

# 固相抽出-GC/MSによる水中のフェノール類の分析方法の検討

中西 成子, 日野 隆信

## Determination of Selected Phenols in Water by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Shigeko NAKANISHI and Takanobu HINO

### I はじめに

野生生物やヒトの生体内で、ホルモンと類似の作用あるいはホルモン等の内分泌を混乱させる作用を持つといわれる内分泌攪乱化学物質が、新たな環境問題として取り上げられてきた。環境庁、建設省が行った全国の河川水や下水の実態調査では、合成洗剤やプラスチック関連の内分泌攪乱化学物質と考えられているノニルフェノールが高頻度で検出された。平成10年10月環境庁は、水質、底質、水生生物中の内分泌攪乱化学物質測定のための暫定マニュアル<sup>1)</sup>を作成したが、水中の内分泌攪乱化学物質の分析で要求される定量下限値は低く、大量の試料水を濃縮して低濃度まで測定しなくてはならず、十分な精度を確保することは容易ではない。

水中のフェノール類を固相抽出カラムで濃縮し、GC/MS-SIMで定量する簡便な分析方法を検討し、JIS規格制定に伴う原案作成のためのアルキルフェノール類の検討試験に参加した。有用な知見が得られたので報告する。

### II 実験方法

#### 1. 試薬

水はミリポア製Milli-Q Plus純水製造装置より得られた水を使用した。ヘキサン、ジクロロメタン、メタノール、アセトンは関東化学製残留農薬試験用1,000倍濃縮検定品を使用した。硫酸ナトリウム(無水)は和光純薬製PCB・フタル酸エステル試験用を使用した。

フェノール類標準原液は、フェノール類17物質(各化合物名は表2参照)の1,000mg/Lヘキサン溶液を各々調製した。内標準物質のナフタレン-d<sub>8</sub>とフェナントレン-d<sub>10</sub>の原液は1,000mg/Lヘキサン溶液を各々調製し、4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>8</sub>は林純薬製の1,000mg/Lヘキサン溶液を使用した。検量線用の混合標準液は、各標準原液および内標準原液をジクロロメタンで、添加回収実験用の標準液はアセトンで希釈調製した。

固相抽出カートリッジは表1に示した4種類のカートリッジを使用した。

#### 2. 装置及びGC/MSの測定条件

固相抽出カートリッジへの通水は、ウォーターズ製Sep-Pakコンセンレータを使用し、加圧送液により水中のフェノール類を固相に吸着させた。

GC/MS装置はヒューレットパッカード製HP5890-5972MSD型を使用し、測定条件は以下の通りである。

カラム：J&W社製DB-5 ms

(内径0.25mm 長さ25m 膜厚0.25 μm)

キャリアガス：ヘリウム 定流量で1 mL/min

カラム温度：50°C(4 min)→8°C/min→280°C(5 min)

注入口温度：250°C

インターフェース温度：280°C

イオン化電圧：70V

試料注入条件：試料2 μLをスプリットレスで1分間

#### 3. 試験操作

1mol/Lの塩酸でpHを3.5~4に調整した試料水1Lを、あらかじめジクロロメタン、メタノールおよび水で洗浄・コンディショニングした固相抽出カートリッジに、通水速度10mL/minで通水する。通水終了後カートリッジを2~3分間吸引脱水し、容量5 mLの試験管を受器としてジクロロメタン5 mLで溶出する。足部にガラスウールを詰め、その上に無水硫酸ナトリウム3gをのせた小ロートを用意し、これに溶出ジクロロメタン溶液を通過させ脱水する。ジクロロメタン溶液を30°Cに加温しながら窒素気流下で濃縮し、これに内標準物質0.1 μgを添加後、ジクロロメタンで1 mLにメスアップする。

調製した試料2 μLをGC/MSに注入し選択イオン検出法(SIM)で測定し、内標準添加法で濃度を算出する。フェノール類16物質と内標準3物質のSIM測定条件を表2に、ノニルフェノールのSIM測定条件を表3に示す。

表1 検討に用いた固相抽出カートリッジ

カートリッジ名	Sep-pak PS-2 Plus	Oasis HLB Plus	Oasis HLB glass	C18 Bond Elut Glass
吸着剤	スチレン・ビニルベンゼン共重合体	共重合体	共重合体	C18(オクチルシラン)
吸着剤の充填量	265mg/カートリッジ	225mg LP/カートリッジ	200mg/カートリッジ	500mg/カートリッジ
型	Plus型	Plus型	バック型	バック型
リザーバ材質、容量	プラスチック	プラスチック	ガラス、5cc	ガラス、6cc
メーカー名	ウォーターズ製	ウォーターズ製	ウォーターズ製	バリアン製

千葉県衛生研究所

(2000年11月10日受理)

表2 フェノール類のSIM測定条件

No.	検討対象化合物名	R. time (min)	定量イオン	確認イオン
1	Phenol	8.62	94	66
2	4-Ethylphenol	12.71	107	122
3	Int. Naphthalene-d8	13.15	136	-
4	2-t-Butylphenol	14.72	135	107
5	2-sec-Butylphenol	14.81	121	150
6	3-t-Butylphenol	15.10	135	107
7	◎ 4-t-Butylphenol	15.10	135	107
8	4-sec-Butylphenol	15.46	121	150
9	◎ 4-n-Pentylphenol	17.92	107	164
10	2-Phenylphenol	18.87	170	141
11	◎ 4-n-Hexylphenol	19.51	107	178
12	◎ 4-t-Octylphenol	20.15	135	107
13	◎ 4-n-Heptylphenol	21.02	107	192
14	3-Phenylphenol	21.63	170	141
15	4-Phenylphenol	21.75	170	141
16	◎ Nonylphenol (Mix)	21.42-22.31	*	*
17	Int. 4-(1-Methyl)-Octylphenol	22.14	126	-
18	◎ 4-n-Octylphenol	22.46	107	206
19	Int. Phenanthrene-d10	22.72	188	-
20	4-n-Nonylphenol	23.83	107	220

◎ : 環境庁暫定マニフル対象物質  
 Int. : 内標準物質  
 \* : 表3参照

表3 ノニルフェノールのSIM測定条件

No.	検討対象化合物名	R. time (min)	定量イオン	確認イオン
16-1	Nonylphenol (1)	21.41	121	107
16-2	Nonylphenol (2)	21.56	135	107
16-3	Nonylphenol (3)	21.67	121	149
16-4	Nonylphenol (4)	21.73	121	149
16-5	Nonylphenol (5)	21.79	135	107
16-6	Nonylphenol (6)	21.94	135	107
16-7	Nonylphenol (7)	22.07	149	121
16-8	Nonylphenol (8)	22.21	135	107
16-9	Nonylphenol (9)	22.31	149	107

### III 結果および考察

#### 1. 5%フェニール-95%メチルシリコンカラムによる分離

図1にDB-5msカラムによるフェノール類標準溶液のGC/MS-SIMのクロマトグラムを示した。3-t-ブチルフェノールと4-t-ブチルフェノールが不分離であったが、N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamideで誘導体化することにより両化合物を分離する

ことができた。両化合物が検出された場合は、誘導体化により確認、定量する必要がある。

図2にノニルフェノールのGC/MS-SIMのイオンクロマトグラム ( $m/z=135, 107, 121, 149$ ) を示した。ノニルフェノールをGC/MS-フルスキャンで測定すると13本のピークが検出されるが、各モニターイオンによるクロマトグラムのピークパターンは、図2のように一致していない。不分離ピークを避けて9本のピークをSIMの定量ピークとして選択し、表3の条件で定量を行った。

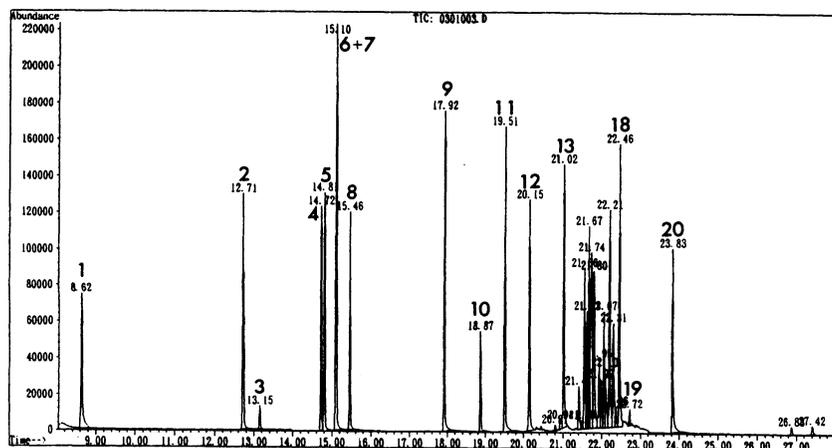


図1 GC/MS-SIMによる標準溶液のクロマトグラム  
 (ノニルフェノール: 10mg/L, 他のフェノール類: 1mg/L, 内標準物質: 0.1mg/L)

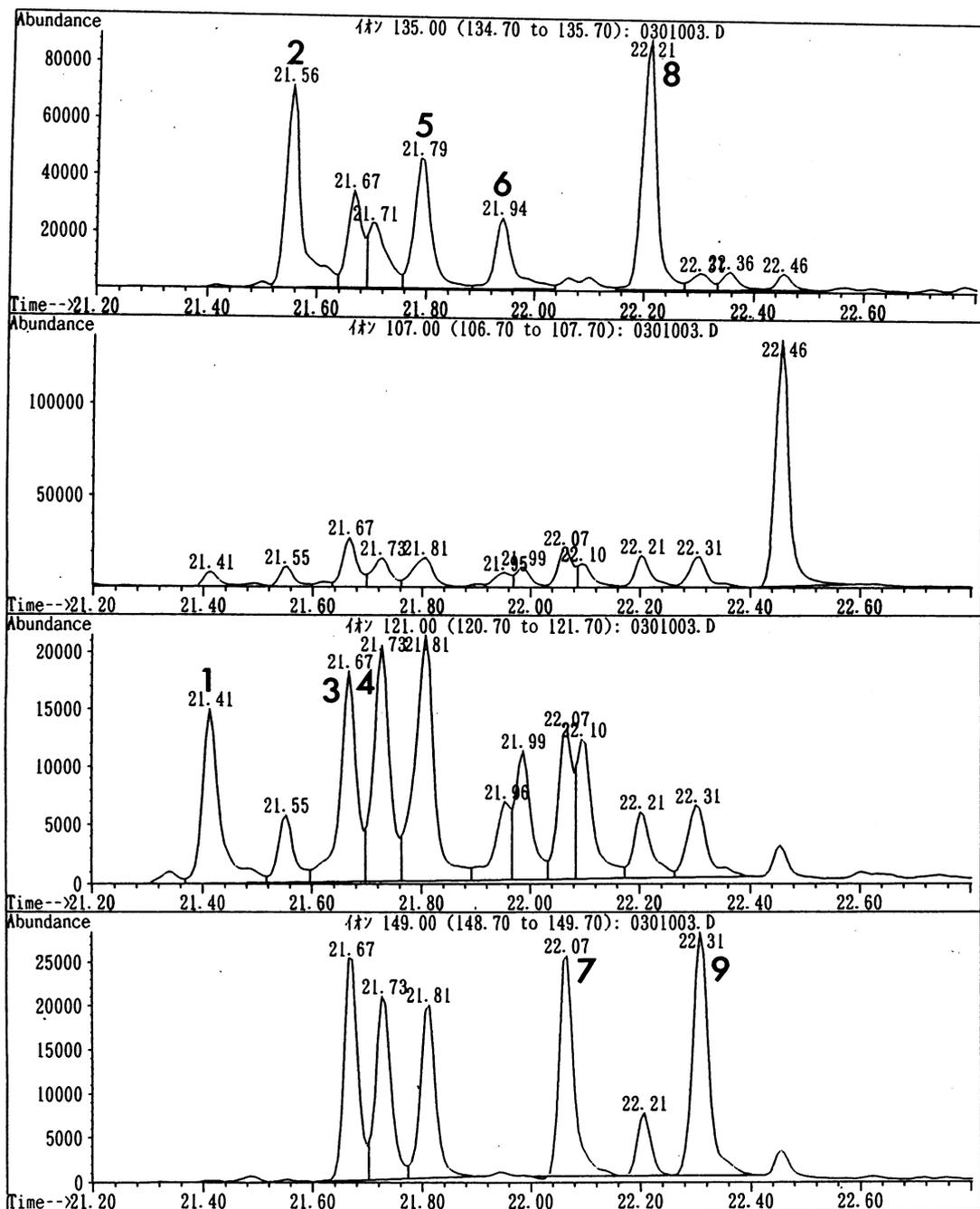


図2 ノニルフェノール標準溶液のイオンクロマトグラム  
(ノニルフェノール：10mg/L)

## 2. 空試験値の低減化

環境庁の内分泌攪乱化学物質測定のための暫定マニュアル<sup>1)</sup>では、目標とする水試料の定量下限値をアルキルフェノール類0.01  $\mu\text{g/L}$ 、ノニルフェノール0.1  $\mu\text{g/L}$ としている。4種類のカートリッジいずれを用いても、空試験溶液からノニルフェノールが検出された。Sep-Pak PS-2 PlusおよびOasis HLB Plusを用いた場合、検出濃度は試料水濃度換算で、0.1  $\mu\text{g/L}$ 程度かそれ以上であった。リザーバの材質がガラス製であるOasis HLB glassおよびC<sub>18</sub> Bond Elut Glassを用いた場合、検出濃度は各々0.02  $\mu\text{g/L}$ 、0.03  $\mu\text{g/L}$  (n=2)であった。容器材質の異なるOasis HLBカートリッジの空試験値の比較から、プラスチック製のカートリッジ容器からのノニルフェノールの溶出が大きく寄与していると考えられる。

ノニルフェノール以外にも、プラスチック由来と推測されるフェノール、2-エチルフェノール、(3+4)-ブチルフェノール、4-tert-オクチルフェノール等が試料水濃度換算で数ng/L程度検出された。また、容器がプラスチック製の無水硫酸ナトリウムカートリッジを用いると、数十ng/L程度の2-フェニルフェノールが検出された。

リザーバの材質がガラス製の固相抽出カートリッジを使用し、脱水操作等試験操作全般にわたりプラスチック製品の使用を極力避けることにより、空試験値を低減化出来た。

## 3. ミリQ水、地下水での標準添加回収実験結果

ミリQ水と地下水にフェノール類を1  $\mu\text{g/L}$ 添加し、4種の固相カートリッジを用いて標準添加回収実験を行った結果を表4に示した。フェノールの回収率は、C<sub>18</sub>で1.3%、PS-2で8.1%、HLB

表4 ミリQ水、地下水での添加回収実験結果

固相: 試料: n=	Sep-Pak Plus PS-2 ミリQ水 6			Oasis HLB glass ミリQ水 3			C18 Bond Elut Glass ミリQ水 3		
	化合物No.	測定値 (ng/L)	C. V. (%)	回収率 (%)	測定値 (ng/L)	C. V. (%)	回収率 (%)	測定値 (ng/L)	C. V. (%)
1	80.7	4.94	8.1	485.0	4.29	48.5	13.1	21.64	1.3
2	861.4	2.91	86.1	770.3	1.68	77.0	243.8	8.21	24.4
4	917.1	2.87	91.7	838.9	1.60	83.9	821.3	4.39	82.1
5	846.2	1.71	84.6	862.7	1.67	86.3	829.1	3.84	82.9
6+7	1719.5	1.52	86.0	1714.7	0.93	85.7	1710.9	3.87	85.5
8	866.2	1.72	86.6	836.5	0.55	83.6	866.5	3.73	86.6
9	909.6	3.96	91.0	869.4	1.97	86.9	914.8	5.23	91.5
10	1073.4	3.19	107.3	937.6	1.38	93.8	945.7	5.98	94.6
11	959.8	4.59	96.0	891.7	1.66	89.2	944.8	5.68	94.5
12	999.6	4.38	100.0	909.9	1.01	91.0	931.8	5.48	93.2
13	985.9	6.50	98.6	892.6	1.67	89.3	924.5	6.51	92.4
14	1048.8	5.31	104.9	552.1	7.61	55.2	921.2	6.17	92.1
15	957.9	4.44	95.8	457.6	10.64	45.8	1063.0	6.58	106.3
18	1015.6	6.82	101.6	860.6	1.72	86.1	892.4	8.42	89.2
20	1029.7	9.24	103.0	895.4	2.36	89.5	825.0	3.76	82.5

各フェノール類添加濃度：1,000ng/L

固相: 試料: n=	Sep-Pak Plus PS-2 地下水 6			Oasis HLB Plus ミリQ水 6		
	化合物No.	測定値 (ng/L)	C. V. (%)	回収率 (%)	測定値 (ng/L)	C. V. (%)
16	981.9	8.01	98.2	1023.9	2.97	102.4

16フェノール添加濃度：1,000ng/L

で48.5%といずれのカートリッジでも低かった。C<sub>18</sub>は4-エチルフェノールの回収率も24.4%と低かった。フェノールはLog Pow (オクタノール/水分配係数のLog値)の値が小さく、固相抽出法ではブレイクスルーし易いため、大量の試料の濃縮は困難であることが知られている<sup>2)</sup>。試料1Lの濃縮で、フェノール、4-エチルフェノールの回収率が低いのは、ブレイクスルーによるものと考えられる。

PS-2、C<sub>18</sub>によるその他のフェノール類の回収率は、各々84.6~107.3%と82.1~106.3%、変動係数はいずれも10%未満で良好な結果が得られた。HLBカートリッジは、フェノールの回収率が最も高かったにもかかわらず、3-フェニルフェノールと4-フェニルフェノールの回収率は55.2%、45.8%と低かった。他のフェノール類については、回収率77.0~102.4%、変動係数3%未満で

良好な結果であった。

3-フェニルフェノールと4-フェニルフェノールで回収率が低いのは、HLBへの保持が強いためと考えられたので、ノニルフェノールを除くフェノール類を1 μg/L添加したミリQ水1Lを通水後、9mlのジクロロメタンで溶離を行い、溶離液を4mlずつフラクション1 (Fr.1)、フラクション2 (Fr.2) として分取した。これを測定した結果を図3に示した。Fr.2で10%以上の回収率が得られたのは、フェノール(14.1%)、2-エチルフェノール(13.3%)、4-sec-ブチルフェノール (10.5%)、3-フェニルフェノール (26.9%)、4-フェニルフェノール (27.8%) であった。HLBのフェノール類の保持力は高く、5 mlのジクロロメタン溶離では、溶離が不十分な化合物があることが明らかになった。

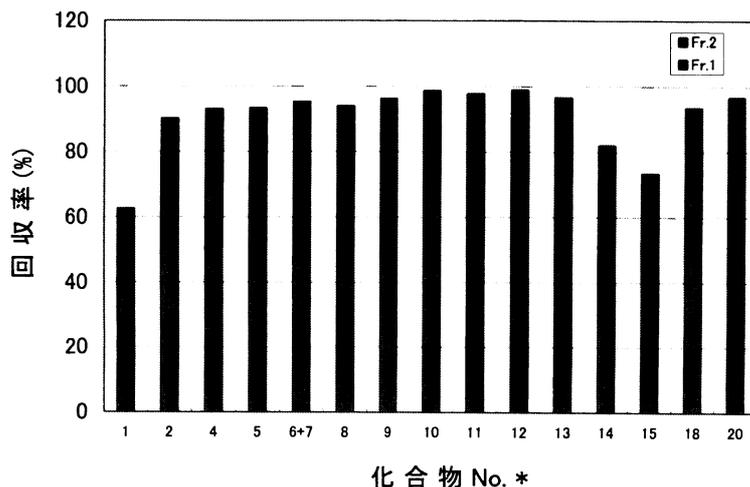


図3 HLBカートリッジからのフェノール類の溶離回収率 (\*化合物No.は表2参照)

4. 異なる検量線法による下水処理場放流水中のノニルフェノールの測定結果

Oasis HLB glassを用いて下水処理場放流水中のノニルフェノールを濃縮し、表3のGC/MS-SIM条件で測定した結果を表5に示した。空試験ではノニルフェノールの9本のSIMピークはいずれも測定可能であったが、試料では9本のピークの内No.16-5, No.16-6, No.16-8の3本のピーク(いずれも定量イオン $m/z=135$ , 確認イオン $m/z=107$ )が測定不能であった。試料と空試験中のノニルフェノール濃度は、6本のピーク面積の合計値より、絶対検量線法、内標準添加法(内標準物質:フェナントレン- $d_{10}$ あるいは4-(1-メチル)オクチルフェノール- $d_5$ )により求めた。表中のノニルフェノールの測定値は空試験補正をしていない。絶対検量線法による試料の測定では変動係数は32.58%と大きく、内標準添加法では変動係数はいずれも良好であったが、用いた内標準物質により平均値に大きな差が認められた。

図4に、空試験(b.1とb.2)と試料(s.1~s.5)中のノニルフェノールのピーク面積をGC/MSの測定順で示した。また、空試験(b.1とb.2)と試料(s.1~s.5)に添加したフェナントレン- $d_{10}$ と4-(1-メチル)オクチルフェノール- $d_5$ のピーク面積の変化も、フェ

ノール標準液(st.2)に添加した各々のピーク面積に対する比として図中に示した。試料中のノニルフェノールと4-(1-メチル)オクチルフェノール- $d_5$ のGC/MS応答値は、試料1から試料3へと測定順に大きく上昇し、空試験測定後の試料4で下降した。一方フェナントレン- $d_{10}$ は、変化の傾向は同様であるが、変化の大きさははるかに小さかった。マトリックス効果の高い試料ではフェノール類の測定感度が上昇するという報告<sup>3)</sup>もあり、内標準物質により平均値に大きな差が認められたのは、フェナントレン- $d_{10}$ ではマトリックスの影響を十分に補正出来なかったためである。定量下限値付近の低い濃度を測定する場合、試料中のマトリックスの影響は大きいと考えられ、内標準物質として測定対象化合物のd体を用いると補正効果が大きいことが明らかになった。

なお、空試験中のノニルフェノール濃度は9本のピーク面積の合計値より、4-(1-メチル)オクチルフェノール- $d_5$ を内標準物質として、求めた値も0.02 $\mu\text{g/L}$ であった。下水処理場放流水の水質分析値は、pH値:6.8, BOD:7.5mg/L, COD:5.3mg/L, SS:1mg/L未満, 蒸発残留物:304mg/L, 塩素イオン:58.2mg/L, 全窒素:13.0mg/L, 全リン1.3mg/Lであった。

表5 異なる検量線法による下水放流水中のノニルフェノールの測定結果

検量線法	内標準物質	空試験値( $\mu\text{g/L}$ )		放流水測定値( $\mu\text{g/L}$ )*					平均値 $\mu\text{g/L}$	標準偏差 $\mu\text{g/L}$	変動係数 %
		1	2	1	2	3	4	5			
絶対検量線法		0.022	0.057	0.131	0.180	0.284	0.162	0.165	0.184	0.058	32.58
内標準添加法	Phenanthrene- $d_{10}$	0.019	0.044	0.128	0.134	0.148	0.127	0.141	0.136	0.009	6.52
内標準添加法	4-(1-methyl)-octylphenol- $d_5$	0.021	0.020	0.041	0.041	0.047	0.042	0.045	0.043	0.003	6.04

\* 放流水の測定値は空試験補正をしていない。

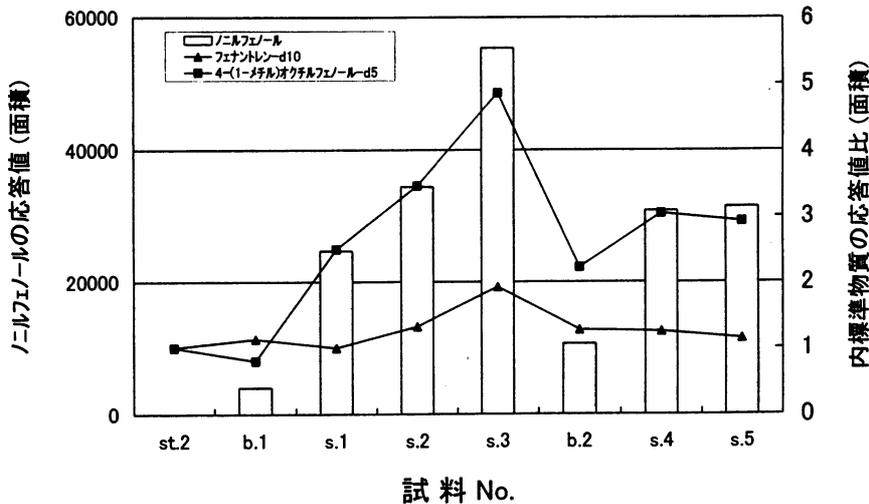


図4 ノニルフェノールと内標準物質のGC/MS-SIM応答値の変動(st.2:標準溶液, b.1とb.2:空試験, s.1~s.5:試料)

5. 下水処理場放流水での標準添加回収実験結果

下水処理場放流水にノニルフェノールを10 $\mu\text{g/L}$ 、他のフェノール類を1 $\mu\text{g/L}$ 添加し、1~2時間室温で静置後、Oasis HLB glassと $C_{18}$  Bond Elut Glassカートリッジを用いて濃縮した。溶離は9mlのジクロロメタンで行い、溶離液を4mlずつフラクション1(Fr.1), フラクション2(Fr.2)として分取した。フェノールと4-エチルフェノールの測定にはナフトレン- $d_8$ を、それ以外の化合物の測定にはフェナントレン- $d_{10}$ を内標準物質として用いて、内標準添加法により測定値を算出した。Fr.1の測定結果を表6に示した。

ミリQ水、地下水での添加回収実験の結果と大きく異なる点は、

HLB,  $C_{18}$ いずれも、ノニルフェノール(46.4%と36.5%), 4-n-オクチルフェノール(66.7%と64.1%), 4-n-ノニルフェノール(52.7%と57.4%)の回収率が低いことである。Fr.2の測定では、HLB濃縮の試料で、3-フェニルフェノールと4-フェニルフェノールの回収率が各々25.8%, 28.4%であった以外はHLB,  $C_{18}$ いずれの回収率も低く、ノニルフェノール、4-n-オクチルフェノール、4-n-ノニルフェノールの回収率は2%以下であった。以上の結果から、固相吸着剤への保持が強すぎるにより、回収率が低下したとは考えづらい。有機物やSSの濃度が高い試料への適用については、さらに検討が必要である。

表6 下水処理場放流水での添加回収実験結果

固相 No.	Oasis HLB glass				C18 Bond Elut Glass			
	測定値 (ng/L)	S. D. (ng/L)	C. V. (%)	回収率 (%)	測定値 (ng/L)	S. D. (ng/L)	C. V. (%)	回収率 (%)
1	498.2	51.9	10.42	49.8	16.7	1.6	9.28	1.7
2	874.5	44.3	5.06	87.5	262.8	6.5	2.47	26.3
4	978.6	56.9	5.81	97.9	961.4	37.6	3.91	96.1
5	1003.8	45.4	4.52	100.4	956.5	42.5	4.44	95.7
6+7	1805.5	89.6	4.96	90.3	1723.1	74.7	4.34	86.2
8	1046.8	58.3	5.57	104.7	996.2	45.1	4.53	99.6
9	972.1	60.5	6.22	97.2	842.7	46.1	5.47	84.3
10	1213.8	27.5	2.26	121.4	1045.8	39.5	3.78	104.6
11	983.2	58.0	5.90	98.3	837.4	48.8	5.82	83.7
12	921.1	52.2	5.67	92.1	790.1	49.8	6.30	79.0
13	898.1	57.8	6.43	89.8	768.2	46.2	6.01	76.8
14	820.5	81.5	9.94	82.0	1112.2	50.7	4.56	111.2
15	639.6	68.5	10.71	64.0	1081.9	46.0	4.25	108.2
16	4636.7	441.5	9.52	46.4	3650.9	289.0	7.92	36.5
18	666.9	44.1	6.62	66.7	641.0	34.2	5.34	64.1
20	526.9	18.3	3.47	52.7	574.3	59.2	10.30	57.4

各フェノール類の添加濃度：1 μg/L (ノニルフェノール：10 μg/L)  
繰り返し測定回数=5

### まとめ

内分泌攪乱化学物質関連のフェノール類17物質を検討対象とし、水中のフェノール類を4種類の固相抽出カートリッジで濃縮し、GC/MS-SIMで定量する簡便な分析方法を検討した。

リザーバの材質がガラス製の固相抽出カートリッジを使用し、脱水操作等試験操作全般にわたりプラスチック製品の使用を極力避けることにより、環境庁の暫定マニュアル<sup>1)</sup>で目標とする定量下限値アルキルフェノール0.01 μg/L、ノニルフェノール0.1 μg/Lを達成できた。GC/MS-SIMによる定量では、内標準添加法による測定値の方が絶対検量線法による値より変動係数が小さく、マトリックスの大きい試料で、定量下限値付近の濃度を測定する場合には、内標準物質として対象物質のd体の選択が有用であった。

ミリQ水あるいは地下水を試料水とした添加回収実験では、4種類の固相抽出カートリッジいずれも環境庁の暫定マニュアル<sup>1)</sup>

対象7物質については良好な回収率であった。下水処理場放流水を試料水とした添加回収実験では、ノニルフェノール、4-n-オクチルフェノール、4-n-ノニルフェノールの回収率が低かった。有機物やSSの濃度が高い試料への適用については、濃縮倍率、SIMクロマトグラム上の妨害ピークの除去等さらに検討が必要である。

### 文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）、1998
- 2) 石井誠治、浦野紘平、亀屋隆志（2000）：多孔質ポリスチレン樹脂カートリッジによる水中微量有機化合物の濃縮条件の一般化、水環境学会誌、Vol.23、85-92.
- 3) 高橋保雄、森田昌敏（1996）：GC/MSによる水中のフェノール類の分析、環境化学、Vol.6、363-373.