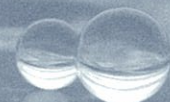


# 環境ホルモンの分析

環境ホルモンとは外因性内分泌攪乱化学物質のことをいい、種々の化学物質のうち体内に取り込まれて、ホルモンのように作用し、正常なホルモン作用に影響を与える物質をいう。その作用、化学的性質については本誌前号に報告している。環境ホルモンに該当する化学物質としては、環境庁から発表されている「環境ホルモン戦略計画SPEED'98(1998)」(Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98)<sup>1)</sup>に67物質がリストアップされている。67物質の大半は農薬類(除草剤、殺虫剤など)、有機塩素系化学物質で占められる。これらの成分の環境中の濃度や分布、また危険レベルが明確でないため、総合的な調査にあたっては、その濃度を可能な限り低濃度まで測定することが望まれている。本稿では、これらの化学物質の分析法を取り上げ、その現状と適用例を紹介する。



## 環境ホルモン対象物質の分析方法

A-1

### 公定法

環境ホルモンの対象成分は多種多数にわたっているため、多成分の同時一括分析が望ましく、したがってマニュアルとしてまとめられた分析方法、①「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)」(環境庁水質保全局水質管理課、平成10年10月)、②「農薬の環境残留実態調査分析法(案)」(環境庁水質保全局土壌農薬課、平成10年10月)では、ガスクロマトグラフ質量分析法が主要な分析法となっている。

現在のところ、マニュアルの分析法は抽出、濃縮、クリーンアップ、測定の概要を記載したもので、詳細な分析方法の記述にはいたっていない。実試料の分析にあたっては、こまかい条件、とくにクリーンアップ条件の検討が必要とされる。

以下に、これらのマニュアルに従って分析方法を概説し、さらに当社での分析例を紹介する。

### 物質ごとの分析法

分析法は各物質の化学的性質によって第1表に示す7つのカテゴリーに分けられる。

1) 環境庁環境保健部環境安全課:「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について」、1998年5月

第1表 環境ホルモン対象化学物質と分析法カテゴリー

物質種別	分析法カテゴリー	化学物質名	定量下限 (ng/L)
PBBおよび有機塩素系化合物	1(その1)	PCB(2)	10
	1(その2)	PBB(3)、ヘキサクロベンゼン(4)、ペンタクロロフェノール(5)、ヘキサクロシクロヘキサン(12-1)、クワロデン(14)、オキシクワロデン(15)、trans-ノナクロル(16)、DDT(18)、DDEおよびDDD(19)、ケルセン(ジコホル)(20)、アルドリノ(21)、エンドリン(22)、デルドリノ(23)、エンドスルファン(ベンゾエピン)(24)、ヘプタクロル(25)、ヘプタクロルエポキシド(26)、メトキシクロル(29)、オクタクロロスチレン(48)	25
アルキルフェノール類	2	ペンタクロロフェノール(5)、5-~9-フェノール(36)、ビスフェノールA(37)、2,4ジクロロフェノール(44)	10~100
フタル酸エステル類	3	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(38)、フタル酸ブチルベンジル(39)、フタル酸ジブチル(40)、フタル酸ジシクロヘキシル(41)、フタル酸ジエチル(42)、フタル酸ジベンチル(63)、フタル酸ジヘキシル(64)、フタル酸ジプロピル(65)	200~500
芳香族炭化水素	4(その1)	ベンゾ(a)ピレン(43)、ベンゾフェノン(46)、4-ニトロトルエン(47)、スチレンダイマー、トリマー(66)	10
	4(その2)	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(45)	10
	4(その3)	1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン(17)、スチレンモノマー(-)、n-ブチルベンゼン(67)	10
農薬類	5(その1)	アトラジン(9)、アラクロール(10)、シマジン(11)、エチルパラチオン(12-2)、カルバリル(13)、マラチオン(27)、ニトロフェン(31)、トリフルラリン(35)、メトリブジン(55)、シベルメトリン(56)、エスファンバレート(57)、フェンバレート(58)、ベルメトリン(59)、ピンクロゾリン(60)	10~50
	5(その2)	2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(6)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(7)	50
	5(その3)	ペノミル(50)	100
	5(その4)	アミトロール(8)	1000
	5(その5)	メソミル(28)	30
	5(その6)	マンゼブ(52)、マンネブ(53)、メチラム(54)、ジネブ(61)、ジラム(62)	200
有機すず化合物	6	トリブチルスズ(33)、トリフェニルスズ(34)	1
人畜由来ホルモン	7	エストラジオール(-)	2.8
その他		ダイオキシン(1)	0.0001
	対象外	マイレックス(30)、トキサフェン(32)、アルディカルブ(49)、キーボン(クロルデコン)(51)	-

注) 物質名の末尾の( )内数値はSPEED'98のリストナンバーを示す。対象外は日本国内で農業登録されていない物質略称) PCB;ポリ塩化ビフェニル、PBB;ポリ臭素化ビフェニル、DDT;p,p'-ジクロロジフェニルトリクロロエタン、DDE,DDD;DDTの代謝物

ヘキサン、ジクロロメタンなどによる液液抽出または固体吸着剤による固相抽出で分離し、そのうち、必要な場合は誘導体化（測定機器に適用しやすい化学形態に変える）、クリーンアップ（不純物除去）して測定液とし、これを高分解能ガスクロマトグラフ質量分析（HRGC/MSまたはHRGC/HRMS）あるいは高速液体クロマトグラフ（HPLC）で測定する。分析過程での回収率確認などのために、サロゲート物質（<sup>13</sup>Cあるいは<sup>2</sup>Hで標識化した化合物）を試料に添加して分析を行う。水系試料について各カテゴリーの分析方法の概要を以下に示す。

1) **カテゴリー1**：PCB、PBB、有機塩素系農薬を対象とする。ヘキサンで液液抽出後、脱水・濃縮し、シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップし、HRGC/HRMSで測定する。サロゲート物質を内標準とした同位体希釈法で各塩素数あるいは臭素数ごとに定量を行う。PCBでは塩素数およびその配位の異なる19物質を対象とし、PBBでは7物質を対象とする。

2) **カテゴリー2**：アルキルフェノール類を対象とする。水溶液から酸性状態で抽出したのち、必要に応じてシリカゲルカラムでクリーンアップした後HRGC/MSで測定する。ビスフェノールAおよびクロロフェノールについては高感度測定のために、抽出した物質を誘導体化（トリメチルシリル化）して分析する。トリメチルシリル化によって直接測定法に比較し約5倍の高感度化をはかることができる。

3) **カテゴリー3**：フタル酸エステル類を対象として、ヘキサンで抽出後、HRGC/MSで測定する。抽出液を必要に応じてフロリジルカラム（けい酸マグネシウム）でクリーンアップする。

4) **カテゴリー4**：芳香族炭化水素を対象とし、ヘキサンまたは固相抽出後、HRGC/MSで測定する。必要に応じてフロリジルカラムでクリーンアップする。低沸点成分（カテゴリー4（その3））については、試料液中に不活性ガスを通じて対象物質を気相中に取り出し、これをトラップ管に冷却して捕集後、トラップ管を加熱して対象物質を脱離させて、HRGC/MSに導入して測定する。

5) **カテゴリー5**：農薬類を対象とし、抽出はジクロロメタンあるいは固相抽出で行うが、クリーンアップあるいは誘導体化することで、6方法に分かれる。測定は主としてHRGC/MSで行うが、一部（カテゴリー5（その4）、（その5）、（その6））では、高速液体クロマトグラフ分離-蛍光検出あるいは紫外吸収検出で測定する。

6) **カテゴリー6**：有機すず化合物を対象とし、ヘキサンで液液抽出後、プロピル化しさらにフロリジルカラムでクリーンアップ後、HRGC/MSで測定する。

7) **カテゴリー7**：人畜由来ホルモンであるエストラジオールを対象とし、固相抽出後、液体クロマトグラフ法で分離し、さらに誘導体化（トリメチルシリル化）してクリーンアップ後、HRGC/MSで測定する。

## A-2

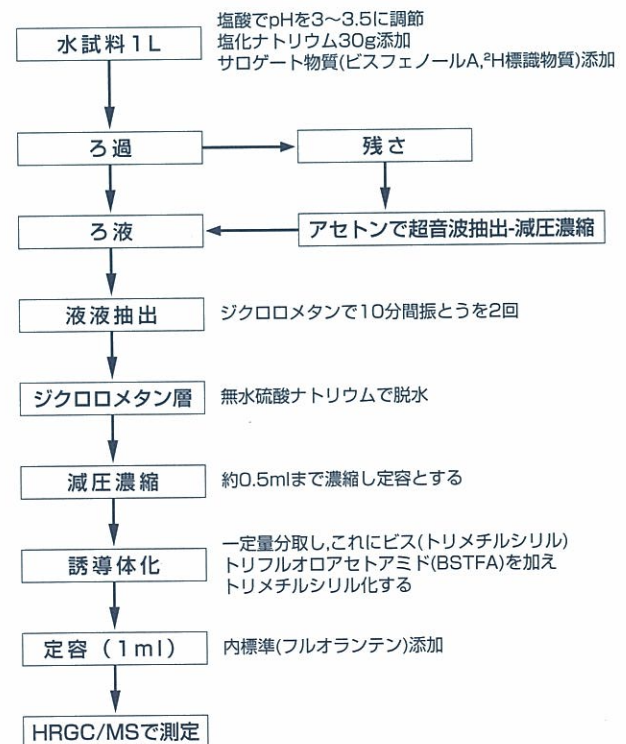
## 分析の例

環境ホルモンとして疑われている67物質のうち、国内生産量が多いことから（プラスチック原料として大量に使用）、環境庁あるいは建設省での総合調査の対象となっているビスフェノールAおよびニルフェノール（C9-フェノール）<sup>2)</sup>について当社での測定例を以下に示す。

### ビスフェノールA

試験試料水中のビスフェノールAを第1図に示す分析フローに従って操作し、第2表に示す条件で分析した結果を第3表に示す。

測定の結果、第2図に示すクロマトグラムが得られる。ビスフェノールAの分析では、誘導体化（トリメチルシリル化）の有無によらず、得られた分析結果はほぼ一定であったが、誘導体化することで、ピークはシャープとなり、定量下限も約5倍に向上させることができる。



第1図 ビスフェノールA分析フロー(誘導体化法)

2) 環境庁水質保全局水質管理課：「水環境中の外因性内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態概況調査について」、1998年7月

環境庁水質保全局水質管理課：「水環境中の外因性内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態概況調査(夏季)結果速報」、1998年12月

## ノニルフェノール

河川水中のノニルフェノールについて、従来法（「化学物質分析法開発調査報告書」平成8年、環境庁）と前記暫定調査マニュアルによる方法で比較調査した結果を第4表に示す。

代表的なクロマトグラムを第3図に示す。

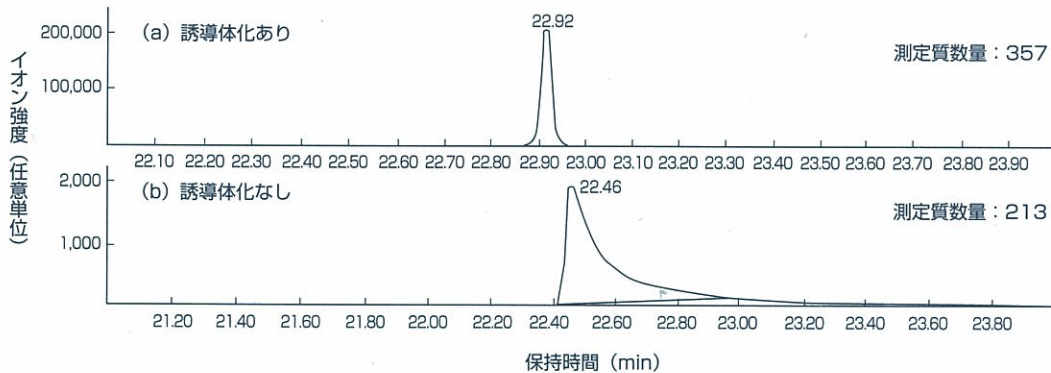
ノニルフェノールの異性体が6成分検出されているので、これら成分の含量として定量する。従来法と今回の方法では抽出条件は異なるが、よく一致した良好な結果が得られた。

第2表 HRGC/MSの測定条件(ビスフェノール測定条件)

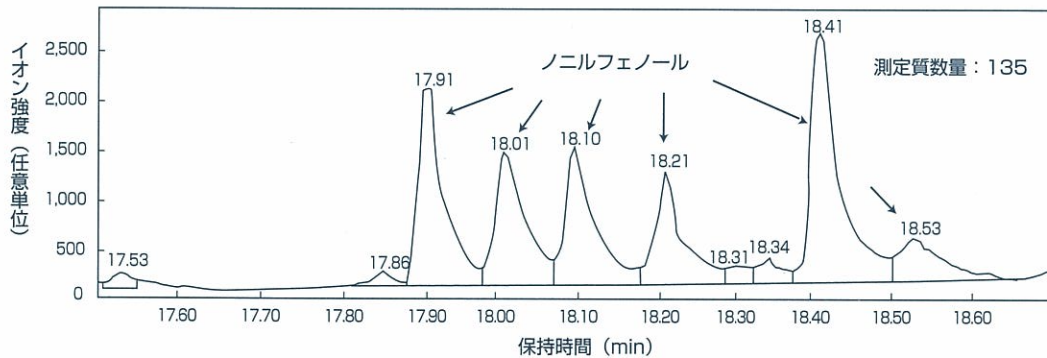
ガスクロマトグラフ	ヒューレットパッカード社製 6890型
	分離カラム: HP5MS(0.25mmi.d.×30m) カラム温度: 40℃(5min)~10℃/min昇温~280℃(10min) 試料注入量: 1μl(スプリットレス) 注入口温度: 250℃
質量分析計	ヒューレットパッカード社製5973型
	イオン化: 電子衝撃法 検出法: 選択イオン法 モニターイオン(m/z): 直接測定: 213(ターゲットイオン)、 228(リファレンスイオン) トリメチルシリル化測定357(ターゲットイオン)、372(リファレンスイオン)

第3表 ビスフェノールA分析結果の一例

方法	定量結果(μg/ml)	
	試料-A	定量下限
直接測定	0.36	0.00005
誘導体化測定	0.53	0.00001



第2図 ビスフェノールAのクロマトグラムの一例



第3図 ノニルフェノールのクロマトグラムの一例

第4表 ノニルフェノール分析結果の一例

方法	定量結果(μg/ml)	
	試料-B	定量下限
従来法*1	0.038	0.0001
暫定マニュアル*2	0.033	0.0001

\*1 化学物質分析法開発調査報告書(平成8年)

\*2 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(平成10年)

今回、環境ホルモンの分析技術概要の紹介として、主として水系試料の分析方法について報告した。現在、当社では水試料のほかに、底質、土壌、水生生物中の環境ホルモンの分析にも取り組んでいる。底質、水生生物などは水系試料の方法と基本的には同じであるが、抽出操作前に予備処理が必要であること、クリーンアップが煩雑であることなどの点でより複雑となる。これらについては、あらためていくつかの成分を取り上げて報告する予定である。〔西神事業所 環境化学室 今北 毅〕