技術論文

固相抽出剤を用いる液体クロマトグラフィー/質量分析法による 河川水中のビスフェノール A の定量

檜 崎 久 武*

Determination of bisphenol A in river-waters samples by LC/MS using solid-phase sorbents

Hisatake NARASAKI*

*Saitama-ken Environmental Analysis and Research Association, 1450-11, Kamiko-cho, Saitama-shi, Saitama 331-0853

(Received 26 April 2002, Accepted 2 September 2002)

Bisphenol A in river-waters samples was determined by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) using solid-phase sorbents. The water samples contained some inorganic salts and humic substances (humic and fulvic acids). Since the humic substances were coextracted with bisphenol A, they interfered with the determination of bisphenol A. Water (300 ml) spiked with 50 ng of deuterated bisphenol A (the surrogate) at natural pH was applied to Accell QMA (strong anion-exchange sorbent) and C₁₈ cartridges using a concentrator at a flow rate of 20 ml min⁻¹. Humic substances were sorbed to the Accell QMA cartridge, while bisphenol A was mainly sorbed to the C₁₈ cartridge. After the C₁₈ cartridge had been eluted with 5 ml of ethyl acetate, the eluate was dehydrated with anhydrous sodium sulfate. The eluate was evaporated to dryness at 35°C under a stream of nitrogen gas. The residue was dissolved in 1 ml of acetonitrile. The concentration of bisphenol A was determined by the operating conditions, as shown in Table 1. When the water samples were densely colored, the humic substances in them could not be completely removed by the above procedure. No difference was found in the recoveries of bisphenol A between pH 3.5 and 7.0. The determination limit of bisphenol A was 5 ng ml⁻¹.

Keywords : bisphenol A; river-water; solid-phase sorbents; liquid chromatography/mass spectrometry.

1 緒 言

ビスフェノール A は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料及びポリ塩化ビニルの安定剤として広く用いられている。最近、ビスフェノール A は内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）として、極めて微量でマウスについてホルモン受容体と結合してホルモン作用を呈し、ホルモン作用を阻害することが見いだされており、動物の生殖への影響が懸念されている¹⁾。河川水は水道水の原水として取水されるので、河川水中のビスフェノール A の濃度を把

握することが望まれる。これまでビスフェノール A はビス(トリメチルシリル)フルオロアセトアミドなどにより誘導体化されて、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) により定量されてきたが、不揮発性で極性の強い化合物の定量には液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) が用いられるようになり、ビスフェノール A についても LC/MS による定量が既に報告されている^{2)~7)}。しかし、LC/MS による実際の河川水の定量については、少量の河川水について添加回収実験が行われているに過ぎない³⁾⁴⁾。河川水中のビスフェノール A を定量するためには、更に多量の河川水を濃縮する必要がある。

LC/MS はマトリックス（共存物質）の影響を受けやす

* (社)埼玉県環境検査研究協会: 331-0853 埼玉県さいたま市上小町 1450-11

Table 1 Operating conditions of LC/MS

LC separation	
Instrument	Waters Alliance 2690
Analytical column	XTerra MS C ₁₈ 2.1 mm id × 180 mm
Guard column	XTerra MS C ₁₈ 2.1 mm id × 20 mm
Mobile phase	A: water, B: acetonitrile
Gradient	60% A initial, linear gradient to 75% B in 5 min, retained for 6 min
Flow rate	0.25 ml min ⁻¹
Injection volume	10 µl
Run time	25 min
MS detection	
Instrument	Waters ZMD 2000
Detector	Waters 996 photodiode array
Ionization mode	Electrospray ionization (ESI), Negative mode
Data acquisition	Selected ion monitoring (SIM)
<i>m/z</i> of bisphenol A	227 for quantitation
<i>m/z</i> of bisphenol A	211 for confirmation
<i>m/z</i> of deuterated bisphenol A	235
Dwell	0.5 s
Cone voltage	30 V for <i>m/z</i> 227 and 235, 70 V for <i>m/z</i> 211
Span	0.6
Retention window end time	11 min
Flow rate of nitrogen for cone	100 l min ⁻¹
Flow rate of nitrogen for desolvation	450 l min ⁻¹
Source block temperature	100°C
Desolvation temperature	250°C
Capillary voltage	3.0 kV

いことが指摘されている⁸⁾。河川水はカルシウムなどの無機塩とフミン酸やフルボ酸（以下、フミン質と総称）のような有機物を含んでいる。酸性で水に不溶性のフミン質がフミン酸であり、すべての pH 範囲で水溶性のフミン質がフルボ酸といわれる⁹⁾。試料の濃縮法としては溶媒抽出法に代わり、固相抽出法が用いられるようになったが、フミン質は幅広い分子量分布を持ち、河川水を固相抽出するとフミン質はビスフェノール A とともに抽出されるので、LC/MS ではフミン質とビスフェノール A を分離する必要がある。

本論文ではフミン質とビスフェノール A の解離定数が大きく隔たっており、中性でフミン質はほとんど解離しているのに対して、ビスフェノール A はほとんど解離していないことを利用して、強塩基性陰イオン交換固相抽出剤アクセル QMA を固相抽出剤 C₁₈ カートリッジの前に直結して、河川水中のフミン質を陰イオンとしてアクセル QMA に吸着させ、C₁₈ カートリッジに吸着したビスフェノール A を酢酸エチルで溶離して LC/MS により定量した。

2 実 験

2.1 装 置

測定にはウォーターズの Alliance 2690 高速液体クロマトグラフ/ZMD2000 質量分析計を用いた。検出器は同社製の 996 ホトダイオードアレイ検出器を波長 210～400 nm まで走査した。分析カラムとしては同社製の XTerra MS C₁₈ ステンレスカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、

粒径 5 µm）の前に XTerra MS C₁₈ ガードカラム（内径 2.1 mm、長さ 20 mm、粒径 5 µm）を取り付けて用いた。

固相抽出剤による濃縮には、同社製のセップパック・コンセントレーター・プラスを用いた。固相抽出剤の乾燥及び溶離には同社製のパキューム・マニホールドを用いた。

pH メーターは東亜ディーケーケーの HM-60A を GST-5421C ガラス電極とともに用いた。

2.2 測定条件

測定条件を Table 1 に示す。いずれもエレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization, ESI），負イオンモード，選択イオン検出（selected ion monitoring, SIM）により定量した。

2.3 試 薬

ビスフェノール A は関東化学製（特級）を用いた。サロゲートとして重水素化ビスフェノール A（林純薬工業，特級，52326）を用いた。アセトニトリル，メタノール及び酢酸エチルは 5000 倍濃縮検定品（関東化学）を用いた。フミン酸溶液はフミン酸（和光純薬，088-04622）約 20 mg を 1 l の超純水に加えて 60°C に加熱して飽和溶液として用いた¹⁰⁾。固相抽出剤としてはウォーターズのセップパックプラス・C₁₈（充填剤量 360 mg），PS-2（充填剤量 265 mg），オアシス HLB（充填剤量 225 mg），アクセル QMA（充填剤量 360 mg）及び NH₂（充填剤量 360 mg）を用いた。水は Milli-RX45 高純水製造装置及び Milli-Q SP TOC

超純水製造装置（以上、日本ミリポア）により精製した超純水（18.3 MΩ）を用いた。超純水製造装置を長時間採水しなかった場合は初流を 1 l 程度排水してから使用した¹¹⁾。フラスコは二クロム酸混液を注いでしばらく浸し、水道水及び超純水で洗ってから使用した。スピッツ管及びバイアル瓶はアセトニトリルですすいだ。

2.4 標準溶液の調製

1000 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液は、ビスフェノール A 25 mg を 25 ml のアセトニトリルに溶解して調製し、冷凍庫に保存した。この溶液 10 µl をアセトニトリル 10 ml に溶解して、1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液を調製した。

1000 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A 溶液は、重水素化ビスフェノール A 10 mg を 10 ml のアセトニトリルに溶解して調製し、冷凍庫に保存した。この溶液 10 µl をアセトニトリルに 10 ml に溶解して、1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液を調製した。

1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液及び 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液は 1 か月ごとに新しく調製した。

2.5 検量線溶液の調製

検量線溶液は、(1) アセトニトリル 1 ml を 0 ng ml⁻¹ 検量線溶液とし、(2) 1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液 50 µl をアセトニトリルに溶解して 1 ml にしたものを 50 ng ml⁻¹ 検量線溶液とし、(3) 1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液 100 µl をアセトニトリルに溶解して 1 ml にしたものを 100 ng ml⁻¹ 検量線溶液とし、すべて 2 ml のスクリー・バイアル（12×32 mm）に移して測定した。(2) と (3) には 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A 溶液 50 µl をサロゲートとしてそれぞれ添加し、内部検量線法により定量した。

2.6 固相抽出剤のコンディショニング

固相抽出剤はいずれも酢酸エチル 3 ml、メタノール 3 ml 及び水 5 ml で順次コンディショニングした。

2.7 操作

2.7.1 純水におけるビスフェノール A の回収率の測定

試料水 330 ml に 1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液 55 µl 及び 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液 55 µl を加え、よくかき混ぜた後、アクセル QMA カートリッジの次に C₁₈ カートリッジを直結し、コンセンレーターに流量 20 ml min⁻¹ で 15 分間 300 ml 採水して、ビスフェノール A を抽出した。抽出後、アクセル QMA カートリッジは棄却した。バキューム・マニホールドを用いて C₁₈ カートリッジの上に注射筒を取り付けて水 5 ml で

洗浄した後、C₁₈ カートリッジの上にコンディショニングしていない PS-2 カートリッジを取り付けて真空ポンプで 3 分間吸引して乾燥した（PS-2 及びオアシス HLB は 10 分間吸引した）。C₁₈ カートリッジの上に注射筒を取り付けて酢酸エチル 5 ml を加え、10 ml スピッツ管を受け器として溶液が出始めたら、いったんバキューム・マニホールドのストップコックを閉じて 1 分間放置して C₁₈ カートリッジを酢酸エチルで湿らせた後、大気圧下において流量 0.2 ml min⁻¹ で溶離した。スピッツ管の内容物に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、別のスピッツ管に溶液を移して窒素気流により 35℃ で蒸発乾固してアセトニトリルで全容を 1 ml にした。別に試料水 330 ml に 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液 55 µl を加えた溶液を空試験溶液として同様の処理をして、上記の結果から差し引いて回収率を求めた。

2.7.2 河川水中におけるビスフェノール A の回収率と定量 河川水 330 ml に 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液 55 µl を加えて、コンセンレーターに流量 20 ml min⁻¹ で 15 分間 300 ml 採水し、2.7.1 と同様の操作を行った。別に河川水 330 ml に 1 µg ml⁻¹ ビスフェノール A 溶液 55 µl と 1 µg ml⁻¹ 重水素化ビスフェノール A（サロゲート）溶液 55 µl を加えて同様の処理をし、ビスフェノール A の濃度を求め、両者の差から回収率を求めた。Fig. 1 に分析操作の流れ図を示す。

3 結果と考察

3.1 溶媒の流量

Fig. 2 に示すように、溶媒の流量を増加させても、減少させても ESI に適した微細な液滴が生成しにくくなり、信号強度は減少し、最適流量は 0.25 ml min⁻¹ にあることが分かった。

3.2 質量数とコーン電圧

Fig. 3 に示すように、ビスフェノール A の分子イオン [M-H]⁻（質量数 227）は、コーン電圧 30 V で信号強度が最大になり、40 V では減少した。

Fig. 4 に示すように、重水素化ビスフェノール A（サロゲート）の分子イオン [M-H]⁻（質量数 235）は、コーン電圧 30 V で信号強度が最大になり、40 V では減少した。

Fig. 5 に示すように、ビスフェノール A の確認イオン [M-H-CH₃]⁻（質量数 211）は、コーン電圧 70 V で信号強度が最大になり、80 V では減少した。

3.3 キャピラリー電圧

Fig. 6 に示すように、キャピラリー電圧は 3.0 kV で信号強度が最大になった。

Fig. 1 Flow diagram of sample preparation

Fig. 2 Effect of the flow rate of solvent on the signal intensity of m/z 227 ($M - H$)⁻

●: 0.20 ml/min; ■: 0.25 ml/min; ▲: 0.30 ml/min; Cone voltage: 30 V; Capillary voltage: 3.0 kV; Desolvation temperature: 250°C

3・4 脱溶媒温度

Fig. 7に示すように、脱溶媒温度は250°Cで信号強度が最大になった。

以上の結果から、Table 1に示す測定条件を確立した。

Fig. 3 Effect of the cone voltage on the signal intensity of m/z 227 ($M - H$)⁻

●: 10 V; ■: 20 V; ▲: 30 V; ★: 40 V; Flow rate of solvent: 0.25 ml/min; Capillary voltage: 3.0 kV; Desolvation temperature: 250°C

Fig. 4 Effect of the cone voltage on the signal intensity of m/z 235 ($C_{15}H_7D_8O_2$)⁻

●: 10 V; ■: 20 V; ▲: 30 V; ★: 40 V; Flow rate of solvent: 0.25 ml/min; Capillary voltage: 3.0 kV; Desolvation temperature: 250°C

3・5 ビスフェノール A の抽出 pH

酸性有機化合物の抽出においては、一般に酸の解離を抑制するために水相が酸性化されている。Coquartらは、スチレン-ジニルベンゼン系 PRP-1 プレカラムを用いて、解離定数が pK_a で 1 であるフェノキシ酢酸類を濃縮する際に試料水の pH を 1 に調整した¹²⁾。Smithらは、同じく PRP-1 プレカラムを用いてクロロフェノール類を濃縮し、純水で回収率は $71 \pm 12\%$ であったが、塩酸で $5 \times 10^{-5} M$ にすると $99 \pm 10\%$ であったと述べている¹³⁾。こうしたことから解離定数の大きな酸性有機化合物を抽出する場合に

Fig. 5 Effect of the cone voltage on the signal intensity of m/z 211 ($M - H - CH_4$)⁻
 ●: 50 V; ■: 60 V; ▲: 70 V; ★: 80 V; Flow rate of solvent: 0.25 ml/min; Capillary voltage: 3.0 kV; Desolvation temperature: 250°C

Fig. 6 Effect of the capillary voltage on the signal intensity of m/z 227 ($M - H$)⁻
 ●: 2.5 kV; ■: 3.0 kV; ▲: 3.50 kV; Flow rate of solvent: 0.25 ml/min; Cone voltage: 30 V; Desolvation temperature: 250°C

は、水相の酸性化は抽出に有効であると考えられる。

ビスフェノール A は 2 個のフェノール性水酸基を持つ二塩基酸であり、その pK_a については 9.59, 10.2, 11.30 などの数値が報告されている¹⁴⁾。

一塩基酸 HA のモル分率を α_0 とし、 A^- のモル分率を α_1 とすると、 α_0 及び α_1 はそれぞれ次の式(2) 及び (3) で表される。

Fig. 7 Effect of the desolvation temperature on the signal intensity of m/z 227 ($M - H$)⁻
 ●: 200°C; ■: 250°C; ▲: 300°C; ★: 350°C; Flow rate of solvent: 0.25 ml/min; Cone voltage: 30 V; Capillary voltage: 3.0 kV

$$\alpha_0 = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (2)$$

$$\alpha_1 = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (3)$$

ビスフェノール A の pK_a を 10 であるとする、式(2) より pH 7 でビスフェノール A の α_0 はほぼ 1 であり、ビスフェノール A は未解離で分子のままであると考えられる。

環境省¹⁵⁾や日本環境化学会¹⁶⁾の暫定マニュアルでは、ビスフェノール A の定量において、水相の pH を 3 前後に調節している。日本工業規格においても溶媒抽出法では pH を約 3 に調節し、固相抽出法では pH を 3.5 に調節している¹⁷⁾。del Olmo らは、ジクロロメタンによる溶媒抽出では pH 6.5 以上ではビスフェノール A の抽出率が急速に減少するので、塩酸を数滴加えているが¹⁸⁾、固相マイクロ抽出では中性のままで行っている¹⁹⁾。

Table 2 に pH 3.5 及び 7.0 において純水及びフミン酸飽和溶液 300 ml に 50 ng のビスフェノール A を添加した際の回収率を示す。Table 2 に示すように、pH 3.5 においても pH 7 においても回収率は良好な結果が得られた。Table 2 の結果からビスフェノール A を抽出する場合には

Table 2 Recoveries of bisphenol A in pure water and humic acid water by solid phase extraction

Sorbent	Recovery ^{a)} , %	
	pH 3.5	pH 7
in pure water		
C ₁₈	90.0 ± 6.8	86.8 ± 9.8
OASIS	92.9 ± 9.5	102.6 ± 10.1
PS-2	104.6 ± 8.3	99.0 ± 8.1
QMA-C ₁₈	—	103.6 ± 4.5
NH ₂ -C ₁₈	—	102.7 ± 4.5
in humic acid water		
QMA-C ₁₈	—	102.7 ± 6.1
NH ₂ -C ₁₈	—	107.7 ± 8.6

a) Average of three measurements with standard deviation. Pure and humic acid waters (300 ml) were spiked with 50 ng each of bisphenol A and deuterated bisphenol A (surrogate). The recoveries were calculated by a difference between the spiked and non-spiked with bisphenol A by the internal standard method.

酸性化する必要はないと考えた。フミン酸飽和溶液については弱塩基性陰イオン交換固相抽出剤 NH₂ (pK_a 9.8) と強塩基性陰イオン交換固相抽出剤 QMA (pK_a 11.0) との比較も行った。いずれの場合も回収率は良好であったが、フミン酸による NH₂ の吸着ゾーンは広がっているのに対し、フミン酸による QMA の吸着バンドは短いので、陰イオン交換固相抽出剤としては QMA を用いることにした。

3・6 フミン質の抽出 pH

フミン質は分子量数百から数千まで幅広い分布を持ち、低分子量のフミン質は pK_a が小さく薄く着色しており、高分子量のフミン質は pK_a が大きく濃く着色している²⁰⁾。LC のクロマトグラムで見ると、低分子量のフミン質は保持時間が小さいので早く流出し、高分子量のフミン質は保持時間が大きいので後に流出する。

Ephraim らは、カナダのフルボ酸について pK₁ が 1.8 のものの割合が 0.245 であり、pK₂ が 3.2 のものが 0.304 であり、pK₃ が 4.2 のものが 0.024 であり、pK₄ が 5.7 のものが 0.227 であったと述べている²¹⁾。Yates III らは、アメリカのスワニー河のフルボ酸についてフミン質が酸性を呈する官能基はカルボキシル基が 57% であり、フェノール性水酸基又はアミノ基が 43% であったと述べている²²⁾。いずれにしてもフミン質は pK_a が 2~5 である多塩基酸であり、式(3)より pH 7 では完全にイオンに解離していると考えられる。

Sancho-Lllops らは、クロロフェノキシ酸の定量において、フミン質は pH 2 では C₁₈ 固相抽出剤に吸着されるが、pH 7 では吸着されないと述べている²³⁾。Pichon らは、飲料水についてフミン質は pH 3 ではスチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤 SDB-1 からメタノールで溶出するが、

pH 7 では溶出しないと述べている。しかし、河川水では pH 7 でも SDB-1 で溶出している²⁴⁾。こうしたことから、フミン質は酸性では未解離の分子として固相抽出剤に吸着されやすいと考えられる。

3・7 イオン交換反応

イオン交換による吸着反応速度は小さいので、ウォーターズではイオン交換固相抽出剤は流量 0.2~1 ml min⁻¹ で流すことを推奨している²⁵⁾。Niessner らは、スチレン-ジビニルベンゼンに種々の陰イオン交換基を取り付けた固相抽出剤に重金属の錯結合したフミン質を吸着させているが、流量は 3 ml min⁻¹ 以下が最適であったと述べている²⁶⁾。著者の実験の結果では、流量を小さくして固相抽出すると、ビスフェノール A の回収率は低下した。pH 7 でビスフェノール A は中性分子として溶存していると考えられるが、流量が遅いと式(1)の平衡が右へ移動してビスフェノール A の一部はイオンに解離して、アクセル QMA に結合するものと考えられる。そこで著者は 20 ml min⁻¹ で急速に抽出した。重水素化ビスフェノール A (サロゲート) によるビスフェノール A の回収率は 0.3~0.7 であった。

一方、フミン質は pH 7 では解離して陰イオンとして存在していると考えられるが、アクセル QMA を急速に通過すると、フミン質の一部はアクセル QMA に吸着されずに溶離するものもあると思われる。したがって、本法はフミン質の比較的少ない河川水中のビスフェノール A に用いることができる。

3・8 無機塩の影響

無機塩は ESI における帯電を妨害して感度を低下する。Moore らは、河川水中の殺虫剤を C₁₈ 固相抽出剤で濃縮した後、LC/MS で定量する際、河川水中の塩類を除去するために、固相抽出剤を 3 ml の水で洗浄している²⁷⁾。ここでは固相抽出後、C₁₈ カートリッジを 5 ml の水で洗浄することにした。

3・9 河川水中のビスフェノール A を抽出するための固相抽出剤と溶離剤

Mills らは、含水たい積物中のトリアジン系除草剤をオクタデシルシリカ C₁₈ 固相抽出剤で濃縮した後、GC/MS で定量する際、フミン質の溶出が最も少ない溶離剤として酢酸エチルを用い、更に溶離した酢酸エチル溶液を流量 0.5 ml min⁻¹ で陰イオン交換固相抽出剤アクセル QMA を用いてフミン質を除去した²⁸⁾²⁹⁾。アクセル QMA はジオールシリカとアクリルアミドの共重合体にトリメチルアミノプロピル基-(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl を結合させたもので、アクセル QMA の pK_a は 11.0 である³⁰⁾。

Table 3 Recoveries and contents of bisphenol A in river water^{a)}

Site	Recovery ^{b)} , %	Content ^{c)} /μg l ⁻¹
Shibakawa (Kawaguchi-shi)	95.9 ± 10.7	0.007 ± 0.003
Hatogawa (Hatoyama-machi)	102 ± 5.3	0.016 ± 0.003
Irumagawa (Iruma-shi)	95.3 ± 5.9	0.015 ± 0.005

a) Average of three determinations with standard deviation.

b) The recoveries were calculated by a difference between the spiked and non-spiked with 50 ng of bisphenol A by the internal standard method. c) The contents were determined by the internal standard method.

著者が河川水について、Mills らのように C₁₈ の次にアクセル QMA で処理したところ、フミン質は完全に除去されなかった。これは含水たい積物よりも河川水ではフミン質の量が多いためと思われる。逆にアクセル QMA の次に C₁₈ カートリッジを連結して河川水を流したところ、無色で透明な河川水ではフミン質はほぼ完全に除去された。

酸性では C₁₈ 固相抽出剤のオクタデシル基とシリカの結合は分解する恐れがあるので、酸性で安定な固相抽出剤として、スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤も逆相固相抽出においてよく用いられる。C₁₈ 固相抽出剤が溶質とファンデルワールス相互作用により結合するのに対して、スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤では更に溶質の芳香環と固相抽出剤の芳香環との π 電子-π 電子相互作用によって結合する。C₁₈ 固相抽出剤の炭素含有量が最高 18% であるのに対して、スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤の炭素含有量は約 90% であり、スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤は保持力が大きく漏出が少ない。スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤は疎水性なので、スチレン-ジビニルベンゼンに親水性の N-ビニルピロリドンを共重合させた固相抽出剤としてオアシス HLB がある。酢酸エチルは大気圧下で C₁₈ 及びオアシス HLB 固相抽出剤から自然に流出させることができるが、スチレン-ジビニルベンゼン系固相抽出剤である PS-2 からは圧力を加えないと完全には流出しない。PS-2 やオアシス HLB は C₁₈ 固相抽出剤よりも吸着力が強く、アクセル QMA から流出したフミン質が吸着しやすいものと考えられるので、ここでは逆相固相抽出剤として C₁₈ を用いることにした。

3・10 河川水におけるビスフェノール A の回収率と濃度

Table 3 に河川水におけるビスフェノール A の回収率及び分析結果を示す。

Fig. 8 にフミン酸飽和溶液 300 ml を QMA-C₁₈ で固相抽出して酢酸エチルで溶離した SIM クロマトグラム (上) と、それに 50 ng のビスフェノール A を添加した SIM ク

ロマトグラム (下) を示す。ビスフェノール A の保持時間 4.4 分付近にビスフェノール A のクロマトグラムが表れているが、いずれもクリーンアップされていることが分かる。

本法の定量感度は 5 ng ml⁻¹ であり、回収率における繰り返し精度は約 10% であった。

3・11 試料のクリーンアップと汚染

GC/MS では保持時間の幅が狭く、ビスフェノール A は誘導体化されて気体として分離されて検出器へ導入されるが、LC/MS では保持時間の幅が広く、そのまま液体として導入される。したがって、LC/MS ではビスフェノール A と同一保持時間で同一質量数を持つ類似の化学種のクロマトグラムは、ビスフェノール A のクロマトグラムと重なって分析結果を狂わせてしまう。内標準法ではサロゲートのクロマトグラムとフミン質のクロマトグラムが重なると、補正結果を狂わせてしまう。LC/MS においては試料のクリーンアップは重要である。

LC/MS におけるフミン質の分析カラムへの流入はその劣化を早め、内径 0.1 mm の電子スプレー・金属キャピラリーを詰まらせる恐れがある。そのためにも強塩基性陰イオン交換固相抽出剤 QMA は有効である。

超純水製造装置の容器はプラスチックで製造されており、長時間放置すると容器からビスフェノール A が溶出するので、初流をしばらく放出させてから使用した¹¹⁾。ビスフェノール A は大気中にも存在しているので、C₁₈ カートリッジを真空ポンプで吸引して乾燥させる際には PS-2 を C₁₈ カートリッジの上に取り付けた (PS Air も市販されている)。

排水中のビスフェノール A の分析に、依然として溶媒抽出/誘導体化 GC/MS が用いられているのも、LC/MS においてクリーンアップが困難なためであると思われる³¹⁾³²⁾。Koeber らは、河川水中のトリアジン系農薬の LC/MS による定量において、restricted access materials (RAMs) により高分子量のフミン質を除去し、molecularly imprinted polymer (MIP) によりトリアジン系農薬を抽出しているが³³⁾、環境ホルモンについて MIP が開発されるまでには、いまだ時間を要するものと思われる。

この液体クロマトグラフィー/質量分析装置の購入に当たっては日本自転車振興会 (競輪) から補助を受けた。また、本装置の使用に際して日本ウォーターズ (株) の鈴木悦子、藪 昌世両氏の助言を得た。記して厚く感謝の意を表します。

(2001 年 9 月, 第 5 回分析化学
東京シンポジウム・2001 機器
分析東京討論会にて一部発表)

Fig. 8 The SIM chromatograms of humic acid solution monitored at m/z 227

The lower chromatogram: humic acid solution applied to QMA-C₁₈ and eluted with ethyl acetate. The upper chromatogram: 300 ml of humic acid solution spiked with 50 ng of bisphenol A (retention time 4.4 min). The humic acid peaks do not appear in both chromatograms.

文 献

- 井口泰泉, 佐藤友美: 環境ホルモン共同研究プロジェクト・平成10年度報告書, p. 1 (1999), (横浜市立大学).
- S. N. Pedersen, C. Lindholm: *J. Chromatogr. A*, **864**, 17 (1999).
- A. Motoyama, A. Suzuki, O. Shiota, R. Namba: *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **13**, 2204 (1999).
- 滝埜昌彦, 代島茂樹, 山口憲治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 563 (1999).
- 米久保 淳, 佐々木俊也, 一木満貴子, 金井みち子, 佐々木秀樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 571 (1999).
- 堀江正一, 吉田栄充, 石井里枝, 小林 進, 中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 579 (1999).
- M. Petrovic, D. Balceló: *Anal. Chem.*, **72**, 4560 (2000).
- T. L. Constantopoulos, G. S. Jackson, C. G. Enke: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 625 (1999).
- 宮島 徹: ぶんせき (*Bunseki*), **1997**, 928.
- G. Marko-Varga, Istvan Csiky, J. Å. Jönsson: *Anal. Chem.*, **56**, 2066 (1984).
- 石井直恵, 加納一郎: The R&D Notebook A, 10, (2001), (Laboratory Water Division of Millipore).
- V. Coquart, M.-C. Hennion: *Sci. Tot. Environ.*, **132**, 349 (1993).
- R. L. Smith, D. J. Pietrzyk: *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 282 (1983).
- C. A. Staples, P. B. Dorn, G. M. Klecka, S. T. O'Block, L. R. Harris: *Chemosphere*, **36**, 2149 (1998).
- 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) ビスフェノール A とクロロフェノール類の分析法, p. 1 (1998), (環境庁水質保全局水質管理課).
- 第24回日本環境化学会講演会資料集, p. 14 (1998).
- JISハンドブック 2001 環境測定 II 水質, p. 901 (2001), (日本規格協会); JIS K 0450, 用水・排水中のビスフェノール A 試験方法 (2000).
- M. del Olmo, A. González-Casado, N. A. Navas, J. L. Vilchez: *Anal. Chim. Acta*, **346**, 87 (1997).
- M. del Olmo, A. Zafra, N. A. Navas, J. L. Vilchez: *Analyst* (Cambridge), **124**, 385 (1999).
- Z.-D. Wang, B. C. Pant, C. H. Langford: *Anal. Chim. Acta*, **232**, 43 (1990).
- J. Ephraim, S. Alegert, A. Mathuthu, M. Bicking, R. L. Malcolm, J. A. Marinsky: *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 354 (1986).
- L. M. Yates III, R. von Wandruszka: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **364**, 746 (1999).
- J. V. Sancho-Llopis, F. Hernández-Hernández, E. A. Hogendoorn, P. van Zoonen: *Anal. Chim. Acta*, **283**, 287 (1993).

- 24) V. Pichon, C. C. D. Coumes, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion: *J. Chromatogr. A*, **737**, 25 (1996).
- 25) Waters Sep-Pak Cartridge Instruction Sheet, WAT011188.
- 26) G. Niessner, W. Buchberger, G. K. Bonn: *Monat. Chem.*, **129**, 597 (1998).
- 27) K. M. Moore, S. R. Jones, C. James: *Wat. Res.*, **29**, 1225 (1995).
- 28) M. S. Mills, E. M. Thurman: *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).
- 29) M. S. Mills, E. M. Thurman: *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 73 (1994).
- 30) ウォーターズ高速液体クロマトグラフィー用カラム・消耗品総合カタログ 2002, p. 9 (2002), (日本ウォーターズ).
- 31) M. I. H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga: *Anal. Chim. Acta*, **428**, 227 (2001).
- 32) J. L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. del Olmo: *Anal. Chim. Acta*, **431**, 31 (2001).
- 33) R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K-S. Boos, B. Sellergren, D. Barceló: *Anal. Chem.*, **73**, 2437 (2001).

要 旨

強塩基性陰イオン交換固相抽出剤アクセル QMA カートリッジをオクタデシルシリカ固相抽出剤 C₁₈ カートリッジの前に直結して中性で河川水を急速に流し、フミン質を陰イオンとしてアクセル QMA カートリッジに吸着させ、ビスフェノール A を C₁₈ カートリッジに吸着させた。C₁₈ カートリッジを酢酸エチルで溶離してアセトニトリル溶液としてエレクトロスプレーイオン化・負イオンモードで液体クロマトグラフィー/質量分析法により測定した。重水素化ビスフェノール A をサロゲートとして添加して内標準法により河川水中のビスフェノール A を定量した。本法はフミン質の比較的少ない河川水中のビスフェノール A の定量に用いることができる。