共同研究報告書

整理番号第346号

内分泌撹乱物質の簡易分析法開発に関する共同研究報告書

－　環境水中のノニルフェノール関連物質一斉分析法の開発　－

平成16年11月

独立行政法人土木研究所

昭和電工株式会社

日本環境株式会社

Copyright © (2006) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、独立行政法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、独立行政法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

共 同 研 究 報 告 書

整理番号第 346 号 2004 年 11 月

内分泌撹乱物質の簡易分析法開発に関する共同研究報告書

－　環境水中のノニルフェノール関連物質一斉分析法の開発　－

研究担当者：

独立行政法人土木研究所	昭和電工株式会社	日本環境株式会社
田中宏明	篠田晶子	飯尾祐子（旧姓　小川）
小森行也	藤原嘉夫	行谷義治

要　旨

NP はアルキルフェノール類の１種であり、外因性内分泌かく乱化学物質として確認されている。NP は樹脂等の添加剤の他、非イオン性界面活性剤である NPnEO の分解生成物であり、中間生成物である NPnEC を含め、その挙動解明について多くの検討がなされている。NPnEO、NP は疎水性、NPnEC は親水性が高いことからそれぞれ別法により分析する必要があった。本研究は同一前処理で NP、NPnEO、NPnEC を同時抽出・分析する方法の開発を行ったものである。

キーワード：アルキルフェノール類、ノニルフェノール、ＮＰ、

目　次

１．はじめに　1

２．研究概要　2

３．研究結果　5

（１）HPLC 分析カラムの検討

（２）検出下限値および定量下限値

（３）前処理法の検討

（４）添加回収法による実証試験

（５）実試料中のノニルフェノール関連物質濃度の測定

（６）LC/MS への適用

４．まとめ　12

別添

１．HPLC 分析カラムの検討　13

（１） Shodex　MSpak GF-310 4E（4.6φ×250mm）

（２） Shodex　Asahipak　NH2P-50 4D（4.6φ×150mm）

（３） Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

２．検出下限値および定量下限値　22

３．前処理法の検討　26

１）カートリッジへの負荷液の塩濃度

２）SS(浮遊固形物)抽出溶媒の検討

３）カートリッジへの負荷液の溶媒濃度

４）カートリッジから NP 類を溶出する溶媒

４．添加回収試験　41

（１）Milli-Q®水を用いた添加回収

（２）河川水を用いた添加回収

（３）下水処理場の流入水、放流水を用いた添加回収

５．実試料中のノニルフェノール関連物質濃度の測定　54

６．LC/MS への適用　58

参考資料

成果の発表　63

１．はじめに

環境水中からの検出率が高いノニルフェノール（NP）はアルキルフェノール類の１種であり、外因性内分泌かく乱化学物質として確認されている[*1]。NPは樹脂等の添加剤の他、非イオン性界面活性剤であるノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）の分解生成物であるといわれており、その挙動解明のため多くの研究者により検討がなされている。NPnEOならびにNPは構造内の疎水性基を利用した抽出・濃縮が比較的容易であるが、中間生成物であるノニルフェノキシ酢酸類（NPnEC[*2]）は親水性が高いため、定量するには、それぞれ別法を採用する必要がある。したがって、NP、NPnEOおよびNPnECのようなアルキルフェノール類を同一の環境試料から抽出・濃縮することは難易度の高い課題である。　本研究は同一前処理でNP、NPnEO、NPnECの抽出並びに同時分析する方法の開発を目的として独立行政法人土木研究所、日本環境㈱、昭和電工㈱が「共同研究」として実施した。

＊１　環境省ホームページ「平成１３年度第１回内分泌攪乱化学物質問題検討会」
http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1301

＊２　NPnEC
NP1EC：ノニルフェノキシ酢酸
NP2EC：ノニルフェノールモノエトキシ酢酸
NP3EC：ノニルフェノールジエトキシ酢酸

２．研究概要

アルキルフェノールの一種であるノニルフェノール（NP）の濃度把握には、ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）そして微生物分解中間産物であるノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）も合わせて解析する必要があるが（図１参照）、現在、水質試料についてNPnEO、NP、および親水性の比較的高い NPnEC 各々に関して、公になっている方法は旧環境庁水質保全局の外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（平成 10 年 10 月）及び下水試験方法追補暫定版内分泌攪乱化学物質編（平成 14 年）の二つである。これらに記載されている方法を比較したものを次ページに示す。（表１参照）いずれも３物質を個々に測定しており、人体への健康影響が懸念される有機溶剤のジクロロメタンの使用や、シリカゲルカラムによる分画で個々の物質を分別するようになっている。この処理は試料の性状により、分画がずれることもある。

これらの問題点をふまえ、我々は NP 関連物質を簡便に分析する方法の開発を目的として、ノニルフェノール関連物質を固相抽出により一括で前処理し、どの分析機関でも測定できるよう蛍光検出 HPLC 法を採用することにした。

その結果、Milli-Q®水、環境水、下水を用いた添加回収試験では良好な結果を示し、下水については流入水から処理水までの処理工程の確認などにも利用できることがわかった。また、同一前処理試料を用い、LC/MS 法への適用を行うことで NPnEO のアルキル鎖ごとの定量が可能になった。　（図２参照）　以下、結果について報告する。

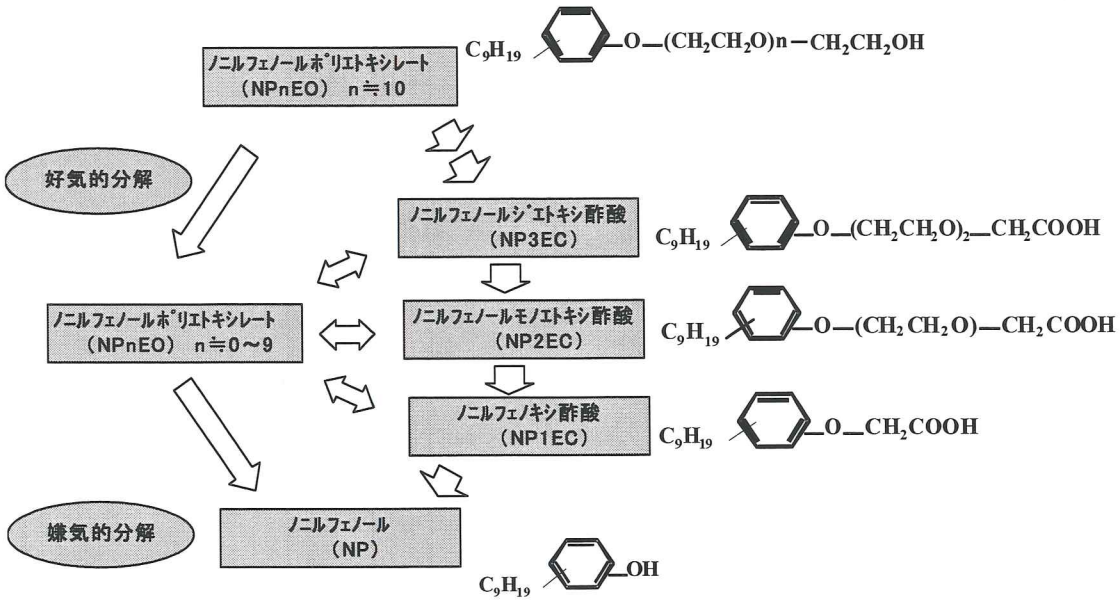


図１　ノニルフェノール関連物質分解過程

表１　公定法の比較

	分析項目	NP			NPnEO	NPnEC	
環境庁＊3	前処理方法	溶媒抽出（ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ）、試料は酸性	固相抽出、試料は酸性（例Sep-pakPS2、Oasis^{TM}HLB、ｴﾑﾎﾟｱﾃﾞｨｽｸSDS-RPS）	固相抽出-エチル化（例Sep-packPS-2）	記載なし	記載なし	記載なし
	SSの処理	懸濁物質がある場合はグラスファイバーフィルターでろ過後、フィルターをアセトンで超音波抽出し、ろ液に合わせて同様の処理を行う。					
	ｸﾘｰﾝｱｯﾌﾟ処理	シリカゲルカラムクロマトグラフィー ﾍｷｻﾝ廃棄→ｱｾﾄﾝ溶出		なし			
	最終溶液	ヘキサン		酢酸メチル→ヘキサン			
	測定方法	GC/MS					
下水試験方法＊4	前処理方法	溶媒抽出（ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ）試料は酸性	固相抽出-ﾄﾘﾒﾁﾙｼﾘﾙ化（n-ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾌﾟﾛﾋﾟﾘﾄﾞﾝ-ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ重合体、例Oasis HLB plus）、試料は酸性	固相抽出（ｽﾁﾚﾝｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ共重合体）、試料は酸性	固相抽出（ｽﾁﾚﾝｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ共重合体、例Sep-pak PS2）	固相抽出－メチル化（グラファイトカーボン）、試料は酸性	固相抽出－メチル化（C_{18}＋強陰イオン交換樹脂SAX）
	SSの処理	環境庁同様	環境庁同様の処理後、ｼﾘｶｶﾗﾑ（例Sep-pak plus ｼﾘｶ）でろ過	環境庁同様	環境庁同様	環境庁同様の方法でｱｾﾄﾝのかわりにﾒﾀﾉｰﾙ使用	
	ｸﾘｰﾝｱｯﾌﾟ処理	シリカゲルカラムクロマトグラフィー ﾍｷｻﾝ廃棄→ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ溶出	シリカゲルカラム（例Sep-pak plus ｼﾘｶ）ﾍｷｻﾝ廃棄→ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ溶出	ﾌﾛﾘｼﾞﾙｶﾗﾑ（市販）ｼﾞｴﾁﾙｴｰﾃﾙ-ﾍｷｻﾝ=4:96v/v溶出	シリカゲルカラム（例Sep-pak Vac ｼﾘｶ）ﾍｷｻﾝ廃棄→ｸﾛﾛﾎﾙﾑ（NPnEO1～4）→ｸﾛﾛﾎﾙﾑ：ﾒﾀﾉｰﾙ=20:80（NPnEO5≦溶出）	なし	なし
	最終溶液	ヘキサン	ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ	ヘキサン	メタノール	ヘキサン	ヘキサン
	測定方法	GC/MS			蛍光-HPLC	GC/MS	GC/MS
本法	前処理方法	**固層抽出（Autoprep EDS-1）、試料はアルカリ性（pH9.5）**					
	SSの処理	**環境庁同様**					
	ｸﾘｰﾝｱｯﾌﾟ処理	**なし**					
	最終溶液	**酢酸エチル＋酢酸→アセトニトリル：MilliQ水=1:1**					
	測定方法	**蛍光－HPLC**			**蛍光HPLC、LC/MS**		

＊３　環境庁：旧環境庁水質保全局の外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（平成 10 年 10 月）

＊４　下水試験方法：下水試験方法　追補暫定版　内分泌攪乱化学物質編（平成 14 年）

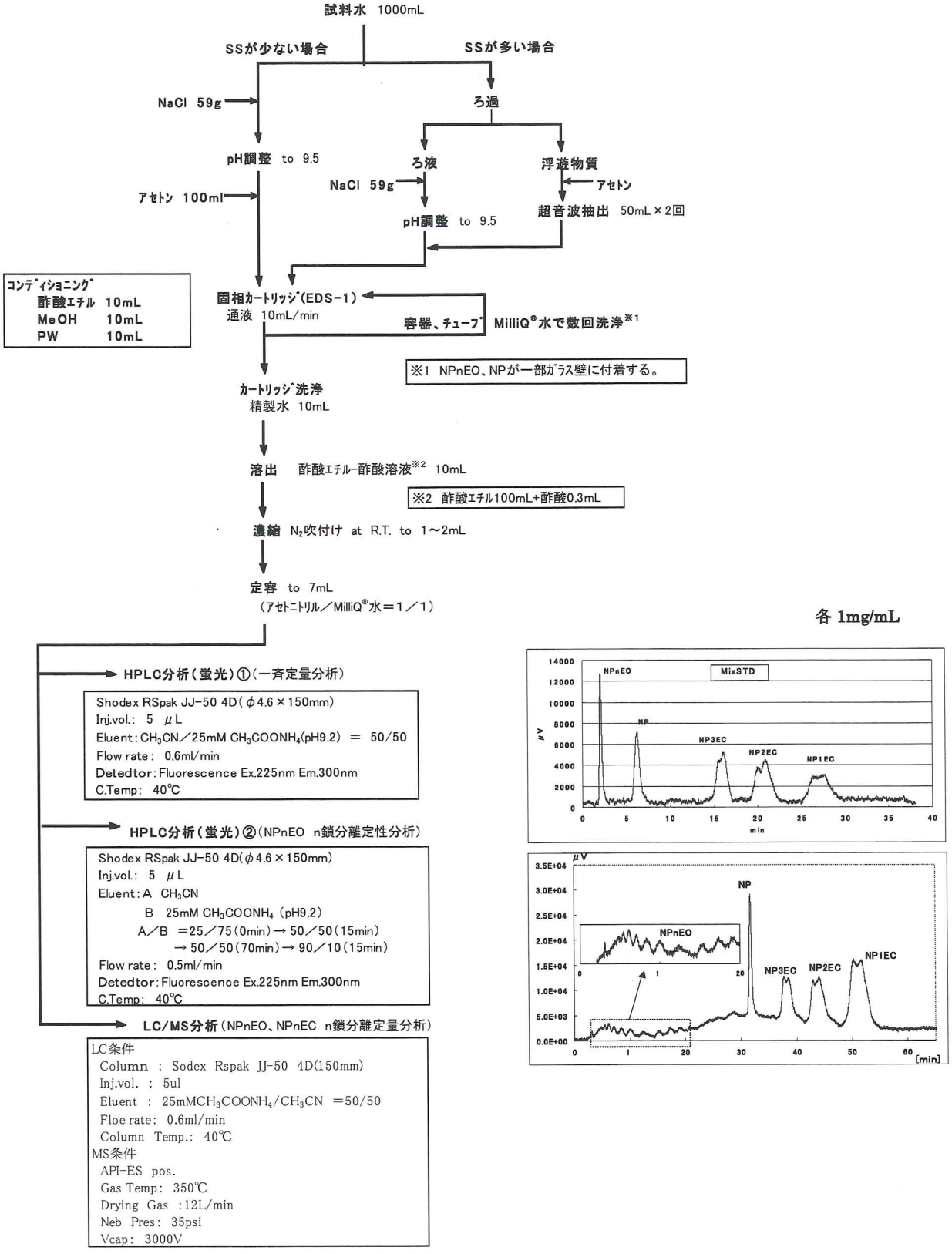


図２　本研究より得られた最適な分析方法

３．研究結果

ノニルフェノール関連物質の簡易分析法の開発に関して、それぞれの検討で得られた知見を以下にまとめる。なお、各項についての詳細は別添とする。

（１）HPLC 分析カラムの検討（別添１参照）

ノニルフェノール関連物質のうち、NPnEO と NP については、分配吸着モードを利用した逆相（ODS）または順相カラム（アミドカラム）による分析がよく知られている。本法では、これらの物質とカルボン酸である NPnEC を同時に分析可能な条件を検討した。

ポリビニルアルコール系ハードゲルを充填したカラム（Shodex　Asahipak　GF-310）は、使用する溶離液の極性によって、脂質などの高分子をサイズ分離的に溶出させ、同時に低分子物質を逆相的に溶出することが可能である。そこで、この GF-310 カラムの基本骨格であるポリビニルアルコール系ハードゲルに微量の第４級アンモニウム基を導入した充填材（Shodex　RSpak　JJ-50）を用い、ノニルフェノール関連物質を同時分析可能な条件を求めた。その結果、NPnEO、NP は逆相的に、NP3EC、NP2EC、NP1EC をイオン交換＋逆相的に相互分離ができることが確認できた。NPnEO の EO 鎖数毎の分離については、グラジエント分析を行うことで分離が可能となった。さらに本法による分析条件は、汎用性の高い HPLC/蛍光検出だけでなくカラムのサイズを変えることなく、そのまま LC/MS にも適用可能であることを確認した。

（２）定量下限値および検量線（別添２参照）

HPLC アイソクラティック分析について、NPnEO(n≒10)、NP は 50～1000μg/L で NPnEC は 250～5000μg/L の範囲で検量線を作成したところ、各項目について良好な直線性を示した（図４）。本検量線の最も濃度が低い点は S/N＝10 を超える値であることを確認し、表２に示すように便宜上これを本法の定量下限値とした（NPnEO、NP＝それぞれ 0.05μg/L、NPnEC＝0.25μg/L）。これらの値は、定義の方法は異なるが、下水試験方法で定められた方法の目標検出下限値を満足していた（NPnEO、NP、NPnEC の目標検出下限値は各々0.2μg/L、0.1μg/L、0.5μg/L）。また、全国の４７下水処理場の測定値(中央値)※に対しても十分対応できるレベルであると考えられた。一例として今回の HPLC 条件で検出限界と考えられるクロマトグラムを図５に示す。

※国土交通省　平成 12 年度下水道における内分泌撹乱物質に関する調査結果より

LC/MS 分析については NPnEO(n≒10)、NPnEC ともに 1～200μg/L の範囲で検量線を作成し（図６）、検出下限値ならびに定量下限値については、下水試験方法で定められた方法で求めた（表３）。LC/MS 分析チャートは別添２　図－別 2.1～4 に示す。HPLC 同様、感度面での問題は見られず、検量線の直線性も良好であった。

表２　HPLC の定量下限値（試料を 1000 倍濃縮して測定）と全国の処理場測定値

	単位	本法の定量下限値	目標検出下限値*
NPnEO	μg／L	0.05	0.2
NP	μg／L	0.05	0.1
NP3EC	μg／L	0.25	0.5
NP2EC	μg／L	0.25	0.5
NP1EC	μg／L	0.25	0.5

＊下水試験方法に記載されている目標検出下限値

		全国47処理場　中央値	
	単位	流入水	放流水
NPnEO(n=1～4)	μg/L	28	0.7
NPnEO(n=5～)	μg/L	81	tr(0.4)
NP	μg/L	4.4	tr(0.2)
NP3EC	μg/L	16	3.1
NP2EC	μg/L	44	3.1
NP1EC	μg/L	0.8	tr(0.7)

（国土交通省　平成12年度下水道における内分泌撹乱物質に関する調査結果より）

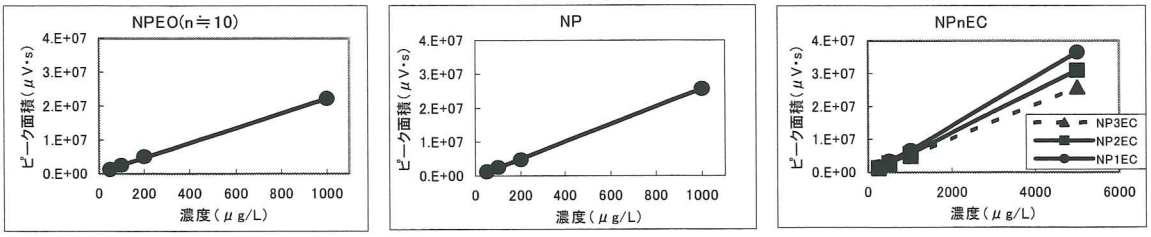


図４　検量線（HPLC）

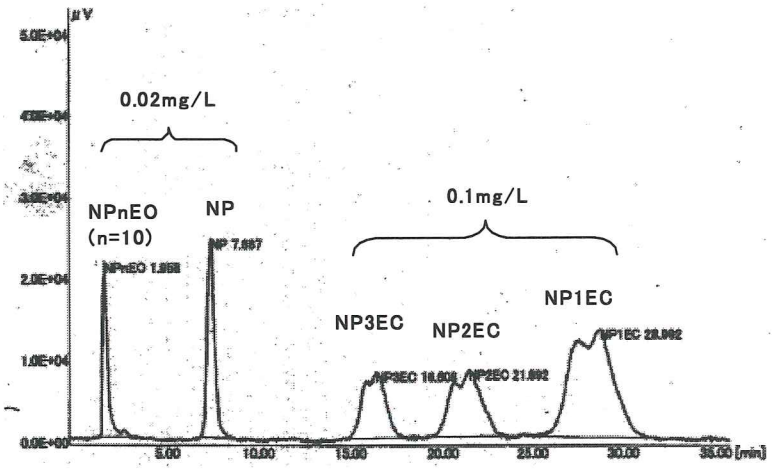


図４　検量線（HPLC）

表３（LC/MS での検出下限値、定量下限値）

	1EO	2EO	3EO	4EO	5EO	6EO	7EO	8EO	9EO	10EO
検出下限値μg/L	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
定量下限値μg/L	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

	11EO	12EO	13EO	14EO	15EO
検出下限値μg/L	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
定量下限値μg/L	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

1EC	2EC	3EC
0.01	0.001	0.001
0.05	0.01	0.01

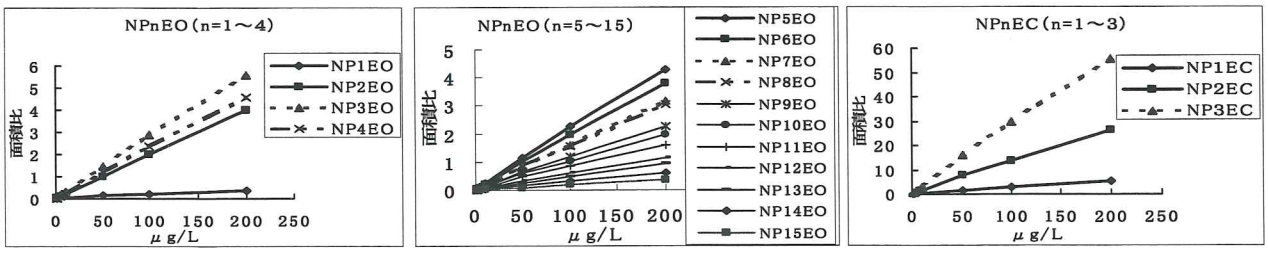


図６　検量線（LC/MS）

（３）前処理法の検討（別添３参照）

ノニルフェノール関連物質は、従来、酸性条件下での固相抽出カートリッジ捕集が行われてきた。酸性条件下でフェノール性 OH 基やカルボン酸などのプロトン解離を抑えることにより、目的物質の疎水性を相対的に高めて固定相に保持させるという原理を利用している。この方法では、目的物質が固相カートリッジに至るまでの容器やラインに吸着することを防ぐことができない。そこで、容器やラインへの吸着によるロスを防ぐためにアルカリ性条件での固相カートリッジ捕集を試みた。捕集には、ジビニルベンゼン骨格にポリＮ－ビニルアセトアミドを導入した充填材のカートリッジを使用した（***Autoprep***® EDS-１（昭和電工）、図７参照）。ノニルフェノール関連物質のフェノール性 OH 基やカルボキシ基は充填材のアミド基やエステル基との水素結合を形成し、しかも目的物質と充填材の間には芳香環同士のπ-π結合が働くと予想される。その結果、親水性と疎水性の２つの作用によって、アルカリ性条件下で NPnEO、NP および、親水性の高い NPnEC を同時に濃縮することが可能となると考えられる。

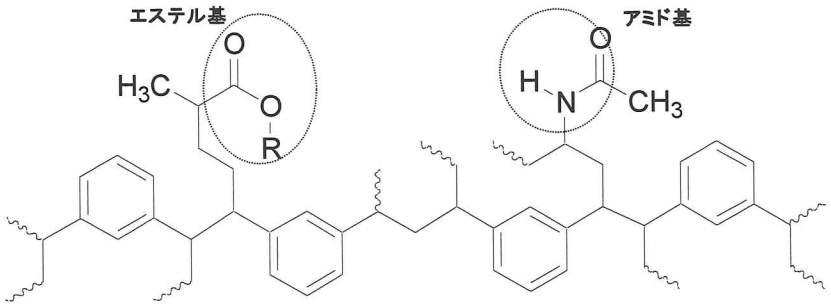


図７　***Autoprep***®EDS-1 充填材

また、NP、NP1～3EC では、カートリッジからの溶出に酢酸添加の酢酸エチルを用いている場合が最も回収率が高いことがわかった（図８参照）。緑色に着色するクロロフィルなどの HPLC 測定妨害成分は、酢酸添加の酢酸エチルでは溶出されず、カートリッジに残った（図９参照）。一方、ノニルフェノール関連物質は、酢酸酸性条件下でプロトン解離が抑えられ疎水性が高まるため、酢酸エチルに溶解し、その結果、カートリッジから溶出された。すなわち、酢酸添加の酢酸エチル溶出を行うことにより、測定妨害成分のクリーンアップと目的成分の回収が同時に行えることがわかった。

	メタノール	アセトニトリル	アセトン	酢酸エチル	酢酸エチル＋酢酸	THF
NPnEO	97%	95%	93%	95%	106%	109%
NP	87%	90%	92%	94%	101%	109%
NP3EC	98%	75%	65%	0%	98%	85%
NP2EC	99%	72%	67%	0%	101%	87%
NP1EC	98%	61%	50%	0%	99%	67%

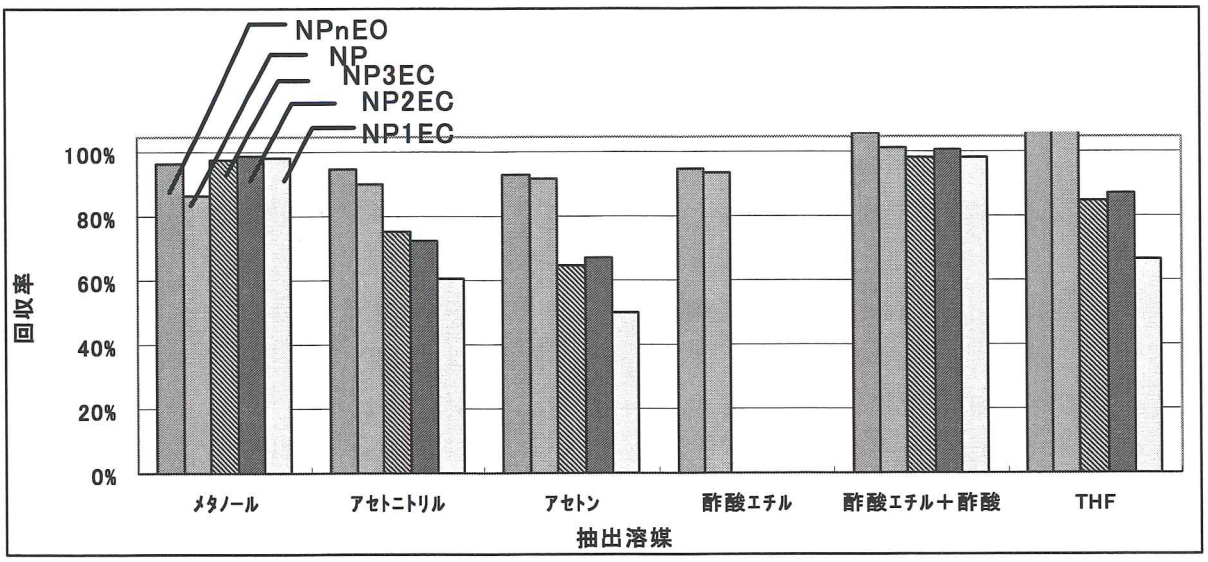


図８　NP類の添加回収試験　－抽出溶媒の検討－

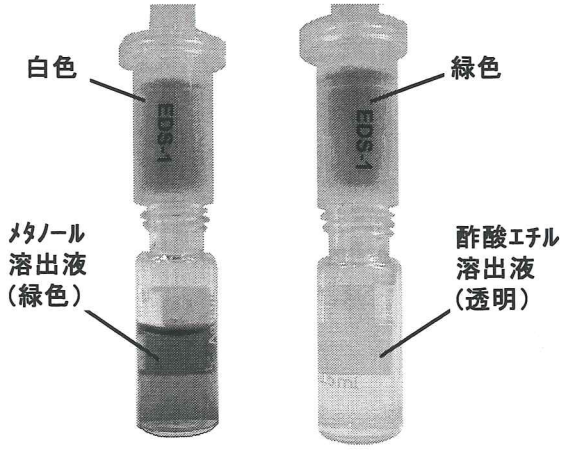


図９　クリーンアップ効果

（4）添加回収による実証試験（別添４参照）

作成した前処理フローに従い、Milli-Q®水、河川水、下水処理場流入水、放流水を用いた添加回収試験を行った。混合標準溶液を最終濃度で 1mg/L になるように添加し、本法フローにて、前処理を行った。（なお本試験においては、最終定容量を 10mL とし、一部を LC/MS 用のサンプルとして用いた。）

実試料において NPnEO、NP ピーク付近に妨害ピークがみられたが、Milli-Q®水、河川水、下水処理場流入水、放流水とも、NPnEO、NP、NPnEC のいずれの成分も 80%以上の良好な回収率が得られ、作成したフローの有用性が確認できた。（表４参照）

表４　添加回収試験回収率

	添加群への添加量	MilliQ水	河川水	下水流入水	下水放流水
NPnEO	1mg/L	101%	85%	97%	96%
NP	1mg/L	94%	93%	97%	98%
NP3EC	1mg/L	99%	99%	109%	107%
NP2EC	1mg/L	98%	96%	104%	106%
NP1EC	1mg/L	84%	100%	109%	107%

（5）実試料中のノニルフェノール関連物質濃度の測定（別添５参照）

本法フローに従い、実試料（河川水、下水処理流入水、放流水、）の HPLC/蛍光測定を行った。(表 5 参照)

・河川水においては、NPnEO、NP は検出されず、NPnEC が僅かながら検出された。

・下水処理場の流入水、放流水についてはサンプリングの時間差のため両者を直接比較することはできないが、 NPnEO は減少、NPnEC（カルボン酸体）は増加の傾向を示し、NPnEO が分解し NPnEC を生成することを示唆する結果であった。一方、NP（ノニルフェノール）に関しては、B 処理場では処理による減少の傾向が得られた。

・ 国土交通省調査による全国 47 処理場の中央と比較すると今回調査した処理場の流入水、放流水とも低めの数値となった。

表５　実試料測定結果

	鶴見川 葦穂橋付近	A処理場		B処理場		全国47処理場 中央値	
		流入水	放流水	流入水	放流水	流入水	放流水
NPnEO	<0.05	17	1.4	7.5	<0.05	—	—
NPnEO(n=1～4)	本法では分離定量せず、総NPnEOとして測定					28	0.7
NPnEO(n≧5)						81	0.4
NP	<0.05	<0.05	<0.05	20	<0.05	4.4	0.2
NP3EC	0.37	<0.25	0.38	<0.25	1.5	16	3.1
NP2EC	0.58	<0.25	0.84	0.91	3.3	44	3.1
NP1EC	0.56	<0.25	0.62	0.42	1.6	0.8	0.7

単位：μg/L

（６）LC/MS への適用（別添６参照）

HPLC では分離定量が難しい NPnEO を個別定量することを目的として、上記の前処理サンプルをそのまま LC/MS に適用することを試みた。分析条件を表６に示す。

表６　LC/MS 分析条件

・LC 条件
HPLC :　Agilent HP1100Series
Column : Shodex JJ-50 4D (4.6×150mm)
Eluent : 25mMCH3COONH4 : CH3CN＝50:50
Flow rate : 0.6mL/min
Column Temp. : 40℃
Injection volume : 5uL
・MS 条件
MS : Agilent LC/MSD SL
Ionization : API-ES(positive)
Gas Temp. : 350℃
Drying Gas : 12L/min
Nebulizer gas : 35psi
Vcap : 3000V

Milli-Q®水、河川水、下水処理場流入水、放流水を用いた 1mg/L での NPnEO、NP3EC、NP2EC、NP1EC 添加回収試験によってほぼ 100%の回収率が得られ、HPLC で測定した数値を裏付ける結果となった（図１０参照）。

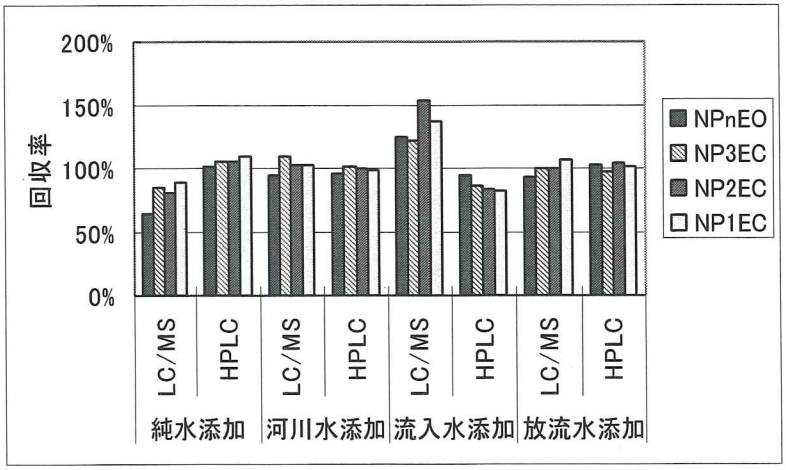


図 10　　添加回収試験比較

また、LC/MS を用いることにより、EO 鎖の分布が明らかになり、定量も可能となった（図１１、１２参照）。

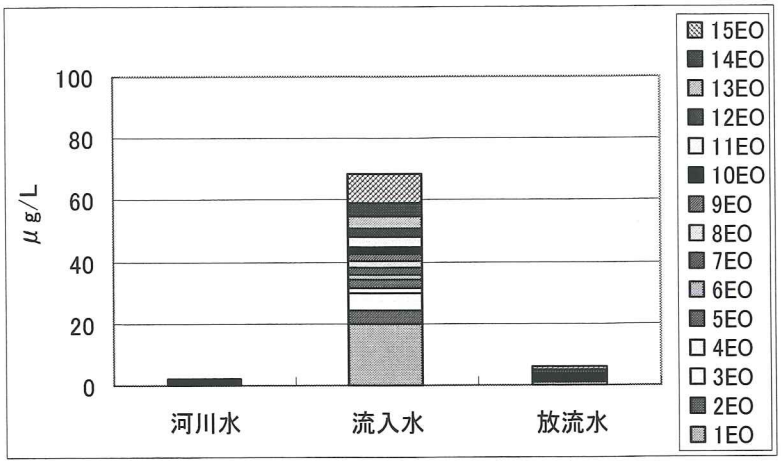


図 11　NPnEO 実測値

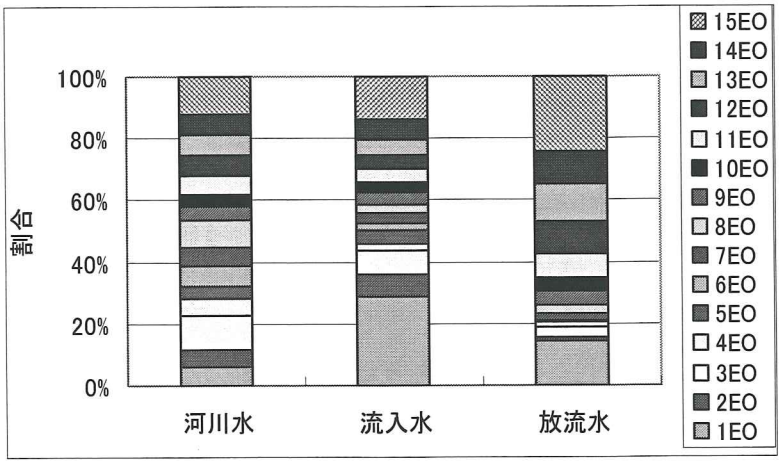


図 12　NPnEO の EO 鎖数別存在比

HPLC と同じ処理試料および同分析カラムを用い、下水などのマトリックスの多い試料にも LC/MS が十分適用できることを確認した（図１３参照）。

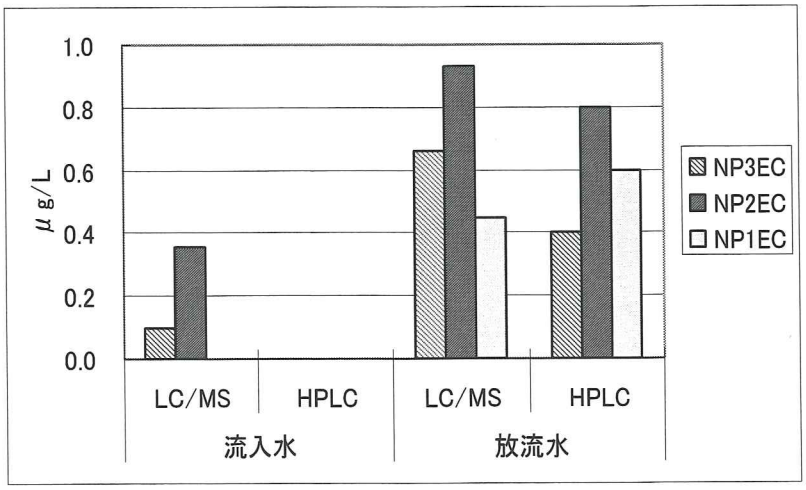


図１３　NPnEC 実試料比較

４．まとめ

ノニルフェノール関連物質の簡易分析法の開発について、HPLC 分析用カラムの検討、前処理条件検討、Milli-Q®水、環境水、下水を用いた添加回収試験、実試料の分析、LC/MS 法の適用などを実施した。

本研究により、従来、それぞれ別法により測定していたノニルフェノール関連物質を同一のカラムで測定する方法を提案することができた。すなわち、今回検討した処理フローでは試料をアルカリ性にすることにより容器やラインへの吸着を防ぎ、また、親水性と疎水性の２つの性質を有する固相カラムを用いることにより、汎用性の高いＨＰＬＣで、NP、NPnEO、NP3EC、NP2EC、NP1EC の同時定量を行うことが可能となった。グラジエント分析を用いれば NPnEO の EO 鎖数の把握が可能であり、さらに LC/MS 分析に適用することにより、EO 鎖数毎の定量が可能となった。

本方法は、調査の目的に合わせた分析方法の選択が可能で、かつ分析方法が簡便なため分析者による個人差も少ないと考えられる。今後実用上の適用範囲を拡大していくためには、より妨害成分含量が多いと考えられる試料（高濃度下水流入水、底質、汚泥、生物）の測定に課題が残っているが、本方法で一斉分析が可能となり、環境中におけるノニルフェノール関連物質の挙動解明が迅速に進むことが期待される。

別添１　HPLC 分析カラムの検討

本研究では、汎用的なＨＰＬＣ／蛍光検出を用いて、ノニルフェノール関連物質（NPnEO、NP、NPnEC）各成分を一括で分離できることを目標に、各々特性を持つ次の 3 種類の分析カラムを検討した。

（１）　Shodex　MSpak　GF-310　4E　（4.6φ×250mm）

充填材：　ポリビニルアルコール系ハードゲル

分離モード：　サイズ分離＋逆相

（２）　Shodex　Asahipak　NH2P-50　4D　（4.6φ×150mm）

充填材：　ポリアミン結合ポリビニルアルコール系ハードゲル

分離モード：　順相

（３）Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

充填材：　微量の第４級アンモニウム基を導入したポリビニルアルコール系ハードゲル

分離モード：　サイズ分離＋逆相＋陰イオン交換

（１）Shodex　MSpak GF-310 4E（4.6φ×250mm）

このカラムの充填材はポリビニルアルコール系ハードゲルを使用しており、使用する溶離液の極性によって、脂質などの高分子をサイズ分離的に溶出させ、同時に低分子物質を逆相的に溶出することが可能である。コーンオイル、その他との分離を目的として検討を行った。

○検討試料

NPnEO（n≒2）、（n≒5）、（n≒10）、（n≒20）	林純薬工業製
NP	〃
NPnEC（n=1,2,3）	〃
コーンオイル	SIGMA 製
イオウ	和光純薬製

アセトニトリルで 100ppm に調整後、HPLC 溶離液にて 1ppm に希釈して検討用試料とした。

○測定条件

Column　：　Shodex　MSpak　GF-310　4E　（4.6φ×250mm）

Eluent　：　（アイソクラティック分析）

CH_3CN／50mM CH_3COONH_4 aq.　＝　90／10

（グラジエント分析）

A CH_3CN

B H_2O

A／B ＝26／74（0min）→ 50／50（26min）→ 90／10（7min）

→ 90／10（15min）

Flow : 0.3mL/min

Detector : （アイソクラティック分析）

UV(220nm)

（グラジエント分析）

Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)

Col.Temp : 40℃

1）検討内容

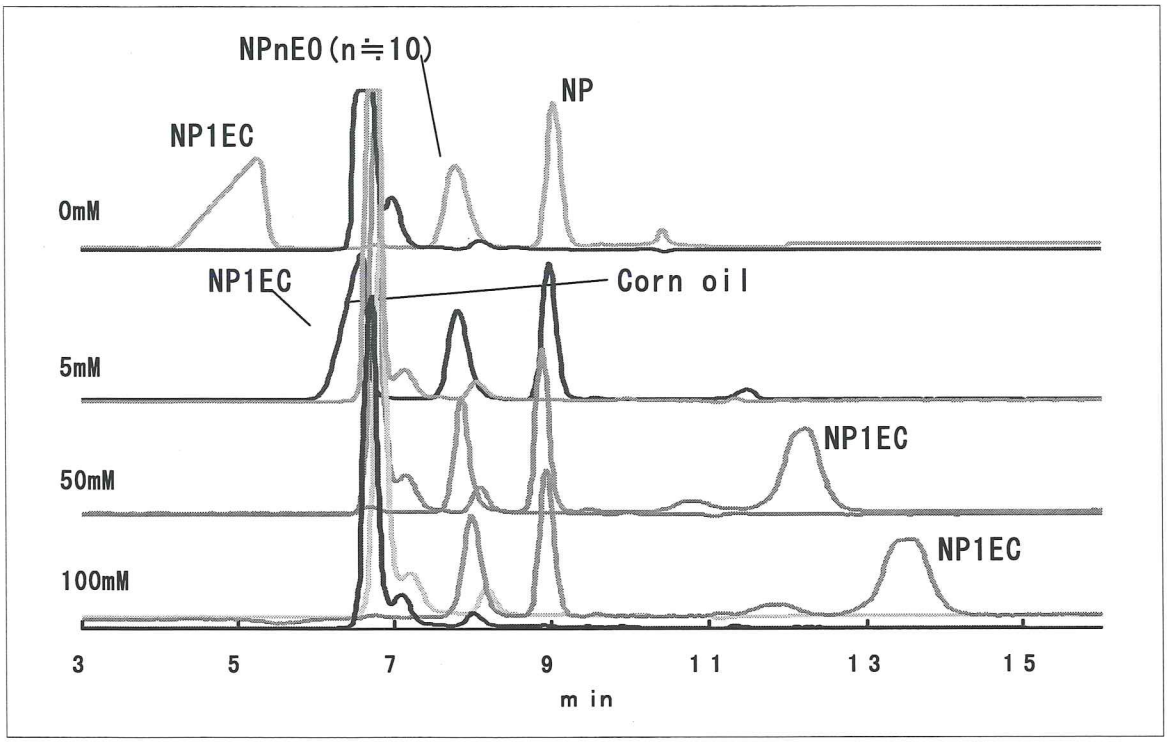
○溶離液の塩濃度の影響

中性物質であるNPnEO（n≒10）、NP、コーンオイルは溶離液中の塩濃度の影響を受けず、保持時間は変わらなかった。塩濃度を上げることにより、塩析効果による溶解度の低下が、これらの中性物質の相対的な疎水性の変化（上昇）を起こすはずであるが、溶離液中に９０％の有機溶媒が存在したために、クロマト上の溶出位置が変動するほど相対的な疎水性が変化しなかったものと思われる。

これに対して､酸性物質であるNP1ECは溶離液中の塩濃度により溶出位置が大きく変化した。すなわち、溶離液中の塩によりNPnECはその相対的な疎水性が大きく変化したわけである。

溶離液中に塩が存在しない場合、NP1ECはイオン排除のピーク形状を示した。この現象から、NP１ECは溶離液中に有機溶媒が９０％存在するにかかわらずカルボキシル基が乖離し（マイナス電荷をもつ)、充てん材のもつマイナス電荷との間にイオン反発を起こしたものと思われる。充てん材自体のマイナス電荷には、流体内でポリマー系充てん材が帯びている静電気の可能性が考えられる。

また、NP1ECは、溶離液中の塩濃度が高くなるにしたがって溶出位置が遅れた。塩濃度が高くなるにしたがって、塩析効果による溶解度の低下が起こり、その結果生じたNP1ECの相対的な疎水性の変化（上昇）が、充てん材への保持力強化に繋がったものと思われる。　（図－別1.1）



図－別 1.1　塩濃度の影響

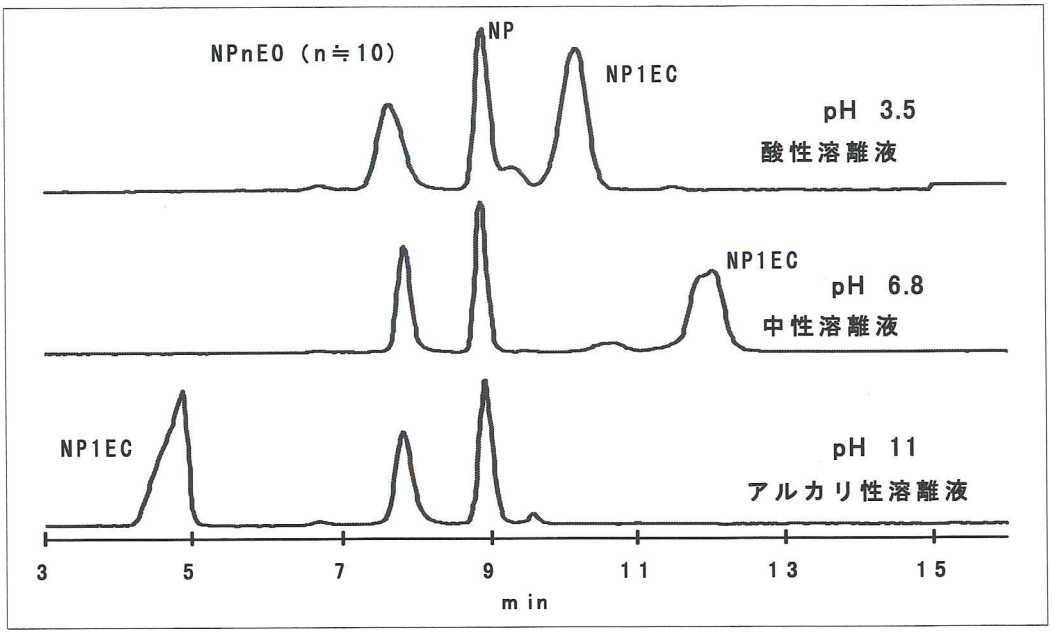
○溶離液の pH の影響

次に、溶離液の塩濃度が５０mMの場合のｐＨの影響を調べた。

中性物質である NPnEO（n≒10）、NP は溶離液の pH の影響を受けず、保持時間は変わらなかった。これに対して酸性物質である NP1EC は、アルカリ性溶離液の場合、イオン排除のピーク形状を示した。溶離液中には有機溶媒が９０％存在するにもかかわらず、アルカリ性条件下では NP１EC のカルボキシル基が強く解離し（マイナスの電荷をもつ）、これが、充てん材のもつマイナス電荷（静電気）との間にイオン反発を起こしたものと思われる。

一方、酸性溶離液条件下では、NP１EC は解離が抑えられることにより溶解度が下がり、その結果、相対的に疎水性が強まる。単純に考えれば中性溶離液の場合よりも相対的な疎水性が高くなるため、溶出位置が遅れるものと予想されたが、溶離液中の有機溶媒濃度が９０％と高いため、１０分付近に溶出された。

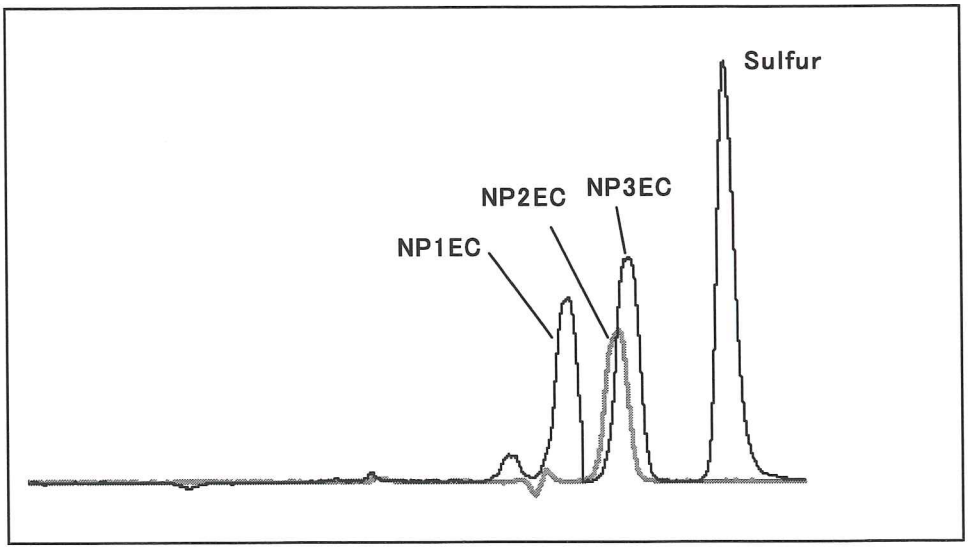
酸性溶離液に比べて、中性溶離液で NP1EC の溶出が遅れた理由としては、NP1EC 単独での疎水性に起因する分配吸着モードだけでは説明がつかない。本条件下で、溶離液中の酢酸アンモニウムと NP1EC がコンプレックスを形成し、このコンプレックスがＮＰ１ＥＣ単独の場合よりもより強い疎水性を示した可能性がある。（図－別 1.2）



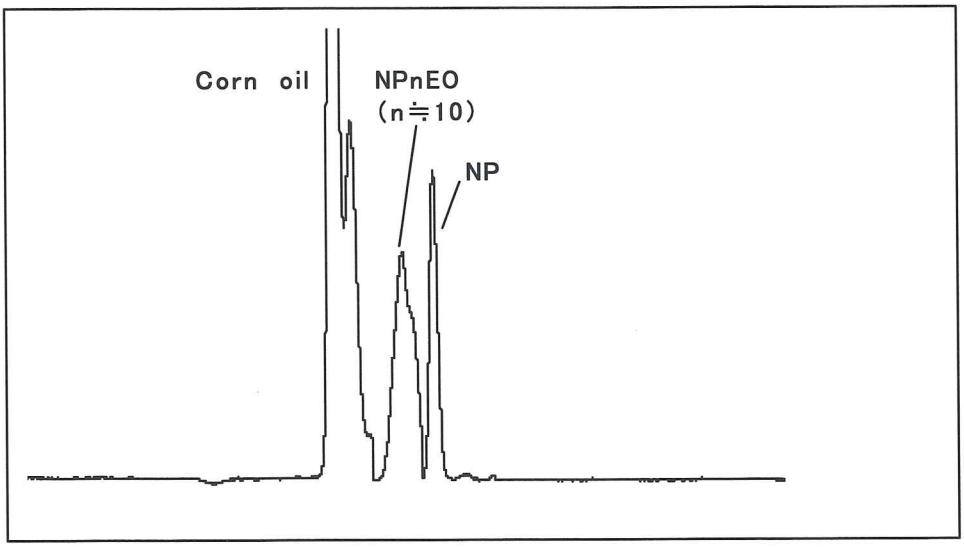
図－別 1.2　溶離液の pH の影響

2）検討結果

上記の知見を元に、各種の塩濃度、ｐＨでの分離を試みところ、NPnEO、NP の分離は可能（塩濃度 50mM、pH6.8）であった。ただし、本カラム（GF-310）は、基本的にサイズ分離のカラムであり、EO 鎖長１つずつの違いである NP1EC, NP2EC, NP3EC の相互分離は難しいことがわかった。（図－別 1.3.1～2）

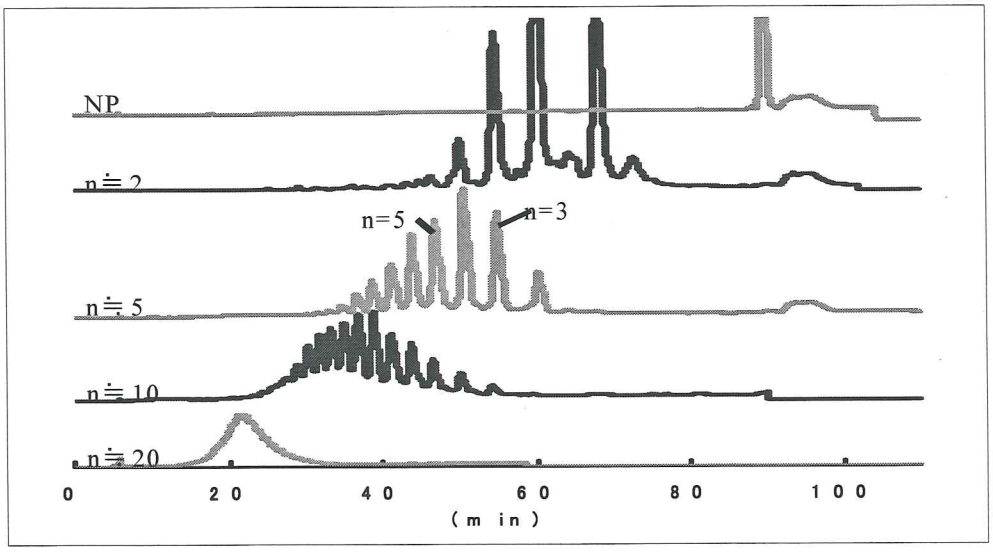


図－別 1.3.1　分離の確認①



図－別 1.3.2　分離の確認②

ただし、同カラムはグラジエント分析条件にすることにより、EO 鎖数毎の分離が可能であることがわかった。この条件では、EO 鎖が長く、親水性が高い順に溶出してくる。（図－別 1.4）



図－別 1.4　グラジエント分析（NPnEO）

（2）Shodex　Asahipak　NH2P-50 4D（4.6φ×150mm）

このカラムはポリアミン結合のポリビニルアルコール系ハードゲルの充填材を用いた順相系のカラムであり、前項において行った NPnEO の EO 鎖数毎の分離（逆相系）を確認するため、順相系でのグラジエント分析検討を行った。

○検討試料

NPnEO（n≒2）、（n≒5）、（n≒10）、（n≒20）（林純薬工業製）をアセトニトリルで 100ppm に調整後、HPLC 溶離液にて 1ppm に希釈して検討用試料とした。

○測定条件

Column　：　Shodex　Asahipak　NH2P-50　4D　（4.6φ×150mm）

Eluent　：　A　Hexane／IPA＝98／2

B　IPA／H_2O＝90／10

A／B　＝99／1（0min）→ 45／55（43min）→ 20／80（10min）

→ 90／10（15min）

Flow　：　1.0mL/min

Detector　：　Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)

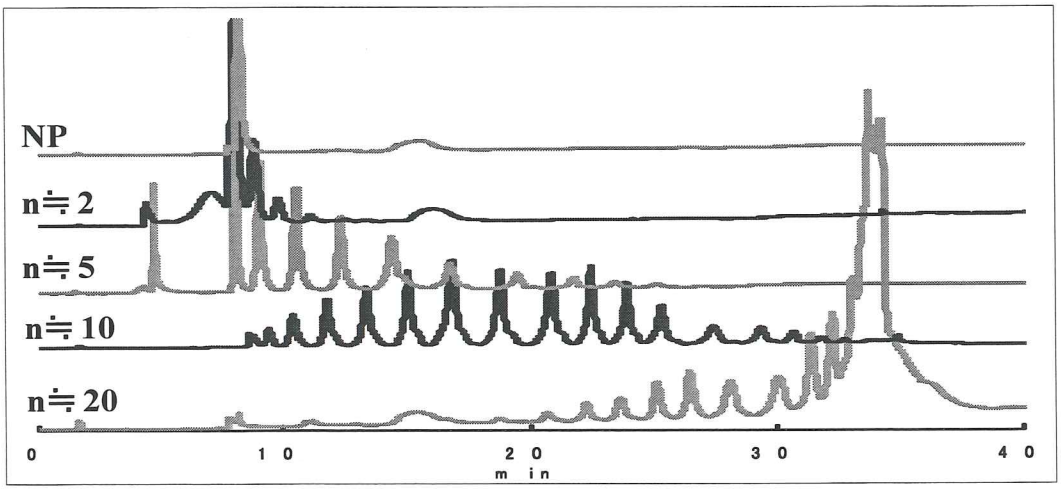
Col.Temp　：　30℃

1）検討内容

（1）の逆相系のカラムに対して、順相系の本カラムがグラジエント分析により、どの程度 NPnEO（n≒10）の EO 鎖毎の分離が可能かについて検討した。

2）検討結果

グラジエント分析によって、EO 鎖毎の分離が可能であることがわかった。（1）のカラムとは逆に EO 鎖が短く、疎水性が高い順に溶出してくるため、両者を比べることにより、存在比を確認をすることができる。 ただし、NP との分離が不充分なため、今回の目的においては利用し難い。（図－別 2.1）



図－別 2.1　グラジエント分析（NPnEO）

（3）Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

本カラムは充てん材の基本骨格に、GF-310（ポリビニルアルコール系ハードゲル）を用いており、中性物質である NPnEO、NP の逆相分離に加え、微量に導入した第 4 級アンモニウム基（陰イオン交換基）による酸性物質 NPnEC の相互分離を目指した。

○検討試料

NPnEO（n≒10）	林純薬工業製
NP	〃
NPnEC（n=1,2,3）	〃

アセトニトリルで 100ppm に調整後、HPLC 溶離液にて 1ppm に希釈して分析用試料とした。

○測定条件

Column　：　Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

Eluent　：（アイソクラティック分析）

CH_3CN／25mM CH_3COONH_4（pH9.2）　＝　50／50

（グラジエント分析）

A　CH_3CN

B　25mM CH_3COONH_4（pH9.2）

A／B　＝25／75（0min）→ 50／50（15min）→ 50／50（70min）

→ 90／10（15min）

Flow　：（アイソクラティック分析）

0.6mL/min

（グラジエント分析）

0.5mL/min

Detector　：（アイソクラティック分析）

UV(220nm)

（グラジエント分析）

Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)

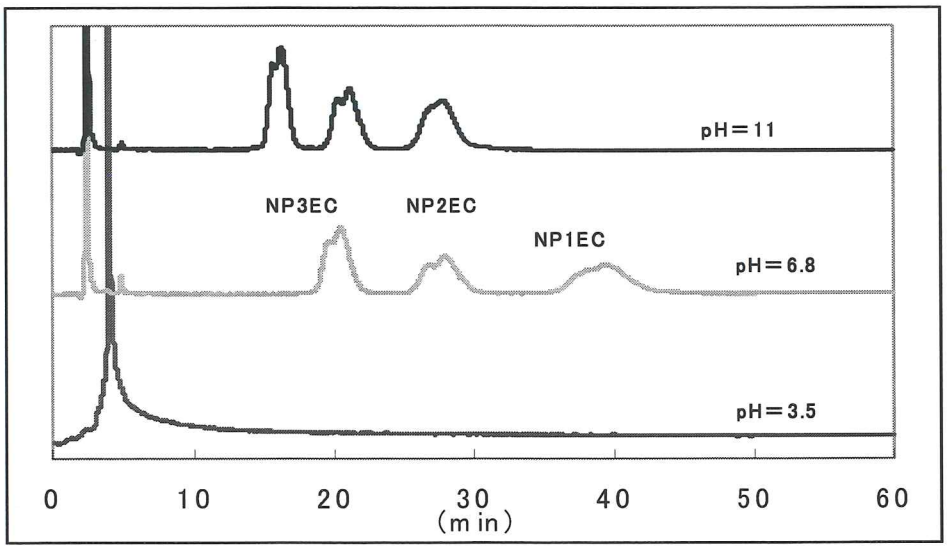
Col.Temp　：　40℃

1）検討内容

溶離液の pH を 3.5、6.8、11 とかえて NP1EC、NP2EC、NP3EO を分析し、最適 pH 条件を確認した。また、グラジエント分析により、NPnEO（n≒10）の分析を行い、EO 鎖毎の分離について検討した。

2）検討結果

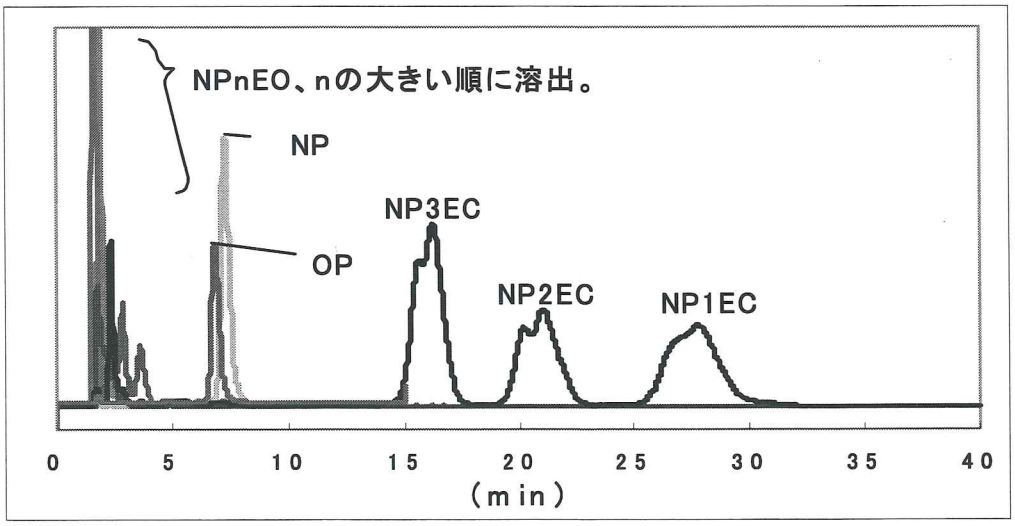
pH を上げることにより、NPnEC の検出が良くなることを確認できた。（図－別 3.1）



図－別 3.1　溶離液の pH の影響(NPnEC)

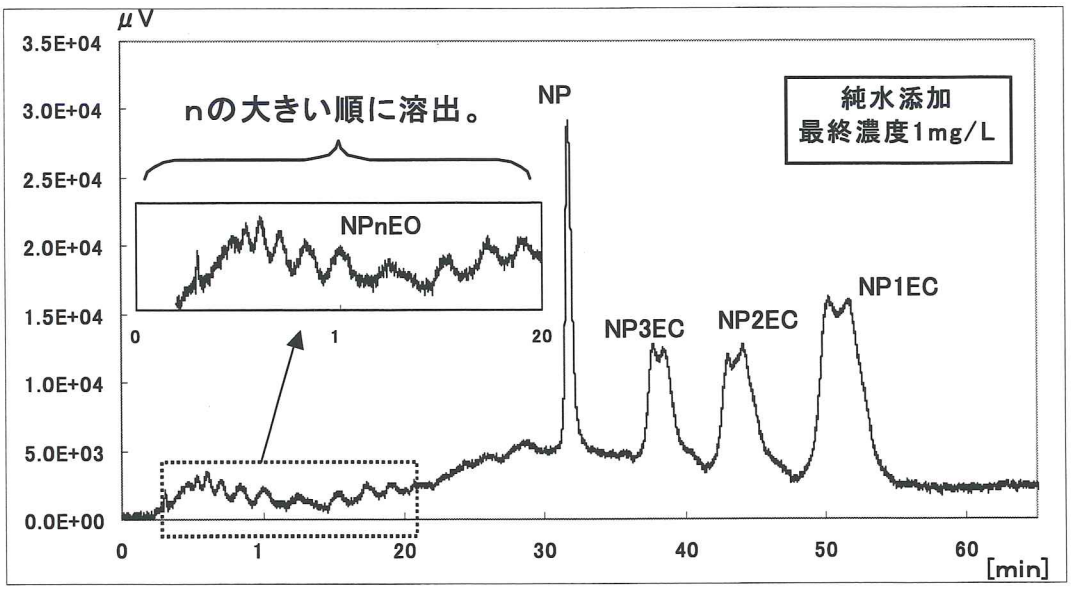
アルカリ条件下で、NPnEO、NP、NP3EO、NP2EO、NP1EO が分離できることを確認できたが、アイソクラティック分析では NPnEO の EO 鎖数毎の分離はできなかった。（図－別 3.2）

図－別 3.2　最適条件下での各成分の分離



以上より、グラジエント分析により NPnEO の EO 鎖毎の分離が可能であるかを検討し、

その結果、分離はある程度可能であることが確認できた。この条件では EO 鎖が長く、親水性が高い順に溶出してくる。（図－別 3.3）分離が十分ではないため EO 鎖数毎の定量は難しいが、鎖数の変化の傾向をつかむことは可能と考えられる。

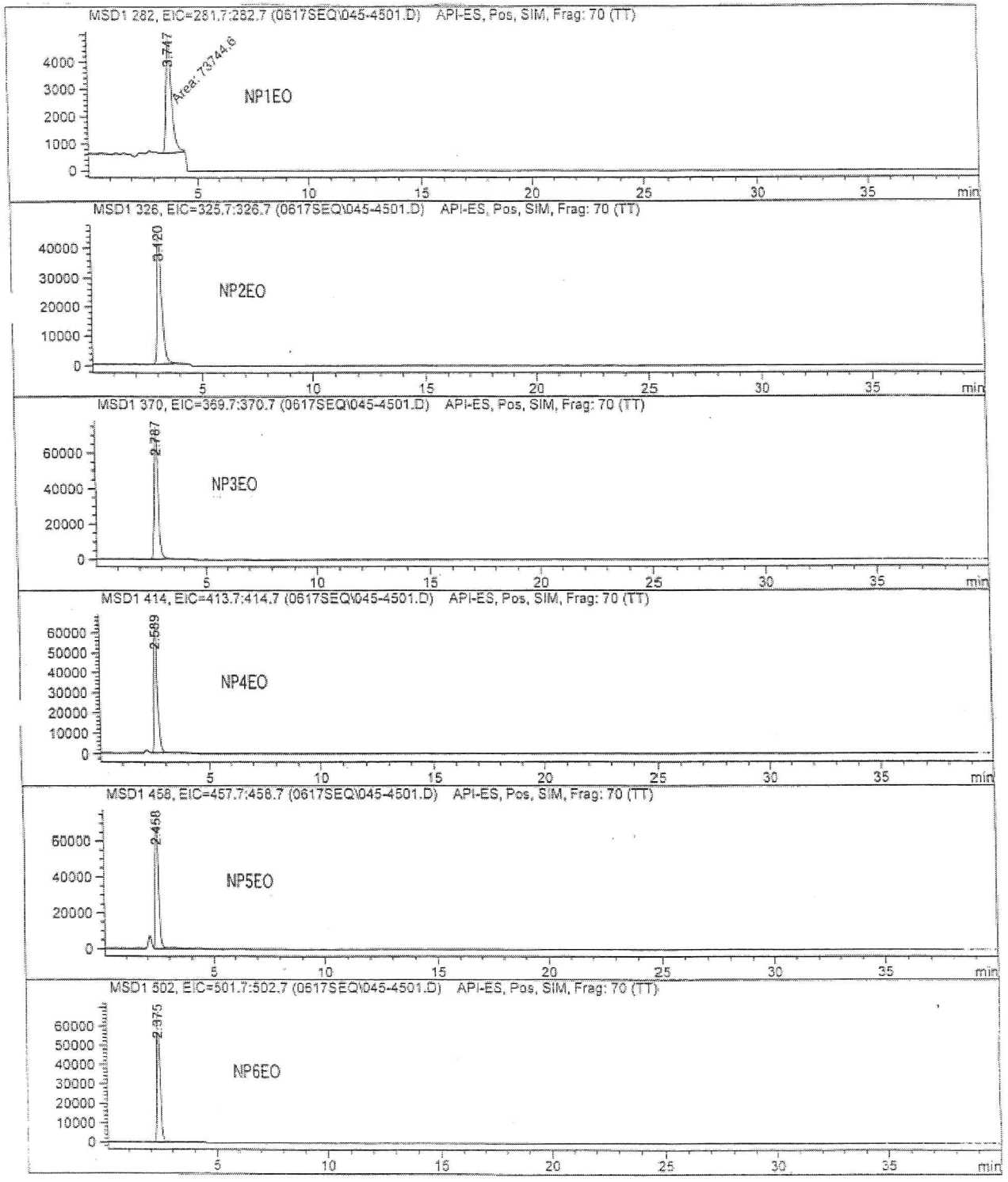


図―別 3.3　グラジエント分析による全成分の分離

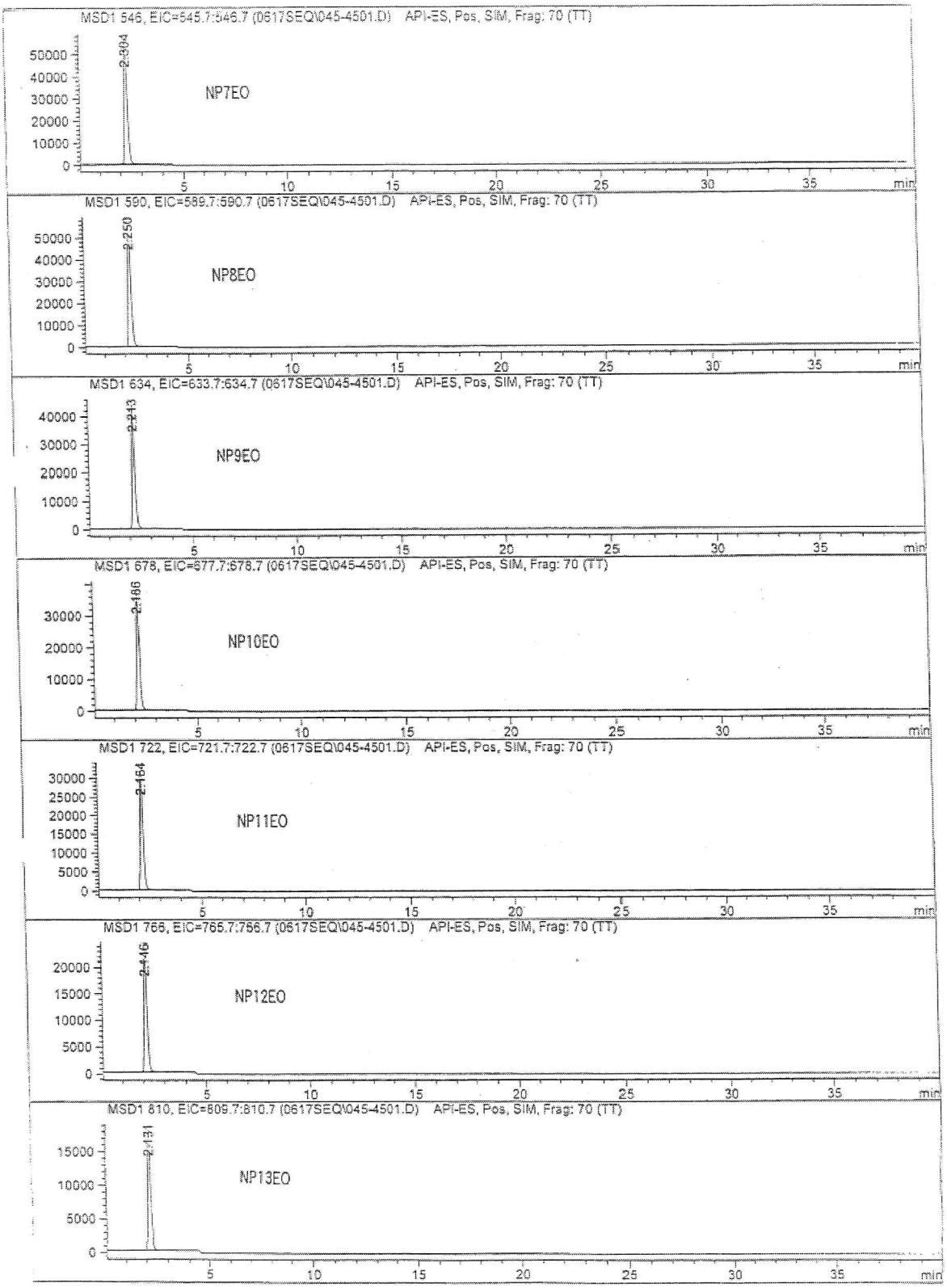
◇まとめ

各成分の一括分離を目標に 3 種のカラムの検討を行った。そのなかで第 4 級アンモニウム基を導入したポリビニルアルコール系ハードゲルを充填したカラム（Shodex　RSpak JJ-50　4D）がより分離能が高いことが確認できた。理由として、充填材基材自体の極性による分配吸着モードと、第 4 級アンモニウム基によるイオン交換モードが各成分の分離に寄与したものと考えられた。なお、NPnEO の EO 鎖数毎の分離については、グラジエント分析である程度の分離ができるため、増減の傾向をつかむことは可能であることも確認できた。

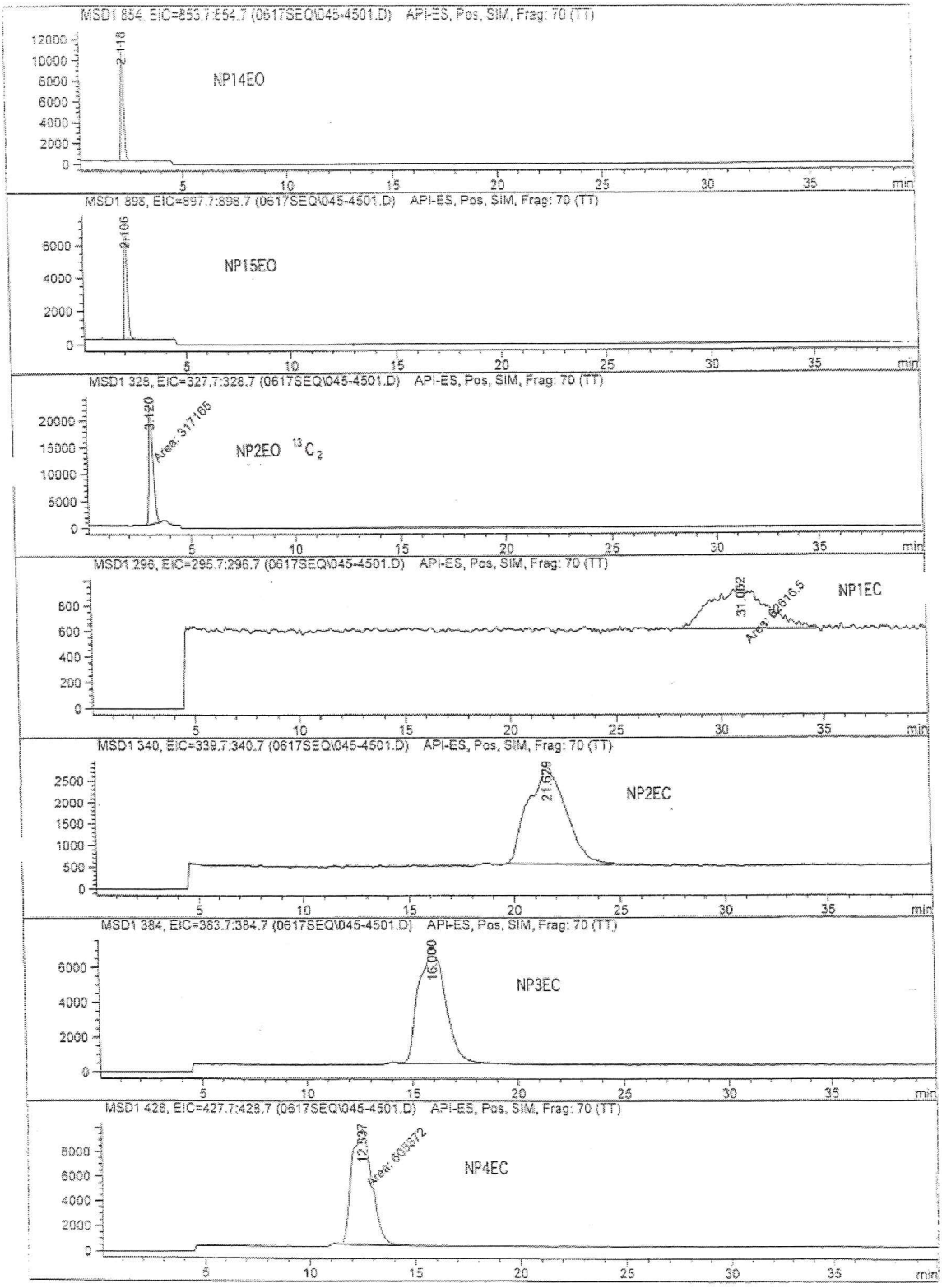
別添２　定量下限値および検量線



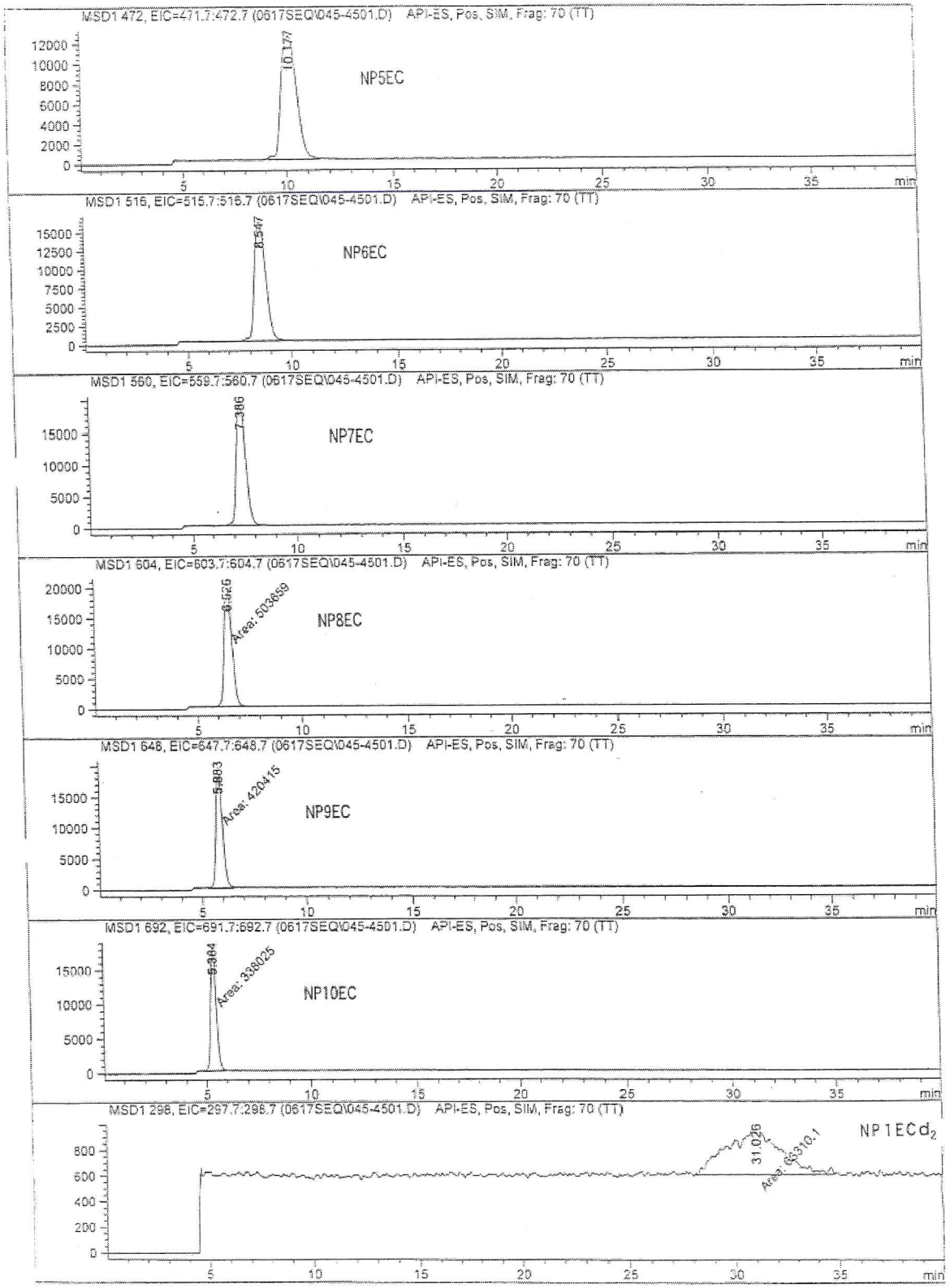
図－別 2.1　LC/MS 分析チャート①



図－別 2.2　LC/MS 分析チャート②



図－別 2.3　LC/MS 分析チャート③

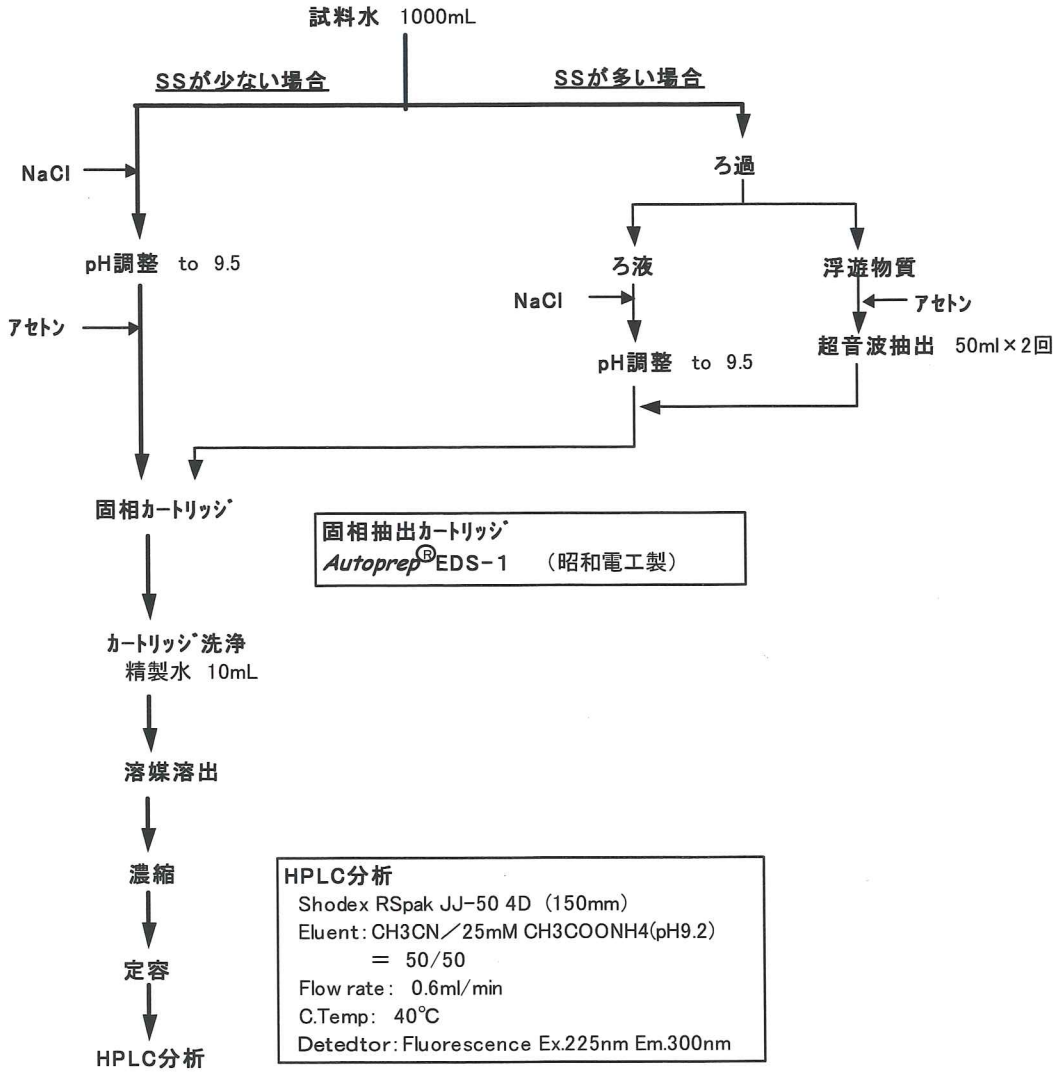


図－別 2.4　LC/MS 分析チャート④

別添３　前処理法の検討

ノニルフェノール関連物質は、目的物質の疎水性を相対的に高めて固定相に保持させるという原理を利用するため、酸性条件下での固相抽出カートリッジ捕集が行われてきたが、この方法では、容器やラインに吸着することによるロスが生じる。そこで、それらロスを防ぐためにアルカリ性条件での固相カートリッジ捕集を試みた。また、公定法で使用されている、疎水性物質の吸着力が強いスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填したカートリッジでは、疎水性妨害物質の分離が十分行えないという経験から、高分子疎水性物質（妨害物質）を排除すると同時に、NPnEO、NP および、親水性の高い NPnEC を同時に濃縮することを目的として、ジビニルベンゼン骨格にポリＮ－ビニルアセトアミドを導入した充填材のカートリッジを用いて条件検討を行った。

前処理フロー



（1）検討内容

1）カートリッジへの負荷液の塩（NaCl）濃度

2）SS(浮遊固形物)抽出溶媒

3）カートリッジへの負荷液の溶媒濃度

4）カートリッジからNP類を溶出する溶媒

なお、カートリッジへの負荷液のpHは、測定物質のイオン化を促して容器への付着ロスを抑えるためにアルカリ（pH9.5）とした。

1）カートリッジへの負荷液の塩（NaCl）濃度

親水性が高く捕集しにくいNPnECの回収率を上げるのと同時に、実試料では塩濃度が不明であるため、ある程度の濃度に調整する目的で試料水へNaClを添加、その最適な添加濃度の検討を行った。

○試薬

NP1EC	林純薬工業製
NP2EC	〃
NP3EC	〃

アセトニトリル（少量のメタノールを添加）で100ppmに調整後、混合、各10ppmとなるようアセトニトリルで調整してNPnEC STDとした。

○試料

Milli-Q®水

○固相抽出カートリッジ

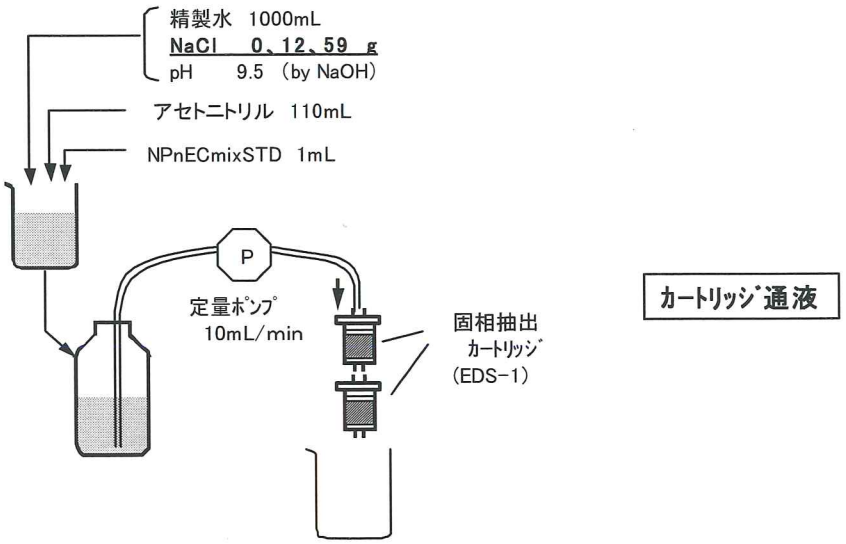
Autoprep® EDS-1　（昭和電工製）　※充填量　500mg

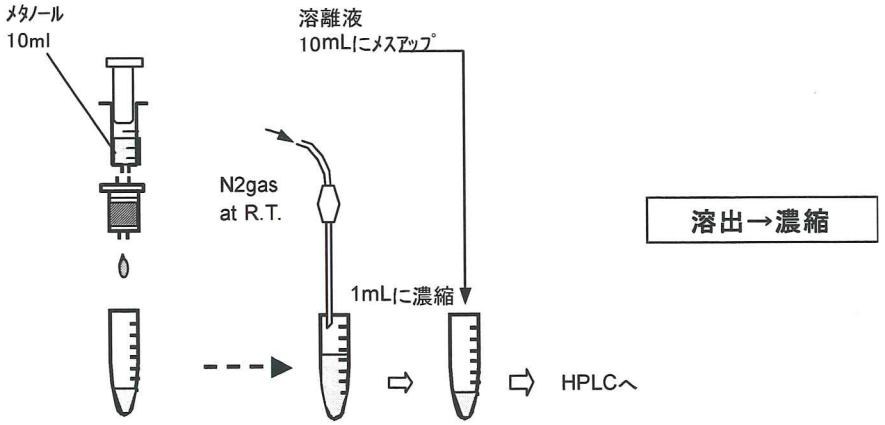
○測定条件

Column	:	Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）
Eluent	:	CH_3CN／25mM CH_3COONH_4　（pH9.2）　＝　50／50
Flow	:	0.6mL/min
Detector	:	Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)
Col.Temp	:	40℃

○手順

Milli-Q®水1000mLにNaClを0、200、1000mMとなるよう添加、NaOHにてpHを9.5に調整した。アセトニトリルを約10%となるように加えた後、NPnEC STDを1mL添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて10mL/minの速度で通液した後、カートリッジをMilli-Q®水10mLで洗浄した。10mLのメタノールでカートリッジからNP類を溶出し、N_2を緩やかに吹き付けて1mLまで濃縮した後、溶離液で10mLに定容して分析サンプルとした。





○検討結果

回収率の結果より、カートリッジに負荷する液の NaCl 濃度は 200～1000mM の範囲であれば良いことがわかった。(表－別 3.1) 本研究では、1000mM の添加することとした。

表－別 3.1　NPnEC (n＝1、2、3) の添加回収率

NaCl 濃度	0mM	200mM	1000mM
回収率(%)			
NP3EC	89	104	98
NP2EC	73	102	100
NP1EC	50	105	99

2）カートリッジへの負荷液の溶媒濃度の検討

SS を含む環境水（河川水、下水流入水等）中の NP 類を測定する場合、固相抽出前に、ろ過した SS の有機溶媒超音波抽出を行い、抽出した液（溶媒）はろ液と合わせてカートリッジに通液する。一方、SS が少ない試料の場合は SS 抽出操作を行わないが、条件をそろえるため、カートリッジ通液前に同量の溶媒を試料に添加する。SS 抽出に使用する溶媒量が少ないと抽出効率が下がるが、ろ液に添加する溶媒が多過ぎると NP 類のカートリッジ捕集率が下がる。そこで、NP 類の捕集率に影響が出ない溶媒濃度を検討した。

○試薬

NP	林純薬工業製
NP1EC	〃
NP2EC	〃
NP3EC	〃

アセトニトリル（NPnEC は少量のメタノールを添加）で 100ppm に調整後、混合、各 10ppm となるようメタノールで調整して mixSTD とした。

○試料

Milli-Q®水

○固相抽出カートリッジ

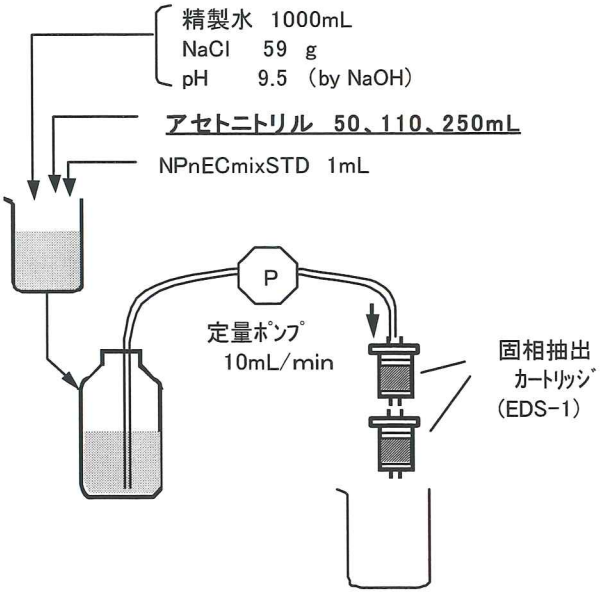
Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　※充填量　500mg

○測定条件

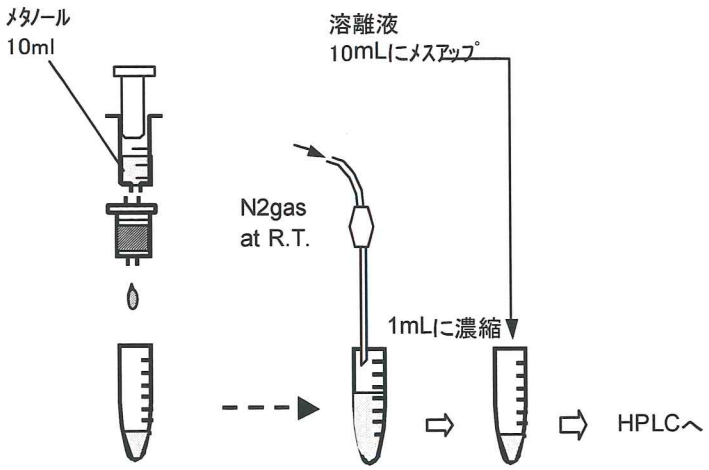
1）と同じ。

○手順

Milli-Q®水 1000mL に NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整した。アセトニトリルを 5、10、20%となるように加えた後、mix STD を 1mL 添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。10mL のメタノールでカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 1mL まで濃縮した後、溶離液で 10mL に定容して分析サンプルとした。



カートリッジ通液

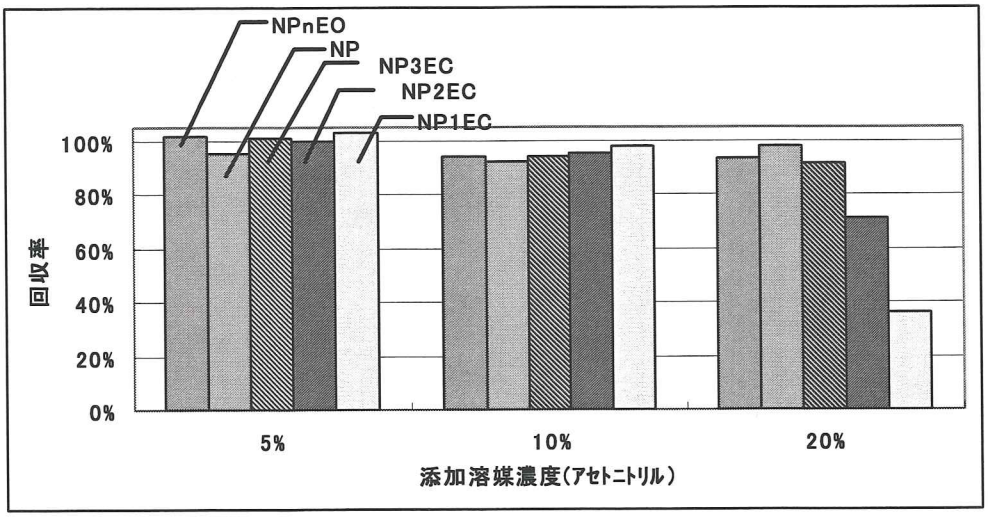


溶出→濃縮

○検討結果

カートリッジに負荷する液の溶媒濃度が試料に対して 10%以下であれば、NP 類の回収率に影響はみられなかった。20%となると、NPnEC の回収率が下がり、NP2EC で 70%、NP1EC では 40%程度となった。(図－別 3.1)　本研究では試料に対して 10%以下となるよう溶媒を添加することとした。　これにより実試料を測定する際、SS 抽出溶媒を試料(ろ液)に加える前に濃縮する手間を省くことが可能となる。(試料 1L あたり SS 抽出溶媒として 100mL を使用、濃縮せずに試料(ろ液)に混合する。)

	添加溶媒濃度		
	5%	10%	20%
NPnEO	102%	94%	94%
NP	96%	92%	98%
NP3EC	101%	94%	92%
NP2EC	100%	95%	71%
NP1EC	103%	98%	36%



図－別 3.1　NP 類の添加回収試験　－添加溶媒濃度の影響－

3）SS(浮遊固形物)抽出溶媒の検討

SS を含む環境水（河川水、下水流入水等）中の NP 類を測定する場合、固相抽出前に、ろ過した SS の有機溶媒超音波抽出を行う。抽出に用いる溶媒としてアセトニトリル、アセトン、メタノールのうち、妨害物質の影響を受けにくいものを検討した。

○試薬

NPnEO（n≒10）	林純薬工業製
NP	〃
NP1EC	〃
NP2EC	〃
NP3EC	〃

アセトニトリル（NPnEC は少量のメタノールを添加）で 100ppm に調整後、混合、各 10ppm となるようメタノールで調整して mixSTD とした。

○試料

神奈川県　鶴見川よりサンプリング

○固相抽出カートリッジ

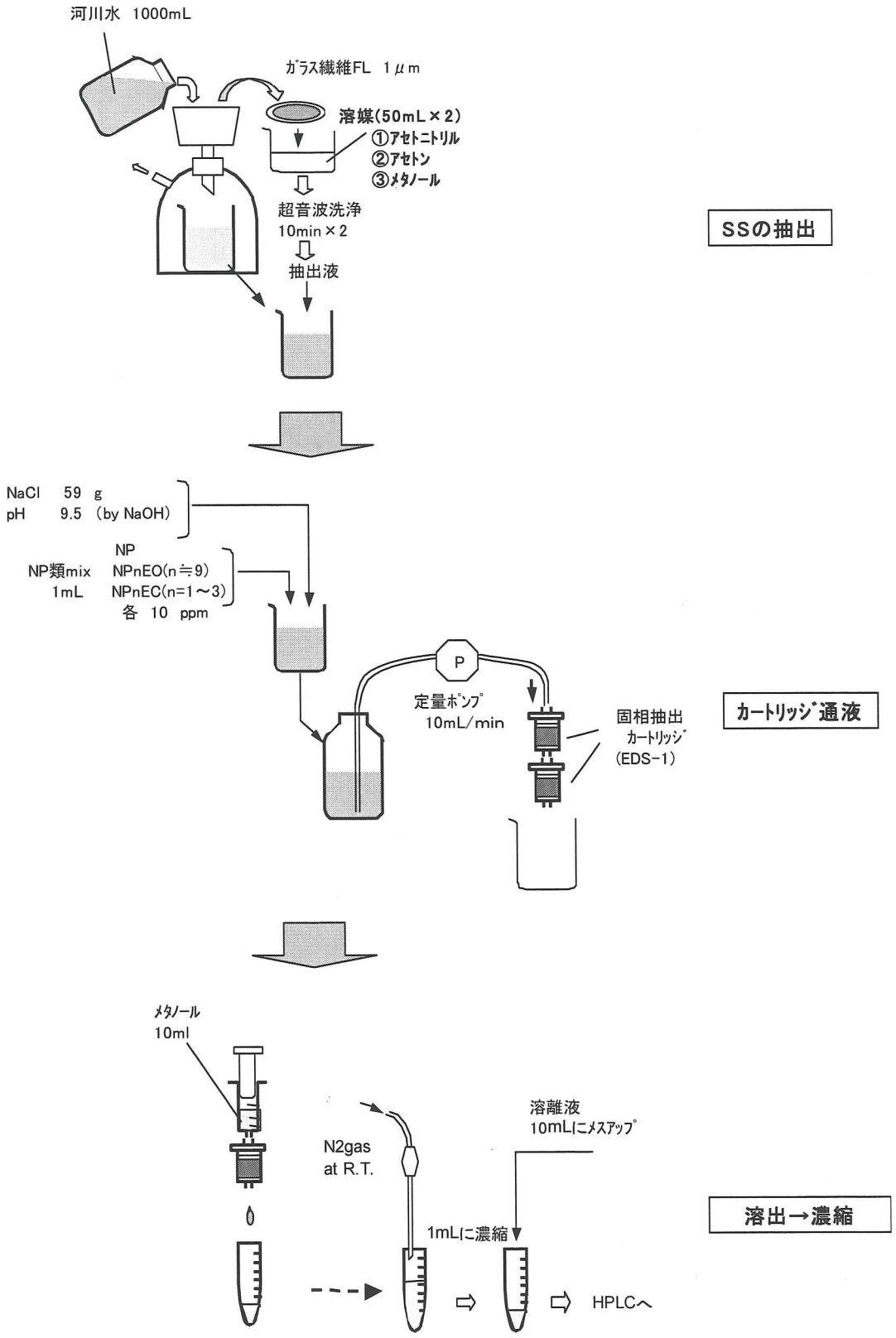
Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　※充填量　500mg

○測定条件

1）と同じ。

○手順

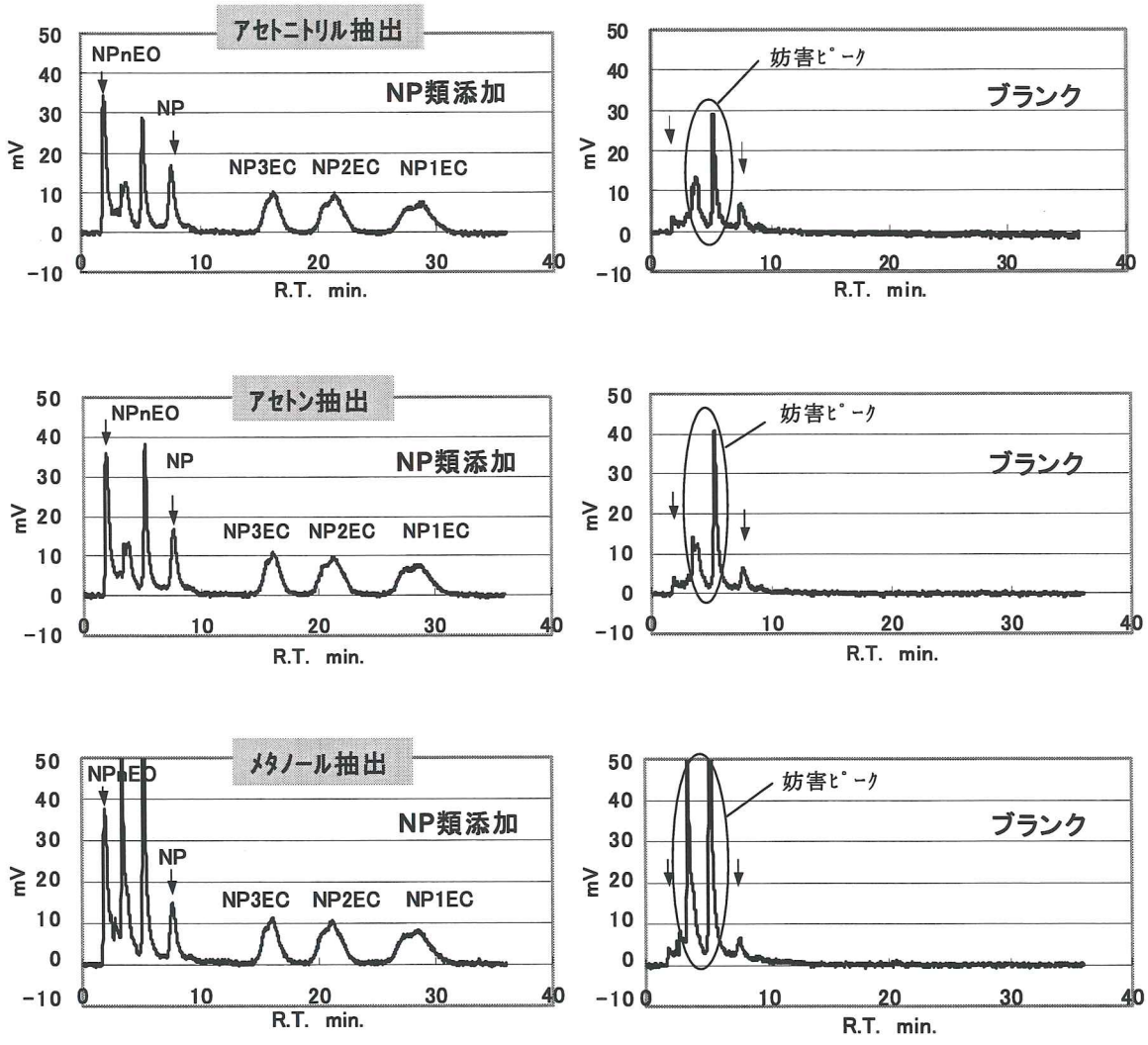
河川水 1000mL をガラス繊維 FL（1μm）で吸引ろ過後、FL を各溶媒（アセトニトリル、アセトン、メタノール）50mL（×2）で超音波抽出（10min×2）した。抽出液をろ液に合わせた後、NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整し、mixSTD を 1mL 添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。10mL のメタノールでカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 1mL まで濃縮した後、溶離液で 10mL に定容して分析サンプルとした。


河川水 1000mL
ｶﾞﾗｽ繊維FL 1μm
溶媒(50mL×2)
①ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ
②ｱｾﾄﾝ
③ﾒﾀﾉｰﾙ
超音波洗浄
10min×2
抽出液
SSの抽出
NaCl 59 g
pH 9.5 (by NaOH)
NP類mix 1mL
NP
NPnEO(n≒9)
NPnEC(n=1～3)
各 10 ppm
P
定量ﾎﾟﾝﾌﾟ
10mL/min
固相抽出
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ
(EDS-1)
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ通液
ﾒﾀﾉｰﾙ
10ml
N2gas
at R.T.
溶離液
10mLにﾒｽｱｯﾌﾟ
1mLに濃縮
HPLCへ
溶出→濃縮

○検討結果

ろ過した SS をいずれの溶媒で抽出したサンプルにおいても、NPnEO、NP のピーク近辺に妨害ピークが見られた。妨害ピークの大きさは、アセトニトリル、アセトンで抽出した場合はほぼ同程度であり、メタノールの場合がやや大きかった。下水試験方法ではアセトンを採用しているため、本研究でもアセトンで抽出することとした。

（図－別 3.2）



図－別 3.2　NP 類添加回収試験　－SS 抽出溶媒による妨害ピークの比較－

4）カートリッジからNP類を溶出する溶媒の検討

A．回収率の検討

通液後のカートリッジからNP類を溶出する溶媒として、メタノール、アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン（THF）のうち、安定した回収率が得られるものを検討した。

○試薬

3）　と同じ。

○試料

Milli-Q®水

○固相抽出カートリッジ

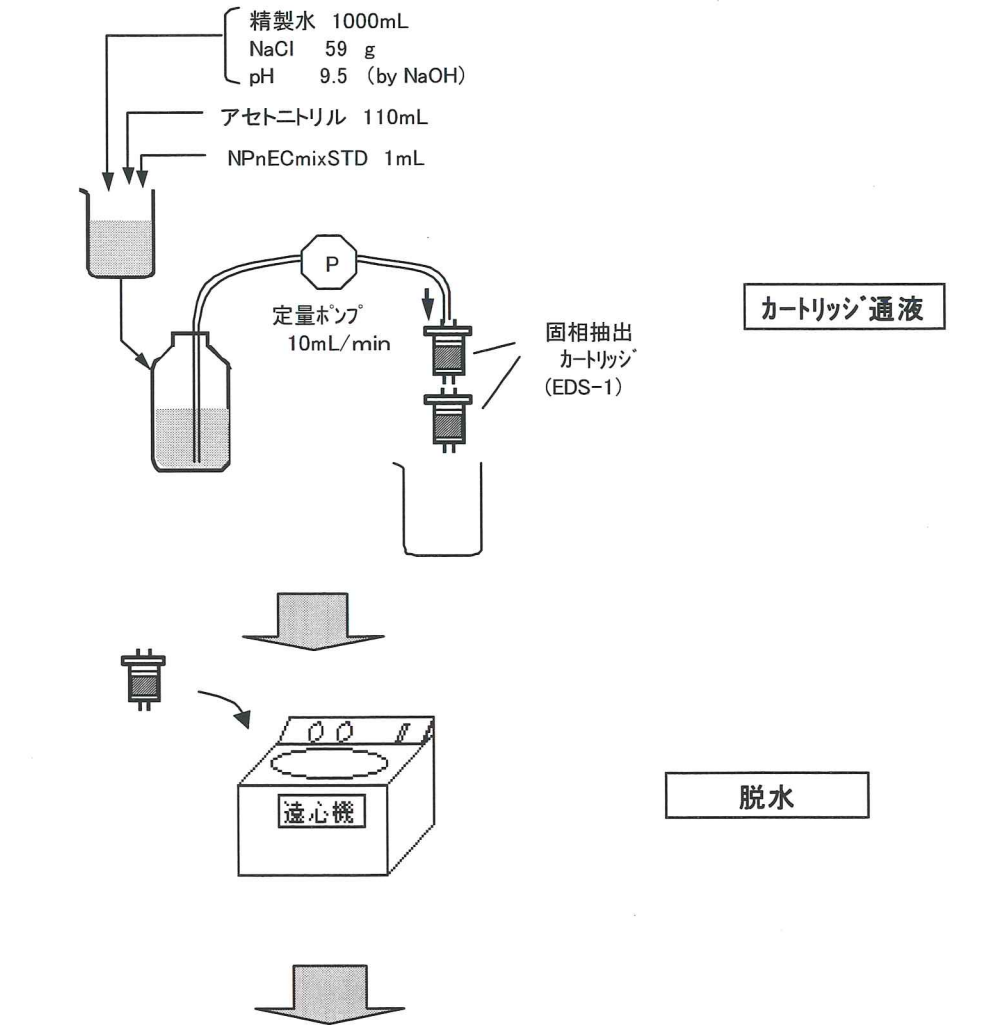
Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　※充填量　500mg

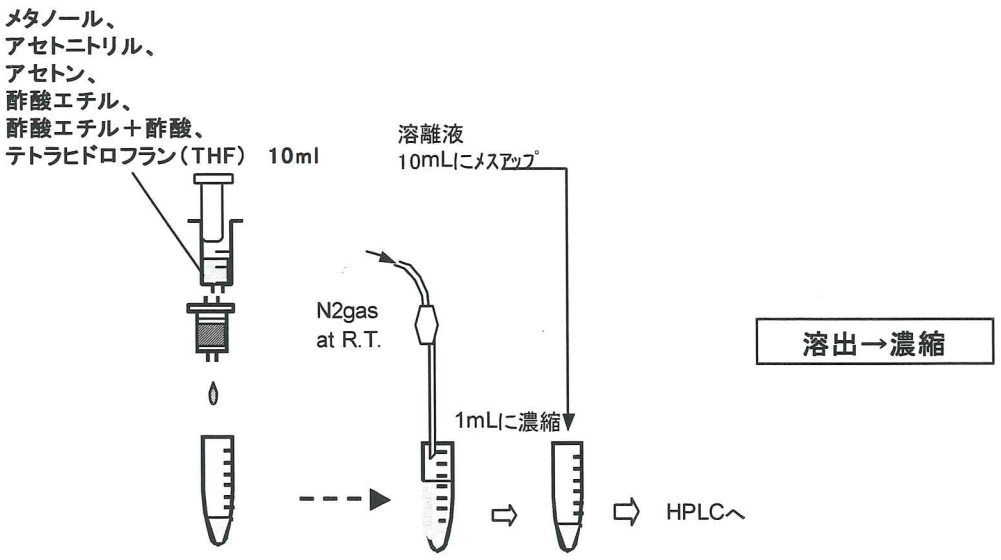
○測定条件

1）と同じ。

○手順

Milli-Q®水1000mLにNaClを1000mMとなるよう添加、NaOHにてpHを9.5に調整し、アセトニトリルを10%となるように加えた後、mix STDを1mL添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて10mL/minの速度で通液した後、カートリッジをMilli-Q®水10mLで洗浄した。メタノール、アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、酢酸エチル＋酢酸、テトラヒドロフラン（THF）の各溶媒10mLでカートリッジからNP類を溶出し、N_2を緩やかに吹き付けて1mLまで濃縮した後、溶離液で10mLに定容して分析サンプルとした。

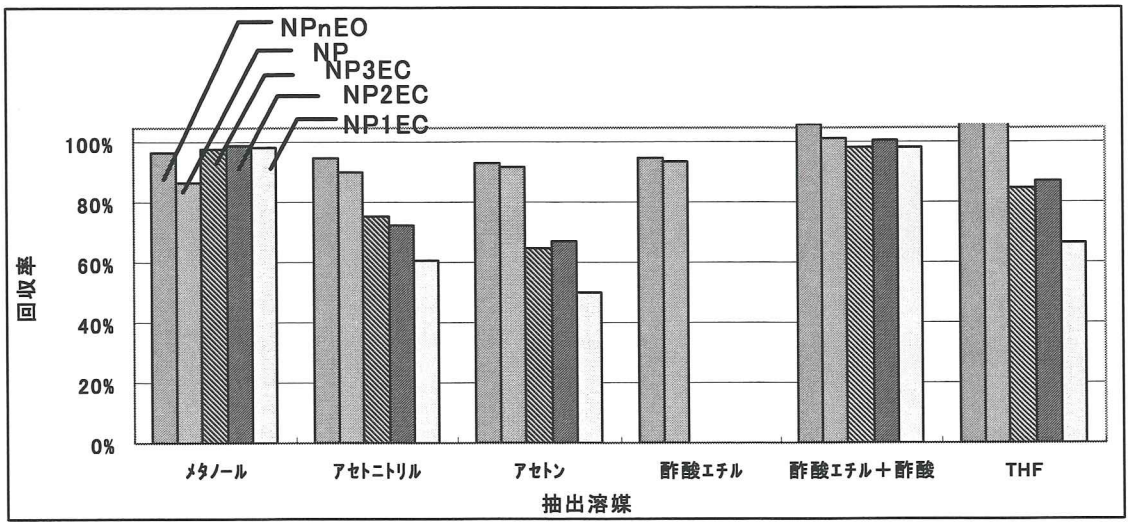

精製水 1000mL
NaCl 59 g
pH 9.5 (by NaOH)
アセトニトリル 110mL
NPnECmixSTD 1mL
P
定量ポンプ
10mL/min
固相抽出
カートリッジ
(EDS-1)
カートリッジ通液
遠心機
脱水


メタノール、
アセトニトリル、
アセトン、
酢酸エチル、
酢酸エチル＋酢酸、
テトラヒドロフラン（THF） 10ml
溶離液
10mLにメスアップ
N2gas
at R.T.
1mLに濃縮
HPLCへ
溶出→濃縮

○検討結果

アセトニトリル、アセトン、THF、酢酸エチルは、NPnEC の回収率が低く、酢酸エチルに少量の酢酸（100mL あたり酢酸 0.3mL）を添加して酸性化した溶媒では、NP、NPnEC ともに安定した回収率が得られることがわかった。（図－別 3.3）

	メタノール	アセトニトリル	アセトン	酢酸エチル	酢酸エチル＋酢酸	THF
NPnEO	97%	95%	93%	95%	106%	109%
NP	87%	90%	92%	94%	101%	109%
NP3EC	98%	75%	65%	0%	98%	85%
NP2EC	99%	72%	67%	0%	101%	87%
NP1EC	98%	61%	50%	0%	99%	67%



図－別 3.3　NP 類の添加回収試験　－抽出溶媒の検討－

B．クリーンアップ効果の検討

回収率が比較的良かったメタノールと酢酸エチル（酢酸添加）について、環境水を試料とした際のクリーンアップ効果の比較を行った。

○試料

神奈川県　鶴見川よりサンプリング

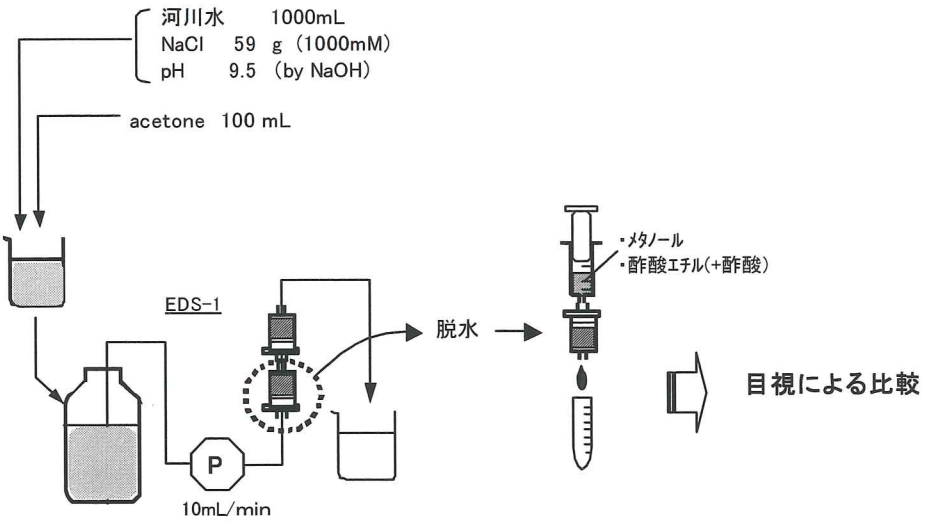
○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　　充填量　400mg

○手順

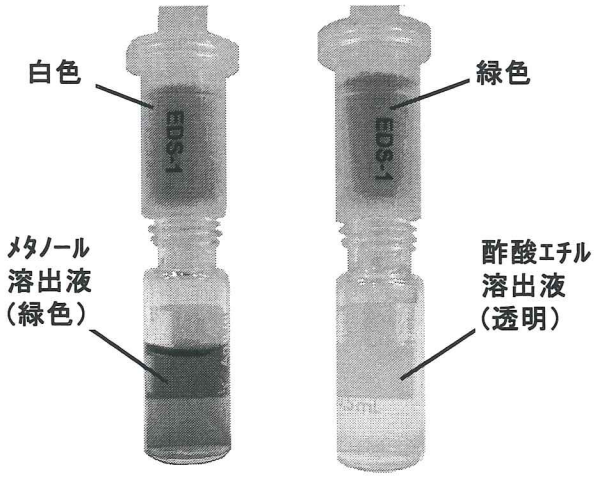
河川水 1000mL に NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整し、アセトンを 10%となるように加え、カートリッジ負荷液とした。予めコンディ

ショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。メタノールおよび酢酸エチル＋酢酸各溶媒 10mL でカートリッジの溶出操作を行い、溶出液の目視比較を行った。



○検討結果

河川水に含まれているクロロフィル等は、カートリッジに捕捉された。その後の NP 関連物質を溶出する溶媒としてメタノールを使用すると、それら着色成分も同時に溶出し、回収液が緑色になった。一方、酢酸エチル（酢酸酸性）の場合、着色成分は溶出されず、液は無色透明で、クリーンアップ効果が確認できた。（図－別 3.4）



図－別 3.4　クリーンアップ効果

◇前処理法の条件検討のまとめ

1）ジビニルベンゼン骨格にポリN－ビニルアセトアミドを導入した充填材のカートリッジを用いることにより、NPnEO、NP および、親水性の高い NPnEC を同時に濃縮することが可能であることがわかった。

2）カートリッジに試料を負荷する際、液の NaCl 濃度は、200～1000mM の範囲であれば NPnEC の回収率は問題がなかった。本研究では 1000mMとすることとした。

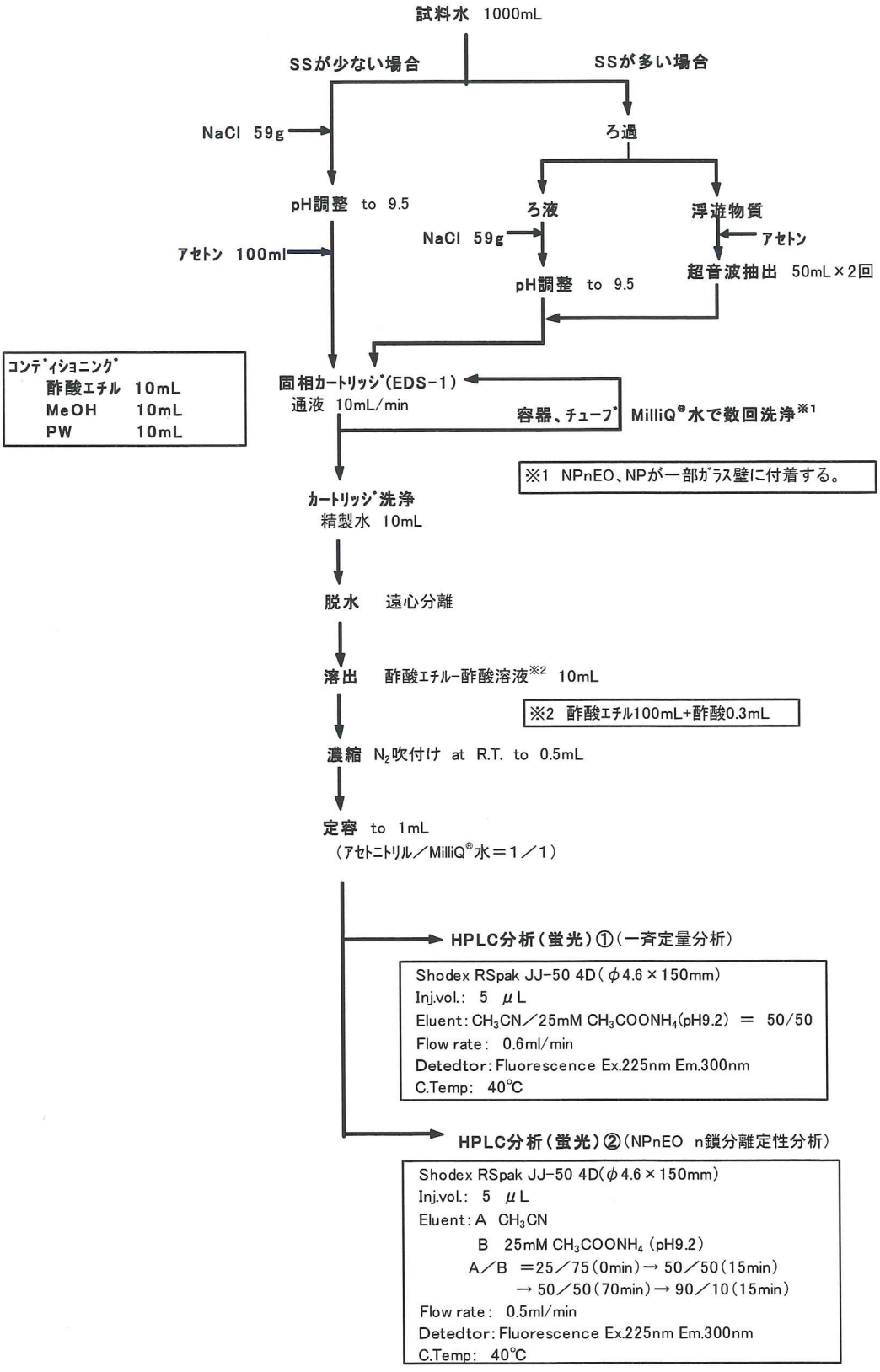
3）SS の多い試料中の NP 類を測定する場合、まず SS をろ過して溶媒で抽出するが、いずれの溶媒で抽出したサンプルにおいても、NPnEO、NP のピーク近辺に妨害ピークが見られた。妨害ピークの大きさは、メタノールと比較してアセトニトリル、アセトンで抽出した場合の方が小さかった。下水試験方法ではアセトンを採用しているため、本研究でもアセトンで抽出することとした。

4）カートリッジに負荷する液の溶媒濃度が 10%以下であれば、NP 類の回収率に影響はみられなかった。　20%となると、NPnEC の回収率が下がり、NP2EC で 70%、NP1EC では 40%程度となった。本研究では、溶媒濃度を 10%とした。これにより、実試料の分析の際、SS 溶出に使用した溶媒の濃縮操作を省くことが可能となる。

5）カートリッジから NP 類を溶出する際に使用する溶媒として、酢酸エチルに少量の酢酸（100mL あたり酢酸 0.3mL）を添加して酸性化したものが回収率が良く、NP、NPnEC ともに安定した回収率が得られることがわかった。

また、環境水（河川水）を試料とした場合、カートリッジには NP 関連物質と同時にクロロフィル等と思われる緑色物質も捕捉される。　溶出溶媒にメタノールを使用するとそれら着色物質も溶出されてしまうが、酢酸エチル（酢酸酸性）では着色物質はカートリッジに保持されたままであり、クリーンアップ効果が高いことがわかった。これらのことから本研究では、カートリッジからの溶出溶媒として、酸性化した酢酸エチルを使用することとした。

以上の結果から得た最適な前処理のフローを示す。（図－別 3.5）



図－別 3.5　NP 関連物質の最適前処理フロー

別添４　添加回収法による実証試験

以下、ここまでの検討結果を確認するため、最適フローに従い、Milli-Q®水、河川水、下水流入水、下水放流水の実試料を用いて添加回収試験を行った。

（１）Milli-Q®水を用いた添加回収試験

○試薬

NPnEO（n≒10）	林純薬工業製
NP	〃
NP1EC	〃
NP2EC	〃
NP3EC	〃

アセトニトリル（NPnEC は少量のメタノールを添加）で 100ppm に調整後、混合、各 10ppm となるようメタノールで調整して mixSTD とした。

○試料

精製水（Milli-Q®水）

○固相抽出カートリッジ

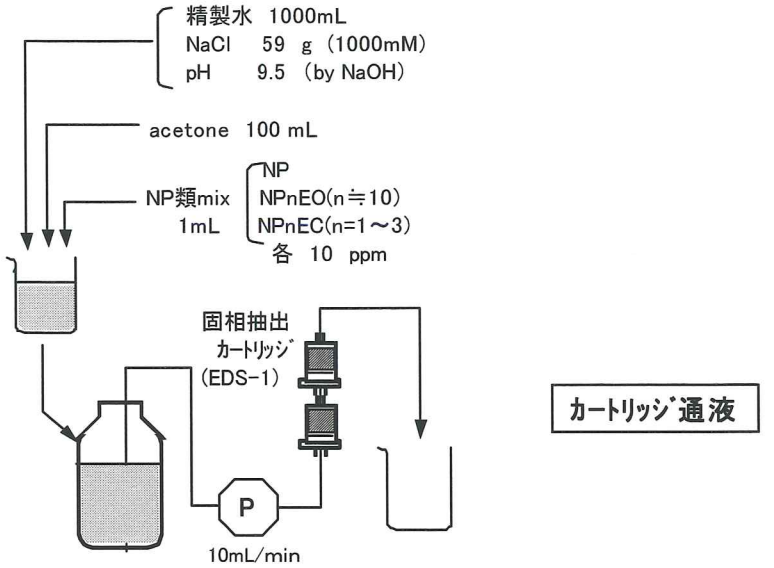
Autoprep® EDS-１　（昭和電工製）　充填量　400mg

○測定条件

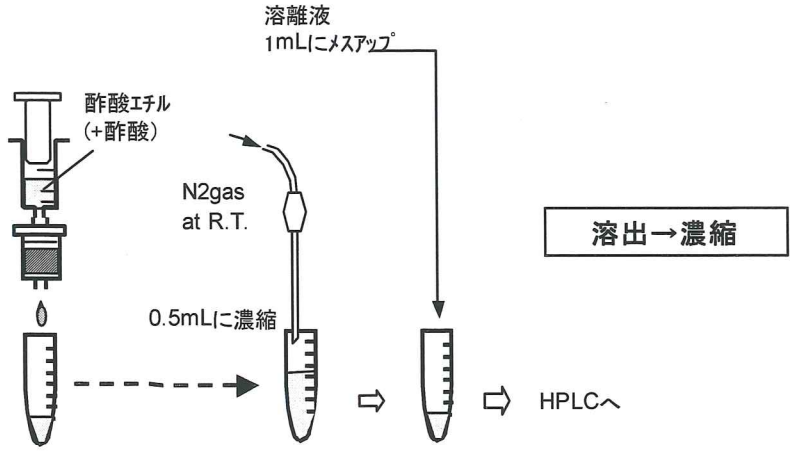
Column	:	Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）
Eluent	:	CH_3CN／25mM CH_3COONH_4（pH9.2）　＝　50／50
Flow	:	0.6mL/min
Detector	:	Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)
Col.Temp	:	40℃

○手順

Milli-Q®水 1000mL に NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整した。アセトンを約 10%となるように加えた後、Mix STD を 1mL 添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。遠心分離による脱水操作後、10mL の酢酸エチル（酢酸添加）で上流側のカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 0.5mL まで濃縮した後、溶離液で 1mL に定容して分析サンプルとした。

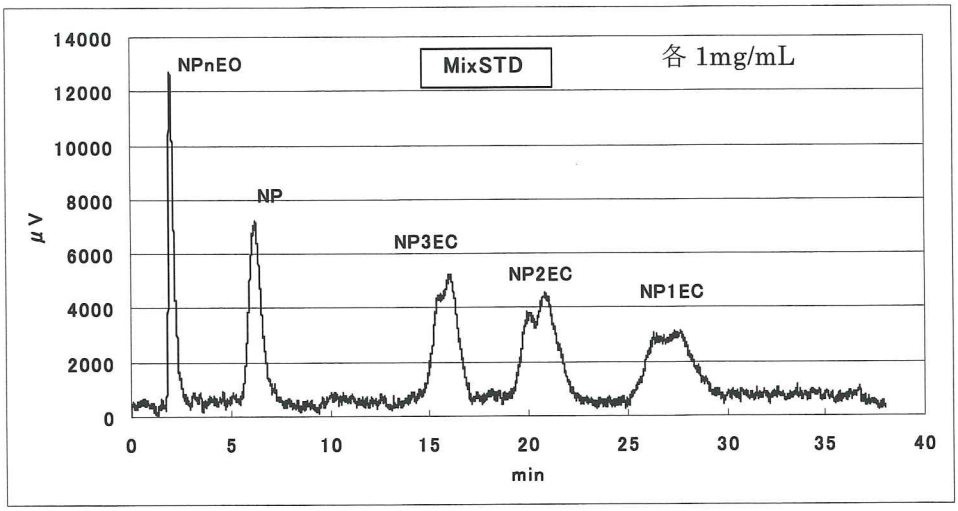

精製水 1000mL
NaCl 59 g (1000mM)
pH 9.5 (by NaOH)
acetone 100 mL
NP類mix 1mL
NP
NPnEO(n≒10)
NPnEC(n=1～3)
各 10 ppm
固相抽出
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ
(EDS-1)
P
10mL/min
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ通液

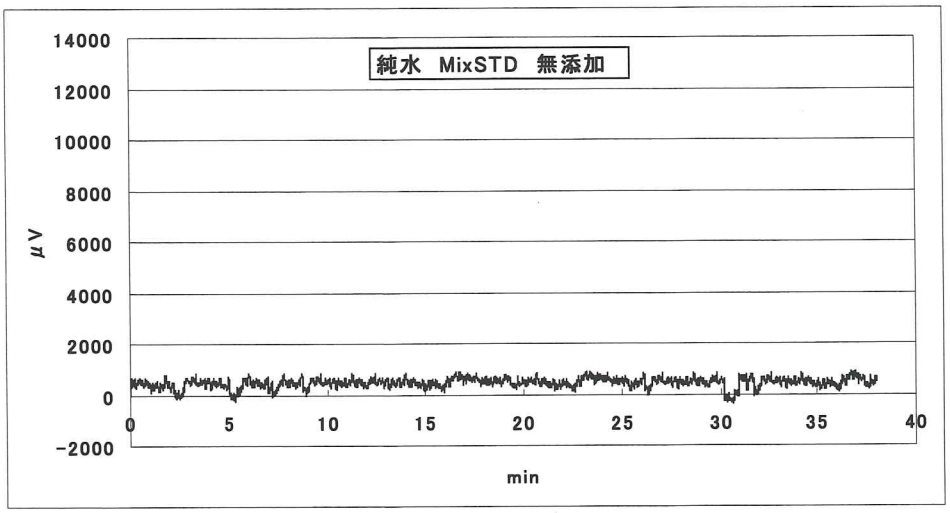

遠心機
脱水

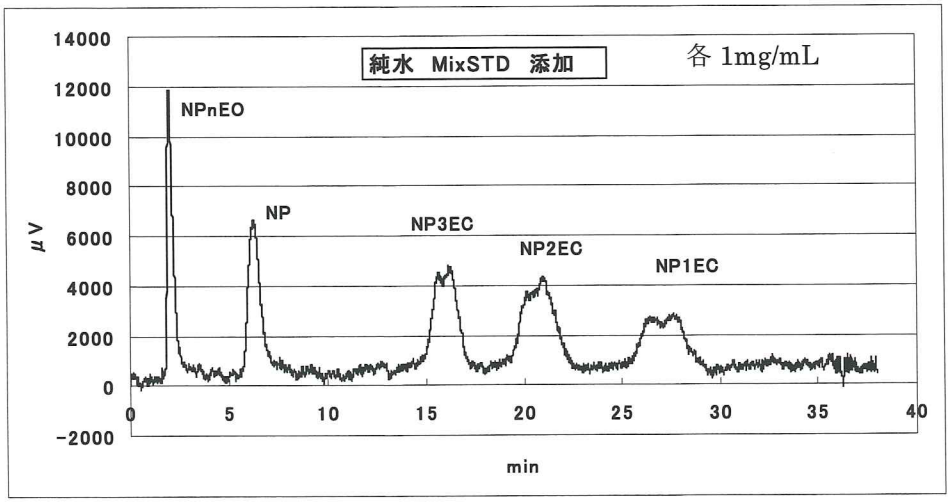

溶離液
1mLにﾒｽｱｯﾌﾟ
酢酸ｴﾁﾙ
(+酢酸)
N2gas
at R.T.
0.5mLに濃縮
溶出→濃縮
HPLCへ

○回収率結果

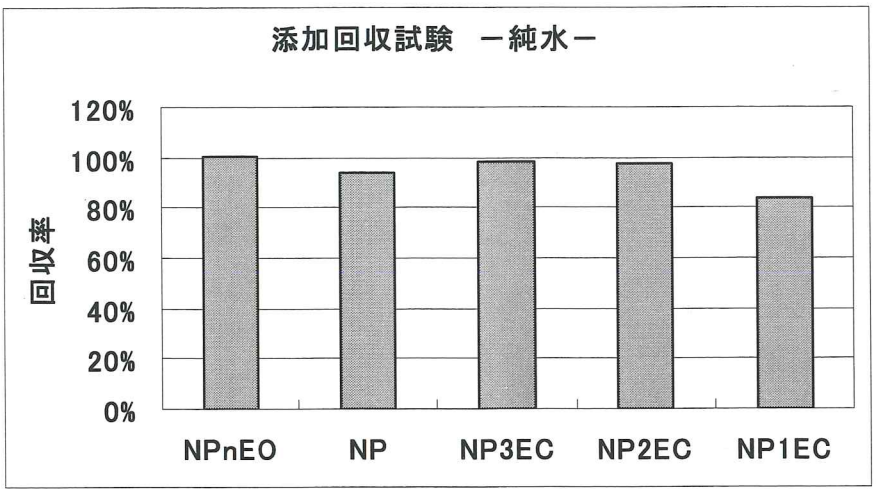
回収率は、いずれの成分も 80～100%と良好な結果が得られた。(図－別 4.1 1～2)







図－別 4.1.1　添加回収試験クロマトグラム〈Milli-Q®水〉



NPnEO	101%
NP	94%
NP3EC	99%
NP2EC	98%
NP1EC	84%

図－別 4.1.2　添加回収試験　Milli-Q®水添加回収率

（2）河川水を用いた添加回収試験

○試薬

（1）と同じ。

○試料

神奈川県　鶴見川よりサンプリング

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　　充填量　400mg

○測定条件

Column　：　Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

Eluent　：　CH_3CN／25mM CH_3COONH_4　（pH9.2）　＝　50／50

Flow　：　0.6mL/min

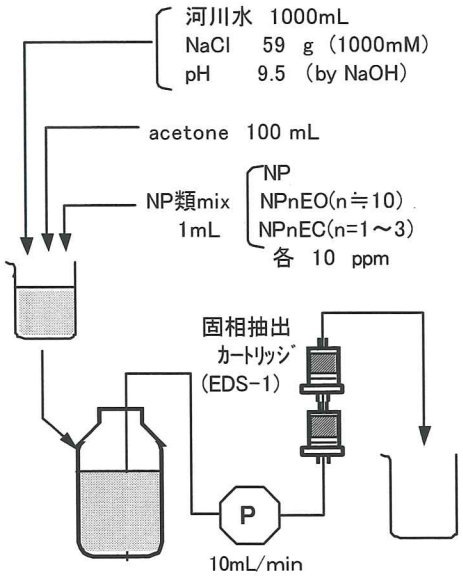
Detector　：　Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)

Col.Temp　：　40℃

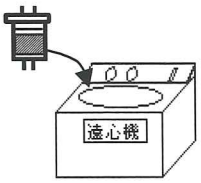
○手順

SS が少ないためろ過操作は行わなかった。

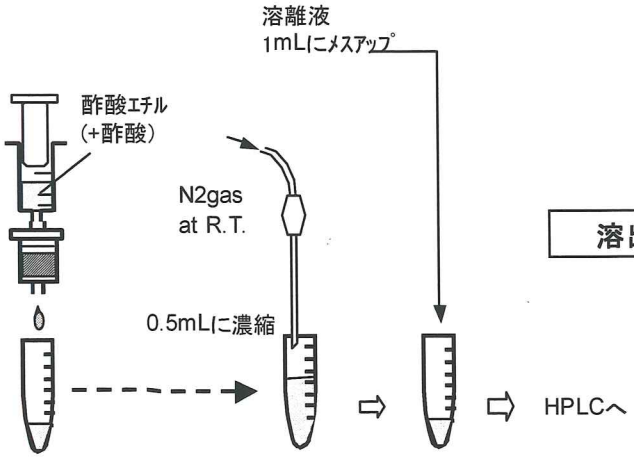
河川水 1000m L に NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整した。アセトンを約 10%となるように加えた後、Mix STD を 1mL 添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。遠心分離による脱水操作後、10mL の酢酸エチル（酢酸添加）で上流側のカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 0.5mL まで濃縮した後、溶離液で 1mL に定容して分析サンプルとした。



カートリッジ通液



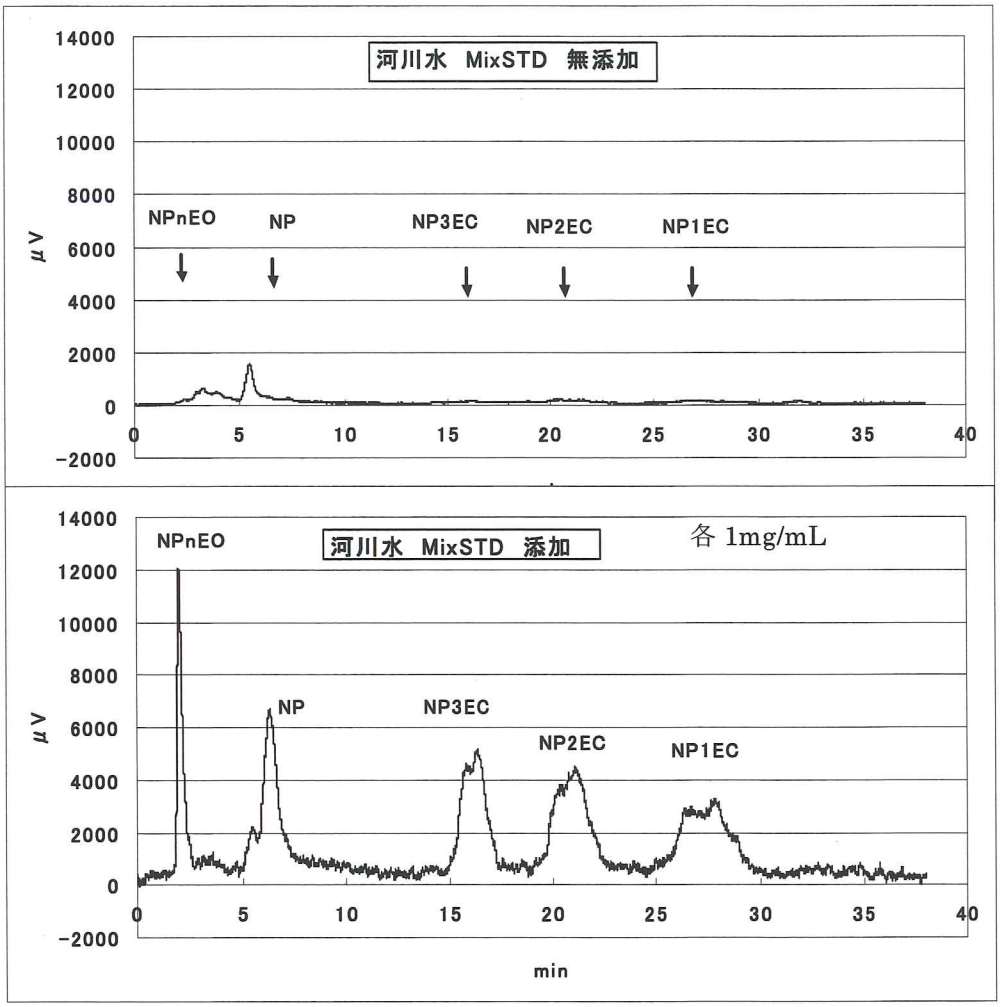
脱水



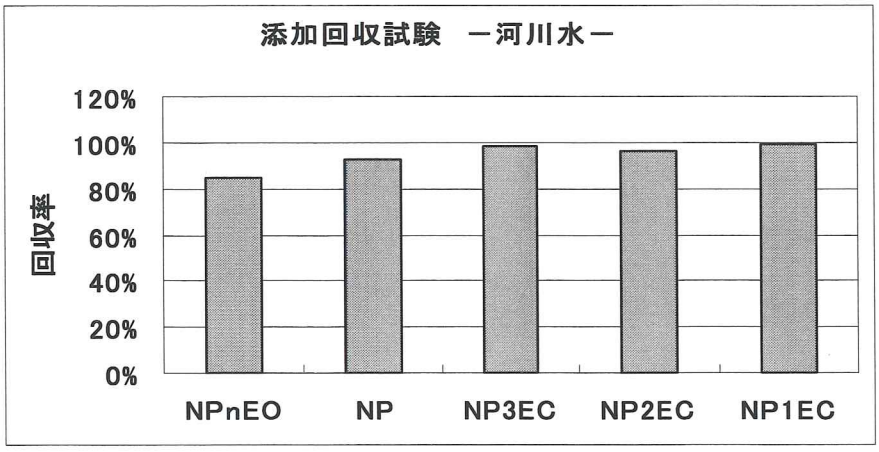
溶出→濃縮

○回収率結果

回収率は、いずれの成分も 80～100%と良好な結果が得られた。(図－別 4.2.1～2)



図－別 4.2.1　添加回収試験クロマトグラム〈河川水〉



NPnEO	85%
NP	93%
NP3EC	99%
NP2EC	96%
NP1EC	100%

図－別 4.2.2　添加回収試験　河川水添加回収率

（３）下水を用いた添加回収試験

Ａ．流入水を用いた添加回収試験

○試薬

（１）と同じ。

○試料

下水処理場流入水

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-１　　（昭和電工製）　　充填量　400mg

○測定条件

Column　：　Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）

Eluent　：　CH_3CN／25mM CH_3COONH_4　（pH9.2）　＝　50／50

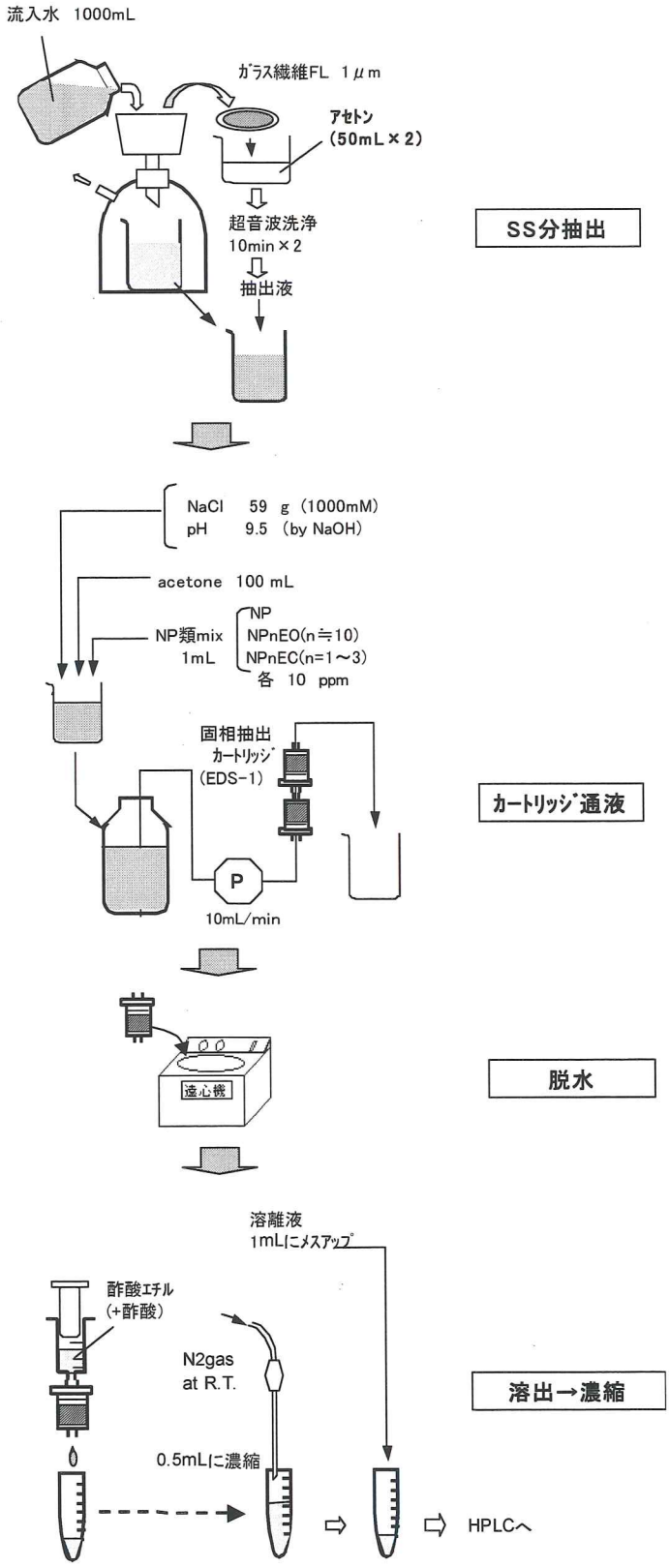
Flow　：　0.6mL/min

Detector　：　Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)

Col.Temp　：　40℃

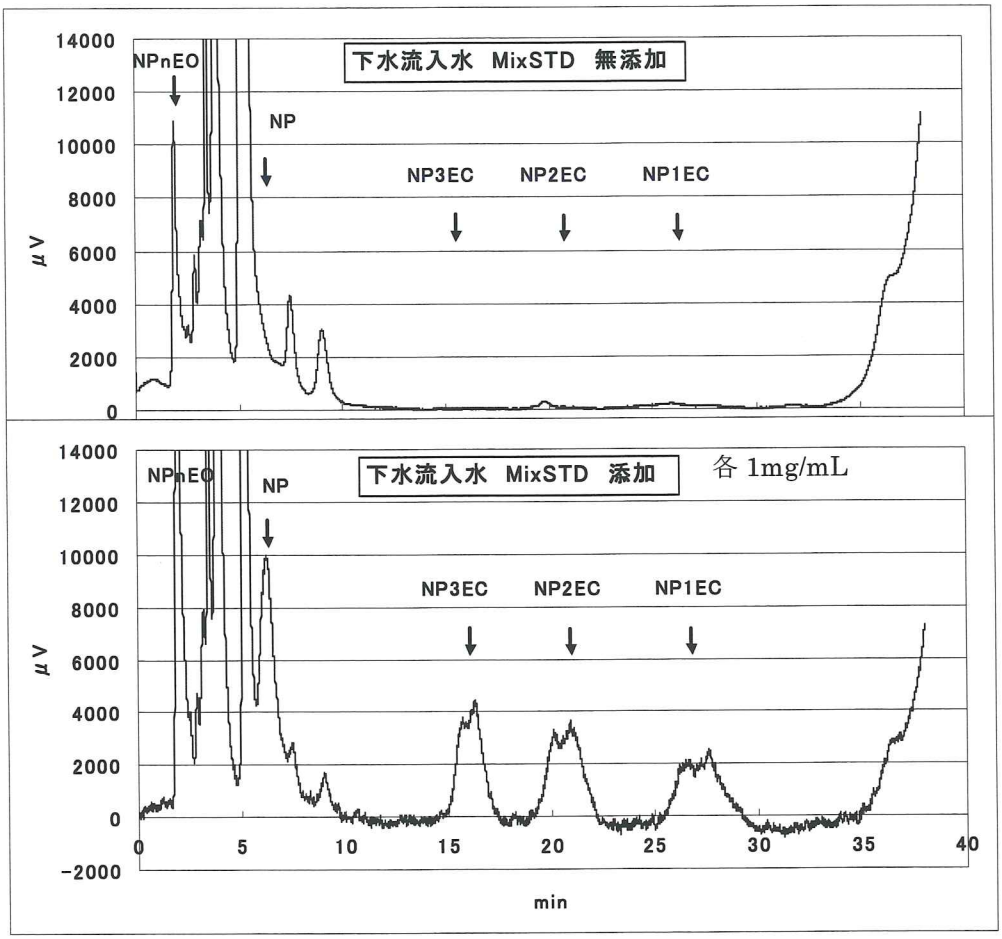
○手順

下水処理場流入水 1000ｍＬをガラス繊維 FL（1μｍ）で吸引ろ過後、FL をアセトン 50mL（×2）で超音波抽出（10min×2）した。抽出液をろ液に合わせた後、NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整し、mixSTD を 1mL 添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。遠心分離による脱水操作後、10mL の酢酸エチル（酢酸添加）で上流側のカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 0.5mL まで濃縮した後、溶離液で 1mL に定容して分析サンプルとした。

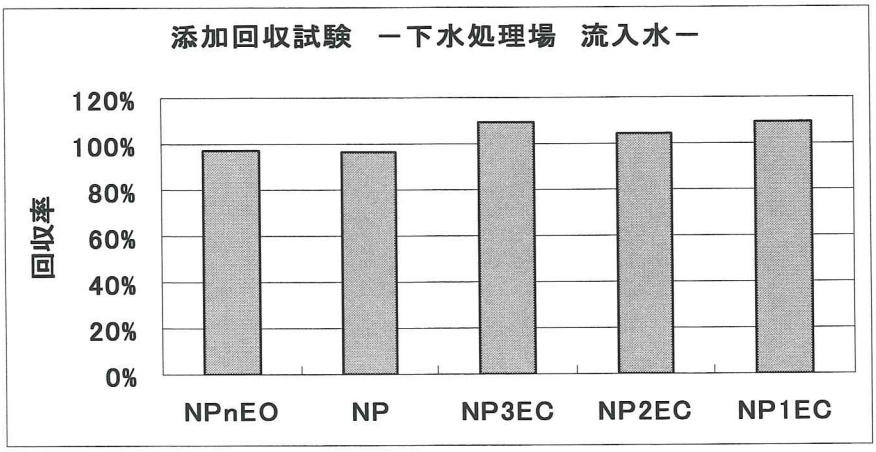

流入水 1000mL
ｶﾞﾗｽ繊維FL 1μm
ｱｾﾄﾝ
(50mL×2)
超音波洗浄
10min×2
抽出液
SS分抽出
NaCl 59 g (1000mM)
pH 9.5 (by NaOH)
acetone 100 mL
NP類mix
1mL
NP
NPnEO(n≒10)
NPnEC(n=1～3)
各 10 ppm
固相抽出
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ
(EDS-1)
P
10mL/min
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ通液
遠心機
脱水
溶離液
1mLにﾒｽｱｯﾌﾟ
酢酸ｴﾁﾙ
(+酢酸)
N2gas
at R.T.
0.5mLに濃縮
溶出→濃縮
HPLCへ

○回収率結果

回収率は、いずれの成分も 90～110%と良好な結果が得られた。(図－別 4.3A.1～2)



図－別 4.3A.1　添加回収試験クロマトグラム〈下水処理場流入水〉



NPnEO	97%
NP	97%
NP3EC	109%
NP2EC	104%
NP1EC	109%

図－別 4.3A.2　添加回収試験　下水処理場流入水添加回収率

B．放流水を用いた添加回収試験

○試薬

（1）と同じ。

○試料

下水処理場放流水

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-1　　（昭和電工製）　　充填量　400mg

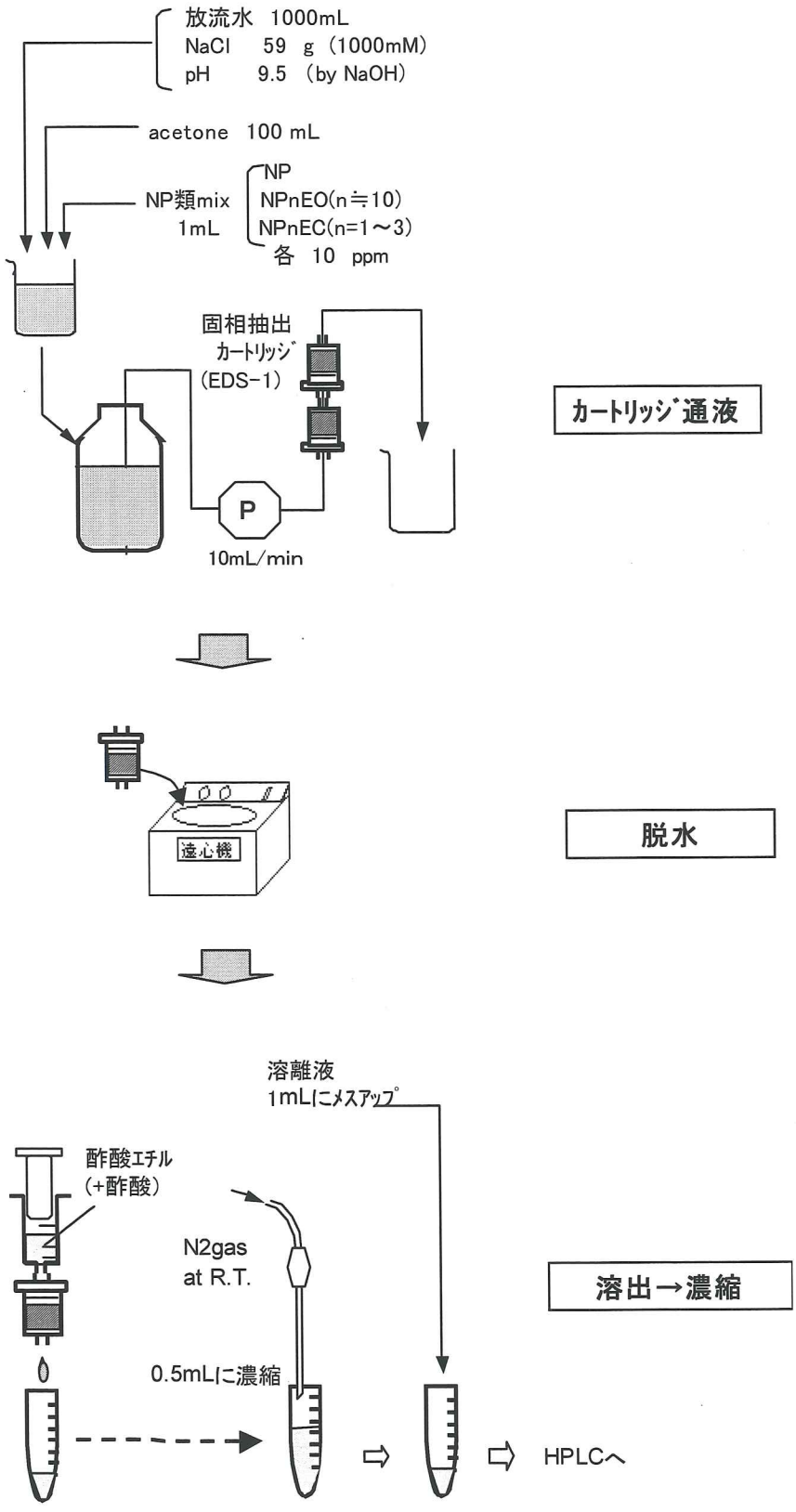
○測定条件

Aと同じ。

○手順

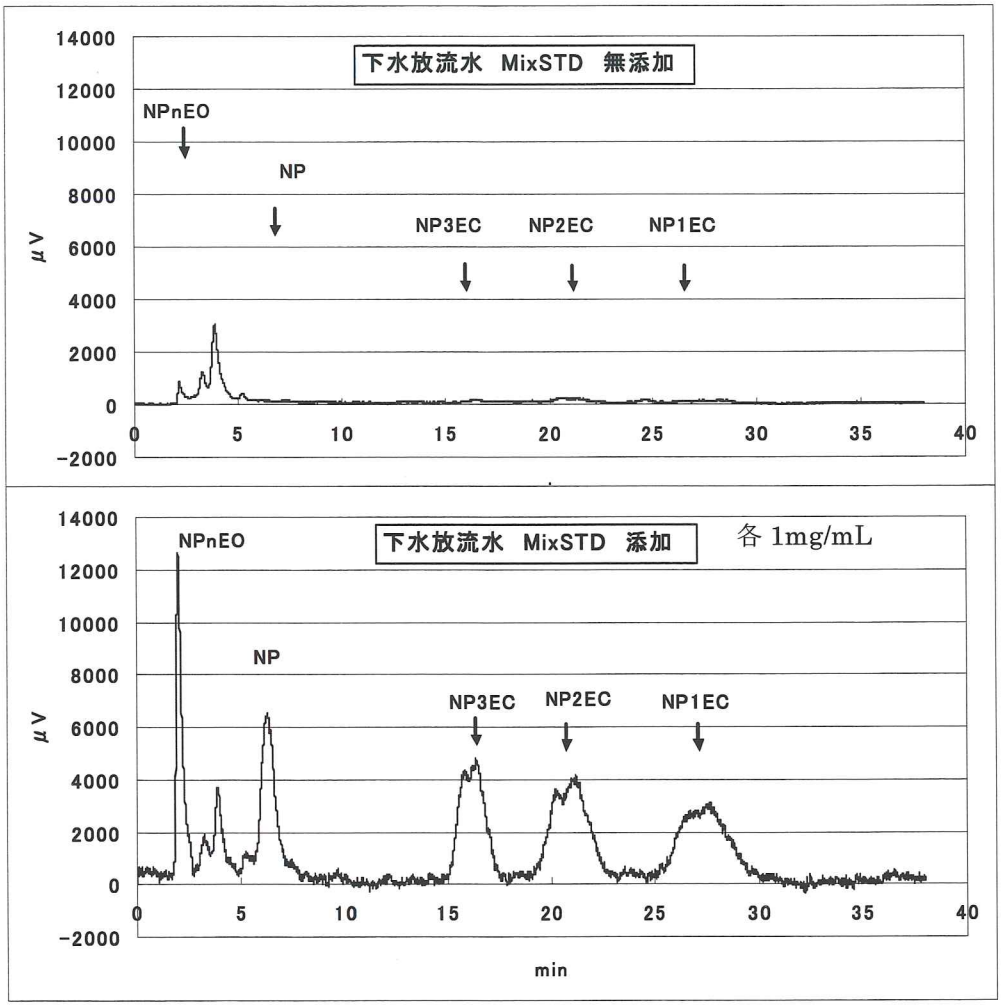
SSが少ないため、ろ過操作は行わなかった。

放流水1000mLにNaClを1000mMとなるよう添加、NaOHにてpHを9.5に調整した。アセトンを約10%となるように加えた後、Mix STDを1mL添加して負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジに定量ポンプにて10mL/minの速度で通液した後、カートリッジをMilli-Q®水10mLで洗浄した。遠心分離による脱水操作後、10mLの酢酸エチル（酢酸添加）で上流側のカートリッジからNP類を溶出し、N_2を緩やかに吹き付けて0.5mLまで濃縮した後、溶離液で1mLに定容して分析サンプルとした。

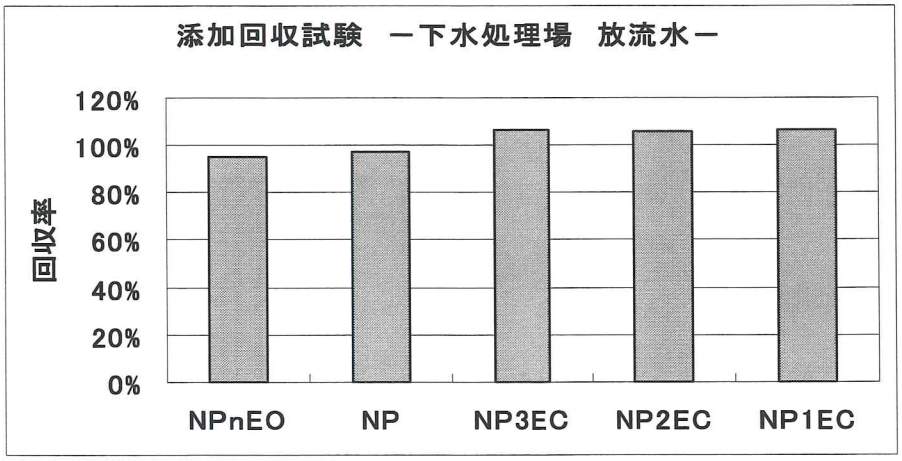

放流水 1000mL
NaCl 59 g (1000mM)
pH 9.5 (by NaOH)
acetone 100 mL
NP類mix 1mL
NP
NPnEO(n≒10)
NPnEC(n=1～3)
各 10 ppm
固相抽出
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ
(EDS-1)
P
10mL/min
ｶｰﾄﾘｯｼﾞ通液
遠心機
脱水
溶離液
1mLにﾒｽｱｯﾌﾟ
酢酸ｴﾁﾙ
(+酢酸)
N2gas
at R.T.
0.5mLに濃縮
溶出→濃縮
HPLCへ

○回収率結果

回収率は、いずれの成分も 90～110%と良好な結果が得られた。（図－別 4.3B.1～2）



図－別 4.3B.1　添加回収試験クロマトグラム〈下水処理場放流水〉



NPnEO	96%
NP	98%
NP3EC	107%
NP2EC	106%
NP1EC	107%

図－別 4.3B.2　添加回収試験　下水処理場放流水添加回収率

◇添加回収試験の結果　まとめ

分析条件の検討結果を元に得られたフローに基づき、Milli-Q®水、河川水、下水処理場（流入水、放流水）を用いた添加回収試験を実施した。

1）Milli-Q®水を用いた添加回収試験

回収率は、NPnEO、NP、NPnEC のいずれの成分も 80～100%と良好な結果が得られた。

2）河川水を用いた添加回収試験

回収率は、NPnEO、NP、NPnEC のいずれの成分も 80～100%と良好な結果が得られた。

3）下水処理場の流入水、放流水を用いた添加回収試験

回収率は、NPnEO、NP、NPnEC のいずれの成分も 90～110%と良好な結果が得られた。

環境水を用いた場合、HPLC 保持時間の短い部分に妨害ピークがみられたが、概ね、得られたフローに従って良好な回収率を確認することができ、上記試料においては同時に各成分の濃度比率がわかる簡易的な分析法として有用であることが確認できた。

別添５　実試料中のノニルフェノール関連物質濃度の測定

最適フローに従って、環境水中のノニルフェノール関連物質濃度を測定した。

１）測定内容

○試料

・ 神奈川県　Ａ下水処理場よりサンプリングした流入水
・ 〃　放流水
・ 神奈川県　Ｂ下水処理場よりサンプリングした流入水
・ 〃　放流水
・ 神奈川県　鶴見川よりサンプリング

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-１　（昭和電工製）　充填量　400mg

○測定条件

Column　:　Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）
Eluent　:　CH_3CN／25mM CH_3COONH_4　（pH9.2）　＝　50／50
Flow　:　0.6mL/min
Detector　:　Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)
Col.Temp　:　40℃

○手順

・下水処理場流入水

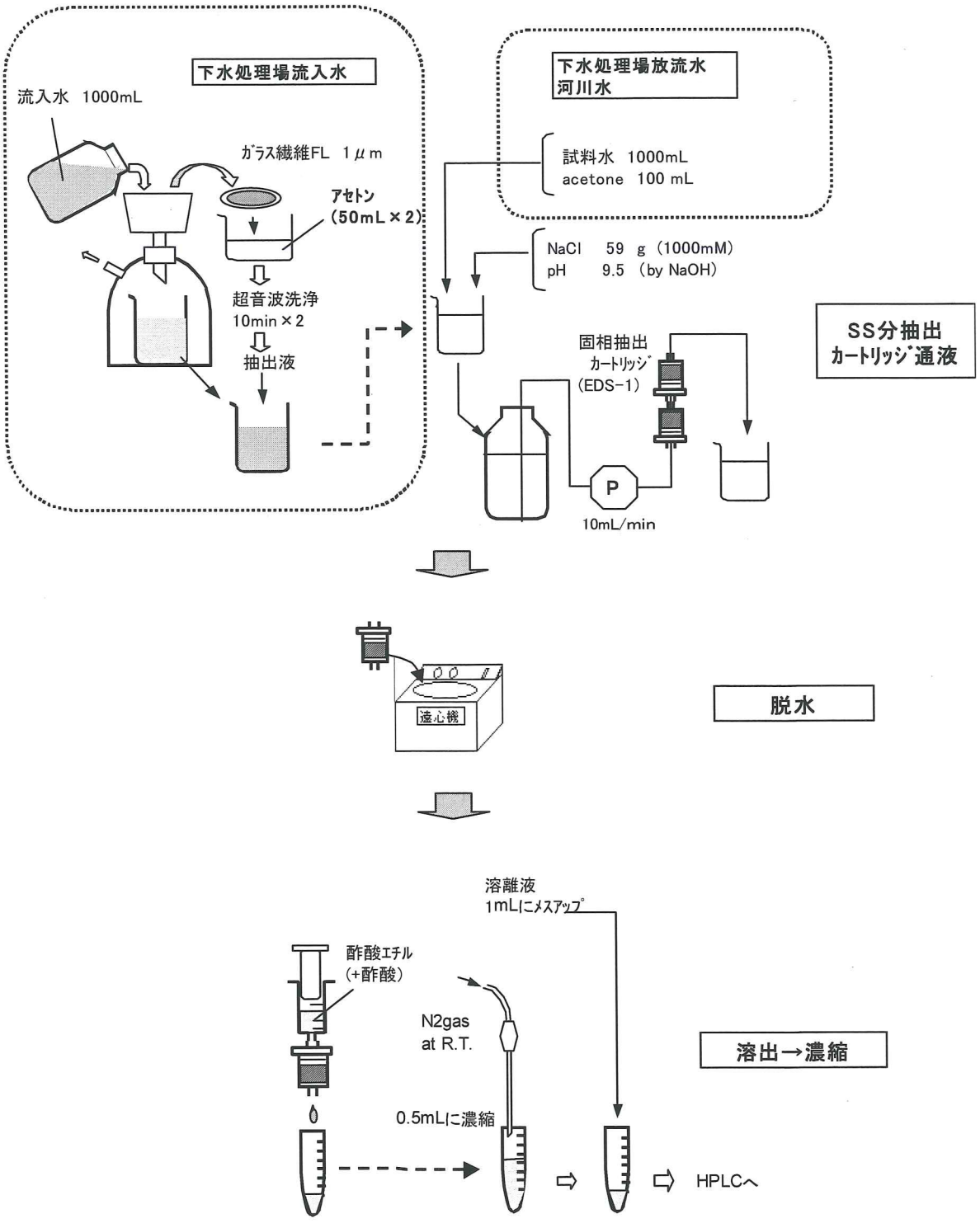
下水処理場流入水 1000mＬをガラス繊維 FL（1μm）で吸引ろ過後、FL をアセトン 50mL（×2）で超音波抽出（10min×2）した。抽出液をろ液に合わせた後、NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整し負荷液とした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジを 2 本連結して定量ポンプにて 10mL/min の速度で通液した後、カートリッジを Milli-Q®水 10mL で洗浄した。遠心分離による脱水操作の後、酢酸を添加（100mL あたり 0.3mL）して酸性化した酢酸エチル 10mL を使用してカートリッジから NP 類を溶出し、N_2 を緩やかに吹き付けて 1mL まで濃縮し、分析サンプルとした。

・下水処理場放流水、および河川水

SS が少ないため、ろ過操作は行わなかった。

試料水 1000mＬに NaCl を 1000mM となるよう添加、NaOH にて pH を 9.5 に調整した。アセトンを約 10%となるように加え負荷液とした。

以下は、下水処理場流入水の場合と同様に分析サンプルの調整を行った。


下水処理場流入水
流入水 1000mL
ガラス繊維FL 1μm
アセトン
(50mL×2)
超音波洗浄
10min×2
抽出液
下水処理場放流水
河川水
試料水 1000mL
acetone 100 mL
NaCl 59 g (1000mM)
pH 9.5 (by NaOH)
固相抽出
カートリッジ
(EDS-1)
P
10mL/min
SS分抽出
カートリッジ通液
遠心機
脱水
溶離液
1mLにメスアップ
酢酸エチル
(+酢酸)
N2gas
at R.T.
0.5mLに濃縮
HPLCへ
溶出→濃縮

3）測定結果

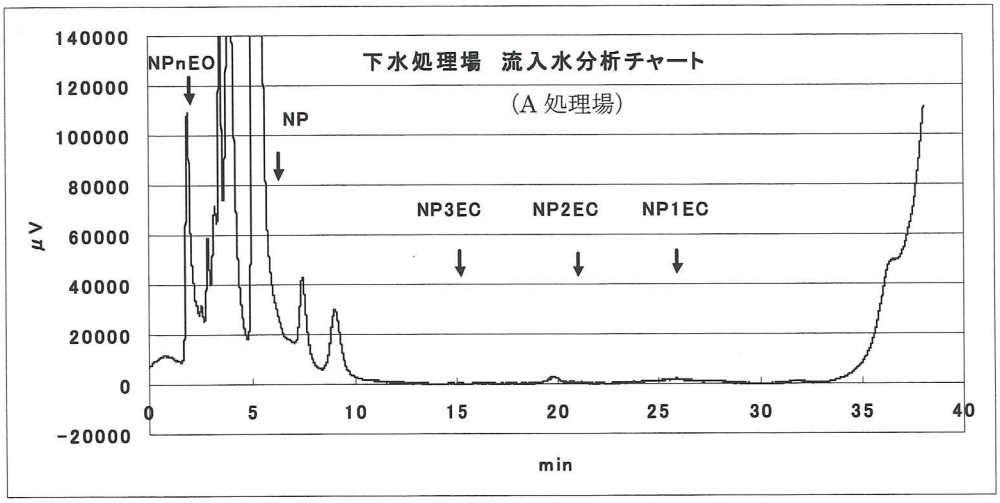
	鶴見川 葦穂橋付近	A処理場		B処理場		全国47処理場　中央値※	
		流入水	放流水	流入水	放流水	流入水	放流水
NPnEO	<0.05	17	1.4	7.5	<0.05	―	―
NPnEO(n=1～4)	本法では分離定量せず、総NPnEOとして測定					28	0.7
NPnEO(n≧5)						81	0.4
NP	<0.05	<0.05	<0.05	20	<0.05	4.4	0.2
NP3EC	0.37	<0.25	0.38	<0.25	1.5	16	3.1
NP2EC	0.58	<0.25	0.84	0.91	3.3	44	3.1
NP1EC	0.56	<0.25	0.62	0.42	1.6	0.8	0.7

単位：μg/L

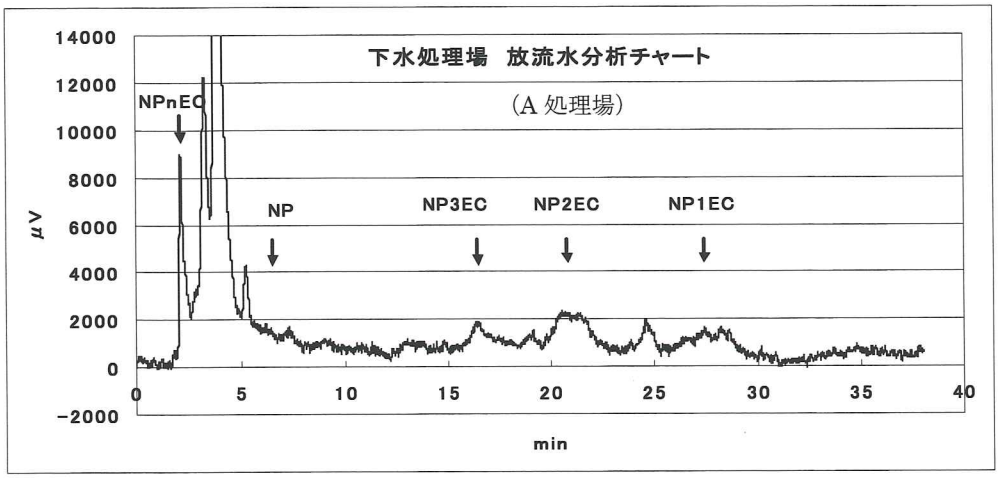
※国土交通省　下水道における内分泌撹乱物質に関する調査の結果について(平成 12 年度) より

◇まとめ

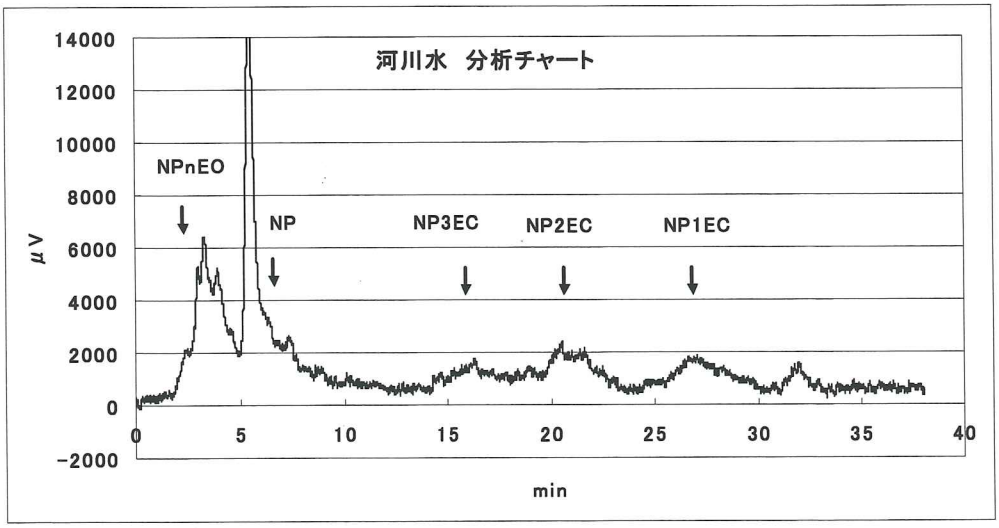
下水処理場の流入水と放流水はほぼ同時刻にサンプリングした。流入水は頻繁に性状が変わるものであり、両者を直接比較することはできないが、下水処理場流入水に 8～17μg/L 存在していた NPnEO は、放流水では 1/10 程度の 0～1.4μg/L となっている一方、NPnEC（カルボン酸体）は流入水より放流水の方が高い傾向にあり、推定される分解過程を示唆する結果であった。（図－別 5.1.1～2）しかし、NP（ノニルフェノール）に関しては、明確な傾向が得られず、流入水の濃度に関わらず今回の放流水中からは検出されなかった。　河川水においては、NPnEO、NP は検出されず、NPnEC が僅かながら検出された。（図－別 5.2）　これらの値は、国土交通省調査による全国 47 処理場の中央値と比較すると今回調査した処理場の流入水、放流水とも低めの数値となった。



図－別 5.1.1　下水処理場流入水　クロマトグラム



図－別 5.1.2　下水処理場放流水　クロマトグラム



図－別 5.2　河川水　クロマトグラム

別添６　LC/MS への適用

余分な手間をかけずにさらに詳細な結果を得るため、上記の前処理サンプルをそのまま LC/MS に適用することを試みた。Milli-Q®水、下水処理場流入水、放流水、河川水を用い、NPnEO、NP3EC、NP2EC、NP1EC について添加回収試験、環境水の実測を HPLC と LC/MS 同時分析で行った。

（１）検討内容

１）添加回収試験における HPLC 分析値との比較（NPnEO 合計、NP3EC、NP2EC、NP1EC）

・ Milli-Q®水
・ 下水処理場流入水、放流水
・ 河川水

２）環境水の実測値（NPnEO 各 n 鎖数毎、NP3EC、NP2EC、NP1EC）

・ 下水処理場流入水、放流水
・ 河川水

１）添加回収試験

○試薬

NPnEO（n≒10）	林純薬工業製
NP1EC	〃
NP2EC	〃
NP3EC	〃

アセトニトリル（NPnEC は少量のメタノールを添加）で 100ppm に調整後、混合、各 10ppm となるようメタノールで調整して mixSTD とした。

○試料

・ Milli-Q®水
・ 神奈川県　下水処理場よりサンプリングした流入水
・ 〃　放流水
・ 神奈川県　鶴見川よりサンプリング

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-１　（昭和電工製）　充填量　400mg

○測定条件

HPLC 分析

Column　:　Shodex　RSpak　JJ-50　4D　（4.6φ×150mm）
Eluent　:　CH_3CN／25mM CH_3COONH_4（pH9.2）　＝　50／50
Flow　:　0.6mL/min
Detector　:　Fluorescence(Ex.225nm、Em.300nm)
Col.Temp　:　40℃

LC/MS 分析

LC 条件

HPLC : Agilent Technologies HP1100Series

Column : Shodex JJ-50 4D

Eluent : 25mMCH_3COONH_4 : CH_3CN＝50:50

Flow : 0.6ml/min

Col. Temp. : 40℃

Injection volume : 5ul

MS 条件

MS : Agilent Technologies LC/MSD SL

Ionization : API-ES(positive)

Gas Temp : 350℃

Drying Gas : 12L/min

Nebulizer gas : 35psi

VCap 3000V

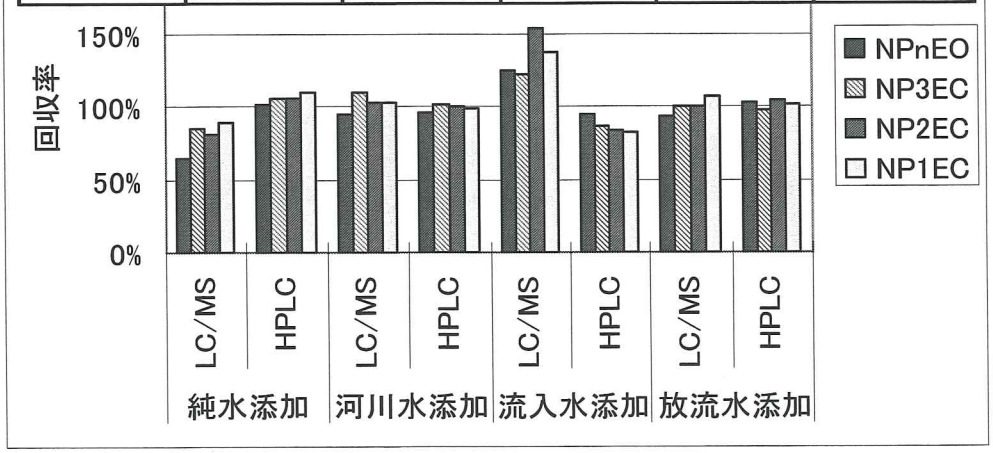
○手順

別添５参照

○検討結果

HPLC に比較して、Milli-Q®水を用いた系で低目に、下水処理場流入水を用いた系で高めの結果となったが、同じ前処理サンプルを用いて、HPLC と LC/MS の分析を行うことは十分に可能と考えられた。（図－別 6.1）

		NPnEO	NP3EC	NP2EC	NP1EC
純水添加	LC/MS	64%	86%	80%	90%
	HPLC	102%	105%	106%	109%
河川水添加	LC/MS	95%	110%	103%	103%
	HPLC	96%	101%	100%	99%
流入水添加	LC/MS	124%	121%	153%	137%
	HPLC	94%	86%	83%	83%
放流水添加	LC/MS	93%	100%	101%	107%
	HPLC	103%	98%	104%	102%



図－別 6.1 添加回収試験 〈LC/MS と HPLC の比較〉

2）LC/MS を用いた実試料(環境水)中のノニルフェノール関連物質濃度測定

○試薬

NP1EO	林純薬工業製
NP2EO	〃
・	
・	
NP15EO	〃
NP1EC	〃
NP2EC	〃
NP3EC	〃

○試料

・ 神奈川県　下水処理場よりサンプリングした流入水

・ 〃　放流水

・ 神奈川県　鶴見川よりサンプリング

○固相抽出カートリッジ

Autoprep® EDS-1　（昭和電工製）　充填量　400mg

○測定条件

1）と同じ。

○手順

別添５参照

○検討結果

前述別添５でも記したとおり下水処理場の流入水は頻繁に性状が変わるものであり、放流水との直接比較はできないが、NPnEO に関しては、流入水濃度が高く、放流水ではその 1/10 程度となっており、HPLC の分析結果と同様の傾向が確認できた。（図－別 6.2）

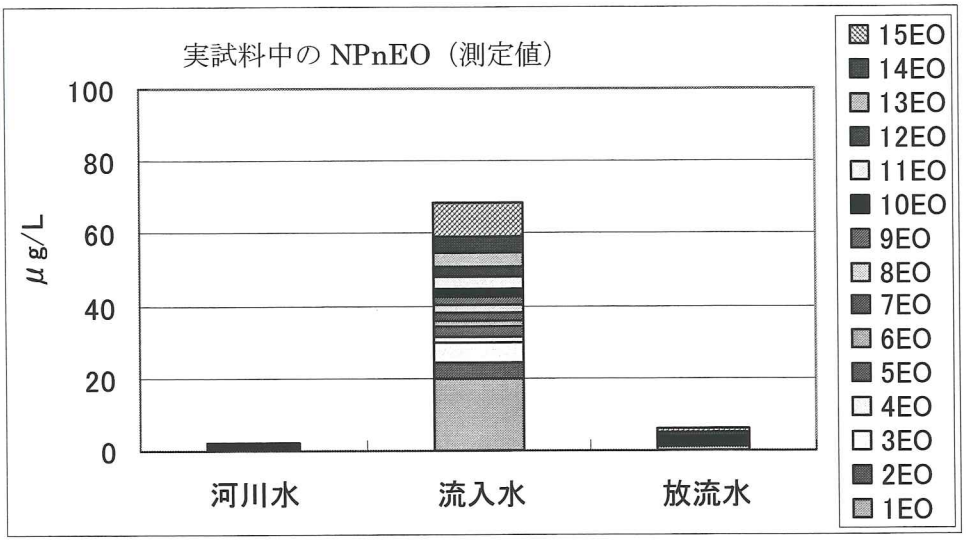
EO 鎖数別の比率は、流入水では下水試験方法で分けている１～4EO と 5EO 以上のそれぞれの合量はほぼ同程度であったが、放流水では多少の変化が見られた。（図－別 6.3）ただし、これらの傾向は下水処理場の処理方法についても変わるので普遍的な傾向とは言いきれない。

河川水に関しては、傾向としてはほぼ均等に１～15E0 鎖がみられた。（　〃　）

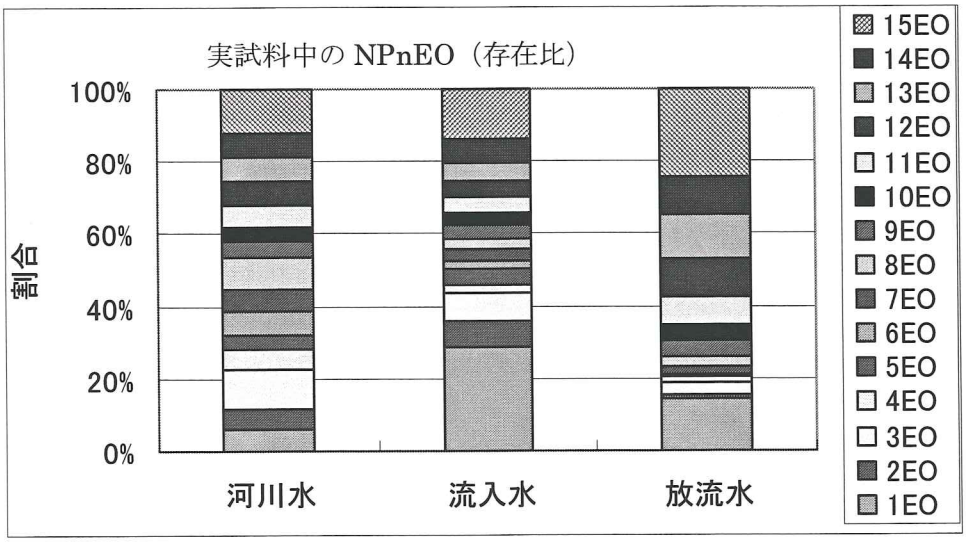
NPnEC に関しては、多少の差はみられるが、HPLC とほぼ同程度の分析値が得られた。やはり、流入水に対して放流水濃度の方が高い傾向が確認できた。（図－別 6.4）

NP に関しては、今回条件が合わず、測定できなかった。

試料名	1EO	2EO	3EO	4EO	5EO	6EO	7EO	8EO	9EO	10EO	11EO	12EO	13EO	14EO	15EO
河川水	0.14	0.14	0.264	0.128	0.098	0.153	0.1435	0.209	0.1125	0.098	0.139	0.16	0.16	0.15	0.296
流入水	19.7	4.82	5.35	1.618	2.75	1.76	2.08	2.08	2.41	2.44	3.05	2.85	3.53	4.52	9.38
放流水	0.9	0.069	0.21	0.0815	0	0.065	0.119	0.19	0.27	0.2735	0.48	0.65	0.77	0.65	1.51

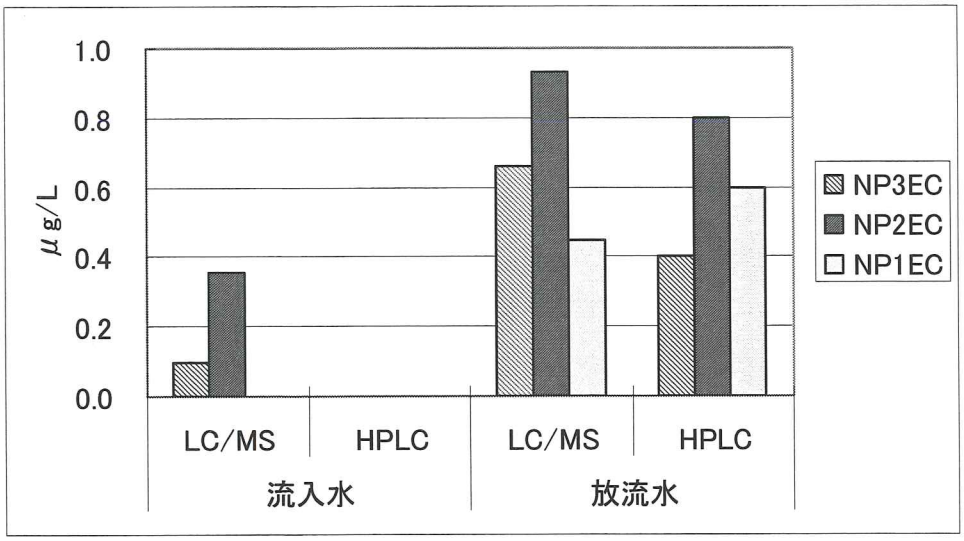


図－別 6.2　LC/MS による測定　（NPnEO）



図－別 6.3　NPnEO の EO 鎖数別の存在比

		NP3EC	NP2EC	NP1EC
流入水	LC/MS	0.1	0.4	0.0
	HPLC	0.0	0.0	0.0
放流水	LC/MS	0.7	0.9	0.4
	HPLC	0.4	0.8	0.6



図－別 6.4　LC/MS による測定（NPnEC）

◇ＬＣ／ＭＳへの適用の結果　まとめ

HPLC 分析フローに基づき前処理を行った、Milli-Q®水、河川水、下水処理場（流入水、放流水）の各サンプルを、そのまま LC/MS 分析へ適用する検討を実施した。

1）添加回収試験では、HPLC に比較して、Milli-Q®水を用いた系で低めに、下水処理場流入水を用いた系で高めの結果となったが、概ね HPLC と同様の結果が得られた。

2）環境水（下水処理場流入水、放流水、河川水）の LC/MS 実測では下記の結果が得られた。

- NPnEO では、EO 鎖数毎の定量ができた。（HPLC では、分離度の問題から定量はできないが、増減傾向は確認できる。）
- 今回 NP は、LC/MS での定量はできなかった。（HPLC で定量可能）
- NPnEC（n=１，２，３）は多少差が見られたが HPLC とほぼ同様の定量値が得られた。

以上のことから、HPLC の前処理フローで得られる同一サンプルを用いて、HPLC と LC/MS の分析を行うことは十分に可能と考えられた。LC/MS では、NPnEO の EO 鎖数毎の定量を、HPLC では、NPnEO の環境水等におけるの傾向変化、および NP、NPnEC の定量が可能である。

参考資料

成果の発表

○大野律子（昭光通商㈱）、篠田晶子（昭和電工㈱）、小川祐子、行谷義治（日本環境㈱）、小森行也、田中宏明（土木研究所）「ノニルフェノールエトキシレート関連物質の分別捕集法開発」第 11 回環境化学討論会（2002）

○小森行也、八十島誠、田中宏明（土木研究所）、篠田晶子（昭和電工㈱）、小川祐子（日本環境㈱）第 11 回環境化学討論会「下水試料中のノニルフェノールエトキシレートの分析」（2002）

○藤原嘉夫、篠田晶子（昭和電工㈱）、大野律子（昭光通商㈱）、小川祐子、行谷義治（日本環境㈱）、小森行也、田中宏明（土木研究所）第 5 回環境ﾎﾙﾓﾝ学会「ノニルフェノール関連物質の分析法開発」(2002)

○藤原嘉夫、篠田晶子（昭和電工㈱）、小川祐子、行谷義治（日本環境㈱）、小森行也、田中宏明（土木研究所）第 12 回環境化学討論会「ノニルフェノールエトキシレート関連物質の濃縮法検討」(2003)

○小川祐子、行谷義治（日本環境㈱）、藤原嘉夫、篠田晶子、森川宏平（昭和電工㈱）、小森行也、田中宏明（土木研究所）第 13 回環境化学討論会「環境水におけるノニルフェノール関連物質の一斉分析法」(2004)