

環境中微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

—LC/MSを用いた水質及び底質中アルキルフェノール類の分析法—

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴

水質第二科

【調査研究】

環境中微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

—LC/MSを用いた水質及び底質中アルキルフェノール類の分析法—

An Analytical Method of Alkyl Phenols in Water and Sediment by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS).

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴

水質第二科

Toyohiro Urayama, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka, Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

要 旨

環境試料(水質・底質)中のペンチルフェノール類，ブチルクレゾール類の多成分同時分析法を検討した。分析法は，水質は逆相系固相で抽出しLC/MS-SIMで測定する方法で，底質はメタノールで抽出し，メタノール／ヘキサン分配，グラファイトカーボンカラム及び陰イオン交換カラムによるクリーンアップを行い，LC/MS-SIMで測定する方法とした。

[キーワード：ペンチルフェノール，tert-ブチルクレゾール，アルキルフェノール類，底質，LC/MS]

[Key words：Pentyl Phenols, tert-Butyl Cresols, Alkyl Phenols, Sediment, LC/MS]

1 はじめに

アルキルフェノール類は，界面活性剤，酸化防止剤，紫外線吸収剤，農薬，香料等の原料として使用されており，ノニルフェノールを中心に内分泌攪乱作用が疑われている物質である。

アルキルフェノール類の分析は，従来からGC/MS法で行われてきたが，極性が強いことからGC/MSでは高感度分析が困難であり，エチル化，トリメチルシリル化等の複雑な誘導体化操作を行った後，GC/MSで測定する方法が行われてきた。このため筆者らは，アルキルフェノールを誘導体化操作を省略してLC/MSで直接測定することを試み，水質及び底質について，ペンチルフェノール類2物質及び類似物質であるブチルフェノール類3物質を同時に分離分析する方法を確立したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

メタノール：LC/MS用

ヘキサン，アセトン，ジクロロメタン，トルエン：残留農薬・PCB試験用，5000倍濃縮検定品

塩化ナトリウム，無水硫酸ナトリウム：残留農薬・PCB試験用

精製水：ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

固相カートリッジ：Sep-Pak Plus C18 (Waters社製)

グラファイトカーボンカートリッジカラム：ENVI-Carb C Packing 12mL, 1g (SUPELCO社製)

陰イオン交換カートリッジカラム：BOND ELUT Jr SAX, 500mg (VARIAN社製)

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を下記に示す。

(LC条件)

使用機種：Waters社製 Alliance2695

条件I (水質試料)

カラム：Atlantis dC18 3 μ m 2.1mm ϕ × 150mmL (Waters社製)

移動相：A：水，B：メタノール

0～1min A：B = 50：50

1～25min A：50→30 B：50→70 liner gradient

25～30min A：B = 30：70

30～30.5min A：30→50 B：70→50 liner gradient

30.5～43min A：B = 50：50

条件II (底質試料)

カラム：Atlantis T3 C18 3 μ m 2.1mm ϕ × 150mmL (Waters社製)

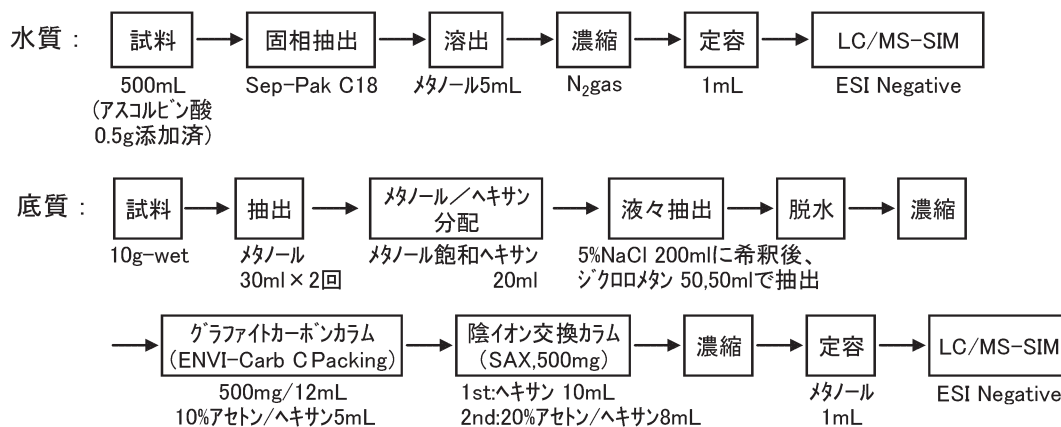


図1 分析フロー図

移動相：A：水，B：メタノール

0～1min A：B = 50：50

1～40min A：50→37 B：50→63 liner gradient

40～40.1min A：37→0 B：63→100 liner gradient

40.1～48min A：B = 0：100

48～48.5min A：0→50 B：100→50 liner gradient

48.5～61min A：B = 50：50

流 量：0.2mL/min

カラム温度：40℃

注 入 量：10 μL

(MS条件)

使用機種：Micromass Quattro micro API

Cone：37V，Capillary：3kV，

SourceTemp：100℃，DesolvationTemp：500℃，

DesolvationGas：600L/hr，ConeGas：50L/hr

イオン化法：ESI Negative

モニターイオン：163(M-H)⁻，164(確認用)

4-n-ペンチルフェノール-d₄ 167(M-H)⁻

2.3 分析方法

図1に示す分析方法について検討した。その詳細は次のとおりである。

〔水質〕

採取時にアスコルビン酸0.5gを添加した試料500mLにサロゲート溶液(2μg/mL，メタノール)を5μL添加し，固相カートリッジSep-Pak Plus C18をそれぞれ10mLのメタノールと20mLの精製水でコンディショニングし，試料を10mL/min.で通水した。通水終了後の固相カートリッジに精製水15mLを通して洗浄した後，窒素ガスを5分間通気して間隙水を除き，メタノール5mLを用いて溶

出した。溶出液は40℃以下で窒素ガスを吹き付けて濃縮した後，メタノール/水(1：1 v/v)で1mLに定容し，試料液とした。

〔底質：メタノール抽出法〕

湿泥試料約10g(乾泥換算試料量として5g相当)を50mL遠心分離管に採取し，サロゲート溶液(2μg/mL，メタノール)を5μL添加し十分に混和した。メタノール30mLを加えた後，密栓して10分間振とうし，10分間超音波抽出を行った後，遠心分離(2,500rpm，10分)を行い，上澄み液を100mL容の分液ロートに移した。残渣にメタノール30mLを加え，振とう・超音波抽出・遠心分離操作をもう一度繰り返し，上澄み液を合わせた。これにメタノール飽和ヘキサン20mLを加えて10分間振とうし，静置した。メタノール層を予め5%塩化ナトリウム水溶液200mLを入れた500mL容分液ロートに移し，ジクロロメタン50mLを加えて振とう抽出を行い，抽出液は200mL容分液ロートに移した。ジクロロメタン50mLによる抽出を再度行い，抽出液は合わせた後，精製水50mLを用いて水洗した。ジクロロメタン層を採取し，20mLのヘキサンを加えた後，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ヘキサンを用いて200mL用のナス型フラスコに移した。抽出液は，ロータリーエバポレータを用いて35℃で蒸発乾固寸前まで濃縮し，更に濃縮液にヘキサン10mLを加え，約1mLまで減圧濃縮し，共存するジクロロメタンを留去した。

予めトルエン5mL，アセトン5mL，ヘキサン10mL(5mL×2)で洗浄したグラファイトカーボンカートリッジカラム(ENVI-Carb C Packing，1g/12mL)にKD濃縮器受器(20mL)をセットした後，試料液をカラムに負荷

し、液面をカラムベッドまで下げてから、ヘキサン4mLで濃縮容器及びカラム壁面を洗い込み、10%アセトン含有ヘキサン5mLで溶出した。溶出液を、ロータリーエバポレータを用いて約1mL以下まで濃縮し、更に窒素吹きつけにより乾固した後、ヘキサン1mLに溶解した。

予め20%アセトン含有ヘキサン10mL及びヘキサン20mLで洗浄した陰イオン交換カートリッジカラム(BOND ELUT Jr SAX, 500mg)に試料液を負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、ヘキサン9mLで濃縮容器及びカラム壁面を洗い込み(この洗浄液は廃棄した)、スピッツ型共栓付試験管をセットした後、20%アセトン含有ヘキサン8mLで溶出した。溶出液を窒素吹きつけにより濃縮乾固し、メタノールを用いて1mLに定容し、測定用試料液とした。

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 測定法の検討

測定法についてはSRM(MS/MS)測定も検討したが、図2に示すとおりSRM測定では4-n-ペンチルフェノールを除き対象物質のプロダクトイオンの強度が弱く高感度分析が不可能であったことから、イオン強度が強くS/N比の良い測定が可能なSIM(シングルMS)測定を採用した(図3)。

なお、SRM測定でもプロダクトイオンにプレカーサイオンと同一質量のイオンを用いる方法は、図4に示すように妨害ピークの影響を排除したり、装置バックグラウンドの低減に有効であった。

3.1.2 HPLCカラムの選定

今回分析対象としたアルキルフェノール類は、測定イオンの装置バックグラウンドが高く、HPLCカラムについてもバックグラウンドが低くシャープなピークが得られるカラムを選択する必要があった。図5に示すとおり、ODS(C18)系カラムのAtlantis dC18及びT3 C18ではシャープなピークが得られ、バックグラウンドも低かったが、C30・C8・Phenylカラムではブロードなピークとなり、ODS系カラムでもXTerraMS及びSunFireではピークと比較してカラムバックが高く、高感度測定は困難であった。

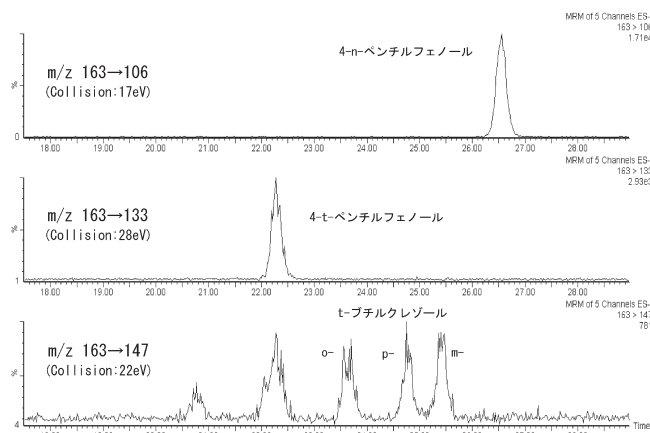


図2 SRM測定のカロマトグラム

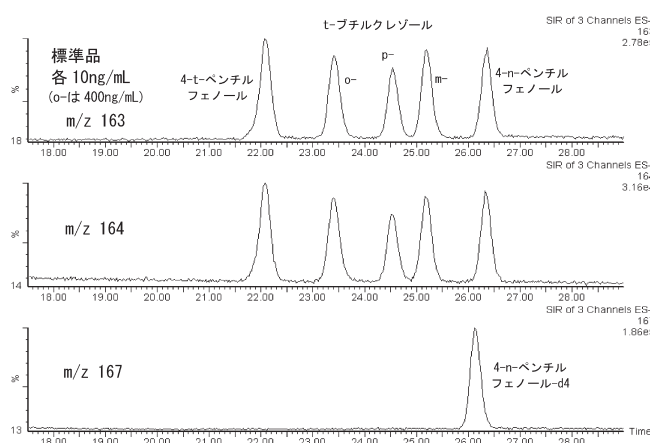


図3 SIM測定のカロマトグラム

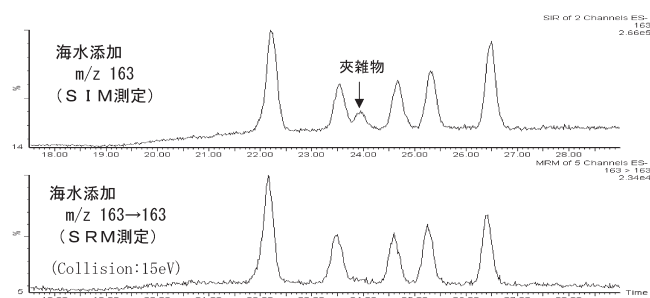


図4 環境試料におけるSIMとSRM測定のカロマトグラム比較(海水に標準品を添加)

3.1.3 移動相条件の検討

対象の5物質は組成式が同一のアルキルフェノール類であり測定イオンが同一であるため、液体クロマトグラムでピークを相互分離する必要があるが、図5に示すODS(C18)系カラムのAtlantis dC18及びT3 C18では、移動相を50%メタノールから70%メタノールまで24分間で緩やかにグラジエントする(LC条件I)ことによりピークを相互分離することができた。

しかし、東京湾底質試料をLC条件Iで分析したところ、図6に示すとおり4-tert-ペンチルフェノールと考えられるピークが確認されたが、カラムをAtlantis T3 C18に変更し、50%メタノールから63%メタノールまでを39分間で更に緩やかにグラジエント(LC条件II)すると、図7に示すとおり4-tert-ペンチルフェノールのピークと夾雑物質のピークに分離され、底質試料ではLC条件IIで分析する必要があることがわかった。

3.1.4 注入量等の検討

対象物質はLCカラムとの相互作用が大きいため、図8に示すとおり注入量を100 μ Lまで増やしてもピーク形状が崩れることはなかったため、感度が必要な時には注入量を増加できることが確認された。

また、測定試料のメタノール濃度については、図9に示すとおりメタノール濃度が上がるにつれピーク幅が広がる傾向が見られたが、ピーク形状が崩れることはなかった。底質試料では、50%メタノールでは溶解できない成分があったので、試料液をメタノール溶液とした。

3.2 水質試料前処理法の検討

8種類の固相カートリッジカラムを用いて添加回収実験を行った。

精製水100mLに標準品各10ng (o-は400ng)添加し通水、メタノール5mLで溶出後、更にアセトニトリル5mLで溶出した。

表1に示すとおりC18が最も回収率が高かったため、C18固相を採用した。

なお、いずれの固相でもメタノール5mLで溶出し、アセトニトリル画分に溶出した物質はなかった。

3.3 底質試料前処理法の検討

底質試料の抽出及び粗クリーンアップについては、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアルに示されたアルキルフェノール類とビスフェノールAの分析法(エチル誘導体化法)¹⁾に準拠して検討を行った。

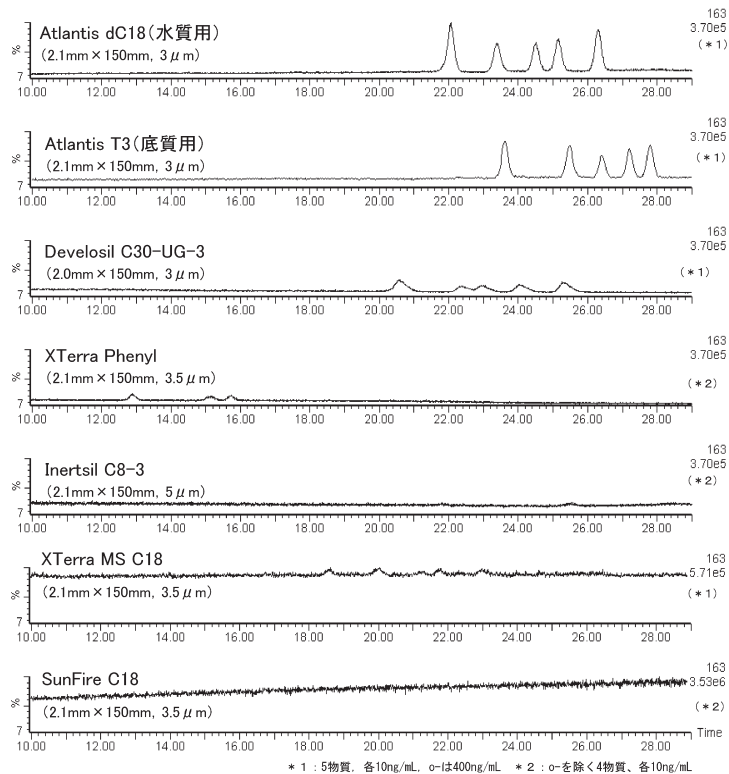


図5 各種HPLCカラムにおける対象物質の分離状況

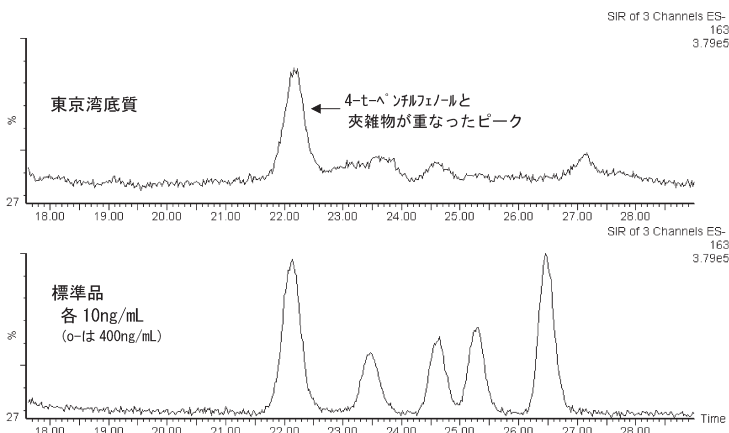


図6 東京湾底質試料のクロマトグラム (LC条件I)

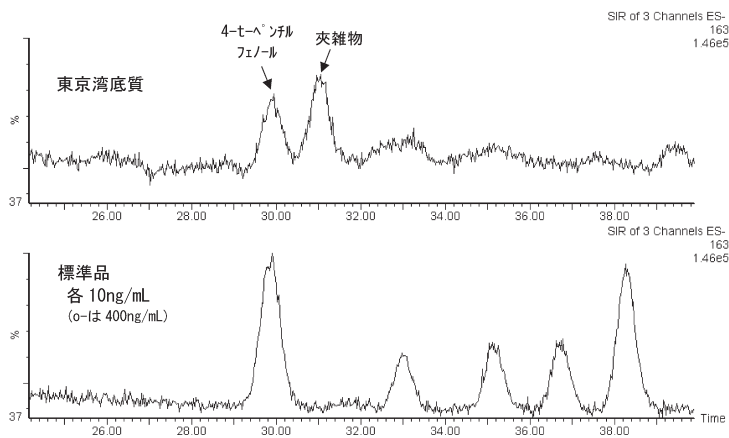


図7 東京湾底質試料のクロマトグラム (LC条件II)

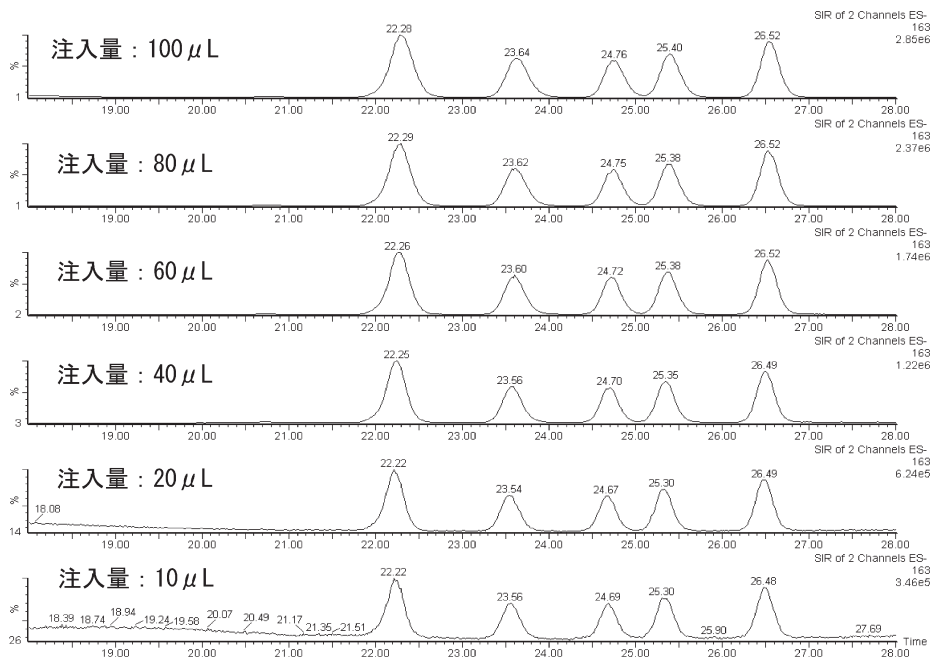


図8 注入量とピーク形状 (50%メタノール/水の測定試料)

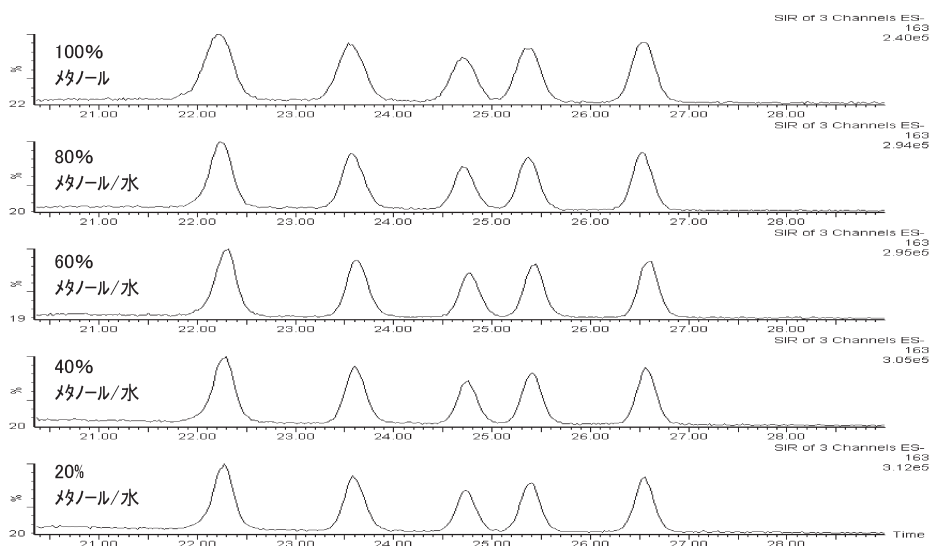


図9 測定試料のメタノール濃度とピーク形状 (注入量 10 μL)

表1 固相カートリッジと回収率

	C8	C18	tC18	AC2	PS2	HLB	PLS3	MAX
6-t-butyl-m-crezol	61	83	64	0	53	60	73	26
6-t-butyl-o-crezol	58	74	57	0	23	32	54	11
2-t-butyl-p-crezol	62	83	63	0	53	61	71	27
4-t-pentylphenol	63	90	67	0	73	74	80	72
4-n-pentylphenol	63	84	65	0	69	74	79	67

(精製水100mL, 標準品各10ng (o-は400ng), メタノール 5mLで溶出)

3.3.1 メタノール/ヘキサン分配及び抽出条件の検討

暫定マニュアルでは、底質中の鉱物油等の除去法としてメタノール/ヘキサン分配を行っているが、表2に示すようにヘキサン層への分配はわずかであり、メタノール

／ヘキサン分配を適用できることが確認できた。

液々抽出法における回収率は、表3に示すようにジクロロメタンの方がヘキサンよりも回収率が高く、底質のメタノール抽出液を5%食塩水に希釈した後ジクロロメ

タンで抽出した場合においても、表4に示すとおり74～97%の回収率で抽出され、暫定マニュアルに示された抽出及び粗クリーンアップ方法に準拠しても十分な回収率が得られることが判明した。

表2 メタノール/ヘキサン分配におけるヘキサン層への分配率

	4-t-ベンチルフェノール	6-t-ブチル-o-クレゾール	2-t-ブチル-p-クレゾール	6-t-ブチル-m-クレゾール	4-n-ベンチルフェノール
ヘキサン層への分配率(%)	1.7	3.2	2.5	1.7	1.7

(メタノール60mL、精製水5mL(試料の含水相当)、メタノール飽和ヘキサン20mLを加え振とう。)

表3 液々抽出における抽出率の比較

	4-t-ベンチルフェノール	6-t-ブチル-o-クレゾール	2-t-ブチル-p-クレゾール	6-t-ブチル-m-クレゾール	4-n-ベンチルフェノール
ジクロロメタン	93	78	86	84	98
ヘキサン	77	70	84	82	89

(精製水100mL、ジクロロメタン又はヘキサン10mL×1回で振とう抽出)

表4 メタノール含有5%塩化ナトリウム水溶液からの抽出率

	4-t-ベンチルフェノール	6-t-ブチル-o-クレゾール	2-t-ブチル-p-クレゾール	6-t-ブチル-m-クレゾール	4-n-ベンチルフェノール
回収率(%)	92	74	79	85	97

(メタノール60mL、5%塩化ナトリウム水溶液200mL、ジクロロメタン50mL×2回で振とう抽出)

3.3.2 イオン交換系カラムクリーンアップの検討

NH₂、PSA、SAX等のイオン交換系カラムについて、溶離液各5mLを用いて溶離パターンを検討した。表5-1～表5-5に示すように、いずれのカラムでもジクロロメタン5mLまたは10%アセトン含有ヘキサン5mLで溶出可能であった。

この中で、BOND ELUT Jr SAX(500mg)は、底質抽出液を負荷した場合でも、第1分画であるヘキサン分画に溶出せず、10%アセトン含有ヘキサンまたはジクロロメタンで目的物質を溶出可能であった。また、カラムから溶出する妨害成分を予め20%アセトンヘキサン10mLで洗浄し、更にヘキサン20mLで洗浄することによりカラムの活性度を回復できる利点があった。溶離液として20%アセトン含有ヘキサン及びジクロロメタンが使用可能であったが、底質抽出液のクリーンアップ効果は20%アセトン含有ヘキサンを使用した場合の方がジクロロメタン溶出よりも着色物質の溶出が少なく、また、底質中の単体硫黄は第1分画(ヘキサン)に溶出した。なお、目的物質はSAXカラムから10%アセトン含有ヘキサンで溶出可能であったが、表6に示すようにカラムのロット

表5-1 BOND ELUT Jr NH₂(500mg)カラムによる溶離分画

物質名	ヘキサン	ジクロロメタン	アセトン	メタノール	合計
4-t-ベンチルフェノール		75	24		100
6-t-ブチル-o-クレゾール		88			88
2-t-ブチル-p-クレゾール		100			100
6-t-ブチル-m-クレゾール		98			98
4-n-ベンチルフェノール		74	26		100

(標準品各10ng(o-は400ng)負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表5-2 BOND ELUT Jr PSA(500mg)カラムによる溶離分画

物質名	ヘキサン	ジクロロメタン	アセトン	メタノール	合計
4-t-ベンチルフェノール		85	16		100
6-t-ブチル-o-クレゾール		87			87
2-t-ブチル-p-クレゾール		97			97
6-t-ブチル-m-クレゾール		93			93
4-n-ベンチルフェノール		81	17		98

(標準品各10ng(o-は400ng)負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表5-3 BOND ELUT Jr SAX(500mg)カラムによる溶離分画

物質名	ヘキサン	ジクロロメタン	アセトン	メタノール	合計
4-t-ベンチルフェノール		88			88
6-t-ブチル-o-クレゾール		82			82
2-t-ブチル-p-クレゾール		87			87
6-t-ブチル-m-クレゾール		87			87
4-n-ベンチルフェノール		98			98

(標準品各10ng(o-は400ng)負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表5-4 SAXカラムによる溶離分画(ジクロロメタン/ヘキサン)

物質名	ヘキサン	10%ジクロロメタン	20%ジクロロメタン	50%ジクロロメタン	100%ジクロロメタン	合計
4-t-ベンチルフェノール				48	47	95
6-t-ブチル-o-クレゾール		69				69
2-t-ブチル-p-クレゾール				83		83
6-t-ブチル-m-クレゾール			10	74		84
4-n-ベンチルフェノール				42	54	96

(標準品各10ng(o-は400ng)負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表5-5 SAXカラムによる溶離分画(アセトン/ヘキサン)

物質名	ヘキサン	10%アセトン	20%アセトン	50%アセトン	100%アセトン	合計
4-t-ベンチルフェノール		92				92
6-t-ブチル-o-クレゾール		71				71
2-t-ブチル-p-クレゾール		87	1			88
6-t-ブチル-m-クレゾール		87	1			88
4-n-ベンチルフェノール		93				93

(標準品各10ng(o-は400ng)負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

により溶出が遅くなる場合があったため、20%アセトン含有ヘキサン8mLを溶離液とした。

3.3.3 グラファイトカーボン系カラムクリーンアップの検討

汚濁の著しい底質試料では、SAXカラム処理のみでは第2分画が着色すること、また、SAXカラムへの負荷量の削減を目的に、グラファイトカーボン系カラムによるクリーンアップを検討した。当初、表7-1に示すENVI-Carb(0.25g)を採用したが、カラムから妨害物質が溶出したため、ENVI-Carb C Packing(1g)を採用し

表6 BOND ELUT Jr SAX (500 mg) の溶離パターン

10%アセトン/ヘキサンでの溶離パターン

	ヘキサン 10mL	10%アセトン /ヘキサン 0-2mL	10%アセトン /ヘキサン 2-4mL	10%アセトン /ヘキサン 4-6mL	10%アセトン /ヘキサン 6-8mL	10%アセトン /ヘキサン 8-10mL	合計
4-tert-ペンチルフェノール					6	24	31
6-tert-ブチル-o-クレゾール		11	45				56
2-tert-ブチル-p-クレゾール			2	54	35		91
6-tert-ブチル-m-クレゾール			2	63	25		90
4-n-ペンチルフェノール					3	28	31

20%アセトン/ヘキサンでの溶離パターン

	ヘキサン 10mL	20%アセトン /ヘキサン 0-2mL	20%アセトン /ヘキサン 2-4mL	20%アセトン /ヘキサン 4-6mL	20%アセトン /ヘキサン 6-8mL	20%アセトン /ヘキサン 8-10mL	合計
4-tert-ペンチルフェノール			57	23	1		82
6-tert-ブチル-o-クレゾール		63					63
2-tert-ブチル-p-クレゾール		32	51				83
6-tert-ブチル-m-クレゾール		37	46				83
4-n-ペンチルフェノール			64	27	3		94

ジクロロメタンでの溶離パターン

	ヘキサン 10mL	ジクロロ メタン 0-2mL	ジクロロ メタン 2-4mL	ジクロロ メタン 4-6mL	ジクロロ メタン 6-8mL	ジクロロ メタン 8-10mL	合計
4-tert-ペンチルフェノール			15	48	20	1	84
6-tert-ブチル-o-クレゾール		72					72
2-tert-ブチル-p-クレゾール			72	3			76
6-tert-ブチル-m-クレゾール			77				77
4-n-ペンチルフェノール			4	61	25	2	91

表7-1 ENVI-Carb (0.25g) カラムによる溶離分画

物質名	ヘキサン	ジクロロメタン	アセトン	ヘンゼン	合計
4-tert-ペンチルフェノール	72	20			91
6-tert-ブチル-o-クレゾール	39	9			48
2-tert-ブチル-p-クレゾール	62	13			76
6-tert-ブチル-m-クレゾール	61	8			70
4-n-ペンチルフェノール		96			96

(標準品各10ng (o-は400ng) 負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表7-2 ENVI-Carb C Packing (1g) カラムによる溶離分画

物質名	ヘキサン	ジクロロメタン	アセトン	ヘンゼン	合計
4-tert-ペンチルフェノール	87	6			93
6-tert-ブチル-o-クレゾール	69	3			72
2-tert-ブチル-p-クレゾール	81	7			87
6-tert-ブチル-m-クレゾール	80	4			83
4-n-ペンチルフェノール		95	3		98

(標準品各10ng (o-は400ng) 負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表7-3 ENVI-Carb C Packing (1g) カラムによる溶離分画 (10%アセトン/ヘキサン)

	10%アセトン/ヘキサン			合計
	0-5mL	5-10mL	10-15mL	
4-tert-ペンチルフェノール	99			99
6-tert-ブチル-o-クレゾール	77			77
2-tert-ブチル-p-クレゾール	98			98
6-tert-ブチル-m-クレゾール	87			87
4-n-ペンチルフェノール	91			91

(標準品各10ng (o-は400ng) 負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

表7-4 ENVI-Carb/NH2カラムによる溶離分画 (アセトン/ヘキサン)

物質名	ヘキサン	10% アセトン	20% アセトン	50% アセトン	100% アセトン	合計
4-tert-ペンチルフェノール		42	36			77
6-tert-ブチル-o-クレゾール		47				47
2-tert-ブチル-p-クレゾール		99				99
6-tert-ブチル-m-クレゾール		98				98
4-n-ペンチルフェノール		8	87			95

(標準品各10ng (o-は400ng) 負荷し、各溶出溶媒5mLずつで順に溶出)

た(表7-2, 表7-3)。なお, ENVI-Carb / NH2(表7-4), ENVI-Carb / PSA 等のカラムについても検討したが, 溶出速度が遅く, 6-tert-ブチル-o-クレゾールの回収率が低いなどの欠点があり, 採用しなかった。

3.4 分解性スクリーニング試験結果

環境水中における分解性を検討するため, 分解性スクリーニング試験を行い, その結果を表8に示した。全ての物質において暗所でも徐々に分解し, 明所ではより分解が進んだ。また, 酸性の方がより安定であったことから, 水質試料の採取時にアスコルビン酸を添加することとし, 保存及び前処理においては, 光の影響をできるだけ避ける必要があった。

表8 分解性スクリーニング試験

物質名	pH	初期濃度 (μg/L)	1時間後の 残存率 (%)		5日後の残存率	
			暗所 (%)	明所 (%)	暗所 (%)	明所 (%)
6-tert-ブチル-m-クレゾール	5	0.1	100	87	—	—
	7	0.1	100	83	66	—
	9	0.1	100	82	—	—
6-tert-ブチル-o-クレゾール	5	0.1	100	86	—	—
	7	0.1	100	85	61	—
	9	0.1	100	81	—	—
2-tert-ブチル-p-クレゾール	5	0.1	100	90	—	—
	7	0.1	100	87	71	—
	9	0.1	100	79	—	—
4-tert-ペンチルフェノール	5	0.1	100	91	—	—
	7	0.1	100	84	81	—
	9	0.1	100	73	—	—
4-n-ペンチルフェノール	5	0.1	100	87	—	—
	7	0.1	100	77	68	—
	9	0.1	100	75	—	—

3.5 添加回収実験

低濃度回収実験の結果を表9に示す。

海水試料への添加回収(表9-1)は, 10ng(o-は400ng)の添加では, 絶対回収率で64~76%とやや低めであったが, 4-n-ペンチルフェノール-d₄をサロゲートに用いた相対回収率で88~105%と100%に近い値に補正された。2ng(o-は80ng)の低濃度添加回収では, 絶対回収率で69~112%, 相対回収率で88~130%と分析誤差が大きくなった。

底質試料への添加回収(表9-2・表9-3)は, 6-tert-ブチル-o-クレゾールが10ng添加で回収率が低い結果とな

表 9-1 添加回収実験結果（海水）

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定 回数	絶対検量線法			サロゲート法		
					検出 濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動 係数 (%)	検出 濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
海水	4-t-pentyl-phenol	500	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		500	2	7	3.1	78	8.3	3.6	90	8.1
		500	10	2	15	76	1	21	105	1
	4-n-pentyl-phenol	500	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		500	2	7	3.5	86	6.8	4.0	100	6.5
		500	10	2	14	71	1	20	98	1
	6-t-butyl-o-crezol	500	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		500	80	7	110	69	14	130	83	12
		500	400	2	580	73	4	810	101	4
	6-t-butyl-m-crezol	500	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		500	2	7	4.5	112	13	5.2	130	9.4
		500	10	2	13	64	2	18	88	2
	2-t-butyl-p-crezol	500	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		500	2	7	4.0	100	11	4.7	118	10
		500	10	2	13	65	4	18	90	4

表 9-2 添加回収実験結果（海底泥・水島沖）

試料名	物質名	試料量 (g-dry)	添加量 (ng)	測定 回数	絶対検量線法			サロゲート法		
					検出 濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動 係数 (%)	検出 濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
海底泥 (水島沖)	4-t-pentyl-phenol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	10	7	1.76	88	5.5	1.83	92	3.5
	4-n-pentyl-phenol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	10	7	1.83	92	4.7	1.91	96	2.2
	6-t-butyl-o-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	400	7	46.1	58	12	48.0	60	8.7
	6-t-butyl-m-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	10	7	1.79	89	6.3	1.86	93	3.6
	2-t-butyl-p-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	10	7	1.93	96	5.0	2.01	101	3.2

表 9-3 添加回収実験結果（海底泥・東京湾）

試料名	物質名	試料量 (g-dry)	添加量 (ng)	測定 回数	絶対検量線法			サロゲート法		
					検出 濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動 係数 (%)	検出 濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
海底泥 (東京湾)	4-t-pentyl-phenol	5	無添加	2	0.76	—	2.2	0.80	—	1.9
		5	20	4	4.45	92	3.8	4.68	97	2.7
	4-n-pentyl-phenol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	20	4	3.61	90	2.2	3.80	95	1.9
	6-t-butyl-o-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	800	4	170	106	8.9	179	112	6.9
	6-t-butyl-m-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	20	4	3.75	94	2.5	3.95	99	2.0
	2-t-butyl-p-crezol	5	無添加	2	ND	—	—	ND	—	—
		5	20	4	3.73	93	1.9	3.92	98	1.8

ったが、そのほかの4物質については、絶対回収率で88～96%，相対回収率で92～101%と100%に近い高い回収率となった。

3.6 検出下限値と環境試料の分析

検出下限値を表10に示したが、6-tert-ブチル-o-クレゾールを除き、水質で5ng/L以下、底質で1ng/g-dry以下の検出下限値が得られ、高感度な測定が可能であった。

表10-1 検出下限値及び定量下限値(水質)

物質	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	検出下限値 (MDL) (ng/L)	定量下限値 (MQL) (ng/L)
4-t-pentyl-phenol	500	1	1.1	2.9
4-n-pentyl-phenol	500	1	1.0	2.6
6-t-butyl-o-crezol	500	1	63	160
6-t-butyl-m-crezol	500	1	1.9	4.9
2-t-butyl-p-crezol	500	1	1.9	4.9

表10-2 検出下限値及び定量下限値(底質)

物質	試料量 (g-dry)	最終液量 (mL)	検出下限値 (MDL) (ng/g-dry)	定量下限値 (MQL) (ng/g-dry)
4-t-pentyl-phenol	5	1	0.28	0.72
4-n-pentyl-phenol	5	1	0.16	0.42
6-t-butyl-o-crezol	5	1	16	40
6-t-butyl-m-crezol	5	1	0.26	0.67
2-t-butyl-p-crezol	5	1	0.25	0.64

3.7 環境試料の分析

水島沖の海水試料及び海底泥試料からは対象物質は検出されなかったが、図7で示したとおり環境省が配布した共通底質(東京湾海底泥)から4-tert-ペンチルフェノールが0.80ng/g-dry検出された。

4 まとめ

ペンチルフェノール類5物質の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はSRM測定での感度が低く、SIM法で測定する必要がある。

- 2) 測定イオンのバックグラウンドが高かったため、バックグラウンドの低いODS系カラム(Atlantis dC18及びT3 C18)を選択する必要がある。
- 3) 5物質は組成式が同一のアルキルフェノール類であり測定イオンが同一であるため、緩やかなグラジエントによりピークを相互分離した。
- 4) 水質試料では逆相系固相SepPak Plus C18が最も回収率が高かった。
- 5) メタノール/ヘキサン分配で、ヘキサン層への分配はわずかであった。
- 6) グラファイトカーボンカラムで、対象物質は10%アセトン/ヘキサン画分に溶出した。
- 7) 陰イオン交換カラムで、対象物質は20%アセトン/ヘキサン画分に溶出した。
- 8) 分解性スクリーニング試験において、暗所でも徐々に分解し酸性の方がより安定であったので、水質試料採取時にアスコルビン酸を添加することとした。
- 9) 環境試料への添加回収試験では、低濃度添加や感度の悪い6-tert-ブチル-o-クレゾールで100%から離れた値となったが、それ以外では4-tert-ペンチルフェノールをサロゲートに用いることでほぼ100%に補正された。
- 10) 環境試料を分析した結果、環境省が配布した共通底質(東京湾海底泥)から4-tert-ペンチルフェノールが0.80ng/g-dry検出された。

なお、本研究は環境省委託の平成18年度化学物質分析法開発調査(環境安全課)²⁾と連携して実施した。

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)、参考法：アルキルフェノール類とビスフェノールAの分析法(エチル誘導体化法)、1998年10月
- 2) 環境省環境保健部環境安全課：平成18年度化学物質分析法開発調査報告書(6-tert-ブチル-m-クレゾール、4-tert-ペンチルフェノール)、掲載予定、2007