

＜報 文＞

環境水中ノニルフェノール分析における固相抽出について*

山内 幸一** ・ 鈴木 敦*** ・ 丹羽 智子** ・ 佐藤 英幸** ・ 武田 裕子**

キーワード ①ノニルフェノール ②マトリックス ③固相抽出 ④公共用水域

要 旨

水生生物の保全に係る水質環境基準項目の一つであるノニルフェノール分析の前処理について、クリーンアップ操作の省略を目的に固相抽出操作でのマトリックスの低減を試みた。固相抽出カートリッジの種類、洗浄液および溶出溶媒を検討した結果、固相抽出カートリッジにPS-2、洗浄液に水-メタノール（1:3）混合溶液、溶出溶媒にヘキサンを用いて前処理することで、マトリックスの低減ができた。河川水の添加回収試験において、ノニルフェノール標準物質の回収率は78～89%、サロゲート物質の回収率は約60%であり付表11の基準を満たしていた。また、この分析法の定量下限値はノニルフェノールの合計として29 ng/Lであった。本分析法により、溶媒使用量と作業時間が大幅に削減でき、環境水中のノニルフェノールのスクリーニング法として有用であると考えられた。

1. はじめに

ノニルフェノール（以下、NPと示す）は、工業用の界面活性剤として使用されるノニルフェノールエトキシレート、印刷インキ、および酸化防止剤の原料等で使用されている物質である¹⁾。当該物質は、「水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件」（平成24年8月環境省告示第127号）により、生活環境を構成する有用な水生生物及びその餌生物並びにそれらの生息または生育環境の保全を目的として設定された水生生物の保全に係る水質環境基準の項目に追加された²⁾。

分析法は、昭和46年12月28日付け環境庁告示第59号付表11（以下、付表11と示す）により、固相抽出によるガスクロマトグラフィー質量分析法が規定されている³⁾。この方法は、固相抽出操作と、マトリックス除去のためのシリカゲルカラムによるクリーンアップ操作を前処理として実施するため、大量のジクロロメタンおよびヘキサンを使用し、かつ多くの時間を必要とする。特に、ジクロロメタンは発がん性が高く、「労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令」（平成26年8月政令第288号）により特定化学物質障害予防規則の第二類物質の対象となっている⁴⁾。作業者の健康を守る観点からも、可能な限り使用量および作業時間を削減することが望ましい。

NPの分析法はこれまでも様々な検討がなされてお

り、分析法の簡略化については、固相抽出カートリッジの後段にシリカゲルカートリッジを連結して前処理をすることで、ジクロロメタンを使用せずに分析可能であるという報告⁵⁾や、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS/MS）を用いた測定により、前処理をすることなく分析可能であるという報告⁶⁾がある。当センターでは、溶媒使用量と作業時間の削減を目的に市販のシリカゲルカートリッジを用いる方法を検討し、付表11と比較して溶媒使用量を約1/10に、クリーンアップ操作の作業時間を約1/8に削減して分析できると報告した⁷⁾。しかし、固相抽出操作のみでマトリックスの低減が可能となれば、クリーンアップ操作そのものが省略できるため、溶媒使用量と作業時間がさらに削減可能となる。

本報では、クリーンアップ操作の省略を目的に、固相抽出カートリッジの種類、洗浄液および溶出溶媒を検討し、固相抽出操作でマトリックスの低減を試みたので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬および装置

NP標準物質は4-NP（混合物）（関東化学製）をアセトンで溶解し必要に応じて希釈して使用した。サロゲート

* Solid-phase extraction for analysis of nonylphenol in environmental water

** Koichi YAMAUCHI, Tomoko NIWA, Hideyuki SATO, Yuko TAKEDA（愛知県環境調査センター）Aichi Environmental Research Center

*** Atsushi SUZUKI（愛知県尾張県民事務所）Owari Citizens Affairs Office, Aichi Prefectural Government

物質は4-(3,6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール¹³C₆標準液 (10 µg/mL) (富士フィルム和光純薬製) をアセトンで希釈して使用した。内部標準物質は4-n-NP-d₄ (富士フィルム和光純薬製) をジクロロメタンで溶解し希釈して使用した。

精製水は超純水製造装置 (Merck Millipore製 Milli-Q Integral 5 機器分析タイプ) で精製した超純水を使用した。アセトン, ヘキサンおよびジクロロメタンは残留農薬・PCB試験用 (富士フィルム和光純薬製) を, メタノールはLC/MS用 (富士フィルム和光純薬製) を使用した。塩酸は有害金属測定用 (富士フィルム和光純薬製) を, 精製水で1 mol/Lに希釈して使用した。

固相抽出カートリッジは, 表1に示す6種類のものを使用した。試料の通水と固相抽出カートリッジの乾燥は全自動固相抽出装置 (ジーエルサイエンス製 Aqua Trace ASPE899) を用いて行った。クリーンアップ用のシリカゲルはカラムクロマトグラフ用シリカゲル (シグマアルドリッジ製 60-100 mesh) を, 400°Cで4時間, 130°Cで15時間熱処理後, 含水率5%に調製して使用した。

試料の測定はガスクロマトグラフ質量分析計 (島津製作所製 GCMS-TQ8040NX) を用いて表2の条件で行った。モニタリングする質量数は付表11と同一のものとした。NPの装置検出下限値 (IDL) を表3に示す。各異性体の試料換算値として0.12~0.42 ng/L, NPの合計として3.2 ng/Lであり, 公共用水域水質調査の報告下限値 (60 ng/L) より十分低値であることを確認した。NPの異性体組成比は, FID検出器を搭載したガスクロマトグラフ質量分析計 (アジレントテクノロジー製 7890B/5977A GC/MSD) を用いて算出した。

2.2 固相抽出条件の検討

塩酸 (1 mol/L) でpH3.5に調整した精製水50 mLにNP標準物質200 ngを添加した溶液を, ジクロロメタン10 mL, メタノール10 mL, 精製水10 mLでコンディショニングをした固相抽出カートリッジに10 mL/minで通水した。洗浄液で固相抽出カートリッジを洗浄し, 窒素吹付と吸引で40分乾燥して, 溶出溶媒で溶出した。得られた溶出液にサロゲート物質50 ngを添加し, 窒素吹付で0.5 mLに濃縮してGC/MSで測定した。なお, 検討内容に応じて, 洗浄液は水または水-メタノール混合溶液, 溶出溶媒はヘキサン, ジクロロメタン, もしくはジクロロメタン-ヘキサン混合溶媒を用いた。

2.3 添加回収試験

塩酸 (1 mol/L) でpH3.5に調整した試料500 mLにNP標準物質200 ngおよびサロゲート物質50 ngを添加した溶

表1 検討に使用した固相抽出カートリッジ

固相抽出カートリッジ	充填剤	充填量 (mg)
Waters Sep-Pak PS-2 Plus Short Cartridge	スチレンジビニルベンゼン共重合体	265
ジーエルサイエンス InertSep Slim-J PLS-3	N含有メタクリレート スチレンジビニルベンゼン共重合体	230
ジーエルサイエンス InertSep Slim C18-C	シリカゲル-オクタデシル基	360
ジーエルサイエンス InertSep Slim-J PH	シリカゲル-フェニル基	500
ジーエルサイエンス InertSep Slim-J AC	活性炭	400
ジーエルサイエンス InertSep Slim GC	グラファイトカーボン	400

表2 GC/MS測定条件

GC/MS : SHIMADZU TQ8040 NX	
カラム	InertCap 5MS ProGuard 2m (30(+2) m×0.25 mm×0.25 µm)
昇温条件	50°C (1 min) → 8°C/min → 280°C (3 min)
キャリアガス	He 線速度一定モード 40 cm/s
注入口温度	250°C
試料注入量	2 µL
試料導入法	スプリットレス
インターフェイス温度	280°C
測定モード	EI SIMモード
イオン源温度	230°C
検出器電圧	0.35 kV
イオン化電圧	70 eV

表3 装置検出下限値 (IDL)

	IDL (pg)	最終液量 (mL)	装置注入量 (µL)	試料量 (L)	IDL試料換算値 (ng/L)
NP1	0.33	0.5	2	0.5	0.17
NP2	0.23	0.5	2	0.5	0.12
NP3	0.63	0.5	2	0.5	0.32
NP4	0.72	0.5	2	0.5	0.36
NP5	0.25	0.5	2	0.5	0.13
NP6	0.84	0.5	2	0.5	0.42
NP7	0.37	0.5	2	0.5	0.19
NP8	0.67	0.5	2	0.5	0.34
NP9	0.61	0.5	2	0.5	0.31
NP10	0.59	0.5	2	0.5	0.30
NP11	0.30	0.5	2	0.5	0.15
NP12	0.62	0.5	2	0.5	0.31
NP13	0.29	0.5	2	0.5	0.15
合計					3.2

液を, ジクロロメタン10 mL, メタノール10 mL, 精製水10 mLでコンディショニングをした固相抽出カートリッジに10 mL/minで通水した。洗浄液で固相抽出カートリッジを洗浄し, 窒素吹付と吸引で40分乾燥して, 溶出溶媒で溶出した。得られた溶出液に内部標準物質50 ngを添加し, 窒素吹付で0.5 mLに濃縮してGC/MSで測定した。なお, 洗浄液は水または水-メタノール混合溶液, 溶出溶媒はヘキサンまたはジクロロメタン-ヘキサン混合溶媒を用いた。定量はNP標準物質とサロゲート物質の濃度比とピーク面積比の関係から作成した検量線を用い

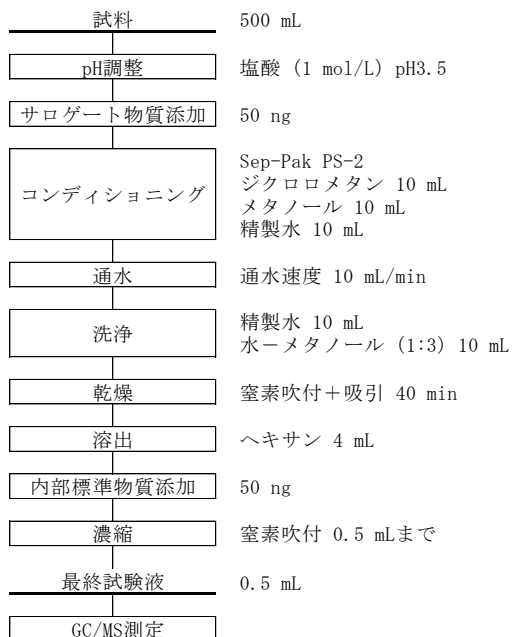


図1 分析フロー

て計算した。本検討により最終的に決定した方法の分析フローを図1に示す。

本報で適用した付表11の方法については、固相抽出カートリッジにPS-2を使用した。付表11ではアセトン4 mLを溶出溶媒としているが、ジクロロメタン6 mLで付表11と同等の結果が得られるとの報告がある⁸⁾ ため本検討ではジクロロメタン6 mLとした。また、シリカゲルカラムによるクリーンアップ操作は、内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に5%含水シリカゲル8 gを充填し、ジクロロメタン-ヘキサン混合溶媒 (3+2) 75 mLで溶出した。

3. 結果および考察

3.1 固相抽出カートリッジの検討

水試料に含まれるNPの保持および固相抽出カートリッジからの溶出状況を把握するため、表1に示した6種類の固相抽出カートリッジを用いて溶出挙動を調べた。

洗浄液は精製水10 mL、溶出溶媒はヘキサンまたはジクロロメタンとして、溶出液は1 mLずつ6 mLまで分画した。結果を図2に示す。

ヘキサン溶出について、PS-2では4 mLの流出でNPが82%溶出したが、他の固相抽出カートリッジでは6 mL流出してもほとんど溶出しなかった。ジクロロメタン溶出について、PS-2、PLS-3、C18-C、PHでは4 mLの流出でNPが75~84%溶出したが、ACとGCでは6 mLの流出で30%程度しか溶出しなかった。そのため、以降では溶出が確認できたPS-2、PLS-3、C18-CおよびPHの4種類で検討を進めた。

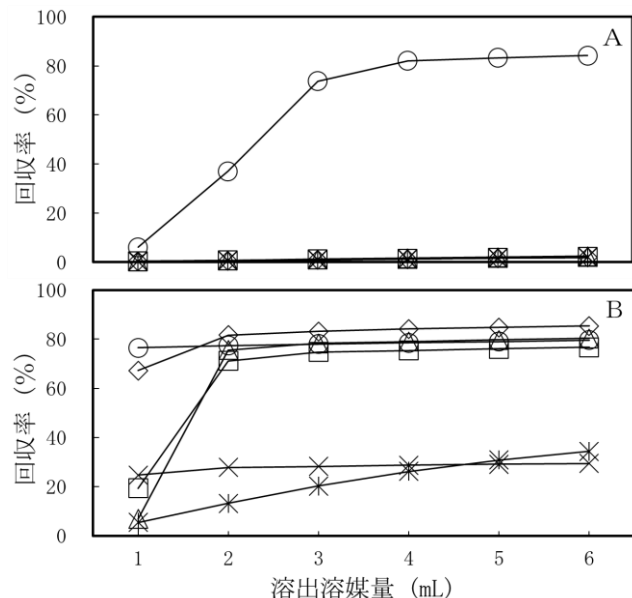


図2 NPの溶出プロファイル

A) ヘキサン B) ジクロロメタン
○)PS-2 △)PLS-3 □)C18-C
◇)PH *)AC ×)GC

3.2 洗浄液および溶出溶媒の検討

固相抽出操作のみでマトリックスの低減をするためには、通水時に保持されたマトリックスを洗浄液で可能な限り除去したのちに目的物質を溶出させる方法と、保持されたマトリックスを固相抽出カートリッジに保持させたまま目的物質のみを溶出させる方法が考えられる。

洗浄液について、付表11では水としているが、親水性が高く水より極性の低い水-メタノール混合溶液を用いることで、水のための洗浄と比較して固相抽出カートリッジに残留するマトリックスを効果的に除去できると思われる。除去効率はメタノール比率が高いほど良いと考えられるが、その一方でNPの回収率が低下する可能性もある。そこで、水-メタノールの比率に対するNPの回収率を調べた。

洗浄液は精製水10 mLおよび水-メタノール混合溶液10 mL、溶出溶媒はPS-2ではヘキサン4 mL、PLS-3、C18-CおよびPHではジクロロメタン4 mLとした。結果を表4に示す。

水-メタノールの混合比は、9:1、3:1、1:1、2:3、1:3の5種類で検討した。PS-2はいずれの条件でも良好な回収率を得られたが、PLS-3とC18-Cでは1:3、PHでは2:3で回収率が低下した。メタノールを洗浄液に用いた場合の回収率も確認したところ、いずれの固相抽出カートリッジでもほとんど回収できなかった。これらのことから、メタノール比率が高く回収率も良好な洗浄液の混合比として、PS-2は1:3、PLS-3とC18-Cは2:3、PHは1:1を選定した。

表4 洗浄液とNP標準物質回収率（％）

固相抽出 カートリッジ	水：メタノール混合比					メタノール
	9:1	3:1	1:1	2:3	1:3	
Sep-Pak PS-2	89	89	85	90	90	<1
InertSep PLS-3	78	81	85	93	26	<1
InertSep C18-C	89	85	88	96	1	<1
InertSep PH	87	85	88	72	4	<1

溶出溶媒については、固相抽出カートリッジに保持されたマトリックスとNPを分離して溶出させるため、比較的極性のあるジクロロメタンと無極性溶媒であるヘキサンの混合溶媒で溶出挙動を調べた。

洗浄液は精製水10 mL、溶出溶媒はジクロロメタン－ヘキサン混合溶媒として、溶出液は1 mLずつ6 mLまで分画した。結果を図3に示す。なお、PS-2は図2よりヘキサンのみで溶出することが確認できたため、この検討から除外した。

ジクロロメタン－ヘキサンの混合比は、1:9、1:3、1:1の3種類で検討した。PHはいずれの条件でもNPが75%程度溶出したが、1:9では十分に溶出するまでの流出液量が多く、1:1では溶出が速すぎるため、最適なジクロロメタン－ヘキサンの混合比は1:3と考えられた。PLS-3とC18-Cは混合比が1:1のときでのみ溶出し、4 mLの流出でPLS-3では94%、C18-Cでは86%のNPが溶出した。

これらのことから、溶出溶媒のジクロロメタン－ヘキサンの混合比は、PLS-3とC18-Cでは1:1、PHでは1:3とし、溶出液量は4 mLとした。また、これら3種類の固相抽出カートリッジは、6 mLのヘキサンでNPの溶出がないことが図2より確認できたため、無極性のマトリックスを除去する目的で、固相抽出カートリッジの乾燥後ヘキサンでの洗浄操作を追加することにした。溶出溶媒量は十分な洗浄効果を得るため、あらかじめヘキサン10 mLで固相抽出カートリッジからNPの溶出がないことを確認し、10 mLに決定した。

3.3 精製水を用いた添加回収試験

3.1と3.2の結果から選定した洗浄液および溶出溶媒を用いて精製水への添加回収試験を行った。

洗浄液は精製水10 mLおよび水－メタノール混合溶液10 mL、溶出溶媒はヘキサン4 mLまたはジクロロメタン－ヘキサン混合溶媒4 mLとした。固相抽出カートリッジごとの洗浄液および溶出溶媒の条件と結果を表5に示す。なお、PLS-3、C18-CおよびPHは固相抽出カートリッジを乾燥後、ヘキサン10 mLで洗浄した。

PLS-3、C18-CおよびPHは、NP標準物質の回収率は86～97%であったが、サロゲート物質の回収率は61～69%であった。一方で、PS-2はNP標準物質の回収率が82%、サ

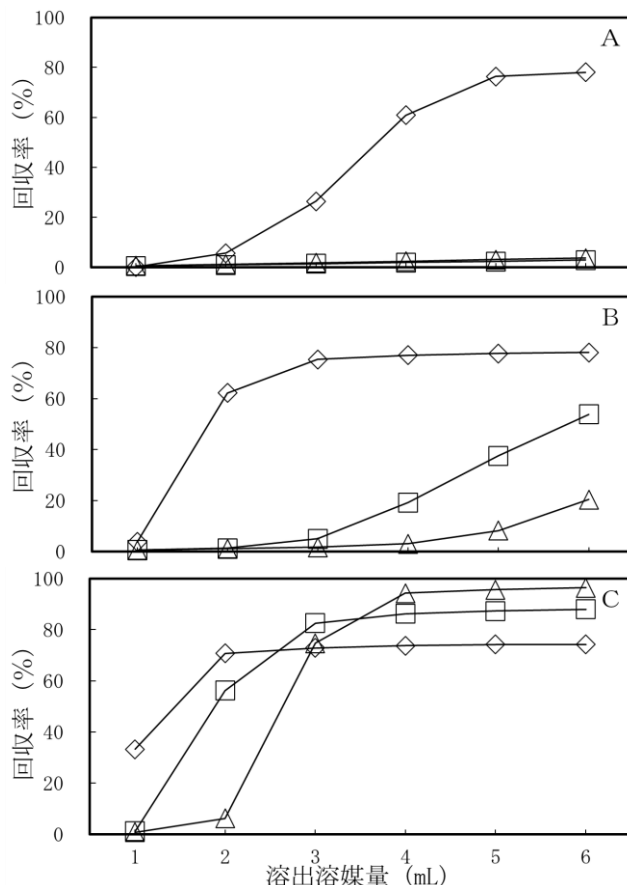


図3 ジクロロメタン－ヘキサン混合溶媒によるNPの溶出プロファイル

A) 1:9* B) 1:3* C) 1:1* △) PLS-3 □) C18-C ◇) PH
*ジクロロメタン：ヘキサンを示す

表5 精製水添加回収試験結果

固相抽出 カートリッジ	洗浄液 混合比*	溶出溶媒 混合比**	NP標準物質 回収率（％）***	サロゲート物質 回収率（％）
Sep-Pak PS-2	1:3	0:1	82	105
InertSep PLS-3	2:3	1:1	86	61
InertSep C18-C	2:3	1:1	93	69
InertSep PH	1:1	1:3	97	67

*水：メタノール **ジクロロメタン：ヘキサン

***NP標準物質回収率は、サロゲート物質で補正された回収率である。

ロゲート物質の回収率が105%と良好な結果が得られた。このことから、最終的に固相抽出カートリッジはPS-2を用いることとした。

3.4 河川水を用いた添加回収試験

愛知県内にある河川から3地点を選定し、その河川水500 mLにNP標準物質200 ngを添加し、図1の分析フローに基づいて添加回収試験を行った。結果を表6に示す。

NP標準物質の回収率は78～89%、サロゲート物質の回収率は約60%であり、付表11のサロゲート物質の回収率の基準を満たしていた。この分析法における検出下限値（MDL）および定量下限値（MQL）を表7に示す。各異性体の試料換算値として、MQLは1.1～4.8 ng/L、NPの合計

表6 河川水添加回収試験結果

河川 類型	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定濃度* (μg/L)	NP標準物質 回収率 (%) **	サロゲート物質 回収率 (%)
A 生物B	500	200	0.3568	89	58
B 生物B	500	200	0.3571	89	59
D 生物B	500	200	0.3103	78	59

*測定濃度は、添加前の河川水に含まれるNP濃度を差し引いた値である。

**NP標準物質回収率は、サロゲート物質で補正された回収率である。

表7 本法における検出下限値（MDL）および定量下限値（MQL）

	MDL (pg)	最終液量 (mL)	装置注入量 (μL)	試料量 (L)	MDL試料換算値 (ng/L)	MQL試料換算値 (ng/L)
NP1	0.79	0.5	2	0.5	0.39	1.1
NP2	0.78	0.5	2	0.5	0.39	1.1
NP3	1.9	0.5	2	0.5	0.93	2.5
NP4	0.81	0.5	2	0.5	0.40	1.1
NP5	1.1	0.5	2	0.5	0.56	1.5
NP6	1.3	0.5	2	0.5	0.64	1.7
NP7	2.3	0.5	2	0.5	1.2	3.1
NP8	1.3	0.5	2	0.5	0.65	1.8
NP9	2.9	0.5	2	0.5	1.5	3.9
NP10	1.2	0.5	2	0.5	0.61	1.7
NP11	1.7	0.5	2	0.5	0.84	2.2
NP12	3.6	0.5	2	0.5	1.8	4.8
NP13	2.0	0.5	2	0.5	0.98	2.6
合計					11	29

として29 ng/Lであり、公共用水域の報告下限値を満たしていた。

3.5 マトリックスの除去

マトリックスがどの程度除去されたか確認するため、本報で検討した方法（以下、本法と示す）と、付表11の方法を河川水に適用してGC/MSで測定した。河川水はNPが未検出のものを扱い、付表11については固相抽出操作のみ実施しクリーンアップ操作は省略した。これらのTICクロマトグラムを図4に示す。なお、この図はスキャン範囲をm/z 45～600に設定し、表2の条件で測定した場合にNPのピークが見られる18.52～20.80 minの範囲のTICクロマトグラムを抽出したものである。

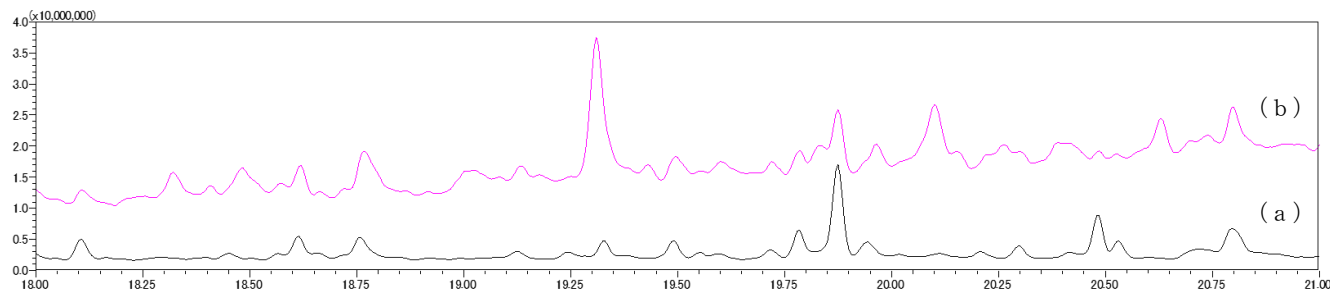


図4 TICクロマトグラムの比較

(a) 本法 (b) 付表11（固相抽出操作のみ）

ピーク検出時間にマトリックスが多量に質量分析部に導入された場合、マトリックスの影響で測定物質のイオン化が促進または阻害されることがあり、定量に大きく影響を及ぼす。本法と付表11を比較すると、本法で示されるピーク数は付表11より少なく、ピーク強度も低下した。また、ベースラインも明らかに付表11と比較して低下した。これらのことから、本法を適用することで、マトリックスを十分除去でき、測定への影響を抑えることができると考えられる。

また、前処理に要する溶媒使用量について表8に示す。なお、この比較における付表11については、シリカゲルカラムによるクリーンアップ操作まで実施したものである。

溶媒使用量は、本法はジクロロメタン10 mL、ヘキサン4 mL、付表11はジクロロメタン71 mL、ヘキサン90 mLであった。本法では付表11と比較して溶媒使用量をおよそ1/10に、ジクロロメタンについてはおよそ1/7に削減できた。本法のジクロロメタンは、固相抽出カートリッジのコンディショニングに使用しているため、コンディショニング条件を検討することにより、ジクロロメタンが不要となると考えられる。

表8 溶媒使用量の比較

	固相抽出操作		クリーンアップ操作	
	ジクロロメタン	ヘキサン	ジクロロメタン	ヘキサン
本法	10 mL	4 mL	—	—
付表11	11 mL	—	60 mL	90 mL

作業時間については、本法は165 min、付表11は330 minであり、本法を適用させることで作業時間を1/2に削減することができた。また、クリーンアップ操作が不要になることで、煩雑な作業や準備が省略できるため、作業者の負担が低減できると考えられる。

4. まとめ

ノニルフェノールの分析について、クリーンアップ操作の省略を目的に固相抽出操作でのマトリックスの低減を

試みた。固相抽出カートリッジの種類、洗浄液および溶出溶媒の詳細な条件を検討した結果、TICクロマトグラムにより固相抽出操作のみでマトリックスの低減が確認できた。この分析法の定量下限値はNPの合計として29 ng/Lであった。

5. 引用文献

- 1) 環境省：リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート 2021年改正対象物質 ノニルフェノール<https://www2.env.go.jp/chemi/prtr/factsheet/factsheet.html> (2024. 11. 8アクセス)
- 2) 環境省：水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について，平成24年8月22日環水大発第120822001号
- 3) 環境省：水質汚濁に係る環境基準について 付表11，昭和46年12月28日環境庁告示第59号
- 4) 厚生労働省：労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令，平成26年8月20日政令第288号
- 5) 長谷川淳，中垣桂一郎，中田憲一：ジクロロメタンを使用しない環境水中ノニルフェノールの簡易前処理法の検討．環境と測定技術，**49** (3)，pp. 35-40，2022
- 6) 松井亮：河川水中のノニルフェノールの分析方法の検討．福井県衛生環境研究センター年報，**13**，pp. 85-86，2014
- 7) 市川智宏，佐藤啓太，吉田恭司，丹羽智子：環境水中ノニルフェノールの測定方法に関する検討．愛知県環境調査センター所報，**43**，pp. 9-16，2015
- 8) 藤川和浩，永島聡子，古閑豊和，松本源生，馬場義輝：ノニルフェノールの分析法の検討．福岡県保健環境研究所年報，**41**，pp. 97-100，2014