

# 外因性内分泌攪乱化学物質の分析法に関する検討 (その2) 環境水におけるベンゾフェノン, ベンゾ〔a〕ピレン 及び4-ニトロトルエンの同時分析法について

川井仁之<sup>1</sup>, 田崎和子<sup>1</sup>, 中川和子<sup>1</sup>, 吉川俊一<sup>1</sup>, 吉田宏三<sup>1</sup>, 寺井洋一<sup>1</sup>

## Studies on the analytical method of endocrine disrupters ( ); Simultaneous analysis of benzofenone, benzo(a)pyrene and 4-nitrotoluene in water

Masayuki KAWAI, Kazuko TAZAKI, Kazuko NAKAGAWA,  
Shinichi YOSHIKAWA, Kozo YOSHIDA, Yoichi TERAJI

**Abstract :** The solid-phase extraction is generally applied for the simultaneous analysis of benzofenone, benzo(a)pyrene and 4-nitrotoluene in water samples. In the procedure, our extraction method using SDB-XC disk with 20% acetone-hexane solution was found to obtain the highest recovery ratio for these substances. The impurity in the silica gel interfering with benzofenone determination was removed by washing silica gel with 20% acetone-hexane solution. Thus, the solid-phase extraction has been shown to have the advantage of shortening the analysis time, as well as preventing possible photodegradation of benzo(a)pyrene occurring during the solvent extraction process.

**Key words :** 環境ホルモン Endocrine disrupters, ベンゾフェノン benzofenone,  
ベンゾ〔a〕ピレン benzo(a)pyrene, 4-ニトロトルエン 4-nitrotoluene

### はじめに

ベンゾフェノンは医薬品原料, ベンゾ〔a〕ピレンは石油・石炭などの燃焼過程での非意図的生成物, 4-ニトロトルエンは有機合成や染料に用いられる2, 4-ジニトロトルエンなどの合成中間体として存在する外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)である。これらの物質は, 環境ホルモン実態調査の対象項目に指定されており, 環境ホルモン暫定マニュアルには, 溶媒抽出法を用いた同時分析法が紹介されている<sup>1)</sup>。しかし, 溶媒抽出法による分析は, 有機溶媒の使用量が多く, 操作に時間を要する。そこで, 近年, 溶媒使用量が少なく, かつ操作が簡便な固相抽出法による同時分析法が用いられるようになってきている。一方, 試料中に夾雑物が多い場合は, 市販固相シリカゲルなどでクリーンアップを行った後 GC/MS 分析を行っている。先に我々は, この操作においてベンゾフェノン定量妨害物質がシリカゲルから溶出し, また, ベンゾ〔a〕ピレンの回収率が低いことを報告した<sup>2)</sup>。そこで, ベンゾフェノン, ベンゾ〔a〕ピレン及び4-ニトロトルエンの同時分析を目的として, 固相抽出法及びシリカゲルによるクリーンアップ処理法を検討したので報告する。

### 方法

#### 1. 試薬・標準品

ベンゾフェノン標準品, ベンゾ〔a〕ピレン標準品, 4-ニトロトルエン標準品及びフルオランテン-d10標準品は, 和光純薬製環境分析用試薬を用いた。固相用シリカゲルは, VARIAN 社製固相抽出用充填剤 BONDESIL-SI を使用した。固相抽出には, GL Sciences 社製ガラス SPE カートリッジキットを用いた。

#### 2. GC/MS 分析条件

「外因性内分泌攪乱化学物質の分析法に関する検討(その1)」と同条件

#### 3. 定量イオン(参照イオン)

ベンゾフェノン: 182 (105)

ベンゾ〔a〕ピレン: 252

4-ニトロトルエン: 137 (91)

フルオランテン-d10: 212

### 結果及び考察

#### 1. 固相抽出法の検討

##### 1) 固相の選択

ディスク型固相として3M 製エムポアディスク SDB-XC と C18, カートリッジ型固相としてウォーターズ製

<sup>1</sup> 京都市衛生公害研究所 環境部門

Sep-Pak PS-2 と Oasis HLB Plus を使用した。ベンゾフェノン、ベンゾ〔a〕ピレン、4-ニトロトルエンの0.1ppm 混合標準液1mL を精製水1L に添加したものを試料とし、それぞれの固相に吸着させた後、ヘキサン、アセトン、酢酸エチル各20mL で溶出させ、回収率を比較した。表1にそれぞれの回収率を示す。ベンゾフェノンにおいては、これら4種類の固相においていずれの溶出溶媒を使用した際にも60%以上の回収率を得ることができた。しかし、ベンゾ〔a〕ピレンにおいては、C18、PS-2 及び HLB Plus を使用した場合、SDB-XC に比較して、これら3物質の回収率が悪く、ばらつきも大きかったため、抽出用固相として SDB-XC が最適であることがわかった。

### 2) ディスク型固相 SDB-XC からの溶出法の検討

0.1ppm 混合標準液1mL を精製水1L に添加したものを試料とし、これをディスク型固相 SDB-XC に吸着させた。これをアセトン比率が1, 5, 10, 20, 30%であるアセトン-ヘキサン溶液10mL で溶出させ、回収率を検討した。その結果、図1に示すように、アセトン比率の増加に伴い、回収率は緩やかな増加傾向が認められ、特にベンゾ〔a〕ピレンの回収率はアセトン比率の影響を受けやすいことがわかった。また、アセトン比率が20%以上で3物質とも良好な回収率が得られたが、30%アセトン-ヘキサン溶液で溶出させたものを GC/MS 分析するとベースラインのノイズが他に比較して大きくなる傾向が認められた。従って、溶出溶媒として20%アセトン-ヘキサン溶液が最適であると考えられた。

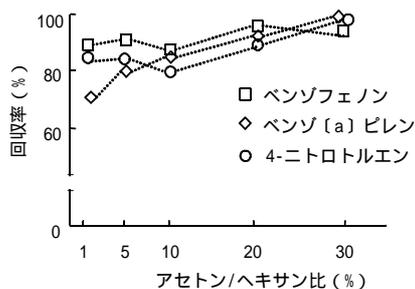


図1 ディスク型固相SDB-XCからの回収

## 2. シリカゲルによるクリーンアップ法の検討

### 1) シリカゲルの妨害物質除去方法の検討

固相用シリカゲルを用いてブランク試料をクリーンアップすると、ベンゾフェノン標準と保持時間及び定量イオン/参照イオン面積比がほぼ同じであるベンゾフェノン定量妨害物質が溶出し、ベンゾフェノンの定量に影響を与えることを我々は先に報告した<sup>2)</sup>。また、その妨害物質はシリカゲル容器ラベル由来であり、常温下であっても経時的にシリカゲルを汚染することを「外因性内分泌攪乱化学物質の分析法に関する検討(その1)」で報告した。そこで、まず、シリカゲルからベンゾフェノン定量妨害物質を除去するため、以下の検討を行った。

1, 5, 10, 20, 30%のアセトン-ヘキサン溶液20mL シリカゲル5g を洗浄し妨害物質の溶出を検討した。その結果、図2-1に示すように、妨害物質はアセトン/ヘキサン比が10%以上で溶出し始め、20%と30%では明らかな差は認められなかった。更に前述の1~30%アセトン-ヘキサン溶液で洗浄したシリカゲルを20%アセトン-ヘキサン溶液20mL で溶出させた。その結果、図2-2に示すように、洗浄溶液のアセトン/ヘキサン比が20%以上で妨害物質は検出されなかった。従って、20%アセトン-ヘキサン溶液20mL でクリーニングすることにより、シリカゲル5g から妨害物質は除去されることがわかった。

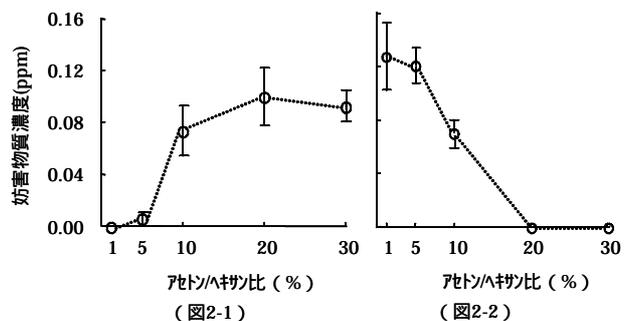


図2 洗浄溶媒と妨害物質溶出との関係

表1 固相抽出ディスクの検討

化合物	回収率 (%)											
	SDB XC (N=4)			C18 (N=2)			PS 2 (N=2)			HLB Plus (N=2)		
	ヘキサン	アセトン	酢酸エチル	ヘキサン	アセトン	酢酸エチル	ヘキサン	アセトン	酢酸エチル	ヘキサン	アセトン	酢酸エチル
ベンゾフェノン	82.5	86.9	90.5	94.7	102.7	89.3	65.0	69.8	97.3	64.1	71.9	110.3
ベンゾ〔a〕ピレン	76.6	73.6	71.0	41.7	50.4	36.6	25.3	8.2	16.0	6.0	21.2	25.3
4-ニトロトルエン	74.1	78.5	81.3	16.5	139.1	49.6	71.0	54.6	86.8	55.8	55.8	89.8

## 2) ヘキサン置換量とベンゾ〔a〕ピレン損失率

シリカゲルにアセトンが残存することによって、ベンゾ〔a〕ピレンの回収率が悪くなることが経験されたので、シリカゲルのヘキサン置換量とベンゾ〔a〕ピレン損失率との関係を検討した。20%アセトン - ヘキサン溶液20mLで洗浄し妨害物質除去したシリカゲルをヘキサン 0, 2, 5, 10, 20mL で再洗浄し、0.1ppm 混合標準液をシリカゲルに負荷し回収率を比較した。その結果、図3に示すように、ヘキサン置換量の増加に伴い、ベンゾ〔a〕ピレンの損失は小さくなり、10mL 以上のヘキサンでシリカゲルを置換することにより、ベンゾ〔a〕ピレンの損失はなくなることが認められた。

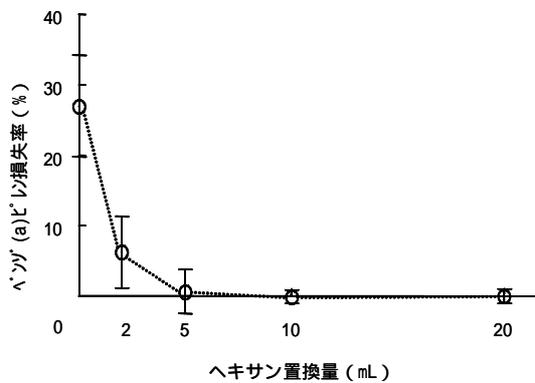


図3 ヘキサン置換量とベンゾ〔a〕ピレン損失率

## 3) クリーンアップ用シリカゲルからの溶出法の検討

0.1ppm 混合標準液1mL をシリカゲルに負荷し、1, 5, 10, 20%のアセトン - ヘキサン溶液、各10mL で溶出させ、回収率を比較した。その結果、図4に示すように、アセトン比率が高くなるにしたがって、各物質の回収率は高くなる傾向があり、特にベンゾ〔a〕ピレンはアセトン比率増加の影響を受けやすいことがわかった。アセトン比率が20%でいずれの物質も良好な回収率が得られた。

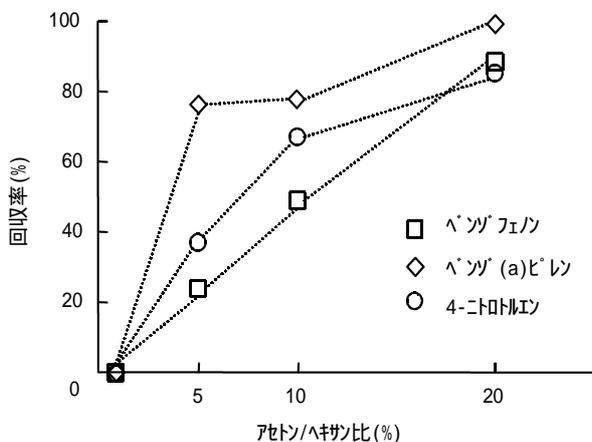


図4 シリカゲルからの回収

## 3. 固相抽出法の評価

以上の検討に基づき作成した固相抽出法と従来の溶媒抽出法を図5に示す。

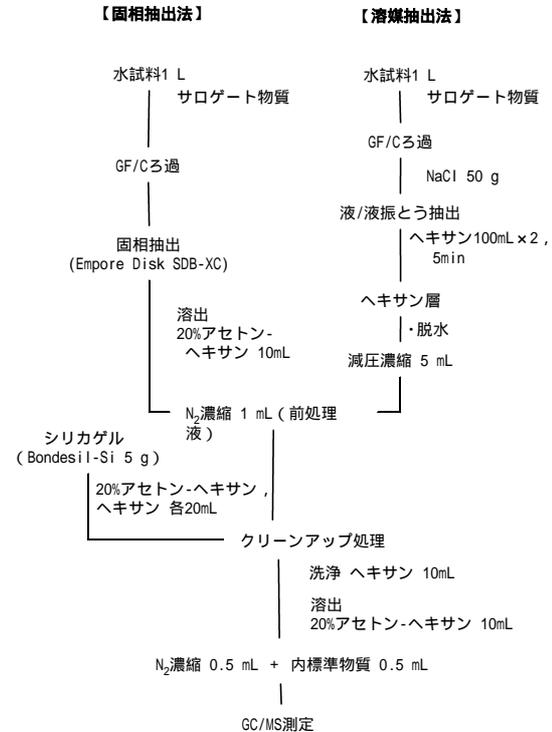


図5 分析法フローチャート

### 1) 蒸留水を用いた評価

ベンゾフェノン、ベンゾ〔a〕ピレン、4-ニトロトルエンの混合標準液0.1ppm と各サロゲートの混合液0.05ppm をそれぞれ1mL ずつ精製水1L に添加し、固相抽出法と溶媒抽出法それぞれの方法で回収試験を行った。その結果、表2に示すように、ベンゾフェノン、ベンゾ〔a〕ピレンにおいてはいずれの方法においても良好な回収率が得られた。しかし、4-ニトロトルエンにおいては、固相抽出法が溶媒抽出法に比べて回収率は高くなることがわかった。

これら3物質の同時分析には固相抽出法が有効であると考えられる。

表2 蒸留水試料による固相抽出法の評価

化合物	固相抽出法		溶媒抽出法	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
ベンゾフェノン	91.7	6.2	93.2	7.9
ベンゾ〔a〕ピレン	92.2	9.3	110.3	1.5
4-ニトロトルエン	85.7	8.0	65.0	8.1

(N=3)

## 2) 河川水試料を用いた評価

浮遊懸濁物 (SS) が1.3, 2.4, 4.9mg/L である3種類の河川水試料を検体とし、各検体1L に0.1ppm 混合標準液を1mL 添加し、固相抽出法の回収率を検討した。その結果、表3に示すように、回収率はSSの影響はあまり受けず、いずれの試料においても回収率は良好であることがわかった。

**表3 河川水試料による固相抽出法の評価**

化合物	河川A pH 8.42 SS 1.3mg/L		河川B pH 8.08 SS 2.4mg/L		河川C pH 8.51 SS 4.9mg/L	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
ベンゾフェノ	93.5	3.6	83.6	4.2	94.2	9.8
ベンゾ [a]ピレン	83.5	6.6	77.6	5.6	79.4	5.0
4-ニトロフェノ	79.4	4.2	74.8	12.6	73.1	4.1

(N=3)

## まとめ

固相抽出法を検討した結果、抽出用固相はディスク型固相 SDB-XC、溶出溶媒は20%アセトン - ヘキサンの条件で3物質について良好な回収率が得られた。また、クリーンアップ法を検討した結果、シリカゲル5g を20%アセトン - ヘキサン10mL で洗浄することによりベンゾフェノン定量妨害物質を除去でき、そのシリカゲルを10mLのヘキサンで再洗浄してアセトンを除去することにより、良好な回収率が得られた。蒸留水及び河川水を試料として添加回収試験を行い、今回検討した固相抽出法を評価した結果、いずれの試料においても良好な結果を得られたが、今後検体数を増やして更に評価する必要があると考える。

## 参考文献

- 1) 環境庁水質保全局：外因性内分泌攪乱化学物質暫定マニュアル， -1 - -8 (1998)
- 2) 田崎和子，他：京都市衛生公害研究所年報，No.69，142 - 144 (2003)

