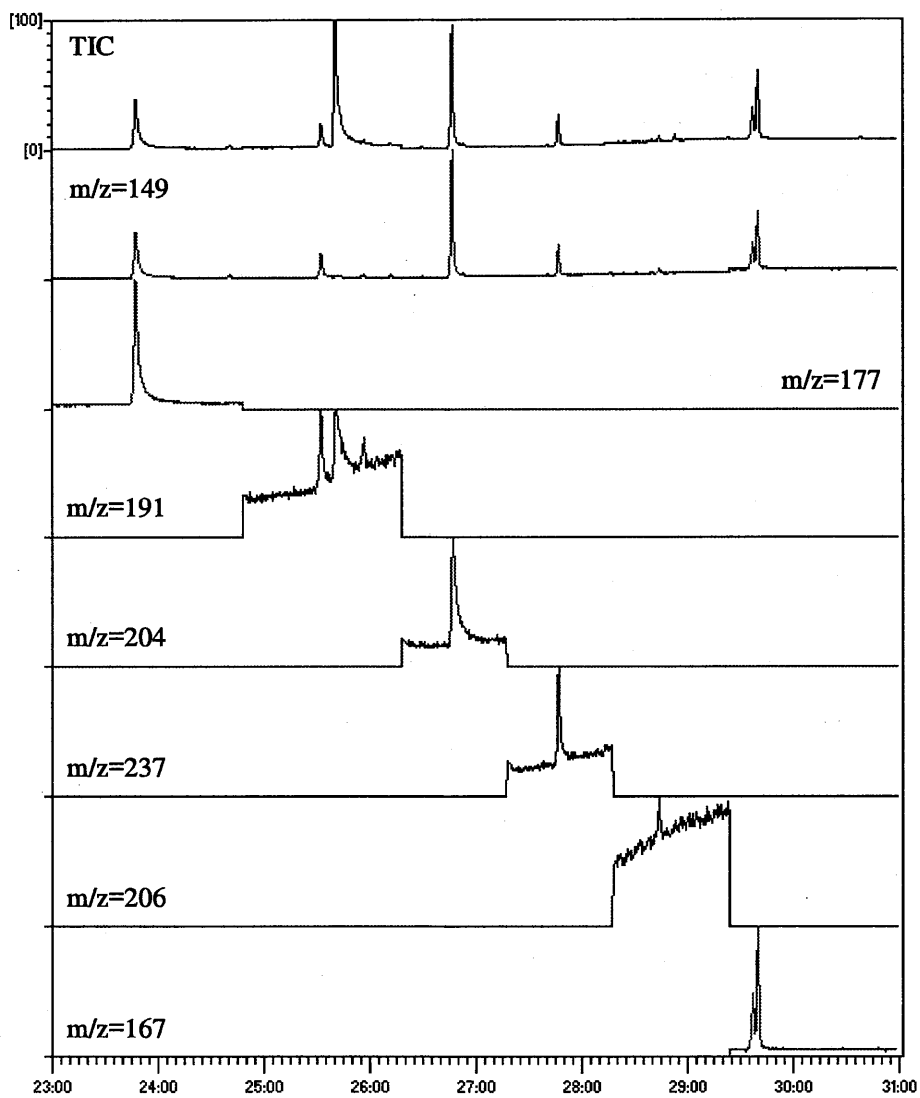


圖 2-3b 標準溶液 10 ppb ( 2  $\mu$  L ) 測定結果  
 ( GCmate : 分解能 500 )

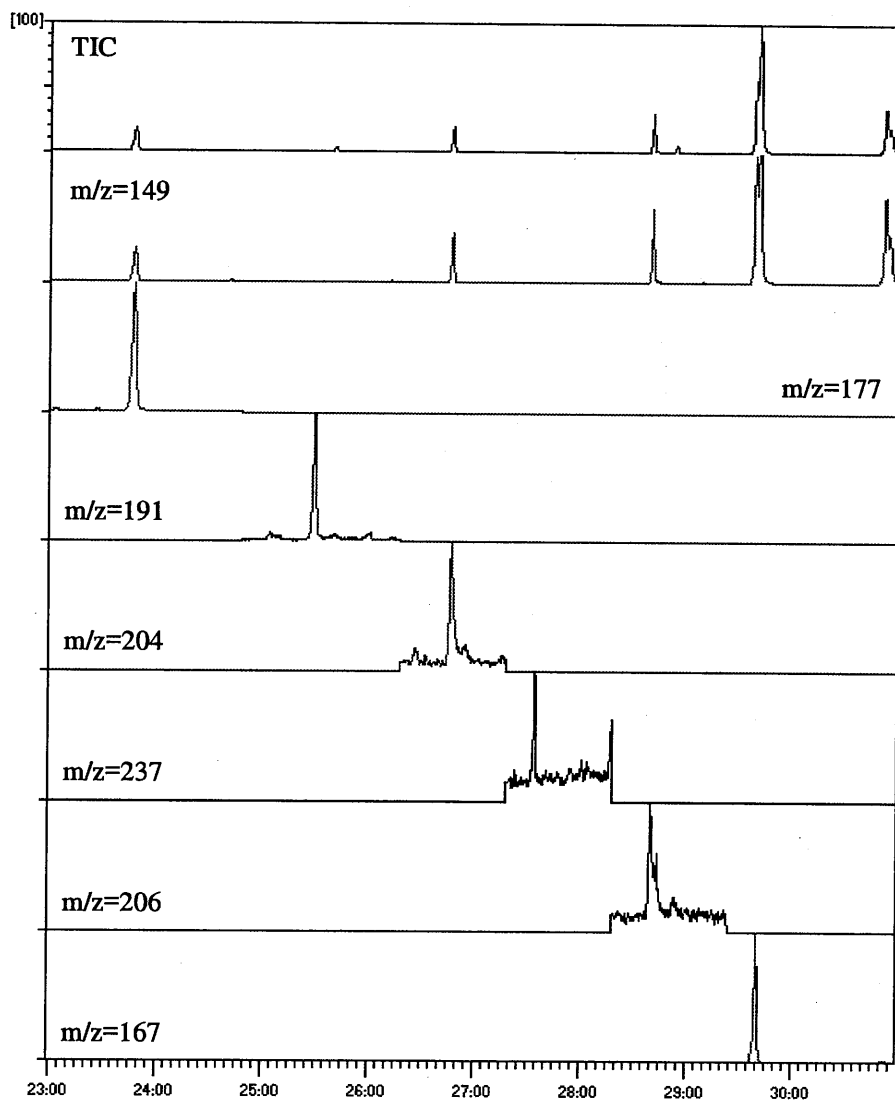


圖 2-4a 下水処理場方流水濃縮試料測定結果  
( GCmate : 分解能 3000 )

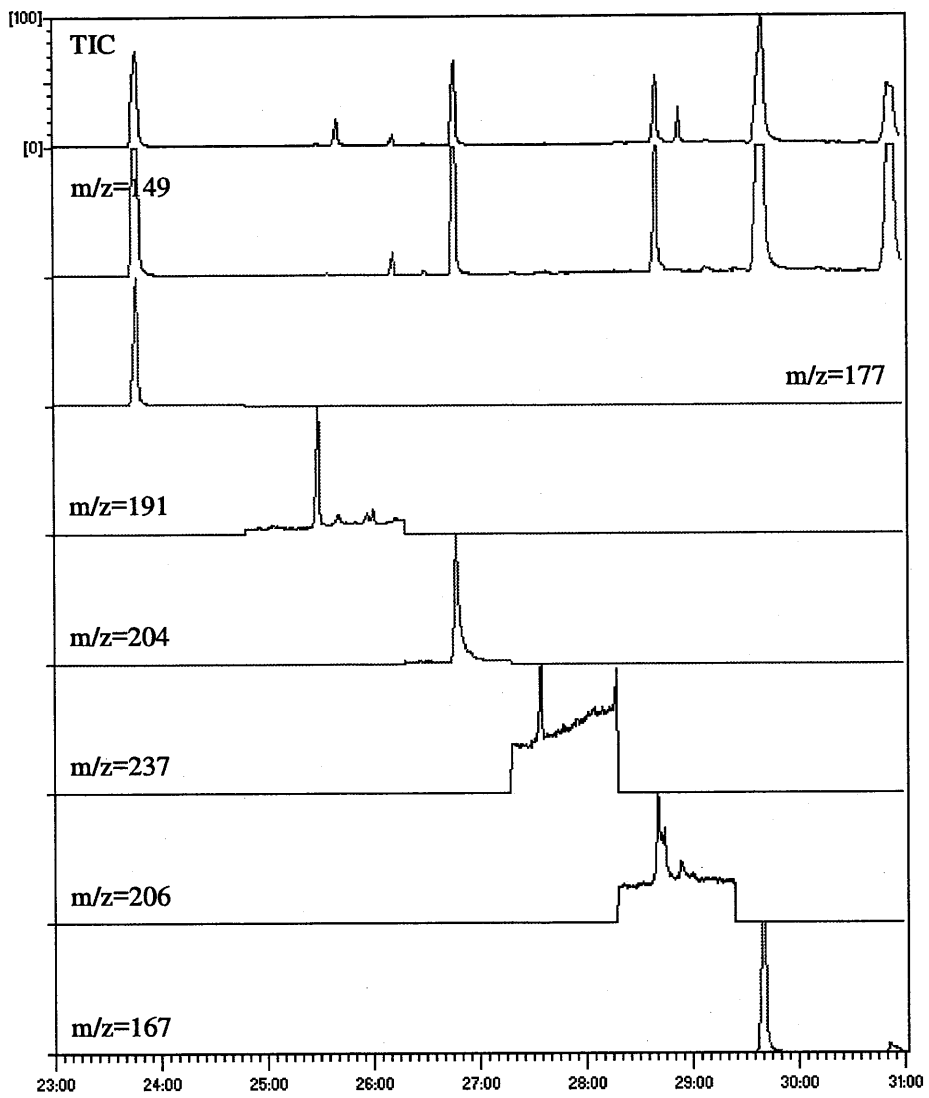
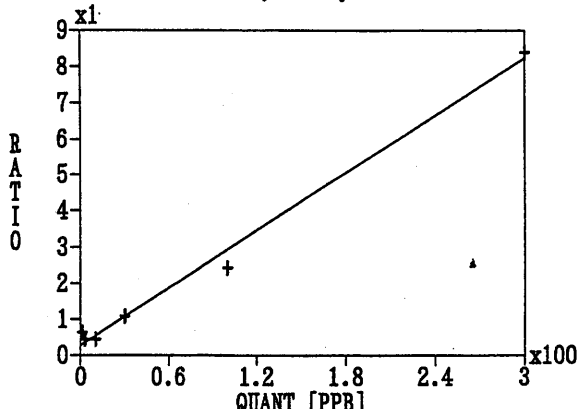


図 2-4b 下水処理場方流水濃縮試料測定結果(フタル酸類)

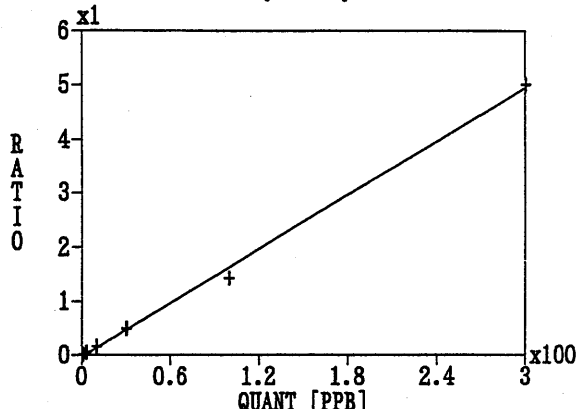
( GCmate : 分解能 500 )

Compound Name : DnEP  
 Q Ion (M/Z) : 149  
 Non Weighted Linear Regression  
 Ratio = 0.02654605 \* Quantity + 0.27366934469



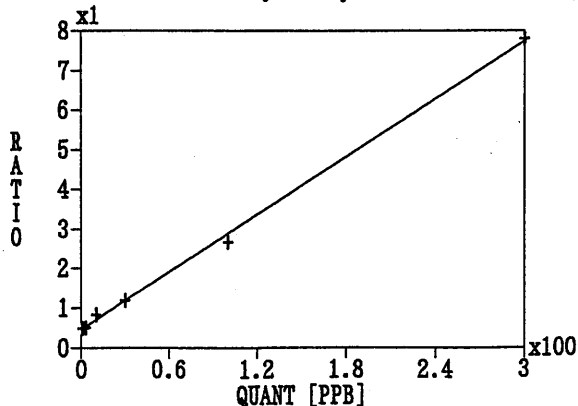
FILENAME	QUANTITY	RATIO[Q/IS]	CALC-QNT	DEV
HST1	1	0.631782466	13.4903	1249.0
HST3	3	0.435510510	6.0966	103.22
HST10	10	0.445893786	6.4878	-35.12
HST30	30	1.079161071	30.3432	1.14
HST100	100	2.433403002	81.3580	-18.64
HST300	300	8.402709851	306.2241	2.07
MEAN PERCENT ERROR [ABS VAL]				234.87
CORRELATIVE COEFFICIENT				0.9958855

Compound Name : DnPropP  
 Q Ion (M/Z) : 149  
 Non Weighted Linear Regression  
 Ratio = 0.01663696 \* Quantity - 0.03781921277



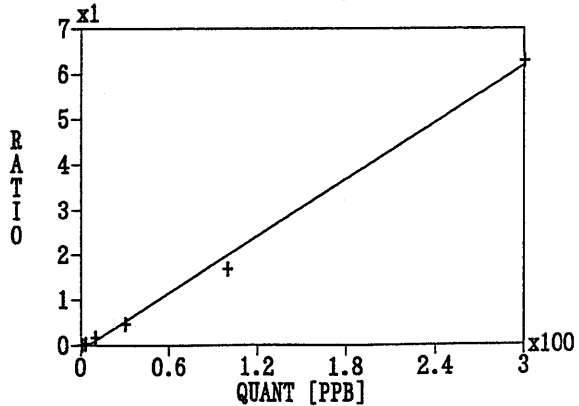
FILENAME	QUANTITY	RATIO[Q/IS]	CALC-QNT	DEV
HST1	1	0.011358396	2.9559	195.59
HST3	3	0.056197973	5.6511	88.37
HST10	10	0.157051445	11.7131	17.13
HST30	30	0.492549389	31.8789	6.26
HST100	100	1.428203518	88.1184	-11.88
HST300	300	5.014534604	303.6825	1.23
MEAN PERCENT ERROR [ABS VAL]				53.41
CORRELATIVE COEFFICIENT				0.9987402

Compound Name : DnBP  
 Q Ion (M/Z) : 149  
 Non Weighted Linear Regression  
 Ratio = 0.02428259 \* Quantity + 0.45197161457



FILENAME	QUANTITY	RATIO[Q/IS]	CALC-QNT	DEV
HST1	1	0.489522715	1.5464	54.64
HST3	3	0.508484144	2.3273	-22.42
HST10	10	0.835173496	15.7809	57.81
HST30	30	1.190901098	30.4304	1.43
HST100	100	2.666996376	91.2186	-8.78
HST300	300	7.802220257	302.6962	0.90
MEAN PERCENT ERROR [ABS VAL]				24.33
CORRELATIVE COEFFICIENT				0.99913

Compound Name : DnPentyIP  
 Q Ion (M/Z) : 149  
 Non Weighted Linear Regression  
 Ratio = 0.02096868 \* Quantity - 0.10838419161



FILENAME	QUANTITY	RATIO[Q/IS]	CALC-QNT	DEV
HST1	1	0.013745302	5.8244	482.44
HST3	3	0.037343888	6.9498	131.66
HST10	10	0.174519754	13.4917	34.92
HST30	30	0.468662086	27.5194	-8.27
HST100	100	1.678311881	85.2078	-14.79
HST300	300	6.287205900	305.0068	1.67
MEAN PERCENT ERROR [ABS VAL]				112.29
CORRELATIVE COEFFICIENT				0.9977983

図 2-5 フタル酸エステル類の検量線

酸分析用 n-ヘキサンにより十分に洗浄する必要があり、またそれらの保管方法にも十分注意が必要である。

## 【フェノール類の分析】

### ・概要

SPEED'98 では、このカテゴリーに属する化学物質はアルキル置換基の炭素数が4個から9個のアルキルフェノール類及びビスフェノールA (BPA), 2,4-ジクロロフェノール (DCP), ペンタクロロフェノール(PCP) である。これらの物質はそれぞれ、界面活性剤の原料/分解生成物, 樹脂の原料, 染料中間体, 防腐剤・除草剤として使用され環境中に放出、残留している。

今回分析対象とした化学物質は表 3-1 に示したアルキルフェノール類およびクロロフェノール類、ビスフェノールAの13種類である。なお Nonyl phenol については複数種類の異性体の混合物を標準品として測定を行った。

表 3-1 アルキルフェノール類の目的成分とモニターイオン

目的成分	モニターイオン m/z			
	107.0497	135.0810	150.1045	
p-tert-butyl phenol	107.0497	135.0810	150.1045	
4-(1-methylpropyl) phenol	107.0497	121.0653	150.1045	
4-n-butyl phenol	107.0497	150.1045		
4-(1,1-dimethyl propyl) phenol	107.0497	135.0810	164.1201	
4-n-pentyl phenol	107.0497	108.0575	164.1201	
4-n-hexyl phenol	107.0497	108.0575	178.1358	
4-(2,2,3,3-tetramethyl propyl) phenol	107.0497	135.0810		
4-n-heptyl phenol	107.0497	108.0575	192.1514	
4-n-octyl phenol	107.0497	108.0575	149.0966	
4-n-nonyl phenol	107.0497	108.0575	220.1827	
Nonyl phenols	107.0497	121.0653	135.0810	149.0966

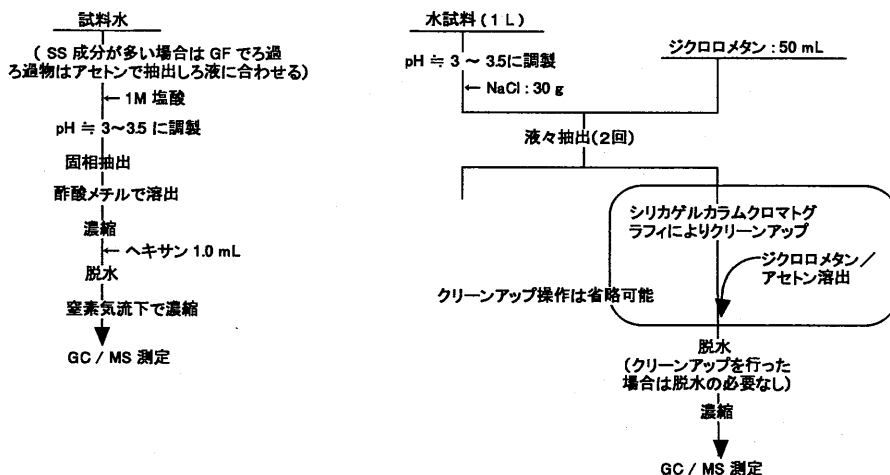


図 3-1 フェノール類の前処理方法

・測定

表 3-2 GC 条件

暫定分析法に示されたアルキルフェノール類の分析方法及び BPA,DCP,PCP の分析方法の手順を図 3-1 に示した。アルキルフェノール類は固相抽出もしくは液々抽出の後に GC/MS 測定、また BPA,DCP,PCP は固相抽出もしくは液々抽出の後にトリ

使用カラム	スベルコ SPB-5 30m×0.25mm 膜厚 0.25 μm フロンティアラボ UA-5P 30m×0.25mm 膜厚 0.25 μm (フェノール測定用カラム:試作品)
カラム温度	60℃ (2min) → 10℃/min → 260℃ (8 min)
注入口温度	250℃
	Pulsed Splitless Mode (Pulse Time 1.1min 30psi) Purge On Time : 1.0 min
ガス流量	1 mL / min 定流量 Mode

メチルシリル化 (TMS 化) 処理を施し GC/MS 測定することとなっている。そこで、今回我々は BPA,DCP,PCP の3種類については TMS 化を行った場合と行わなかった場合でその結果を比較し、TMS 化を行わない簡便な分析方法の可能性を検討した。

表 3-1,3-2 には測定時の GC の条件と SIM 測定を行う場合のモニターイオンの質量数を示した。測定には「四重極型」の質量分析計である Automass と「二重収束型質量分析計」の GCmate を使い、GCmate では高分解能測定 (分解能 3000) 測定のみを行い Automass 及び GCmate での測定結果を比較した。また、BPA,DCP,PCP の3種を TMS 化すること無しに測定する場合には「フロンティアラボ社」により開発されたフェノール分析用カラム UA-5(P) (5%-フェニルメチルシリコン) と通常のカラムの双方で測定を行い、フェノール分析用カラムの性能を評価した。

・分析結果

図 3-2 に、BPA,DCP,PCP の標準品を TMS 化すること無しに、Automass, GCmate の双方にて測定した結果を示した。標準品の分析では四重極型と二重収束型の間で大きな差は見られず、いずれの場合も GC/MS に注入する際の溶液の濃度として 10ppb 程度の分

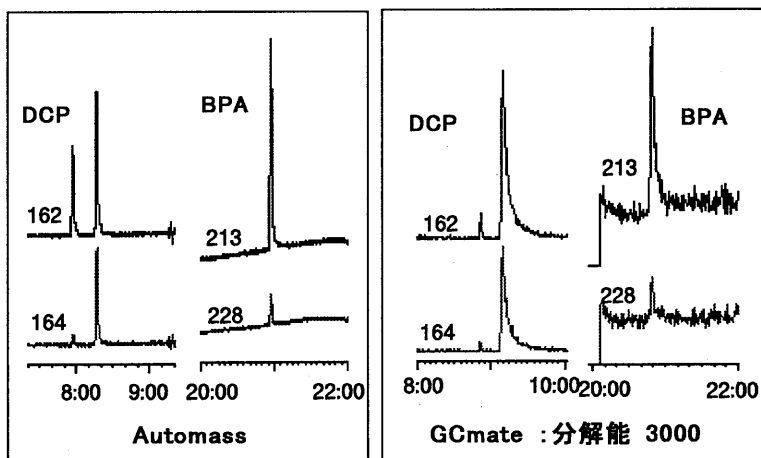


図 3-2 DCP, BPA 標準溶液 10 ppb のクロマトグラ

析は十分可能であった。本測定に使用したキャピラリーカラムは Automass での測定には UA-5(P) を、また GCmate での測定にはスペルコ社の SPB-5 を使用した。BPA のクロマトグラムを双方で比較すると、SPB-5 でのピーク形状はテーリングの傾向が大きいのに対して UA-5(P) でのピーク形状は比較的シャープであることがわかる。今回、検討した結果では UA-5(P), SPB-5 いずれのカラムを使用した場合でも 10~300ppb の範囲で直線性の良い検量線を作成することが可能であった。しかし、BPA, DCP のいずれについてもそのピーク形状は UA-5(P) の測定結果をの方が良好であることから BPA, DCP を TMS 化すること無しに測定を行う場合には UA-5(P) を使用した方が良好な結果が得られと考えられる。後に述べる「アルキルフェノール類」についてもこれらの傾向は同様であり、フェノール分析用カラム UA-5(P) はフェノール類の分析には有効であることが示唆された。ただし、今回検討した中では PCP に関しては UA-5(P), SPB-5 いずれのカラムを用いても TMS 化すること無しに測定を行うことは不可能であった。

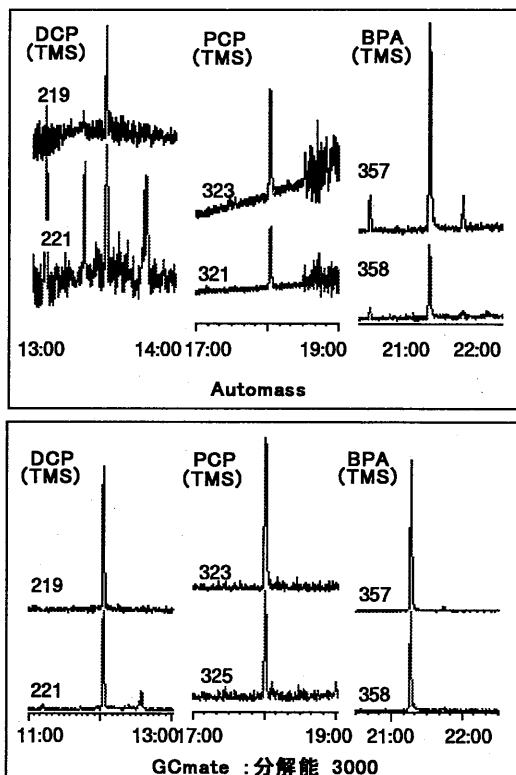


図 3-3 TMS 化体標準液 5 ppb のクロマトグラム

図 3-3 には TMS 化処理を施して測定を行った結果についても同時に示した。TMS 化を施した場合は PCP を含む 3 種のフェノール類を高感度に分析することが可能であった。

図 3-4 に実試料として、下水処理放流水を暫定分析法に従い固相抽出法により 1000 倍濃縮した溶液を測定した結果を示した。実試料についても TMS 化を行ったものと行わなかったものの双方について測定を行った。Automass 及び GCmate の双方で、微量ながら BPA, DCP, PCP が検出された。ただし、Automass による測定では PCP については夾雑物の妨害により PCP のピークの判定が困難であることがわかった。夾雑物中での目的成分の検出状況をより明確に評価するために、同様の実試料の濃縮溶液に対して BPA, DCP, PCP の濃度が濃縮溶液中で 10ppb となるように添加したものについての測定を行った。その結果を図 3-4 に示した。Automass と GCmate の測定結果を比較すると、実試料の測定結果と同様に Automass での測定では夾雑物質の妨害が顕著であるのに対して、GCmate の分解能 3000 での測定では夾雑物質の妨害は軽減されている。特に TMS 化しない場合の BPA クロマトグラムでは Automass の測定では近傍に妨害ピークが出現



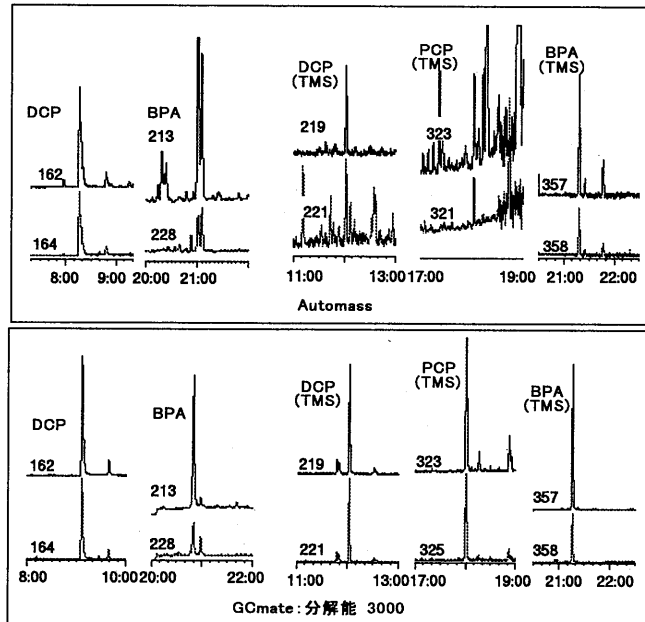


図 3-4 下水処理場放流水濃縮試料+ 標準溶液 10 ppb 測定結果

しているのに対して GCmate の測定では目的成分である BPA のピークのみが検出されている。また TMS 化した場合の PCP の測定では Automass の場合は非常に妨害ピークが多いのに対して GCmate の測定では妨害ピークが比較的少ない。これらのことは質量分析計の分解能の差によるものである。GCmate での測定では分解能を 3000 と設定したために、夾雑物質の影響が軽減されたものと考えられる。つまり Automass は四重極型の質量分析計であるためその測定時の分解能は 500 程度であるのに対して、GCmate では分解能を 3000 で測定を行っているためである。本データを見る限りでは、今回検討した実試料では GCmate を用いた分析ではクリーンアップの処理は省略可能と考えられる。

次に、アルキルフェノール類の分析結果を次に示す。図 3-5 には Automass 及び GCmate を用いた場合の標準溶液 (10ppb) の測定結果を示した。標準品の分析では四重極型と二重収束型の間で大きな差は見られない。いずれの場合も GC/MS に注入する際の溶液の濃度として 10ppb 程度の分析は充分可能であった。

図 3-6 には河川水及び下水処理場放流水を暫定分析法に従い 1000 倍濃縮したもの、およびその濃縮試料に対して、それぞれの化学物質の標準品を 10 ppb となるように添加したものを測定した結果のクロマトグラムを示した。Automass で測定したクロマトグラムでは、実試料中に存在している夾雑物質の影響により分析対象物質のピークが判別しづらい状況である。一方、これとは対照的に GCmate で測定したクロマトグラムでは、夾雑物質の影響は比較的小さく目的物質のピークがはっきりと確認することが可能であった。これは BPA,DCP,PCP の場合と同じく、質量分析計の分解能を 3000 と設定したために、夾雑物

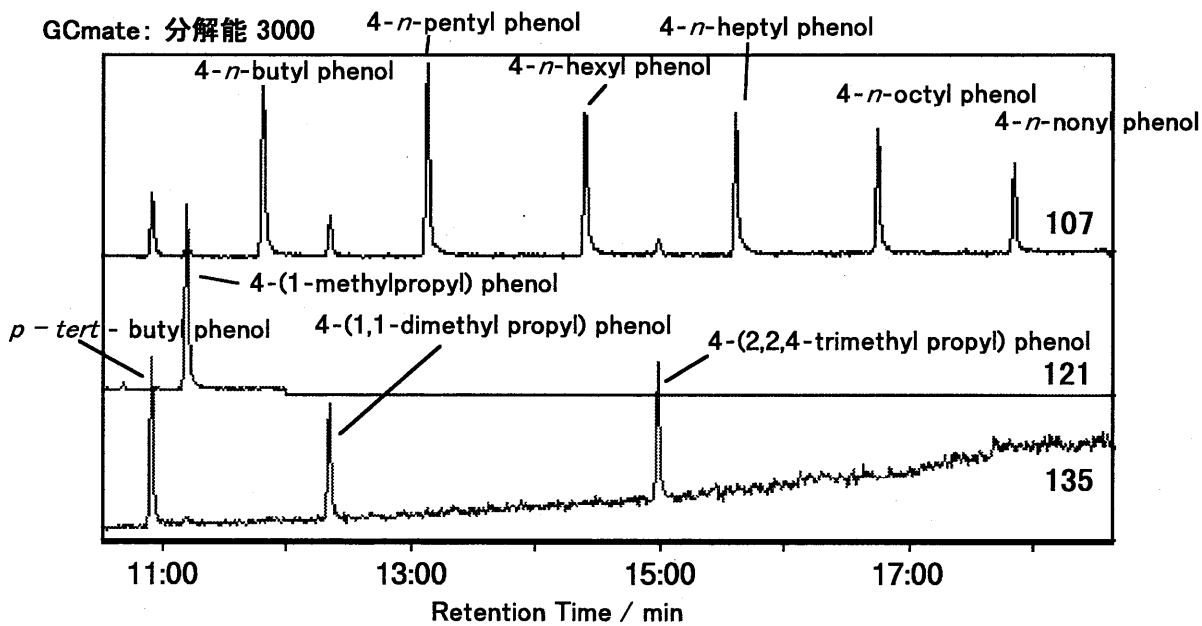
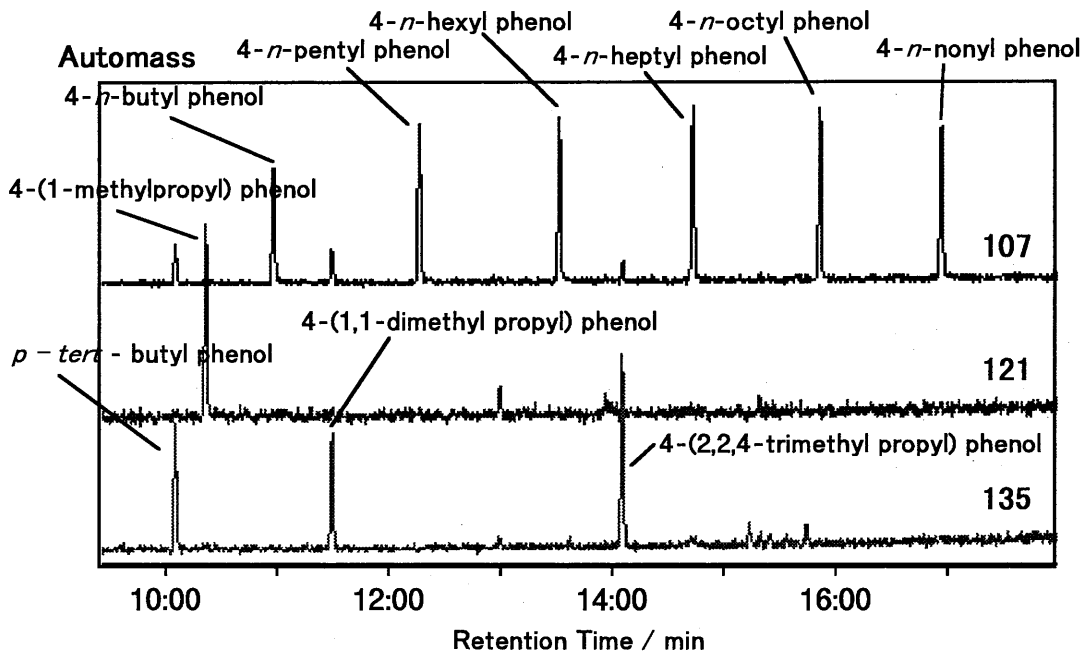


図 3-5 標準溶液 10 ppb の測定結果

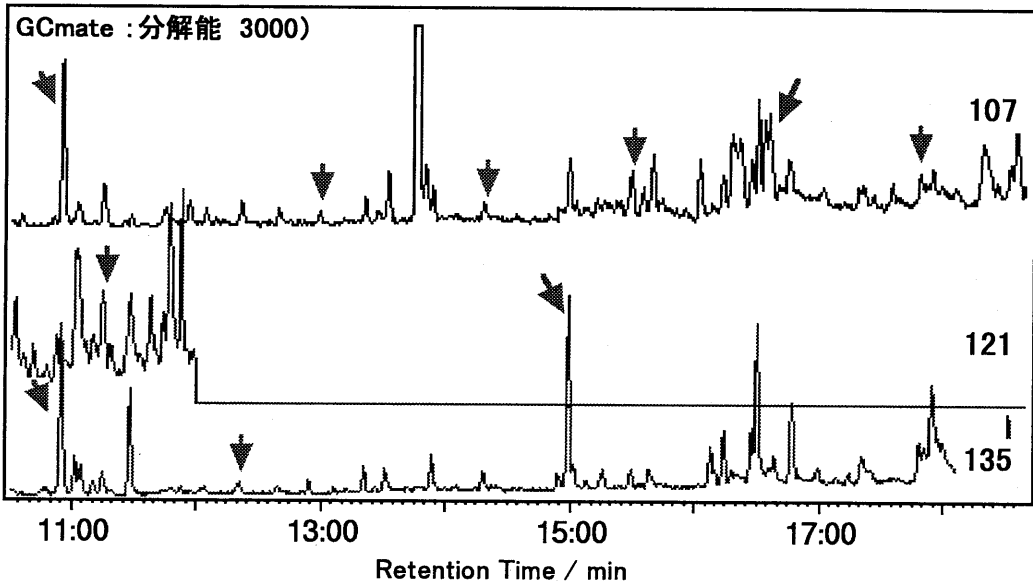
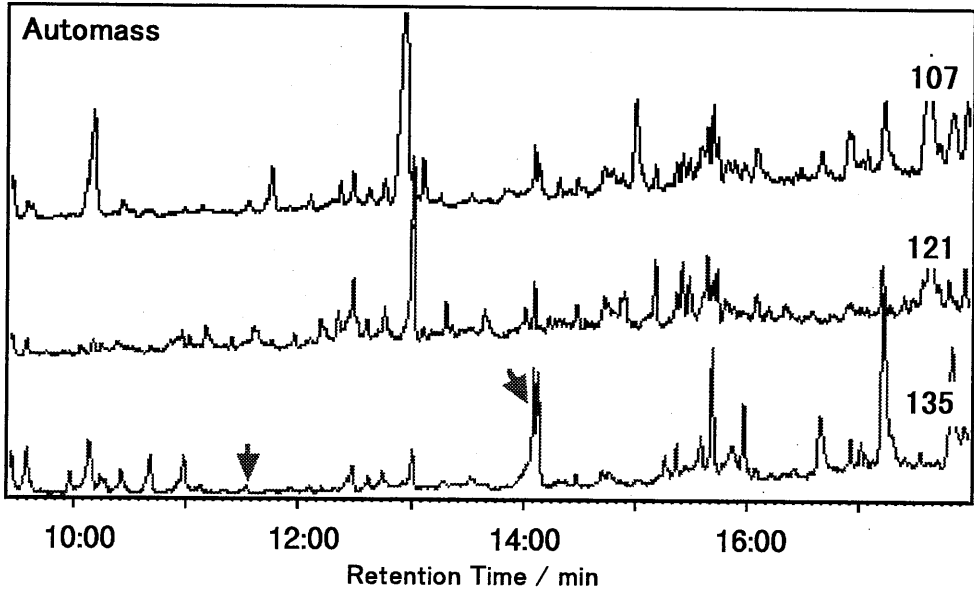


圖 3-6 下水処理場放流水濃縮試料測定結果

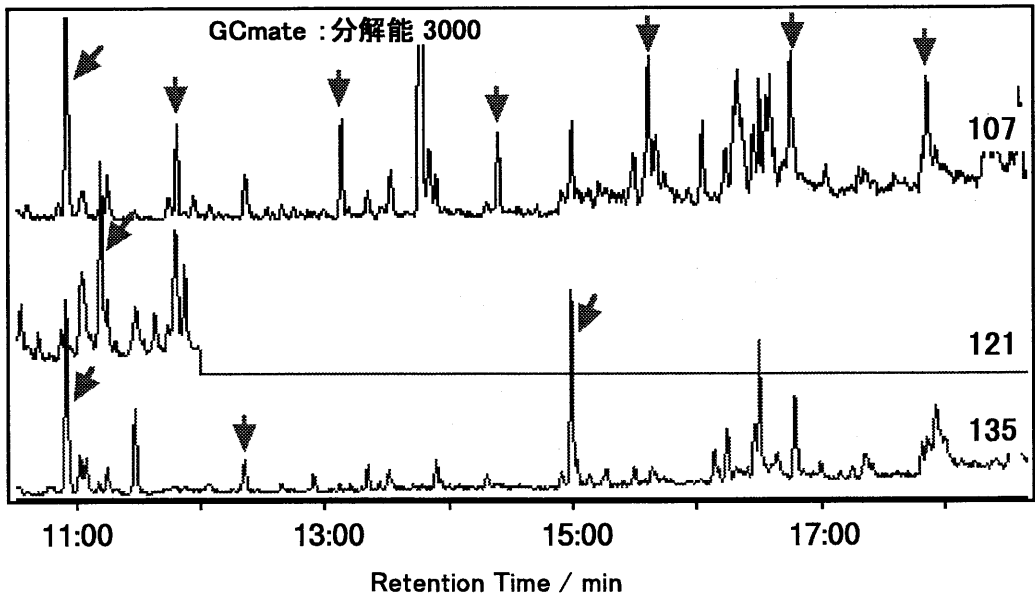
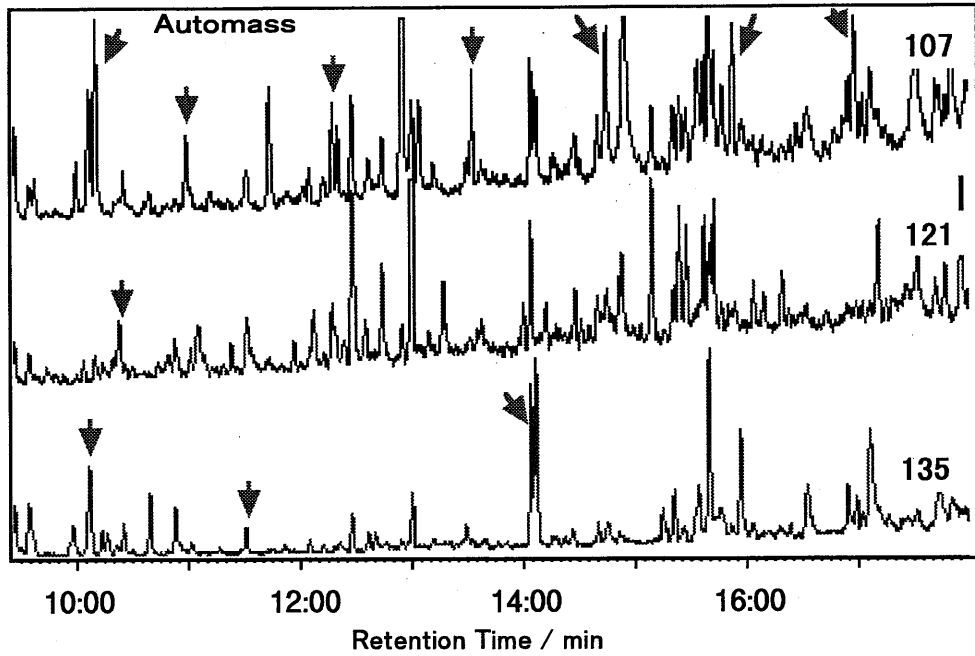


图 3-7 下水処理場放流水濃縮試料 + 標準溶液 10 ppb 測定結果

質の影響が軽減されたものと考えられる。このデータを見る限りではアルキルフェノール類についても、今回検討した実試料では GCmate を用いた分析ではクリーンアップの処理は省略可能であろう。また、今回検討した実試料は河川水・下水処理場放流水であったが、底質試料や食品試料などの測定を行う場合には、分解能をあげることによるメリットが顕著に見られるものと予想される。

このように、フェノール類の分析においては質量分析計の分解能により得られるデータにある程度差が見られ、分解能をあげることにより夾雑物質の影響を受けにくい測定が可能であることがわかった。

### 【有機塩素系農薬の分析】

#### ・概要

環境ホルモン物質としてあげられている化学物質のうち半数以上は農薬として過去、もしくは現在も使用されている化学物質かその分解生成物である。暫定分析法に示された前処理方では、HCH や HCB などの有機塩素系農薬は PCBs PBBs などと同じカテゴリーに分類されている。今回これらの有機塩素系農薬のうち HCH 類（4種）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、エンドスルファンサルフェート、メトキシクロル、ケルセン（ジコホール）の分析について検討を行った。

表 4-1 有機塩素系農薬の目的成分とモニターイオン

目的成分	モニターイオン m/z			
Cyclohexane (HCH)	180.9379	182.9349	218.9116	216.9145
Heptachlor	100.0080	102.0051	271.8102	273.8072
Dicofol	138.9951	140.9922	251.0030	253.0002
Heptachlor epoxide	352.8442	354.8413	350.8471	
Endosulfan sulfate	271.8102	273.8072	386.8400	388.8371
Methoxychlor	227.1072	228.1106		

#### ・測定

暫定法に示された「有機塩素系農薬」の測定法の手順を図 4-1 に示した。n-ヘキサンによる液々抽出の後、カラムクロマトによりクリーンアップ処理及び各化合物質群にフラクション分画を行った後に GC/MS で測定することとなっている。

表 4-2 GC 条件

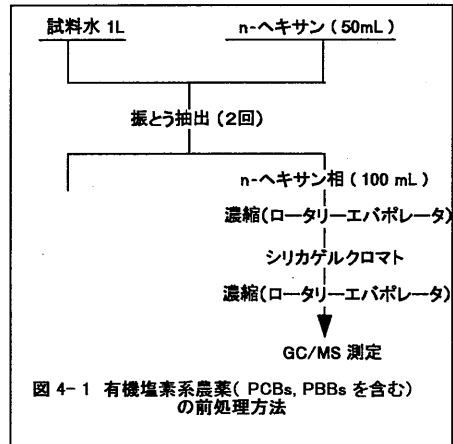
使用カラム	スベルコ SPB-5 30m×0.25mm 膜厚 0.25 μm
カラム温度	80℃ (3min) → 15℃/min → 170℃ (0 min) → 7℃/min → 300℃ (10 min)
注入口温度	280 °C
	Pulsed Splitless Mode (Pulse Time 1.1min 30psi) Purge On Time : 1.0 min
ガス流量	1 mL / min 定流量 Mode

表 4-1,4-2 には SIM 測定を行う場合のモニタリーイオンの質量数と測定時の GC の条件を示した。測定には GCmate を用い、低分解能測定（分解能 500）と高分解能測定（分解能 3000）の双方の条件で測定を行いその結果を比較した。

#### ・分析結果

図 4-2 a, b に 20ppb の標準物質を SIM で測定した結果を示した。分解能 500 及び 3000 の双方において感度よく測定することが可能であった。

図 4-3 a, b には海水の濃縮試料にそれぞれの有機塩素系農薬の標準物質を濃縮溶液として 10 ppb となるように添加したものを測定した結果である。図からもわかるように分解能 500 では夾雑物の影響を受けて、一部の化合物についてはピークを確認できない。一方、分解能 3000 での測定では夾雑物の影響が軽減されておりクロマトグラムも S/N の良い状態で、今回の条件では測定対象としたすべての農薬を検出することが可能であった。このように有機塩素系農薬の測定においてもフェノール類の測定時と同じように分解能を高くすることによるメリットが見られた。このような傾向は塩素や臭素を多く含むような化合物においてより顕著に見られることが知られていることから、他の有機塩素系農薬や PCBs, PBBs でも同様の傾向が見られることが予想される。



#### 【まとめ】

環境ホルモン関連物質は「四重極型質量分析計」及び「二重収束型質量分析計」のいずれでも分析が可能であった。また、測定対象物質の種類にもよるが「四重極型質量分析計」よりも「二重収束型質量分析計」を用いた方が、明らかに夾雑物質の妨害が少なくなった。このことから考えて、環境ホルモン物質の分析を「四重極型質量分析計」で行う場合には、クリーンアップ処理が必須となる可能性がある。また、環境中の化学物質をより低濃度まで測定するためには、濃縮率を高くするか、大量注入などの手法を用いる必要に迫られる。その場合、ある程度のクリーンアップの操作を行うにしても「夾雑物質」の影響は少なからず生じてくるであろう。そのような状況では、今回検討したいいわゆる「中分解能」程度の質量分析計を用いることは有用であるあるものと考えられる。

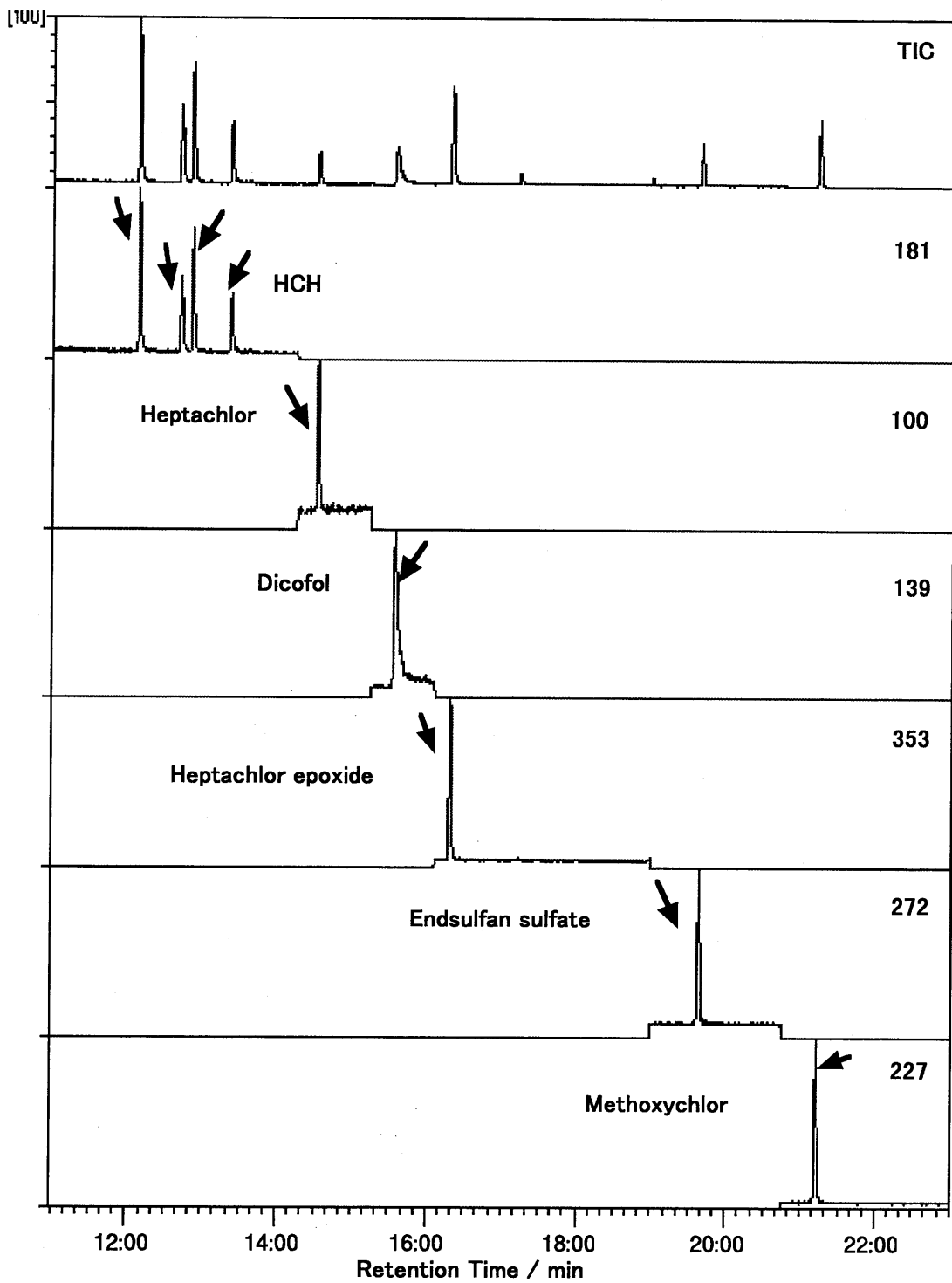


図 4-2a 標準試料 20 ppb 測定結果  
( GCmate : 分解能 3000 )

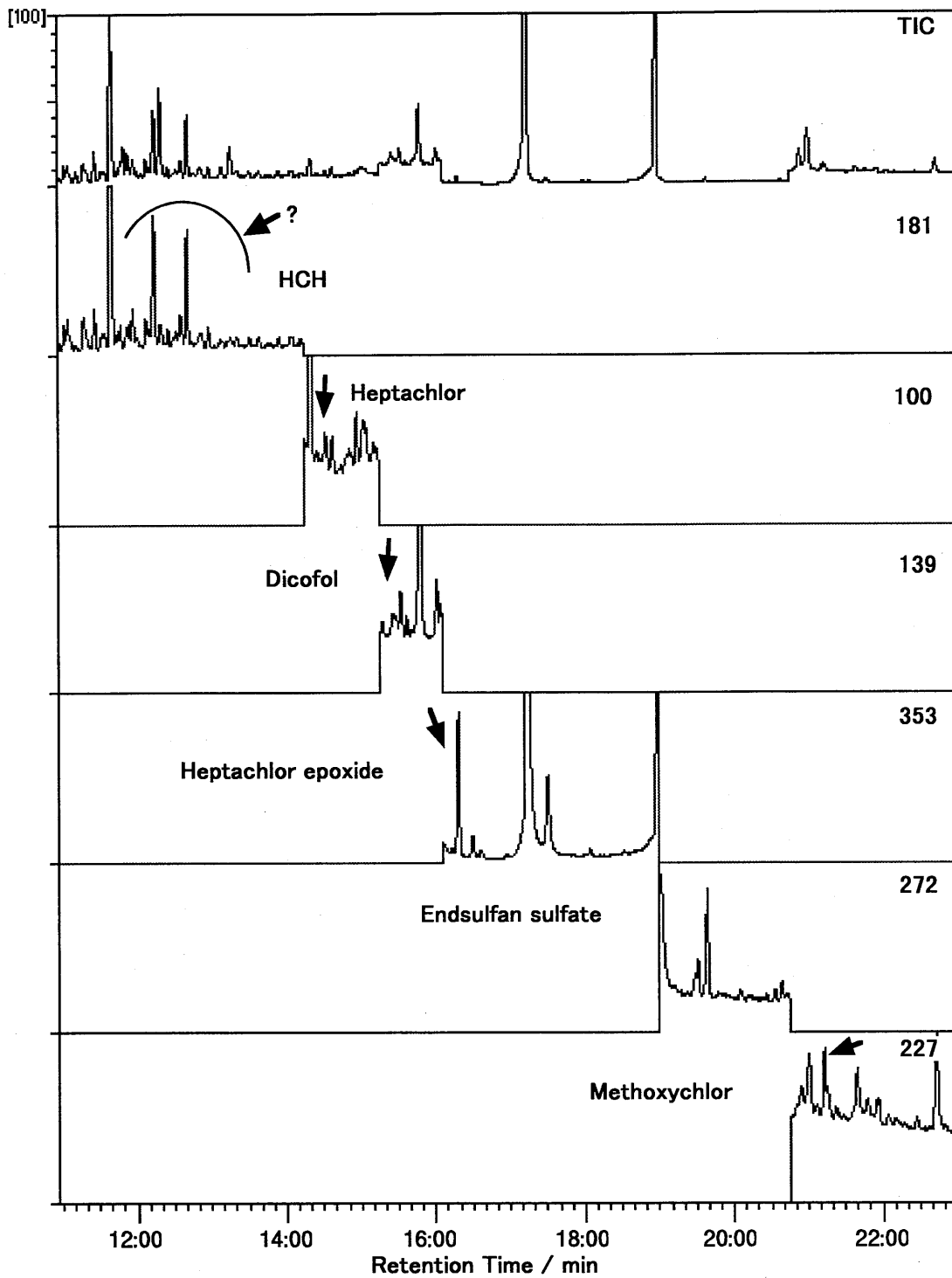


圖 4-3b 海水濃縮試料 + 標準試料 10 ppb 測定結果  
( GCmate : 分解能 500 )



#### 【参考文献】

- 1) 奪われし未来, シーア・コルボーン, ダイアン・ダマノスキ, ジョン・ピーターソン・マイヤーズ 著, 長尾 力 訳, 1997年9月, 翔泳社
- 2) 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-, 1998年5月, 環境庁
- 3) 第24回 日本環境化学会講演会資料集, 1998年7月9日, 日本環境化学会
- 4) 第26回 日本環境化学会講演会予稿集, 1998年10月29日, 日本環境化学会

#### 【謝辞】

今回、有機塩素系農薬の測定に用いた海水試料濃縮溶液をご提供くださった兵庫県立公害研究所 藤森一男氏に深謝致します。



## 広告のページ

日本ミリポア株式会社  
株式会社パーキンエルマージャパン  
株式会社日立サイエンスシステムズ  
横河アナリティカルシステムズ株式会社



# 環境分析に...

# Milli-Q<sup>®</sup>

超純水製造装置

# Gradient

- TOC 5ppb 以下を実現
- 1.5 ℓ / 分の高流量
- TOC計標準装備
- GLP および ISO/IEC Guide 25対応
- JIS K0557 A4グレードに相当  
改正JIS K0102 の BOD, COD の測定用として最適

## ■ Milli-Q Gradient

高性能短波長 UV ランプの採用により TOC 5ppb 以下の超純水が常時採水できます。毎分 1.5 ℓ の流量で連続して採水できますので器具洗浄等で大量に超純水が求められる環境分析にも十分対応できます。HPLC など有機物分析に最適です。

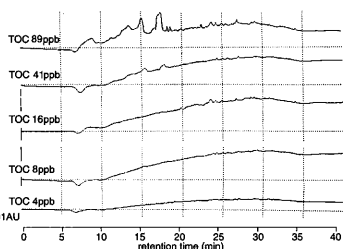
## ■ 価格

¥ 1,020,000

- その他に目的に応じた Milli-Q を 3 機種揃えています。

## ■ TOC値がHPLCに与える影響

カラム：  
Waters Puresil C18,  
4.6x150mm  
移動相：  
水(Milli-Q Gradient)/  
アセトニトリル  
流速：1.0 ml/min  
検出器：  
Waters PDA991  
波長：214 nm  
カラム平衡化/  
グラディエントプログラム



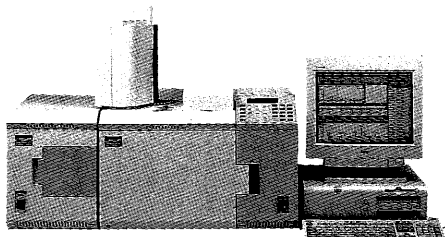
# MILLIPORE

日本ミリポア株式会社  
ラボラトリーウォーター事業部

東京 / TEL.(03) 5442-9714(直) FAX.(03) 5442-9734 〒108-0073 東京都港区三田 1-4-28 三田国際ビル  
大阪 / TEL.(06) 390-0595(直) FAX.(06) 307-2019 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 6-1-1 新大阪プライムタワー  
九州 / TEL.(092) 471-7511(直) FAX.(092) 412-1340 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 1-13-9 住友生命博多駅東ビル  
米沢工場 / 〒992-1128 山形県米沢市八幡原 2-4736-3 (ISO9001 認定工場)

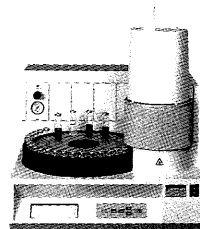
**PERKIN ELMER**  
Look to us. And see more.

### TurboMass ガスクロマトグラフ質量分析計



クラス最高の測定質量範囲2~1200 m/z  
EI/CI/NCIモード対応の  
ワンランクアップのGC/MS分析

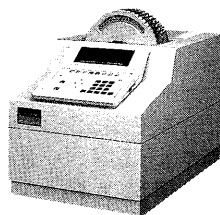
### HS40XL ヘッドスペースサンプラー



水質分析の標準  
ヘッドスペースサンプリング

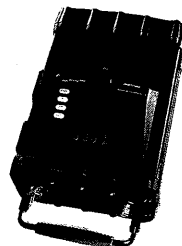
# 大気・水・土壌 環境ホルモン物質の分析を支える パーキンエルマーの環境分析機器

### ATD400 サーマルデゾーションシステム



大気分析の標準  
チューブサンプリング

### Voyager ポータブルガスクロマトグラフ



4本のキャピラリーカラム分析  
標準内蔵

※仕様・外観は予告なく変更することがあります。※詳細はお問い合わせ下さい。

パーキンエルマーの製造する分析機器およびシステムは、  
ISO9001の認証を受けた工場で開発・製造されています。



株式会社 パーキン エルマー ジャパン

分析機器事業部

横浜 〒220-0004 横浜市西区北幸2-8-4横浜西口K.N.ビル 大阪 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町5-3 九州 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-12-6花村ビル  
TEL. (045)314-8381代 FAX. (045)314-5142 TEL. (06)386-6004代 FAX. (06)386-7009 TEL. (092)473-7001代 FAX. (092)473-8353

# キャピラリーカラム時代にベストマッチ 20検体対応のセミオートサンプラです。

## 特長

### 高速注入です。

キャピラリーカラム分析のようにキャリア速度が速い場合は、それに合わせた注入速度が必要です。手動注入では困難な高速注入が可能です。

### 注入量が細かく変えられます。

0.1  $\mu$ l~5.0  $\mu$ lまで0.1  $\mu$ l単位(50ステップ)で変えられます。

### 20検体まで自動注入できます。

通常最もよく使われる試料数に対応できる機能をコンパクトなボディに納めました。

### 高粘性試料の吸入ができます。

試料の吸入速度および試料吸引後の待機時間が変えられるので、比較的高粘性の試料も安定に吸入することができます。

### 分析周期時間が設定できます。

分析周期は最大990分まで設定できます。また、ガスクロマトグラフからのレディ信号によって分析を開始させることも可能です。

### 2種類の溶媒を使ってシリンジ洗浄できます。

クロスコンタミネーションを最小に抑えることができます。

HITACHI  
AI-3000

G-3500

HITACHI  
AI-3000

G-3500形ガスクロマトグラフに

AI-3000形オートインジェクタを装着した外観。

株式会社 日立サイエンスシステムズ

本 社 工 場 〒312-0033 茨城県ひたちなか市市毛1040番地 電話(029)272-5471(代表) FAX(029)274-4497

**URL** <http://www.hipri.co.jp/science/top.htm>

日製産業株式会社

本 社 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目24番14号 電話/東京 (03)3504-7211 (ダイヤルイン)

事 業 所 北海道 (011)221-7241・東北 (022)264-2211・筑波 (0298)23-7391・横浜 (045)451-5151・新潟 (025)241-3011  
北陸 (076)263-3480・中部 (052)583-5841・京都 (075)241-1591・関西 (06)366-2551・四国 (0878)62-3391  
中国 (082)221-4514・九州 (092)721-3501

**URL** <http://www.nisseisg.co.jp/kagaku/>

株式会社 日立製作所

計測器事業部 〒100-8220 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 (新丸ビル) 電話/東京 (03)3212-1111 <大代>

**URL** <http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki>

認証取得  
**ISO 9001**

信頼と満足が得られる  
製品システムをお届けします。



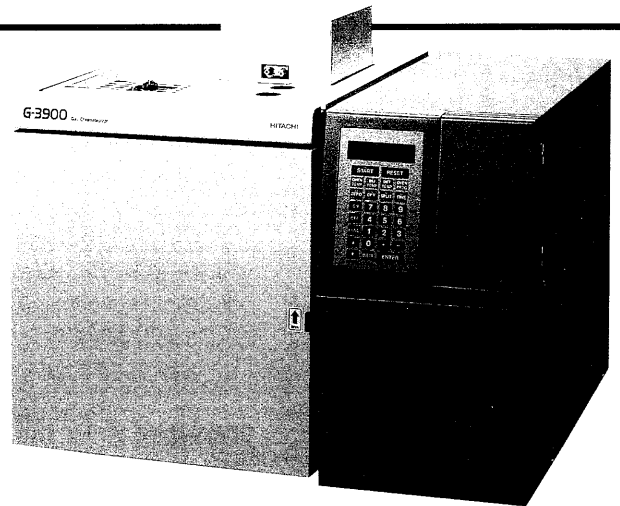
ISO 14001  
認証取得

計測器事業部計測器工場は  
環境に優しい工場づくりを推進します。

## G-3900形

### 高機能と高信頼性

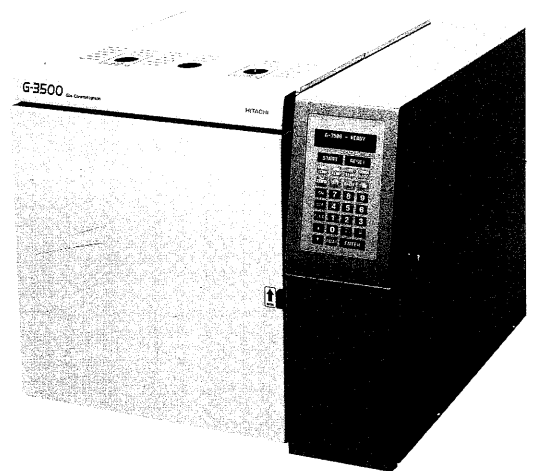
- キャピラリーカラムに適したガスクロマトグラフ
- バックドカラムも使用できます
- 6種類の異なる検出器を使用できます  
(PID・FID・TCD・FTD・FPD・ECD)
- 2種類の異なる注入口を同時取り付けできます
- 2種類の異なる検出器を同時取り付けできます
- 2系列キャリアーガス流路の同時装備ができます
- キャピラリーカラム用注入口には背圧制御方式採用
- PCデータステーションにより装置のシステム制御ができます
- デジタルフローコントローラ(DFC)をオプションで取り付けできます



## G-3500形

### シンプル&コンパクト

- ルーチン分析に適したキャピラリーガスクロマトグラフ
- バックドカラムも使用できます
- シンプル機能による使いやすさ
- コンパクトサイズによる設置性改善  
約515mm(幅)×450mm(奥行き)×435mm(FID付き高さ)
- 小電力化により省エネルギー対応
- FID(水素炎イオン化検出器)専用機
- キャピラリーカラム用注入口には背圧制御方式採用
- デジタルフローコントローラ(DFC)をオプションで取り付けできます



株式会社 日立サイエンスシステムズ 本 社 工 場 〒312-0033 茨城県ひたちなか市市毛1040番地 電話(029) 272-5471(代表) FAX(029) 274-4497

**URL** <http://www.hipri.co.jp/science/top.htm>

日製産業株式会社 本 社 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目24番14号 電話/東京 (03) 3504-7211(ダイヤルイン)

事 業 所 北海道 (011) 221-7241・東北 (022) 264-2211・筑波 (0298) 23-7391・横浜 (045) 451-5151・新潟 (025) 241-3011  
北陸 (076) 263-3480・中部 (052) 583-5841・京都 (075) 241-1591・関西 (06) 366-2551・四国 (0878) 62-3381  
中国 (082) 221-4514・九州 (092) 721-3501

**URL** <http://www.nisseisg.co.jp/kagaku/>

株式会社 日立製作所 計測器事業部 〒100-8220 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号(新丸ビル) 電話/東京 (03) 3212-1111(大代)

**URL** <http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki>

認証取得  
**ISO 9001**

信頼と満足が得られる  
製品システムをお届けします。



**ISO 14001**  
認証取得

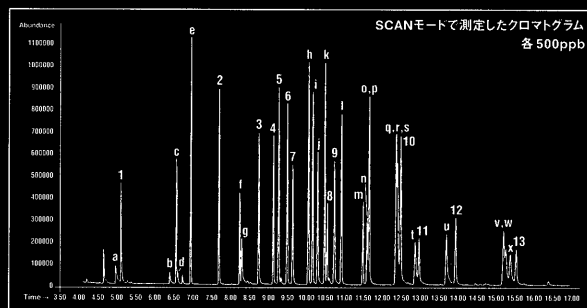
計測器事業部計測器工場は  
環境に優しい工場づくりを推進します。



# GC/MSによる、水道水およびゴルフ場規制農薬の一斉分析。

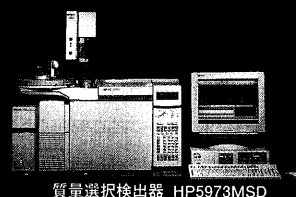
No.	農薬名	指針値 (mg/l)	No.	農薬名	指針値 (mg/l)
1	シクロボス (DDVP)	0.01	8	フェニトロチオン (MEP)	0.003
2	フェノフカーブ (BPMC)	0.02	9	チオベンカーブ	0.02 (基準値)
③	シマジン (CAT)	0.003 (基準値)	10	イソプロチオラン	0.04
④	フロヒザミド	0.008	11	イソキサチオン	0.008
⑤	ダイアジノン	0.005	12	クロロニトロフェン (CNP)	0.0001
⑥	クロロタロニル (TPN)	0.04	13	EPN	0.006
7	イブベンホス (IBP)	0.008			

No.	農薬名	指針値 (mg/l)	No.	農薬名	指針値 (mg/l)
a	メタミドホス (アセフェートの代替)	0.5	m	ヘンティメタリン	0.5
b	アセフェート	0.8	n	メチルタイムロン	0.3
c	エトリジアゾール (エクロメゾール)	0.04	o	キャフタン	3
d	トリクロロホス (DEP)	0.3	p	イソフェンホス	0.01
e	クロロネブ	0.5	q	フタミホス	0.04
f	ベンフルラリン (ベスロジン)	0.8	r	ナフロハミド	0.3
g	ベンシクロン	0.4	s	フルトラニル	2
h	テルフカルブ (MBPMC)	0.2	t	トリクロヒル	0.06
i	トルクロホスメチル	0.8	u	メフロコヒル	1
j	メタラキシル	0.5	v	ヒリフチカルブ	0.2
k	ジチオヒル	0.08	w	イフロシオン	3
l	クロロヒリホス	0.04	x	ピリタフェンチオン	0.02



数字: 水道水規制農薬  
丸数字: 水道水およびゴルフ場規制農薬  
アルファベット: ゴルフ場規制農薬  
下線の物質は、追加設定されたもの

注: 丸数字の農薬については水道水の基準値/指針値を示しました。ゴルフ場の指針値はこの10倍の濃度になります。

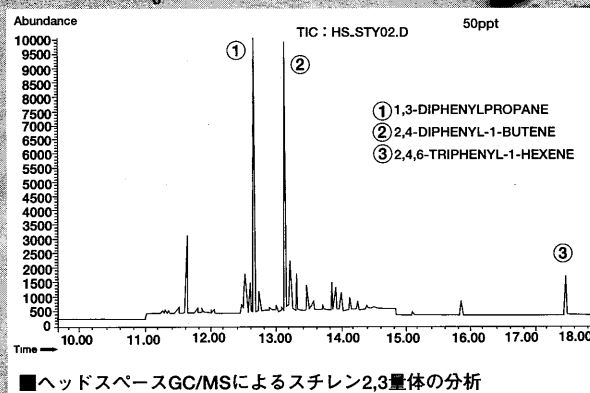
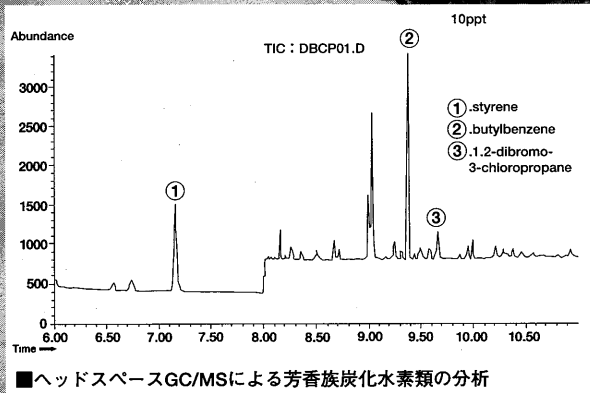


質量選択検出器 HP5973MSD

横河アナリティカルシステムズ株式会社

営業本部 / 〒180-8543 東京都武蔵野市中町1-15-5 三鷹高木ビル ☎ 0422-56-9393/4

水中の環境ホルモンを分析する  
ヘッドスペースGC/MS。  
きわめて敏感。



ヘッドスペースサンプラ/HP6890GC/HP5973MSD

内分泌攪乱化学物質のGC分析

(第229回ガスクロマトグラフィー研究特別講演会資料)

¥ 2,000

1998年12月4日 初版第1刷

監修者	渡辺 征夫
編者	増田 聰子
発行	日本分析化学会 ガスクロマトグラフィー研究懇談会
住所	東京都品川区西五反田1-26-2 五反田ザンハイ304号
電話番号	03-5487-2790

ISBN \*\*\*\*\*