

◆ 報文 ◆

下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析

小森行也* 八十島誠** 高橋明宏*** 矢古宇靖子**** 田中宏明*****

1. はじめに

正常なホルモン作用に影響を与えることが疑われている外因性の物質(内分泌搅乱化学物質)による環境汚染問題が顕在化してきている。これらの物質は、極低濃度でも影響を及ぼす恐れがあることから大きな社会問題となっており、人の健康や生態系への影響を未然に防止する観点から、関係省庁や研究機関が種々の調査に取り組んでいる。建設省(現国土交通省)においても、健全な水環境を維持・向上するうえで必要不可欠な社会基盤施設である下水道に関する調査・検討を行うため、平成10年度に「下水道における環境ホルモン対策検討委員会」を設置し、下水に適した分析手法の開発及び下水処理場の処理工程における調査を地方公共団体と共同で実施¹⁾している。

調査対象物質は、環境庁(現環境省)の「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」²⁾において、内分泌搅乱作用を有すると疑われている化学物質リストの中から、生活排水または工場排水に含まれる物質を基本とし、国内生産量や環境中での検出状況を勘案し選定した25の化学物質と人畜由来ホルモン及びノニルフェノールの関連物質である。

天然のエストロゲンである 17β -エストラジオール(17β -estradiol; E2)、エストロン(estrone; E1)及び経口避妊薬(ピル)の主成分であるエチニルエストラジオール(ethynodiol; EE2)の女性ホルモン(エストロゲン)作用は、内分泌搅乱化学物質がエストロゲンのような働きをするエストロゲン様活性に比べ非常に強いことが知られている³⁾。

従って、内分泌搅乱化学物質の下水処理場での実態調査あるいは環境への影響評価においてエストロゲン作用の強いE2、E1、EE2を対象とすることは重要である。建設省の実態調査¹⁾ではE2を調査対象とし、比較的簡易に測定でき

る抗原抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)を用いて測定しているが、ELISAは対象物質と類似の物質も合わせて測定するなどの問題があるため、新たな方法の開発が望まれている。また、E1、EE2についても下水試料の測定に適した分析方法の開発が望まれている。

また、ノニルフェノキシ酢酸類(nonylphenoxy acetic acid; NPnEC, n = 0, 1, 2)は、非イオン界面活性剤のノニルフェノールエトキシレート(nonylphenol ethoxylate; NPEO)が好気性条件下で微生物分解を受けて生成することが知られている物質である⁴⁾。また、NPnECは内分泌搅乱作用を有すると疑われており⁵⁾、ノニルフェノール類の中ではノニルフェノールエトキシレートとともに注目すべき物質である。これらの下水処理過程、環境中での挙動はよく分かっておらず、現在その分析方法についての報告⁶⁾も少ないことから、ノニルフェノール類の挙動を調べる上で下水道に適した新たな分析方法の開発が必要である。

ここでは、下水試料を対象としたE2、E1、EE2の分析について、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS/MS)を用いた方法について検討した結果を報告するとともに、ノニルフェノキシ酢酸類については、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による分析法について検討した結果を報告する。

また、下水処理場の流入水と二次処理水について、本法によるエストロゲンの測定を行った結果を報告する。

2. 分析方法及び下水試料の測定

2.1 エストロゲンの分析方法

本方法は、下水試料中のE2の分析を目的として環境庁の暫定マニュアル⁷⁾を参考に種々の検討を行い提案⁸⁾した方法(バージョン1)を改良するとともに、さらにE1、EE2も測定対象物質に加えて検討を行ったものである。バージョン1では、

試料をろ過した後固相抽出し、フロリジルカートリッジと薄層クロマトグラフによるクリーンアップを行い、LC/MS/MS 分析を行ったが、試料前処理が煩雑であることから簡易化の検討を行ったものである。

試料の前処理は、以下の手順とした。試料 1000ml をガラス纖維ろ紙 (glass fiber filter B ; GF/B、孔径 1μm) でろ過する。ろ紙に残った浮遊物質 (suspended solid; SS) は、アセトン 5ml を用い 2 回抽出 (超音波利用) し、抽出液をろ液に合わせる。ろ液に内標準物質として 17 β -エストラジオールの重水素置換体 (17 β -エストラジオール-d3) を添加した後、通水直前にメタノールと精製水でコンディショニングした固相抽出用カートリッジ (Sep-pak C18) に通し、E2、E1、EE2 をカートリッジに吸着させる。ろ液を通したカートリッジは、遠心分離と窒素ガスを通すことにより脱水を行う。次に、酢酸エチル / メタノール (5:1) 5ml を通し E2、E1、EE2 を溶出させる。

溶出液は、窒素吹き付けにより濃縮乾固する。次に、酢酸エチル 2ml に溶解 (超音波利用) し、5%NaCl 1ml を加え激しく攪拌する (2 分)。

放置後、酢酸エチル層を別の容器に移し、5%NaCl 層に酢酸エチル 2ml 加え、再度激しく攪拌する。酢酸エチル層は、先の酢酸エチルに合わせ、無水硫酸ナトリウム (2g) を通し脱水する。酢酸エチルの入っていた容器を酢酸エチル 1~2ml で洗い、無水硫酸ナトリ

ウムカラムに通す。

脱水後の酢酸エチルを窒素吹き付けにより濃縮乾固する。次に、ヘキサン / ジクロロメタン (1:1) 1ml に溶解 (超音波利用) し、この溶解液をフロリジルカートリッジに通しクリーンアップする。溶解液の入っていた容器はヘキサン / ジクロロメタン (1:1 1ml で洗いフロリジルカートリッジに通す。

次にフロリジルカートリッジをヘキサン / ジクロロメタン (1:1) 10ml で洗浄する。フロリ

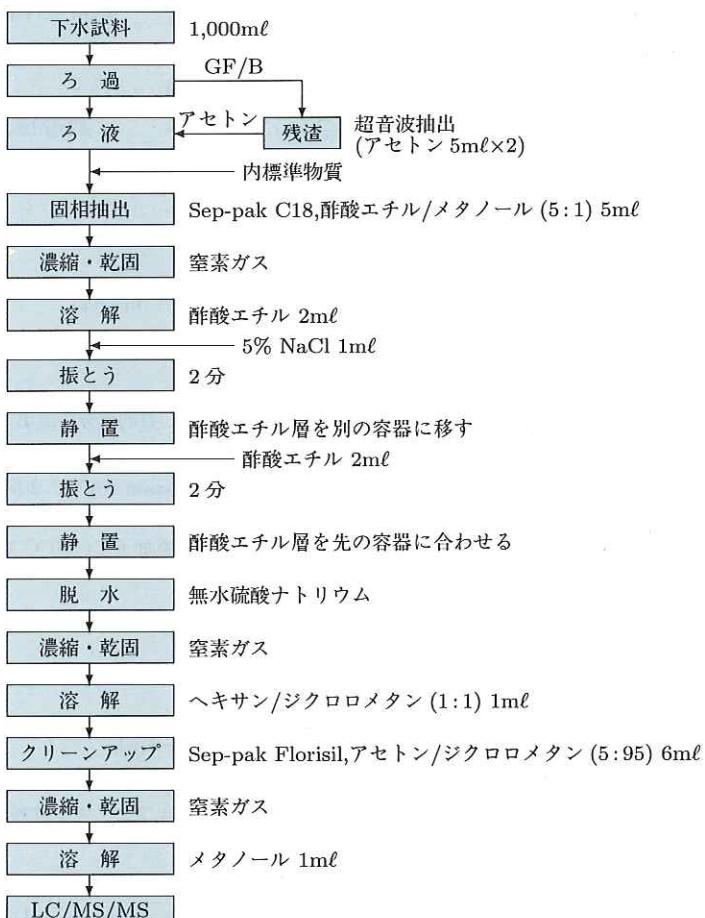


図-1 下水試料中のエストロゲン分析フロー

表-1 分析条件

LC/MS/MS	: TSQ, HP1100
カラム	: HP Zorbax Eclipse XDB-C18, 2.1mmφ × 150mm
移動相	: アセトニトリル / 水 (60:40), 0.15ml/min
注入量	: 10μl
イオン化方法	: AP-ESI Negative, Collision Energy 45eV, アルゴン 2.2~2.3 mTorr
測定イオン	: E2 (271~145), E1 (269~145), EE2 (295~145)

ジルカートリッジに吸着した E2、E1、EE2 は、アセトン/ジクロロメタン (5:95) 6mℓで溶出させる。溶出液を窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール 1mℓに再溶解後、遠心分離し上澄液を LC/MS/MS で測定する。分析操作フローを図-1、LC/MS/MS の分析条件を、表-1 に示す。

2.2 ノニルフェノキシ酢酸類の分析方法

分析は、磯部ら⁶⁾の方法を基に検討し下水試料に適した方法とするため、若干の変更を行った。試料 1000mℓをガラス纖維ろ紙 (GF/B、孔径 1μm) を用いてろ過する。ろ紙上の残査は、10mℓのメタノールで抽出し、ろ過試料と合わせる。ろ過試料を予めメタノール、精製水でコンディショニ

ングした固相カラム (Sep-pak tC18) に通水する。通水後、カラムを乾燥させないように注意しながら、予めメタノール、精製水でコンディショニングした強陰イオン交換樹脂カラム (Varian SAX) を tC18 の下に連結する。

次に、メタノールを 1mℓ/min の流速で 5mℓ 通過させ、tC18 より目的成分を溶出させると同時に、SAX に陰イオン性の物質を捕集する。tC18 を取り除き、SAX に 20%塩酸/メタノールを 1mℓ/min の流速で 5mℓ 通過させ、目的成分を溶出する。溶出液に 14%三フッ化ホウ素 (BF₃)/メタノールを 0.5mℓ 加え、90 °C で 1 時間加熱してメチル化を行う。

放冷後、精製水 2mℓ、ヘキサン 1mℓを加えて

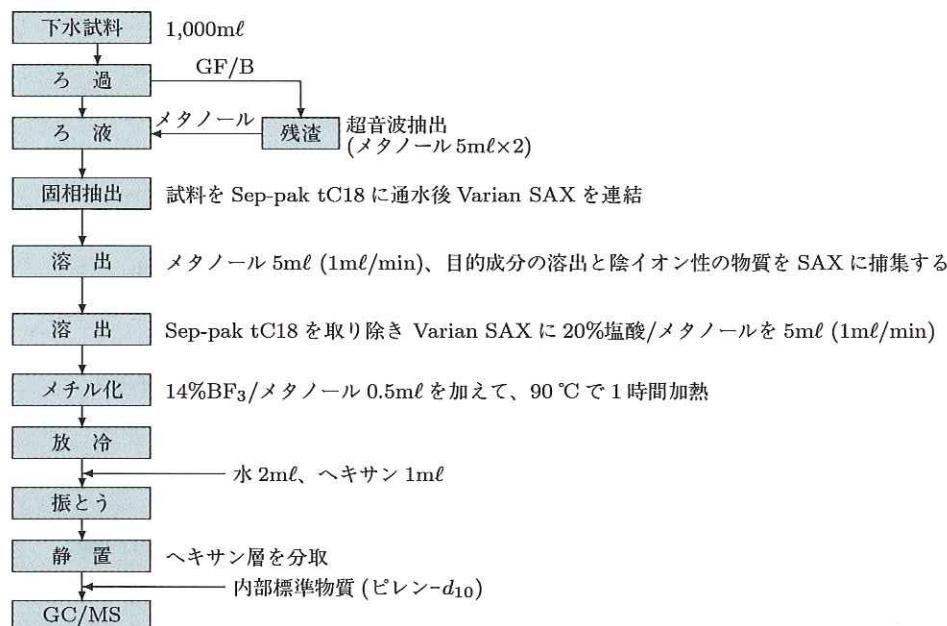


図-2 下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類分析フロー

表-2 GC/MS 分析条件

GC 条件	カラム	HP-5MS 30m × 0.25mm df=0.25μm
	カラム温度	100 °C (1min) ~ 12 °C/min ~ 300 °C (1min)
	注入口温度	300 °C
	注入法	パレスドスプリットレス
	キャリアガス流量	1.2mL/min
MS 条件	インターフェイス温度	300 °C
	イオン源温度	230 °C
	イオン化法	EI
	イオン化電圧	70eV
	検出モード	SIM (定量イオン；221.2, 265.2, 309.2)

液・液抽出を行う。ヘキサン層を分取し、内部標準物質としてピレンの重水素体(ピレン-d₁₀)を加えた後、GC/MSによる定量を行う。分析操作フローを図-2、GC/MSの分析条件を表-2に示す。

2.3 下水試料中のエストロゲンの測定

処理能力 5,000~500,000m³/day の 18 処理場において流入下水と二次処理水を対象に本分析法を用いたエストロゲンの測定を行った。測定試料数はそれぞれ 35 検体である。また、測定試料の採取は、平成 12 年 8 月~12 月にかけて実施した。

3. 結果と考察

3.1 エストロゲンの分析方法

測定値の信頼性に関わる検出下限値、定量下限値、回収率は以下のとおりである。一般に検出下限値、定量下限値は、繰り返し測定のバラツキを標準偏差(S)で表し、3S を検出下限値とし、10S を定量下限値としている。本試験での標準溶液の LC/MS/MS 測定の繰り返し精度を表-3 に示す。また、試料中の目的物質の回収率を求める

表-3 標準液の繰り返し測定試験結果

	濃度	測定値	平均	S
E2 (ng/μl)	0.002	0.0020	0.0021	0.00015
		0.0022		
		0.0019		
		0.0020		
		0.0019		
		0.0023		
		0.0021		
E1 (ng/μl)	0.002	0.0022	0.0020	0.00014
		0.0018		
		0.0020		
		0.0020		
		0.0020		
		0.0018		
		0.0019		
EE2 (ng/μl)	0.002	0.0021	0.0019	0.00016
		0.0019		
		0.0019		
		0.0017		
		0.0020		
		0.0017		
		0.0017		

表-4 添加回収試験結果

	添加濃度	E2		E1		EE2		
		測定値	回収率	測定値	回収率	測定値	回収率	
		(μg/ℓ)	(%)	(μg/ℓ)	(%)	(μg/ℓ)	(%)	
精製水	0.040	無添加	0.0000	—	0.0000	—	0.0000	—
		0.0390	98	0.0467	117	—	—	
		0.0414	104	0.0440	110	0.0391	98	
		0.0408	102	0.0465	116	0.0341	85	
		0.0424	106	0.0439	110	0.0363	91	
		0.0380	95	0.0442	111	0.0376	94	
		0.0442	111	0.0456	114	0.0374	94	
二次処理水	0.040	無添加	0.0004	—	0.0028	—	0.0000	—
		0.0382	95	0.0435	102	0.0371	93	
		0.0369	91	0.0404	94	0.0366	91	
		0.0383	95	0.0428	100	0.0380	95	
		0.0347	86	0.0386	90	0.0399	100	
		0.0367	91	0.0382	89	0.0382	96	
		無添加	0.0052	—	0.0141	—	0.0000	—
一次処理水	0.040	0.0468	104	0.0612	118	0.0404	101	
		0.0427	94	0.0648	127	0.0409	102	
		0.0426	94	0.0682	135	0.0369	92	
		0.0461	102	0.0620	120	0.0418	105	
		0.0427	94	0.0499	89	0.0354	88	
		0.0410	90	0.0487	86	0.0420	105	

表-5 標準試料の繰り返し分析結果 (ng/μℓ)

No.	NP0EC	NP1EC	NP2EC
1	0.071	0.045	0.046
2	0.066	0.042	0.041
3	0.065	0.041	0.042
4	0.064	0.042	0.044
5	0.063	0.040	0.040
平均	0.066	0.042	0.043
S	0.0031	0.0019	0.0024

試験として、既知濃度を試料に添加し、本試験での回収率を求めた。その添加回収試験の結果を表-4に示す。

表-3の繰り返し試験のバラツキから、3Sを検出下限値とすると約0.0005ng/μℓとなる。下水試料の分析では、前処理段階で1000倍濃縮することから、下水試料の検出下限値を0.0005μg/ℓとする。同様に、定量下限値は10Sとすると0.0015μg/ℓとなる。

また、精製水、二次処理水、一次処理水を用いた添加回収試験の回収率は、それぞれ平均で92~113%であり良好な結果であった。

3.2 ノニルフェノキシ酢酸類の分析方法

NPnECの標準メタノール溶液をメチル化し、繰り返し分析した結果を表-5に示す。10Sを定量下限値とすると、定量下限値は約0.03ng/μℓとすることができる。下水試料の分析では、前処理段階で1000倍濃縮することから下水試料の定量下限値は0.03μg/ℓとする。

精製水、二次処理水、一次処理水への添加回収試験の結果を表-6に示す。いずれも77%以上の回収率となっており良好な結果が得られた。

3.3 下水試料中のエストロゲンの測定

下水試料の分析結果を表-7に示す。18ヶ所の処理場において調査した結果、流入水中のE2は、流入水で0.0036~0.020μg/ℓ(中央値0.0091μg/ℓ)、二次処理水でND~0.0033μg/ℓ(中央値0.0004μg/ℓ)、E1は、流入水で0.014~0.077μg/ℓ(中央値0.046μg/ℓ)、二次処理水でND~0.10μg/ℓ(中央値0.0064μg/ℓ)、EE2は、流入水、二次処理水とも検出下限値(0.0005μg/ℓ)以下であった。下水処理におけるE2の除去率は概ね96%、E1の除去率は概ね86%であった。E1はE2に比べ下水処理での除去率が低くなっているが、E1はE2に

表-6 添加回収試験結果 (%)

		NP0EC	NP1EC	NP2EC
精製水 (1μg/ℓ)	1	95.8	91.8	87.5
	2	97.3	88.1	78.9
	3	92.6	86.6	77.9
	4	94.4	88.1	79.9
	5	91.0	89.7	82.1
	平均	94.2	88.9	81.3
CV(%)		2.7	2.2	4.7
二次処理水 (3μg/ℓ)	1	96.7	95.6	89.7
	2	99.6	97.7	90.3
	3	97.8	98.3	94.5
	4	83.1	84.1	80.2
	5	102	102	97.7
	平均	95.8	95.5	90.5
CV(%)		7.7	7.1	7.3
一次処理水 (4μg/ℓ)	1	98.1	97.2	90.8
	2	97.3	97.9	95.3
	3	99.3	102	102
	4	98.6	100	95.3
	5	98.9	100	102
	平均	98.4	99.4	97.1
CV(%)		0.8	1.9	5.0

注: ()内の数値は、標準物質添加濃度

表-7 下水中的エストロゲン測定結果 (μg/ℓ)

	n	E2	E1	EE2
流入水	35	0.0091 (0.0036~0.020)	0.046 (0.014~0.077)	ND (ND)
処理水	35	0.0004 (ND~0.0033)	0.0064 (ND~0.10)	ND (ND)

上段: 中央値、下段: 範囲、ND: 検出下限値未満

比べ分解速度が遅い⁹⁾ことが原因として考えられる。

4.まとめ

4.1 エストロゲンの分析方法

LC/MS/MSによるE2、E1、EE2の測定方法の検討を行い、以下の結果が得られた。本分析法での下水試料の定量下限値は0.0015μg/ℓ、回収率は92~113%であった。また、E2測定を目的としたバージョン1に比べ、薄層クロマトグラフによるクリーンアップに代え酢酸エチルを用いた液

液抽出したことにより操作がやや簡易になって
いる。

4.2 ノニルフェノキシ酢酸類の分析方法

GC/MS による下水試料の NPnEC 分析について検討を行い、以下の結果を得た。本分析法での下水試料の定量下限値は $0.03\mu\text{g}/\ell$ 、回収率は 81%以上であった。

今後は、本方法を用い下水処理過程における NPnEC の挙動調査を実施していく予定である。

4.3 下水試料中のエストロゲンの測定

本法により下水中の E2、E1、EE2 を測定した結果、E2 は、流入水で $0.0036\sim0.020\mu\text{g}/\ell$ (中央値 $0.0091\mu\text{g}/\ell$)、二次処理水で ND~ $0.0033\mu\text{g}/\ell$ (中央値 $0.0004\mu\text{g}/\ell$)、E1 は、流入水で $0.014\sim0.077\mu\text{g}/\ell$ (中央値 $0.046\mu\text{g}/\ell$)、二次処理水で ND~ $0.10\mu\text{g}/\ell$ (中央値 $0.0064\mu\text{g}/\ell$)、EE2 は、流入水、二次処理水とも検出下限値 ($0.0005\mu\text{g}/\ell$) 以下であった。

本手法により下水試料中のエストロゲン (E2、E1、EE2) 及びノニルフェノキシ酢酸類の測定が可能となった。これらの物質を下水道における内分泌搅乱化学物質調査マニュアル(案)¹⁰⁾で調査対象としている化学物質に加えることにより、より充実した調査が実施されることを期待する。

参考文献

- 建設省都市局下水道部：平成 11 年度下水道における内分泌搅乱化学物質に関する調査報告書、建設省都市局下水道部、2000.
- 環境庁：外因性内分泌搅乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98、環境庁、1998.
- 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定、環境工学研究論文集、第 36 卷、pp.199-208、1999.
- 小森行也、田中宏明、竹嶽健治：活性汚泥処理プロセスにおける NP、NPEO の挙動、第 37 回下水道研究発表会講演集、pp.713-715、2000.
- E. Routledge and J. Sumpter : Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen, Environ. Toxicol. Chem., Vol.15, No.3, pp.241-248, 1996.
- 磯部友彦、高田秀重：環境試料中のノニルフェノールエトキシカルボン酸 (NPEC) の分析、第 9 回環境化学討論会、pp.48-49、2000.
- 環境庁水質保全局：外因性内分泌搅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、1998.
- 小森行也、高橋明宏、田中宏明：LC/MS による下水試料中の 17β -エストラジオールの分析、第 9 回環境化学討論会講演要旨集、pp.346-347、2000.
- A.C.Belfroid et al. : Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, The Science of the Total Environment, 225, pp.101-108, 1999.
- 日本下水道協会：下水道における内分泌搅乱化学物質調査マニュアル(案)、日本下水道協会、2001.

小森行也*



独立行政法人土木研究所水循環研究グループ
水質チーム主任
研究員
Koya KOMORI

八十島誠**



同 水循環研究グループ
水質チーム交流
研究員
Makoto YASOJIMA

高橋明宏***



東京都下水道局三河
島処理場
(前 國土交通省土木
研究所下水道部水質
研究室研究員)
Akihiro TAKAHASHI

矢古宇靖子****



(前 國土交通省土木
研究所下水道部水質
研究室重点研究支援
協力員)
Yasuko YAKOU

田中宏明*****



独立行政法人土木研究所水循環研究グループ
水質チーム上席
研究員
Hiroaki TANAKA