

## 4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・ オクタクロロスチレン・ ベンゾ[a]ピレンの分析法の検討

小中ゆかり 中富 光信 馬部 文恵 常政 典貴  
佐伯 彩路 橋本 和久 関川 恵子\*1 尾川 健  
今村 光徳 世良 勝利\*2

内分泌攪乱作用があるとの疑いがもたれている物質のうち、4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・オクタクロロスチレン・ベンゾ[a]ピレンの4物質について、水質と底質試料それぞれについて一括分析法の検討を行い、その結果は以下のとおりである。

- 1 水質については、液液抽出による分析法で、回収率良好であり、4物質一括分析が可能である。検出限界値は0.01~0.02  $\mu\text{g/l}$ であった。
- 2 底質については、室温アルカリ分解法により、4物質一括分析が可能である。実試料において、ベンゾ[a]ピレンはかなり高い濃度で検出されることが予想され、測定濃度が他の3物質とでは、オーダーが異なる。各物質ごとに測定濃度を考慮した検量線の濃度設定および試料液の希釈などの前処理が必要である。

キーワード：内分泌攪乱化学物質，芳香族炭化水素類，室温アルカリ分解

### はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質による健康影響・環境汚染が問題視され、1998年に環境庁より発表された「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SPED98—」<sup>1)</sup>には、生物の内分泌作用を攪乱する化学物質として67物質群がリストアップされた。

当所でも、1998年に作成された「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)<sup>2)</sup>に準じて、各物質をグループ化し、一括分析を検討してきたところである。

スチレン2量体及びスチレン3量体が、平成12年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会において「リスクが低く今後行政施策としての試験は行わないが、研究的・学問的に追求していくこと」<sup>3)</sup>とされたため、今回、スチレン2量体及びスチレン3量体を対象からはずし、4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・オクタクロロスチレン・ベンゾ[a]ピレンの4物質について、一括分析するべく、分析条件などを変更し、水質・底質合わせて検討を行い、その結果をとりまとめたので報告する。

### 方 法

#### 1 対象物質

- ① 4-ニトロトルエン
- ② ベンゾフェノン
- ③ オクタクロロスチレン
- ④ ベンゾ[a]ピレン

各標準物質の100  $\mu\text{g/ml}$ ヘキサン溶液を作成し、標準原液とする。各標準原液を等量混合した標準混合溶液(10  $\mu\text{g/ml}$ )を作成し、多段階希釈し検量線作成用の標準液(0.02~0.2  $\mu\text{g/ml}$ 、ベンゾ[a]ピレンは一部0.2~2  $\mu\text{g/ml}$ )とした。

なお、①は東京化成工業(株)、②は関東化学(株)、③はDr. Ehrenstorfer、④は和光純薬(株)より入手した。

#### 2 サロゲート物質と内部標準物質

<サロゲート物質>

ベンゾフェノン-d10、ベンゾ[a]ピレン-d12

各サロゲート物質の100  $\mu\text{g/ml}$ ヘキサン溶液を作成し、これを等量混合した混合溶液(1  $\mu\text{g/ml}$ )を作成する。これを、検量線作成用の標準溶液に0.1  $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した。また、分析試料に対しては、分析開始時、試料に0.1  $\mu\text{g}$ を添加した。

<内部標準物質>

アントラセン-d10、フルオランテン-d10

\*1 現 環境局環境保全課

\*2 現 安佐南区厚生部

クリセン-d12

各内部標準物質の 100 μg/ml ヘキサン溶液を等量混合し、1 μg/ml の内部標準混合ヘキサン溶液を作成する。これを検量線作成用の標準液及び測定用試料に 0.1 μg/ml になるように添加した。

なおサロゲート物質のベンゾフェノン-d10 は関東化学㈱、ベンゾ[a]ピレン-d12 は㈱CIL、内部標準物質は和光純薬工業㈱より入手した。

3 装置

GC/MS

ガスクロマトグラフは HP5890 II を、質量分析装置は日本電子 Automas50 を使用した。

4 GC/MS の測定条件の検討

各物質の分離及び分析時間が最適となるように昇温条件他 GC/MS の測定条件の検討を行った。

5 水質試料の分析法の検討

平成 11 年度、当所の年報の「4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の分析法の検討」<sup>4)</sup>で報告した分析方法で、オクタクロロスチレン・ベンゾ[a]ピレンを含めた 4 物質の一括分析の適用の可否を検討した。

6 底質試料の分析法の検討

平成 12 年度、当所の年報の「底質中の 4-ニトロトルエン、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン、ベンゾ[a]ピレン、スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の同時分析法の検討」<sup>5)</sup>で報告した分析方法について引き続き検討を行った。

結果と考察

1 GC/MS の測定条件の検討

GC/MS の測定条件を表 1 に、その条件下における TIC を図 1 に示す。なお、各物質のモニターイオンを表 2 に示す。

表1 GC/MS測定条件

カラム	SGE 社製 BPX5 (長さ 25m, 内径 0.22mm, 膜厚 0.25 μm)
昇温条件	50°C (1min) -30°C/min -260°C -10°C/min -300°C (2min)
注入口温度	250°C
注入方式	スプリットレス (1 分間パージオフ) 2 μl 注入
流量制御	EPC 定流量モード, 1.2ml/min (ヘリウム)
イオン化法	E I
イオン化電流	3mA
イオン化電圧	70eV
温度制御	イオン源 250°C, インターフェース 250°C
スキャン	50~400a. m. u. 0.4sec/scan

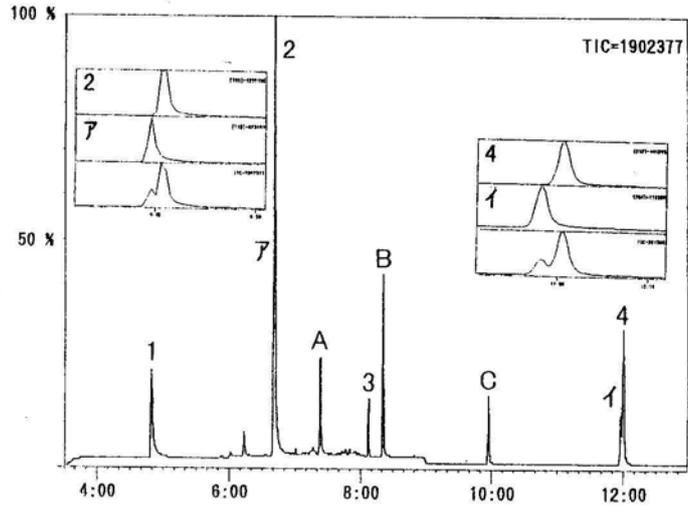


図1 測定対象物質の TIC

表2 測定対象物質のモニターイオン

対象物質	M. W.	モニターイオン	参照 i. s.
1 4-ニトロトルエン	137	91	137 A
2 ベンゾフェノン	182	105	182 A
3 オクタクロロスチレン	379	380	378 B
4 ベンゾ[a]ピレン	252	252	250 C
A ベンゾフェノン-d10	192	110	192 A
I ベンゾ[a]ピレン-d12	264	264	260 C
A アントラセン-d10		188	i. s.
B フルオランテン-d10		212	i. s.
C クリセン-d12		240	i. s.

2 水質試料の分析法の検討

分析フローを図 2 に示す。

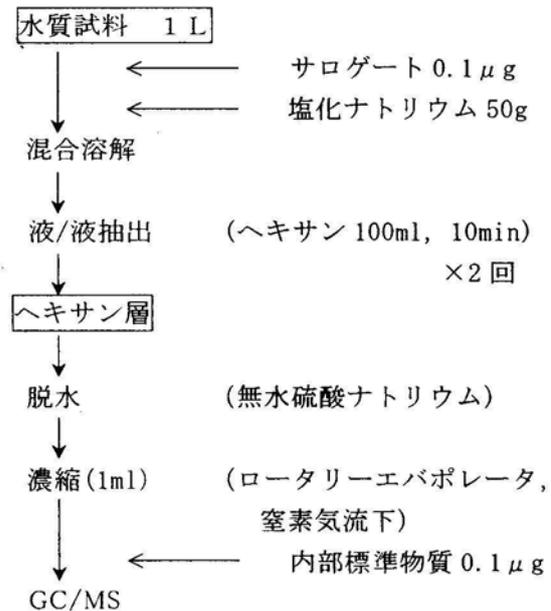


図2 水質試料分析フロー

ミリQ水(MILLIPORE 超純水システム Milli-Q EDS 処理水)1Lに各標準物質 0.05 μg を添加し、回収試験を行った。その添加回収試験結果と検出下限値及び定量下限値を表3に示す。

「検出下限値(MDL) (μg/l) = t (8-1, 0.05) × 標準偏差(μg/ml)/1000 { t (8-1, 0.05) = 1.895 } 」とし、定量下限値はMDLの3倍の値とした。

<検出下限値(MDL)の算出のしかた>  
 n回繰り返し試験を行った時のMDLは、  
 $MDL = t(n-1, \alpha) \times St$   
 $\alpha$  : 危険率 [ここでは危険率5% (片側)]  
 $t(n-1, \alpha)$  : 自由度 n-1,  $\alpha = 0.05$  における t 値表  
 繰り返し回数とその  $t(n-1, \alpha)$

n	自由度	t(n-1, α) (片側)
6	5	2.015
7	6	1.943
*8	7	1.895

St: 繰り返し試験測定値の標準偏差

表3 添加回収試験結果および検出下限値と定量下限値

対象物質	回収率 (%)	標準偏差 (μg/ml)	検出下限	定量下限
4-ニトロトルエン	89	0.012	0.024	0.073
ベンゾフェノン	110	0.010	0.019	0.059
ベンゾフェノン*	99	0.008	0.016	0.048
オクタクロスチレン	81	0.003	0.006	0.019
ベンゾ[a]ピレン	100	0.004	0.008	0.026
ベンゾ[a]ピレン*	92	0.007	0.013	0.039

\* : d 体比補正值 (n=8, 単位: μg/l)

標準偏差に幅があるものの、回収率は全物質とも80%~110%の間であり、概ね良好である。

ベンゾフェノンのd体自体の回収率は88%で、ベンゾ[a]ピレンのd体回収率は99%であった。分析法として適切であると考えられる。

なお、各物質のブランク値は、ベンゾフェノンが0.01 μg/l 検出され、他の3物質は検出されなかった。

### 3 底質試料の分析法の検討

分析フローを図3に示す。

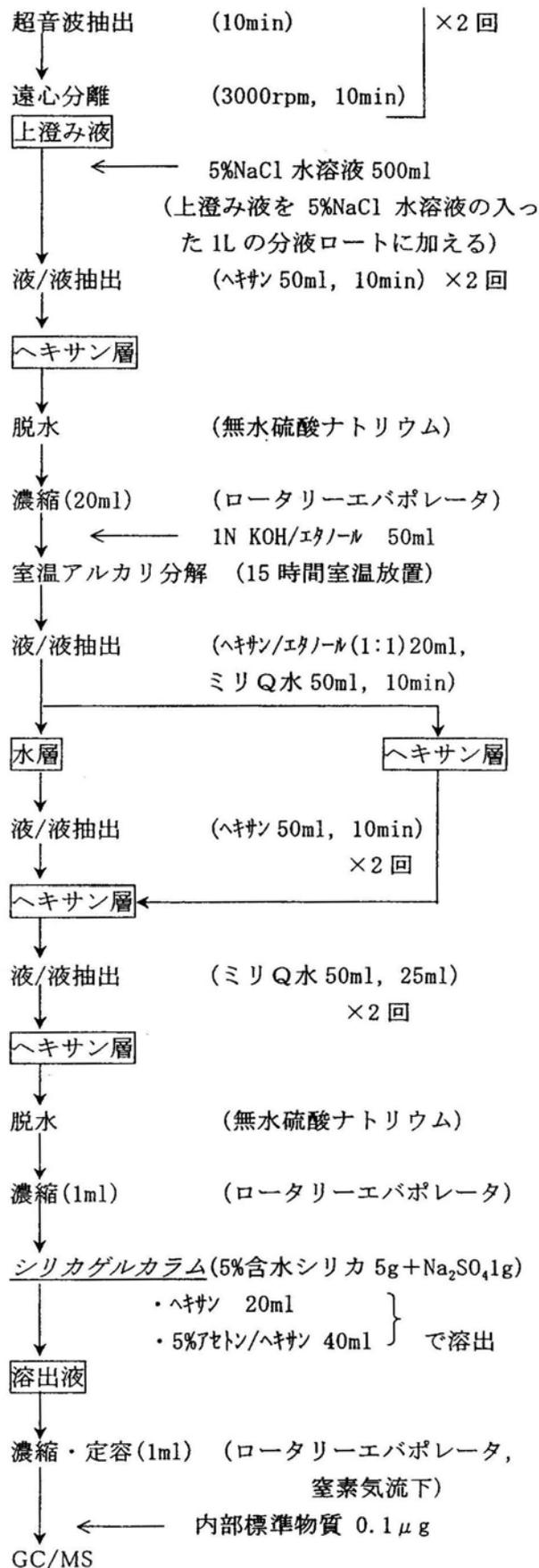
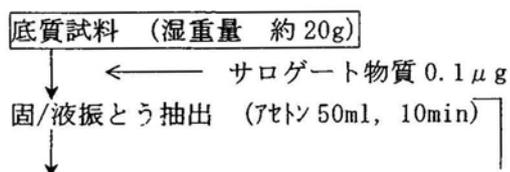


図3 底質試料分析フロー

(1) シリカゲルクロマト

シリカゲルカラムによるクリーンアップ操作での回収率を調べるため、各対象物質 0.2 μg (ヘキサン溶液) を負荷し、その分画状況を調べた。シリカゲルカラムは、コック付きガラス製カラム (内径 1 cm, 長さ 30cm) に 5% 含水シリカゲル 5g をヘキサンの湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを 1g 積層したものをを用いた。溶出は、ヘキサン 20ml で溶出した後、続いて 1% (v/v) のアセトン/ヘキサン混合溶液もしくは 5% (v/v) のアセトン/ヘキサン混合溶液で溶出し、それぞれの結果を比較検討した。その結果を表 4 に示す。

表 4 シリカゲルクロマト分画結果

流量	ヘキサン 1% (v/v) アセトン/ヘキサン (ml)				
	0-20	0-10	10-20	20-30	~ 50-60
①	-	-	-	-	92.9
②	-	-	-	-	95.8
③	94.7	-	-	-	-
④	-	76.0	4.9	-	-

流量	ヘキサン 5% (v/v) アセトン/ヘキサン (ml)				
	0-20	0-10	10-20	20-30	~ 50-60
①	-	-	-	93.7	-
②	-	-	-	89.0	-
③	100	-	-	-	-
④	-	83.6	5.0	-	-

① 4-ニトロトルエン, ② ベンゾフェノン, ③ オクタクロロスチレン,  
④ ベンゾ[a]ピレン (単位: %)

この結果から、前述の底質試料分析フロー中のシリカゲルクロマトにおける溶出溶媒と溶媒の量を、ヘキサン 20ml, 引き続いて 5% (v/v) アセトン/ヘキサン 40ml とした。なお、対象物質がオクタクロロスチレンのみの場合は、ヘキサン 20ml のみで溶出が可能である。また、オクタクロロスチレンを測定対象としない場合は、ヘキサン溶出部分を廃棄することにより、ヘキサンに溶出する不純物質を分離することができ、クリーンアップに有効である。

(2) 底質分析法による添加回収試験

アセトン 50ml に各標準物質 0.1 μg を添加し、液/液抽出に供し、「図 3 底質試料分析フロー」に従い、回収試験を行った。その添加回収試験結果と検出下限値及び定量下限値を表 5 に示す。

表 5 底質分析法による添加回収試験結果と検出下限値と定量下限値

対象物質	回収率 (%)	標準偏差 (μg/ml)	検出下限	定量下限
4-ニトロトルエン	76	0.005	1.01	3.03
ベンゾフェノン	91	0.014	2.77	8.33
ベンゾフェノン*	121	0.006	1.16	3.49
オクタクロロスチレン	69	0.008	1.51	4.55
ベンゾ[a]ピレン	63	0.007	1.51	4.54
ベンゾ[a]ピレン*	101	0.004	0.77	2.33

\*: d 体比補正值 (n=8, 単位: μg/kg)

「検出下限値 (MDL) (μg/kg) = t (8-1, 0.05) × 標準偏差 (μg/ml) × 1000/10 { t (8-1, 0.05) = 1.895 } (含水率 50% の底質 20g を採取したとして、実質底質量を 10g として換算した。)」とし、定量下限値は MDL の 3 倍の値とした。

回収率は概ね、70%~130% を達成しているが、一部オクタクロロスチレンとベンゾ[a]ピレンの内標比計算による回収率が低くなった。ベンゾフェノンの d 体回収率は 79% で、ベンゾ[a]ピレンの d 体回収率は 64% であった。d 体を添加したベンゾフェノン、ベンゾ[a]ピレンは、d 体による補正を行うと、いずれも回収率が高くなり、標準偏差も低くなった。d 体補正が有効に働いているが、試験方法として、内標比計算で 70% の回収率を確保することが前提であり、ベンゾ[a]ピレンは課題が残った。また、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレンについては同物質の d 体が市販されておらず、マニュアルには他の物質があげられているが、挙動が目的物質と異なり検討中である。

ベンゾフェノン、ベンゾ[a]ピレンの操作ブランクについては、同保持時間においてピークが検出される。このピークは、定量イオンと確認イオンとの比は標準品とは異なるが、目標検出限界値あるいはそれ以下と低濃度であり、当該物質であるか否かは確定できない。

これらの結果から、課題は残るものの、前述の分析方法は、底質試料 4 物質の一括分析として適切であると考えられる。

(3) 底質への添加回収試験

実際の底質試料 (含水率 51.71%) を約 20g 採取し、各標準物質及び各 d 体を 0.1 μg 添加し、前述の底質分析フローに従い、添加回収試験を行った。ブランクテストの結果、使用した底質試料自体からは、4-ニトロトルエン、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレンの 3 物質は検出されなかった。し

かし、ベンゾ[a]ピレンは、底質試料自体から添加量をはるかに上回る量のベンゾ[a]ピレンが検出されたため、その添加量を1 $\mu$ gとし、再度添加回収試験を行った。その結果を表6に示す。

表6 底質への添加回収試験結果

対象物質	回収率 (%)	平均値	標準偏差
4-ニトロトルエン	82	0.082	0.013
ベンゾフェノン	68	0.068	0.011
ベンゾフェノン*	116	0.116	0.005
オクタクロステレン	60	0.060	0.005
ベンゾ[a]ピレン	121	1.210	0.045
ベンゾ[a]ピレン*	91	0.913	0.026

\*: d 体比補正値

(n=6, ベンゾ[a]ピレンは n=3, 単位:  $\mu$ g/ml)

回収率は、オクタクロステレンを除いて、概ね良好であった。

ベンゾ[a]ピレンについては、使用した底質から内標比濃度で 0.472  $\mu$ g/ml (d 体比濃度で 0.512  $\mu$ g/ml) 検出されたため、上記の値はその値を差し引いて計算した。使用した底質自体の実質換算濃度は内標比で 48.4  $\mu$ g/kg (d 体比で 52.5  $\mu$ g/kg) であった。今回の試験でもわかるように、ベンゾ[a]ピレンが底質からかなりの濃度で検出されることが予想される。実際の測定では、ベンゾ[a]ピレンと他の3物質の測定濃度が1~2桁異なることになり、GC/MS 測定において注意が必要である。一括分析を行う際に、物質ごとの検量線の範囲を検討し、またベンゾ[a]ピレンの測定試料を希釈するなどの前処理が必要となる。

実際の底質への添加回収試験では、妨害物質が多く、シリカゲルクロマトにおけるクリーンアップを行っているが、それでも一部目的物質が妨害物質と重なり、定量イオンを変更して測定した。さらなるクリーンアップ方法の検討も必要かもしれない。

回収率が低かったオクタクロステレンについては、妨害物質の多い底質試料にあつて、GC/MS での感度が他物質に比べて極端に低く、添加量が定量下限に近く低かったため、その影響かもしれない。

底質分析では、「図3 底質試料分析フロー」にあるように前処理が多段階にわたり複雑であり、かかる手間と時間も膨大である。熟練することにより、回収率の問題などは解決されるものと思う

が、前処理の短縮・簡略化に検討の余地が残る。

#### (4) 市販品のシリカゲルカラムの利用

底質分析の前処理の短縮・簡略化を計る上で、シリカゲルクロマトによるクリーンアップにおいて市販品の利用を検討した。

「GLサイエンス(株)製ヘキサソル洗浄済みシリカゲルカートリッジカラム(5g)」を使用して検討を行った。なお、使用前のブランクテストで、このカラムから測定対象物質および妨害物質は検出されなかった。市販品を利用したシリカゲルクロマトの分画試験結果を表7に示す。また、このシリカゲルカラムを用いて行った一連の底質試料分析の添加回収試験結果も自家製のシリカゲルカラムを使用した場合と同様の結果が得られ、概ね良好であった。なお、この分画試験、添加回収試験は使用したシリカゲルカラム以外は前述の結果表4,6の際と同条件で行った。

表7 シリカゲルクロマト分画結果

流量	ヘキサソル 5%(v/v)アセトン/ヘキサソル (ml)				
	0-20	0-10~	20-30	30-40	40-50
①	—	—	52.5	23.9	5.0
②	—	—	63.5	24.0	3.3
③	105	—	—	—	—
④	—	—	65.0	24.8	7.2

① 4-ニトロトルエン, ② ベンゾフェノン, ③ オクタクロステレン, ④ ベンゾ[a]ピレン (単位: %)

シリカゲル分画結果を、市販のものと自家製のものとで比較すると、シリカゲルの量が同じ5gでありながら、市販のものでは、ベンゾ[a]ピレンの溶出が大きく、遅れ溶出パターンが異なった。4-ニトロトルエン・ベンゾフェノンを含め、全体的に溶出が遅くなり必要な溶出溶媒量が多くなった。市販品利用に際し、事前検討が重要である。

市販品を用いることにより、溶出溶媒量は多くなったが、シリカゲルカラム作成時間の短縮などを考慮すると、トータル的にシリカゲルクロマトの処理時間は大いに短縮された。

4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・オクタクロステレン・ベンゾ[a]ピレン分析法として、今回示した方法で、水質・底質試料のそれぞれの一括分析が可能であると考えられる。今後、回収率を上げ、定量下限値を下げるべく、改善・検討を続けていきたい。

文 献

- 1) 環境庁：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 SPEED98－，22～23，(1998)
- 2) 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），II-1～II-16，VI-1～VI-8（1998）
- 3) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応について－環境ホルモン戦略計画 SPEED98－，(2000年11月版)
- 4) 小中ゆかり 他：4-ニトロトルエン・ベンゾフェノン・スチレン2量体及びスチレン3量体の分析法の検討，広島市衛生研究所年報，19，54～58(2000)
- 5) 下田喜則 他：底質中の4-ニトロトルエン，ベンゾフェノン，オクタクロロスチレン，ベンゾ[a]ピレン，スチレン2量体及びスチレン3量体の同時分析法の検討，広島市衛生研究所年報，20，62～64(2001)