

報 文

ビスフェノール A 及びノニルフェノールの固相抽出による
濃縮/液体クロマトグラフィー及び直接液体クロマトグラ
フィー/質量分析米久保 淳^{®*}, 佐々木俊哉*, 一木満貴子*, 金井みち子*, 佐々木秀輝*Concentration of bisphenol A and nonylphenol by solid-phase
extraction and direct analysis by LC/MS

Jun YONEKUBO, Syunya SASAKI, Makiko ICHIKI, Michiko KANAI and Hideki SASAKI*

* Nihon Waters K.K., No.5 Koike Bldg., 1-3-12, Kita-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001

(Received 18 January 1999, Accepted 6 April 1999)

Concentration by solid phase extraction (SPE) and LC/MS direct analysis methods has been established for bisphenol A (BSA) and nonylphenol (NP) as endocrine disruptors (ED) samples. In 1) concentration by SPE, used for reverse-phase cartridge, on average for 5-times analysis of the % recovery with % the RSD is higher than 80% and less than 17%, respectively. 2) Of the three ionization methods (EI, APCI and ESI) for LC/MS detection, ESI is considered because of better ionization concerning sensitivity. The limit of detection (LOD) according to a method based on the standard deviation (SD) of the measurement is 0.07 ng ml^{-1} (BSA) and 0.73 ng ml^{-1} (NP), respectively, from this LC/MS method with ESI detection. Considering the result from a blank test, the detection limit of this method was chosen to be 0.1 ng ml^{-1} (BSA) and 7.0 ng ml^{-1} for a real-sample analysis. This method also provides good reproducibility (% RSD < 3.2) and linearity ($r^2 > 0.99$) from each LOD mentioned above to the 1000 ng ml^{-1} range.

Keywords : bisphenol A; nonylphenol; endocrine disruptors; LC/MS.

1 緒 言

近年,世界的にいわゆる環境ホルモン(外因性内分泌攪乱物質)に対する関心が高まっており,その分析対象化合物数は環境庁の環境ホルモン戦略計画 SPEED'98(1998年5月公表)でモニタリングされる化合物で67物質(群),米国環境保護局(EPA)のスクリーニング

プログラムでは実に86000化合物に上っており,その数は今後更に増大する可能性がある.しかし,これら化合物の環境中の濃度や分布状態,体内摂取時の動態等に関しては必ずしも明確ではなく,これらの総合的研究が開始された現在,環境あるいは生体中のこれら化合物の濃度を高感度で分離・分析する方法の確立が急務とされている.現在,前述のSPEED'98に挙げられた67の化合物については暫定的なモニタリング手法が1998年7月に公表され,随時その更新が行われているが,基本的

* 日本ウォーターズ株式会社: 140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル

な考え方¹⁾としては、1) 環境中の濃度を可能な限り低濃度まで測定することが望まれる。当面、話題となっている化合物群については、環境水（河川、海水等）については検出下限 0.01 ppb (10 ng/l) 程度、排水等については検出下限 0.1 ppb (100 ng/l) 程度を目安として測定方法を設定する。2) 分析の効率化とコストの切り詰めを図る必要があり、可能な限り多成分の同時一括分析を組み合わせる測定方法としていくことが必要である。3) 分析技術は日進月歩の進歩を遂げており、現時点で適当な分析法と考えられる方法も新しいより良い分析方法に置き換えられるべきである、といった提唱がなされている。これらの方針、特に上記 1) 及び 2) を満たす分析方法として現行法ではガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) が主要となっているが、一部の化合物については蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が採用されている。一方、従来より医薬品²⁾食品分析³⁾で用いられている高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) が大気⁴⁾、有機金属^{5,6)}、環境中化学物質安全性総点検調査（環境庁環境安全課）のプライオリティーリスト掲載^{7,8)}の化合物や農薬^{9)~11)}等、環境分野での応用も試みられている。本研究では現在、トリメチルシリル¹⁾又はアセチル¹²⁾誘導体化後、GC/MS に供されているビスフェノール A (BSA) と未誘導のまま直接 GC/MS にて測定されているノニルフェノール (NP) の固相抽出による濃縮法と、LC/MS による直接（非濃縮）同時分析法について検討、更にポリカーボネート (PC) 製試料瓶をモデルとした実分析に応用した。

2 実 験

2.1 試薬及び溶媒

BSA と NP は特級を、純水、メタノールとアセトニトリルは HPLC 用を、*tert*-ブチルメチルエーテルは残留農薬試験用（いずれも関東化学製）を使用した。固相抽出には Oasis HLB カートリッジ 6cc/200mg（ウォーターズ製）を用いた。

2.2 固相抽出法による濃縮

各 3 ml の 10% メタノール含有 *tert*-ブチルメチルエーテル、メタノール次いで純水でコンディショニングした固相抽出カートリッジに、リン酸にて pH 3.0 に調整した BSA と NP の 4 段階の濃度勾配を持つ標準品添加純水を 500 ml 通水、3 ml の 5% メタノールで洗浄後、6 ml の 10% メタノール含有 *tert*-ブチルメチルエーテルで溶出、濃縮・乾固後、アセトニトリル 1 ml で再溶解したものを、HPLC 分析の供試料とした。Fig. 1 に固相抽

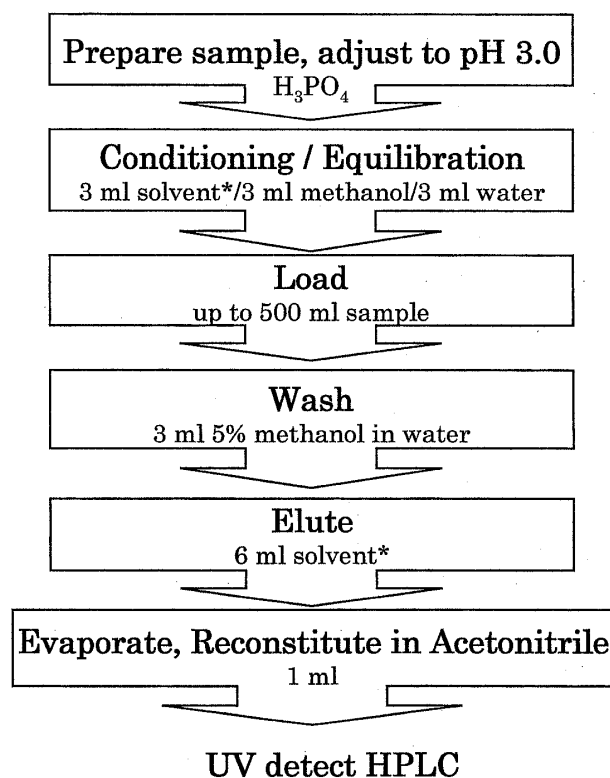


Fig. 1 Flow sheet of sample preparation on Oasis HLB 6 cc/200 mg cartridge

Solvent: 10% methanol in *tert*-butylmethyl ether; pH 3.0 adjusted by H_3PO_4 .

出による濃縮法のフローシートを示した。

2.3 装置及び測定条件

LC/MS システムには TMD（電子イオン化, EI）及び ZMD（大気圧イオン化, API）MS 検出器付き Alliance System（ウォーターズ製）を用い、測定条件を Table 1 に示した。

2.4 試料調製

PC からの BSA 溶出測定のモデル実験として、広口 500 ml PC 製試料瓶（井内盛栄堂製）に純水を沸騰させた熱水 500 ml を充たし、30 分静置したものを試料溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 固相抽出による濃縮法

Fig. 2 に BSA 及び NP それぞれ 0.24 及び 1.20 (NP) ng ml^{-1} 添加、濃縮後の試料溶液の UV 検出によるクロマトグラムを示した。本濃度において、BSA のピーク

Table 1 Analytical conditions for HPLC and MS

Analysis for sample concentration	
HPLC	
Column	Symmetry Shield RP18, 4.6 × 150 mm
Mobile phase	A: 15 mM sodium phosphate buffer (pH 3.0) B: acetonitrile
Gradient	60% A initial, linear gradient to 100% B in 20 min
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	UV 225 nm
Injection	75 µl
Analysis for non-concentration with MS	
HPLC	
Column	Symmetry C8, 3.5 µm, 2.1 × 50 mm
Mobile phase	A: water B: acetonitrile
Gradient	60% A initial, linear gradient to 75% B in 5 min
Flow rate	0.3 ml/min
Injection	20 µl
MS detection	
Ionization	Electrospray (ESI), Negative.
Mode	Selected ion mode (SIM) 227 amu for BSA, 219 amu for NP as pseudomolecular ion (M-H) ⁻
Voltage	Capillary 3.0 V, Sample cone 39 V

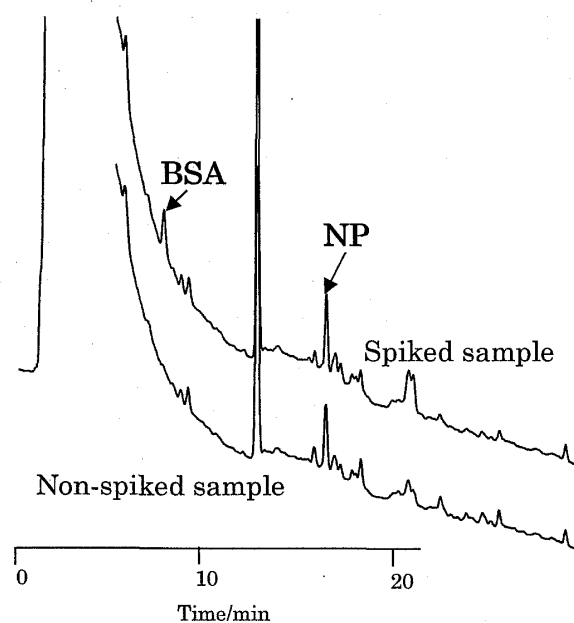


Fig. 2 UV chromatogram of concentrated bis-phenol A and nonylphenol mixture
BSA 0.24/NP 1.20 ng ml⁻¹, 75 µl injection

が良好に検出されているのに対して, NP は既に空試験溶液からもピークが検出されており, 添加によるピーク強度の増加が不明りょうである. 本法に従い, 4段階の

濃度勾配を持つ標準品添加純水試料より目的成分を各5回抽出, 濃縮した各溶液を UV 検出による HPLC 法で測定した結果を Table 2 にまとめた. 回収率の平均は BSA で 95~101%, NP で 78~83% であった. 本濃度範囲で検量線は BSA, NP 共に $r^2 > 0.99$ と良好な直線性を示した. 本法にて濃縮された試料溶液の上水試験法¹²⁾で使用されている方法に準拠した検出下限 (LOD) は濃縮前の溶液濃度に換算して, それぞれ 0.1 (BSA) 及び 0.73 (NP) ng ml⁻¹ であった.

3.2 LC/MS 法による直接分析

3.2.1 最適イオン化の検討 EI 法は特徴的なフラグメントより豊富な構造情報を与える反面, 必ずしも分子イオン (M⁺) を与えるとは限らず, 感度面でも API と比較すると物質によって 10~1000 倍程度劣る¹¹⁾. 実際, 今回の対象成分である BSA, NP 標準品各 1 ppm を直接導入にて EI 法で分析した結果, 共に分子イオンピークの基準ピーク (それぞれ 213, 135) に対する強度比は 30% 以下で, 選択イオンモニタリング (SIM) における分子イオンピーク及び基準ピークの検出でも, BSA 及び NP 共, 10 ppb レベルで S/N が 3 となった. したがって, ppb レベルにおける定性・定量には大気圧化学イオン化 (APCI) 及びエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が有用と考え, 両法による検討を行った.

Table 2 Results for sample concentration of bis-phenol A and nonylphenol mixture

Spiked levels Compound	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
Bis-phenol A	101 (17)	97.1 (2.9)	95.4 (1.0)	97.4 (1.2)
Nonylphenol	n.a.*	82.9 (6.0)	80.0 (3.1)	78.0 (4.2)

Results are given as % recovery with % RSD in parenthesis.

Spiked level (ng ml ⁻¹)	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
Bis-phenol A	0.24	0.80	3.20	20.00
Nonylphenol	1.20*	4.00	16.00	78.00

* Level 1 for nonylphenol, blank value greater than 50% of spiked level.

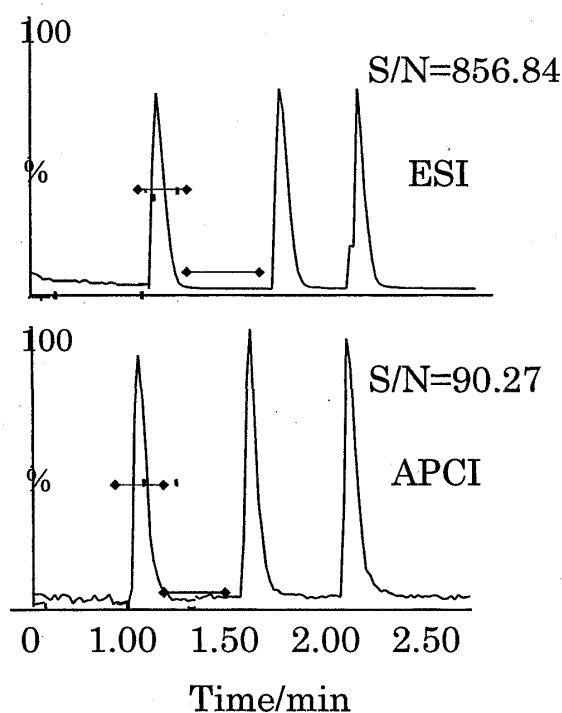


Fig. 3 ESI/APCI mass chromatogram of bis-phenol A

Monitor ion: $(M-H)^- = 227$ amu; Mode: negative, SIM; Sample: 100 ng ml⁻¹, 20 μ l $\times$ 3 injection

Fig. 3 及び 4 に BSA 及び NP 0.1 ng ml⁻¹ の負イオンモードによる ESI と APCI のマスクロマトグラムを示した。両イオン化法によるクロマトグラムを比較したところ、BSA, NP 共にピーク強度 (面積/高さ) に大差はなかったものの、その S/N は 4 倍以上、ESI 法のほうが良好であった。以上の結果より、本分析におけるイオン化法は負イオンモード ESI 法が最適であった。

3.2.2 最適キャピラリー及びコーン電圧の検討

ESI 法においては金属キャピラリーの先端部に電圧を印

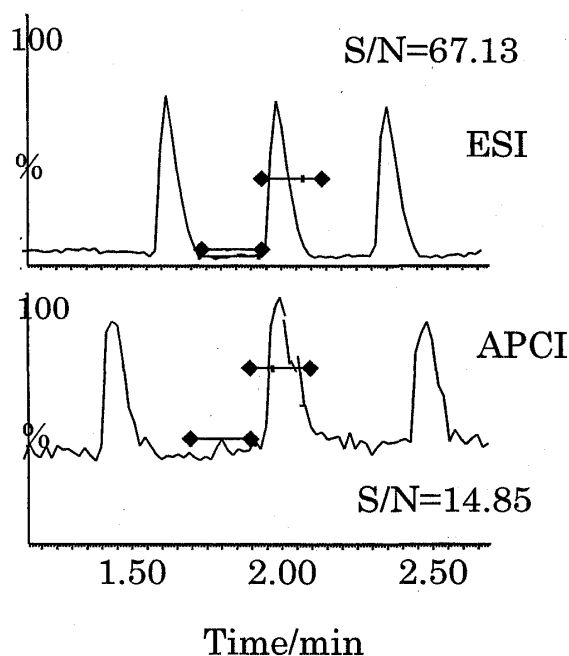


Fig. 4 ESI/APCI mass chromatogram of nonylphenol

Monitor ion: $(M-H)^- = 219$ amu; Mode: negative, SIM; Sample: 100 ng ml⁻¹, 20 μ l $\times$ 3 injection

加することでイオン化を行う。この電圧値を検討したところ、BSA, NP 共に 3.0 V において最大のピーク強度を与えた。また、サンプルコーンの電圧を変えることで得られるスペクトルのパターン、各イオンの強度に影響を及ぼす。このキャピラリー印加電圧の変化に伴う BSA 及び NP のスペクトルパターンを Fig. 5 及び 6 に示した。BSA, NP 共に 39 V において擬分子イオン $(M-H)^-$ のピーク強度が最大となった。加えて、きょう雑成分が多く共存する実試料の分析を考慮すれば、擬分子イオン $(M-H)^-$ による検出が定性能に勝る。感

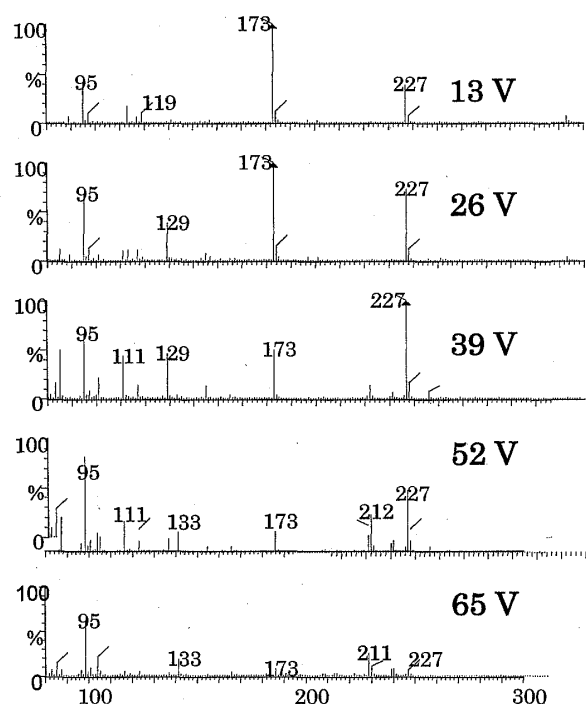


Fig. 5 Effect of cone voltage for ESI mass spectrum of bis-phenol A

Mode: negative, scan; Sample: $1 \mu\text{g ml}^{-1}$

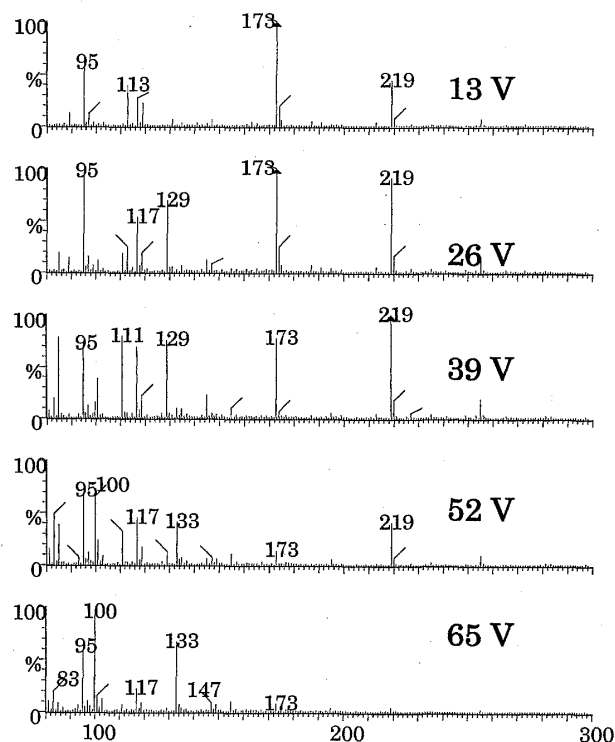


Fig. 6 Effect of cone voltage for ESI mass spectrum of nonylphenol

Mode: negative, scan; Sample: $1 \mu\text{g ml}^{-1}$

度・定性能の双方の観点より本電圧を最適電圧とした。

3・2・3 検量線 BSA ($5 \sim 1000 \text{ ng ml}^{-1}$) 及び NP ($10 \sim 1000 \text{ ng ml}^{-1}$) における検量線はいずれも原点を通過する直線 ($r^2 > 0.99$) となり, ppb オーダーの定量に十分使用できる。しかし, BSA 及び NP それぞれ 0.1 及び 1 ng ml^{-1} 付近の濃度では, S/N で 3 以上の良好なピークが得られる反面, 空試験溶液からもピークが検出され, 前述の原点通過検量線での定量値は BSA で 0.05 , NP で 6.21 ng ml^{-1} であった。この空試験値を考慮し, 原点外挿の検量線を BSA ($0.1 \sim 10 \text{ ng ml}^{-1}$) 及び NP ($1 \sim 100 \text{ ng ml}^{-1}$) の範囲で求めたところ, 良好な直線 ($r^2 > 0.99$) が得られた。

3・2・4 検出限界及び再現性 LOD の算出方法はクロマトグラフィーの場合, その S/N が 3 程度の値を使用するが, 環境分析においては低濃度試料の分析値の標準偏差 (SD) を利用する方法⁽¹²⁾⁽¹³⁾ が使用されている。今回, 環境庁が提案している水質, 底質及び生物の内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) の分析法の概要⁽¹⁾ でも, 検出限界の測定という項で, 前処理を行った後の試料溶液を 5 回測定してその SD を求め, この 3 倍の値の濃度をメソッド検出下限 (MDL) とする, 更に前項 3・2・3 で記述したように, 空試験から対象物質が検出された場合,

空試験値を差し引いた値を検出値とする, という記述が見られる。Fig. 7 及び 8 に BSA (0.5 ng ml^{-1}) 及び NP (5 ng ml^{-1}) の 5 回繰り返しマスキロマトグラムを示した。本濃度における面積値の相対標準偏差 (% RSD) は, それぞれ 2.64 及び 3.16 と良好な値を示した。また, この測定値より得られた濃度の SD は BSA が 0.023 , NP が 0.242 であり, この数値から算出された LOD はそれぞれ 0.07 及び 0.73 ng ml^{-1} である。この値と前項 3・2・3 よりの空試験溶液からの対象物質の検出値を考慮して, 本法の検出限界を BSA が 0.1 ng ml^{-1} , NP が 7.0 ng ml^{-1} とした。環境試料の分析を仮定した本分析法では, 空試験溶液からの対象物質, 特に NP の混在が避けられない現状では必ず空試験を行い, その値を考慮した検出下限を設定することがより实际的である。

3・2・5 モデル実験 BSA は PC 等の樹脂素材の原料として使用されており, PC 製品は食器などの用途で日常的に我々が接している物の一つである。そこでモデル実験として, 当研究室で使用している広口 500 ml PC 製試料瓶の熱水抽出溶液を本方法に供し, BSA を測定した。Fig. 9 に抽出に使用した熱水 (空試験) 及び熱水抽出溶液のクロマトグラムを示した。本方法を使用する

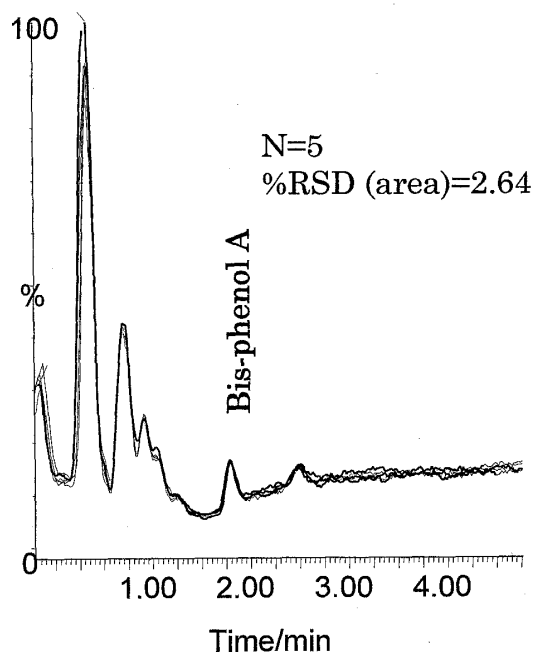


Fig. 7 Overlaid mass chromatogram of bis-phenol A

Monitor ion: SIM, $(M-H)^- = 227$ amu; Sample: 0.5 ng ml^{-1} , $20 \mu\text{l} \times 5$ injection

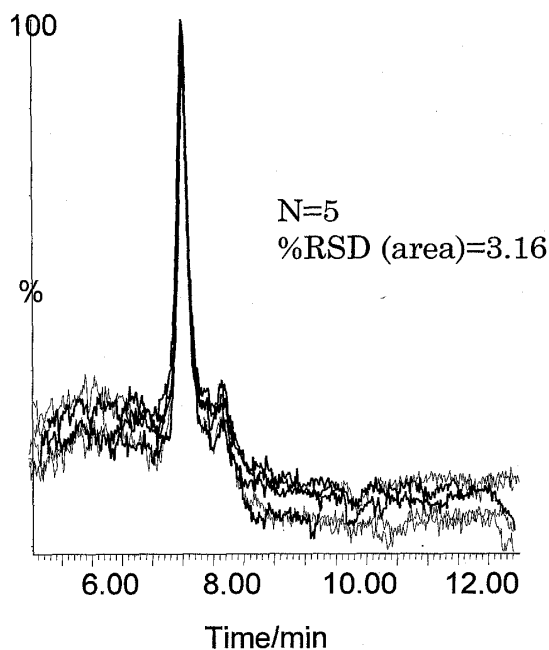


Fig. 8 Overlaid mass chromatogram of nonylphenol

Monitor ion: SIM, $(M-H)^- = 219$ amu; Sample: 5.0 ng ml^{-1} , $20 \mu\text{l} \times 5$ injection

ことで誘導体化や固相抽出による濃縮を用いることなく、BSAの定量 (1.83 ng ml^{-1}) が可能であった。

BSAは比較的高極性化合物で、GC/MS分析には誘導体化の処理が必要となるのに対し、NPはその極性の低さから未誘導体化のまま直接GC/MSにて測定されている。HPLC法ではともに未処理のまま同時分析が可能であるが、従来のUV検出では固相抽出法による濃縮が必要不可欠となる。今回、この両成分の固相抽出法による濃縮法を確立し、UV検出HPLC法で濃縮前の溶液濃度に換算して、数百pptオーダーの分析を可能とした。また、LC/MS法を用いることで、同濃度の溶液を濃縮なしで分析可能とした。

このような高感度分析では、前処理時に器具や試薬から試料溶液が汚染される可能性も高く、正確な定量値を得るためには、煩雑な処理は可能な限り省略し、空試験からの数値を十分に考慮する必要がある。今後、この固相抽出法による濃縮法とLC/MS法を併用することで現行法であるGC/MS法と比較して、より簡便な前処理での分析の可能性が示唆された。

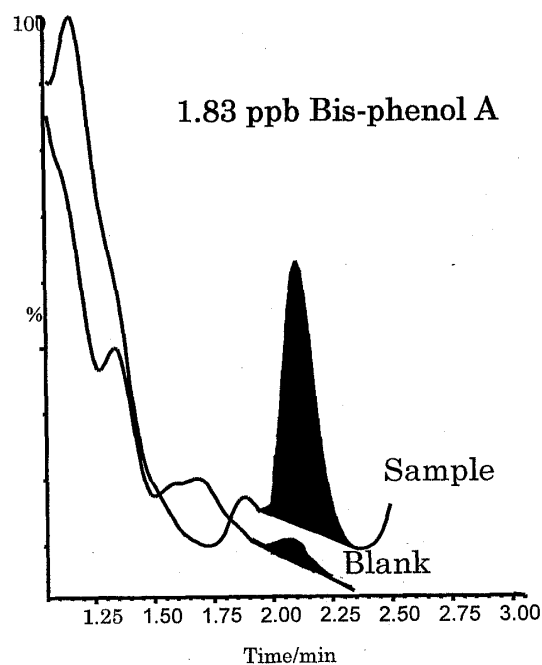


Fig. 9 Overlaid mass chromatogram of hot water blank and extracts of polycarbonate bottle
SIM, $(M-H)^- = 227$ amu, $20 \mu\text{l}$ injection

文 献

- 1) 日本環境化学会編: 第 26 回日本環境化学会講演会予稿集, (1998).
- 2) 志田保夫: *ぶんせき (Bunseki)*, **1996**, 55.
- 3) 堀江正一, 中澤裕之: *ぶんせき (Bunseki)*, **1996**, 62.
- 4) 鈴木 茂, 大嶋道孝: 第 7 回環境化学討論会講演要旨集, p. 248 (1998).
- 5) 森脇 洋, 張野広也, 福島 実: 第 6 回環境化学討論会講演要旨集, p. 37 (1997).
- 6) 森脇 洋, 山口之彦, 福島 実: 第 7 回環境化学討論会講演要旨集, p. 214 (1998).
- 7) 長谷川敦子, 薩摩林 光, 野溝春子, 小澤秀明, 寺沢潤一, 水戸部英子, 田辺顕子, 川田邦明, 鈴木 茂: 第 6 回環境化学討論会講演要旨集, p. 153 (1997).
- 8) 水戸部英子, 茨木 剛, 川田邦明, 長谷川敦子, 小澤秀明, 薩摩林 光, 寺沢潤一, 野溝春子, 上堀美智子, 今村 清, 奥村為男, 古武家善成, 中野 武, 剣持堅志, 吉岡敏行, 鈴木 茂: 第 7 回環境化学討論会講演要旨集, p. 216 (1998).
- 9) H. Sasaki, J. Yonekubo: 5th International Conference on Environmental Chemistry, p. 158 (1996).
- 10) J. Yonekubo, H. Sasaki: 5th International Conference on Environmental Chemistry, p. 156 (1996).
- 11) 持田真紀, 一木満貴子, 佐々木秀輝, 米久保淳: 第 7 回環境化学討論会講演要旨集, p. 34 (1998).
- 12) 日本水道協会: “上水試験方法解説編”, p. 8 (1993).
- 13) 鈴木 茂, 石黒智彦, 安原昭夫: 環境化学, **2**, 71 (1992).

要 旨

環境ホルモン (外因性内分泌攪乱物質) の一種であるビスフェノール A (BSA) 及びノニルフェノール (NP) について, 1) 固相抽出による濃縮法, 2) LC/MS 法による直接 (非濃縮) 分析について検討した結果, 1) 逆相系カートリッジを用いた固相抽出による濃縮法において, $0.24 \sim 20 \text{ ng ml}^{-1}$ (BSA) 及び $4.0 \sim 100 \text{ ng ml}^{-1}$ (NP) の範囲で, 各 5 回の回収率及び相対標準偏差 (% RSD) の平均は, それぞれ 80% 以上, 17% 以下であった. 2) LC/MS 法による直接分析において, イオン化法として EI, APCI 及び ESI の 3 法を比較したところ, 検出感度を考慮すると ESI 法が最適であった. このイオン化を用いた LC/MS 法による検出限界, 再現性及び定量範囲について検討した結果, 本方法による検出限界は空試験からの定量値を考慮して BSA 及び NP それぞれ 0.1 及び 7.0 ng ml^{-1} であった. 再現性は, 0.5 ng ml^{-1} (BSA) 及び 5 ng ml^{-1} (NP) における 5 回繰返しの面積値の % RSD で 2.64 及び 3.16, 定量範囲は 0.1 ng ml^{-1} (BSA) 及び 1 ng ml^{-1} (NP) から 1000 ng ml^{-1} までの検量線において $r^2 > 0.99$ といずれも良好な値を示した.