

博士学位論文

環境中微量化学物質を対象とする

有機質量分析法開発および

環境動態把握に関する研究

Organic mass spectrometric methods and

environmental behavior analyses of

trace environmental chemicals.

中部大学大学院応用生物学研究科博士後期課程

応用生物学専攻

長谷川 瞳

Summary

This paper describes liquid chromatographic and mass spectrometric (LC/MS) study and environmental applications of chemicals that are suspected to be toxic to wildlife and the environment.

The study focused on environmental behaviors of 1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane (HBCD) [3194-55-6], 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) [80-05-7], 4-(2-Phenylisopropyl)phenol (4-cumylphenol) [599-64-4], and (E)-3,4-bis(4-hydroxyphenyl)-3-hexene (diethylstilbestrol) [56-53-1], which are regulated as persistent chemical substances in the law 'Act on the Evaluation of Chemical Substances and Regulation of Their Manufacture' or suspected to be endocrine disruptors.

The brominated flame retardants HBCD isomers were measured in water, sediments and biological samples such as fishes and breast milk by developing highly sensitive and selective LC/MS methods, and the environmental concentration levels in Nagoya city were discussed. Potentially endocrine disrupting chemicals of Bisphenol A and 4-cumylphenol were simultaneously measured in environmental waters and the difference of the difference in environmental behavior of the two chemicals are discussed. A synthesized chemical of diethylstilbestrol, which has potent estrogenic properties, were measured in waters in Nagoya city with the limit of detection of 0.005 ng/L by developing a highly sensitive measurement method, and the environmental effects by diethylstilbestrol were supposed to be very little. The result was appreciated as new aspects of diethylstilbestrol in environmental water by the Japan Society of Environmental Chemistry.

II Analytical method development and environmental behavior evaluation of hexabromocyclododecane.

In the Chapter II, I reported analytical methods of HBCDs in water, sediment, and biological samples in Nagoya city, and discuss on the environmental distributions, time trends in sediment concentrations and possibility of biodegradation in sediment.

HBCDs were found in various water samples, of which concentrations of the total isomers ranged from <0.76 to 79 ng/L. The gamma isomer dominated over the other isomers in water samples. Similarly, sediment samples were dominated by the gamma isomer, which was found in all samples,

ranged from <1.9 to 58 ng/g-dry. In fish and shellfish, the alpha isomer, which was predominant in the most samples, was found from 25 to 6300 ng/g-lipid in concentration. In the case where γ -HBCD was predominant similar to those in industrial products, the sampling site was supposed to be close to the discharge point. In breast milk, α -HBCD was also predominant and was found in all samples from <3.7 to 13 ng/g-lipid in concentration.

In the degradation experiment in sediment, biodegradation of HBCDs might be possible under anaerobic condition.

III Analytical method development and environmental behavior evaluation of Bisphenol A and *p*-cumyl phenol

In the Chapter III, I reported the simultaneous and high sensitive analytical method for the determination of Bisphenol A (BPA) and para-cumylphenol (*p*-CP) by LC/MS/MS, and evaluated the environmental behaviors in water.

BPA and *p*-CP were found in various water samples in Nagoya city, of which concentrations ranged from 33 to 290 ng/L and <3.4 to 160 ng/L. *p*-CP was found in high concentrations in Arako river. Concentration of BPA was not correlated to that of *p*-CP (coefficient of correlation value 0.13).

IV Analytical method development and environmental surveillance for trace levels of diethylstilbestrol in water.

In the Chapter IV, A highly sensitive method for the determination of diethylstilbestrol (DES) in water by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS) and the application to environmental waters in Nagoya city were described.

Two grams of ascorbic acid and five nano grams of diethylstilbestrol-*d*8 as the surrogate were added to every 2000 mL of water sample. The sample was filtrated with glass fiber filter (GS25) and adjusted to pH2.5 with 6 mol/L of HCl followed by solid phase extraction with a cyclohexyl silica cartridge (InertSep CH). The fraction eluted with 5 mL of methanol was passed through a multilayer solid phase extraction cartridge (GC/SAX/PSA) to remove matrices. The analyte was eluted from the

cartridge with 12 mL of methanol. The elute was concentrated to volume approximately 0.25 mL in a test tube at 40°C in water bath under nitrogen gentle stream, and then it was filled up to 0.5 mL with pure water for LC/MS/MS measurement.

Negative electrospray ionization (ESI-negative) was used to ionize diethylstilbestrol and the internal standard (i.e. diethylstilbestrol-*d8*). The determination was performed by the selected–reaction–monitoring (SRM) method using precursor/product ion transition m/z 267.45 to 237.41 for diethylstilbestrol and m/z 275.43 to 245.47 for diethylstilbestrol-*d8*.

The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.005 ng/L and 0.013 ng/L, respectively. The average recoveries ($n=5$) from river water and sea water spiked with 0.5 ng of diethylstilbestrol are 103% (RSD 4.0%) and 104% (RSD 2.9%), respectively.

In all the river waters and sea waters sampled in Nagoya city, the concentrations of diethylstilbestrol were below the MDL.

目次

I. 研究の背景と本研究の目的	1
II. 臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs) の分析法開発および環境調査	7
III. <i>p</i> -クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発および環境調査	61
IV. ステロイドホルモン類の分析法開発および環境調査	
IV-1 本研究の背景となる研究	93
IV-2 ジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES) の分析法開発および環境調査	108
V. 総括	128
VI. 業績	131

I. 本研究の背景と目的

化学物質はその多くが我々の生活をより豊かに、便利にする目的で開発され、使用されている。他方、人の健康や生態系への影響等が危惧され、社会問題となっている化学物質も多数存在する。外因性内分泌攪乱物質、残留性有機汚染物質(POPs)はそのような化学物質にあたり、国際条約、法律などにより、国内外において規制されている。

我が国における化学物質による環境汚染を防止の基本となる法律は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」である。化審法は、1968年に起こったカネミ油症事件のポリ塩化ビフェニル（PCB）による健康被害を契機に、1973年に制定された。カネミ油症事件が起こるまで、人への健康被害の防止は、直接、化学物質と接触して被害を及ぼすような毒劇物の製造・使用等の規制や排出ガス・排出水等の規制によっておこなわれてきた。ところが、この事件は、従来、規制対象になっていなかった安定で分解しにくい物質が、長期間にわたって人体に残留して徐々に健康に被害を及ぼしたもので、これまでの化学物質の安全性に関する考え方を根本的に覆すものであった。この事件をきっかけに、新しい化学物質が製造される際には、その安全性を確認し、人の健康を損なうおそれのある化学物質に対しては、製造・輸入の規制が求められるようになった。このような背景から、1973年に厚生省（現：厚生労働省）、通商産業省（現：経済産業省）を主管として、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律ができた。また、当時発足して間もない環境庁（現：環境省）は、環境中の化学物質を調査し、その結果をもとに化審法の主管省である厚生省、通商産業省に見解を述べる役割を果たし、この調査は今日も続いている。

化審法の特徴は新規化学物質の事前審査制度を世界に先駆けて導入したことであり、届出された新規化学物質のうち、難分解性、高濃縮性、長期毒性のあるものを特定化学物質（現：第一種特定化学物質）に指定し、製造・輸入の規制（事実上の製造・輸入禁止）を行った。1986年に従来の特等化学物質を、第一種特定化学物質と名称変更するとともに、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンによる地下水汚染問題を契機に顕在化した、高濃縮性ではないが難分解性、長期毒性のある化学物質を第二種特定化学物質に新たに指定し、規制をおこなうことになった。また、高濃縮性ではないが難分解性、長期毒性のおそれの疑いのある化学物質も指定化学物質（現：第二種監視化学物質）に指定し、必要な措置が講じられることになった。しかし、ここまでの化審法は、環境を経由した人の健康被害の防止のみを目的としており、一般環境中の動植物への影響を考えていなかった。また、OECDから

も、日本の化学物質管理政策に対して「生態系保全」の考え方を導入するように勧告がなされた。そこで、2003年に法律を改正し、動植物への影響に着目した制度の導入（第三種監視化学物質の指定・措置）や環境中の放出可能性に着目した制度（中間物等の申出・確認）の見直しなどが行われ、現在に至っている。

近年、化審法の第1種特定化学物質への登録数は増加しており、2010年にはペルフルオロオクタンスルホン酸などの有機フッ素化合物、臭素系難燃剤の一つであるポリ臭素化ジフェニルエーテルなど12物質が、2013年には臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン及び農薬エンドスルファンの2物質が追加登録された。これらの物質は、規制対象になって間もないため、環境中に存在している可能性が高く、その濃度レベルの把握が求められている。

本研究では、生態系への影響が懸念される物質で、その環境動態が十分に明らかにされていない物質を対象に、LC/MSによる高確度で高感度な分析法を研究し、それらの環境汚染状況を明らかにした。研究の対象とした物質は、化審法で新たに追加登録された臭素系難燃剤、工業製品や生活用品としての用途が広く、女性ホルモン様作用があるとされているビスフェノール類、ヒトをはじめ、生物から排出されている天然型ステロイドホルモン類や合成型ステロイドホルモン類である。

工業製品である臭素系難燃剤のヘキサブロモシクロドデカンは近年、需要が急速に伸びている物質で、本研究を始めた2011年当時は、化審法の第1種特定化学物質およびPOPsには指定されていなかったが、先行して研究を行った。この研究では、魚介類などの生物試料や母乳試料など試料量に制限があるもの、水質試料、底質試料について、HBCDsの α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の5異性体の分析方法を開発し、それらの環境挙動を研究した。また、ビスフェノール類では、環境濃度レベルが比較的明らかなビスフェノールAと共にビスフェノールAの重合防止剤である*p*-クミルフェノールの同時分析法を研究し、環境濃度レベルの把握を行った。さらに、我々ヒトをはじめ、生物から排出されている天然型ステロイドホルモン類、およびジェチルスチルベストロールなどの合成型ステロイドホルモン類について研究した。ステロイドホルモン類の環境中の挙動を包括的に把握するため、試料処理からLC/MS/MSによる測定まで、極力共通する方法を用い、環境媒体間の分析の質の整合性がとれるように新たに一斉分析法を検討し、開発した。加えて、きわめて微量でも動物の胎児等に影響が生じる恐れがあるジェチルスチルベストロールについては、一斉分析法では感度が不足するため、単一物質で極低濃度の分析法を開発し、環境濃度レベルを調査した。

なお、本研究の中で取り組んだ、合成型ステロイドホルモンの一種であるジェチルスチル

ベストロールの研究結果が、2014年に日本環境化学会の第23回環境化学技術賞を受賞した。

以下に各章の詳細を記した。

「II 臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロデカン(HBCDs)の分析法開発および環境調査」について。

臭素系難燃剤は、防燃・難燃を目的として、建材や繊維等をはじめ、様々な製品中に幅広く使用されている。代表的な臭素系難燃剤としては、ヘキサブロモシクロデカン(HBCDs)、テトラブロモビスフェノールA(TBBPA)およびポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)が知られている。これらの中で、残留性や生物蓄積性、毒性等があまりないTBBPAは、これまでに特に規制等も行われてきていない。一方、残留性や生物蓄積性、毒性等の高いPBDEsは、1990年代半ば、欧州で使用規制されるようになった。そして、その代替物質としてHBCDsが使用されるようになった。HBCDsの需要は1990年代以降、年々増加しており、日本では年間2千トン超が使用されている。この物質は添加型難燃剤と呼ばれ、化学的に結合していない形態で製品に添加・配合されているため、容易に脱離・溶出し、様々な過程で環境中に漏出する可能性が高いと考えられる。さらに、HBCDsは、上記PBDEsと同様、環境残留性、生物蓄積性が高い物質で、毒性に関する報告もある。このような理由から、臭素系難燃剤の中でも、特にHBCDsに注目が集まっている。

臭素系難燃剤を対象とした環境調査はPBDEsを中心に、国内外で多くの調査が行われ、報告されている。本研究では、まだ調査事例の少ないHBCDsについて、一般環境調査に留まらず、環境残留性と関連して、生分解性や汚染の経時変化についても検討を行い、解析した。分析方法については過去に報告例があるが、回収率や濃縮倍率などの点から、改良が必要と考えた。試料処理からLC/MS/MSによる測定まで、極力共通する方法を用い、環境媒体間の分析の質の整合性がとれるよう、新たに分析法を検討・開発し、評価を行った。さらに、その分析法を用いて、大気を除く全ての媒体での挙動を包括的に把握することを目的とした。

HBCDsは、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の5異性体が存在するが、これまでの報告では、そのうち α 、 β 、 γ の3種類についての測定方法しかなかった。そこで、本研究では、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の5種類すべての異性体について、同時に分析できる方法を目指した。

各媒体の前処理方法については、水質試料では、溶媒の使用量を抑えるため、抽出方法を

従来の液液抽出法から、固相抽出法を採用するために検討を行った。底質試料では、抽出後の煩雑なクリーンアップ操作を簡素化し、前処理作業時間の迅速化を目指した。また、生物試料では、一度の前処理操作で、他の臭素系難燃剤や残留性有機汚染物質 (POPs) 類などの分析も行えるような方法を検討した。

さらに、環境汚染状況を地域的にすべての環境媒体で評価することを目的とし、名古屋市内河川および名古屋港海域の水質・底質・魚介類試料および母乳試料の調査を行った。また、底質中での微生物による HBCDs の分解についても、名古屋市内の底質を用いて実験を行い考察した。

「III *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発および環境調査」について。

ビスフェノール A (BPA) は、ポリカーボネート製のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料として幅広く利用されている。一方で、1996 年『奪われし未来 (Our Stolen Future)』の出版を契機に、内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) として、日本国内でも大きく取り上げられ、環境省、厚労省等が調査研究を開始した。さらに近年では、BPA は、きわめて微量でも動物の胎児等に影響を生じることがあるとの報告もあり、より高感度での分析法が求められている。

p-クミルフェノール (*p*-CP) は、BPA から一つ水酸基の取れた物質で、主に、界面活性剤の原料として使用されている。また、ポリカーボネート樹脂合成の際には BPA とともに原料として使用されることもある。

BPA に関してはこれまでに多くの研究がされており、分析法に関する報告例も多い。一方で、*p*-CP は、BPA と構造的に非常に類似しており、腎毒性が認められているにも関わらず、分析法についての報告例がほとんどなく、LC/MS による分析法を開発した例はない。また、BPA 類を分析するときは、誘導体化 GC/MS 法により測定を行うことが多いが、誘導体化反応を行うことは、操作が煩雑になり、前処理時間に長時間を要する。この点を改善するために、誘導体化反応なしで測定を行うことができる LC/MS による分析法開発を行うこととした。また、BPA は非常に幅広く使用されていることから、実験室内の環境中にも存在していることが考えられるため、極微量の分析を行う際には、ブランク対策を行うことが必須になる。

そこで、本研究では、BPA と、その関連物質である *p*-CP について、LC/MS を用いて、水

環境中の存在量を高感度で同時に分析する方法を開発した。さらに、両物質の環境動態を把握することを目的とし、名古屋市内の環境水を対象に開発した方法を用いて両物質を同時に調査した。

「IV. ステロイドホルモン類の分析法開発および環境調査」について。

ステロイドホルモンはステロイド骨格を持つ化合物で、我々人類をはじめ、生態系に幅広く存在している。ステロイドホルモンには、天然に存在している天然型のものと、人工的に作り出した合成型のものの2種類が存在している。

天然型ステロイドホルモンは一般に生殖腺や副腎においてコレステロールから合成され、それらのホルモン分子の構造は脂質であり、それらは細胞膜に達すると容易に内部に通過し細胞核へ到達する。また、合成型ステロイドホルモンは、さまざまな種類のものが創り出されている。その多くはステロイド化合物であるが、似た分子形状の為にステロイド受容体に作用しうる非ステロイド分子も存在する。受容体作用の点で、合成ステロイドは天然型ステロイドよりも弱いものもあれば、逆に天然型ステロイド以上に強いものもある。

近年、人間の尿中に含まれているエストラジオールをはじめ、天然型および合成型ステロイドホルモンが環境へ与える影響が問題となってきた。エストロン (E1) や 17 β -エストラジオール (E2)、アンドロステンジオン (A) が生活排水中で観測されている。特に英国では、雌雄同体化したローチ (コイ科の魚類) が 1980 年代前半から下水処理場放流先の河川で見つかって以降、特に水生生物への環境ホルモン作用が懸念されている。このような背景から、著者は天然型男性ホルモンの分析法開発や、環境水中のステロイドホルモン類の一斉分析法開発に取り組んだ。

これらの天然型ステロイドホルモン類に関する研究に加えて、本研究では、合成型ステロイドホルモンの分析法開発および環境調査を行うことを目的とした。対象物質として、合成型女性ホルモンであるジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES)に注目した。

DES は、かつて流産防止剤などに用いられてきた合成型女性ホルモン薬剤である。1970 年代以降、生殖器異常などの報告が相次ぎ、ヒトへの影響が懸念されるようになった。日本においては、環境基準値は設定されていないが、残留農薬等ポジティブリスト制度の中では、食品中において DES の検出下限値は 0.0005 mg/L (500 ng/L)と定められている。一方で、環境省は、既報の毒性情報に基づいて、環境水中の DES をより高

感度で測定すべきとの方針を出し、検出下限値を 0.01ng/L と設定した。既存の分析方法の中で、最も一般的に行われている分析法は、厚生労働省から出されている「ジエチルスチルベストロール試験法」で、アセトニトリルを用いて溶媒抽出を行い、LC/MS を用いて測定する方法である。ただし、この方法は、検出下限値を 500 ng/L として作られた分析法であるため、0.01ng/L という検出下限値は到底得られない感度であった。そこで、本研究では、測定が可能となるような分析方法を開発し、環境実態調査を行うことを目的とした。

DES の高感度分析を行うためには試料を高濃縮する必要がある。試料中の DES を効率よく抽出するための前処理方法の検討、試料中のマトリックス成分を除去するためのクリーンアップ方法などについて検討した。前処理方法が確立した後、検出下限値や添加回収率等を算出し、本法の評価を行った。さらに本法を用いて名古屋市内の河川水・海水の環境調査を行った。この DES の研究結果が、2014 年に日本環境化学会の第 23 回環境化学技術賞を受賞した。

II 臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)の分析法開発および環境調査

1. はじめに

我々の生活環境中に存在する様々な製品には、幅広く難燃剤が使用されている。ヘキサブロモシクロドデカン (HBCDs) は、テトラブロモビスフェノール A (TBBPA) およびポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) とともに代表的な臭素系難燃剤として知られている¹⁾。これらの中で、残留性や生物蓄積性、毒性等が比較的低い TBBPA は、これまでに特に規制等も行われてきていない。一方、残留性や生物蓄積性、毒性等の高い PBDEs は、1990 年代半ば、欧州で使用規制されるようになり、HBCDs は、その代替物質として使用されるようになった。HBCDs の需要量は 1990 年代以降、年々増加しており、日本では年間 2 千トン超が使用されている²⁾。この物質は添加型難燃剤と呼ばれ、化学的に結合していない形態で製品に添加・配合されているため、容易に解離・溶出し、様々な過程で環境中に漏出する可能性が高いと考えられる。このような理由から、臭素系難燃剤の中でも、特に HBCDs に注目が集まっている。

また、HBCDs は、上記 PBDEs と同様、環境残留性、生物蓄積性が高い物質である。HBCDs の餌中投与による生物への影響では、アメリカチョウゲンボウでは産卵期の早期化や雛の成長速度の遅れ³⁾、仔ラットでは体重減少、甲状腺重量の増加や血清 T3 の減少⁴⁾が見られた、等の報告がある。ヒトに関しても肝細胞 L02 に対して細胞学的影響がある⁵⁾との報告があり、HBCDs の人や生態に対するリスクが懸念される。我が国では「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」において、2013 年 7 月 5 日に、第一種特定化学物質としての登録されたばかりである⁶⁾。また、2013 年 5 月 10 日ジュネーブで行われたストックホルム条約締約国会議において、ANNEX A (廃絶。EPS 及び XPS 建築用途の除外付き) として登録され、世界的にも関心を集めている⁷⁾。

臭素系難燃剤を対象とした環境調査は国内外で多くの調査が行われ、報告されている⁸⁾ -¹⁴⁾。世界では、アメリカ、サンフランシスコ湾で湾内の堆積物および野生生物の調査¹⁵⁾、中国、長江デルタ地域の土壌中調査¹⁶⁾、スイス、ジュネーブ湖の魚類中の調査¹⁷⁾、アメリカ、ボストンの母親から採取した母乳中の調査¹⁸⁾など、多くの調査結果が報告されている。日本国内では、東京湾¹⁹⁾や大阪市の淀川²⁰⁾などで底質調査結果の報告があり、福井県九頭竜川流域の繊維工業地域においては高濃度の HBCDs が検出された報告例²¹⁾もある。しかし上

記の報告例は、環境調査結果に関するものが多く、濃度分布や発生源の推定に留まっている。

また、HBCDs の分析方法については過去に報告例があるが^{22) -24)}、改善すべき課題も多い。一つ目に HBCDs は質量数が大きいため、GC/MS を使用した分析では、異性体分離が厳しく、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε の 5 異性体を個々に分離分析することが出来ない。二つ目に、前処理において、溶媒抽出をした場合、溶媒の使用量が非常に多くなること、底質試料等の場合、クリーンアップ操作が不十分で、測定の際のマトリックスの影響が懸念されること等がある。上記の問題点を解決するために、環境調査に先立ち、まず各調査媒体における HBCDs の分析法を検討し、分析法の評価を行った。

一つ目の分離の課題に関して、HBCDs は、主に α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε の 5 異性体が存在するが (2.1 HBCDs の構造および物性)、これまでの報告では、そのうち α 、 β 、 γ の 3 種類についての測定方法しかなかった。そこで、本研究では、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε の 5 種類すべての異性体を LC により分離し、同時に分析できる方法を目指した。

二つ目の課題、各媒体の前処理方法については、水質試料では、溶媒の使用量を抑えるため、抽出方法を従来の溶媒抽出法から、固相抽出法を採用するために検討を行った。底質試料では、抽出後の煩雑なクリーンアップ操作を簡素化し、前処理作業時間の迅速化を目指した。また、生物試料では、限られた試料量の中で、一度の前処理操作で、他の臭素系難燃剤や残留性有機汚染物質 (POPs) 類などの分析も行えるような方法を開発した。それぞれの環境媒体で、試料処理から LC/MS の検出まで、極力共通する方法を用い、環境媒体間の分析の質の整合性がとれるよう、新たに分析法を検討・開発し、評価を行った。

さらに、同一地域において包括的に HBCDs 量を把握することを目的とし、名古屋市内河川および名古屋港海域の水質・底質・魚介類試料および母乳試料の調査を行った。一般環境調査に留まらず、環境残留性と関連して、生分解性や汚染の経時変化についても調査を行い、解析した。また、土壌中での HBCDs の挙動に関しては、好気性および嫌気性土壌で HBCDs が分解されたという報告²⁵⁾ や、HBCDs 汚染土壌から *Pseudomonas* 属 HB01 という γ -HBCD 分解菌が単離されたとの報告もあり²⁶⁾、河川底質においても HBCDs の分解の可能性が考えられる。そこで、微生物による HBCDs の分解について、名古屋市内の河川底質を用いて、好気性、嫌気性、滅菌条件における HBCDs の分解試験を行い考察した。

2. HBCDs の分析法開発

2.1 HBCDs の構造および物性

分析法開発をする際に必要な物質の情報（構造，分子式や物性など）を以下に示す。

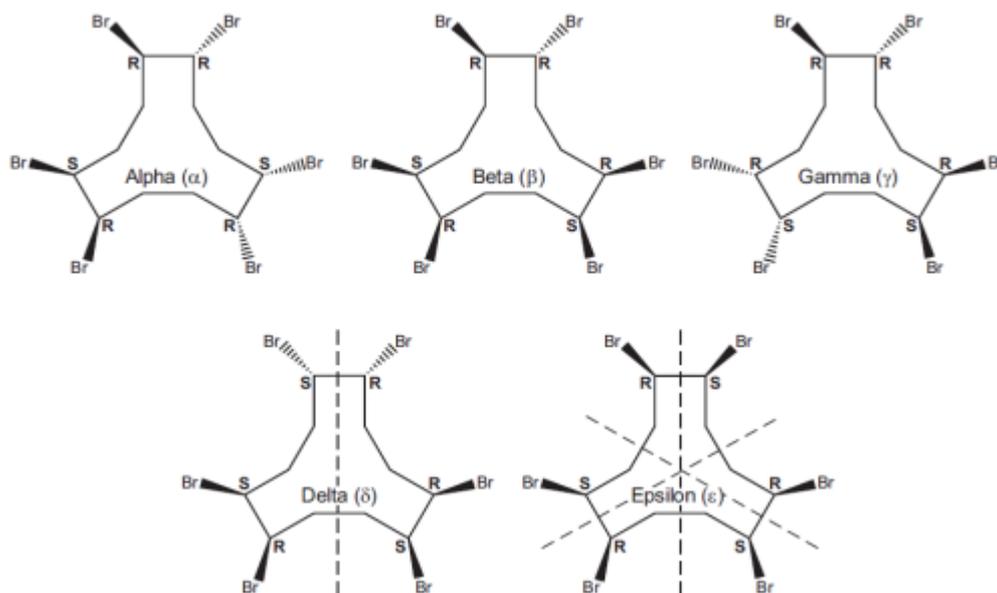


Fig.1 HBCDs の構造異性体

①構造異性体：Fig.1 に示す 5 異性体

②分子量：641.7

③融点： α 体 179～181℃， β 体 170～172℃， γ 体 207～209℃

④沸点：190℃以上で分解

⑤外観：灰褐色粉体

⑥溶解性：対水溶解度： α 体 48.8 $\mu\text{g/L}$ ， β 体 14.7 $\mu\text{g/L}$ ， γ 体 2.1 $\mu\text{g/L}$ (20℃)

対クロロホルム・酢酸エチル・アセトニトリル・メタノール 1g/L 以上

⑥logKow：5.62

⑦分解性：難分解性

⑧蓄積性：高蓄積性

⑨製造輸入量

HBCDs が第一種監視化学物質に指定された平成16年度の製造・輸入の実績は、3443トンであり、平成18年度の3937トンを最高に以降減少傾向にある。

Table.1 HBCDs の製造輸入量

(単位：トン)

	製造・輸入数量	国内出荷量	輸出
平成16年度	3,443	3,223	181
平成17年度	3,097	2,850	362
平成18年度	3,937	3,548	172
平成19年度	3,206	3,282	118
平成20年度	2,844	2,817	68
平成21年度	2,613	2,570	7

(化審法に基づく届出数量)

⑩用途

HBCDs は、発泡ポリスチレン製の住宅建材、土木建材などに樹脂用難燃剤として約8割、ポリエステル製の難燃カーテンなど繊維用難燃剤として約2割、使用されている。

Table.2 HBCDs の用途

(単位：トン)

	国内出荷量	用途別出荷割合		
		樹脂用難燃剤	繊維用難燃剤	その他
平成16年度	3,223	2,661	562	0
平成17年度	2,850	2,339	460	50
平成18年度	3,548	2,900	596	52
平成19年度	3,282	2,518	760	4
平成20年度	2,817	2,365	446	6
平成21年度	2,570	2,171	399	0

(化審法に基づく届出数量)

⑪異性体構成比 (%)

Table.3 HBCDs の異性体構成比

	α 体	β 体	γ 体
HBCD (難燃剤)	5 ~ 15	< 20	70 ~ 90
樹脂中 HBCD (押出製法)	60 ~ 70	20 ~ 30	10 ~ 20
樹脂中 HBCD (ビーズ式)	10 ~ 20	10 ~ 20	60 ~ 80
繊維中 HBCD	10 ~ 40	5 ~ 30	50 ~ 85

(経産省委託調査等)

2.2 試薬・器具

分析法開発をする際に使用した試薬および実験器具を以下に示す。

【試薬】

α -HBCD(50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

β -HBCD(50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

γ -HBCD(50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

δ -HBCD(50 μ g/mL) 99% : Wellington Laboratory 社製

ϵ -HBCD(50 μ g/mL) 99% : Wellington Laboratory 社製

$^{13}\text{C}_{12}$ - α -HBCD (50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

$^{13}\text{C}_{12}$ - β -HBCD (50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

$^{13}\text{C}_{12}$ - γ -HBCD (50 μ g/mL) 99% : Cambridge Isotope Laboratory 社製

メタノール(LC/MS 用) : 関東化学(株)製

アセトニトリル(LC/MS 用) : 関東化学(株)製

アセトン(残留農薬用) : 和光純薬(株)製

ヘキサン(残留農薬用) : 和光純薬(株)製

ジクロロメタン(残留農薬用) : 和光純薬(株)製

シュウ酸ナトリウム(特級) : 和光純薬(株)製

ジエチルエーテル(残留農薬用) : 和光純薬(株)製

エタノール(残留農薬用) : 和光純薬(株)製

フロリジル PR(残留農薬用)：和光純薬(株)製

44%硫酸シリカゲル(ダイオキシン類分析用)：和光純薬(株)製

銅粉末(特級)：和光純薬(株)製

【器具】

Empore Disk SDB-XD (47 mm)：3M 社製

ビーカー，目盛付き試験管，メスフラスコ，標線ビン，

吸引ろ過器装置，窒素吹き付け装置

高速溶媒抽出装置 ASE 300：DIONEX，

ホモジナイザー，超音波装置

ビーカー(100 mL)，目盛付き試験管，メスフラスコ(50 mL)，標線ビン，

分液ロート(100 mL, 300 mL, 1 L)，

ナス型フラスコ(100 mL, 200 mL, 300 mL)，

ガラス製クロマト管（ガラスコック付き，内径 10 mm，長さ 300 mm）

【標準液の調製】

$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon$ -HBCD 50.0 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を正確に 500 μL 量り取り，アセトニトリル 25 mL で希釈して 1.0 mg/L の標準液を作製した。 $^{13}\text{C}_{12}$ - α, β, γ -HBCD も同様にして 50.0 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液をアセトニトリルで希釈して 1.0 mg/L のサロゲート内標準液を作製する。

【検量線用標準液の調製】

1.0 mg/L の標準液を窒素吹きつけにより乾固直前までアセトニトリルを留去し，ヘキサンに転溶した後，ヘキサンで順次希釈して，2.0 ng/mL から 100 ng/mL の検量線用標準液を作製する。

各検量線用標準液のサロゲート内標準物質濃度が 50.0 ng/mL になるように 1.0 mg/L のサロゲート内標準液を添加する。

2.3 HBCDs の LC/MS 測定方法

LC/MS 測定は Alliance2695/ Micromass Quattro micro API (Waters 社, Milford, MA, USA) を用い、定量は ESI-Negative-SRM モードにより行った。測定条件を以下に示す。

〔LC 条件〕

LC 機種 : Waters 2695

カラム : Ascentis express C18 (2.1 mm×100 mm×2.7 μm) supelco

移動相 : A : water B : CH₃OH C : CH₃CN

0→16 min A:25→21, B: 67.5→71.1, C: 7.5→7.9 linear gradient

16→18 min A:21→0, B:71.1→90, C:7.9→10 linear gradient

18→20 min A:B:C=0:90:10

20→25 min A:B:C=25:67.5:7.5

(移動相が 2 液までしか設定できない場合)

A : water B : CH₃OH : CH₃CN = 9 : 1

0→16 min A:25→21, B: 75→79 linear gradient

16→18 min A:21→0, B:79→100 linear gradient

18→20 min A:B=0:100

20→25 min A:B=25:75

流量 : 0.2 mL/min カラム温度 : 40 °C 注入量 : 10 μL

〔MS 条件〕

機種 : Waters QuattroMicro API

コーン電圧 : 30 V コリジョン電圧 : 15 eV キャピラリー電圧 : 1.20 kV

コーンガス流量 : 50 L/hr デソルベーションガス流量 : N₂ (700 L/hr)

ソース温度 : 110 °C デソルベーション温度 : 350 °C

イオン化法 : ESI (-) SRM

モニターイオン: 641 > 79 (確認イオン 677 > 79)

モニターイオン (内標準) : 653 > 79

[5 異性体分離の検討]

HBCDsはFig.1に示した通り、 α , β , γ , δ , ϵ の5つの異性体が存在する。 α , β , γ の3異性体のみであれば、多くのカラムで問題なく分離することが出来るが、5異性体をすべて分離することは困難だったので、分離条件を検討した。

母体がシリカゲルの10 cm, 3 μm のカラムでは、化学結合基がC8, C18, C30の3種類について検討したが、どの場合も5異性体分離は不可能であった。移動相条件によっては4異性体まで分離可能であるが、ベースライン分離は難しく、特に α と δ , δ と ϵ の分離が悪かった (Fig.2中3,4参照)。またカラムの長さを15 cmのものに変え、長時間かけて分析を行うことにより、5異性体分離は可能となったが、ベースライン分離は難しいことに加えて、保持時間が長いためにピーク形状が悪くなってしまった (Fig.2中2参照)。今回、使用することにしたAscentis expressカラムは、Fused-Core™粒子構造を持っており、粒子内拡散が他のカラムに比べて小さい。そのため、通常の3 μm のカラムの2倍の理論段数を持ち、sub-2 μm 充填剤粒子と同等の高速分析と高分離を達成するため、短時間で5異性体の分離が可能になった (Fig.2中1参照)。

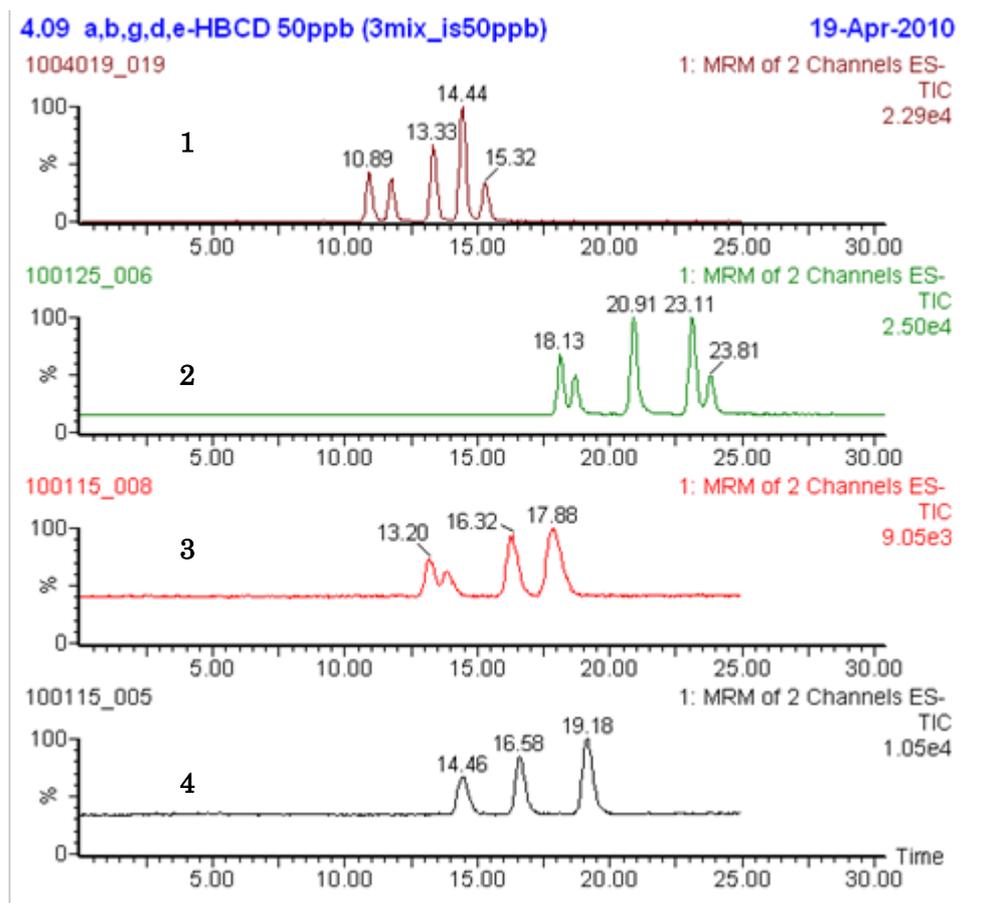


Fig.2 分析カラムによる分離の違い (分析条件は以下の通り)

1. カラム : Ascentis express C18 (2.1 mm×100 mm×2.7 μm) supelco

移動相 : A : water B : CH₃OH C : CH₃CN

0→16 min A:25→21, B: 67.5→71.1, C: 7.5→7.9 linear gradient

16→18 min A:21→0, B:71.1→90, C:7.9→10 linear gradient

18→20 min A:B:C=0:90:10

20→25 min A:B:C=25:67.5:7.5

2. カラム : L-column C-18 (2.1 mm×150 mm×3 μm) 化評研

移動相 : A : water B : CH₃OH C : CH₃CN

0→18 min A:25→20, B: 60, C: 15→20 linear gradient

18→22 min A:20→0, B:60, C:20→40 linear gradient

22→25 min A:B:C=25:60:15

3. カラム : Develosil C-30 (2.1 mm×100 mm×3 μm) 野村化学

移動相 : A : water B : CH₃OH C : CH₃CN

0→18 min A:25→20, B: 60, C: 15→20 linear gradient

18→22 min A:20→0, B:60, C:20→40 linear gradient

22→25 min A:B:C=25:60:15

4. カラム : Capcell pak C-8 (2.1 mm×100 mm×3 μm) 資生堂

移動相 : A : water B : CH₃OH C : CH₃CN

0→18 min A:30→20, B: 30, C: 40→50 linear gradient

18→22 min A:20→0, B:30, C:50→70 linear gradient

22→25 min A:B:C=30:30:40

[検量線]

検量線用標準液 10 μL を LC/MS に注入した。得られた標準物質のピーク面積とサロゲート内標準物質のピーク面積の比及び濃度比から検量線を作成した。 α -HBCD, β -HBCD, γ -HBCD, δ -HBCD, ε -HBCD とも、検量線は、2 ng/mL から 100 ng/mL の濃度範囲において相関係数 0.9993 以上で十分な直線性を示した。

検量線を Fig.3 に、検量線作成用データを Table 4 に示す。

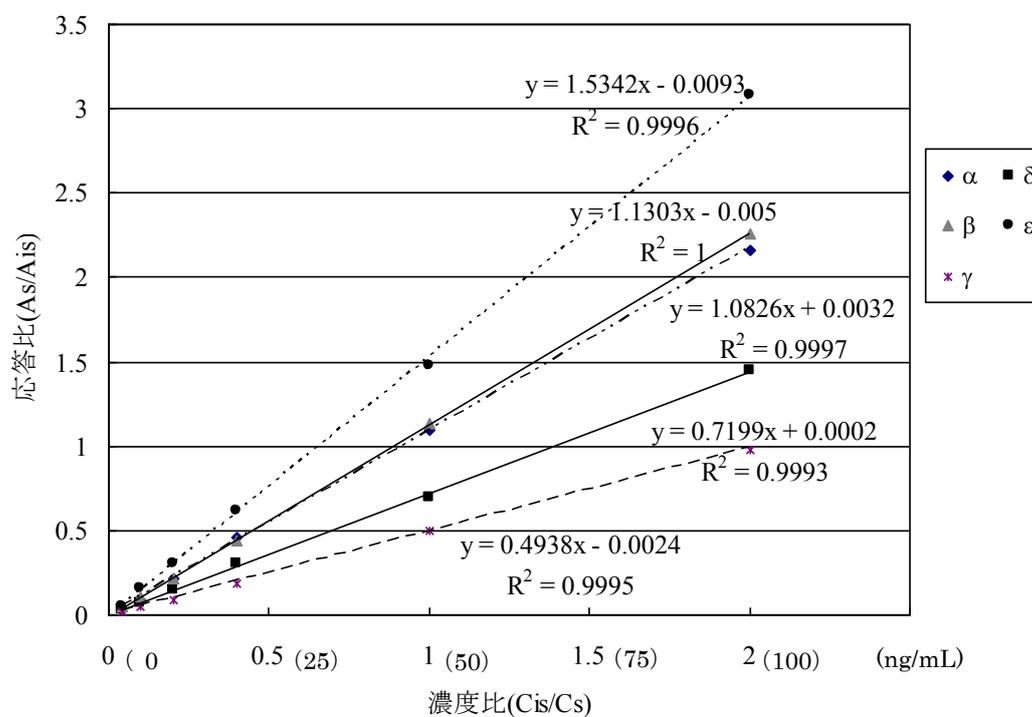


Fig.3 検量線（括弧内の数値は標準溶液濃度。内標準物質濃度は 50 ng/mL）

Table 4 検量線作成データ

	標準試料濃度	応答値		応答比	相対感度係数	相対感度
	(C_s)	調査物質(A_s)	内標準物質 A_{is}	(A_s/A_{is})	(C_{is}/C_s) × (A_s/A_{is})	係数の CV
	(ng/mL)	$m/z = 641$	$m/z = 653$		* $C_{is} = 50$ (ng/mL)	(%)
α	100	2279	1055	2.1591	1.0796	7.3
	50	1215	1107	1.0981	1.0981	
	20	487	1065	0.4571	1.1427	
	10	237	1078	0.2200	1.0998	
	5	98	1063	0.0917	0.9175	
	2	45	1068	0.0420	1.0511	
δ	100	1529	1055	1.4482	0.7241	5.3
	50	771	1107	0.6961	0.6961	
	20	326	1065	0.3058	0.7645	
	10	160	1078	0.1485	0.7423	
	5	73	1063	0.0684	0.6842	
	2	28	1068	0.0265	0.6630	
β	100	3984	1767	2.2546	1.1273	4.6
	50	2032	1798	1.1303	1.1303	
	20	799	1808	0.4420	1.1049	
	10	409	1873	0.2185	1.0924	
	5	186	1788	0.1043	1.0428	
	2	87	1816	0.0480	1.1995	
ε	100	4703	1528	3.0782	1.5391	6.0
	50	2312	1562	1.4797	1.4797	
	20	966	1567	0.6167	1.5419	
	10	486	1606	0.3026	1.5130	
	5	231	1518	0.1522	1.5221	
	2	79	1514	0.0524	1.3098	

	100	1501	1528	0.9824	0.4912	
	50	785	1562	0.5023	0.5023	
	20	285	1567	0.1820	0.4551	
γ	10	148	1606	0.0919	0.4595	7.2
	5	78	1518	0.0516	0.5156	
	2	33	1514	0.0220	0.5493	

〔定量〕

試験液 10 μ L を LC/MS に注入し、得られた対象物質とサロゲート内標準物質のピーク面積比から、検量線より定量した。

2.4 各媒体の分析法に関する要素技術とその評価

2.4.1 水質試料中 HBCDs の前処理方法

2.4.1.1 抽出方法の検討

ディスク型固相 4 種、カートリッジ型固相 4 種、液々抽出 2 種で精製水からの抽出方法を検討した。結果は Fig.4 に示す。

精製水 200 mL に HBCDs を 50 ng 添加したものを試料として用いた。固相抽出は、どの固相もアセトン、ジクロロメタンで洗浄した後、メタノール、精製水各 10mL でコンディショニングしてから使用した。通液後は 30 分ほど乾燥させ、アセトン 3 mL、ジクロロメタン 3 mL で溶出し、窒素パーズ後、1 mL に定容。液々抽出は、各溶媒（ヘキサン、ジクロロメタン）とも 50 mL で 3 回抽出。塩析効果を期待して、試料に 6 g の NaCl を添加したのも抽出した。HBCDs は物性情報から考えて器具等へ吸着しやすく、そのためにカートリッジ型の固相を使用すると、固相のハウジング部分へ吸着してしまうことにより、回収率が低くなったことが考えられる。また、水試料を前処理するときの利便性を考慮して、溶媒の使用量が多い液々抽出ではなく、ディスク型固相を使用することとした。精製水を用いた前処理の検討結果から、C18 もしくは XD を使用するのが良いと考え、この 2 つのディスク型固相を用いて海水及び河川水で検討を行った。河川水試料においては回収率に大差はなかったが、海水サンプルにおいては、XD を使用した方が良好な結果が得られたので、水試料の前処理には XD を使用することとした。

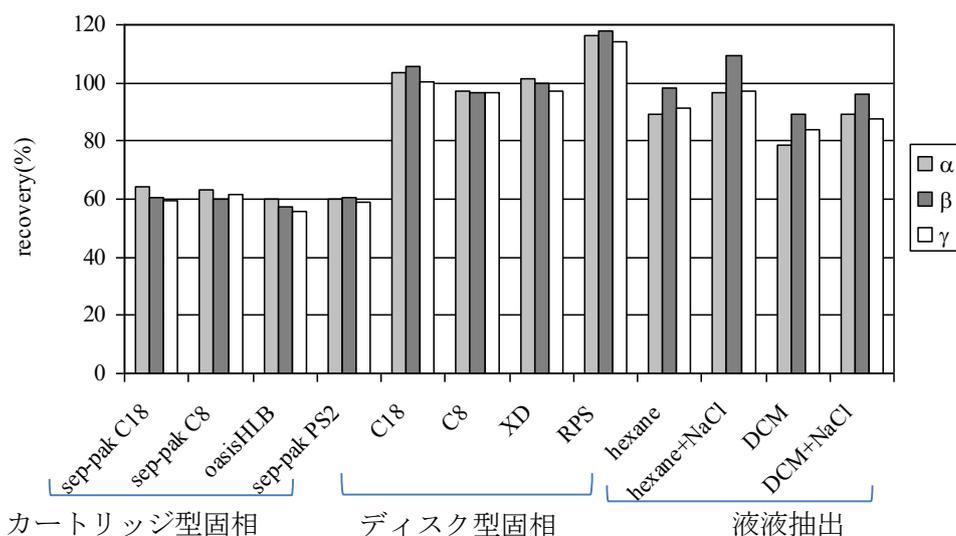


Fig.4 抽出方法による回収率の違い

2.4.1.2 水試料の前処理方法

水試料 200 mL にサロゲートとして $^{13}\text{C}_{12}$ - α , β , γ -HBCD を 50.0 ng (1.00 mg/L, 50.0 μL) 添加した。固相ディスク (Empore Disk SDB-XD) はメタノール 10 mL, 精製水 10 mL でコンディショニングした後, 試料を負荷する。試料の入っていたガラス容器は, 2 mL のメタノールで洗浄し, 固相ディスク上に合わせた。更にそのガラス容器は 10 mL の精製水で洗浄し, 同じく固相ディスク上に合わせ, 約 20 mL/min の速度で通水した。通水後は 10 mL の精製水で固相ディスクを洗浄し, 1~2 分間吸引脱水した後, 固相ディスクを吸引装置から取り外し, 40 °C の乾燥機中で 1 時間乾燥させた。

吸引ろ過装置を再度組み立て, ろ液留出部に受器をセットした後, 4 mL のアセトン, 続いて 4 mL のジクロロメタンで溶出した後, ガラス製ファンネル等は 2 mL のアセトンで洗浄し溶出液に合わせた。その後, 溶出液は 40 °C の水浴を備えた窒素吹き付け装置で乾固直前まで濃縮し, 80%アセトニトリル水溶液で 1 mL にメスアップした後, 超音波装置に 2 分間程度かけて試験液とした。

2.4.1.3 分析法の定量性とその評価

[測定方法の検出下限(MDL),定量下限(MQL)]

本測定方法における MDL 及び MQL を下表に示す。

測定方法の検出下限(MDL)及定量下限(MQL)の算出は, 「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)を採用し, Table 5, 6 のとおり算出した。

Table 5 MDL 及び MQL の算出 (海水試料)

物質名	α	δ	β	ε	γ
試料	海水	海水	海水	海水	海水
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	2	2	2	2	2
試料換算濃度 (ng/L)	10	10	10	10	10
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1
注入濃度 (ng/mL)	2	2	2	2	2
装置注入量 (μ L)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
操作ブランク平均(ng/L)*1	ND	ND	ND	ND	ND
無添加平均 (ng/L)*2	ND	ND	ND	ND	ND
結果 1 (ng/L)	9.86	11.3	9.80	9.45	10.9
結果 2 (ng/L)	9.59	10.6	9.71	8.74	10.9
結果 3 (ng/L)	9.65	10.7	9.12	9.27	10.4
結果 4 (ng/L)	10.7	10.9	9.37	9.62	9.69
結果 5 (ng/L)	11.4	10.9	10.6	9.37	11.1
結果 6 (ng/L)	9.32	10.8	9.84	10.1	11.6
結果 7 (ng/L)	11.8	11.2	10.0	9.54	9.20
結果 8 (ng/L)	11.7	9.05	10.0	9.22	11.0
平均値 (ng/L)	10.50	10.67	9.807	9.419	10.58
標準偏差 (ng/L)	1.01	0.702	0.444	0.399	0.781
MDL (ng/L)*3	3.8	2.7	1.7	1.5	3.0
MQL (ng/L)*4	10	7.0	4.4	4.0	7.8
S/N 比	15	12	20	22	16
CV(%)	9.6	6.6	4.5	4.2	7.4

*1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均 (n=3)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n=3)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

*5 サロゲート回収率： α ；68.9%， β ；64.5%， γ ；64.8%

Table 6 MDL 及び MQL の算出 (河川水試料)

物質名	α	δ	β	ε	Γ
試料	河川水	河川水	河川水	河川水	河川水
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	2	2	2	2	2
試料換算濃度 (ng/L)	10	10	10	10	10
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1
注入濃度 (ng/mL)	2	2	2	2	2
装置注入量 (μ L)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
操作ブランク平均(ng/L)* ¹	ND	ND	ND	ND	ND
無添加平均 (ng/L)* ²	ND	ND	ND	ND	ND
結果 1 (ng/L)	9.98	10.4	10.4	9.32	10.2
結果 2 (ng/L)	10.2	10.9	9.67	10.6	11.0
結果 3 (ng/L)	8.95	10.8	9.57	10.2	11.7
結果 4 (ng/L)	10.8	10.5	9.67	10.0	11.8
結果 5 (ng/L)	10.2	9.05	10.6	10.8	10.9
結果 6 (ng/L)	9.51	11.4	10.1	9.48	10.4
結果 7 (ng/L)	9.51	9.43	9.94	9.89	10.5
平均値 (ng/L)	9.878	10.35	10.00	10.04	10.92
標準偏差 (ng/L)	0.60	0.832	0.409	0.536	0.617
MDL (ng/L)* ³	2.3	3.2	1.6	2.1	2.4
MQL (ng/L)* ⁴	6.0	8.3	4.1	5.4	6.2
S/N 比	20	14	21	16	12
CV (%)	6.1	8.0	4.1	5.3	5.7

*1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均(n=3)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n=3)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

*5 サロゲート回収率： α ；86.6%， β ；84.8%， γ ；82.8%

〔添加回収試験〕

精製水、河川水（庄内川）、海水（名古屋港）への標準物質添加回収結果を Table 7 に示す。河川水、海水の添加回収試験試料のクロマトグラムを Fig.5 に示す。

内標準物質による補正を行わない場合、精製水については α 、 β 、 γ とともに 90%以上の回収率が得られたが、河川水、海水に関しては共に 60~80%程度の回収率であった。この原因として、試料濃縮による LC/MS 測定時のイオン化抑制など幾つかの可能性が考えられるが、明かではない。しかし、相対標準偏差が小さく、かつ内標準物質の回収率が 60%以上あり、内標準物質による補正後の回収率が良いことから、内標準物質による補正を行うことで、このままの分析方法でも定量的評価は可能と判断した。定量結果については、すべて内標準物質による補正を行った値により評価を行った。

Table 7 精製水、河川水（庄内川）、海水（名古屋港）への標準物質添加回収結果

精製水（添加）					
物質名	α	δ	β	ϵ	γ
試料量 (L)	0.2		0.2		0.2
標準添加量 (ng)	2		2		2
測定回数	3		3		3
検出濃度 (ng/mL)	2		2		2
回収率 (%)	98.8	- 104		- 100	
サロゲート回収率 (%)	97.2	- 96.4		- 90.1	
CV (%)	9.6	- 4.5		- 7.4	

精製水（無添加）

物質名	α	δ	β	ε	γ
試料量 (L)	0.2		0.2		0.2
標準添加量 (ng)	無添加		無添加		無添加
測定回数	2		2		2
検出濃度 (ng/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
回収率 (%)	-	-	-	-	-
サロゲート回収率 (%)	93.8	-	97.2	-	96.4

河川水試料（添加）

物質名	α	δ	β	ε	γ
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	2	2	2	2	2
測定回数	7	7	7	7	7
検出濃度 (ng/mL)	2	2	2	2	2
回収率 (%)	99	103	100	100	109
サロゲート回収率 (%)	68.9	-	64.5	-	64.8
CV (%)	6.1	8.0	4.1	5.3	5.7

河川水試料（無添加）

物質名	α	δ	β	ε	γ
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	無添加	無添加	無添加	無添加	無添加
測定回数	2	2	2	2	2
検出濃度 (ng/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
回収率 (%)	-	-	-	-	-
サロゲート回収率 (%)	90.0	-	85.3	-	80.8

海水試料（添加）

物質名	α	δ	β	ϵ	γ
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	2	2	2	2	2
測定回数	8	8	8	8	8
検出濃度 (ng/mL)	2	2	2	2	2
回収率 (%)	105	107	98	94	106
サロゲート回収率(%)	68.9	-	64.5	-	64.8
CV (%)	9.6	6.6	4.5	4.2	7.4

海水試料（無添加）

物質名	α	δ	β	ϵ	γ
試料量 (L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量 (ng)	無添加	無添加	無添加	無添加	無添加
測定回数	2	2	2	2	2
検出濃度 (ng/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
回収率 (%)	-	-	-	-	-
サロゲート回収率(%)	85.3	-	81.2	-	79.1

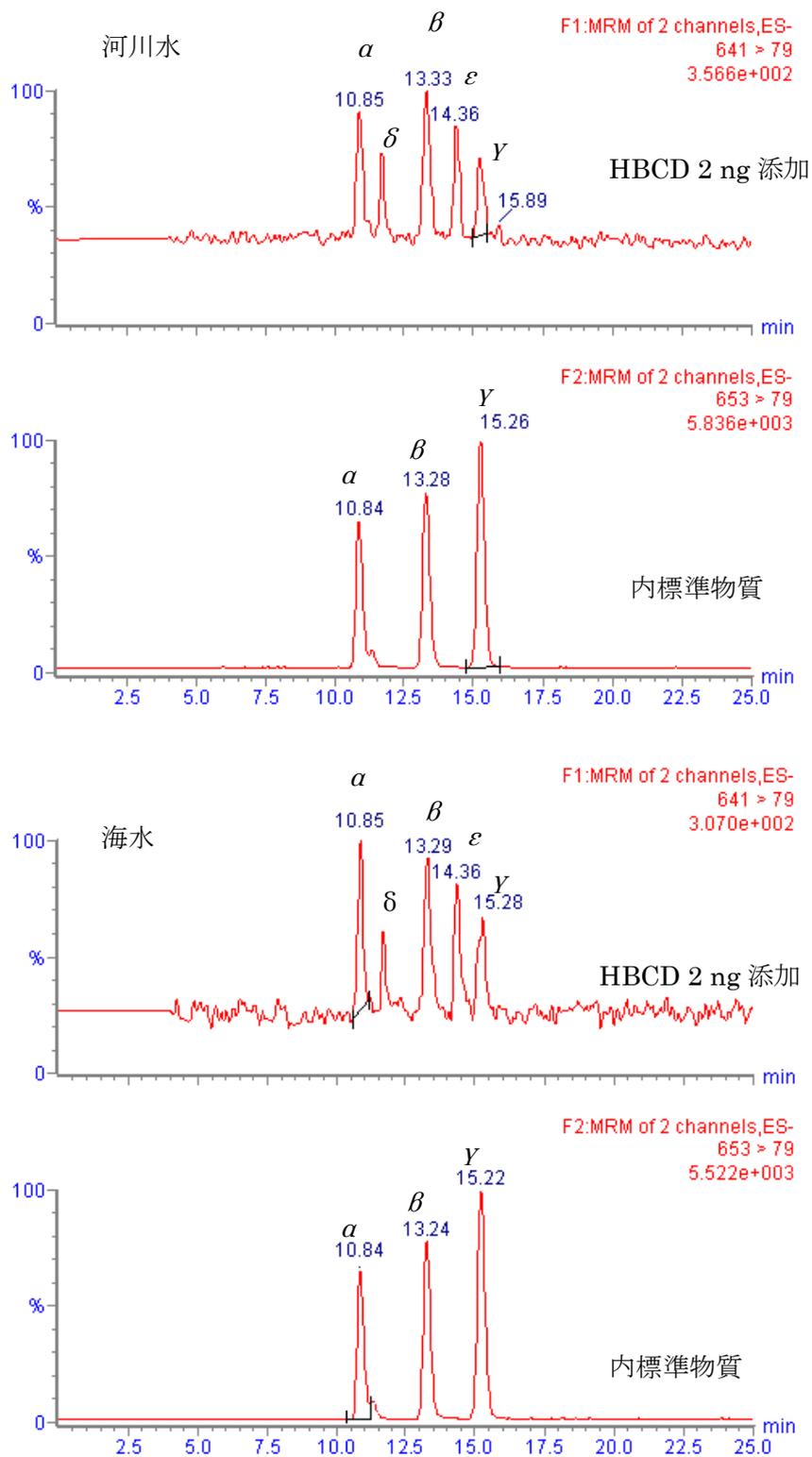


Fig.5 河川水、海水の添加回収試験試料のクロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を Table 8 に示す。 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ -HBCD の 5 異性体とも、暗所における保存であれば、pH が 5, 7, 9 いずれの場合においても、7 日後の残存率は 90% 以上であった。また、明所における保存であっても、7 日後の残存率は 90% 以上であった。

Table 8 分解性スクリーニング試験の結果

pH	初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)					残存率 (%)				
		1 時間後					7 日後				
		α	δ	β	ϵ	γ	α	δ	β	ϵ	γ
5 (暗所)	2	96	100	98	100	101	99	96	96	81	95
7 (明所)	2						99	98	100	91	94
7 (暗所)	2	95	97	92	96	100	92	99	89	90	95
9 (暗所)	2	97	93	96	99	102	95	102	103	92	93

〔保存性試験〕

保存性試験の結果を Table 9 に示す。河川水および海水を前処理した試験液に、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ -HBCD の標準溶液を表中の濃度添加し、7 日後の残存率を測定した。添加濃度が 2 ng/mL と低濃度の場合、添加濃度が 20 ng/mL の場合と比較して、やや残存率が低くなる傾向があった。しかし、いずれの場合においても残存率は 85% 以上であり、前処理後、数日以内に測定を行えば問題ないと考えられる。検量線溶液については低濃度および高濃度ともに 1 か月後の残存率が 90% 以上あり、標準溶液を調製してから、1 か月程度は使用が可能であると考えられる。

Table 9 保存性試験の結果

	初期濃度	残存率 (%)				
		7 日間				
		α	δ	β	ϵ	γ

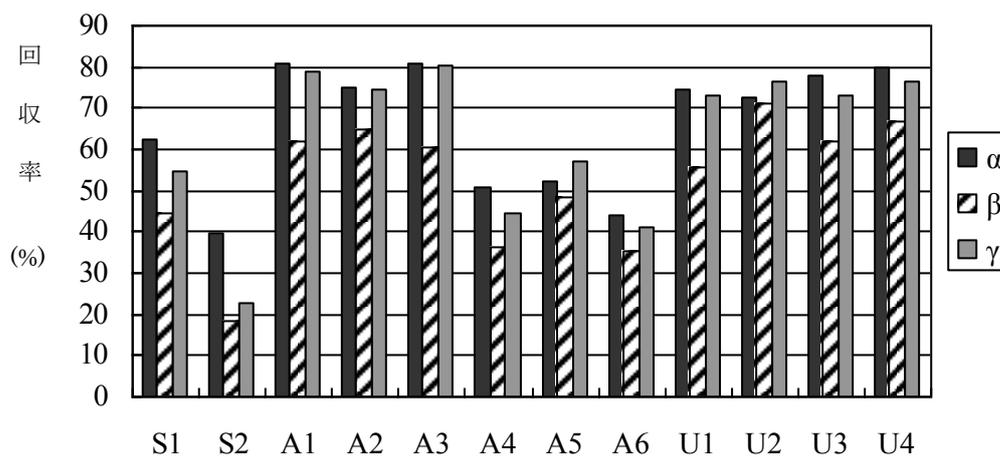
		(ng/mL)	α	δ	β	ϵ	γ
河川水	試料	2	87	95	87	93	92
	試料	20	91		97		96
海水	試料	2	85		85		85

		初期濃度	残存率 (%)				
		(ng/mL)	1ヶ月				
		(ng/mL)	α	δ	β	ϵ	γ
標準溶液	検量線最低濃度	2	103	94	107	96	100
	検量線最高濃度	100	96	103	102	95	97

2.4.2 底質試料中 HBCDs の前処理方法

2.4.2.1 抽出方法の検討

乾重量あたり 5 g 程度の底質試料を量り取り、サロゲートとして $^{13}\text{C}_{12}$ - α , β , γ -HBCD を 50 ng 添加した後、抽出操作を行った。抽出方法は下記の条件において検討を行い、結果を Fig.9 に示す。なお、Fig.6 は添加したサロゲートの回収率を表している。



S1, S2 : ソックスサーム抽出

A1~A6 : 高速溶媒抽出

U1~U4 : 超音波・振とう抽出

Fig.6 抽出方法による回収率の違い

抽出条件

ソックスサーム抽出：抽出温度 180°C，煮沸時間 45 分間，抽出時間 30 分間。

使用溶媒 1 回目アセトン，2 回目ヘキサン (S1, 2)。

高速溶媒抽出：抽出温度 100°C，圧力 1500 psi，加熱時間 5 分間。

使用溶媒アセトン (A1~A3)，アセトニトリル (A4~A6)。

超音波・振とう抽出：超音波 10 分間，振とう 10 分間，2500 rpm 遠心分離 10 分間を 3 セット。

使用溶媒アセトン (U1, 2)，アセトニトリル (U3, 4)

検討の結果，アセトンを用いた高速溶媒抽出，および超音波・振とう抽出が，他の抽出方法と比べて内標準物質の回収率が高かった (Fig.9)。ただし，超音波・振とう抽出の場合，底質からの抽出効率が高速溶媒抽出の場合と比較して低い可能性がある。Fig.10 の HBCDs のクロマトグラムより， α ， β に関しては A1 と U1 のピーク面積に大きな差はないが， γ のピーク面積は大きく差が出た。Fig.10 に示した以外の A2~A6, U2~U4 についても同様の傾向が見られた。以上の結果から，アセトンを用いた高速溶媒抽出を採用することとした。

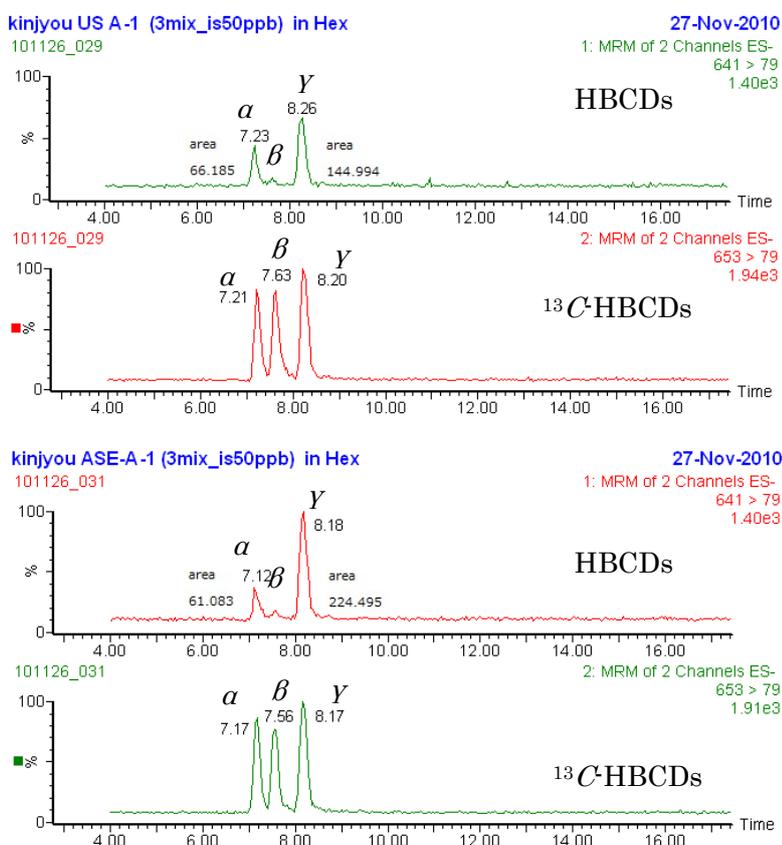


Fig.7 抽出方法による HBCD のピーク面積の違い (上 : U1, 下 : A1)

2.4.2.2 クリーンアップ方法について

〔硫酸処理による分解の可能性について〕

底質を前処理すると、測定時にマトリックスの影響が懸念されるため、クリーンアップ操作が必要となる。硫酸処理は、有機物の分解に非常に有効な手段であるが、硫酸処理を施すと、HBCDsが分解する可能性があるという文献があったので、確認を行った。

名古屋港の底質 20 g-wet をソックスサームを用いて抽出し、その後、ヘキサン溶液に転溶し、100 mL に定容する。それを四等分に分割し、それぞれ、濃硫酸 5 mL で 1~4 回、硫酸処理を行った。同様に、ヘキサン 100 mL、HBCDs 400ng を添加し、よく混合させて、四等分に分割した。それぞれ、濃硫酸 5 mL で 1~4 回、硫酸処理を行った。

Table 10 硫酸処理による HBCDs の減少

底質中HBCD濃度 (ng/g-dry)				ヘキサン中HBCD濃度 (ng/mL)			
硫酸処理の回数	α	β	γ	硫酸処理の回数	α	β	γ
1	10.30	1.57	14.01	1	96.5	94.1	115.8
2	11.51	1.67	13.30	2	90.5	91.0	111.6
3	11.39	1.67	13.15	3	106.6	103.5	125.6
4	10.42	2.21	14.72	4	93.6	96.4	112.2

Table 10 に、それぞれの HBCDs 濃度を表に示した。硫酸処理の回数を 1~4 回行っても、HBCDs 濃度はほぼ同じであった。また、ヘキサン中に添加した HBCDs の濃度も硫酸処理の回数に関わらず、添加した 100 ng が検出され、硫酸処理による分解は起きていないことが明らかとなった。よって、クリーンアップ操作として、硫酸処理は有効な手段と考えられる。

〔カラムクロマトグラフィーの条件について〕

底質の前処理の際には、クリーンアップ操作として、前述の硫酸処理を行うだけでは不十分であった。硫酸処理に加えて、カラムクロマトグラフィーを行うことで、試験液中の測定妨害成分を除去することが有効と考えられる。また、ここで、分画を行うことにより、HBCDs 以外にポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)やポリ塩化ビフェニル(PCB)をはじめ、多くの残留性有機汚染物質(POPs)類も同時に前処理することが可能であると考えられる。そこで、フロリジルおよびシリカゲルを用いて、カラムクロマトグラフィーの条件検討を行った。

1. フロリジル 5 g :
 - F-1 10%ジクロロメタン/ヘキサン 40 mL
 - F-2 25%ジクロロメタン/ヘキサン 100 mL
2. フロリジル 5 g :
 - F-1 10%ジクロロメタン/ヘキサン 40 mL
 - F-2 30%ジクロロメタン/ヘキサン 80 mL
3. シリカゲル ワコーゲル S1 5 g :
 - F-1 10%ジクロロメタン/ヘキサン 100 mL
 - F-2 25%ジクロロメタン/ヘキサン 150 mL
4. シリカゲル C100 5 g :
 - F-1 10%ジクロロメタン/ヘキサン 50 mL
 - F-2 25%ジクロロメタン/ヘキサン 100 mL

Table 11 フロリジルごとの HBCDs 回収率

回収率(%)	α	β	γ
フロリジル1	88.7	93.6	95.7
フロリジル2	87.8	93.0	92.7

シリカゲルを使用した条件 3, 4 は, HBCDs が少しずつただらだと溶出してくるため, F-1, F-2 だけでは HBCDs を回収できなかった。溶媒の量を増やすことで回収率を向上も考えられるが, 今回の検討結果から, HBCDs のクリーンアップには適さないと判断した。一方で, 条件 1, 2 の F-2 の回収率は Table 11 に示したとおり良好であった。どちらの場合も F-1 の 10%ジクロロメタン/ヘキサンのほうに HBCDs が溶出してくることはなかった。条件 1, 2 では, F-2 において使用する溶媒の量が異なっており, 条件 2 のほうが, より早く溶出するために, 溶媒の使用量も減らすことができる。しかし, ジクロロメタンの濃度が高いために, 不純物がより多く混ざっていた。そこで, 今回は条件 1 のほうを採用することとした。

〔クリーンアップ操作の迅速・簡素化について〕

硫酸処理はクリーンアップ操作において必要な操作であるが、操作が煩雑で、濃硫酸を大量に使うために危険も伴い、さらに使用後の廃硫酸の処理も行わなければならない。そこで、硫酸処理を迅速かつ簡素化するために、硫酸シリカゲルを使用する方法を検討した。

・44%硫酸シリカゲルの使用

固相チューブに、右の量を上から順番に silica1→44%硫酸 silica→silica2 で詰める。

	silica1	SO4-silica	silica2
1	0.2	0.5	0.4
2	1	1	2
3	0.2	0.5	0.4
4	0.2	1	0.2

ヘキサンに転用した標準物質を 100ng 添加して、ヘキサン 4mL で洗浄後、30%ジクロロメタン／ヘキサンで分画。5mL ずつ分取した。

(単位：g)

どの条件においても 30%ジクロロメタン／ヘキサンを 20mL 流せば、HBCD は 90~100%回収することが出来た。

・44%硫酸シリカゲルとフロリジルの併用

十分に硫酸処理の効果を得られるように 44%硫酸シリカゲルは 4g 使用した。

	florisil	SO4-silica	florisil
1	1	4	4
2	1	4	3
3	1	4	2

(単位：g)

ガラスカラムに、上から順に、無水硫酸ナトリウム 2g→florisil→44%硫酸 silica→florisil (使用量は右記表の通り) を詰める。展開溶媒は上述の通りで行った。10%ジクロロメタン／ヘキサン 35mL で洗浄、25%ジクロロメタン／ヘキサン 50mL で溶出させた。底質の抽出液を使用して試験した結果、条件 1 がもっともよかった。10%ジクロロメタン／ヘキサン 35mL で洗浄、25%ジクロロメタン／ヘキサン 50mL で溶出させる。

44%硫酸シリカゲルを用いてカラムクロマトを行うことで、見た目にも、無色透明になり、測定時にも大きな影響はなく測定することが可能であった。

2.4.2.3 最終溶液の使用溶媒について

名古屋港の底質を前処理した場合、硫酸処理、フロリジルカラム処理をしても、最終的にアセトニトリルでメスアップすると、高い頻度で不溶成分が析出してきた。そのため、回収率が良好な結果が得られなかった。

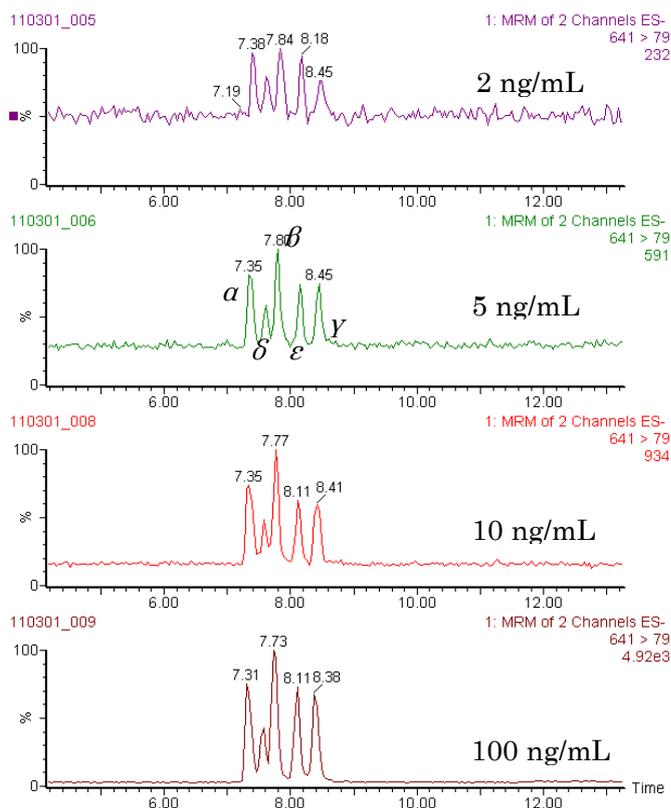
この不溶成分は、上記クリーンアップに Envicarb などの活性炭処理を行っても、なお析出してきたため、最終溶液に使用する溶媒をアセトニトリルから別の溶媒へ変更することを検討した。アセトニトリル、メタノール、アセトン、THF、イソプロパノール、ヘキサンと 6 種類を使用して見たが、不溶成分が析出してこなかったのはヘキサンを使用した場合のみであった。なお、ヘキサンとアセトン、アセトニトリルなどの混合溶媒も検討したが良好な結果は得られなかった。

HPLC にヘキサンを注入するのは一般的ではないが、試してみたところ、特に問題なく測定ができるようであった。最終溶液をヘキサン溶液にして LC/MS に注入する際の再現性等を確認した。

標準液および底質試料のヘキサン溶液を 100 回以上注入した後も、再現性よく測定出来ることが確認できた。ただし、場合によってはピーク形状が崩れることもあり、若干の注意が必要である（頻度的には数十回のうちの 1 回）。 γ のピークは崩れやすいが、 α 、 β のピークが崩れることはなかった。また、 γ のピーク形状が崩れた場合でも、ピーク面積はあまり変わらなかった。ピーク形状が崩れてきたらアセトニトリル 100% で数時間カラムを洗浄することにより改善され、再び測定を行うことが可能であった。

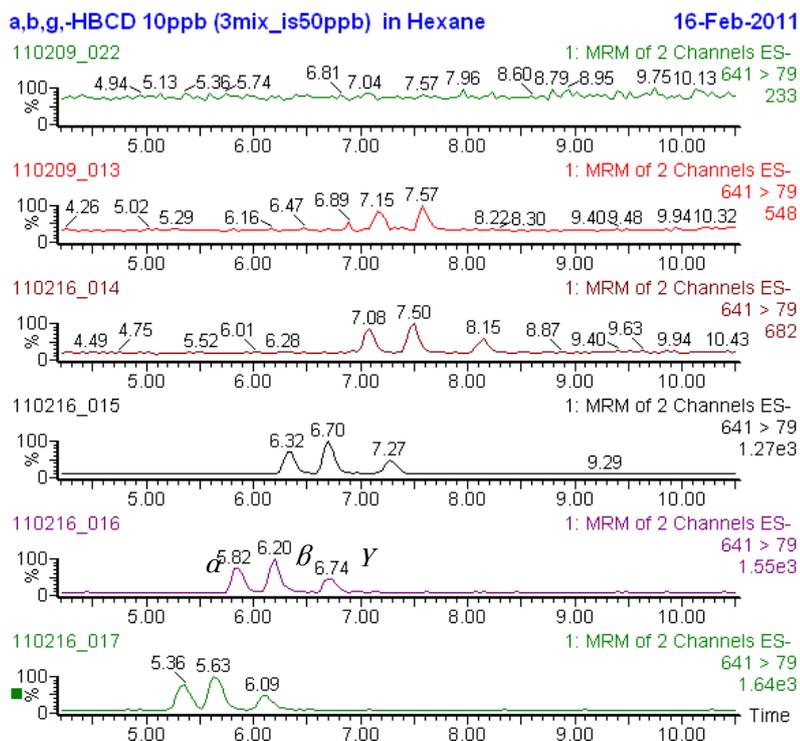
ヘキサン注入は、アセトニトリル注入よりもピークがシャープで、低濃度試料の場合においてもピーク処理がしやすい一方、ヘキサン注入にすると、5 異性体のベースライン分離は厳しく、 α 、 β 、 γ の 3 異性体のみでの分析となる（ベースライン分離はできないが存在を確認する程度であれば可能）。参考までに Fig.11 に 5 異性体を測定した際のクロマトグラムを示した。

Fig.12 はヘキサン溶液にした標準溶液を注入量を変化させて測定した結果を示す。装置への注入量は、少なすぎても多すぎても良くなく、カラムや装置への影響等も考慮して 5 μ L 注入にすることとした。



左から順に
 α , δ , β , ϵ , γ -
HBCD

Fig.8 5 異性体混合標準液 (ヘキサン溶液) 測定時のクロマトグラム



ヘキサン
100%溶媒
上から順に
1 µL
2.5 µL
5 µL
10 µL
15 µL
20 µL
注入

Fig.9 標準液 (ヘキサン溶液) 測定時のクロマトグラム

2.4.2.4 アセトニトリル／ヘキサン分配の検討

上記の通り、44%硫酸シリカゲル・フロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップでは、最終溶液中に、不溶物が析出してくる場合がある。最終溶媒にヘキサンを用いることで、この問題はほぼ解決できるが、機器への負担等も考慮して、不溶成分を除去する方法を検討した。高速溶媒抽出後、アセトニトリル・ヘキサン分配を行う方法を検討した。

高速溶媒抽出後はアセトン溶液になっているので、ヘキサンへ転溶・脱水した。ヘキサン溶液 10 mL に対してヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL で分配操作を 2 回行った。分配を行った後は、通常通り、44%硫酸シリカゲル・フロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行い、最終、ヘキサン溶液にして、LC/MS 分析を行った。

ヘキサン溶液にしたところ、最終溶液中に目視できるほどの不溶物が出てこなくなったため、回収率の向上が期待されたが、分配操作による損失もあるため、アセトニトリル・ヘキサン分配操作の有無により、回収率に大きな相違が出ることはなかった (Table 12 の結果参照)。

特に妨害物質があまり多く含まれていないようなきれいな底質を分析する場合においては、アセトニトリル・ヘキサン分配による損失の方が大きくなる可能性が高く、前処理の際には省略した方がよいと考えられる。

Table 12 アセトニトリル・ヘキサン分配操作の有無による回収率の差(%)

分配操作有り				分配操作無し			
No.	α	β	γ	No.	α	β	γ
K1	86.6	68.8	85.8	K11	79.3	67.6	87.3
K2	76.7	59.8	71.7	K12	86.0	47.4	84.1
K3	82.3	56.4	89.7	K13	86.1	80.7	92.8
K4	84.4	59.9	80.7	K14	84.7	49.1	96.0
K5	76.8	71.7	75.4				
K6	76.1	60.3	75.3				
K7	85.4	53.4	79.1				
平均	81.2	61.5	79.7	平均	84.0	61.2	90.1

2.4.2.5 底質試料の前処理方法

乾重量あたり 5 g 程度の底質試料を 100 mL ビーカーに量り取り，銅粉末 1 g とハイドロマトリックス 13 g を加えて，均一になるようによく混合した。そこへ，サロゲートとして $^{13}\text{C}_{12}$ - α , β , γ -HBCD を 50.0 ng (1.00 mg/L, 50.0 μL) 添加した後，さらによく混合し，試料が均一になったら，66 mL ASE セルへ移し入れた。セルにすき間がある場合，ガラスビーズを入れて，セル内を満たし，アセトン 100%，100°C，1500 psi で 2 回，高速溶媒抽出(ASE)を行った。ASE が終わったら，抽出液を 300 mL のナス型フラスコに移し入れ，ロータリーエバポレーターにて 5 mL 程度まで濃縮した。

300 mL 分液ロートに精製水 140 mL と飽和食塩水 20 mL を入れ，そこへ濃縮した抽出液とヘキサン 40 mL を加えた。抽出液が入っていた 300 mL のナス型フラスコは，アセトン 2～3 mL 程度と，ヘキサン 10 mL 程度で洗い込み，300 mL 分液ロートへ併せ，10 分間振とうした。十分に静置した後，水層を除き，さらに 100 mL の精製水を加えて，再び 10 分間振とうした。再度，水層を取り除き，無水硫酸ナトリウムで脱水し，100 mL ナス型フラスコへ入れて，ロータリーエバポレーターにて 5 mL 程度まで濃縮した。

濃縮液をヘキサンの 10 mL に定容したものと，ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を 100 mL 分液ロートに入れ，10 分間振とう，静置し，ヘキサン層とアセトニトリル層に分離した後，アセトニトリル層を別の 100 mL 分析ロートに移した。残ったヘキサン層に再度ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え，振とう静置した後，アセトニトリル層を先に別の 100 mL 分液ロートに分取しておいたアセトニトリル層に合わせた。合わせたアセトニトリル層に精製水 5 mL を加え，10 分間振とう，静置した。次に，1 L 分液ロートにその含水アセトニトリル層と 2%塩化ナトリウム水溶液 500 mL，ヘキサン 50 mL を入れ，10 分間振とう，静置した。水層は再度ヘキサン 50 mL で抽出した。ヘキサン層を併せ，精製水 20 mL で 2 回水洗し，無水硫酸ナトリウムで脱水後，200 mL ナス型フラスコへ入れて，ロータリーエバポレーターにて 2 mL 程度まで濃縮した。

ガラス製クロマト管 (ガラスコック付き，内径 10 mm，長さ 300 mm) に，ガラスウール，フロリジル 4 g，44%硫酸シリカゲル 4 g，フロリジル 1 g，無水硫酸ナトリウム 1 g の順に詰めて，カラムを作成した。抽出液を負荷して，10%ジクロロメタン/ヘキサンを 35 mL を流した後，25%ジクロロメタン/ヘキサン 50 mL を 100 mL ナス型フラスコへ回収し，ロータリーエバポレーターにて 2 mL 程度まで濃縮した。その後，10 mL 容目盛付き試験管に移

し入れ、窒素吹きつけにより 0.5 mL 程度まで濃縮し、ヘキサンにて 1 mL に定容して試験液とした。試験液 5 μ L を LC/MS/MS に注入し、ESI-Negative で測定した。

2.4.2.6 分析法の定量性とその評価

[測定方法の検出下限(MDL),定量下限(MQL)]

本測定方法における MDL 及び MQL を Table 13 に示す。測定時の代表的なクロマトグラムを Fig.13 に示す。

Table 13 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	α	β	γ
試料	底質	底質	底質
試料量(dry-g)	5.00	5.00	5.00
添加量(ng)	10.0	10.0	25.0
試料換算濃度(ng/g-dry)	2.00	2.00	5.00
最終液量(mL)	1.00	1.00	1.00
注入液濃度(ng/mL)	10.0	10.0	25.0
装置注入量(μ L)	5.0	5.0	5.0
操作ブランク平均(ng/g-dry) *1	0	0	0
無添加平均(ng/g-dry) *2	<2.7	<2.8	<4.8
結果 1(ng/g-dry)	2.26	2.07	4.58
結果 2(ng/g-dry)	2.32	2.19	4.88
結果 3(ng/g-dry)	2.55	2.20	5.46
結果 4(ng/g-dry)	2.69	2.77	4.76
結果 5(ng/g-dry)	2.14	2.57	5.25
結果 6(ng/g-dry)	2.72	2.77	5.67
結果 7(ng/g-dry)	2.86	2.38	4.36

平均値(ng/g-dry)	2.506	2.421	4.993
標準偏差(ng/g-dry)	0.271	0.285	0.481
MDL(ng/g-dry) *3	1.1	1.1	1.9
MQL(ng/g-dry) *4	2.7	2.8	4.8
S/N	15	11	12
CV(%)	11	12	9.6

*1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均 (n=3)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n=3)

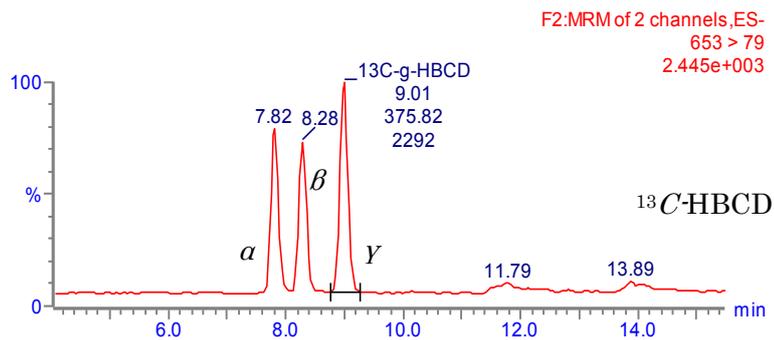
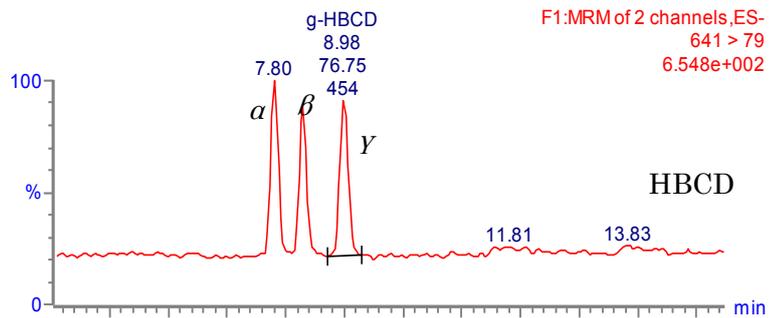
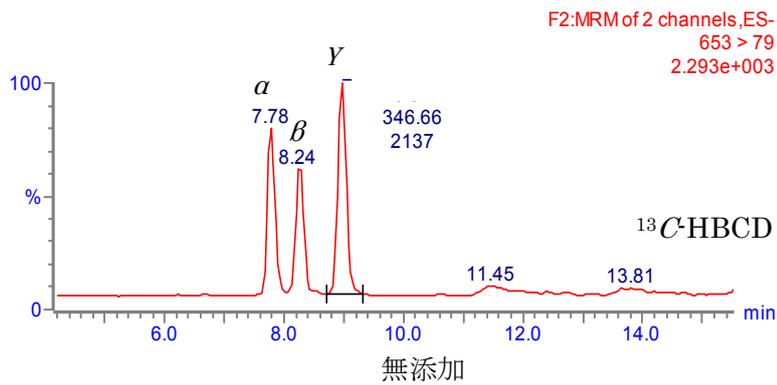
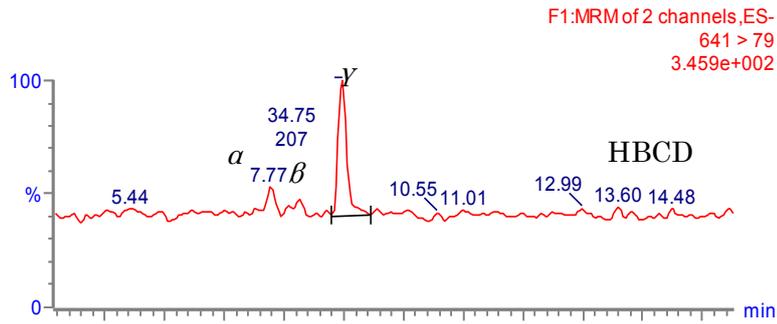
*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

*5 サロゲート回収率： α ；84.3%，CV% 7.5%

β ；66.2%，CV% 11%

γ ；81.4%，CV% 8.1%



標準液 (α, β : 10 ng, γ : 25 ng) 添加

Fig.10 MDL 算出時のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

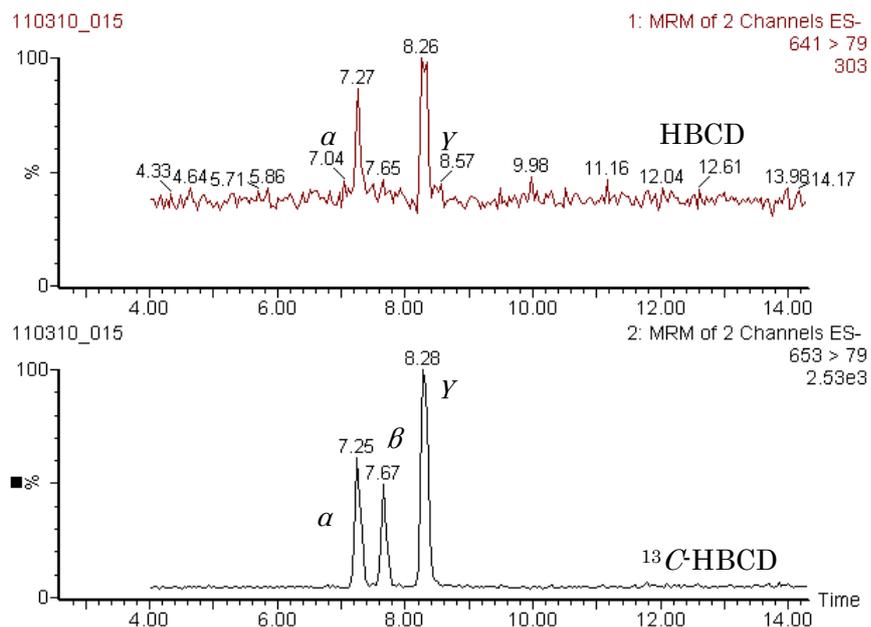
底質（名古屋港）への標準物質添加回収結果を Table 14 に示す。添加回収試験試料のクロマトグラムを Fig.14 に示す。すべての試料において、内標準物質の回収率が 75%以上あり、内標準物質による補正後の回収率が良いことから、内標準物質による補正を行うことで、このままの分析方法でも定量的評価は可能と判断した。定量結果については、すべて内標準物質による補正を行った値により評価を行った。

Table 14 底質（名古屋港）への標準物質添加回収結果

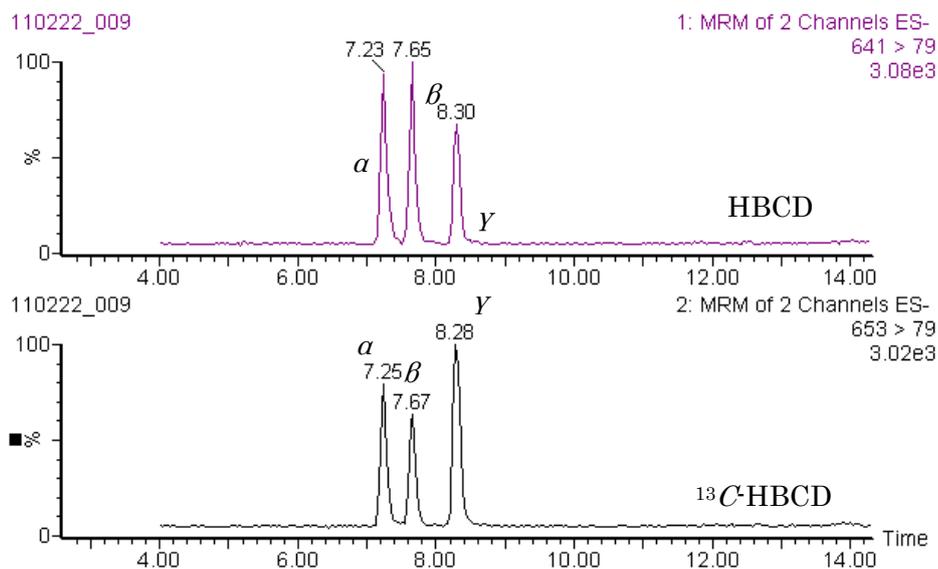
物質名	試料量 (g-dry)	標準添加量 (ng)	検体数	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	サロゲート 回収率 (%)	CV(%)
α	5	無添加	2	ND (0.77)	-	80.7	-
	5	50	5	10.61	98.4	94.7	8.3
β	5	無添加	2	ND (0.18)	-	60.3	-
	5	50	5	11.23	110.5	75.2	12.1
γ	5	無添加	2	ND (2.44)	-	77.2	-
	5	50	5	13.42	109.8	87.9	16.6

(注) ND とは MQL 以下の値であったことを示す。括弧内の数字は参考値。

MDL 測定時のサロゲート回収率： α ；84.3%， β ；66.2%， γ ；81.4%



無添加



標準液 50 ng 添加

Fig.11 添加回収試験試料測定時のクロマトグラム

2.4.3 生物試料中 HBCDs の前処理方法

2.4.3.1 分析法の定量性とその評価

〔試料の前処理及び試験液の調製〕

魚介類試料は名古屋港および名古屋市内河川で採取したボラやスズキを使用し、その可食部 10~20g 程度を秤り取った。アセトン 40 mL とヘキサン 40 mL でホモジナイズ抽出を行った (10000 rpm, 10 分間)。抽出後はブフナー漏斗でろ過し、ろ紙上をヘキサンで洗浄してろ液に合わせた。ろ液は 1 L の分液漏斗へ移し入れ、3%食塩水 500 mL で洗浄した。抽出は 2 回繰り返して行った。ろ液は、蒸留水にて水洗を 2 回行った後、硫酸ナトリウムで脱水して、200 mL のナス型フラスコへあわせ、エバポレーターにて濃縮した。

濃縮された抽出液は 100 mL の分液漏斗へ移し入れ、さらにヘキサン 5 mL とヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を入れ、10 分間振とうした (アセトニトリル/ヘキサン分配)。

ヘキサン層はヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL で 2 回振とうし、アセトニトリル層へ合わせた。アセトニトリル層に蒸留水 5 mL を加え、さらに 3%食塩水 500 mL とヘキサン 100 mL を加え、振とうした。ヘキサン層は 20 mL の蒸留水にて 2 回洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水して、200 mL のナス型フラスコへあわせ、エバポレーターにて濃縮した。

ガラスカラムにフロリジル 20 g と、その上に硫酸ナトリウム 2 g を入れ、ヘキサンにて洗浄した後、濃縮した抽出液を乗せた。F1 : ヘキサン 150 mL, F2 : 10%ジクロロメタン/ヘキサン 160 mL, F3 : 25%ジクロロメタン/ヘキサン 250 mL で分画を行い、HBCDs 分析には F2 を用いた。F2 はロータリーエバポレーターにて濃縮し、アセトニトリルへ転容した。その後、溶出液は 40 °C の水浴を備えた窒素吹き付け装置で乾固直前まで濃縮し、80%アセトニトリル水溶液で 1 mL にメスアップした後、超音波装置に 2 分間程度かけて試験液とした。試験液 5 µL を LC/MS/MS に注入し、ESI-Negative で測定した。

母乳試料は愛知県内在住の母親から提供いただき、その 50g 程度を秤り取り、300 mL 分液漏斗へ入れた。さらに、シュウ酸ナトリウム飽和水溶液 10 mL, ジエチルエーテル 50 mL, エタノール 50 mL, ヘキサン 30 mL を入れて、脂肪の抽出を行った。水層はヘキサン 30 mL にて 2 回抽出し、すべてのヘキサン層を合わせて、3%食塩水で 3 回洗浄した。その後、硫酸ナトリウムで脱水して、秤量済みの 200 mL ビーカーへ入れ、80°C でヘキサンを揮散させた。ビーカーの重量を量り、脂肪重量を求めた後、脂肪分をヘキサンに再溶解させた。以後、アセトニトリル/ヘキサン分配、フロリジルカラムによる精製は魚介類試料と同様の操作

を行った。

〔測定方法の検出下限(MDL),定量下限(MQL) 〕

本測定方法における MDL 及び MQL を Table 15 に示す。

Table 15 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	α	β	γ
試料量(dry-g)	5	5	5
添加量(ng)	100	100	100
試料換算濃度(ng/g-dry)	100	100	100
最終液量(mL)	1	1	1
注入液濃度(ng/mL)	10	10	25
装置注入量(mL)	5	5	5
操作ブランク(ng/g-dry)*1	0	0	0
無添加平均(ng/g-dry)*2	<2.7	<2.8	<4.8
結果 1(ng/g-dry)	8.82	9.04	9.13
結果 2(ng/g-dry)	7.78	9.00	8.86
結果 3(ng/g-dry)	8.02	9.04	9.72
結果 4(ng/g-dry)	9.92	7.96	10.69
平均値(ng/mL)	8.63	8.76	9.60
標準偏差(ng/mL)	0.96	0.53	0.81
MDL(ng/g-dry)*3	3.7	2.1	3.1
MQL(ng/g-dry)*4	9.6	5.3	8.1
S/N	15	11	12
CV(%)	11.2	6.1	8.4

*1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均 (n=3)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n=3)

$$*3 \quad MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

$$*4 \quad MQL = \sigma_{n-1} \times 10$$

〔添加回収試験〕

生物（名古屋港高潮防波堤・ボラ）への標準物質添加回収結果を Table 16 に示す。

すべての試料において、内標準物質の回収率が 75%以上あり、内標準物質による補正後の回収率が良いことから、内標準物質による補正を行うことで、このままの分析方法でも定量的評価は可能と判断した。定量結果については、すべて内標準物質による補正を行った値により評価を行った。

Table 16 生物（名古屋港高潮防波堤・ボラ）への標準物質添加回収結果

物質名	α	β	γ
試料量(g-dry)	10	10	10
標準添加量(ng)	100	100	100
測定回数	4	4	4
検出濃度(ng/g-dry)	65	76	85
回収率(%)	86	90	96
IS 回収率(%)	76	84	89
CV(%)	11	15	7.2

2.4.4 各媒体の分析法のまとめ

上記検討により開発された分析法を Fig. 12 にまとめた。

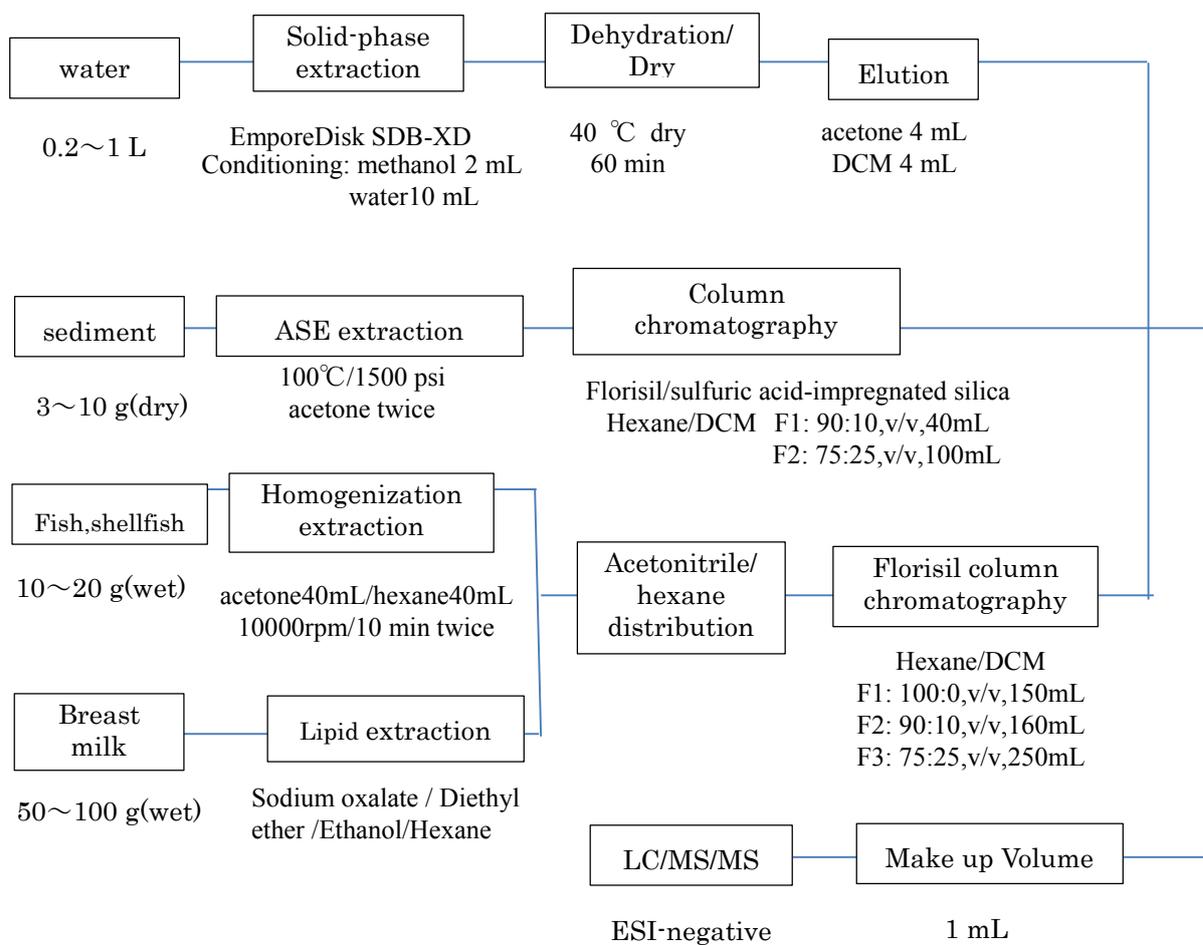


Fig. 12 HBCDs の分析フローチャート

3. 名古屋市内的における HBCDs の環境動態把握に関する研究

3.1 試料

水質試料は 2007 年～2012 年にかけて名古屋市内河川及び名古屋港 20 地点で採水した。採水はステンレス製のバケツを用いて行い、試料はガラス製の容器へ入れた。底質試料は 2009 年に名古屋市内河川および名古屋港 30 地点で採泥した。そのうち名古屋港内 1 地点でアクリル製コアを使用して、深さ 20 cm ぶんの不攪乱柱状泥試料を採取した。採取した底質は 2mm メッシュのふるいにかけた後、3000rpm で 20 分間遠心分離し、過剰な水分を除去したものを試料とした。また、底質試料における各種項目は、TOC は底質調査方法¹⁹⁾、粒径は JIS A 1204²⁰⁾ に従って分析を行った。魚介類試料は 2010、2011 年に名古屋市内河川および名古屋港内で採れたボラ、スズキ、フナ、コイ、オイカワ、ナマズ、ティラピア（ともに可食部（筋肉））、シジミ（全体）24 検体を用い、母乳試料は、2009、2010 年に出産した愛知県内在住の母親から 20 検体を採取した。

3.2 各媒体における実態調査結果および濃度分布

各媒体における調査結果の概要を Table 17 に示す。すべての試料において、 δ 体および ϵ 体が検出されることはなかった。水中では濃度範囲が <0.76～79 ng/L（中央値 2.3 ng/L）、底質では濃度範囲が <1.9～58 ng/g-dry（中央値 5.2 ng/g-dry）、魚介類では濃度範囲が 25～6300 ng/g-lipid（中央値 320 ng/g-lipid）、母乳では濃度範囲が <3.7～13 ng/g-lipid（中央値 4.6 ng/g-lipid）であった。平均値や中央値を算出の際は、MDL 未満の結果に関しては、MDL の 1/2 の値を計算に用いた。また、水質試料で濃縮倍率が異なる試料に関しては（試料量 500 mL を用いて 1000 倍濃縮した）、濃縮倍率を考慮して MDL を求めた。魚介類、母乳試料については、脂肪重量当たりの濃度として計算を行った。

Table 17 各媒体の調査結果

	water			
	α (ng/L)	β (ng/L)	γ (ng/L)	total(ng/L)
average	1.1	0.33	9.4	11
median	0.40	0.15	1.6	2.3
s.d.	1.4	0.54	20	22
max	4.9	2.5	71	79
min	<0.76	<0.34	<0.60	<0.76
detection	7/20	3/20	18/20	18/20

	sediment			
	α (ng/g-dry)	β (ng/g-dry)	γ (ng/g-dry)	total(ng/g-dry)
average	3.1	0.88	6.8	10
median	0.55	0.55	3.2	5.2
s.d.	3.9	0.66	9.7	14
max	14	2.6	47	58
min	<1.1	<1.1	<1.9	<1.9
detection	13/30	7/30	19/30	19/30

	fish and shellfish			
	α (ng/g-lipid)	β (ng/g-lipid)	γ (ng/g-lipid)	total(ng/g-lipid)
average	350	42	660	1100
median	120	1.1	200	320
s.d.	490	130	1200	1700
max	1800	620	4900	6300
min	9.4	3.5	12	25
detection	24/24	9/24	24/24	24/24

	breast milk			
	β (ng/g-			
	α (ng/g-lipid)	lipid)	γ (ng/g-lipid)	total(ng/g-lipid)
average	5.2	1.1	1.6	5.6
median	4.0	1.1	1.6	4.6
s.d.	3.3	0.0	0.0	3.2
max	13	<2.1	<3.1	13
min	<3.7	<2.1	<3.1	<3.7
detection	10/20	0/20	0/20	10/20

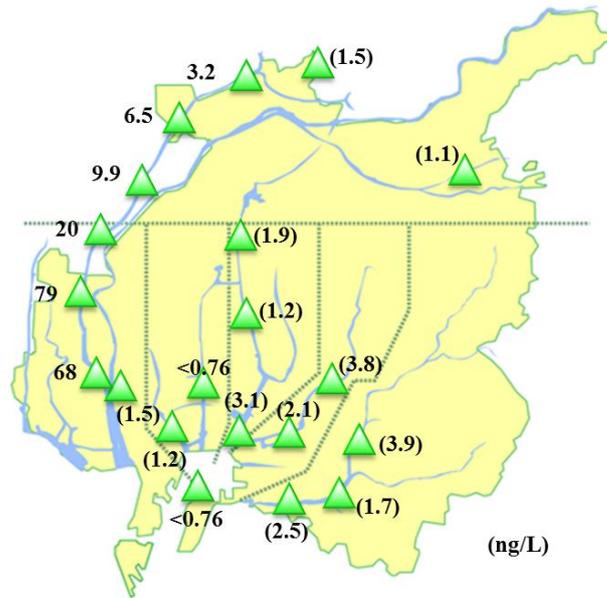


Fig. 13 Map depicting the concentrations of total HBCDs in river water of Nagoya City .

The value in the map represents concentration in ng/L of total HBCDs.

The value in parenthese is the value under the method quantitation limit.

水質試料は、名古屋市の西部地域を流れる新川において高濃度の地点が複数箇所見られたが、その他は市内全域において1~4 ng/L程度の検出レベルであった (Fig.13)。同様に、底質試料においても、一部の高濃度地点を除くと、数~十数 ng/g-dry程度の検出レベルであった。魚介類試料に関しては、食物連鎖の上位種ほど濃度が高い傾向がみられ、生物濃縮を示唆する結果が得られた (後述)。母乳試料は他の環境試料とは異なり、すべての検体において濃度の範囲は比較的狭かった。

異性体別に濃度を見ると、水質および底質試料では、異性体のうち、 γ 体が最も高濃度で検出される場合が多く、 α 体、 β 体は、 γ 体に比べ低濃度であった (Table 17)。水質試料における異性体比は、 α 体: β 体: γ 体=2:1:7程度で、工業製品 (一例として α -HBCD:5~15%、 β -HBCD:<20%、 γ -HBCD:70~90%の組成比の製品がある²²⁾)として使用されているHBCDsの異性体比と非常によく一致した。底質試料においては、水質試料と同様に、 γ 体の割合が高い試料が多かったが、名古屋港東部の底質試料においては、一部、 α 体の割合が γ 体より高く、異性体比が工業製品と異なるものが存在した (Fig. 14 および Fig. 15)。これらの地点は、発生源から離れているため、HBCDsの供給が少なく、 γ 体が底質中で徐々に分解され、異性体比が変化している可能性が考えられた。

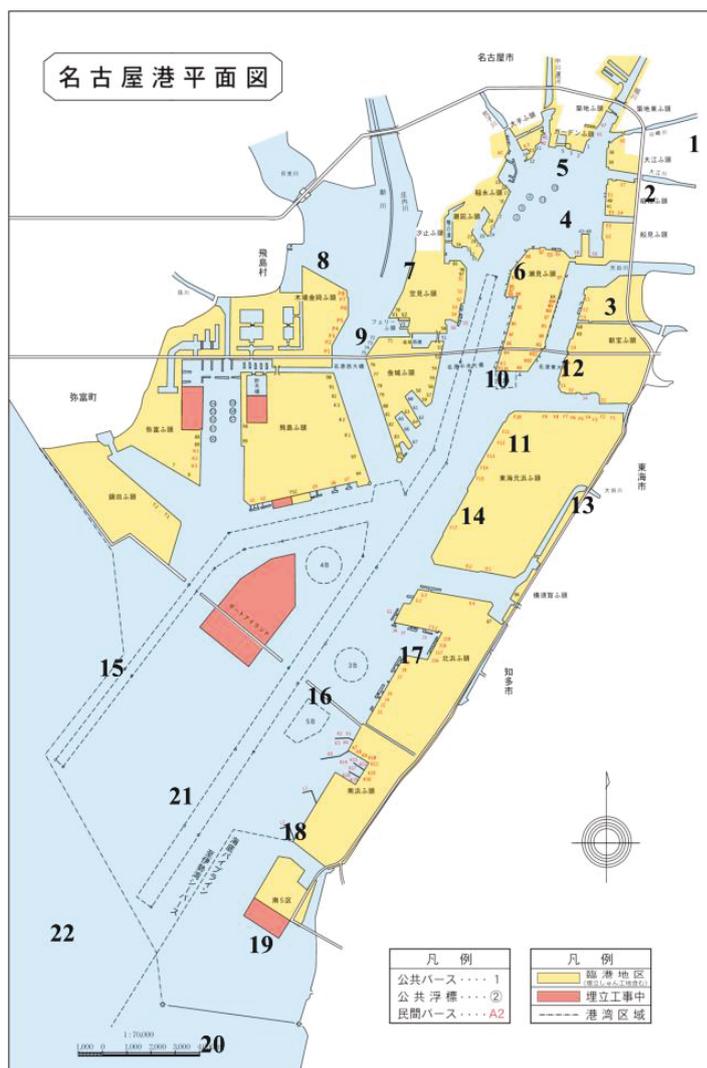


Fig. 14 Map of the sampling points of the Port of Nagoya

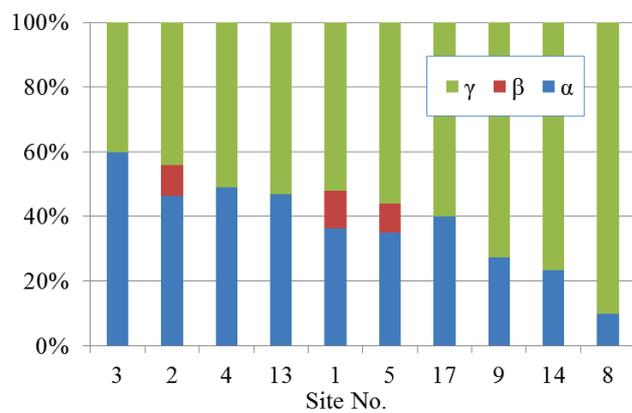


Fig. 15 Comparison of HBCD isomers ratio in sediment of the Port of Nagoya

魚介類試料では、 β 体が検出されることは少なく、 α 体、 γ 体の濃度順で検出された (Table 17)。魚介類試料の各異性体の中央値は α 体 120 ng/g-lipid、 β 体 1.1 ng/g-lipid、 γ 体 200 ng/g-lipid であった。また、 α 体と γ 体の濃度の関係を考察するために散布図を作成したところ、相関係数は 0.87、近似式は $y=0.8148x+94.864$ となり、 α 体と γ 体が 4 : 5 程度の割合で検出されるパターンが多かった (Fig. 19)。ただし、Fig. 16 中で相関係数を算出する際に 2 検体を除外した。これらは、名古屋市西部を流れる河川の同一地点で採取されたフナ試料である。この 2 検体は、HBCDs 濃度が非常に高く、 γ 体が高割合で検出された。異性体比が他の試料とは異なり、工業製品と近かったことから、調査地点付近に発生源が存在する可能性が示唆された。

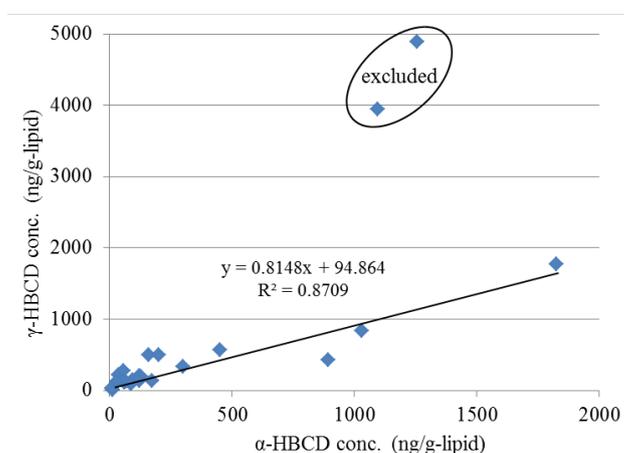


Fig. 16 Scatter diagrams between α -HBCD and γ -HBCD in fish and shellfish samples. The data marked as excluded were for the samples heavily polluted with HBCDs.

母乳試料は、すべての試料において α 体が検出されたのみであった。魚介類試料からは α 体と γ 体がともに検出された一方で、母乳試料では、 α 体しか検出されなかったことから、ヒトと魚介類では、HBCDs 異性体の吸収および代謝メカニズムが異なる可能性があると考えられる。

以上、まとめると、HBCDs は、工業製品として使用后、河川・海域へ排出され、概ねそのままの異性体組成比で水域中に存在し、底質に移行し、一部は異性体組成比が変化して存在している。そこに生息している魚介類は、底生生物やプランクトンなどを摂取し、それらを経由して HBCDs が体内へ取り込まれ、体内の異性体組成比が変化する。なお、ヒト体内へ取り込まれると、そのほとんどが α 体として存在している。

3.3 各媒体中での動態について

3.3.1 底質中での粒径, TOC との相関

名古屋港底質に関して、調査地点および各地点における堆積物特性と HBCDs 濃度の調査結果を Table 18 に示す。TOC や粒度は地点ごとに大きく異なり、TOC は、名古屋市内の河川水・下水・工場排水などの都市域からの面源負荷の影響を受ける沿岸部ほど高濃度で、沿岸部から離れるにつれて徐々に濃度は低くなる傾向が見られた。粒径 (clay+silt (%)) と HBCDs の関係を Fig.17, TOC と HBCDs の関係を Fig.18 に示す。(ただし、Fig. 16 と同様に、発生源が付近に存在する可能性がある地点番号 8,9 (Fig. 14) に関しては相関関係の計算から除外してある。) 粒径と total HBCDs 濃度は、相関は見られなかったが、TOC と total HBCDs 濃度は、相関係数 0.68 で、正の相関が認められ、TOC が高い地点ほど、HBCDs も高濃度となる傾向があった。異性体別に見ても、同様の傾向があり、TOC との正の相関を示した。このことから、HBCDs は底質中の有機物中に存在すると考えられる。実際、有機物をあまり含まない砂状の底質より、有機物を多く含むヘドロ質な底質中で HBCDs は高濃度であった。

Table.18 Sediment character and concentration of HBCDs in the Port of Nagoya

	TOC mg/g	Silt %	Clay %	Silt+Clay %	50% D mm	total HBCDs ng/g-dry
1	32	59	29	88	0.013	22
2	80	56	28	85	0.015	27
3	16	39	20	58	0.039	7.0
4	40	60	30	90	0.012	11
5	42	65	33	98	0.011	18
6	29	66	33	98	0.011	3.1
7	0.89	3.9	2.0	5.9	0.34	2.2
8	3.1	18	8.8	27	0.16	11
9	6.4	34	17	51	0.068	19
10	23	63	31	94	0.011	2.5
11	14	60	31	91	0.012	<1.9
12	12	53	27	80	0.015	<1.9
13	32	55	28	82	0.014	13
14	34	66	33	98	0.011	5.1
15	14	66	32	98	0.011	<1.9
16	11	60	30	90	0.013	2.0
17	17	54	26	80	0.017	5.3
18	4.6	43	22	65	0.038	<1.9
19	6.4	36	17	53	0.056	<1.9
20	2.3	14	7.2	22	0.24	<1.9
21	12	65	32	97	0.011	2.5
22	16	66	33	99	0.010	5.4

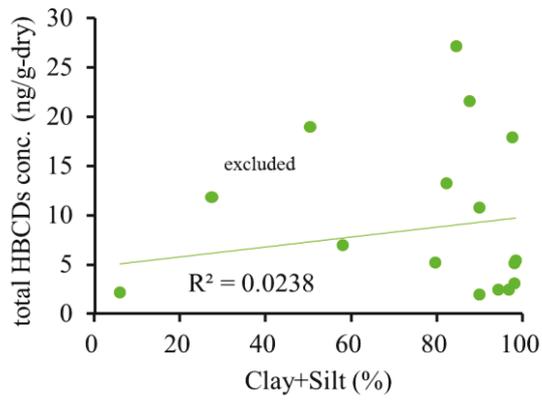


Fig. 17 Scatter diagram between particle size of sediment and HBCDs concentration

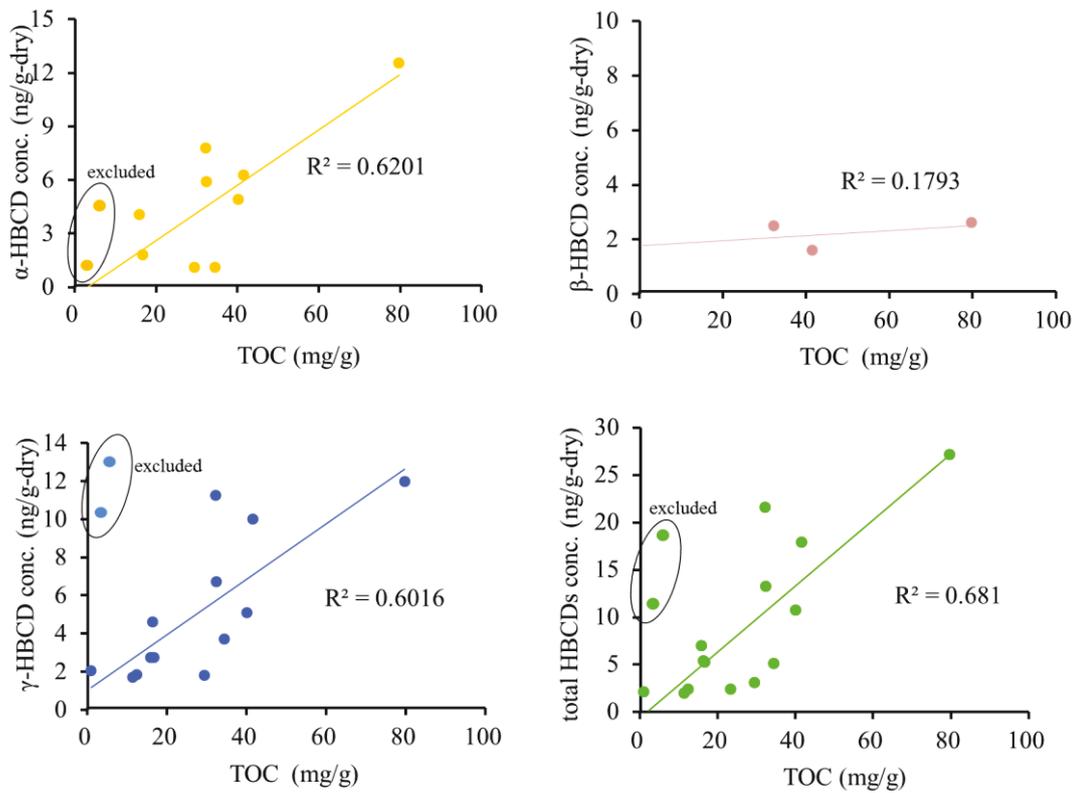


Fig. 18 Scatter diagram between TOC value and HBCDs concentration in sediment

3.3.2 生物濃縮の可能性

Fig.19 には、名古屋港高潮防波堤で採取された試料中の HBCDs 異性体の濃度を魚種別に示した。デトリタスや付着藻類を餌とするボラよりも、小魚や甲殻類などを餌とする肉食性のスズキの方が高濃度であり、食物連鎖の上位に位置するものほど高濃度な結果となった。Fig.20 には、市内河川で採取された魚と、その河口部で採取されたシジミの結果を示した。河川水中の HBCDs が非常に高濃度であった新川では (Fig.13)、そこに生息するシジミ (Fig.20, shellfish 2) 中の HBCDs 濃度も非常に高く、また異性体比も工業製品として使用される HBCDs に近い比率で検出され、発生源の影響が示唆された。

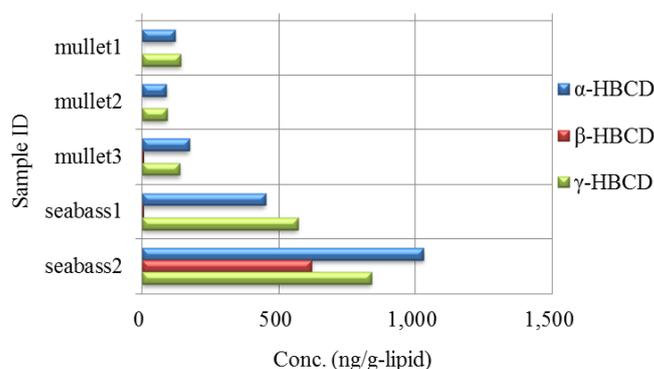


Fig. 19 Concentration of HBCDs in mullet and sea bass collected in Nagoya Port

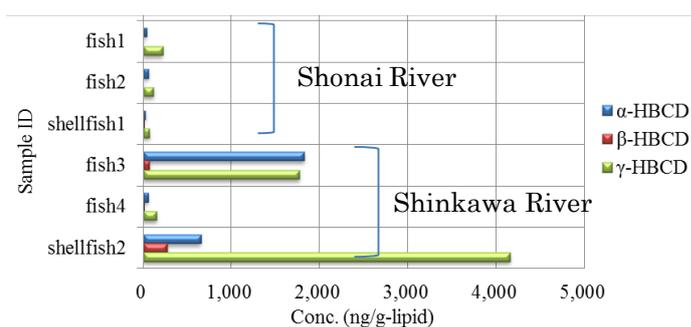


Fig. 20 Comparison of concentration of HBCDs in Shonai River and Shinkawa River
fish 1: crucian carp, fish 2,3: carp, fish 4: pale chub, shellfish 1,2: corbicula

3.3.3 コアサンプル調査による鉛直濃度分布

3.2.1 に示した結果のうち、名古屋港の堆積物試料は、2009年11月に港内22地点で採泥した。そのうち1地点 (Fig. 14, 地点番号14) でアクリル製コアサンプラーを使用して、20cmの不攪乱柱状泥試料を採取し、堆積物表層から2cmごとに層切りを行った。

名古屋港鉛直濃度分布の結果を Fig.21 に示した。港内の堆積速度は、0.7 g/cm²/year と報告されており、約30年分の経年変化を測定したことになる。HBCDsの鉛直濃度は約15年前から増加しており、Fig.22 に示した HBCDs 需要量の推移²⁾ のグラフと比較すると5年程度のズレが生じているが、これは、使用された HBCDs が環境中へ放出され、蓄積されていくことによる時間差と考えられる。この差が生じた要因の一つとして、底質中における HBCDs 分解の可能性が考えられる。

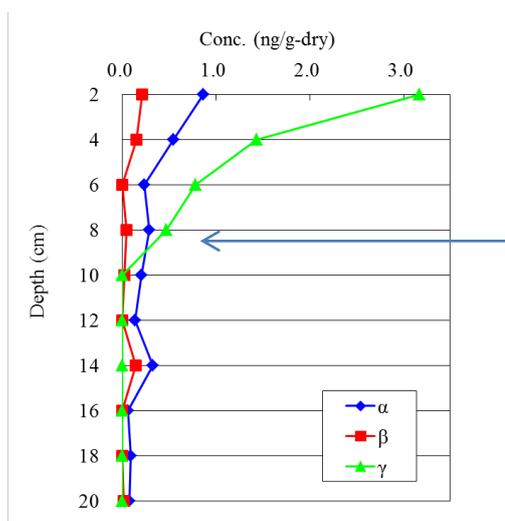


Fig. 21 Vertical concentration profile of HBCD diastereomers in sediment of the Port of Nagoya

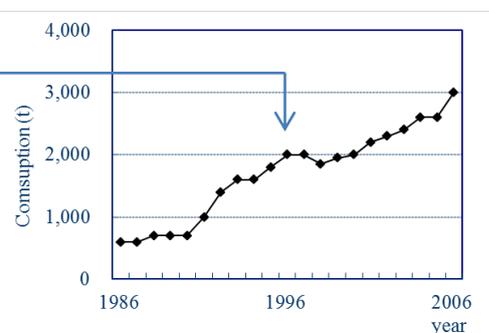


Fig. 22 Consumption of the HBCD diastereomers in recent period in Japan

3.3.4 底質中における HBCDs 分解の可能性

HBCDs は底質中で分解する可能性が報告されているため、名古屋市内河川の底質においても、同様の傾向があるか、市内を流れる山崎川および大江川の底質を用いて試験を行った。

それぞれの試料を河川水部分と底質部分にわけ、別々に前処理した結果、HBCDs が検出されたのは底質部分のみで、河川水部分からは検出されなかった。この結果より、添加した標準溶液はその大部分が底質に吸着したと考えられる。

12 週間（84 日）にわたって分解性試験を行った結果を Fig.23 に示した。試験開始直後の濃度は、添加した HBCDs がすべて底質部分に移行したと考えて、計算で求めたところ、嫌気性条件下で最も顕著に HBCDs の減少傾向が見られた。異性体別にみると（Fig.24）、嫌気性条件下では、 β 体および γ 体の濃度減少は迅速で、試験開始後 1 週間以内（開始から 1 週間までの結果はない）に、初期濃度の 30%程度にまで濃度が減少し、その後は停滞した。 α 体については、 β 体、 γ 体ほどの急速な濃度減少はなかったものの、徐々に濃度が低下し 4 週間後には停滞状態となった。一方で、好気性条件下では、滅菌操作の有無に関わらず、嫌気性条件下と比較して、濃度減少は穏やかであった。

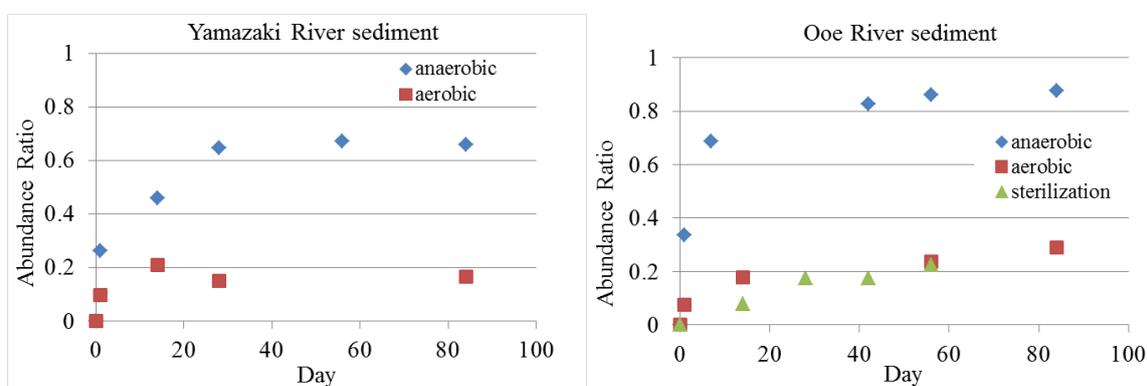


Fig. 23 Degradation rate of total HBCDs in sediments in different conditions of storage.

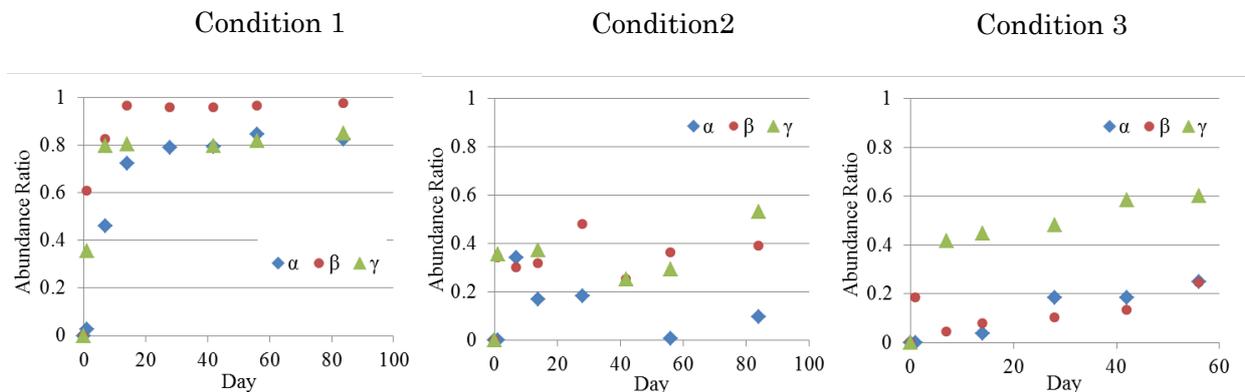


Fig. 24 Degradation patterns of HBCD diastereomers in Ooe River sediment under the different condition

Condition 1: Sediment kept under anaerobic by scavenging air with nitrogen gas

Condition 2: Sediment kept under aerobic.

Condition 3: Sediment sterilized with autoclave at 121°C under pressure of 15 psi for 20 minutes

HBCDs はオクタノール・水分配係数 (log Pow) が非常に高いため、状態の異なる底質への吸着の違い、実験室内の蛍光灯からの紫外線による分解の違いなども考えられるが、嫌気性条件では好気性条件と比較して HBCDs 濃度の減少速度は速かった。好気性条件の底質と滅菌処理を行った底質を比較すると、HBCDs 濃度の減少について両者に大きな差はなかった。

HBCDs 汚染土壌から *Pseudomonas* 属 HB01 という γ -HBCD 分解菌が単離されたとの報告もあり²⁶⁾、不確実な要素も残されているが、嫌気性条件において、大江川および山崎川の底質中には HBCDs の分解菌が存在している可能性が考えられる。しかし、この実験で臭素イオン等、分解生成物の確認には至らなかった。

4. まとめ

環境試料中の HBCDs の分析法の開発を行い、媒体間で整合する系統的な分析法を開発した。その結果、海水試料以外は、 $^{13}\text{C}_{12}$ -HBCDs の回収率が 83~97%で、十分に定量的評価ができると判断された。また、海水試料に関しては、 $^{13}\text{C}_{12}$ -HBCDs の回収率が 65~67%と若干低めであった。これは濃縮試料を MS 測定する際のイオン化抑制の可能性が考えられ、今後原因の解明と分析方法の改良が必要である。ただし、相対標準偏差が小さく、かつ内標準物質による補正後の回収率が良いことから、内標準物質による補正を行うことで、このままの分析方法でも定量的評価は可能と判断した。

名古屋市内で採取された環境試料の調査結果については、水質、底質、生物、母乳、すべての媒体から高頻度で HBCDs が検出され、市内の広域にわたって HBCDs が存在していることが明らかになった。異性体別には、河川水・海水・底質試料では、多くの試料において γ 体が卓越して検出され、魚介類・母乳試料では、 α 体の割合が高かった。工業製品として使用されている HBCDs の異性体組成は γ -HBCD \gg α -HBCD \geq β -HBCD の順で、環境中へ排出された HBCDs は、河川及び海域においては、概ね、そのままの異性体組成比で存在するが、底質に移行すると、一部は異性体組成比が変化して存在している。さらに、そこに生息している魚介類は、底生生物やプランクトンなどを摂取し、HBCDs が体内へ取り込まれ、体内の異性体組成比が変化していると考えられる。

また、底質中における異性体組成比の変化を見るために、生分解試験を行った結果、嫌気性条件において、HBCDs の分解の可能性が見られた。しかし、実験底質の同一性や分解生成物が未確認であることなど、不確実な要素も残されており、分解を確認するには至らなかった。今後、HBCDs の底質中における生分解性の有無を評価できる方法を研究することで、底質中での HBCDs の動態をより正確に把握することができると考えられる。

以上の研究結果から、大気を除くすべての環境媒体の汚染状況および挙動を、同一地域において包括的に把握することができた。また、これらの知見を得るために、全環境媒体を一貫する分析法開発は重要であったと考えられる。

5. 参考文献

- 1) 難燃剤協会 HP <http://www.frcj.jp/index.html>
- 2) 環境省資料 : http://www.env.go.jp/air/report/h19-05/15_ref4.pdf
- 3) FERNIE Kim J., LETCHER Robert J.:REPRODUCTIVE CHANGES IN AMERICAN KESTRELS (FALCO SPARVERIUS) IN RELATION TO EXPOSURE TO TECHNICAL HEXABROMOCYCLODODECANE FLAME RETARDANT, *Environ Toxicol Chem.*, 30, 2570-2575, 2011.
- 4) 蜂須賀暁子, 中村亮介, 佐藤雄嗣, 中村里香, 渋谷淳, 手島玲子,: 臭素化難燃剤 hexabromocyclododecane(HBCD)のラット周産期暴露における発達期免疫機能影響について, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 128, 58-64, 2010.
- 5) AN Jing, ZOU Wen, CHEN Cen, ZHONG Fang Y.: The cytological effects of HBCDs on human hepatocyte L02 and the potential molecular mechanism., *J Environ Sci Health Part A*, 48, 1333-1342, 2013.
- 6) 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法） <http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/>
- 7) ストックホルム条約
<http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/mctl/ViewDetails/EventModID/7595/EventID/424/xmid/7598/Default.aspx>
- 8) Adrian, C., Andreas, C. G., Robin, J. L., Stefan, V., Martin, K., Norbert, V. H., Heather, L., Collin, R. A., and Jacob, D. B.: Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 3679-3688, 2006.
- 9) Kohler, M., Zennegg, M., Bogdal, C., Gerecke, A. C., Schmid, P. P., Heeb, N. V., Sturm, M., Vonmont, H., Kohler, H-P. E., and Giger, W.: Temporal trends congener patterns, and sources of octa-, nona-, and decabromodiphenyl ethers (PBDE) and hexabromocyclododecanes (HBCD) in Swiss lake sediments., *Environ. Sci. Technol.*, 42, 6378-6384, 2008
- 10) Morris, S., Allchin, C. R., Zegers, B. N., Haftka, J. J. H., Boon, J. P., Belpaire, C., Leonards, P. E. G., Van Leeuwen, S. P. J., and Boer, J.: Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in north sea estuaries and aquatic food webs., *Environ. Sci. Technol.*, 38, 5497-5504, 2004.

- 11) Marvin, C. H., Tomy, G. T., Alae, M., and MacInnis, G.: Distribution of hexabromocyclododecane in Detroit river suspended sediments., *Chemosphere*, 64, 268-275, 2006.
- 12) Law, R. J., Bersuder, P., Allchin, C. R., and Barry, J.: Levels of the flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A in the blubber of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded or bycaught in the U.K., with evidence for an increase in HBCD concentrations in recent years., *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2177-2183, 2006.
- 13) Ueno, D., Alae, M., Marvin, C., Muir, D. C. G., and Machinnis, G.: Distribution and transportability of hexabromocyclododecanes (HBCD) in the Asia-Pacific region using skipjack tuna as a bioindicator., *Environ. Pollut.*, 144, 238-247, 2006.
- 14) 岩村幸美, 陣矢大助, 門上希和夫, 梶原葉子, 楠田哲也, 日本全国の淡水域に生息するギンブナ (*Carassius auratus (gibelio) langsdorfii*) 中のヘキサブロモシクロドデカン蓄積量調査—濃度レベル, 地域分布及び産卵期の卵への移行—, *環境化学*, 22, 25-32, 2012.
- 15) KLOSTERHAUS Susan L., STAPLETON Heather M., LA GUARDIA Mark J., GREIG Denise J.: Brominated and chlorinated flame retardants in San Francisco Bay sediments and wildlife, *Environ Int.*, 47, 56-65, 2012.
- 16) MENG Xiang-zhou, DUAN Yan-ping, YANG Chao, PAN Zhao-yu, WEN Zhi-hao, CHEN Ling.: Occurrence, sources, and inventory of hexabromocyclododecanes (HBCDs) in soils from Chongming Island, the Yangtze River Delta (YRD), *Chemosphere*, 82, 725-731, 2011.
- 17) CHEAIB Zeinab, GRANDJEAN Dominique, DE ALENCASTRO Luiz F., KUPPER Thomas.: Brominated Flame Retardants in Fish of Lake Geneva (Switzerland), *Bull Environ Contam Toxicol*, 82, 522-527, 2009.
- 18) CARIGNAN Courtney C., HEIGER - BERNAYS Wendy, MCCLEAN Michael D., WEBSTER Thomas F.: Predictors of Tetrabromobisphenol-A (TBBP-A) and Hexabromocyclododecanes (HBCD) in Milk from Boston Mothers, *Environ Sci Technol.*, 46, 12146-12153, 2012.
- 19) Minh, N. H., Isobe, T., Ueno, D., Matsumoto, M., Mine, M., Kajiwara, N., Takahashi, S., and Tanabe, S.: Spatial distribution and vertical profile of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecanes in sediment core from Tokyo Bay Japan. *Environmental Pollution*, 29, 665-682, 2007.

- 20) Managaki, S., Enomoto, I., and Masunaga, S.: Spatial distribution of HBCD in Japanese river sediment and its source., *Organohalogen Compound*, 71, 2517-2520, 2009.
- 21) MANAGAKI Satoshi, ENOMOTO Iku, MASUNAGA Shigeki.: Sources and distribution of hexabromocyclododecanes (HBCDs) in Japanese river sediment, *J Environ Monit.*, 14, 901-907, 2012.
- 22) Suzuki, S., and Hasegawa, A.: Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers and tetrabromobisphenol A in water and sediment by liquid chromatography/ mass spectrometry., *Anal. Sci.*, 22, 469-474, 2006.
- 23) Dodder, N. G., Sander, L. C., Peck, A. M., and Kucklick, J. R.: Analysis of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry: Chromatographic selectivity and ionization matrix effects., *J. Chromatogr. A.*, 1135, 36-42, 2006.
- 24) 揚妻友彦, 環境試料中の臭素系難燃剤の測定方法-LC/MS/MS 法による HBCD 異性体の測定-, *環境と測定技術*, 34, 11-13, 2007.
- 25) Davis, J. W., Gonsior, S., Marty, G., and Arino, J.: The transformation of hexabromocyclododecane in aerobic and anaerobic soils and aquatic sediments., *Water Res.*, 39, 1075-1084, 2005.
- 26) Yamada, T., Takahama, Y., and Yamada, Y.: Isolation of *Pseudomonas* sp. strain HB01 which degrades the persistent brominated flame retardant γ -hexabromocyclododecane., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1674-1678, 2009.
- 27) 底質調査方法, 4.10 全有機炭素 (TOC), 78-80.
- 28) 日本工業規格 JIS A 1204, 土の粒度試験方法
- 29) 環境省環境保健部環境安全課, 平成 23 年度化学物質分析法開発調査報告書
- 30) 環境省資料 : http://www.meti.go.jp/committee/summary/0004475/pdf/118_s08_00.pdf
- 31) Lu, X., Matsumoto E.: Recent sedimentation rates derived from ^{210}Pb and ^{137}Cs methods in Ise Bay, Japan., *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, 83-93, 2005.

III *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発および環境調査

1. はじめに

ビスフェノール A (BPA) は、ポリカーボネート製のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料として幅広く利用されており、年間 40 万トン以上、生産されている。一方で、1996 年『奪われし未来 (Our Stolen Future)』の出版を契機に、内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) として、BPA は日本国内でも大きく取り上げられ、環境省、厚労省等が調査研究を開始した。さらに近年では、BPA は、きわめて微量でも動物の胎児等に影響が生じることがあるとの報告もあり²⁾、より高感度での分析法が求められている。

p-クミルフェノール (*p*-CP) は、BPA から一つ水酸基の取れた物質で、主に、界面活性剤の原料として使用されている。また、ポリカーボネート樹脂合成の際には BPA とともに原料として使用されることもある。法的には規制対象物質として登録されていないが、これまでの毒性試験から、腎毒性などが報告されている³⁾。

BPA に関してはこれまでに多くの研究がされており、実態調査結果や分析法に関する報告例も多い。海外においては、アメリカ・ニューオーリンズ湖の表面水やミシシッピ川の堆積物⁴⁾、台湾の主要河川の水や底質⁵⁾、地中海北西部の沿岸水⁶⁾、オランダ Selangor 川流域の水処理場⁷⁾などで、実態調査結果に関する報告例がある。日本国内でも、多くの自治体において、BPA およびアルキルフェノール類の実態調査を行っている⁸⁾⁻¹¹⁾。また、分析法に関しては、水、底質、生物など各媒体について、GC/MS もしくは LC/MS を使用した報告が多数されており¹²⁾⁻¹⁶⁾、分析マニュアル^{17), 18)}等も多く存在する。

一方で、*p*-CP は、BPA と構造的に非常に類似しており、毒性が認められているにも関わらず、実態調査や分析法についての報告は少ない。実態調査に関しては、中国、Dianchi 湖での調査結果が報告されているのみである¹⁹⁾⁻²¹⁾。分析法に関しては、GC/MS を用いる方法²²⁾、および UV-HPLC を用いる方法²³⁾が報告されているが、LC/MS による分析法を開発した例はない。GC/MS により測定を行う際には、前処理として、誘導体化反応を行う必要があるが、操作が煩雑になり、前処理に長時間を要する。また、UV-HPLC による測定では十分な感度を得られない。これらの点を改善するために、誘導体化反応なしで高感度分析を行うことができる LC/MS による分析法開発を行った。さらに、*p*-CP と BPA を同時に高感度で分析することで、環境中での両者の関係も明らかになることが期待される。

また、BPA は非常に幅広く使用されていることから、実験室内の環境中にも存在してい

ることが考えられる。そのため、高感度分析を行う際には、ブランク対策を行うことが必須になる。

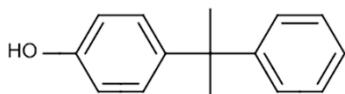
そこで、本研究では、BPA と、その関連物質である *p*-CP について、LC/MS を用いて、水環境中の存在量を高感度で同時に分析する方法を開発し、その方法を用いて両物質の実態調査を行うことを目的とした。

2. *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発

2.1 *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の構造および物性

p-クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発をする際に必要な物質の情報（構造、分子式や物性など）を以下に示す。

p-クミルフェノール，略称：*p*-CP

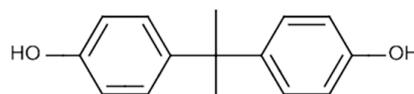


4-(2-フェニルプロパン-2-イル)フェノール

CAS 番号：599-64-4

[分子量]	212.28 ²⁴⁾
[融点]	74.5 °C ²⁵⁾
[沸点]	335 °C ²⁵⁾
[比重]	1.0163 (20 °C/4 °C) ²⁶⁾

ビスフェノール A，略称：BPA



4,4'-(プロパン-2,2-ジイル)ジフェノール

CAS 番号：80-05-7

[分子量]	228.28 ²⁴⁾
[融点]	150-155 °C ²⁷⁾
[沸点]	220 °C ²⁷⁾
[比重]	1.195 (25 °C/25 °C) ²⁸⁾
[蒸気圧]	0.00000004 mmHg (25 °C) ²⁹⁾
[溶解性]	水：120-300 mg/L ²⁴⁾
[log P _{ow}]	3.4 ²⁴⁾

【毒性，用途】

4-(2-フェニルプロパン-2-イル)フェノール

[実験動物に対する急性毒性情報]

毒性情報なし

[用途] 界面活性剤原料，樹脂改質剤・ゴム・潤滑油等の安定剤，防腐・防カビ剤

4,4'-(プロパン-2,2-ジイル)ジフェノール

[実験動物に対する急性毒性情報]

マウス（経口） LC_{50} : 2500 mg/kg^{30),31)}

マウス（腹腔内注射） LC_{50} : 150 mg/kg^{30),31)}

[用途] ポリカーボネート樹脂・エポキシ樹脂合成原料，塩化ビニル樹脂添加剤，ポリエステル樹脂中間体，難燃剤・熱硬化剤添加剤，インキ樹脂用・塗料・接着剤用・窯業鋳型用バインダー添加剤

2.2 試薬・器具

分析法開発をする際に使用した試薬および実験器具を以下に示す。

【試薬】

ビスフェノール A (BPA) 標準品：和光純薬

p-クミルフェノール(*p*-CP)：和光純薬，特級 (min.98.0%)

ビスフェノール A-*d*₁₄ (BPA-*d*₁₄) 標準品：和光純薬

ビスフェノール A-¹³C₁₂ (BPA-¹³C₁₂) 100 μg/mL アセトニトリル溶液

：Cambridge Isotope Laboratories, Inc (輸入先：和光純薬)

ジクロロメタン：和光純薬，残留農薬・PCB 分析用

アセトン：和光純薬，残留農薬・PCB 分析用

メタノール：関東化学，LC/MS 用

アセトニトリル：関東化学，LC/MS 用

超純水：関東化学，LC/MS 用

Inertsep CH (500mg/ 6mL)：GL science 社製

Sep-Pak Carbon/NH₂ (500mg/ 6mL)：waters 社製

【標準液の調製】

【標準液】 BPA 標準品および *p*-CP を正確に 10 mg 量り取り，アセトニトリル 100 mL で希釈して 100 mg/L の標準原液を作製した。この標準原液をマイクロシリンジにより 20 μL 分取しアセトニトリルで 2 mL に定容した (1 mg/L = 1000 μg/L)。さらに，1000 μg/L 標準液を 100 μL 採りメタノール：精製水 = 1 : 3 の溶液で 10 mL に希釈した (10 μg/L)。

【サロゲート内標準液】 市販の BPA-¹³C₁₂ 100 mg/L を 0.5 mL 分取しアセトニトリルで 50

mL に定容したものをサロゲート内標準液とした (1 mg/L = 1000 µg/L)。

〔シリンジスパイク内標準液〕 BPA-*d*₁₄ 10 mg をアセトニトリルに溶解し 100 mL に定容したものを 100 mg/L のシリンジスパイク内標準原液とした。この標準原液をマイクロシリンジにより 20 µL 分取しアセトニトリルで 2 mL に定容したものを標準液とした (1 mg/L = 1000 µg/L)。

〔検量線作成用標準液〕 1000 µg/L 標準液を、マイクロシリンジ等で 1000, 500, 150, 100, 80, 50, 40, 20, 10 µL 採りメタノール：精製水 = 1 : 3 の溶液を用いて 10 mL に希釈した (100, 50, 15, 10, 8.0, 5.0, 4.0, 2.0, 1.0 µg/L)。この際、サロゲート内標準液 (BPA-¹³C₁₂ : 1 mg/L) 及びシリンジスパイク内標準液 (BPA-*d*₁₄ : 1 mg/L) を 10 µg/L の濃度になるように各々 100 µL ずつ添加した。

【器具】 ビーカー，目盛付き試験管，メスフラスコ，標線ビン，コンセントレーター，窒素吹き付け装置，マイクロシリンジ，パストゥールピペット 等

2.3 *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の LC/MS 測定方法

LC/MS 測定は Alliance2695/ Micromass Quattro micro API (Waters 社, Milford, MA, USA) を用い、定量は ESI-Negative-SRM モードにより行った。測定条件を以下に示す。

〔LC 条件〕

機種： Waters 2695

カラム : Ascentis Express C18 (10 cm × 2.1 mm, 2.7 µm)

移動相条件 : A 超純水 , B メタノール

0→1 min A : 80 B : 20

1→10 min A : 80 → 5 B : 20 → 95 linear gradient

10→14 min A : 5 B : 95

14→14.5 min A : 5 → 0 B : 95 → 100 linear gradient

14.5→20 min A : 0 B : 100

20→21 min A : 0 → 80 B : 100 → 20 linear gradient

21→29 min A : 80 B : 20

流速 : 0.2 mL/min、カラム温度 : 40 °C、 注入量 : 10 µL

[MS 条件]

機種 : Waters 社製 QuattroMicro API

キャピラリー電圧 : 3.50 kV コーンガス流量 : 50 L/hr

デソルベーションガス流量 : N₂(700 L/hr) ソース温度 : 120 °C

デソルベーション温度 : 350 °C イオン化法 : ESI (-) SRM

	コーン電圧(V)	キャピラリー電圧(eV)	定量イオン	確認イオン
BPA	25	25	227>133	227>212
p-cumylphenol	25	25	211>196	211>133
BPA_d14	30	25	241>141.8	241>223
BPA_13C12	30	25	239>139	239>224

[標準物質のクロマトグラムおよびマススペクトル]

p-クミルフェノールおよびビスフェノール A の標準物質のクロマトグラムを Fig. 1 に、マススペクトルを Fig.2~5 に示した。

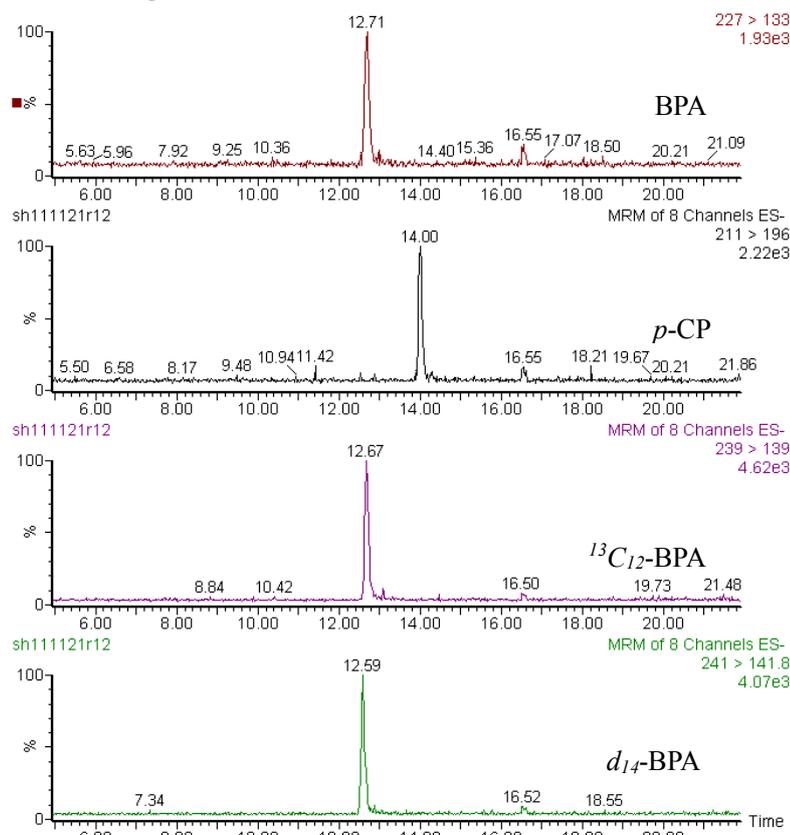


Fig. 1 標準物質 (5 ng/mL) のクロマトグラム

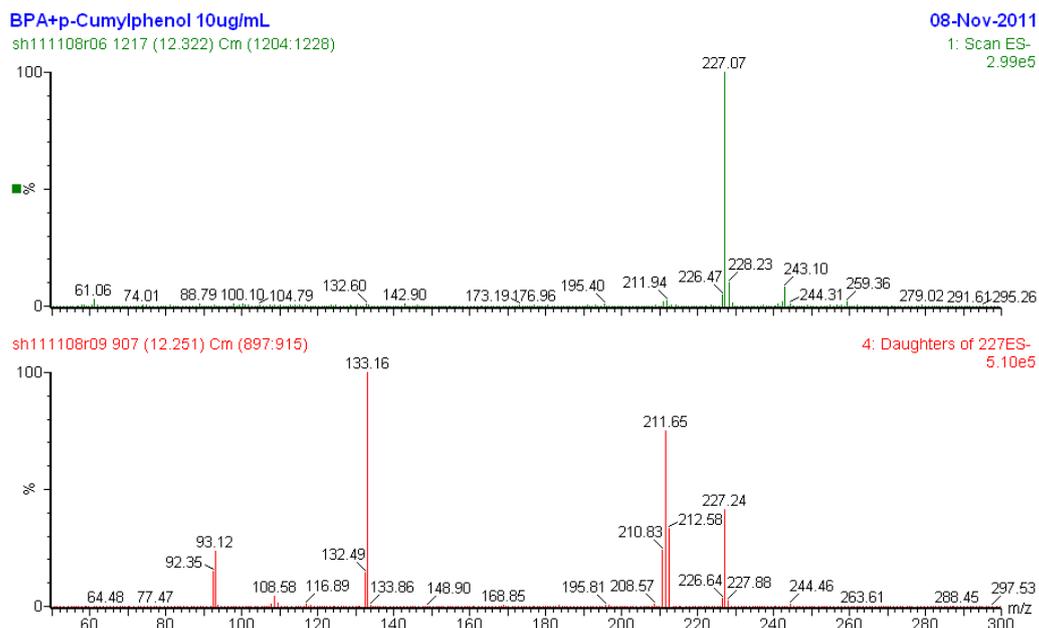


Fig. 2 BPA のプレカーサーイオン (上段) と
m/z:227 のプロダクトイオン (下段) のマススペクトル

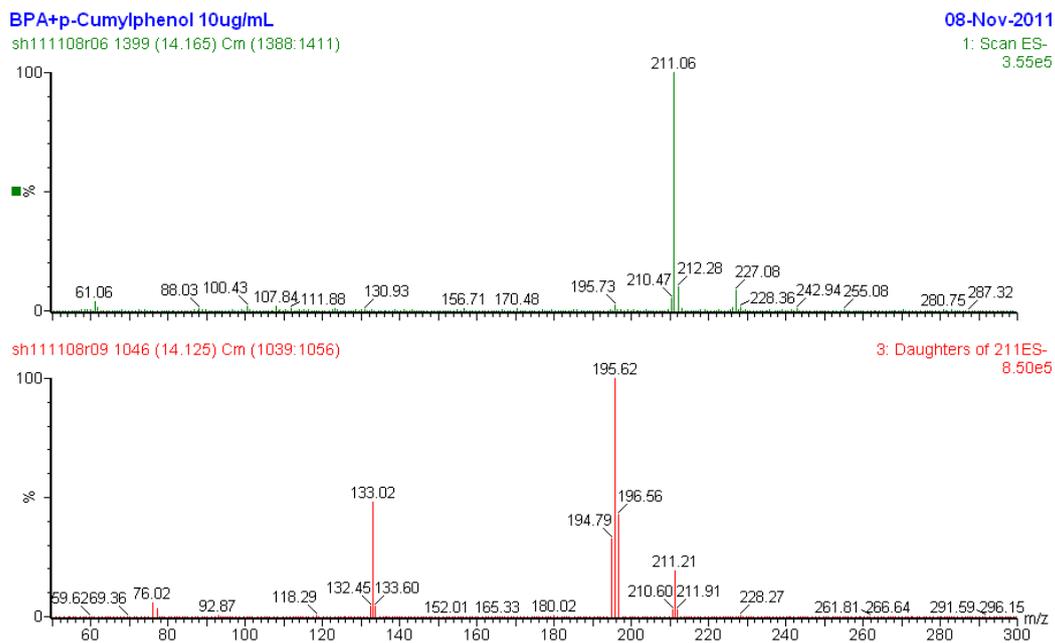


Fig. 3 *p*-cumylphenol のプレカーサーイオン (上段) と
m/z:211 のプロダクトイオン (下段) のマススペクトル

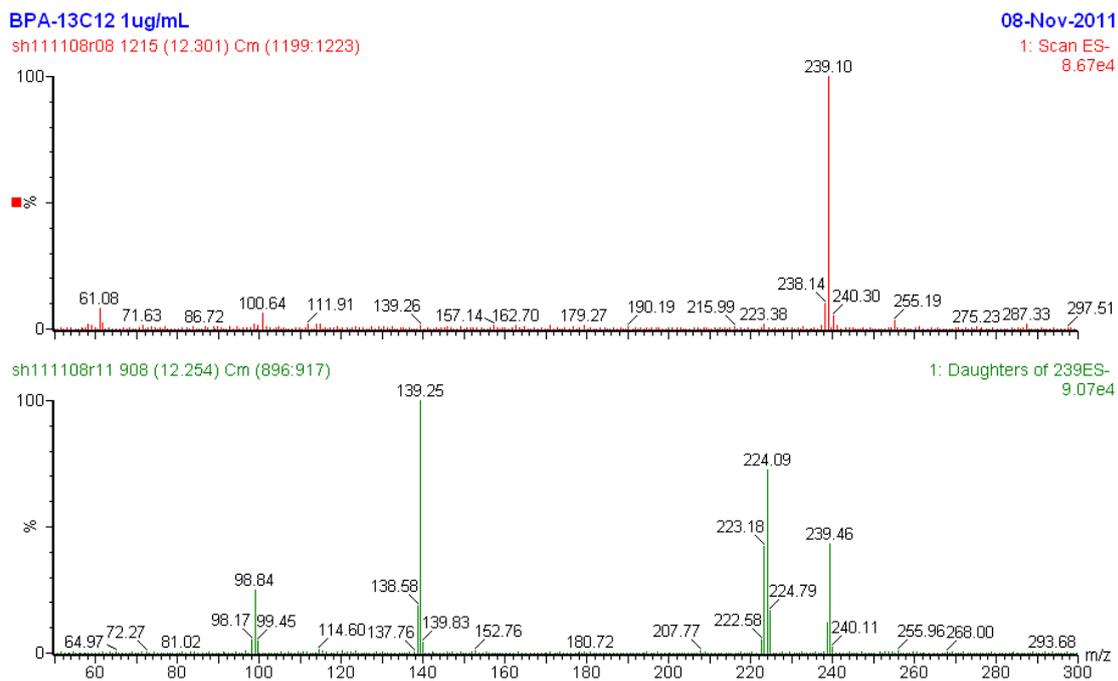


Fig. 4 $^{13}C_{12}$ -BPA のプレカーサーイオン（上段）と
m/z:239 のプロダクトイオン（下段）のマススペクトル

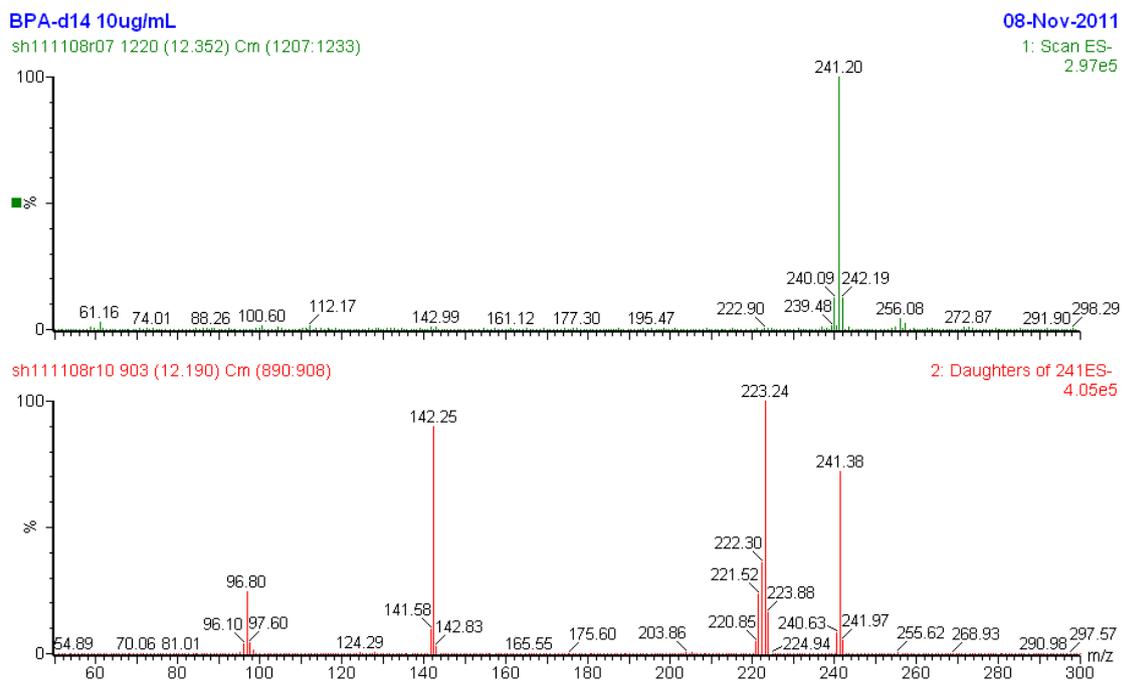


Fig. 5 d_{14} -BPA のプレカーサーイオン（上段）と
m/z:241 のプロダクトイオン（下段）のマススペクトル

〔検量線〕

検量線用標準液 (1.0 µg/L~100 µg/L) 10 µL を LC/MS に注入して測定を行った。各々得られたクロマトグラムにおいて、対象物質のピーク面積をサロゲート内標準物質のピーク面積で除して得られる応答比を計算し、検量線の縦軸とした。対象物質の濃度をサロゲート内標準物質の濃度で除して得られる濃度比を計算し、横軸とした。最小二乗法により一次の検量線を作成し、関係式及び相関係数を計算した。BPA および p-CP とともに、1 µg/L から 100 µg/L の濃度範囲において、相関係数 0.9996 と良好な直線性を持つ検量線が得られた。

検量線を Fig. 6, 7 に、検量線作成用データを Table 1, 2 に示す。

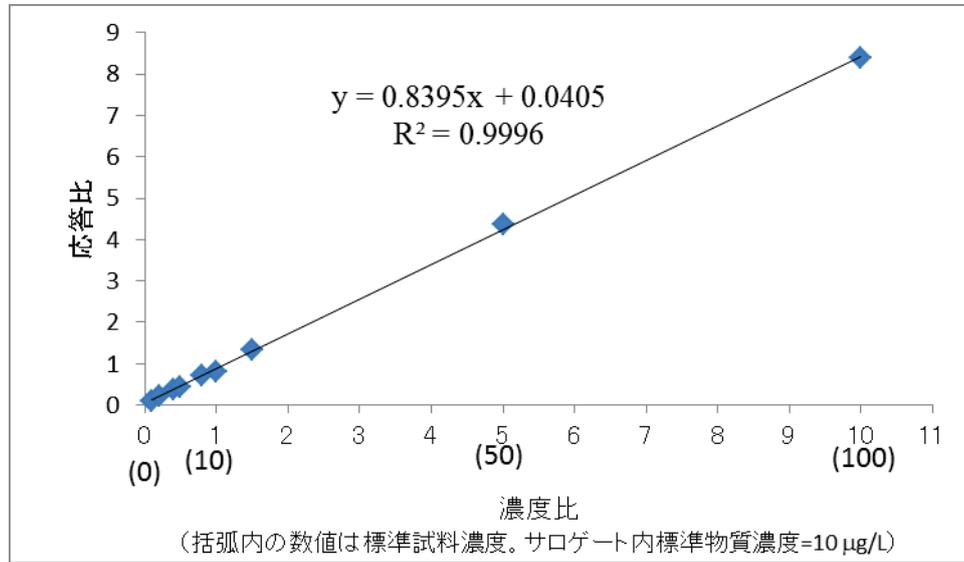


Fig. 6 BPA の検量線

Table 1 BPA の検量線作成用データ

標準試料濃度 (単位 : µg/L)	応答値		応答比 (As / Ass)
	調査物質 (As) BPA m/z = 227 → 133	サロゲート内標準物質 (Ass) BPA - ¹³ C ₁₂ m/z = 239 → 139	
1.0	27.51	272.14	0.1011
2.0	65.98	291.04	0.2267
4.0	92.14	239.13	0.3853
5.0	127.39	293.90	0.4335
8.0	191.05	268.96	0.7103
10.0	237.9	293.57	0.8102
15.0	376.0	282.13	1.3328
50.0	1243.0	285.41	4.3551
100.0	2414.074	288.07	8.3802

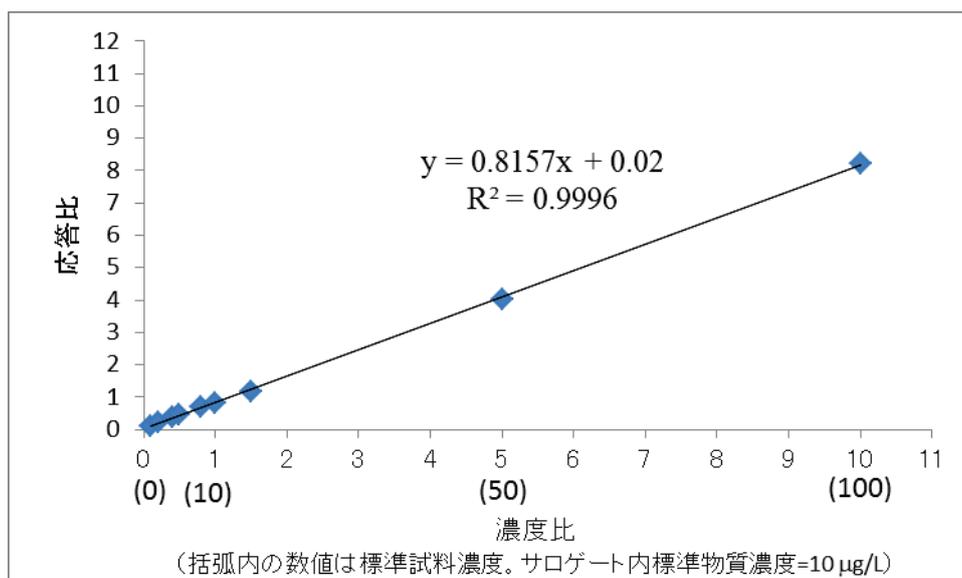


Fig. 7 *p*-cumylphenol の検量線

Table 2 *p*-cumylphenol の検量線作成用データ

標準試料濃度 (単位：□g/L)	応答値		応答比 (As / Ass)
	調査物質 (As) <i>p</i> -CP m/z = 211 → 196	サロゲート内標準物質 (Ass) BPA- ¹³ C ₁₂ m/z = 239 → 139	
1.0	31.25	272.14	0.1148
2.0	66.63	291.04	0.2289
4.0	89.12	239.13	0.3727
5.0	133.21	293.90	0.4532
8.0	187.19	268.96	0.6960
10.0	238.2	293.57	0.8112
15.0	330.4	282.13	1.1709
50.0	1144.0	285.41	4.0084
100.0	2370.937	288.07	8.2304

〔定量〕

試験液 10 μL を LC/MS に注入して測定を行った。得られたクロマトグラム上の対象物質のピーク面積をサロゲート内標準物質のピーク面積で除した応答比から検量線に照らして対象物質の濃度をサロゲート内標準物質の濃度で除した濃度比を算出した。得られた濃度比から、対象物質の試験液濃度($\mu\text{g/L}$)を求めた。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C (ng/L)は次式により算出した。

$$C = R \times Q / V$$

R : 検量線から求めた被検物質濃度をサロゲート物質濃度で割った比

Q : 試料中に添加したサロゲートの量 (ng)

(= 添加するサロゲートの濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) \times 添加するサロゲートの容量 (μL))

V : 試料水量(L)

本分析法においては、 Q : 10 (ng), V : 0.2 (L)である。

2.4 分析法に関する要素技術とその評価

2.4.1 水質試料中 *p*-クミルフェノールおよびビスフェノール A の前処理方法

2.4.1.1 抽出方法の検討

p-CP と BPA を同時に前処理するための抽出方法を検討し、結果を Fig.8 に示した。液液抽出をする方法も考えられたが、溶媒の使用量が少なく、操作も簡便な固相抽出をする方法について検討した。

ミリ Q 水 200mL に BPA, *p*-CP を 10 ng 添加し、8 種類の固相 (Fig.8 に記載) を用いて抽出した。抽出後、アセトン 5 mL で溶出して、窒素吹き付けにより乾固直前まで濃縮した。さらに、50%メタノール水溶液で 1mL に定容し、50 μ L を LC/MS へ注入した。

通液試料が中性の場合、いずれの固相を用いても、BPA および *p*-CP は固相を通り抜けてしまい、ほとんど回収されなかった。一方で、試料を pH3 程度に調製した後、固相抽出を行うと、HLB, RP1, CH においては BPA が 80%以上回収され、さらに、HLB, CH を使用した場合においては *p*-CP も 90%以上回収された。

以上の結果から、HLB, CH が候補として考えられたが、試料水中のマトリックスを出来るだけ試験液に持ち込まないようにする目的で、より選択性の高い CH を用いて、実試料の前処理をすることとした。また、溶出溶媒に関しては酢酸エチル、ジクロロメタン、メタノール、アセトンで検討した結果、最も溶出率の高かったメタノールを用いることとした。

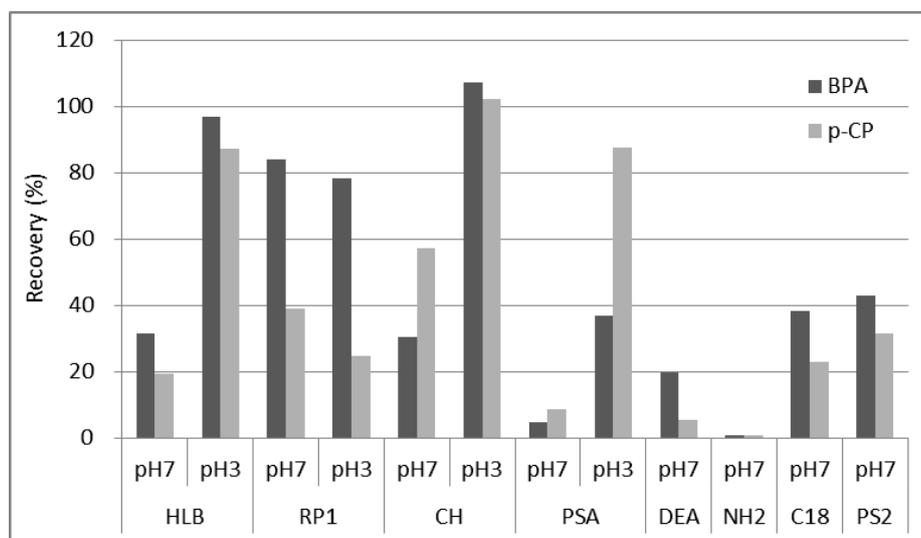


Fig. 8 抽出固相および pH による回収率の違い

2.4.1.2 クリーンアップ方法の検討

環境水を濃縮すると、目的物質以外のマトリックス成分が測定の妨害となる。マトリックス成分を除去するために、クリーンアップ操作が必要となる。

上記で前処理した試験液を、MF-1、MF-2、Envicarb、Inertsep GC、Inertsep GC/PSA、Inertsep GC/SAX/PSA、Sep-Pak Carbon/NH₂ を使用してクリーンアップ方法を検討した。

MF-1、MF-2 は試験液をそのまま固相に通過させるのみで測定し、残りの活性炭系固相はメタノール 20mL で十分に洗浄し、ブランクが検出されないことを確認したうえで使用した。試験液を負荷し、10mL のメタノールで溶出(F1)、さらに 5mL のメタノールで溶出(F2)させた。その後、窒素吹き付けにより乾固直前まで濃縮し、50%メタノール水溶液で 1mL に定容した。

MF-1 を用いた場合、クロマトグラムのベースラインが MF-2 を使用した時ほどきれいにならなかった。また、BPA は 80%程度回収されたが、p-CP の回収率が 50%程度であった。

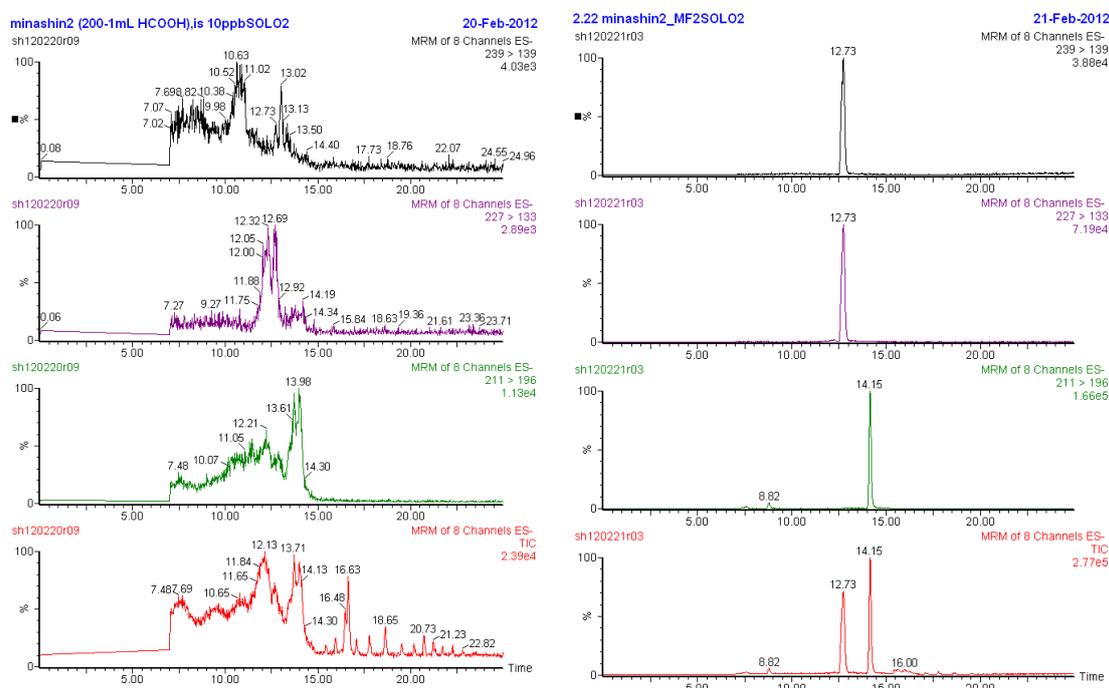
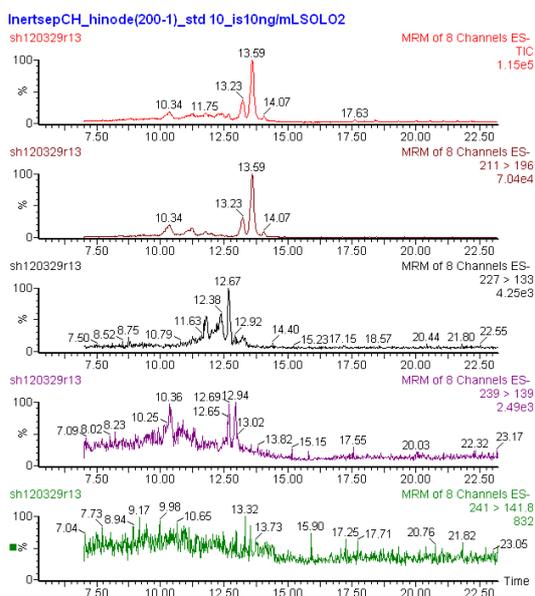


Fig. 9 クリーンアップ前後のクロマトグラム

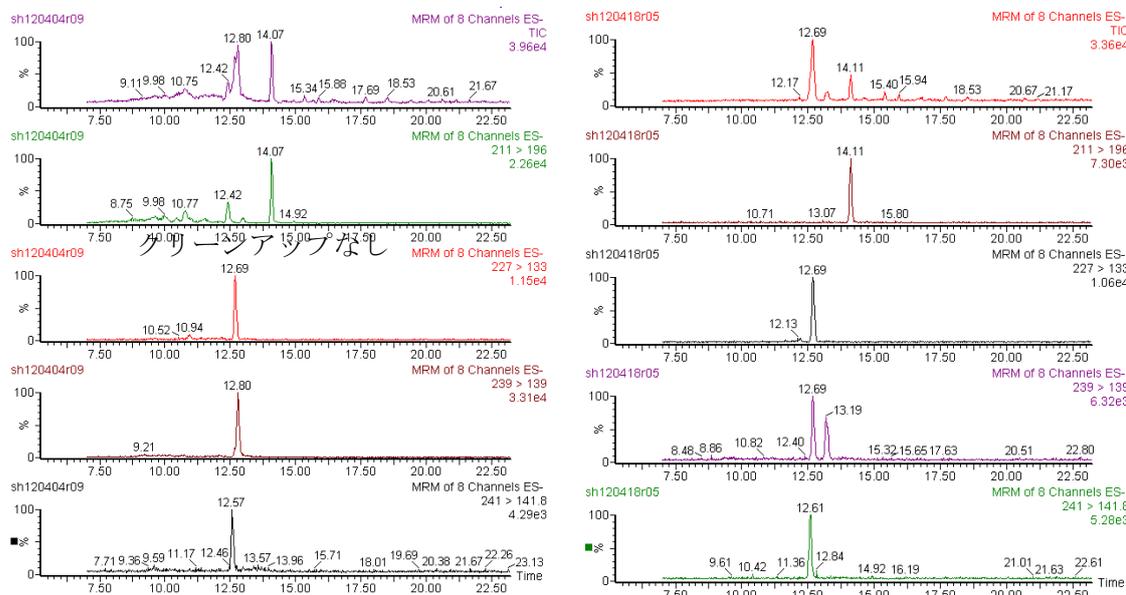
(左：クリーンアップ前，右：MF-2 に通過させた後)

MF-2 を用いてクリーンアップを行った結果を Fig. 9 に示す。左側はクリーンアップ前の試験液、右側はその試験液を MF-2 に通過させた後に測定を行ったものである。クロマトグラムは非常にきれいになるが、ピーク強度が 3~7 倍になってしまった。BPA, p-CP だけでなく、¹³C-BPA の強度も増加し、この強度増加は他の試料においても再現性良く出てきてしまった。また、ENVI-Carb, Inertsep GC ではクリーンアップが不十分でクロマトグラムのベースラインがきれいにならず、Inertsep GC/PSA, Inertsep GC/SAX/PSA では p-CP の回収が不十分だった。Sep-Pak Carbon/NH₂ では MF-2 のような現象も起きず、ベースラインもきれいになったので、クリーンアップには Sep-Pak Carbon/NH₂ を用いることとした。



く、¹³C-BPA の強度も増加し、この強度増加は他の試料においても再現性良く出てきてしまった。また、ENVI-Carb, Inertsep GC ではクリーンアップが不十分でクロマトグラムのベースラインがきれいにならず、Inertsep GC/PSA, Inertsep GC/SAX/PSA では p-CP の回収が不十分だった。Sep-Pak Carbon/NH₂ では MF-2 のような現象も起きず、ベースラインもきれいになったので、クリーンアップには Sep-Pak Carbon/NH₂ を用いることとした。

(Fig.10 参照)



Envicarb 使用

Carbon/NH₂ 使用

Fig. 10 クリーンアップの有無によるクロマトグラムの違い

2.4.1.3 操作ブランクについて

p-CP は操作ブランクが不検出であったが、BPA は操作ブランクが検出された。

精製水から作成した空試験液の繰り返し測定結果は MDL 試験結果として Table 3 および Fig. 12 に示した。BPA は 0.008 ng/mL 程度の操作ブランク値が検出され、IDL 試料換算値 0.0014 ng/mL 以上の値であった。MDL は 0.00078 ng/mL と算出され、環境試料を用いて算出された MDL 0.0019 ng/mL より低い結果となった。しかし、IDL を超す高いブランク値であり、操作を行う際には可能な限り低減化することが望ましい。

また、精製水の通液を行わないで、操作のみのブランク試験を行った際のクロマトグラムを Fig. 11 に示す。測定回数 5 回で試験をしたが、いずれの場合においても BPA、*p*-CP とともに IDL 以下で不検出であった。よって、精製水の取り扱いには十分注意を払い、使用前にあらかじめ BPA の含有量を把握しておくことが必要であると考えられる。

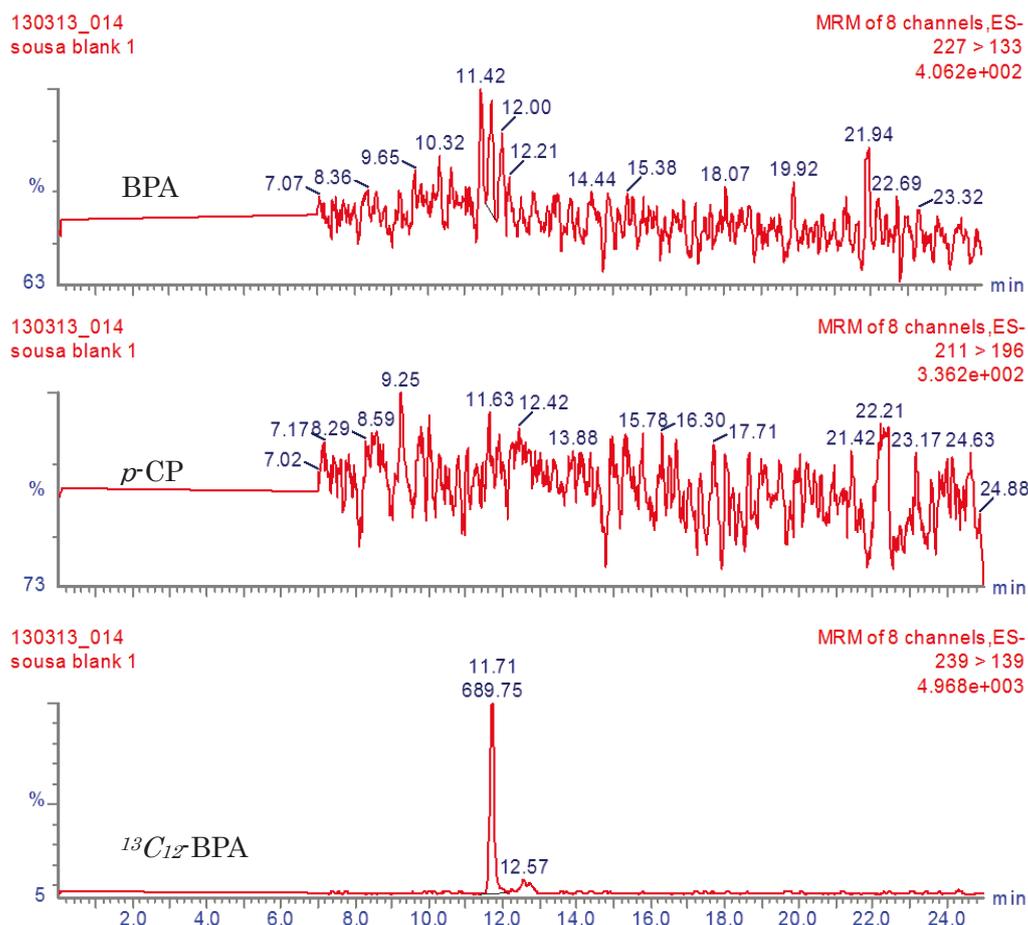


Fig. 11 操作ブランク試験時のクロマトグラム

2.4.1.4 水質試料の前処理方法

水試料 200 mL にギ酸 100 μ L を添加した後、サロゲートとして BPA- $^{13}\text{C}_{12}$ を 10 ng (1 mg/L, 10 μ L) 添加した。固相カートリッジ (Inertsep CH) はメタノール 10 mL, 精製水 10 mL でコンディショニングした後, 試料を負荷する。約 20 mL/min の速度で通水する。通水後は 10 mL の精製水で固相カートリッジを洗浄した後, 固相カートリッジをコンセンレーターから取り外し, 10 分程度, 吸引乾燥させた。

抽出が済んだ Inertsep CH を上に, メタノール 10 mL で洗浄した SepPak Carbon/ NH_2 (注 2) を下に, 直列に並べ, 最下部にメモリ付試験管をセットした。Inertsep CH の上からメタノールを 10 mL 通し, 続いて SepPak Carbon/ NH_2 を通過したメタノールが試験管へ入るようにした。

その後, 溶出液は 40 $^{\circ}\text{C}$ の水浴を備えた窒素吹き付け装置で乾固直前まで濃縮し, 50%メタノール水溶液で 1 mL にメスアップした。超音波装置に 2 分間程度かけた後, シリンジスパイクとして BPA- d_{14} を 10 ng (1 mg/L, 10 μ L) 添加して試験液とした。

2.4.2 分析法の定量性とその評価

2.4.2.1 測定方法の検出下限(MDL),定量下限(MQL)

本測定方法における MDL 及び MQL を Table 3, 4 に示す。

測定方法の検出下限(MDL)及定量下限(MQL)は, 「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月) に従って算出した。測定時の代表的なクロマトグラムを Fig. 12, 13 に示す。

Table 3 MDL 及び MQL の算出 (精製水試料)

物質名	BPA	p-CP
試料	精製水	精製水
試料量(L)	0.2	0.2
標準添加量(ng)	-	5
試料換算濃度(ng/mL)	-	0.025
最終液量(mL)	1	1
注入濃度(ng/mL)	50	50
装置注入量(mL)	10	10
操作ブランク平均(ng/mL)*1	-	ND
無添加平均(ng/mL)*2	0.0078	ND
結果 1(ng/mL)	0.00790	0.0249
結果 2(ng/mL)	0.00782	0.0249
結果 3(ng/mL)	0.00772	0.0240
結果 4(ng/mL)	0.00789	0.0250
結果 5(ng/mL)	0.00748	0.0269
結果 6(ng/mL)	0.00815	0.0245
結果 7(ng/mL)	0.00790	0.0252
平均値(ng/mL)	0.007839	0.02505
標準偏差(ng/mL)	0.000205	0.000904
MDL(ng/mL)*3	0.00078	0.0034
MQL(ng/mL)*4	0.0020	0.0090
S/N	15	55
CV(%)	2.6	3.6

*1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均 (n=3)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値(n=3)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$, *4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$, *5 サロゲート回収率：106%, CV% 6.8%

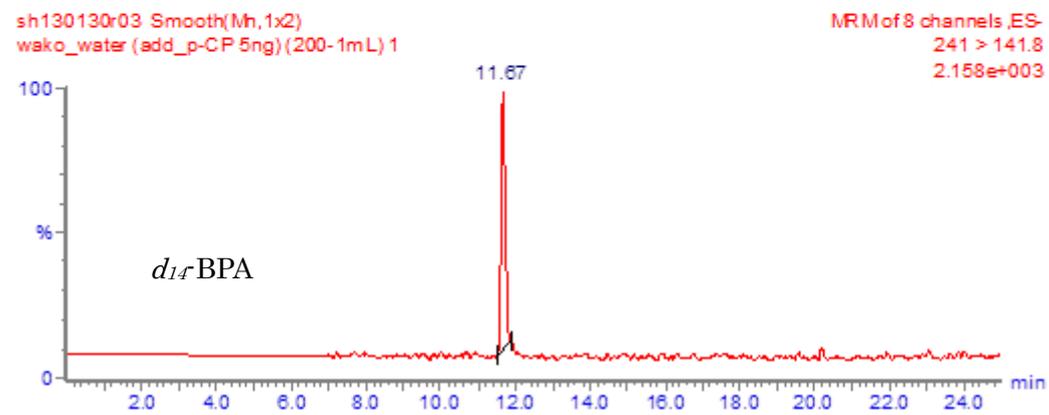
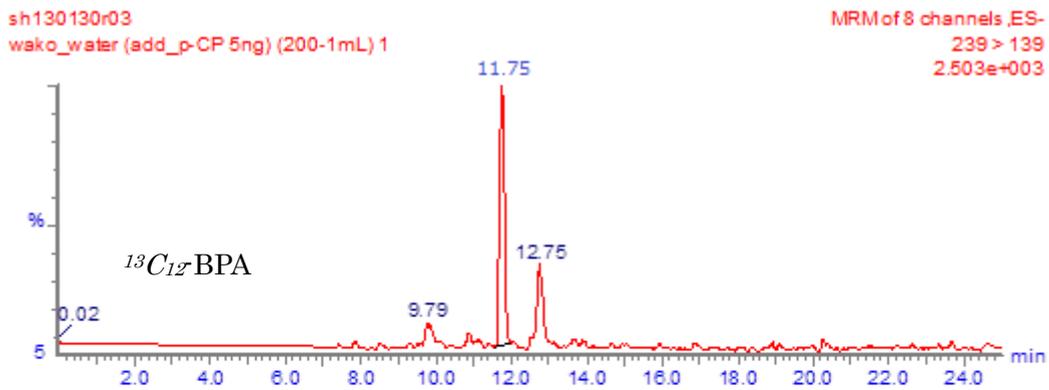
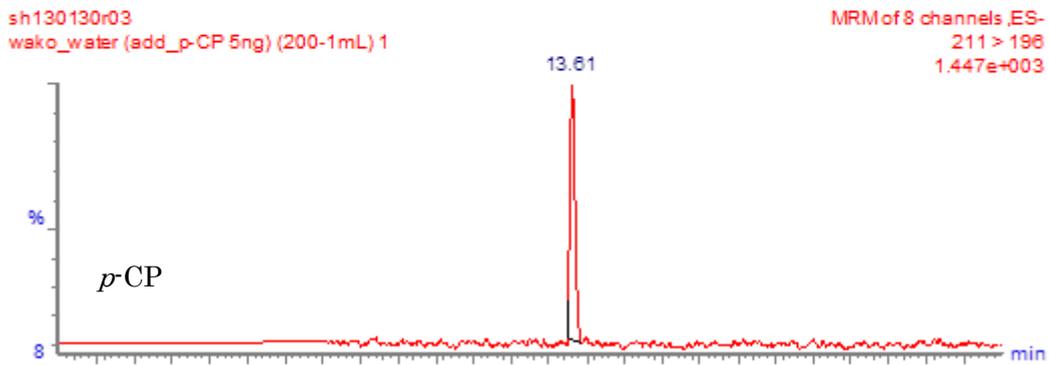
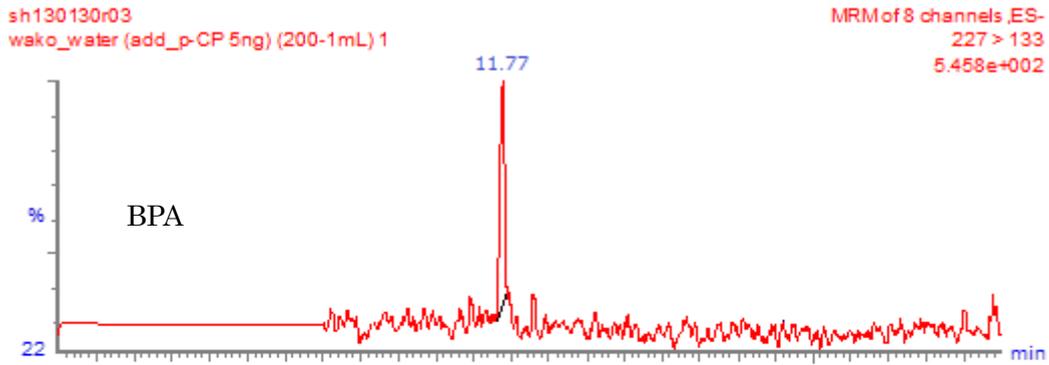


Fig.12 MDL 試験試料 (精製水) のクロマトグラム

Table 4 MDL 及び MQL の算出 (海水試料)

物質名	BPA	p-CP
試料	海水	海水
試料量(L)	0.2	0.2
標準添加量(ng)	-	-
試料換算濃度(ng/mL)	-	-
最終液量(mL)	1	1
注入濃度(ng/mL)	50	50
装置注入量(mL)	10	10
操作ブランク平均(ng/mL)* ¹	0.0078	ND
無添加平均(ng/mL)* ²	0.036	0.015
結果 1(ng/mL)	0.0360	0.0142
結果 2(ng/mL)	0.0347	0.0148
結果 3(ng/mL)	0.0360	0.0146
結果 4(ng/mL)	0.0359	0.0147
結果 5(ng/mL)	0.0353	0.0152
結果 6(ng/mL)	0.0354	0.0146
結果 7(ng/mL)	0.0360	0.0159
平均値(ng/mL)	0.03561	0.01486
標準偏差(ng/mL)	0.000506	0.000555
MDL(ng/mL)* ³	0.0019	0.0021
MQL(ng/mL)* ⁴	0.0051	0.0055
S/N	88	34
CV(%)	1.4	3.7

*1-4 Table 3 と同様

*5 サロゲート回収率 : 94%, CV% 9.9%

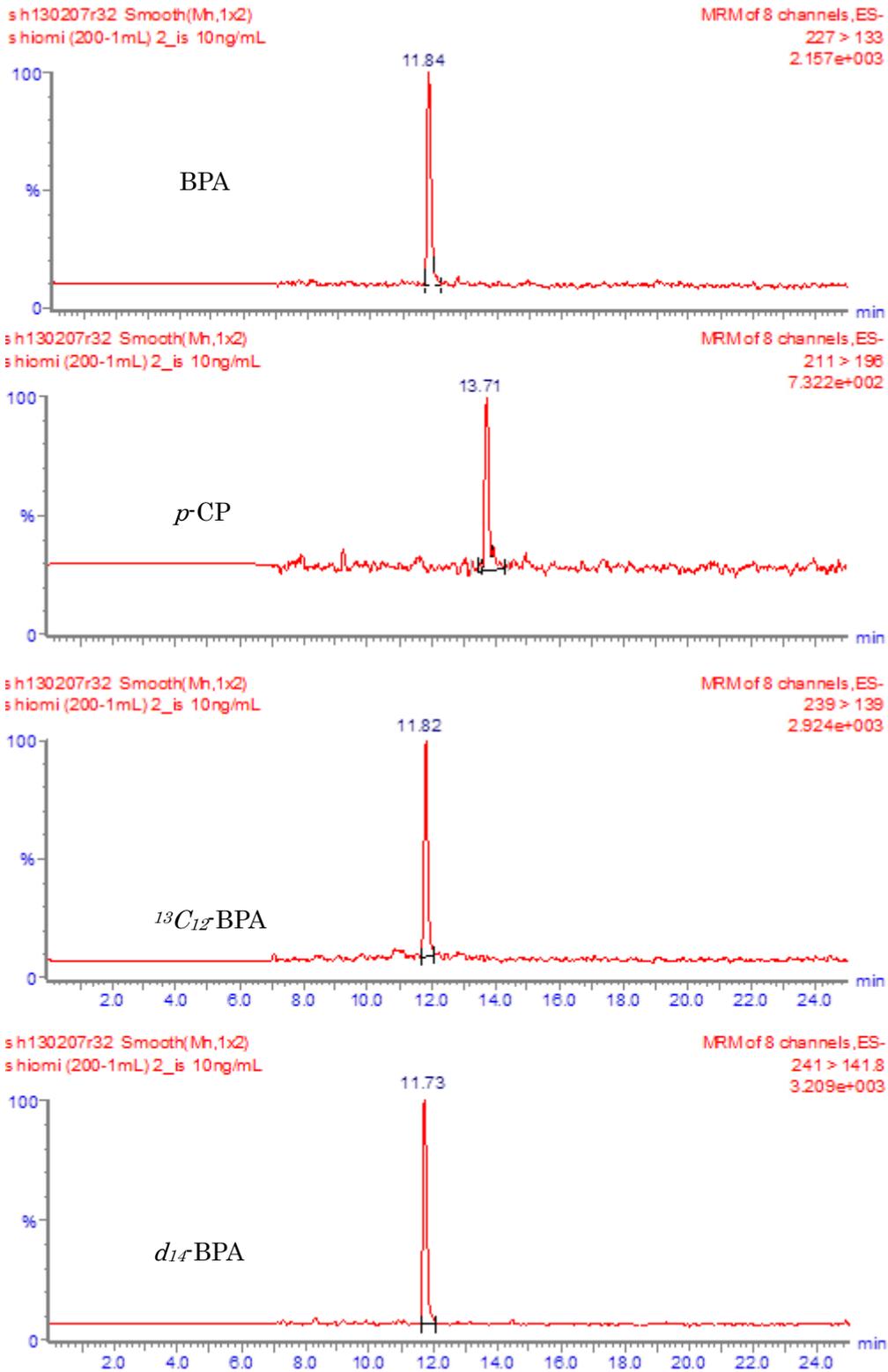


Fig. 13 MDL 試験試料 (海水) のクロマトグラム

2.4.2.2 添加回収試験

精製水、海水（潮見ふ頭）、河川水（大森橋）への標準物質添加回収結果を Table 5 に示す。河川水、海水の添加回収試験試料のクロマトグラムを Fig. 14, 15 に示す。すべての試料において、内標準物質の回収率が 80%以上あり、内標準物質による補正後の回収率が良いことから、内標準物質による補正を行うことで、定量的評価は可能と判断した。定量結果については、すべて内標準物質による補正を行った値により評価を行った。

Table 5 各試料における添加回収試験結果

超純水				
物質名	BPA	<i>p</i> -CP	BPA	<i>p</i> -CP
試料量(L)	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量(ng)	無添加	無添加	50	50
測定回数	5	5	5	5
検出濃度(ng/mL)	0.017	ND	0.26	0.24
回収率(%)	-	-	97	96
サロゲート回収率(%)	90.4	-	92.9	-
CV(%)	6.3	-	1.2	1.9

海水（潮見ふ頭）				
物質名	BPA	<i>p</i> -CP	BPA	<i>p</i> -CP
試料量(L)	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量(ng)	無添加	無添加	50	50
測定回数	7	7	5	5
検出濃度(ng/mL)	0.036	0.015	0.28	0.27
回収率(%)	-	-	99	100
サロゲート回収率(%)	90.8	-	87.9	-
CV(%)	1.4	3.7	1.2	1.7

河川水（大森橋）

物質名	BPA	<i>p</i> -CP	BPA	<i>p</i> -CP
試料量(L)	0.2	0.2	0.2	0.2
標準添加量(ng)	無添加	無添加	50	50
測定回数	7	7	5	5
検出濃度(ng/mL)	0.059	ND	0.31	0.25
回収率(%)	-	-	98	99
サロゲート回収率(%)	86.7	-	81.3	-
CV(%)	1.5	-	1.5	1.3

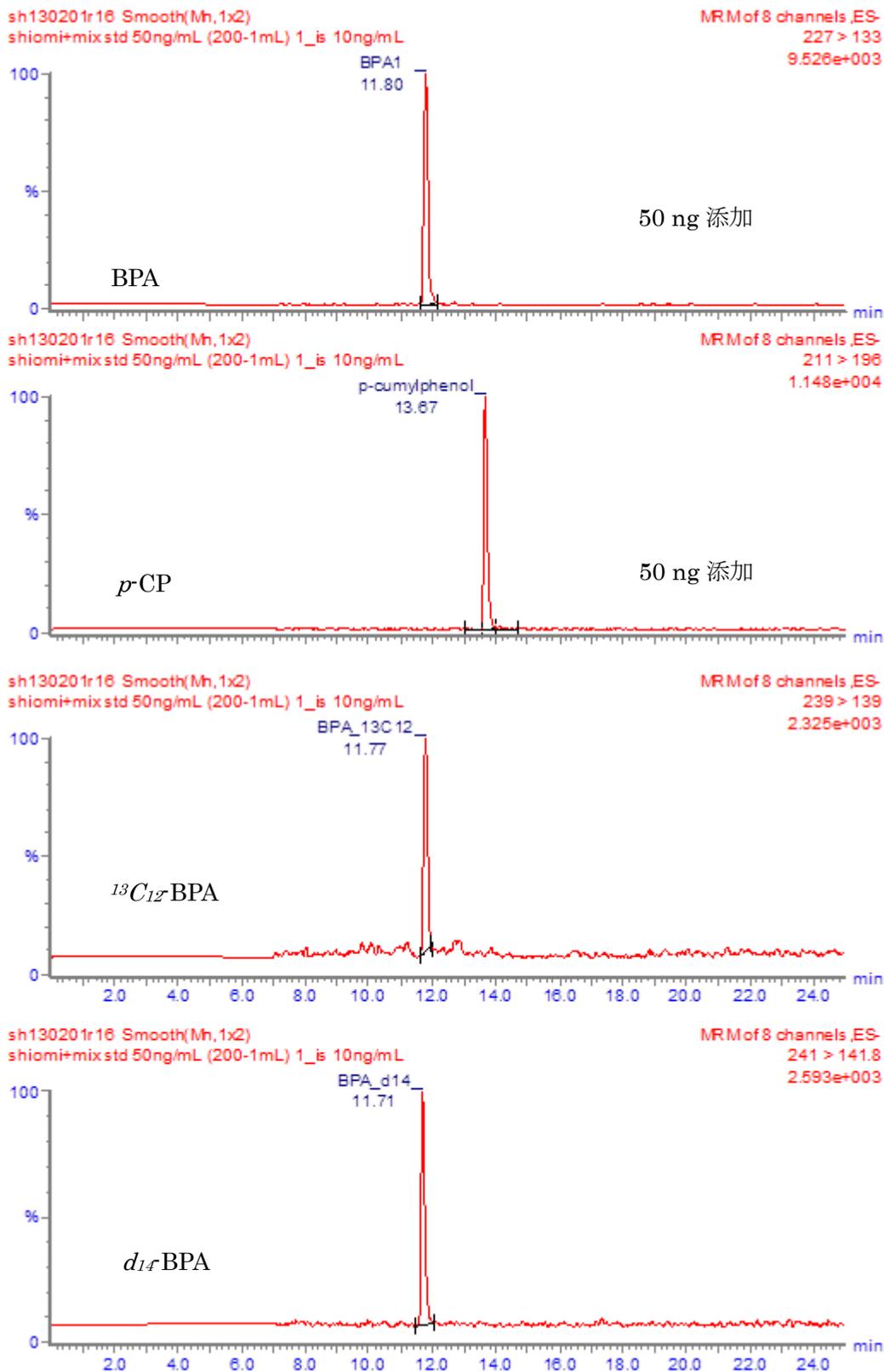


Fig. 14 海水の添加回収試験試料のクロマトグラム

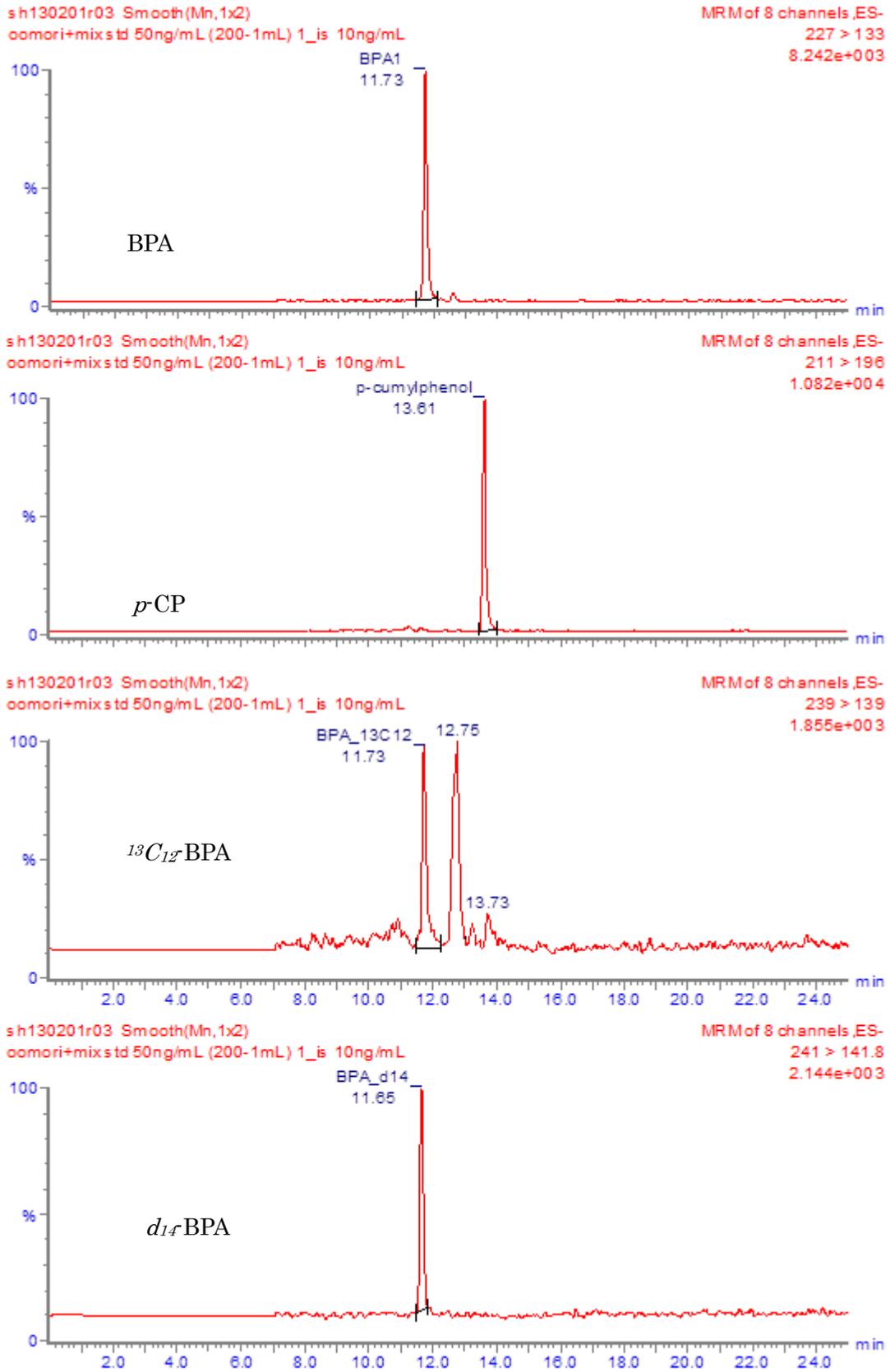


Fig. 15 河川水の添加回収試験試料のクロマトグラム

2.4.2.3 分解性スクリーニング試験

分解性スクリーニング試験の結果を Table 6 に示す。

pH5,7,9 いずれの場合においても 1 週間程度の保存は問題なく、明所における保存も特に問題ないと考えられる。また、保存容器がガラス製であっても、テフロン製であっても、BPA および p-CP の保存は可能であると考えられる。

Table 6 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)		残存率 (%)	
		1 時間後		7 日後	
	BPA	p-CP	BPA	p-CP	
5 (暗所)	50	96	94	97	94
7 (明所)	50			92	85
7 (暗所)	50	98	96	94	95
9 (暗所)	50	96	97	92	94

(ガラス容器にて試験実施)

pH	初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)		残存率 (%)	
		1 時間後		7 日後	
	BPA	p-CP	BPA	p-CP	
5 (暗所)	50	99	99	97	98
7 (明所)	50			97	101
7 (暗所)	50	98	99	94	98
9 (暗所)	50	98	97	92	94

(テフロン製容器にて試験実施)

2.4.2.4 保存性試験

保存性試験の結果を Table 7 に示す。海水や河川水に BPA および p-CP の標準溶液を添加しても、1 週間後の残存率は 90%以上あった。ただし、試料を分析する際には、一般的な化学物質の分析と同様に、試料は冷暗所にて保存を行い、採取後速やかに分析することが望ましいと考えられる。また、標準溶液は高濃度、低濃度ともに 1 か月の保存

は十分可能であった。ただし、測定の際には、ピーク強度を十分に確認して測定を行った方がよいと考えられる。

Table 7 保存性試験結果

	初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)		残存率 (%)	
		7日間		1か月	
		BPA	<i>p</i> -CP	BPA	<i>p</i> -CP
河川水	50	92	98		
海水	50	99	99		
標準溶液	5			104	100
標準溶液	50			98	101

3. 名古屋市内的における実態調査結果

3.1 試料

水質試料は 2007 年～2012 年にかけて名古屋市内河川及び名古屋港 13 地点で採水した。採水地点を Fig. 16 に示す。採水はステンレス製のバケツを用いて行い、試料はガラス製の容器へ入れた。

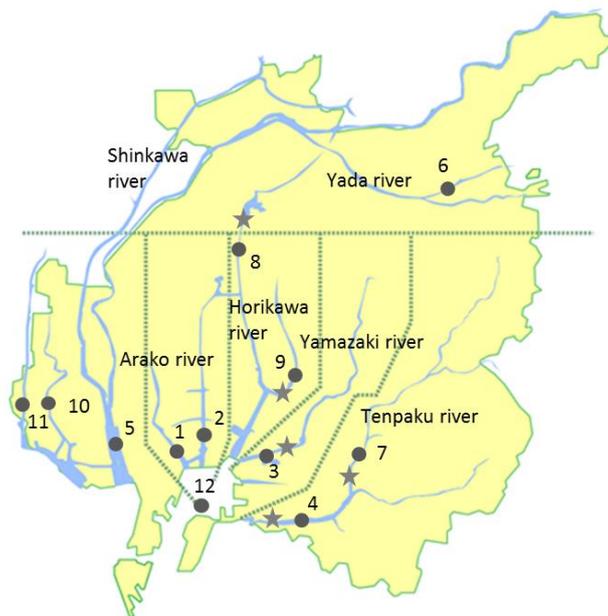


Fig. 16 Map depicting the sampling sites in Nagoya city.

Black circles denote all sites at which the quality of water was constantly monitored.

Stars denote sewage treatment plants near the sampling point.

3.2 実態調査結果および濃度分布

名古屋市河川及び名古屋港海水の BPA および *p*-CP の実態調査結果を Table 8 に示す。

BPA は、測定したすべての試料から MDL 以上の濃度が検出された。河川水試料中の濃度範囲が 40~290 ng/L、海水試料は 33 ng/L であった。

p-CP は、測定した 12 検体中 10 検体から MDL 以上の濃度が検出された。河川水試料中の濃度範囲が <3.4~160 ng/L で、海水試料は 7.2 ng/L であった。

平均値や中央値を算出の際は、MDL 未満の結果に関しては、MDL の 1/2 の値を計算に用いた。

BPA は市内ところどころに高濃度地点が存在しており、広範囲にわたって汚染されていることが明らかになった。また、*p*-CP については荒子川の河口付近において高濃度地点が存在しており、付近に汚染源が存在することが明らかになった。今後も引き続き、調査していく必要があると考えられる。

Table 8 Concentrations of PCP and BPA in the samples at different sampling sites.

sampling site	1	2	3	4	5	6
BPA (ng/L)	290	74	220	59	150	55
PCP (ng/L)	5.6	<5.2	160	46	21	6.8
PCP/BPA	0.02	-	0.73	0.78	0.14	0.12
sampling site	7	8	9	10	11	12
BPA (ng/L)	40	62	97	43	230	33
PCP (ng/L)	<5.2	5.7	8.2	6.3	5.3	5.8
PCP/BPA	-	0.09	0.08	0.15	0.02	0.17
	average	median	max	min	detected number	
BPA (ng/L)	110	68	290	33	12/12	
PCP (ng/L)	23	6.6	160	<5.2	10/12	

Sampling sites 1–11: river water, Sampling site 12: seawater; all sites were constantly monitored by the Nagoya City Government.

For the values below MDL, half of the MDL values were used for the calculation of the average, median, and standard deviation.

今回の実態調査結果で、BPA および *p*-CP の濃度比を Table 8 に、BPA および *p*-CP の濃度の関係を Fig.17 に示した。

両者の濃度比は 0.02 から 0.7 と幅広く、両者がポリカーボネート樹脂の原料等で共に使用されることもあるが、それぞれの物質の用途が多岐にわたっていることが示唆された。濃度比が 0.02 程度の Group1、濃度比が 0.1 程度の Group2、濃度比が 0.7 程度の Group3 と、大きく 3 つのグループに分類することができた。Group2 が全体の半分を占めており、最も一般的な状態であることが示された。一方で、Group1 の地点では、*p*-CP 濃度と比較して BPA 濃度が非常に高く、調査地点付近に BPA の発生源がある可能性がある。また、Group3 の地点は *p*-CP と BPA がほぼ同程度の濃度であり、*p*-CP 濃度が非常に高かった。いずれの地点も、比較的近郊に下水処理施設があるが、その影響の有無については今後の調査課題である。

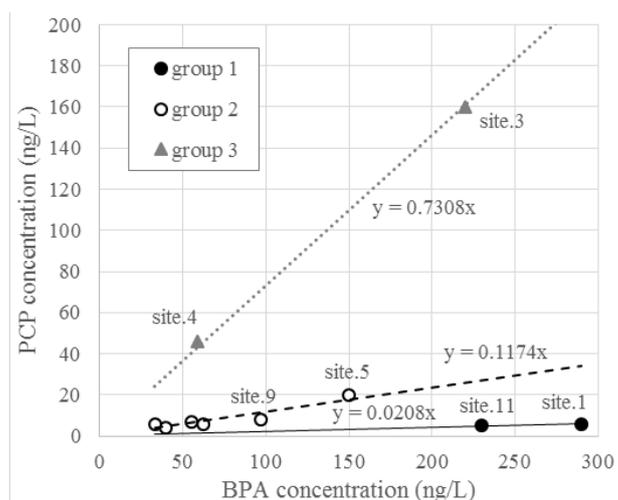


Fig. 17 Scatter plots between the concentrations of BPA and PCP.

The concentration ratio of PCP to BPA varied from 0.02 to 0.7, and it can be classified into three groups from the calculation of the results obtained from the variation in the ratios.

Group 1: concentration ratios of PCP to BPA were less than or equal to 0.02 (Sites 1 and 11)

Group 2: concentration ratios of PCP to BPA were 0.02–0.2 (Sites 5, 6, 7, 8, 9 and 12)

Group 3: concentration ratios of PCP to BPA were around 0.7 (Sites 3 and 4)

4. まとめ

水質試料中のビスフェノール A および *p*-クミルフェノールを同時に高感度分析するための方法を検討した。種々の検討の結果、本法において、必要とされるレベルの検出下限値、添加回収率等を得ることができた。BPA は非常に幅広く使用されているため、数 ng/L オーダーの検出を可能にするには、ブランク対策が必須となる。使用する器具・試薬類、環境など、可能な限りの汚染源を排除し、分析を行った。最も大きな汚染源であったのが、水で、一般的な超純水装置から得られる水からは BPA が数 µg/L レベルで検出された。試薬として市販されている高純度の水を使用することで、ブランク値を大幅に下げることができた。他に、使用する固相カートリッジは使用前にメタノールを用いて洗浄すること、実験室環境中にも BPA が存在するので、手早く操作を行うこと、などによりブランク問題を解決することができた。

本法による検出下限値は、純水を用いた場合、BPA: 0.00078 µg/L, *p*-CP: 0.0034 µg/L, 海水を用いた場合、BPA: 0.0019 µg/L, *p*-CP: 0.0021 µg/L と算出された。添加回収率は、純水を用いた場合、BPA: 97%, *p*-CP: 96% (サロゲート回収率 93%), 海水を用いた場合、BPA: 99%, *p*-CP: 100% (サロゲート回収率 88%), 河川水を用いた場合、BPA: 98%, *p*-CP: 99% (サロゲート回収率 81%) であった。

また、本法を用いて名古屋市内の河川水・海水中の BPA および *p*-CP の環境調査を行ったところ、全ての地点から BPA は検出され、市内広域にわたる汚染が確認された。*p*-CP は測定した 12 検体中 10 検体から MDL 以上の濃度が検出され、150 ng/L を超す高濃度地点も存在した。

また、BPA および *p*-CP の関係を見るために、両者の濃度比を求めたところ、0.02 から 0.7 と幅広く、BPA および *p*-CP はポリカーボネート樹脂の原料として共に使用されることもあるが、それぞれの物質の用途が多岐にわたっていることが示唆された。

5. 参考文献

- 1) 経済産業省：化学工業統計年報
- 2) Vom Saal, F. S., Barry G.T., Monica, M.M., Paola, P., Kristina, A.T., Susan, C.N., Minati, D.D., V.K. Ganjam, Stefano, P. and Wade, V.W.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2056-2061 (1997).
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所：既存化学物質毒性データベース
- 4) WANG Guangdi, MA Peng, ZHANG Qiang, LEWIS John, LACEY Michelle, FURUKAWA Yoko, O'REILLY S.E., MEAUX She:,iley, MCLACHLAN John, ZHANG Shaoyuan,: Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments, *J Environ Monit.*, 14 , 1353-1364, 2012.
- 5) LEE Ching-chang, JIANG Ling-ying, KUO Yi-ling, LEE Ching-chang, HSIEH Chia-yi, CHEN Colin S., TIEN Chien-jung,: The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems, *Chemosphere*, 91 , 904-911, 2013.
- 6) SANCHEZ-AVILA Juan, TAULER Roma, LACORTE Silvia,: Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk, *Environ Int.*, 46 , 50-62 , 2012.
- 7) SANTHI Veerasingam Armugam, MUSTAFA Ali Mohd,: Assessment of organochlorine pesticides and plasticisers in the Selangor River basin and possible pollution sources, *Environ Monit Assess*, 185, 1541-1554, 2013.
- 8) 征矢野清,: 日本沿岸域における内分泌かく乱化学物質汚染～海洋生物の繁殖に及ぼす影響～, *食品衛生学雑誌*, 54 , 223-226, 2013.
- 9) 西野貴裕, 山崎くみ子, 大庭智弘, 太田早苗, 佐々木裕子,: 水環境 東京都内の水環境における内分泌かく乱化学物質の汚染実態, *東京都環境科学研究所年報*, 2005, 151-157, 2005.
- 10) 古武家善成, 松村千里, 鶴川正寛, 藤原英隆, 北本寛明,: 兵庫県内河川における内分泌攪乱化学物質の分布特性および PRTR データから得られた環境排出量との関係, *兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要*, 1 , 60-66, 2005.

- 11) 小島節子, 渡辺正敏, 安藤良, 中瀬直喜,: 名古屋港水域における魚介類中のアルキルフェノール類,ビスフェノール A,ペンタクロロフェノールの蓄積, 名古屋市環境科学研究所報, 32 , 2002.
- 12) CAO Xu - Liang,: RECENT DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF BISPHENOL A IN FOOD AND BIOLOGICAL SAMPLES, *J Liq Chromatogr Relat Technol.*, 35, 2795-2829, 2012.
- 13) DORIVAL-GARCIA N., ZAFRA-GOMEZ A., NAVALON A., VILCHEZ J.I.: Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques, *J Chromatogr A.*, 1253 , 1-10, 2012.
- 14) Penalver, A. et al.: Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples, *J. Chromatogr. A*, 964, 153-160 (2002)
- 15) 中澤裕之, 伊藤里恵, 岩崎雄介, 中田彩子, 斉藤貢一,: 内分泌攪乱化学物質の微量分析と健康リスク評価への応用, *分析化学*, 56, 1005-1018, 2007.
- 16) 中村貞夫, 滝埜昌彦, 代島茂樹,: ガスクロマトグラフィー/負イオン化学イオン化質量分析法によるクロロフェノール類,ビスフェノール A 及び 17 β - エストラジオールの定量, *分析化学*, 49, 181-187, 2000.
- 17) 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) (1998).
- 18) 環境庁水質保全局水質管理課 : 要調査項目等調査マニュアル (水質, 底質, 水生生物) (1999)
- 19) WANG Bin, WAN Xing, ZHAO Shimin, WANG Yu, YU Fang, PAN Xuejun,: Analysis of Six Phenolic Endocrine Disrupting Chemicals in Surface Water and Sediment, *Chromatographia*, 74 , 297-306, 2011.
- 20) WANG Bin, HUANG Bin, JIN Wei, WANG Yu, ZHAO Shimin, PAN Xuejun,: Seasonal distribution, source investigation and vertical profile of phenolic endocrine disrupting compounds in Dianchi Lake, China, *J Environ Monit.*, 14, 1275-1282, 2012.
- 21) LIU Jingliang, WANG Renmin, HUANG Bin, LIN Chan, WANG Yu, PAN Xuejun,: Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species

- from Dianchi Lake, China, *Environ Pollut.*, 159, 2815-2822, 2011.
- 22) LIU Jingliang, PAN Xuejun, HUANG Bin, FANG Kai, WANG Yu, GAO Jianpei,; LIU Jingliang, PAN Xuejun, HUANG Bin, FANG Kai, WANG Yu, GAO Jianpei, *Int J Environ Anal Chem.*, 92 , 135-1149, 2012.
- 23) LOPEZ - DARIAS Jessica, PINO Veronica, AYALA Juan H., GONZALEZ Venerando, AFONSO Ana M.,; Micelle-mediated extractions using nonionic surfactant mixtures and HPLC-UV to determine endocrine-disrupting phenols in seawaters, *Anal Bioanal Chem*, 391, 735-744, 2008.
- 24) Webkis-plus (化学物質データベース)
- 25) Lide, D.R,(ed), CRC Handbook of Chemistry and Physics 84th Edition
- 26) Beilstein Handbook of Organic Chemistry
- 27) Maryadele J. O'Neil(Ed), The Merck Index 14th Edition
- 28) Lewis,R.J.,(Ed), Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th ed, John Wiley & Sons
- 29) PRTR 排出量等算出マニュアル 第3版
- 30) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)
- 31) 神奈川県化学物質安全情報提供システム (kis-net)

IV. ステロイドホルモン類の分析法開発および環境調査

IV-1 本研究の背景となる研究

IV-1.1 ステロイドホルモン類の一斉分析法の開発

1. はじめに

環境中にある化学物質が、生物の正常なホルモン作用をかく乱している可能性が指摘され、内分泌かく乱物質（環境ホルモン）として問題になっている。1997年1月にワシントンで開催されたスミソニアン会議の定義によれば、環境ホルモン物質とは女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモンの働きをかく乱する物質とされているが、これらの中で特に注目されているのがビスフェノール A、アルキルフェノール類などの女性ホルモン様物質である。また、人畜由来の天然女性ホルモン 17 β -エストラジオール(E2)やその代謝物のエストロン(E1)は、前述の女性ホルモン様化学物質と比較すると、女性ホルモン活性が非常に高いため、環境への影響も大きいと考えられている。

エストラジオール類など女性ホルモン様物質の環境調査結果は、国内外において多くの報告がある。国外においては、イギリスの河川水²⁾やカナダの下水処理場³⁾、ニュージーランドの廃棄物排水⁴⁾、韓国の河川水および下水処理水⁵⁾などについての報告があり、国内においても、東京^{6),7)}や大阪⁸⁾、名古屋⁹⁾⁻¹¹⁾などの各都市での調査結果が報告されている。

これまでに女性ホルモン様物質の測定は、GC/MS法によるものが多く報告されている¹²⁾⁻¹⁴⁾。しかし、GC/MS法による分析は、前処理時に、誘導体化やクリーンアップなどをする必要があり、操作が煩雑なものとなる¹⁵⁾。そこで今回は、LC/MSを使用して、より簡便な前処理で、定量精度の高い分析法を目指した。また、今回は、女性ホルモン以外に、それと反対の生理作用を示し、環境水中の濃度や挙動についてあまり調査されていない男性ホルモンについても注目した。男性ホルモンが女性ホルモンに拮抗作用を示し、水環境中でこれらの存在比のバランスが崩れると、水生生物の内分泌かく乱を引き起こすとの報告がある^{16),17)}。このような背景から、女性ホルモン類に加えて、男性ホルモン類に関しても、LC/MSを使用して同時分析する方法を開発し、さらに、その方法を用いて名古屋市内の下水処理水、河川水中の調査することを目的とし、研究を行った。

2. 方法

2.1 前処理方法

試料水 500mL をろ紙(GF/C)でろ過し、さらにろ紙をメタノール 5mL で洗浄してろ過水に合わせた。これをメタノール 10mL, 精製水 10mL でコンディショニングした EDS-1 カートリッジカラムに 20mL/min の速度で通水した。カートリッジカラムは精製水 10mL で洗浄し、50 分間吸引乾燥させて水分を除いた。次いで、酢酸エチル 6mL で溶出し、10mL 容試験管に受けた。窒素ガスを吹き付けて乾固させ、500 μ L の 20%アセトニトリル水溶液で再溶解し試料液とした。

2.2 測定条件

(LC 条件)

分離カラム : waters 製 X-Bridge (2.1mm \times 100mm \times 3.5 μ m)

移動相 : A : 0.01%NH₃/H₂O B : 0.01%NH₃/CH₃CN

0 \rightarrow 3min A:90 \rightarrow 60 B : 10 \rightarrow 40 liner gradient

3 \rightarrow 10min A:60 \rightarrow 20 B : 40 \rightarrow 80 liner gradient

10 \rightarrow 13min A:B=20:80

流量 : 0.2mL/min カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C 注入量 : 10 μ L

(MS 条件) (6 物質共通)

ソース温度 : 100 $^{\circ}$ C キャピラリー電圧 : 3.0 kV

コーンガス流量 : 50 L/hr デブールベーション流量 : 600 L/hr

Table 1 各物質の測定条件

	モニター イオン	cone電圧 (V)	collision電圧 (eV)	ESI(+/-)
エストロン(E1)	269>145	70	40	-
17 β -エストラジオール(E2)	271>145	60	40	-
エストリオール (E3)	287>171	60	35	-
エチニルエストラジオール(EE2)	295>145	50	40	-
テストステロン(T)	289>97	30	20	+
ジヒドロテストステロン(DHT)	291>81	25	25	+

3. 結果および考察

3.1 標準溶液の測定

混合標準溶液 (E1, E2, E3, EE2, DHT 0.1mg/L, T 1μg/L) のクロマトグラムを Fig.1 に示した。また、検量線を作成したところ、E1, E2, E3, EE2, DHT では 0.02~1.0mg/L, T では 0.2~10μg/L の範囲で 0.998 以上の良好な相関係数が得られた。

3.2 装置検出下限値(IDL)及び定量下限値(MQL)

標準物質を LC/MS を用いて 5 回繰り返し測定を行い、その標準偏差から装置検出下限値(IDL)を求めた⁸⁾。測定濃度は、E1, E2, E3, EE2, DHT が 0.02mg/L,

T が 0.2μg/L で行った。また、河川水に標準物質を IDL 値の 5 倍程度の濃度 (E1, E2, E3, EE2, DHT が 0.1mg/L, T が 1μg/L) になるように添加し、3.1 に従って前処理した。得られた試料を LC/MS を用いて測定を行い、その標準偏差から測定方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)を求めた⁸⁾。MDL の算出に際しては、一連の繰り返し分析を 5 回行った。

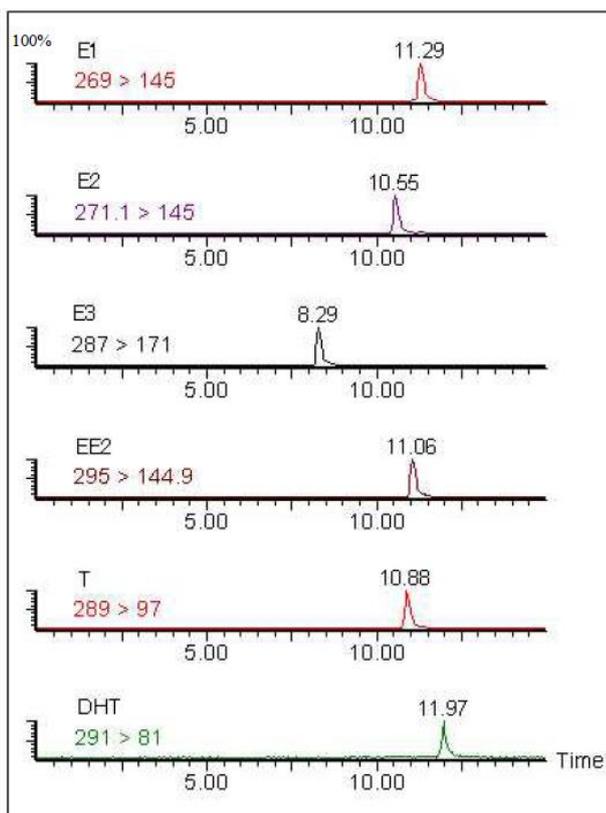


Fig.1 混合標準溶液のクロマトグラム

Table 2 各物質の検出下限値及び定量下限値

	IDL (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
E1	1.20	3.21	8.25
E2	0.49	5.79	14.90
E3	1.10	4.82	12.40
EE2	1.65	4.55	11.70
T	0.01	0.10	0.26
DHT	1.78	12.87	33.12

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma \times 2$$

$$MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma \times 2$$

$$MQL = \sigma \times 10$$

3.3 移動相の検討

各物質を測定するのに最適な条件を決めるため、移動相を変えて測定を行った。アセトニトリル-水系の移動相を用い、そのまま使用した場合、ギ酸を添加した場合、アンモニア水を添加した場合について検討を行った。

アセトニトリル-水のみを移動相を用いると、6物質ともに形状のよいピークが得られ、感度も良好だった。ギ酸を0.1%になるようにアセトニトリル・水の両方に添加し測定を行ったところ、ジヒドロテストステロンのみ感度が10倍以上向上した。逆に、エストラジオール類4物質についてはピークがほとんど検出されなくなった。一方で、同様にアンモニア水を0.01%になるように添加した場合は、エストラジオール類4物質およびテストステロンの感度が数倍～十数倍程度向上した。ジヒドロテストステロンについては、無添加の場合とほぼ同等の感度が得られた。これは、移動相を塩基性にすることによって、脱プロトン化分子イオンが生成されやすくなり、特に Negative モードで測定しているエストラジオール類の感度が向上したと考えられる。

Fig.2には、エストロン1mg/L、テストステロン10 μ g/Lの標準溶液を各移動相ごとに測定した際のクロマトグラムを示した。図中の数字はピーク強度を表しており、数値が大きいほど感度よく測定できたといえる。

以上の検討により、移動相は0.01%アンモニア水含有アセトニトリル-水を使用することとした。

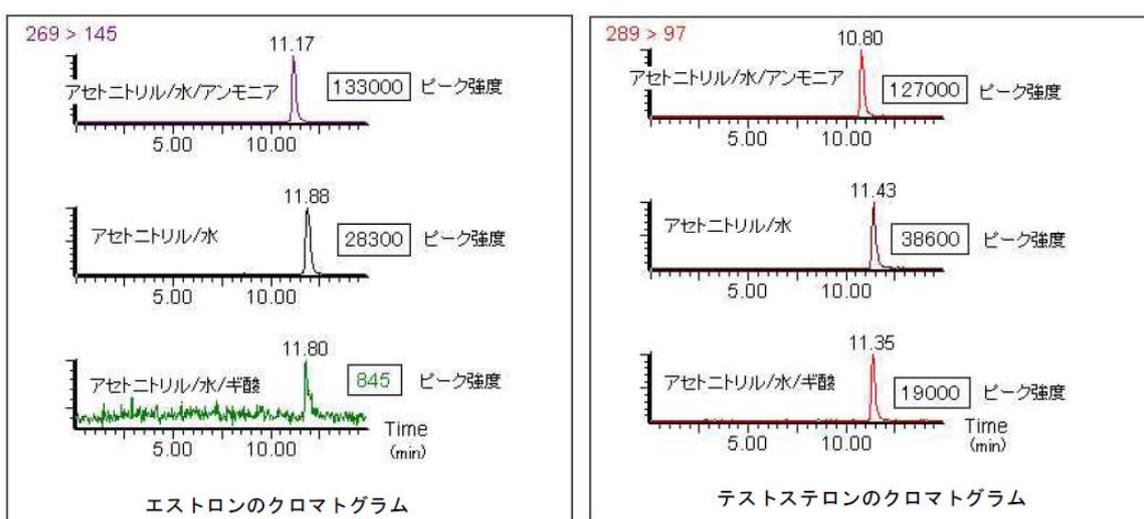


Fig.2 移動相の検討結果

3.4 前処理方法の検討

3.4.1 固相乾燥時間について

固相抽出後、溶出させる前に、固相カートリッジを吸引乾燥させる。その乾燥時間の最適化を検討し、Fig.3 に示した。

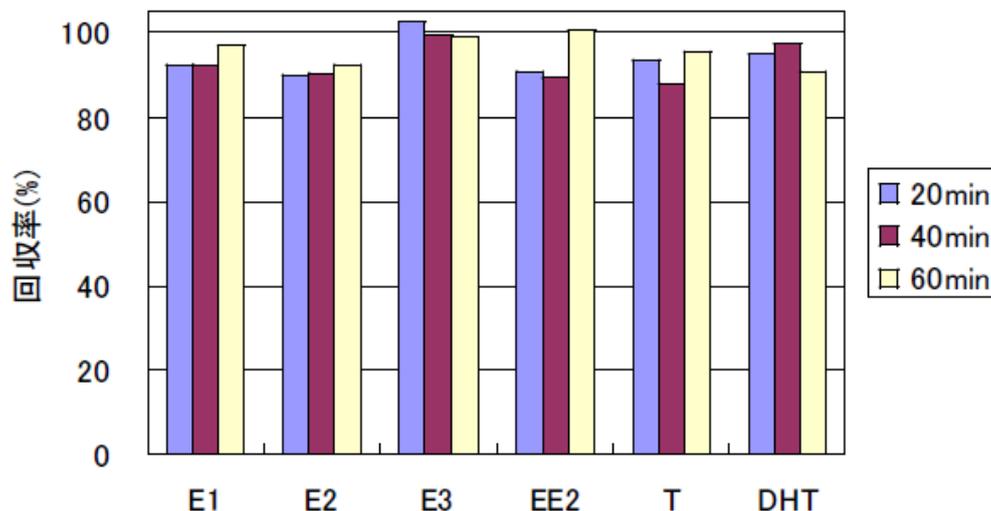


Fig.3 乾燥時間による回収率の違い

ほとんどの物質において乾燥時間を長めにとった方が回収率が高い結果が得られた。一方で、ジヒドロテストステロンはあまり長く乾燥させない方がよい結果であった。以上より、固相の乾燥時間は 50 分にすることとした。

3.4.2 溶出溶媒について

平成 15 年度の要調査項目等調査マニュアルによると、エストラジオール類の固相からの溶出は、E1, E2, EE2 は酢酸エチル、E3 は 5mM トリエチルアミン/メタノールで行っているため、E3 の溶出溶媒について検討を行った。

まず始めに酢酸エチル 6mL(3+3mL)で、さらに続いて 5mM トリエチルアミン/メタノール 6mL で溶出した。

E3 を含むエストラジオール類 4 物質、テストステロン類 2 物質ともに、はじめの酢酸エチルによる溶出で 93%以上が回収されていることがわかった。前処理の手間、使用する試薬量のことを考えると、酢酸エチルのみの溶出で十分であると考えられる。

3.4.3 クリーンアップについて

今回の分析では、できるだけ簡便な測定で操作ロスを少なくするために、クリーンアップの必要性についても検討を行った。

クリーンアップは、固相抽出後、フロリジルカラムに通すという方法で行った。河川水に混合標準溶液（E1, E2, E3, EE2, DHT 0.5mg/L, T 5 μ g/L）を添加した試料中のテストステロンのクロマトグラムを Fig.4 に示した。クリーンアップをすることにより、大部分の夾雑物を取り除かれ、クロマトグラムのベースラインが下がり、S/N 値も大きくなった。しかし、クリーンアップをしていない場合も測定対象物質のピークを妨害するようなピークは見られず、ほぼ同様な測定結果が得られた。エストラジオール類についても同様の結果が得られ、名古屋市内河川であればクリーンアップなしの測定が可能であると考え、今回は省略することとした。

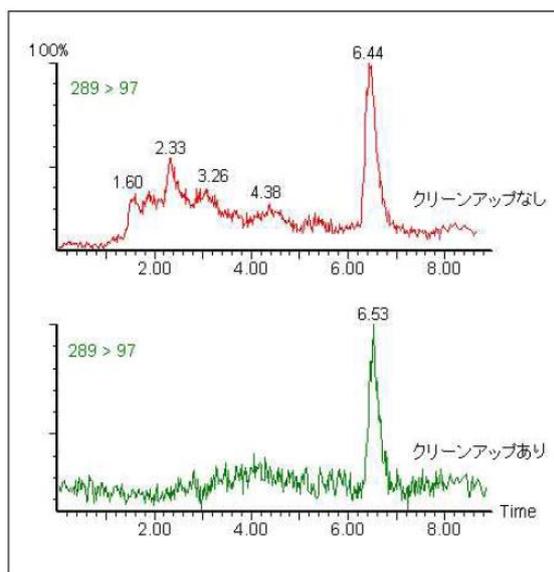


Fig.4 河川試料中テストステロンのクロマトグラム

3.5 添加回収率

これまでに報告されている毒性情報^{18), 19)}から算出された要求感度²⁰⁾を満たすためには、今回の分析では、最低でも 1000 倍以上の濃縮をする必要がある。しかし、それ以上濃縮すると河川水試料において、マトリックスの影響を強く受けるため、今回の分析では 1000 倍濃縮することとした。河川水に標準物質を添加して測定した結果を Fig.5 に示した。

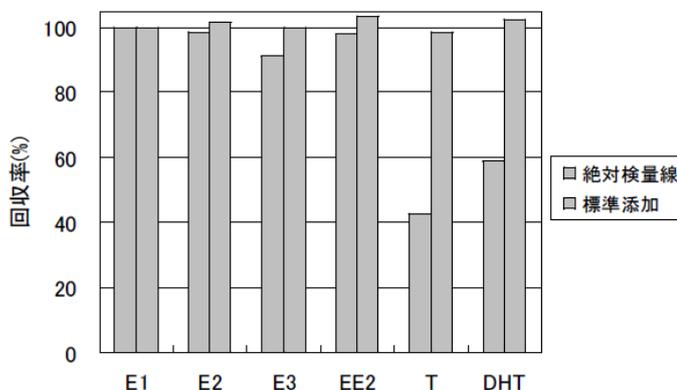


Fig.5 定量方法による回収率の違い

絶対検量線による測定では、試料中の夾雑物の影響を受けて、各物質の感度が減少した。エストラジオール類ではその影響が無視できるほど小さいが、テストステロン類では、標準溶液を測定したときの50～70%程度に感度が減少した。

回収率の低下は、マトリックスの影響によるイオン化率の低下またはモニターイオン強度の低下が推察され、サロゲートで回収率の補正を行い測定するという報告がある¹⁰⁾。

今回は、高価なサロゲートを使用せず、またクリーンアップも省略していることから、マトリックスの影響を避けるため、標準添加法による測定で回収率を求めた。その結果、エストラジオール類、テストステロン類ともに満足な回収率が得られた。よって、エストラジオール類、テストステロン類の測定は標準添加法で測定することとした。

3.6 名古屋市内の河川水、下水処理水の測定結果

名古屋市内の下水処理水、河川水を上記の標準添加法により実際に測定した。

下水処理水からは、エストロン、エストラジオール、テストステロンの3物質が検出されたが、河川水からはいずれの物質も検出されなかった。下水処理水から検出された濃度は、エストロンが10～30ng/L、エストラジオールが1.4～10ng/Lで、テストステロンは検出下限値付近であった。

4. まとめ・今後の課題

LC/MS/MSによるステロイドホルモンの分析法を検討して以下の結果を得た。

1)女性ホルモン物質(E1, E2, E3, EE2), 男性ホルモン物質(T, DHT)をLC/MS/MSにより同時に分析することが出来た。2)EDS-1による固相抽出によりE1, E2, E3, EE2, T, DHTを良好な回収率で抽出した。3)固相抽出後クリーンアップ操作なしで河川水, 下水処理水の測定が可能であった。4)高価なサロゲートを使用せずに, 標準添加法による測定を行い, 満足な回収率を得ることが出来た。5)一斉分析によって女性ホルモン及び男性ホルモンの両方を同時に検出することができ, 名古屋市内環境試料において, 女性ホルモンだけでなく, 男性ホルモンも検出された。今回は, 実試料の分析を下水処理水3地点, 市内河川水3地点の合計6地点しか行うことが出来なかった。今後は, 名古屋市内河川をより広範囲に地点数も増やして分析を行うことにより, 女性ホルモン物質, 男性ホルモン物質, さらにはこれらの代謝物質および抱合体についても分布を調査していきたいと考えている。また, 各物質のサロゲートを使用した分析方法についても併せて考察していきたいと考えている。

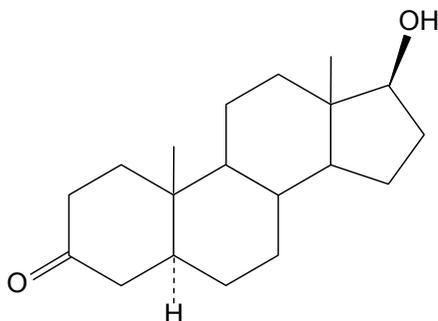
IV-1.2 ジヒドロテストステロン(Dihydrotestosterone, DHT)の高感度分析法開発

1. はじめに

IV-1.1 に記述した通り，環境ホルモン物質への関心が高まるとともに，環境中に存在している女性ホルモンおよび男性ホルモンの濃度を正確に把握しておくことは非常に重要なことである。IV-1.1 では女性ホルモンおよび男性ホルモンを同時に分析する方法について報告したが，この分析法では，すべての物質について高感度で分析を行うことができなかった。特に男性ホルモンの 5 α ジヒドロテストステロン(DHT)は，同じく主要な男性ホルモンであるテストステロンと比較して，感度が 100 分の 1 程度であった。DHT はテストステロンと比較して，生理活性がより強く²¹⁾，高感度での分析が必要である。

そこで，テストステロンと同程度の検出下限値 0.1ng/L の測定が可能となるように，DHT に特化した分析法の開発を行うこととした。

2. DHT の物性・用途



分子量	蒸気圧 (kPa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow
290.44	1.493E-6	41.97	3.07

毒性情報 : ラット (35 日間 TDLo) 17.5 mg/kg

用途 : 男性ホルモン，医薬品原料.

3. 方法

3.1 前処理方法

試料 200 mL に 100 ng/mL のサロゲート溶液を 50 μ L 添加し，10 mL の LC/MS 用メタノールと 10 mL の精製水でコンディショニングした固相カートリッジに 20 mL/min で通水し抽出した。通水終了後の固相カートリッジに精製水 10 mL を通して洗浄した後，30 分間通気乾燥させ，十分に水分を除去した。次いで 3 mL のメタノール，3 mL の酢酸エチルの順で

溶出し、10 mL 容 試験管に受けた。窒素ガスを吹き付けて乾固させ、0.5 mL の 40%メタノール水溶液で再溶解し、試料液とした。

3.2 測定条件等

〔LC/MS 条件〕

LC/MS 機種名 : Waters 社製 2695/QuattroMicro API

LC 機種 : Waters 2695

カラム : 資生堂 MG-II C-18 (2.1 mm×100 mm×3 μm)

移動相 : A : H₂O B : CH₃OH

0→1 min A:B=60 : 40

1→15 min A:60→10 B : 40→90

15→20 min A:B=10 : 90

20→27 min A:B=60 : 40

流量 : 0.2 mL/min カラム温度 : 45 °C 注入量 : 10 μL

(MS)

機種 : Waters QuattroMicro API

コーン電圧 : 20 V コリジョン電圧 : 30 eV キャピラリー電圧 : 3.80 kV

コーンガス流量 : 50 L/min. デソルベーションガス流量 : N₂(600 L/min)

ソース温度 : 115 °C デソルベーション温度 : 500 °C

イオン化法 : ESI (+) SRM

モニターイオン: 定量用 291>255 確認用 291>159

モニターイオン (内標準) : 定量用 295>259 確認用 295>163

10.23 DHT 1ppm (MG-II column)

13-Dec-2007

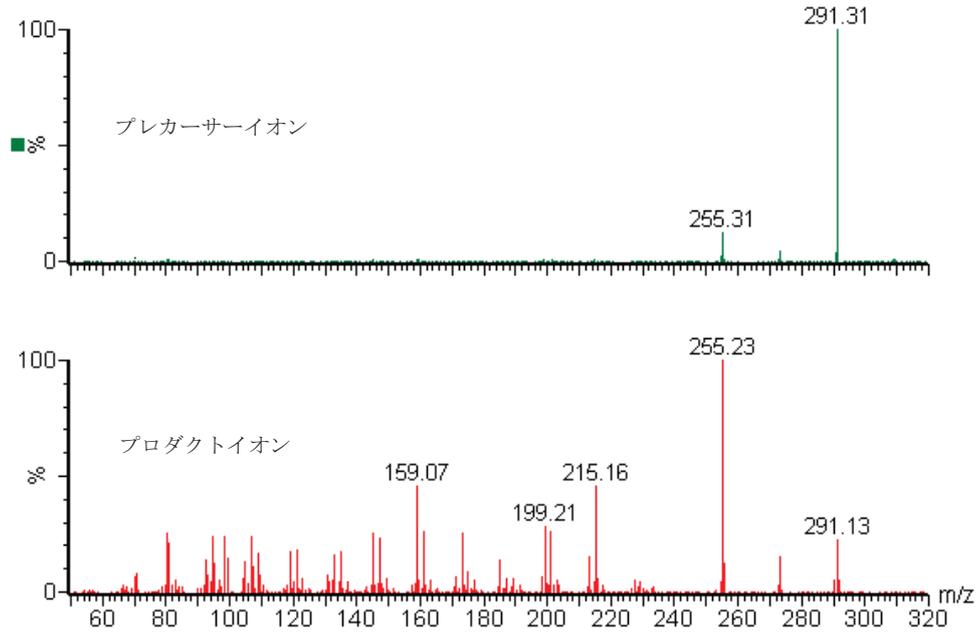


Fig.6 ジヒドロテストステロンのマススペクトル

[検量線]

検量線は、0.1～10 ng/mL の範囲において十分な直線性があった。

検量線を Fig. 7 に示す。

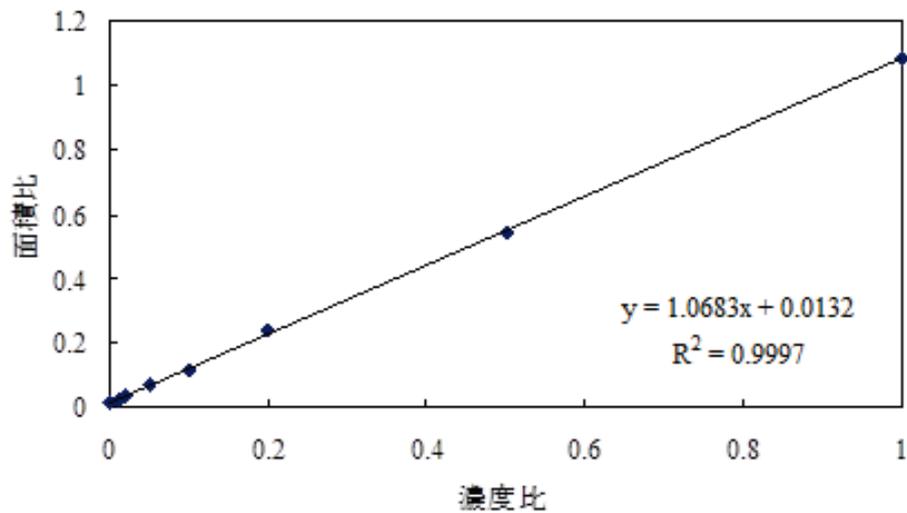


Fig.7 ジヒドロテストステロンの検量線

4. 結果および考察

4.1 検出下限値および定量下限値

本分析に用いた LC/MS (Waters QuattroMicro API) の装置検出下限値 (IDL) を Table 3 に、本測定方法における検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) を Table 4 に示す。

Table 3 装置検出下限(IDL)の算出

物質名	ジヒドロテストステロン
試料量(mL)	200
最終液量(mL)	0.5
注入濃度(ng/mL)	0.1
装置注入量(μL)	10
結果1(ng/mL)	0.11
結果2(ng/mL)	0.10
結果3(ng/mL)	0.09
結果4(ng/mL)	0.10
結果5(ng/mL)	0.10
結果6(ng/mL)	0.09
結果7(ng/mL)	0.11
平均値(ng/mL)	0.100
標準偏差(ng/mL)	0.0087
IDL(ng/mL)	0.034
IDL試料換算値(ng/L)	0.085
S/N	9.0
CV(%)	8.7
$IDL=t(n-1,0.05)*2*\sigma_{n-1}$	

Table 4 測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限(MQL)の算出

物質名	ジヒドロテストステロン
試料	海水
試料量(L)	0.2
標準添加量(ng)	0.5
試料換算濃度(ng/L)	2.5
最終液量(mL)	0.5
注入液濃度(ng/mL)	1
装置注入量(μL)	10
操作ブランク平均(ng/L)	0
無添加平均(ng/L)	0
結果1(ng/L)	2.548
結果2(ng/L)	2.490
結果3(ng/L)	2.488
結果4(ng/L)	2.509
結果5(ng/L)	2.470
結果6(ng/L)	2.486
結果7(ng/L)	2.508
平均値(ng/L)	2.500
標準偏差(ng/L)	0.0251
MDL(ng/L)	0.098
MQL(ng/L)	0.25
S/N	62
CV(%)	1.01
$MDL=t(n-1,0.05)*2*\sigma_{n-1}$	
$MQL=10*\sigma_{n-1}$	

4.2 添加回収実験結果

水試料への標準物質添加回収実験結果を Table.5 に示す。精製水・河川水・海水ともに 60～80%程度の回収率であった。原因として、試料濃縮による LC/MS 測定時のイオン化抑制など幾つかの可能性が考えられるが、明かではない。しかし、相対標準偏差が小さいことから、内標準物質による補正を行うことで、このままの分析方法でも定量的評価は可能と判断した。定量結果については、すべて内標準物質による補正を行った値により評価を行った。

Table.5 添加回収実験結果

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	回収率 (%)	変動係数 (%)	繰り返し n
精製水	200	無添加	-	-	1
	200	5	79	7.1	3
河川水	200	無添加	-	-	1
	200	5	67	8.7	3
海水	200	無添加	-	-	1
	200	5	87	5.9	3

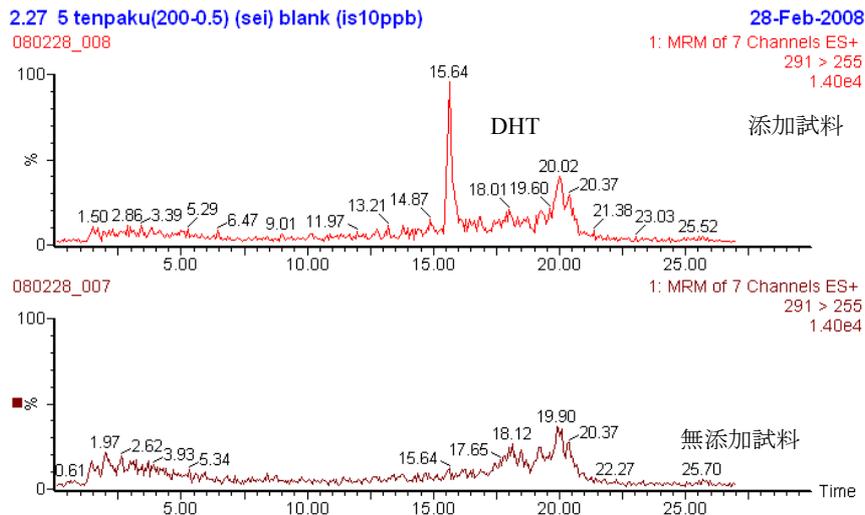


Fig.8 河川水への添加回収試験結果

4.3 分解スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を Table.6 に示す. 暗所における保存であれば, pH が 5, 7, 9 いずれの場合においても, 7 日後の残存率は 90% 以上であった. また, 明所における保存であっても, pH 7 の場合, 7 日後の残存率は 90% 以上であった.

Table.6 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度(ng/mL)	1時間後の残存率(%)	5日後の残存率(%)	
			暗所	明所
5	10	92.2	92.0	-
7	10	94.6	98.7	96.8
9	10	98.1	96.6	-

4.4 固相抽出検討結果

前処理で試料を濃縮するために使用する固相の検討を行った.

500 mL の精製水に 5 ng のジヒドロテストステロンを添加し, メタノール 5 mL と精製水 5 mL でコンディショニングした各種固相へ通液した. 30 分の通気乾燥の後, メタノール 8 mL で溶出し, N₂ パージにより乾固させ, 40%メタノール水溶液 500 μ L で再溶解して試験溶液とした. Fig.9 に, 各種固相別の回収率を示す.

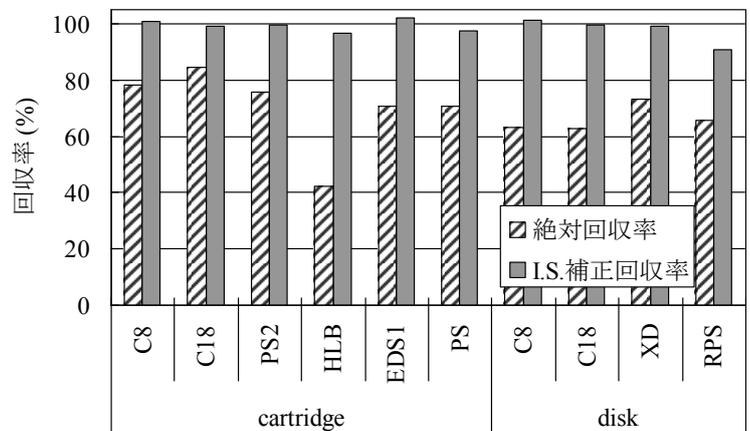


Fig.9 固相ごとの回収率の違い

ほとんどの固相で絶対回収率70%前後の結果が得られた。最も回収率がよかったのはC18カートリッジを使用した場合であった。しかし、河川水や海水を前処理した場合、他の固相に比べて、多くのマトリックスを溶出してしまう欠点がある。それを避けるため、今回はEDS1カートリッジを使用することとした。またEDS1を用いた場合、メタノール溶出後、酢酸エチルでさらに溶出することで回収率が数%から10%程度向上したので、溶出溶媒にはメタノール、酢酸エチルの2種類を用いることとした。

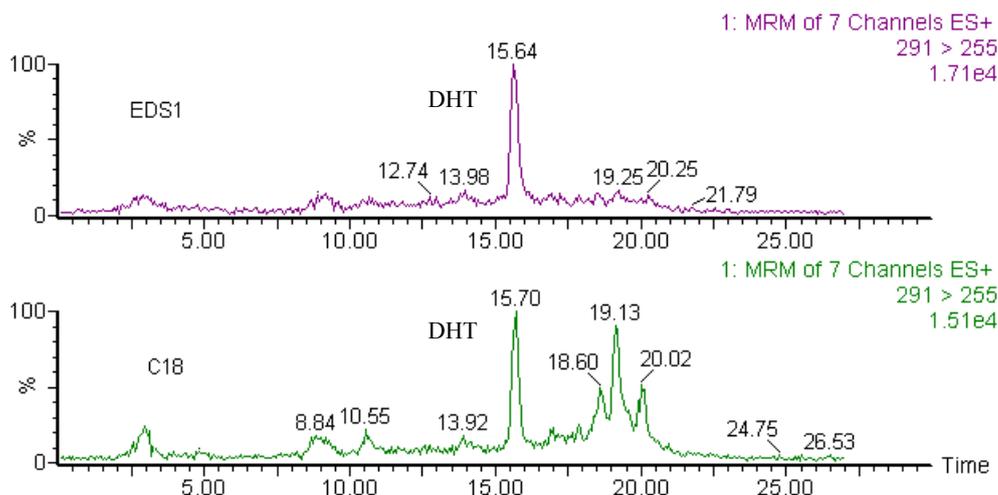


Fig.10 河川水を前処理した場合の2種の固相(上:EDS1,下:C18)のクロマトグラムの違い

4.5 クリーンアップ検討結果

蒸留水や海水、山村部の河川水などは測定の妨害となるマトリックスの存在が少なく、クリーンアップをすることなく測定をすることができるが、一方、都市河川水などを濃縮すると、試験溶液中にはマトリックスが存在し、測定の妨害になる。そのため、固相抽出・溶出・濃縮・乾固後に行うクリーンアップ方法について検討した。

n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1の混合溶媒1 mLに、5 ngのジヒドロテストステロンを添加し、試験溶液とした。n-ヘキサン5 mLでコンディショニングしたフロリジルカートリッジ (SepPak Plus Florisil Cartridge) に負荷し、n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1の混合溶媒10 mLで洗浄した。その後、アセトン/ジクロロメタンの混合溶媒を混合割合を変えながら(アセトン割合0~20%)それぞれ5 mLで分画を行い6回溶出した(F1~F6)。窒素ガスを吹き付けて乾固させ、40%メタノール水溶液500 μ Lで再溶解したものを測定した。なお、試験溶液負荷後、n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1の混合溶媒10 mLでカートリッジを洗浄しても、ジヒドロテストステロンは溶出してこなかった。

検討結果を Fig.11 に示す. 溶出溶媒にジクロロメタンのみを使用すると, F1 から F6 まで 30 mL 流しても回収率が 70%程度にしかならず, 全てを溶出することは出来なかった. 一方で, 溶出溶媒にアセトン/ジクロロメタンの混合溶媒を用いると, F1, F2 の 10 mL で 90%程度溶出することがわかった. ただし, アセトンの割合を 20%にした場合, 溶出は速いが, 同時に妨害物質まで溶出してしまう可能性が高い.

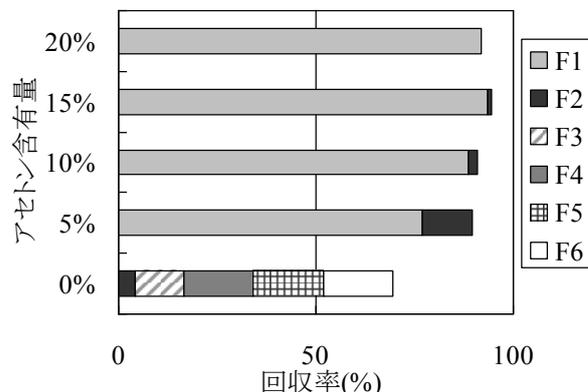


Fig.11 クリーンアップ方法の検討結果

検討の結果から, n-ヘキサン:ジクロロメタン=3:1 の混合溶媒 10 mL で洗浄した後, 10% アセトン/ジクロロメタンの混合溶媒 10 mL で溶出することとした.

名古屋市内河川水試料に対して, 固相抽出・溶出・濃縮・乾固後に上記条件でクリーンアップを行った結果を Fig.12 に示す. クリーンアップをすることにより, 測定溶液中のマトリックスが減少し, クリーンアップしない場合と比較して, 回収率が 60%程度から 75-80%程度へ向上した.

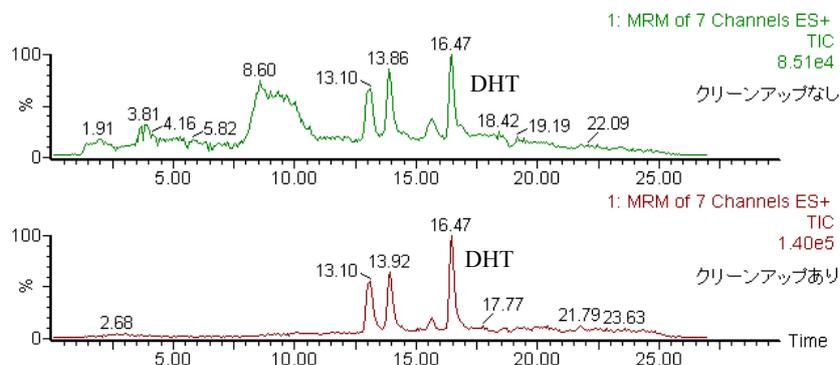


Fig.12 クリーンアップの有無によるクロマトグラムの違い

5. 環境試料測定結果

名古屋市河川および名古屋港海水を測定した結果を Fig.13 に示す。いずれの試料もジヒドロテストステロンは検出されなかった。他にも数地点において測定を行ったが、いずれも不検出であった。

本法により、水試料中ジヒドロテストステロンの 0.1 ng/L オーダーの検出が可能であり、30 ng/L オーダーの定量が可能である。

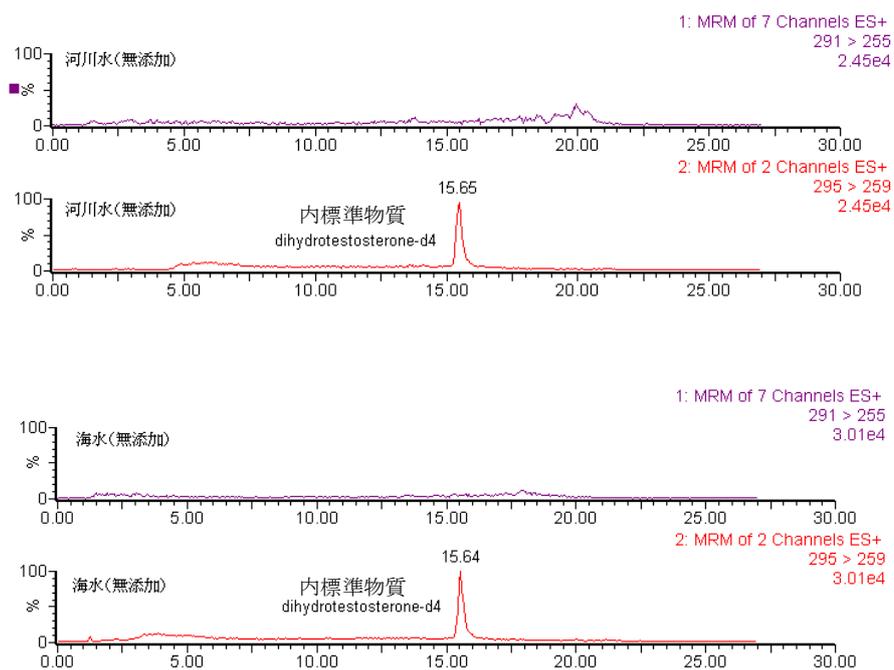


Fig.13 環境試料測定時のクロマトグラム

IV-2 ジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES) の分析法開発および環境調査

1. はじめに

IV-1 に記述した研究結果を基に、本研究では、合成型のステロイドホルモンの分析法開発および環境調査を行った。対象物質として、合成型女性ホルモンであるジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES)に注目した。

DES は、かつて流産防止剤などに用いられてきた合成型女性ホルモン薬剤である。1970 年代以降、生殖器異常などの報告が相次ぎ、ヒトへの影響が懸念されるようになった。

ジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES)は、かつて流産防止剤などに用いられてきた合成型女性ホルモンの薬剤で、IARC 発ガン性リスクの Group 1 に分類されている。1938 年にイギリスで合成され、女性ホルモン様作用が発見されて以降、切迫流産防止剤としてだけでなく、更年期障害・老人性膣炎・不妊症に対しても広く用いられてきた²³⁾。アメリカにおいては、1938 年から 1971 年にかけて 500-1000 万人に処方されたとも言われている。1970 年代以降、胎児期に DES の暴露を受けた女性に膣腺ガンや子宮形成不全などの女性器障害が発生²⁴⁾、同男性についても生殖器異常の確率が高い²⁵⁾との報告があり、DES 使用によるヒトへの影響が懸念されるようになった^{26)~28)}。その後、アメリカ食品医薬品局(FDA)は 1971 年に妊婦に対する DES の使用を禁止し、厚生省(現厚生労働省)は同年 12 月、薬務局長名で、「DES またはその誘導体を含む製剤(外用剤除く)は、胎児に作用し、出生女児が思春期前後に膣ガンが発生するとして、使用中の安全性を確保するため、妊娠中は使用しないこと、また、効能の事項に『流産、習慣性流産』など妊娠に使用されるおそれのある表示があれば削除するように」という通知を出した。

DES のように女性ホルモン様作用を持つステロイドホルモン類は、極微量であっても生物に影響を与える可能性が高いとされ²⁹⁾、環境中における DES の高感度分析法が求められる。日本においては、DES の環境基準値は設定されていないが、厚生労働省が定める残留農薬等ポジティブリスト制度では、食品中の DES は不検出であること、と設定されており、その検出下限値は 0.0005 ppm (500 ng/L)と定められている。また、環境省は、既報の毒性情報に基づいて³⁰⁾、環境水中の DES をより高感度で測定すべきとの方針を出し、検出下限値

を 0.01ng/L と設定している。

これまで、GC/MS や LC/MS により、環境中における種々のステロイドホルモン類の測定がなされ、ng/L～μg/L レベルでの検出が報告されている^{31),32)}。DES については、環境水や下水処理水から、溶媒抽出法や C18 などによる固相抽出法^{33),34)}により、検出下限値数～数百 ng/L レベルの報告がなされている^{33)~37)}が、環境省の方針に対応する検出下限値を満足するには、試料濃縮率や精製方法の改良が求められる。

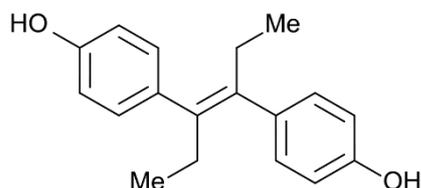
本研究では、試料のクリーンアップ方法、大量試料導入方法を検討し、環境水中の DES の高感度分析方法(検出下限値 0.01ng/L)を開発し、環境を調査した。ここでは、開発した分析方法の要素技術の検討結果および、名古屋市内で行った環境調査結果について報告する。

2. 実験

2.1 DES の構造および物性

DES の分析法開発をする際に必要な物質の情報（構造、分子式や物性など）を以下に示す。

【対象物質の構造】



CAS 番号 : 56-53-1

分子式 : C₁₈H₂₀O₂

【物理化学的性状】

分子量	融点(°C)	水溶解度 (mg/L)25°C	log P _{ow}
268.36	170.5	12	5.07

SRC PhysProp Database による

【毒性、用途等】

毒性情報	: マウス(経口, TD, 53 週)	13 mg/kg
	: モルモット(経口, TDLo, 12 週)	144 mg/kg
	: ラット(腹腔内注射, LD ₅₀)	34 mg/kg

： 人(経口, TD_{Lo}, 50 週) 0.26 mg/kg

用途 : 合成女性ホルモン(かつては流産防止剤として使用されていた)

神奈川県化学物質安全情報システムによるデータベース

2.2 試薬

DES(純度 98+%, HPLC 用), アセトン(残留農薬試験用), ヘキサン(残留農薬試験用), 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液(LC/MS 用)は和光純薬(大阪)製, DES-*d*₈ (純度 98.7%)は CDN isotopes 社製(Quebec, Canada)を使用した。メタノール(LC/MS 用)は関東化学(東京)製を使用した。

DES 標準原液, 標準液は, DES をメタノールで希釈して作製した。DES-*d*₈ も同様にしてメタノールで希釈して内標準液を作製した。内標準液は, 各検量線用標準液および試験液中に 10.0 ng/mL になるように添加した。

2.3 器具

水質試料からの抽出には, シクロヘキシルシリカカートリッジ (InertSep CH 500 mg, GL Sciences 社, 東京), 試験液のクリーンアップにはグラファイトカーボン/強陰イオン交換/極性相互作用+陰イオン交換混合固相(InertSep GC/SAX/PSA 500 mg/500 mg/500 mg, GL Sciences 社, 東京)を使用し, 固相への通液はコンセンレーター(Waters 社, Milford, MA, USA)により行った。濃縮操作は窒素吹付装置を用いて行った。

3. 結果および考察

3.1 検出条件

3.1.1 カラム分離

DES は *cis* 体 *trans* 体の異性体を持ち, 通常の C₁₈ カラムでは 2 本のピークに分離された(Fig.1)。後出のピークは小さく, 試料中濃度が低いとピークが認識されなくなり, 定量の感度と精度が低下するため, 異性体を分離せず, ピークが 1 本で分析される Shield RP18 カラムを使用した。

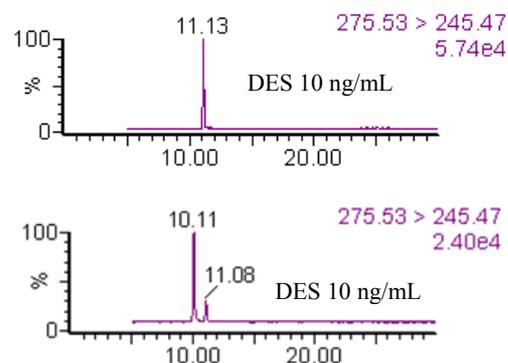


Fig. 1. Difference in separation of DES isomers between two types of HPLC columns
upper: XBridge TM Shield RP18,
lower: a conventional C₁₈ column

3.1.2 装置条件

LC-MS 測定は Alliance2695/ Micromass Quattro micro API (Waters 社, Milford, MA, USA)を用い、定量は ESI-Negative-SRM モードにより行った。測定条件を以下に示す。

[LC 条件]

LC : Alliance2695

カラム : XBridge™ Shield RP18 3.5 μm 2.1 × 100 mm (Waters 社)

移動相 : A : 2 m mol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール

0 ~ 5 min A : 70 → 20 B : 30 → 80 linear gradient

5 ~ 20 min A : 20 B : 80

20 ~ 22 min A : 20 → 70 B : 80 → 30 linear gradient

22 ~ 30 min A : 70 B : 30

流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40 °C, 注入量: 100 μL

[MS 条件]

MS : Micromass Quattro micro API

Cone voltage : 40 V, Collision Energy: 30 eV

Capillary voltage : 3 kV, Source Temp. : 120 °C, Desolvation Temp. : 350 °C

Desolvation Gas : 700 L/hr, Cone Gas : 50 L/hr

イオン化法 : ESI-Negative-SRM

モニターイオン : DES 267.45 → 237.41 , DES-*d*₈ 275.43 → 245.47

3.1.3 標準物質のクロマトグラム, マススペクトル, 検量線および装置検出下限

標準物質のクロマトグラムおよびマススペクトルを Fig.2, 3 に示した。

検量線は, 0.0500 ng/mL から 50.0 ng/mL の濃度範囲において相関係数 0.9997 で十分な直線性を示した。検量線を Fig.4 に, 検量線作成用データを Table 1 に示す。

「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁸⁾に記載される方法に従って, 装置検出下限(IDL)を求めた。結果を Table. 2 に示す。また, 測定時の代表的なクロマトグラムを Fig.5 に示す。

[標準物質のクロマトグラム]

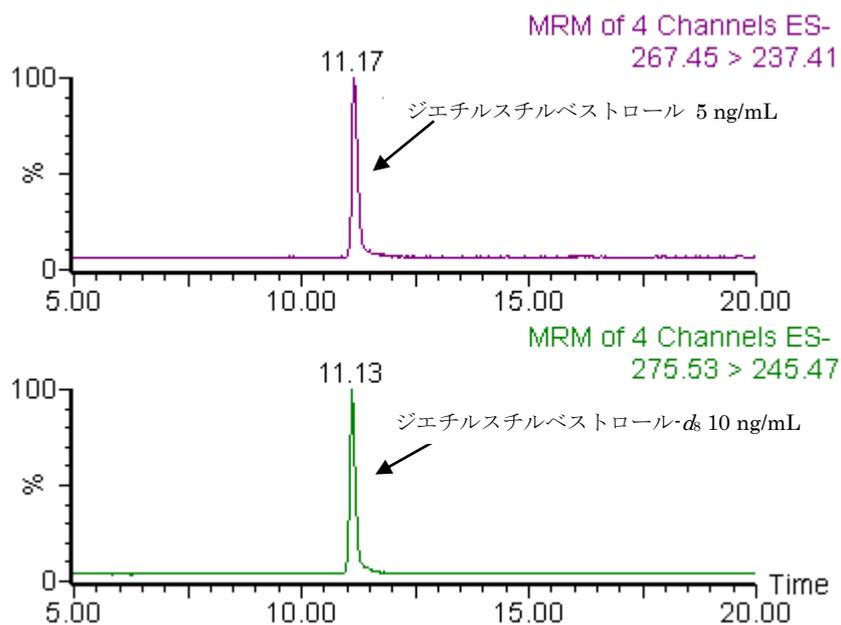


Fig.2 標準物質のクロマトグラム

[標準物質のマスペクトル]

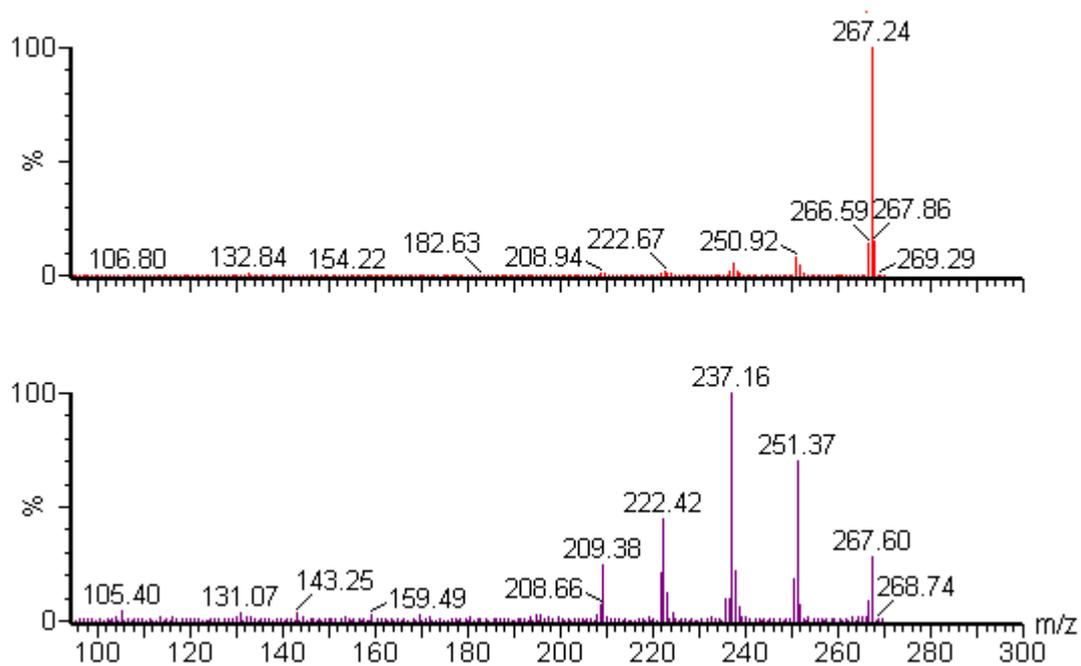


Fig.3 DES のプレカーサーイオンと $m/z:267$ のプロダトイオンのマスペクトル

[検量線]

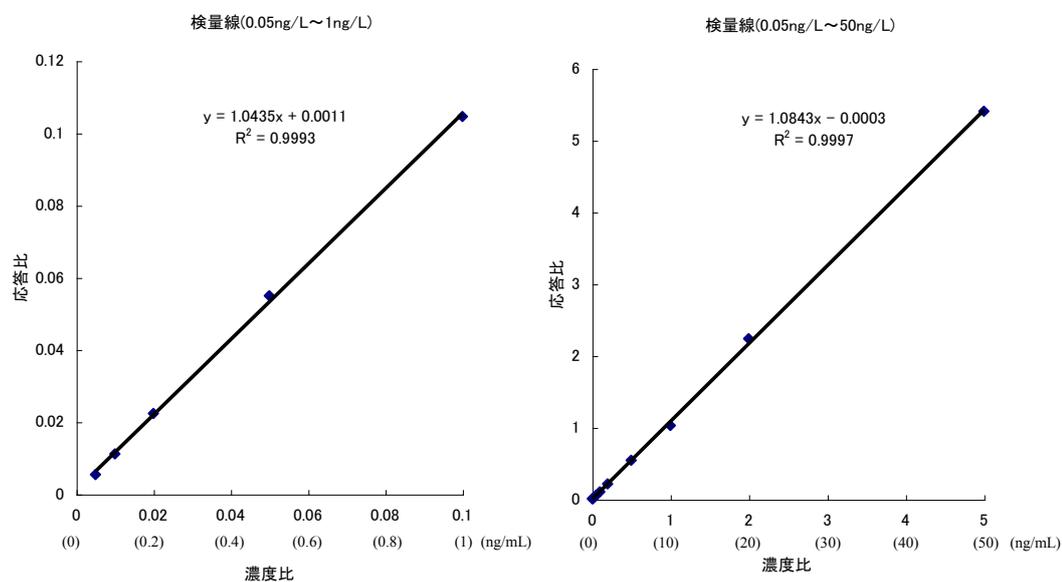


Fig.4 検量線 (括弧内の数値は標準溶液濃度。内標準物質濃度は 10 ng/L)

Table 1 検量線作成用データ

標準試料濃度(C _s) (ng/mL)	応答値		応答比 (A _s /(A _{ss}))
	調査物質(A _s)	内標準物質 (A _{ss})	
	<i>m/z</i> =267.24	<i>m/z</i> =275.43	
0.05	56	10455	0.0054
0.1	130	11275	0.0115
0.2	242	10867	0.0223
0.5	605	11003	0.0550
1	1201	11501	0.1044
2	2370	10996	0.2155
5	6058	11114	0.5451
10	11319	10999	1.0291
20	24045	10281	2.3388
50	54443	9971	5.4601

Table 2 IDL の算出

物質名	ジエチルステルベストール
試料量(L)	2.0
最終液量(mL)	0.5
注入液濃度 (ng/mL)	0.05
装置注入量 (μL)	100.0
結果 1 (ng/mL)	0.0529
結果 2 (ng/mL)	0.0555
結果 3 (ng/mL)	0.0511
結果 4 (ng/mL)	0.0541
結果 5 (ng/mL)	0.0547
結果 6 (ng/mL)	0.0540
結果 7 (ng/mL)	0.0562
結果 8 (ng/mL)	0.0521
平均値	0.05382
標準偏差	0.0017
IDL(ng/mL) *	0.0065
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.0016
S/N 比	10.6
CV%	3.18

* IDL=t (n-1,0.05) × 標準偏差 × 2

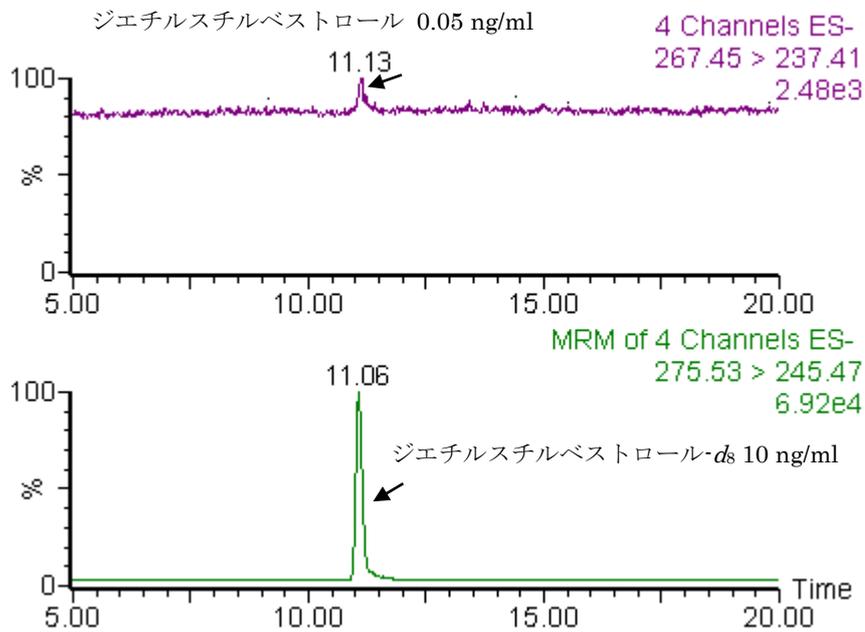


Fig.5 IDL 算出時のクロマトグラム

3.2 分析法に関する要素技術とその評価

3.2.1 固相抽出方法の検討

河川水 1 L に DES を 50 ng 添加した試料液を，後述の 3.3.1 に示す方法により，以下 7 種類の固相を用いて抽出した。①Oasis HLB-Plus(Waters 社製)，②Sep-Pak-Plus PS-2(Waters 社製)，③Aquisis-PLS-3-Jr 230mg (GL Sciences 社製)，④Autoprep EDS-1 250mg(昭和電工社製)，⑤InertSep CH 500mg (GL Sciences 社製)，⑥InertSep mini RP-1 230mg(GL Sciences 社製)，⑦Empore disk SDB-RPS 47mm (3M 社製)。上記固相のうち，①~⑤については，抽出後，メタノール 5 mL で溶出して，その 20 μ L を LC/MS へ注入した。結果の概要を Fig.6 に示す。回収率を算出したところ 62.1%~73.2%で，大差はなかった。また，上記①~⑦の溶出液に対して，3.2.3 に記述するクリーンアップ操作を行ったところ 10%程度の回収率の向上が見られた。

以上の結果から，いずれの固相も回収率に大差はないが，回収率が最も高かった⑤ InertSep CH 500 mg を選択した。尚，2L の試料を通水する際に破過することが懸念されたため，固相を 2 連にして同様に操作を行ったが，1 連のみで破過はなかった。

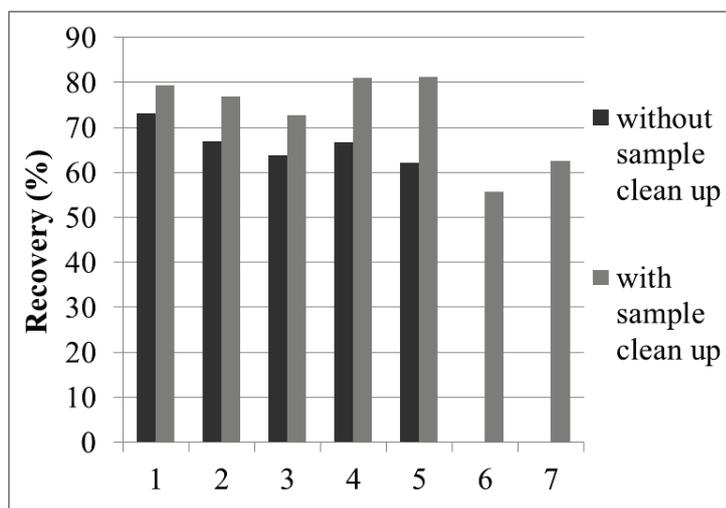


Fig. 6. Recoveries of DES from river water by using seven SPE cartridges.

1. Oasis HLB-Plus (Waters) ,2. Sep-Pak-Plus PS-2(Waters),
3. Aquisis-PLS-3-Jr 230mg (GL Sciences),4. Autoprep EDS-1 250mg (Showa-denko),
5. InertSep CH 500mg (GL Sciences), 6. InertSep mini RP-1 230mg(GL Sciences),
7. Empore disk SDB-RPS 47mm (3M)

3.2.2 試料濃縮率及び LC/MS への注入量の違いによる回収率への影響

精製水及び河川水、海水 2L に DES を 50 ng 添加した試料液を、後述の 3.3.1 に示す方法により前処理し、濃縮倍率ごとに回収率を比較した。濃縮倍率が 200, 1000, 2000 倍と変わっても、クリーンアップ操作をしていれば、回収率に大差はなかった。

ただし、本法では DES の微量分析を行っており、目的の感度を得るためには、LC/MS への注入量を、通常の 20 倍程度にする必要がある。5 μ L 程度の注入量であれば、特に注意の必要はないが、今回は 100 μ L の大容量を注入するため、最終溶液の溶媒組成も併せて測定結果への影響を検討した。結果、LC/MS への注入量が 50 μ L 以上の場合、最終溶液の溶媒組成を、移動相の初期状態の組成に近づけないとピーク形状が悪くなった。一方で、最終溶液に水を加えることによる DES の不溶解物質への吸着や溶解度の低下が影響し、見かけ上の回収率は低下した。結果、ピーク形状を良好に保つ限界の溶媒組成比メタノール:水 = 1 : 1 を最終溶液として選択した。

後述の 3.3.1 に示す方法に従って処理（4000 倍濃縮）した精製水および海水試料を 5~100 μ L 注入した場合の回収率を Fig.7 に示す。注入量が増加するとサロゲートの絶対回収率が低下した。しかし、後述の添加回収試験結果に示す通り、DES-*d8* による回収率補正を行うことにより、98%以上の回収率が得られた。

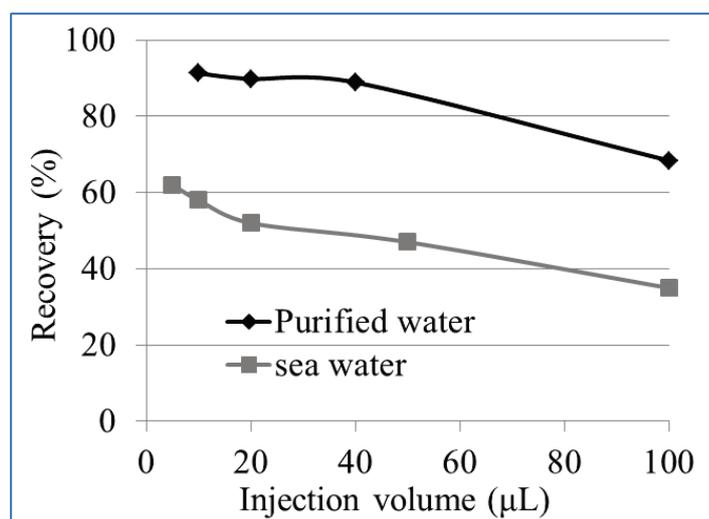


Fig. 7 Effect of injection volume on overall recoveries (%) of DES-*d8* in purified water and sea water samples.

3.2.3 クリーンアップ方法の検討

本分析では、前処理において高濃縮するため、試料マトリックスによるイオン化抑制が無視できない。都市の河川水から抽出される主な夾雑成分としては陰イオン(LAS)、非イオン界面活性剤(NPnEO)及びその分解物(NPnEC)、クロロフィル等が考えられ、これらの物質のうち、LAS, NPnEC の多くは、DES の保持時間(11 分)付近に検出された。環境水中濃度としては LAS 約 10 ng/mL と NPnEC 約 1 ng/mL と低濃度であるが、DES を高感度に分析するためには、試料液を高濃縮する必要があるが、夾雑成分もかなり高濃度になるため、クリーンアップ方法の検討を行った。

3.2.3.1 クリーンアップの候補固相に関する DES 抽出率の検討

試料のクリーンアップのために、活性炭カートリッジを用いる方法を検討した。①Inertsep GC(GL Sciences 社製)、②ENVI-Carb(SUPELCO 社製)、③Autoprep AC(昭和電工社製)、④SeP-Pak AC2(waters 社製)の 4 種類の固相について検討を行った。DES の回収率を Fig. 8 に示す。

精製水 10 mL に DES 20 ng を添加したものを試験液とし、上記の活性炭カートリッジに通液した。カートリッジからの溶出は第一分画(F1)メタノール 12 mL、第二分画(F2)メタノール 12 mL で行った。結果、①および②は、F1 のみで 98.6%、98.8%の DES の回収率が得られた一方で、③および④からは F1, F2 とともに DES は全く回収されなかった。

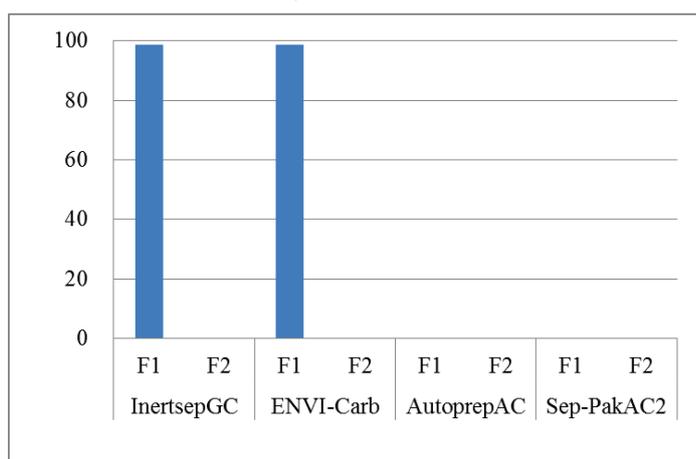


Fig.8 Recoveries (%) of DES from purified water by using 4 kinds of activated carbon cartridges

F1: the first fraction with 12mL of Methanol,

F2: the second fraction with another 12mL of Methanol

3.2.3.2 活性炭系固相による主要夾雑成分の除去効率の検討

次に、(1)の検討試料と同様の試料に、夾雑成分として、陰イオン界面活性剤(LAS) 200 ng, 非イオン界面活性剤の分解物(NPnEC) 20 ng を添加し、①～④の活性炭カートリッジに通液した。カートリッジからの溶出は第一分画(F1)メタノール 12 mL, 第二分画(F2)メタノール 12 mL で行った。

(1)の検討結果より、①, ②の固相においては DES が 100%近く回収されているはずであるにも関わらず、いずれの場合においても回収率は低く、最も高い①でも、22%程度の回収率であった。一方で、夾雑成分として添加した LAS や NPnEC は、その多くが試験液中に回収されていたこと、活性炭系固相を通す前の未処理試料を測定しても回収率が 20%程度であること、の 2 点を合わせて考察すると、DES が回収されていないのではなく、イオン化抑制により、見かけ上、回収率が悪いことが示唆された。そこで、環境試料中の DES のクリーンアップを行う際には、活性炭カートリッジのみでは不十分であり、陰イオン交換作用や極性相互作用を持つ固相を合わせて使用することとした。

上記 4 種類の固相の中で回収率のよかった①Inertsep GC (以下、GC と記載)を中心に、極性相互作用と弱陰イオン交換作用を持つ PSA, 強陰イオン交換作用を持つ SAX を組み合わせた GC/PSA および、GC/SAX/PSA を用いて検討を行った。

上記検討と同様に、精製水 10 mL に DES 50 ng と、さらに夾雑成分として、陰イオン界面活性剤(LAS) 200 ng, 非イオン界面活性剤の分解物(NPEC) 20 ng を添加したものを試験液として、固相カートリッジへ通液した。固相カートリッジからの溶出は第一分画(F1)メタノール 12 mL, 第二分画(F2)2%ギ酸/メタノール 12 mL で行った。DES, LAS, NPEC の回収率をそれぞれ Fig. 9, 10, 11 に示す。

DES が F1 に溶出することを考慮すると、イオン化抑制を抑えるためには、F1 に LAS および NPEC が溶出しないことが望ましい。Fig. 10, 11 より、GC を用いた場合、LAS や NPEC の多くが F1 に溶出し、クリーンアップが十分にできていないことが示された。GC/PSA を用いた場合、GC と比較するとクリーンアップ効果が期待できるが、10～20%程度が F1 に溶出してくる結果となった。一方で GC/SAX/PSA を用いると LAS, NPEC とともに F1 にはほとんど溶出してこなかった。これは SAX, PSA の両方の効果により、LAS, NPEC が十分に保持されたためだと考えられる。

Fig. 9 より、各クリーンアップカートリッジを用いた際の回収率を比較すると、GC,

GC/PSA, GC/SAX/PSA の順で回収率が高くなった。これは、Fig. 10, 11 の結果からもわかるように、試料液中の夾雑成分が除去され、イオン化抑制の影響を抑えることができたためであると考えられる。実際、環境試料にこの固相を適用した結果、LAS, NPnEC は 90%以上除去され、クロロフィル等の色素も除去された。以上の検討結果より、試料液のクリーンアップには GC/SAX/PSA 固相を用いることとした。

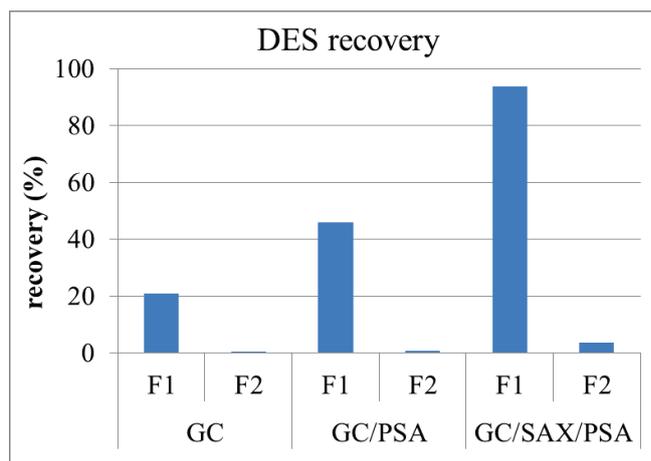


Fig.9 Recoveries (%) of DES from purified water by using three SPE cartridges
 F1: the first fraction with 12mL of Methanol 12 mL,
 F2: the second fraction with another 12mL of Methanol.
 GC: Inertsep GC, GC/PSA: InertSep GC/PSA, GC/SAX/PSA: InertSep GC/SAX/PSA

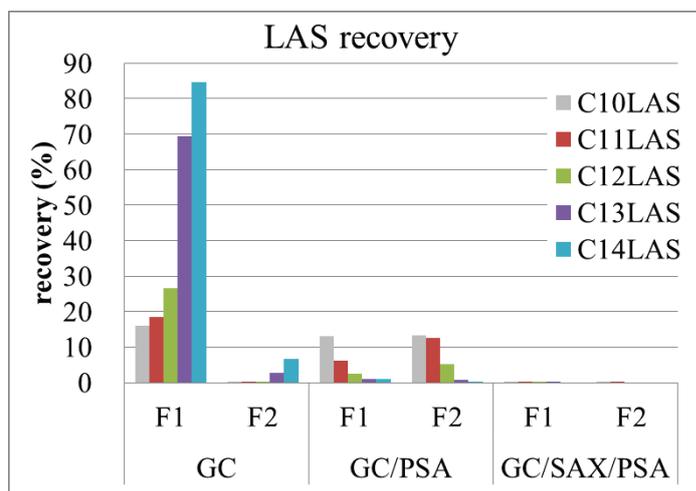


Fig.10 Recoveries (%) of LAS from purified water using activated carbon SPE cartridges.
 F1: the first fraction with 12mL of Methanol (DES is eluted in this fraction)
 F2: the second fraction with 12mL of 2% HCOOH/Methanol.
 GC, GC/PSA and GC/SAX/PSA are the same abbreviations as those in Fig.9.

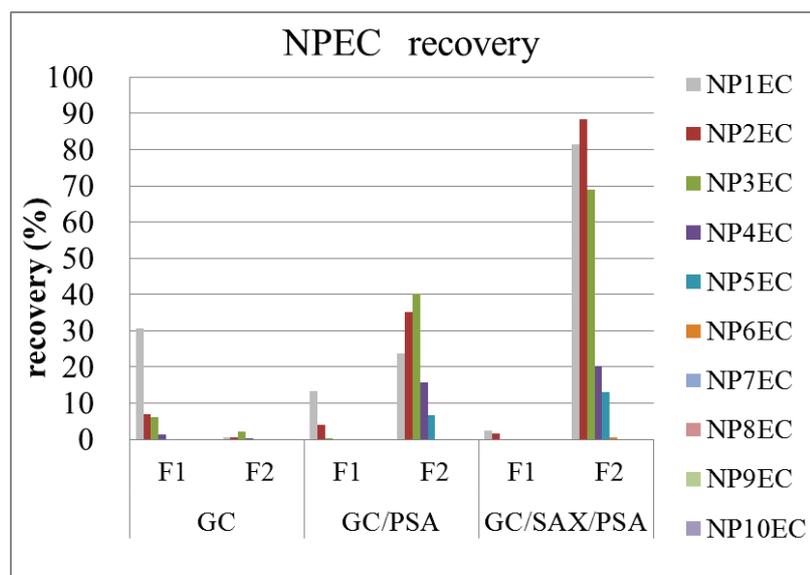


Fig.11 Recoveries (%) of NPEC in purified water collected in activated carbon SPE cartridges.

F1: the first fraction with 12mL of Methanol (DES is eluted in this fraction)

F2: the second fraction with 12mL of 2% HCOOH/Methanol

GC, GC/PSA and GC/SAX/PSA are the same abbreviations as those in Fig.9

3.3 分析法の定量性とその評価

3.3.1 分析方法

水試料 2 L に、DES のフェノール性 OH 基の酸化分解を抑えることを目的としてアスコルビン酸 2g を添加し、さらにサロゲートとして DES-*d*₈ 溶液(1μg/mL)を 5 μL 添加後、ろ過した。ろ紙上の SS はメタノール 5 mL で 2 回洗い込み、ろ液と合わせ、6 mol/L 塩酸で pH2.5 に調整した。10 mL のメタノールでコンディショニングした InertSep CH カートリッジに、試験液を 20 mL/min の速度で通水し、精製水 20 mL で洗い込んだ後、15 分間吸引脱水した。次いで 10 mL 試験管を受器として 5 mL のメタノールで溶出した。溶出液はクリーンアップのため、10 mL のメタノールでコンディショニングした InertSep GC/SAX/PSA カートリッジに、1 mL/min 程度の通液速度で負荷し、12 mL のメタノールで溶出した。溶出液は 40 °C の水浴を備えた窒素吹き付け装置で 0.25 mL まで濃縮し、精製水で 0.5 mL にメスアップし、試験液とした。なお、固相抽出後の吸引脱水は、抽出液中への水の混入を減らすことを目的として行っており、脱水前後の固相の重量を測定した結果、脱水時間は 15~30 分程度で良好であった。また、InertSep GC/SAX/PSA カートリッジからの溶出液量に関しては、検討の

結果，DES を 100%回収するための必要最低限のメタノール量とした。

3.3.2 分析方法の検出下限，定量下限，添加回収試験

「化学物質環境実態調査実施の手引き」¹⁶⁾に記載される方法に従って，分析方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)を求めた。結果を Table. 3 に示す。

また，精製水，河川水(庄内川)，海水(名古屋港)への標準物質添加回収結果を Table.4 に示す。精製水については 68.4%の回収率が得られたが，河川水，海水に関しては共に 40%程度の回収率であった。これは 4000 倍の試料濃縮と，装置への 100 μ L 注入によるイオン化抑制に起因すると考えられるが，相対標準偏差が小さいことから，このままでも定量的評価は可能である。さらに，Table.4 に示した通り，DES-*d8* により補正を行うことで精密な定量も可能である。

Table 3 MDL 及び MQL の算出

物質名	ジエチルスチルベストール
試料	河川水
試料量(L)	2.0
標準添加量(ng)	0.1
試料換算濃度 (ng/L)	0.05
最終液量 (mL)	0.5
注入液濃度 (ng/mL)	0.2
装置注入量 (μ L)	100.0
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1}	ND
無添加平均 (ng/L) ^{*2}	ND
結果 1 (ng/L)	0.0497
結果 2 (ng/L)	0.0526
結果 3 (ng/L)	0.0508
結果 4 (ng/L)	0.0509
結果 5 (ng/L)	0.0489
結果 6 (ng/L)	0.0495
結果 7 (ng/L)	0.0485

結果 8 (ng/L)	0.0494
平均値(ng/L)	0.05009
標準偏差(ng/L)	0.0013
MDL(ng/L) *3	0.0050
MQL (ng/L) *4	0.0133
S/N 比	12.0
CV%	2.65

- *1 操作ブランク平均：試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均
- *2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値
- *3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$
- *4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$
- *5 サロゲート回収率：平均 47.6%， CV%6.3%

Table 4 精製水，河川水（庄内川），海水（名古屋港）への標準物質添加回収結果

試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	サロゲート回収率 (%)	変動係数 (%)
精製水	2	無添加	2	ND		69.1	
		0.5	2	0.245	98	68.4	
河川水	2	無添加	2	ND		48.8	
		0.5	5	0.26	104	42.6	4.0
海水	2	無添加	2	ND		47.4	
		0.5	5	0.265	106	41.9	2.9

3.3.3 試料水中における DES の保存性

河川水，海水および標準試料の DES の保存性を Table 5 に示す。試料水ではアスコルビン酸を添加した場合と無添加の場合および，試料の粗抽出液中の保存性を標準溶液と比較した。環境水試料中の DES は，アスコルビン酸の有無に関わらず，1 週間の保存が可能であり，粗抽出液に関しては 2 週間の保存が可能であった。また，標準溶液に関しては 0.2 ng/mL という比較的 low 濃度であっても 1 か月は保存できる。

Table 5 保存性試験の結果

試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率 (%)		
		7日間	14日間	1ヶ月
河川水	試料(アスコルビン酸添加)	0.2	88	
	試料	0.2	90	
	粗抽出液	0.4		95
海水	試料(アスコルビン酸添加)	0.2	85	
	試料	0.2	85	
	粗抽出液	0.4		98
標準溶液	MDLの10倍	0.2		100
	検量線最高濃度	50		96

3.4 環境試料の測定結果

名古屋市内河川水および名古屋港海水を本法により分析した結果を、Fig. 13, Fig. 14 に示す。Fig. 13 は名古屋市北部を流れる庄内川中流域で採水した河川水を分析した結果で、DES は 0.005 ng/L 以下で検出されなかった。Fig. 14 は名古屋市中部を流れる堀川の河口部で採水した海水を測定した結果で、DES は同じく 0.0050 ng/L 以下で検出されなかった。Fig.14 で、DES の保持時間付近に未知物質のピークが検出されたが、同じ試料を用いて添加回収試験を行ったところ、この未知物質は DES とは分離され、定量に問題はなかった。

いずれの地点からも DES は検出されなかったが、これは日本国内において、DES の使用が非常に限られており、前立腺癌の治療薬「ホンバン錠」として一部で使用されているのみであるためと考えられる。このことを考慮すると、病院排水など、限られた水質汚染の確認の課題は残るが、現在はこの薬剤も製造中止になっているため、環境への影響は低いと考えられる。

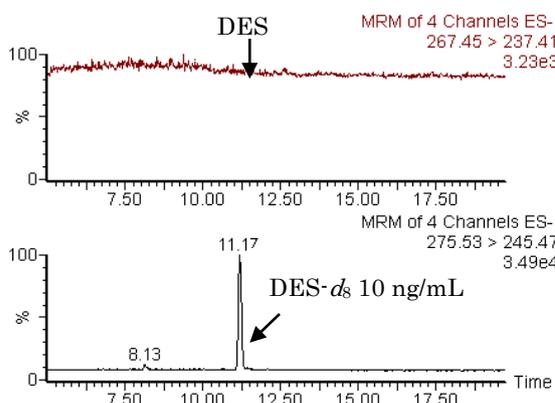


Fig. 13 An SRM chromatogram of DES in river water

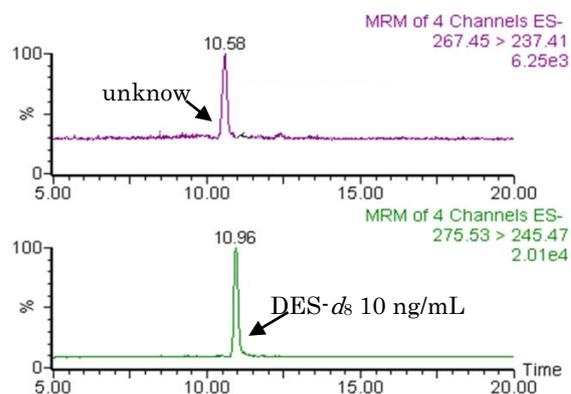


Fig. 14 An SRM chromatogram of DES in sea water

4. まとめ

本報告では DES の極微量分析を行うため、試料のクリーンアップ方法、大量試料導入方法を検討し、LC/MS/MS による分析方法を開発した。本法によって、環境水中の DES を界面活性剤などの共存成分による影響を抑え、DES の相対回収率 98% で安定して分析できた。また、複数箇所の水質試料を用いて MDL を計算したところ、いずれも 0.005 ng/L で、水質試料において環境省が設定した DES の検出下限値 0.01 ng/L を満足した。

名古屋市内河川水および名古屋港海水を本法により分析した結果、いずれの地点においても DES は 0.005 ng/L 以下で検出されなかった。

文献

- 32) 西川智浩, 白石不二雄, 白石寛明, 森田昌敏ら: 第 8 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会講演要旨集, 34-35 (2002)
- 33) MATTHIESSEN P., POTTINGER T.g., PULMAN K.g.t., ARNOLD D., PEPPER T.j., JOHNSON A.c.: Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms., *Sci Total Environ.*, 367, 616-630, 2006.
- 34) LISHMAN Lori, SMYTH Shirley Anne, SARAFIN Kurtis, TOITO John, PEART Thomas, LEE Bill, SETO Peter.: Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci Total Environ.*, 367, 544-558, 2006.
- 35) SARMAH A.k., NORTHCOTT G.l., LEUSCH F.d.l., TREMBLAY L.a.: A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Sci Total Environ.*, 355, 135-144, 2006.
- 36) KIM Sang D., CHO Jaeweon, KIM In S., VANDERFORD Brett J., SNYDER Shane A.: Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.*, 41, 1013-1021, 2007.
- 37) ISOBE Tomohiko, SERIZAWA Shigeko, Horiguchi Toshihiro, SHIBATA Yasuyuki, MORITA Masatoshi, SHIRAISHI Hiroaki.: Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay. *Environ Pollut.*, 144, 632-638, 2006.
- 38) 西野貴裕, 山崎くみ子, 大庭智弘, 太田早苗, 佐々木裕子.: 水環境 東京都内の水環境に

- おける内分泌かく乱化学物質の汚染実態, 東京都環境科学研究所年報, 2005, 151-157, 2005.
- 39) YAMAMOTO Atsushi, KAKUTANI Naoya, YAMAMOTO Kohji, KAMIURA Toshikazu, MIYAKODA Hidekazu,: Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources. *Environ Sci Technol.*, 40, 4132-4137, 2006.
- 40) 名古屋市環境保全局 : 平成 11 年版名古屋市環境白書 (1999)
- 41) 小島節子, 渡辺正敏, 安藤良, 中瀬直喜 : 名古屋市環境科学研究所報, 32, 31-36 (2002)
- 42) 小島節子 : 名古屋市環境科学研究所報, 34, 43-48 (2004)
- 43) STANFORD Benjamin D., WEINBERG Howard S.: Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices. *J Chromatogr A*, 1176, 26-36, 2007.
- 44) YU Zirui, PELDSZUS Sigrid, HUCK Peter M.: Optimizing gas chromatographic-mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. *J Chromatogr A*, 1148, 65-77, 2007.
- 45) LEE Hing-biu, PEART Thomas E., SVOBODA M. Lewina,: Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1094, 122-129, 2005.
- 46) 環境庁水質保全局水質管理課 : 要調査項目等調査マニュアル (水質, 底質, 水生生物) 平成 11 年 12 月, 47-62 (1999)
- 47) 古閑豊和, 田口貴美子, 篠原亮太 : 日本水環境学会年会講演集, 604 (2005)
- 48) 古閑豊和, 中村仁美, 野見山桂, 篠原亮太 : 第 15 回環境化学討論会要旨集, 512 (2006)
- 49) KANG I J, OSHIMA Y, TSURUDA Y, YAMAGUCHI T, IMADA N, HONJO T, YOKOTA H, MAEDA M, TADOKORO H.: Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)., *Chemosphere*, 47, 71-80, 2002.
- 50) HUANG Chong, ZHANG Zhaobin, WU Shimin, ZHAO Yanbin, HU Jianying,: In vitro and in vivo estrogenic effects of 17 α -estradiol in medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 80, 608-612, 2010.
- 51) 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課 : 内分泌かく乱化学物質調査の考え方
- 52) http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NC/Research_yamaji_3.htm

- 53) 石井義昭, 沖田智, 鳥貝真, 尹順子 : 分析化学, **49**, 735-758 (2000)
- 54) 武田玲子, 吉田由布子 : 「ピルの危険な話」 東京書籍, (2000)
- 55) Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C.: Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med.*, **284**, 878-881 (1971).
- 56) Henderson, B.E., Benton, B., Cosgrove, M., Baptista, J., Townsend, D. and Hart, W., Mack, TM.: Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. *Pediatrics*, **58**, 505-507 (1976).
- 57) Mittendorf, R.: Teratogen update carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology*, **51**, 435-445 (1995).
- 58) Giusti, R.M., Iwamoto, K. and Hatch E.E.: Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.*, **122**, 78-88 (1995).
- 59) Herbst, A.L.: Behavior of estrogen-associated female genital tract cancer and its relation to neoplasia following intrauterine exposure to diethylstilbestrol (DES). *Gynecol Oncol*, **76**, 147-156 (2000).
- 60) Vom Saal, F. S., Barry G.T., Monica, M.M., Paola, P., Kristina, A.T., Susan, C.N., Minati, D.D., V.K. Ganjam, Stefano, P. and Wade, V.W.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2056-2061 (1997).
- 61) Zhong X, Xu Y, Liang Y, Liao T, Wang J.: The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an in vivo model for endocrine disruption in freshwater teleosts : a full life-cycle test with diethylstilbestrol., *Aquatic Toxicology.*, **71**(1), 85-95 (2005)
- 62) Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., Kamiura, T. and Miyakoda, H.: Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources., *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 4132-4137 (2006).
- 63) R. Jeannot, Hassan, S., Emmanuel, S., Thierry, D. and Katja, D.: Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry., *J. Chromatogr. A*, **974**, 143-159 (2002).
- 64) Benijts, T., Dams, R., Gunther, W., Lambert, W. and Leenheer, A.D.: Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass

- spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1358-1364 (2002).
- 65) Lopez, de Alda, M.J. and Barcelo, D.: Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water, *J. Chromatogr. A*, **938**, 145-153 (2001).
- 66) Pedrouzo, M., Borrull F., Pocurull E. and Maria M.R.: Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, **78**, 1327-1331 (2009).
- 67) Chen, H.C., Kuo H.W. and Ding W.H.: Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction, *Chemosphere*, **74**, 508-514 (2009).
- 68) Lei, B., Huang, S., Zhou, Y., Wang, D. and Wang, Z.: Level of six estrogens in water and sediment from three river in Tianjin area, China, *Chemosphere*, **76**, 36-42 (2009).

V. 総括

本章は著者が行った「環境中微量化学物質を対象とする有機質量分析法開発および環境動態把握に関する研究」に関する一連の結果とその考察である。

我々の生活の中には、その利便性のために非常に多くの化学物質が使用されている。しかし、その反面、中には、人の健康や生態系等への影響が危惧されているために、社会問題となっている化学物質も多数存在する。本研究では、生態系への影響が懸念される物質で、その環境動態が十分に明らかにされていない物質を対象に、LC/MSによる高確度で高感度な分析法を研究し、それらの環境汚染状況を明らかにしてきた。研究対象とした物質は、化審法で新たに追加登録された臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)、工業製品や生活用品としての用途が広く、女性ホルモン様作用があるとされているビスフェノール A(BPA)および *p*-クミルフェノール(*p*-CP)、ヒトをはじめ、生物から排出されている天然型ステロイドホルモン類や合成型ステロイドホルモンのひとつジェチルスチルベストロール(DES)である。

環境動態に先だつた分析法開発として、HBCDsでは α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の5つの異性体を効率よく分離し高感度で分析する方法を、BPAおよび *p*-CPでは両物質の存在比を把握するため高感度な同時分析法を、ステロイドホルモン DESでは生態系への影響を評価できる高感度な分析法を、それぞれ開発した。これらの分析法を用いた環境動態把握では一般環境調査に留まらず、環境残留性と関連して、生分解性や汚染の経時変化についても調査を行い、解析してきた。

以下にそれらを総括する。

「II 臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)の分析法開発および環境調査」

臭素系難燃剤の一つであるヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)は、同じく臭素系難燃剤であるポリ臭素化ジフェニルエーテルの代替品として、その需要量が増加傾向にある。また、臭素系難燃剤の中では、テトラブロモビスフェノール Aの方が工業的な需要量は多いが、生物蓄積性、難分解性などの点において、HBCDsは非常に重要な物質と考え、研究対象物質として取り上げた。

本研究では、一般環境調査に留まらず、環境残留性と関連して、生分解性や汚染の経時変化についても調査を行い、解析した。分析方法については過去に報告例があるが、回収率や

濃縮倍率などの点から、改良が必要であると考え、水質・底質・生物の各媒体における HBCDs の分配を極力同じ質の分析法で把握するため、それぞれの媒体の分析法を開発し、分析法の評価を行った。加えてこれまで、HBCDs 分析では、3 異性体の分離分析しか行われてこなかったが、本研究では 5 異性体の分離分析を可能とした。また、抽出方法やクリーンアップ方法の改良により、より迅速に分析することが可能となった。

名古屋市内で採取された環境試料の調査結果については、すべての媒体から高頻度で HBCDs が検出され、市内の広域にわたって HBCDs が存在していることが明らかになった。工業製品として使用されている HBCDs の異性体組成は γ -HBCD \gg α -HBCD \cong β -HBCD の順で、環境中へ排出された HBCDs は、河川及び海域においては、概ね、そのままの異性体組成比で存在するが、底質に移行すると、一部は異性体組成比が変化ししばしば α -HBCD $>$ γ -HBCD $>$ β -HBCD の順で存在している。さらに、そこに生息している魚介類は、底生生物やプランクトンなどを摂取し、HBCDs が体内へ取り込まれ、体内の異性体組成比が変化していると考えられる。また、不確実な要素も残されているが、底質中において、HBCDs の生分解試験を行った結果、嫌気性条件において、HBCDs の分解の可能性を示唆する結果を得た。

以上の研究結果から、大気を除くすべての環境媒体の汚染状況および挙動を、同一地域において包括的に把握することができた。また、これらの知見を得るために、全環境媒体を一貫する分析法開発は重要であったと考えられる。

「III p -クミルフェノールおよびビスフェノール A の分析法開発および環境調査」

ビスフェノール A (BPA) に関してはこれまでに多くの研究がされており、分析法に関する報告例も多い。一方で、BPA の関連物質である p -クミルフェノール (p -CP) に関しては、分析法についての報告例がほとんどなく、研究対象物質として取り上げた。これらの物質について環境実態を評価するため、共通の分析基盤で、両者の水環境中の存在量を高感度で同時に分析する方法を開発した。さらに、その方法を用いて両者の環境挙動を把握することを目的とし、研究を行った。

本研究により、BPA および p -CP は LC/MS を用いて高感度で同時分析することが可能となった。高感度分析を行うためには BPA のブランク問題を解決することが必要であったが、前処理方法を簡素化し、使用する水に注意を払うことで、問題を解決することができた。

本法を用いて名古屋市内の河川水・海水の BPA および *p*-CP の環境調査を行ったところ、全ての地点から BPA は検出され、市内広域にわたる汚染が確認された。一方で、*p*-CP は高濃度の数地点があった他は、検出下限値程度の検出レベルであった。BPA と *p*-CP の濃度比には、特に強い関係は見られなかった。これは、BPA および *p*-CP はポリカーボネート樹脂の原料として共に使用されることもあるが、それぞれの物質の用途が多岐にわたっているためであると考えられる。

「IV ジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol, DES) の分析法開発および環境調査」

DES のように女性ホルモン様作用を持つステロイドホルモン類は、極微量であっても生物に影響を与える可能性が高いとされ、環境中における DES の高感度分析法が求められる。また、環境省は、既報の毒性情報に基づいて、環境水中の DES をより高感度で測定すべきとの方針を出し、検出下限値を 0.01ng/L と設定している。これまでに、環境水や下水処理水から、数～数百 ng/L レベルの検出下限値で報告がなされているが、生物影響濃度を考慮すると、数千～数万倍の感度が必要である。

本研究では、試料のクリーンアップ方法、大量試料導入方法を検討し、環境水中の DES の高感度分析方法を開発した。これまでの報告値を大きく上回る感度で測定を行うことを可能にした（検出下限値 0.005ng/L、定量下限値 0.013ng/L）。また、名古屋市内河川水および名古屋港海水を本法により分析した結果、いずれの地点においても DES は 0.005 ng/L 以下で検出されなかった。

本研究の結果をまとめた論文が、2014 年に日本環境化学会の第 23 回環境化学技術賞を受賞し、高感度化に特化した分析法開発は非常に意味のある研究であったと考えられる。

VI. 業績

VI-1 査読付学術論文

Hitomi HASEGAWA, Shingo HIRAO and Shigeru SUZUKI, Liquidchromatography-mass spectrometric analysis of p-cumyl phenol and Bisphenol A in environmental waters in Nagoya city, *J. Environmental Chemistry*, 26 (1), 21-26 (2016)

長谷川 瞳, 渡辺正敏, 鈴木 茂, 環境中のヘキサブロモシクロドデカンの分析法および調査, *環境化学*, 24 (1), 1-9(2014)

長谷川 瞳, 渡辺正敏, 鈴木 茂, 環境水中のジエチルスチルベストロールの高感度分析法, *環境化学*, 23 (1), 1-7(2013)

*第 23 回環境化学技術賞 (日本環境化学会) 受賞

Hitomi Hasegawa, Masatoshi Watanabe and Shigeru Suzuki, Behavior of Hexabromocyclododecane (HBCD) stereoisomers in water, sediment, and biological samples, Proceedings of the 19th International Mass Spectrometry Conference, 100551, September 15-21, 2012

VI-2 査読無学術論文

長谷川 瞳, 渡辺正敏, 底質中 1,2,5,6,9,10-ヘキサブロモシクロドデカンの分析法開発及び名古屋市内の濃度実態, *名古屋市環科研所報*, 41, 39-46(2011)

長谷川 瞳, 渡辺正敏, 5 α -ジヒドロテストステロンの分析法開発及び名古屋市内水環境中の濃度, *名古屋市環科研所報*, 40, 38-43, (2010)

VI-3 学会発表

長谷川 瞳, 平生進吾, 内藤宏孝, 飛石和大, 塚谷裕子, 鈴木 茂ら, LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(64)、第 24 回環境化学討論会、2015

長谷川 瞳、平生進吾、名古屋市内河川におけるネオニコチノイド系農薬および代謝物の濃度分布、第 18 回水環境学会シンポジウム、2015

長谷川 瞳、平生進吾、八木正博、鈴木 茂ら、LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(60)、第 23 回環境化学討論会、2014

長谷川 瞳、鈴木 茂、名古屋市内水環境における有機フッ素化合物の汚染実態について、第 48 回水環境学会年会、2014

長谷川 瞳、平生進吾、田原るり子、伊藤朋子、鈴木 茂ら、LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(57)、第 22 回環境化学討論会、2013

長谷川 瞳、渡辺正敏、鈴木 茂、名古屋市域におけるヘキサブロモシクロドデカンの生物試料および母乳中等の濃度レベル、第 21 回環境化学討論会、2012

長谷川 瞳、平生進吾、長谷川敦子、上堀 美知子、鈴木 茂ら、LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(53)、第 21 回環境化学討論会、2012

Hitomi Hasegawa, Masatoshi Watanabe, Shigeru Suzuki, Behavior of Hexabromocyclododecane (HBCD) stereoisomers in water, sediment, and biological samples., 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012

長谷川 瞳、渡辺正敏、鈴木 茂、LC/MS/MS による水環境中ジエチルスチルベストロールの微量分析法の検討、第 46 回水環境学会年会、2012

長谷川 瞳、田原るり子、清水明、長谷川敦子、鈴木 茂ら、LC/MS による化学物質分析法の基礎的研究(48)、第 20 回環境化学討論会、2011

長谷川 瞳、渡辺正敏、内藤了二、中村由行、名古屋港における臭素系難燃剤の濃度分布と堆積物特性、第 45 回水環境学会年会、2011

VII. 謝辞

本研究の遂行と論文の作成にあたり、多くの皆様のご指導をいただきました。特に、中部大学大学院応用生物科学研究科の鈴木茂教授には、本研究をまとめるにあたり、実験の進め方や測定法・装置に関する知識、実験結果のまとめ方などの基礎的な考え方から、学術研究と行政的な研究の繋ぎ方、まとめ方まで、様々なことをご教示いただきました。本論文を完成させることができたのは、同教授の豊富な経験と温かいご指導によるものであり、深く感謝いたします。並びに、論文の作成にあたり、研究者としての考え方、論理的な筋道を立てることなどについて、丁寧にご指導いただいた中部大学大学院応用生物科学研究科の山本敦教授、石田康行准教授に厚く感謝いたします。

著者の所属する名古屋市環境科学調査センターを 2012 年に退職された渡辺正敏氏には、有機化学物質の取り扱い方や前処理方法、質量分析計の操作方法など、基礎からひとつひとつ丁寧にご指導いただき、誠に感謝しております。また、本研究の遂行の機会を与えてくださいました名古屋市環境科学調査センターの所長、ならびに同センターの研究員、職員の方々には心より感謝しております。

最後に、本論文を完成するまで、温かく見守っていただき、子育てや家事を助けていただいた両親、夫と、辛い時も可愛い笑顔で励ましてくれた息子と娘に心より感謝し、結びといたします。