

## 3・2 資料

### 1) GC/MS を用いたフェノール類の一斉分析法の検討

黒木隆司 木庭亮一\*

#### はじめに

公共用水域へ流入する化学物質等の影響により、魚がへい死する事故が発生することがあるが、へい死の原因としてフェノール類が疑われる場合もあり、河川等への流入により短時間のへい死に結びつくこともある。

フェノール類は消毒剤、局部麻酔剤（歯科用）、ピクリン酸、サリチル酸、フェナセチン及び染料中間物の製造並びに合成樹脂、可塑剤、合成香料、農薬、安定剤及び界面活性剤などに用いられており、ガス工場、化学工場、病院、研究施設、洗炭などの排水、アスファルト舗装道路洗浄水及び防錆・防腐剤などから公共用水域に流出することがある。

フェノール類の水道法の水質基準は0.005mg/L、水質汚濁防止法の排水基準は5mg/Lと定められている。フェノール、ペンタクロロフェノール、ノニルフェノール等は化学物質排出把握管理促進法の第一種指定化学物質に指定されているほか、ノニルフェノールは環境基本法に基づく水生生物の保全に係る環境基準項目に、フェノール、4-*t*-オクチルフェノール、2,4-ジクロロフェノールは同法に基づく水生生物の保全に係る要監視項目にそれぞれ指定されている。

フェノール類の分析方法としては、水試料からの抽出方法として、溶媒抽出法や固相抽出法を用い、測定機器として高速液体クロマトグラフやガスクロマトグラフイオン質量分析計（GC/MS）を用いた方法が報告<sup>1）</sup>～<sup>3）</sup>されている。

今回、魚へい死事故の原因究明に資するため、毒性が比較的高い物質など計26物質のフェノール類（フェノール、クロロフェノール類12物質及びアルキルフェノール類13物質）を対象物質として選定し、GC/MSを用いた一斉分析法の検討を行ったので報告する。

#### 実験方法

##### 1 試薬・器具

###### 1.1 標準品

- ・フェノール：フェノール標準品（関東化学製、水質試験用 1000mg/L）
- ・2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2,4-ジク

ロクロフェノール、2,6-ジクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール：クロロフェノール標準液（関東化学製 水質試験用 1000mg/L）

- ・3-クロロフェノール：東京化成工業製（純度：>98.0%）
- ・3,4-ジクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、3,4,5-トリクロロフェノール、2,3,4-トリクロロフェノール、2,3,4,5-テトラクロロフェノール：Dr.Ehrenstorfer GmbH製（純度：99.0%）

・ペンタクロロフェノール：Dr.Ehrenstorfer GmbH製（純度：99.0%）

- ・4-エチルフェノール、2-*t*-ブチルフェノール、3-*t*-ブチルフェノール、4-*t*-ブチルフェノール、4-*sec*-ブチルフェノール、4-*n*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、ノニルフェノール、4-*n*-オクチルフェノール、ビスフェノールA：アルキルフェノール類混合標準原液II（13種）（関東化学製 水質試験用 ノニルフェノール：1000mg/L、その他のアルキルフェノール類：100mg/L）

- ・ビスフェノールA-d<sub>16</sub>：関東化学製（環境分析用）

・13C<sub>6</sub>-ペンタクロロフェノール：和光純薬工業製（純度：99.0%）

- ・ナフタレン-d<sub>8</sub>：和光純薬工業製（環境分析用）

##### 1.2 混合標準溶液

各標準品をアセトンに溶解させて混合し、アセトンで適宜希釈してノニルフェノールは1mg/L、ノニルフェノール以外は0.1mg/Lとなるように混合標準溶液を調製した。

##### 1.3 サロゲート溶液及び内部標準溶液

サロゲート物質であるビスフェノールA-d<sub>16</sub>及び13C<sub>6</sub>-ペンタクロロフェノールはそれぞれアセトンに溶解させて適宜希釈して1mg/Lとなるように調製した。

また、内部標準物質であるナフタレン-d<sub>8</sub>はジクロロメタンに溶解させて適宜希釈して1mg/Lとなるように調製した。

##### 1.4 その他の試薬等

- ・ジクロロメタン：関東化学製 残留農薬・PCB試験用
- ・アセトン：関東化学製 残留農薬・PCB試験用

\*現熊本県北広域本部玉名地域振興局保健福祉環境部

- ・硫酸ナトリウム（無水）：関東化学製 残留農薬・PCB試験用
- ・N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド（BSTFA）：和光純薬工業製
- ・ガスクロマトグラフ用固相カラム：PLS-3（GL Sciences製 200mg/6mL）
- ・バイアル瓶：アジレント製

## 2 GC/MS分析条件

GC/MS：島津製作所製 GCMS-TQ8040

キャピラリカラム：RESTEK製 Rtx-5MS

内径0.25mm 長さ30m 膜厚0.25 $\mu$ m

注入方式：スプリットレス

試料注入量：2 $\mu$ L

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

インターフェース温度：250 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

GC昇温条件：50 $^{\circ}$ C（2分） $-7^{\circ}$ C/分 $-180^{\circ}$ C $-12^{\circ}$ C/分 $-300^{\circ}$ C（3分）

測定イオン：表1のとおり

## 3 分析法

図1に分析フローを示す。固相カラム（PLS-3）をジクロロメタン10mL、アセトン10mL及び精製水10mLでコンディショニングし、1 $\mu$ g/mLのサロゲート溶液50 $\mu$ Lを添加し、(1+1)硫酸でpH2~2.5に調製した試料500mLを10mL/分の速度で通水する。その後、精製水10mLで洗浄して、窒素ガス吹き付けにより30分乾燥し、ジクロロメタン-アセトン（6:1）6mLで溶出し、硫酸ナトリウム（無水）で脱水して、窒素気流下で0.5mLまで濃縮する。その後、1 $\mu$ g/mLの内部標準溶液を50 $\mu$ L添加し、BSTFAを50 $\mu$ L添加して室温で1時間以上静置し、ジクロロメタンで1mLに定容したものを試験溶液とする。

## 結果及び考察

### 1 前処理方法の検討

#### (1) 固相抽出法の検討

フェノール類の分析法について、公定法では4-アミノアンチピリン吸光度法が採用されているほか、固相抽出法を用いた方法が報告<sup>1~3)</sup>されている。今回、図1に示す分析フローにより検討を行った。抽出溶媒にジクロロメタンを用いた場合と矢口らの報告<sup>1)</sup>で検討されているジクロロメタン-アセトン（6:1）を用いた場合とで河川水を用いてサロゲートの回収率を比較した。その結果を表2に示す。ジクロロメタン6mLで溶出した場合はビスフェノールA-d<sub>16</sub>の回収率が8.6%と低くなったが、ジクロロメタン-アセトン（6:1）混合溶媒6mLで溶出した場合は78.9%に改善され、フェノール類の回

収率も良好な結果が得られたことから、抽出溶媒は、ジクロロメタン-アセトン（6:1）混合溶媒6mLを用いることとした。精製水及び河川水にノニルフェノールを500ng、ノニルフェノール以外を50ng添加し、固相抽出法により求めた回収率を表4に示す。概ね80%以上の良好な回収率が得られ、3回繰り返し測定の変動係数も10%以内と良好な再現性が得られた。

表2 サロゲートの平均回収率（n=3）

	回収率 (%)	
	ジクロロメタン	混合溶媒
ビスフェノールA-d <sub>16</sub>	8.6	78.9
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> ペンタクロロフェノール	56.4	109.9

#### (2) 溶媒抽出法の検討

固相抽出法とは別に溶媒抽出法を用いた方法が高橋らの報告<sup>3)</sup>により検討されている。今回、操作が比較的容易である溶媒抽出法による前処理も併せて検討した。図2に溶媒抽出法による分析フローを示す。塩化ナトリウム30gを添加し、1 $\mu$ g/mLのサロゲート溶液50 $\mu$ Lを添加して（1+1）硫酸でpHを2~2.5に調製した試料500mLを1L分液ロートに入れ、ジクロロメタン-アセトン（6:1）混合溶媒50mLを加えて5分間振とうし、分離するまで静置する。次に、水層にジクロロメタン-アセトン（6:1）混合溶媒50mLを加えて再度5分間振とうし、抽出液を合わせ、硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、5mL程度まで減圧濃縮した後、窒素気流下で0.5mLまで濃縮する。その後、1 $\mu$ g/mLの内部標準溶液を50 $\mu$ L添加し、BSTFAを50 $\mu$ L添加して室温で1時間以上静置し、ジクロロメタンで1mLに定容したものを試験溶液とした。精製水及び河川水にノニルフェノールを500ng、ノニルフェノール以外を50ng添加し、溶媒抽出法により求めた回収率を表3に示す。概ね70%以上の回収率が得られたが、フェノールなど低い回収率を示すものもあった。

(1)、(2)の検討結果を踏まえて、大量の溶媒を使用する溶媒抽出法に対して、固相抽出法は操作が簡便で溶媒の使用量も少なく、処理時間も短いことから、本法では固相抽出法による前処理法を用いることとした。

## 2 検量線

混合標準溶液をジクロロメタンで希釈し、ノニルフェノールは25~1000 $\mu$ g/L、ノニルフェノール以外は2.5~100 $\mu$ g/Lの濃度範囲で作成したところ、いずれの物質も決定係数0.999以上の良好な相関性が得られた。

## 3 装置の検出下限値及び定量下限値

検量線の最低濃度（ノニルフェノールは25 $\mu$ g/L、ノ

ニルフェノール以外は2.5µg/L)の標準溶液を7回繰返し分析して、分析値を試料換算した値の標準偏差の3倍を検出下限値、10倍を定量下限値として算出した。その結果を表5に示す。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)(平成10年10月 環境庁)によると、目標検出下限はノニルフェノールが0.1µg/L、それ以外のフェノール化合物が0.01µg/Lとされており、それと比較して十分に高感度であった。

3) 高橋保雄, 森田昌敏: 環境化学, Vol. 6, No.3, 363-373 (1996) .

表5 装置の検出下限値及び定量下限値

対象物質	検出下限値 (µg/L)	定量下限値 (µg/L)
フェノール	0.001	0.004
2-クロロフェノール	0.001	0.003
3-クロロフェノール	0.0007	0.002
4-クロロフェノール	0.0007	0.002
2,4-ジクロロフェノール	0.001	0.003
2,6-ジクロロフェノール	0.0008	0.002
3,4-ジクロロフェノール	0.0003	0.001
2,4,5-トリクロロフェノール	0.0006	0.002
2,4,6-トリクロロフェノール	0.001	0.004
3,4,5-トリクロロフェノール	0.001	0.003
2,3,4-トリクロロフェノール	0.001	0.003
2,3,4,5-テトラクロロフェノール	0.0008	0.002
ペンタクロロフェノール	0.001	0.005
ビスフェノールA	0.001	0.004
2-t-ブチルフェノール	0.002	0.007
3-t-ブチルフェノール	0.001	0.004
4-t-ブチルフェノール	0.0009	0.003
4-sec-ブチルフェノール	0.0003	0.001
4-n-ブチルフェノール	0.0006	0.002
4-n-ヘプチルフェノール	0.0008	0.002
4-n-ヘキシルフェノール	0.0003	0.001
4-エチルフェノール	0.0007	0.002
ノニルフェノール*	0.011	0.037
4-t-オクチルフェノール	0.0007	0.002
4-n-オクチルフェノール	0.0009	0.003
4-n-ペンチルフェノール	0.0004	0.001

※ノニルフェノールの下限値は、13異性体別に算出した下限値の合計値とした。

### まとめ

フェノール類26物質の一斉分析法の開発を目的として、固相カラムに通水してジクロロメタン-アセトン(6:1)混合溶媒で抽出後、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA)で誘導体化してGC/MSを用いた定量分析法の検討を行ったところ、精製水及び河川水を用いた添加回収試験において良好な回収率が得られたことから、本法はフェノール類26物質の一斉分析法として有効な手法であると考えられる。

### 文献

- 1) 矢口久美子, 鈴木俊也, 安田和男: 東京衛研年報, 53, 229-233 (2002) .
- 2) 中西成子, 日野隆信: 千葉衛研報告, 24, 16-21 (2000) .

表 1 測定イオン (m/z)

	定量用イオン (m/z)	確認用イオン (m/z)
フェノール	151	152,166
2-クロロフェノール	185	187
3-クロロフェノール	185	187
4-クロロフェノール	185	187
2,4-ジクロロフェノール	219	221
2,6-ジクロロフェノール	219	221
3,4-ジクロロフェノール	219	221
2,4,5-トリクロロフェノール	255	270
2,4,6-トリクロロフェノール	255	270
3,4,5-トリクロロフェノール	255	270
2,3,4-トリクロロフェノール	255	270
2,3,4,5-テトラクロロフェノール	287	289
ペンタクロロフェノール	323	325
ビスフェノールA	357	358
2-t-ブチルフェノール	207	222
3-t-ブチルフェノール	207	222
4-t-ブチルフェノール	207	222
4-sec-ブチルフェノール	193	222
4-n-ブチルフェノール	179	222
4-n-ヘプチルフェノール	179	264
4-n-ヘキシルフェノール	179	250
4-エチルフェノール	179	194
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体1	194	236
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体2	208	293
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体3	208	180
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体4	222	264
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体5	208	236
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体6	222	264
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体7	208	293
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体8	236	194
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体9	222	180
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体10	236	194
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体11	208	293
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体12	264	236
ノニルフェノール <sup>※1</sup> 異性体13	222	180
4-t-オクチルフェノール	207	278
4-n-オクチルフェノール	179	278
4-n-ペンチルフェノール	179	236
ビスフェノールA-d <sub>16</sub> <sup>※2</sup>	368	367,369
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> ペンタクロロフェノール <sup>※3</sup>	329	344
ナフタレン-d <sub>8</sub>	136	108

※1 ノニルフェノールは、13 異性体別に定量用イオン及び確認用イオンを設定した。

※2 ビスフェノール A-d<sub>16</sub> は、ペンタクロロフェノール以外のフェノール類の定量に用いた。

※3 <sup>13</sup>C<sub>6</sub>ペンタクロロフェノールは、ペンタクロロフェノールの定量に用いた。

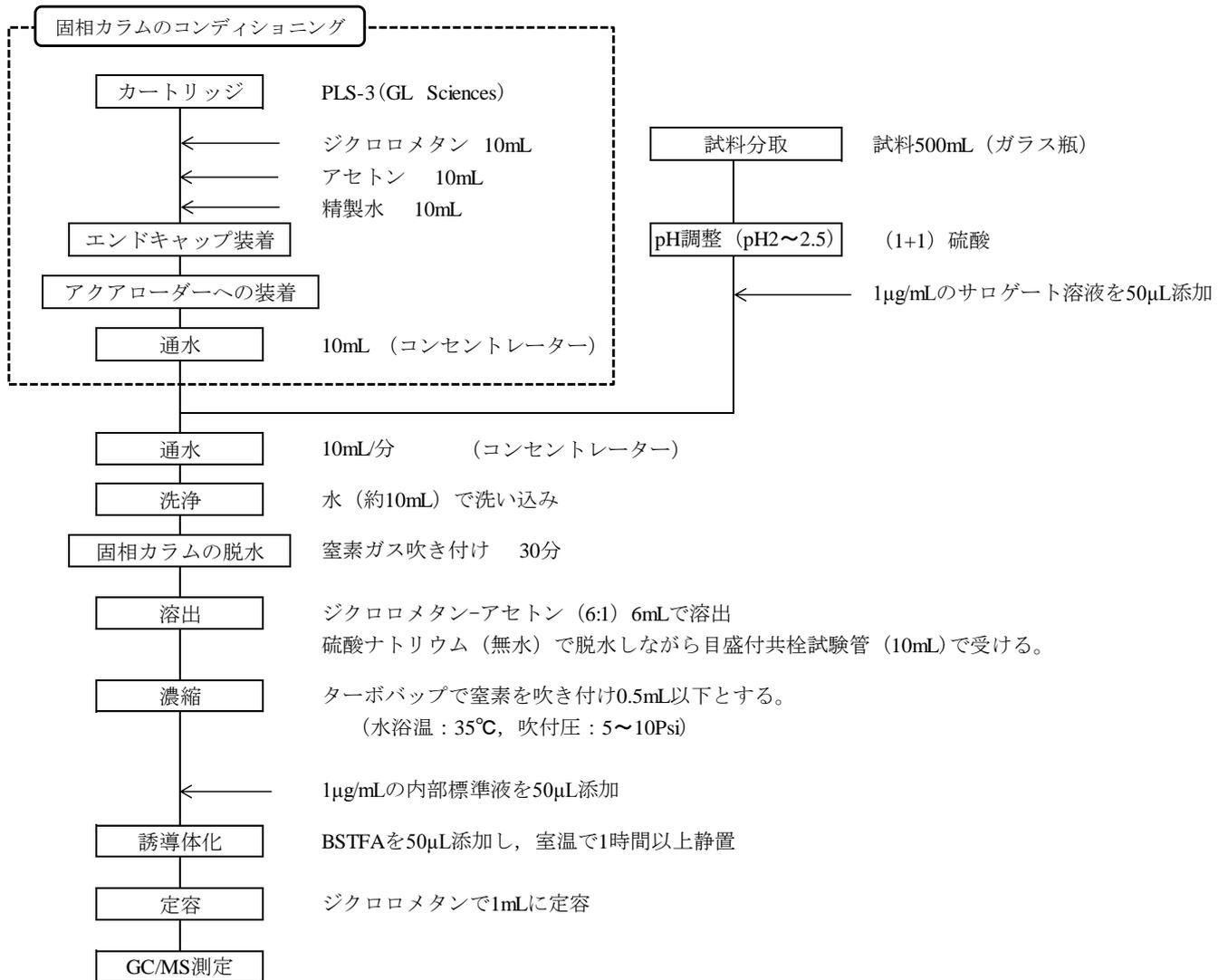


図1 固相抽出法による分析フロー

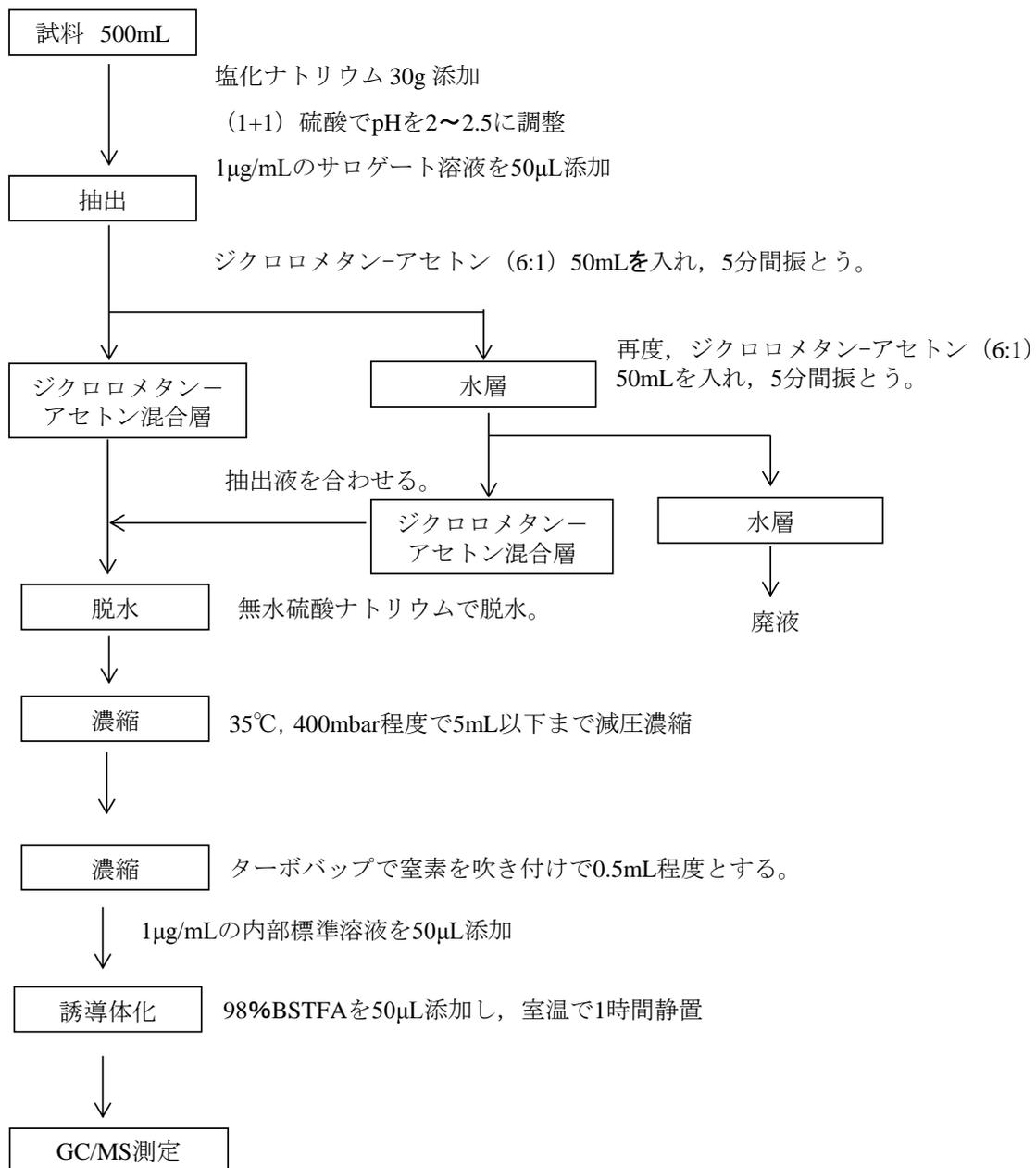


図2 溶媒抽出法による分析フロー

表3 溶媒抽出法による平均回収率 (n=3)

対象物質	精製水		河川水	
	平均回収率 (%)	変動係数 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
フェノール	64.8	3.2	63.4	3.7
2-クロロフェノール	73.7	1.8	74.2	2.5
3-クロロフェノール	77.2	1.7	76.8	2.8
4-クロロフェノール	75.0	2.1	75.3	3.4
2,4-ジクロロフェノール	80.1	0.4	79.9	2.5
2,6-ジクロロフェノール	76.9	1.8	80.6	3.4
3,4-ジクロロフェノール	80.6	0.8	81.4	3.3
2,4,5-トリクロロフェノール	80.0	1.4	77.5	2.1
2,4,6-トリクロロフェノール	80.3	1.2	81.6	3.0
3,4,5-トリクロロフェノール	86.4	0.7	86.3	2.4
2,3,4-トリクロロフェノール	85.9	2.6	87.1	1.5
2,3,4,5-テトラクロロフェノール	85.3	2.8	86.0	2.6
ペンタクロロフェノール	103.6	1.6	99.2	1.5
ビスフェノールA	96.9	1.3	96.3	2.7
2-t-ブチルフェノール	89.5	2.6	89.4	4.7
3-t-ブチルフェノール	65.7	5.9	64.3	5.8
4-t-ブチルフェノール	80.5	0.8	83.2	3.6
4-sec-ブチルフェノール	80.4	1.3	81.4	2.5
4-n-ブチルフェノール	79.2	1.8	80.5	4.1
4-n-ヘプチルフェノール	89.5	0.6	88.4	2.7
4-n-ヘキシルフェノール	84.4	0.9	87.2	2.6
4-エチルフェノール	77.0	1.0	77.4	3.1
ノニルフェノール*	83.4	1.4	81.7	3.7
4-t-オクチルフェノール	82.2	0.9	81.7	2.9
4-n-オクチルフェノール	82.8	1.7	77.1	2.6
4-n-ペンチルフェノール	81.0	0.9	81.1	1.9

表4 固相抽出法による平均回収率 (n=3)

対象物質	精製水		河川水	
	平均回収率 (%)	変動係数 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
フェノール	103.7	9.8	92.4	5.4
2-クロロフェノール	82.4	7.0	105.1	6.4
3-クロロフェノール	84.9	7.1	105.7	6.8
4-クロロフェノール	83.4	7.5	105.5	4.3
2,4-ジクロロフェノール	87.4	6.1	104.0	2.0
2,6-ジクロロフェノール	83.3	5.9	104.6	4.2
3,4-ジクロロフェノール	87.8	7.1	104.3	5.1
2,4,5-トリクロロフェノール	99.8	1.4	113.5	3.7
2,4,6-トリクロロフェノール	101.5	6.1	118.3	0.6
3,4,5-トリクロロフェノール	99.4	6.4	113.3	3.4
2,3,4-トリクロロフェノール	95.9	4.1	111.2	3.4
2,3,4,5-テトラクロロフェノール	95.4	8.1	118.6	1.0
ペンタクロロフェノール	99.0	4.2	101.7	9.4
ビスフェノールA	104.0	2.6	109.7	2.3
2-t-ブチルフェノール	92.7	7.1	104.6	5.2
3-t-ブチルフェノール	77.6	7.4	91.4	6.5
4-t-ブチルフェノール	88.4	6.7	101.8	5.7
4-sec-ブチルフェノール	88.8	6.8	101.2	6.5
4-n-ブチルフェノール	87.3	6.7	107.6	4.8
4-n-ヘプチルフェノール	98.3	4.5	114.1	4.0
4-n-ヘキシルフェノール	95.5	6.6	112.9	3.3
4-エチルフェノール	93.3	6.4	111.8	5.8
ノニルフェノール*	97.0	4.7	104.5	4.5
4-t-オクチルフェノール	97.8	5.7	104.9	5.5
4-n-オクチルフェノール	94.8	3.7	104.9	8.7
4-n-ペンチルフェノール	98.1	6.1	112.8	4.4

※13 異性体の合計濃度をノニルフェノールの濃度として回収率を算出した。