

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11670

研究課題名(和文)ビスフェノールSの塩素置換体による水環境汚染の実態解明

研究課題名(英文)Contamination of chlorinated bisphenol S in aquatic environment.

研究代表者

山田 建太 (Yamada, Kenta)

常葉大学・社会環境学部・講師

研究者番号：60637057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビスフェノールA(BPA)の代替物質に位置付けられており、感熱紙の顔色剤として使用されているビスフェノールS(BPS)と、その塩素置換体(Cl-BPS)による水環境汚染の実態を調査した。まずmonoCl-BPS、diCl-BPS、triCl-BPS、tetraCl-BPSの標準品を合成し、排水、底質、魚類試料中のBPSとCl-BPSの分析方法を構築した。製紙・パルプ工場の排水が流入する排水路から海域に放流されている排水を採取し分析した結果、BPSと4種のCl-BPSが検出された。BPSだけでなく、非意図的に生じたと推測されるCl-BPSが環境中に放流されていることが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、BPSだけでなくCl-BPSも環境中に放流されていることが初めて明らかにされた。Cl-BPSについては、標準品が市販されていないこと、これまで実試料からの検出例がなかったことから、リスク評価に必要な情報がほとんどない。Cl-BPSは、BPSよりも疎水性が高いことが指摘されており、環境や生態系への蓄積性が高いと推測される。今後は、BPSに起因するリスクを高度に評価するために、Cl-BPSも含めた生体・生態系への影響評価や、環境負荷量の把握が必要となることから、本研究で合成した標準品や、構築した分析方法、排水中の濃度モニタリングデータが重要な役割を果たすと言える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, concentrations of bisphenol S (BPS), a bisphenol A alternative used in the manufacturing of thermal paper, and its chlorinated derivatives (Cl-BPS), were investigated in aquatic environments. First, we synthesized different types of Cl-BPS (monoCl-BPS, diCl-BPS, triCl-BPS, and tetraCl-BPS) to use as standards, and developed an analytical method for the detection of BPS and Cl-BPS in wastewater, sediment, and fish samples. BPS and Cl-BPS were detected in effluent from paper and pulp mills that contained wastewater. This result indicates that unintentionally generated Cl-BPS is released into the aquatic environment.

研究分野：環境分析化学

キーワード：水環境汚染 ビスフェノールS 塩素置換体 非意図的生成物 分析法の構築

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビスフェノール S (BPS) は、ポリカーボネート樹脂の原料、感熱紙の顕色剤として、国内外で広く使用されている。BPS は、内分泌かく乱作用を有することが懸念されているビスフェノール A (BPA) の代替物として位置付けられているが、エストロゲン様作用や抗アンドロゲン作用を有することが報告されており、決して安全な代替物とは言えないことが指摘されている。また、国内外の環境水や底質から BPS が検出されたことが報告されており、国内では製紙工場排水による負荷量が多いことが指摘されている。図 1 に BPS と BPA の分子構造式を示す。

古紙再生工場における漂白工程や廃水処理に、塩素処理が採用されている場合、処理過程で廃水中のフェノール類から、塩素置換体が生じる可能性があることが知られており、過去には古紙再生工場の排水中から塩素置換 BPA が検出されたことが報告されている。BPA の代替物質として近年使用量が増加している BPS についても、塩素処理過程で非意図的に塩素置換 BPS (Cl-BPS) が生じると推測されるが、それらの標準品が市販されていないことから、Cl-BPS を分析対象とした報告はまだ見当たらない。

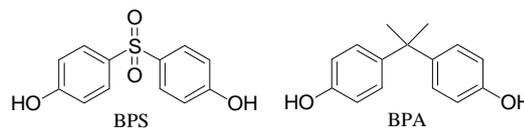


図 1 BPS と BPA の分子構造式

2. 研究の目的

本研究では、まず Cl-BPS の標準品の合成を目的とした。次に、合成により入手した標準品を用いて、排水、底質、魚類試料中の Cl-BPS の分析方法を検討した。そして、構築した分析法を用いて、製紙・パルプ関連工場の排水が多く流入する工業専用排水路から海域に放流されている排水を採水し、定期的に Cl-BPS を分析した。さらに、その排水が流れ込む港湾で採取した底質や、排水の吐出口周辺で捕獲した魚類を試料とし、Cl-BPS を分析することで、塩素処理過程で非意図的に生じ、水環境中に放流されていると推測される Cl-BPS による水環境汚染の実態を把握することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 塩素置換 BPS 標準品の合成

メタノールに溶解した BPS に、次亜塩素酸ナトリウム溶液を滴下し、室温で 2 時間攪拌した。亜硫酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止した後、6M 塩酸で pH を 3 以下に調整し、酢酸エチルで生成物を抽出した。高速液体クロマトグラフィーを用いて、生成物を単離・精製し、¹H-NMR スペクトルと、GC-MS 測定から得られるマススペクトルから分子構造式を決定した。本研究で合成した Cl-BPS の分子構造式を図 2 に示す。

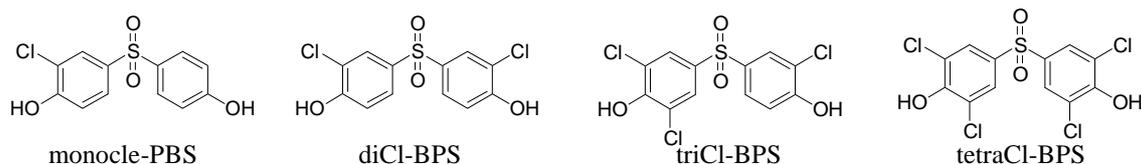


図 2 Cl-BPS の分子構造式

monoCl-BPS: 3-chloro-4-hydroxyphenyl 4-hydroxyphenyl sulfone

diCl-BPS: bis(3-chloro-4-hydroxyphenyl) sulfone

triCl-BPS: 3-chloro-4-hydroxyphenyl 3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl sulfone

tetraCl-BPS: bis(3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl) sulfone

(2) 分析方法の検討

本研究では、BPS と 4 種の Cl-BPS の分析方法を確立するために、固相抽出 誘導体化 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による前処理・分析条件を検討した。

排水試料の前処理・分析方法の検討: 超純水に BPS、Cl-BPS、BPA を添加し、ろ過・pH 調製後、固相カートリッジに 5 mL/min の速度で通水した。固相カートリッジを乾燥し、酢酸エチルとメタノールで溶出した後、溶出液を窒素気流下で濃縮し、誘導体化後に GC-MS/selected ion monitoring (SIM) で測定した。また *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (BSTFA:TMCS) を誘導体化試薬として用いたとき、誘導体化に要する反応時間を検討した。さらに、固相カートリッジを検討する為に、3 種のカートリッジ (Oasis HLB plus 225 mg, MCX plus 225 mg, Sep-Pak tC18 plus 400 mg, Waters) による回収率を比較した。

底質試料の前処理・分析方法の検討：モデル底質試料とした土壌 20 g に BPS と Cl-BPS、参考物質として BPA、サロゲート物質として BPA-*d*₁₆ と BPS-*d*₈ を添加し、超音波抽出、クリーンアップ後、GC-MS/SIM で測定し、回収率を確認した。

クリーンアップ方法として、溶媒抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、固相抽出カートリッジ (ENVI-Carb/NH500 mg、Oasis MAX plus 225 mg、Oasis MCX plus 225 mg) を検討した。

魚類試料の前処理・分析方法の検討：魚肉 20 g に BPS と Cl-BPS、BPA、サロゲート物質として BPA-*d*₁₆ と BPS-*d*₈ を添加し、メタノールを加えてホモジナイズした。超音波抽出、クリーンアップ後、GC-MS/SIM で測定し、回収率を確認した。底質試料と同様に、クリーンアップ方法として、溶媒抽出と固相抽出カートリッジ (ENVI-Florisisil 500 mg、Oasis MCX plus 225 mg) を検討した。

(3)試料の採取

排水試料：静岡県富士市の工業排水専用排水路の吐出口から、海域に放流される排水を採水した。排水試料は、2019年3月から2021年4月の間に、定期的に13回採水した。

排水試料は、その日のうちにろ過・pH調整後、その500 mLを試料とし、本研究で構築した前処理・分析法によって BPS、Cl-BPS、BPA を測定した。また、参考のために、pH、水温、SS、COD も測定した。

底質試料：排水試料の採水地点と同じ場所で、エクマンバージ採泥器を用いて底質試料を採取した。底質試料は2019年3月から2021年4月の間に、6回採取した。底質試料は分析するまで -80 で保存した。

魚類試料：排水の吐出口周辺で、釣りによってクサフグ (*takifugu alboplumbeus*) 1 試料 (体長 12.0 cm、体重 44.92 g)、クロダイ (*acanthopagrus schlegelii*) 2 試料 (体長 40.1 cm、体重 1495.4 g) (体長 38.0 cm、体重 1495.4 g) を捕獲し、魚類試料とした。捕獲した魚類試料から筋肉部位を切り取り、分析するまで -80 で保存した

4. 研究成果

(1)塩素置換 BPS の合成

4 種の塩素置換 BPS を合成・精製できたことが、¹H-NMR スペクトルとマスペクトルから確認された。¹H-NMR のケミカルシフト値を以下に示す。また GC-MS により得られた TIC から、純度が 99% 以上であることが確認されたため、これを標準品として以降の実験に用いた。

- monoCl-BPS: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.81 ppm (*d*, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.74 ppm (*dd*, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 2H), 7.64 ppm, *dd*, *J* = 2.0, 9.0 Hz, 1H), 7.00 ppm (*d*, *J* = 8.5, 1H), 6.90 ppm (*dd*, *J* = 2.3, 8.8 Hz, 2H).
- diCl-BPS: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.88 ppm (*d*, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.69 ppm (*dd*, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 2H), 7.05 ppm (*d*, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 2H).
- triCl-BPS: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.90 ppm (*d*, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.83 ppm (*s*, 2H), 7.71 ppm (*dd*, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 1H), 7.05 ppm (*d*, *J* = 8.5 Hz, 1H).
- tetraCl-BPS: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.88 ppm (*s*, 4H).

(2)分析法の検討結果

排水試料の前処理・分析法の検討結果：誘導体化に要する反応時間を検討するために、BPS とその塩素置換体を BSTFA:TMCS によって、10、30、60、90 分の反応時間で誘導体化し、GC-MS で測定した。その結果、反応時間 60 分の条件で全ての物質において最もピーク面積値が高かった。また塩素置換 BPS については、反応時間 90 分ではピーク面積値が低下したことから、反応時間は 60 分と設定して以降の実験を行った。

添加回収実験により、3 種の固相カートリッジの回収率を比較した。BPS と Cl-BPS の回収率を図 3 に示す。固相カートリッジとして tC18 を用いた条件では、回収率は 21.8 ~ 132.8% (RSD: 3 ~ 22%) であり 4 種の塩素置換 BPS の回収率は比較的良好であったが、BPS の回収率が 21.8% と低かった。HLB (回収率: 78.2 ~ 102.7%、RSD: 15 ~ 33%) と、MCX (回収率: 78.2 ~ 102.5%、RSD: 15 ~ 22%) では、BPS とその塩素置換体のいずれにおいても回収率は良好であった。また、参考物質とした BPA の回収率も 91.2 ± 4.8% であった。そこで、回収率と再現性が高かった MCX を用いて、排水試料の前処理を行うこととした。

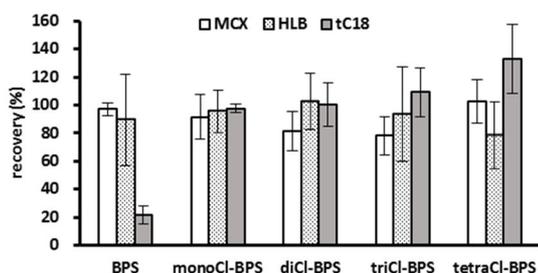


図 3 固相抽出カートリッジの種類による BPS と Cl-BPS の回収率の比較

底質試料の前処理・分析法の検討結果：モデル底質試料 20 g に濃塩酸 2 mL を加えた後に、メタノールとアセトン（1：1）の混合溶媒を 20 mL 加え、10 分間超音波抽出し、遠心分離（3000 rpm）によって上澄みを分取した。この操作を 3 回繰り返して得られた抽出液を溶媒抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、固相抽出カートリッジで精製し、回収率と夾雑物の除去を確認した。その結果、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと、固相抽出（ENVI-Carb/NH）では、夾雑物を十分除去でき、BPA の回収率は良好であったが、BPS と Cl-BPS はほとんど回収できなかった。そこで、溶媒抽出によって精製した後、さらに固相抽出（MCX）で精製する方法を検討した。

抽出液をエバポレーターで約 5 mL まで濃縮し、pH3 以下にした 5%塩化ナトリウム水溶液 500 mL に加え、酢酸エチルで溶媒抽出した。酢酸エチル相を濃縮し、少量のメタノールで溶解して、pH を 3 以下にした超純水に加えて、固相カートリッジ（MCX）に 5mL/min で通水した。通水後、20%MeOH 水溶液でカートリッジを洗浄し、酢酸エチル 5 mL とメタノール 5 mL で溶出した。溶出液を濃縮乾固し、誘導体化後、GC-MS/SIM で分析した。この前処理方法では、夾雑物を十分除去でき、かつモデル底質試料に添加した測定対象物質について、比較的良好な回収率（BPS: 96.8%、monoCl-BPS: 57.1%、diCl-BPS: 58.9%、triCl-BPS: 76.1%、tetraCl-BPS: 113.0%、BPA: 92.2%）であったことから、採取した底質試料については、この方法で前処理・分析した。

魚類試料の前処理・分析法の検討結果：魚類試料 20 g にメタノールを 20 mL 加えてホモジナイズした後、10 分間超音波抽出し、遠心分離（3000 rpm）によって上澄みを分取した。この操作を 3 回繰り返して得られた抽出液を溶媒抽出、固相抽出カートリッジで精製し、回収率と夾雑物の除去を確認した。その結果、固相抽出（Florisil）では、夾雑物を十分除去でき、BPA の回収率は良好であったが、BPS と Cl-BPS はほとんど回収できなかった。

そこで、溶媒抽出によって精製した後、さらに固相抽出（MCX）で精製する方法を検討した。抽出液に超純水 5 mL 加えて分液ロートに移し、*n*-ヘキサン 50 mL を加えて振とうし、*n*-ヘキサン相を廃棄した。この操作を 3 回繰り返した。抽出液はエバポレーターで約 5 mL まで濃縮し、pH3 以下にした 5%塩化ナトリウム水溶液 500 mL に加え、酢酸エチルで溶媒抽出した。酢酸エチル相を濃縮し、少量のメタノールで溶解して、pH を 3 以下にした超純水に加えて、固相カートリッジ（MCX）に 5mL/min で通水した。通水後、20%MeOH 水溶液でカートリッジを洗浄し、酢酸エチル 5 mL とメタノール 5 mL で溶出した。溶出液を濃縮乾固し、誘導体化後、GC-MS/SIM で分析した。その結果、測定対象物質の回収率は、BPA（99.2%）、BPS（114.7%）と良好であったが、monoCl-BPS（39.7%）、diCl-BPS（32.7%）、triCl-BPS（40.4%）、tetraCl-BPS（18.1%）と Cl-BPS については低かった。より回収率の高い前処理方法の検討が必要であるが、妨害ピークとなる脂質を十分除去できたことから、捕獲した魚類試料については、この方法で前処理・分析した。

(3) 試料の分析結果

排水試料の分析結果：本研究で構築した分析法によって排水試料を分析した結果、BPS と 4 種の Cl-BPS、BPA が検出された。検出された対象物質の濃度を表 1 に示す。BPS は全ての排水試料から検出され、平均濃度は 45.42 µg/L であった。排水試料の分析を開始した 2019 年から 2021 年の間、継続して BPS が検出されており、2021 年 4 月に採水した排水試料では、186.18 µg/L の濃度で検出された。BPA も全ての排水試料から検出され、平均濃度は 1.98 µg/L であった。

本研究で対象とした排水試料は、2021 年現在 86 工場が利用している工業排水専用排水路の放流水であり、約 7 割が製紙・パルプ工場である。特に国内では、感熱紙への使用について、BPA から BPS への代替が進んでいることが指摘されていることから、BPA より BPS の方が高濃度で検出されたと推測される。

分析対象とした Cl-BPS の中で、最も検出頻度が高かった monoCl-BPS は、全ての排水試料から検出された。その平均濃度は 1.77 µg/L であった。その他、diCl-BPS、triCl-BPS、tetraCl-BPS の検出頻度は約 60% であり、平均濃度はそれぞれ、2.08、3.00、10.12 µg/L であった。4 種の Cl-BPS では monoCl-BPS は検出頻度が高いが比較的濃度は低く、triCl-BPS は比較的高濃度で検出される傾向がみられた。

底質試料の分析結果：BPS と BPA が、全ての底質試料から検出され、平均濃度はそれぞれ 3.11、1.60 µg/g であった。また、Cl-BPS については、diCl-BPS と tetraCl-BPS のピークが検出されたが、定量下限値以下であり、monoCl-BPS と triCl-BPS については、検出限界値以下であった。

本研究では排水の吐出口周辺で底質を採取したが、この地点は水深が約 4 m と比較的浅く、流

れも速いことから、定常的に底質が堆積していなかった。そのため、排水中の対象物質が蓄積していなかったと考えられる。今後は、底質の採取地点を検討して再度底質の分析を行う必要がある。

表 1 排水試料[$\mu\text{g/L}$]と底質試料[$\mu\text{g/g}$]から検出された BPS、Cl-BPS、BPA の濃度

	BPA	BPS	monoCl-BPS	diCl-BPS	triCl-BPS	tetraCl-BPS
排水($n=13$)						
平均	1.98	45.42	1.77	2.08	3.00	10.12
中央値	1.21	31.78	1.64	2.35	2.92	11.60
範囲	0.62-4.56	2.59-186.18	NQ-3.21	ND-3.09	ND-3.66	ND-18.26
底質($n=6$)						
平均	1.60	3.11	ND	ND	ND	ND
中央値	1.60	3.25	0.00	0.00	0.00	0.00
範囲	1.20-2.23	2.03-3.80	ND	NQ	ND	NQ

NQ: Not Quantified (S/N < 10)

ND: Not Detected (S/N < 3)

魚類試料の分析結果：捕獲した魚類から、対象物質は検出されなかった。本研究では、捕獲した魚類サンプル数が少なく、前処理・分析方法による Cl-BPS の回収率が低かったため、より精度の高い情報を得るために、今後より回収率の高い分析法へと改良し、魚類サンプルの数を増やして調査する必要がある。

本研究では、Cl-BPS の標準品を合成し、それを用いて、前処理・分析法を構築した。その分析法によって排水試料を分析した結果、非意図的生成物である Cl-BPS が比較的高い頻度で検出された。これより、BPS だけでなく Cl-BPS も環境中に放流されていることが明らかにされた。Cl-BPS については、標準品が市販されていないこと、これまで実試料からの検出例がなかったことから、リスク評価に必要な情報がほとんどない。

本研究結果によって、国内外で広く使用されている BPS に起因する環境リスクを、より高度に評価するために、Cl-BPS も含めた生体・生態系への影響評価や、環境負荷量を把握するための調査の進展が期待される。その時に、本研究で合成した標準品や、構築した前処理・分析法、分析データが重要な役割を果たすと考えられることから、本研究成果は環境汚染化学物質のリスク評価の高度化に寄与する知見といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田建太, 水野翔太, 小川浩, 寺崎正紀, 牧野正和
2. 発表標題 塩素置換ビスフェノールSの分析法の検討
3. 学会等名 日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田建太, 水野翔太, 小川浩, 寺崎正紀, 牧野正和
2. 発表標題 塩素置換ビスフェノールSの分析法の検討と工場排水からの検出
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田建太, 小川浩, 寺崎正紀, 牧野正和
2. 発表標題 工場排水と底質中の塩素置換ビスフェノールSの分析
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------