

資料 ビスフェノール A の塩素処理副生成物の分取及び構造解析

株式会社 東レリサーチセンター

1. 研究目的

ビスフェノール A を塩素処理した際に精製する化合物について GC/MS、LC/MS、LC/NMR 法にて同定を行うと共に、LC 法にて各成分の分取を行う。

2. 実験方法

2.1 試料

ビスフェノール A の塩素処理水は国立公衆衛生院から供与された(ビスフェノール A 510mg から処理分[試料 1]および 1g から処理分[試料 2])。なお、試料 1 および 2 については別々に抽出、LC 分取操作を行った。

2.2 溶媒および試薬

精製水	: 関東化学、HPLC 用
アセトニトリル	: 関東化学、HPLC 用
ジクロロメタン	: 関東化学、残留農薬試験用
無水硫酸ナトリウム	: 国産化学、特級
1mol/L 塩酸水溶液	: ナカライテスク
ヘキサン	: 関東化学、残留農薬試験用
アセトン	: 関東化学、残留農薬試験用

2.3 前処理法

2.3.1 抽出

予めアセトニトリル、精製水で洗浄およびコンディショニングした固相抽出カートリッジ(Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridges, Waters)に、1mol/L 塩酸で pH を 3.0 に調整した試料水を通水させた。通水終了後、5mL の精製水で洗浄後、ジクロロメタン 5mL にて溶出させた。溶出溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水処理後、ロータリーエバポレーターで約 0.2mL まで濃縮し、抽出溶液とした。抽出操作については試料 1 および 2 とも同様に行った。

2.3.2 精製

試料 1

予めヘキサン 50mL でコンディショニングした 5%含水シリカゲルカラム(10mm φ × 10cm)に、抽出溶液をアプライした。ヘキサン 100mL で洗浄後、20%(v/v)アセトン含有ヘキサン 100mL、50%(v/v)アセトン含有ヘキサン 100mL、アセトン 100mL で溶出し、各溶出画分毎に無水硫酸ナトリウムで脱水処理後、ロータリーエバポレーターで約 1mL に濃縮し、精製溶液とした。個々に以下の試料を調整した。

- 画分 A : 20%(v/v)アセトン含有ヘキサン溶出画分
- 画分 B : 50%(v/v)アセトン含有ヘキサン溶出画分
- 画分 C : アセトン溶出画分

試料 2

試料 2 の抽出成分を LC/UV にて測定した結果、それ以上の精製は不要と判断され、以降の処理には、抽出後の濃縮溶液をそのまま用いた。

2.4 測定

2.4.1 LC/MS 測定

試料溶液中に含まれる成分の分子量を調査するため、LC/MS にて測定を行った。

LC/MS 分析条件

HPLC	: Waters 616 Pump
	: Waters 600s Controller
	: Waters 486 Detector
Column	: Capcellpak C18 UG120 2.1mmi.d.×150mmL
Column temp.	: 24℃
Mobile Phase	: 溶離液 A、精製水 溶離液 B、アセトニトリル A : B(80 : 20) - (30min) - >(0 : 100)、hold for 10min
Flow rate	: 0.2mL/min
質量分析計	: TSQ7000 (Finnigan MAT)
データ処理装置	: DEC3000(DEC)
Ionization mode	: ESI(負イオン)
ESI Voltage	: 4.5kV
Seath gas	: Nitrogen(70psi)
Aux.gas	: Nitrogen(10unit)
HC temp.	: 250℃
Total scan time	: 2.0sec
Electron multi.	: 1,500V
走査範囲	: m/z 100~1000

2.4.2 LC/NMR 測定

試料中に含まれる成分の構造概要を調査するため、LC/NMR にて測定を行った。

LC/NMR 測定条件

HPLC	: Varian HPLC システム
Column	: Capcellpak C18 UG120 2.1mmi.d.×150mmL
Column temp.	: 室温
Mobile Phase	: 溶離液 A、精製水 溶離液 B、アセトニトリル A : B(80 : 20) - (30min) - >(0 : 100)、hold for 10min
Flow rate	: 0.2mL/min

¹H NMR 測定条件

装置	: UNITY INOVA 500 (パリアン)
観測周波数	: 499.8MHz
温度	: 室温
基準	: アセトニトリル (2.00ppm 付近)
観測幅	: 12000 Hz
パルス幅	: 45 度
データ点	: 32K
パルス繰り返し時間	: 1.5sec
積算回数	: 4~8 回

2.4.3 GC/MS 測定

フラグメント情報から構造解析を目的として、GC/MS 測定を行った。

GC/MS 測定条件

GC/MS	: Fisons MD-800
GC	
注入方法	: Splitless Injection
注入量	: 1 μ L
カラム	: SGE 社、BPX-5 25m \times 0.22mm I.D. \times 0.25 μ m Film
カラム温度	: 60 $^{\circ}$ C(1min)---10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(Hold for 10min)
キャリアーガス	: He(Head Pressure 120kPa)
インターフェース温度	: 280 $^{\circ}$ C

MS

イオン化法	: EI
イオン化電圧	: 70eV
イオン源温度	: 250 $^{\circ}$ C
捜査範囲	: m/z 10~800

2.4.4 LC/UV 測定

LC/UV 法にて測定を行い、各溶出画分のクロマトグラムパターンを調査した。また、ピーク面積の大きな成分については分取を行った。

HPLC 測定条件

HPLC	: ギルソン 680 ポンプ
カラム	: Capcel Pak UG120 4.6 ϕ \times 250mm(分析時) Capcel Pak UG120 306 ϕ \times 250mm(分取時)
移動相	: 溶離液 A、精製水 溶離液 B、アセトニトリル A : B(80 : 20) - (30min) - \rightarrow (0 : 100), hold for 10min

流速 : 1mL/min(分析時)
 15mL/min(分取時)
 検出 : UV254nm
 注入量 : 10 μ L(分析時)
 200 μ L(分取時)

3. 測定結果

3.1 試料 1

試料 1 の抽出成分を GC/MS にて測定した結果、多数の成分が確認され、HPLC での分取操作時の作業効率を考慮して、極性の違いによる精製を行うため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。溶出溶媒の極性を段階的にあげていき、20%アセトン・ヘキサン溶液溶出画分(試料 1・画分 A)、50%アセトン・ヘキサン溶液溶出画分(試料 1・画分 B)およびアセトン溶出画分(試料 1・画分 C)の 3 画分を得た。

それぞれの画分を再度 GC/MS 測定し、測定時クロマトグラム、主要成分のマスペクトルを示した。また、ライブラリーサーチを行い、一致するスペクトル(成分)が示された場合にはライブラリーサーチ結果を示した。

ビスフェノール A が塩素置換した際に期待される分子量を表 1 に示した。

表 1 ビスフェノール A および塩素置換体の期待される分子量

CL	分子内元素数			分子量
	C	H	O	
0	15	16	2	228
1	15	15	2	262
2	15	14	2	296
3	15	13	2	330
4	15	12	2	364

試料 1・画分 A では Trichlorophenol、Benzofuran,5,7-Dichloro-2,3-Dihydro-2-methyl、Tetrachlorobisphenol A と考えられる成分等が観測された(表 2)。

表 2 試料 1・画分 A の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
10.781	196	2,4,6-Trichlorophenol
12.816	202	Benzofuran,5,7-Dichloro-2,3-Dihydro-2-methyl
14.439	220	不明
21.960	356	不明
24.337	364	Tetrachlorobisphenol A

試料 1・画分 B では Benzofuran, 5,7-Dichloro-2,3-Dihydro-2-methyl、Dichlorobisphenol A、Tetrachlorobisphenol A 等が観測されたが、構造が推定されない成分も確認された。

表 3 試料 1・画分 B の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
11.738	186	不明
12.814	202	Benzofuran,5,7-Dichloro-2,3-Dihydro-2-methyl
14.530	220	不明
20.806	262	不明
20.989	296	Dichlorobisphenol A
22.663	296	Dichlorobisphenol A
22.770	330	Trichlorobisphenol A
24.333	364	Tetrachlorobisphenol A
24.447	380	不明

試料 1・画分 C においては、量的に多い成分は観測されず、画分 A および B においてほとんどの成分が溶出したと考えられた。

以上の結果より、試料 1・画分 B にはビスフェノール A の 1、2、3、4 塩素置換体が、試料 1・画分 A にはビスフェノール A の 4 塩素置換体が含まれていると考えられた。

LC 分取時の目的成分(ビスフェノール A の塩素置換体)の溶出位置を確認するため LC/MS 測定を行った。試料 1・画分 A および試料 1・画分 B 双方について、LC/MS 測定 (ESI イオン化法での負イオン検出) を行った結果を表 4 および表 5 に示した。

表 4 試料 1・画分 A の LC/ESI/MS 測定結果

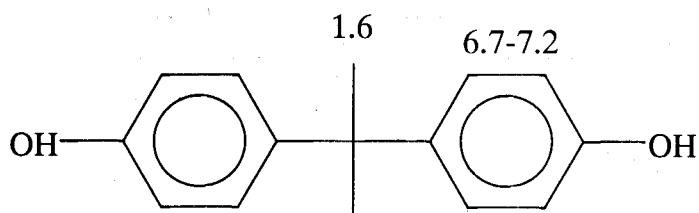
スキャン回数 (回)	推定分子量 (M.W.)	目的成分
71~86	364,524	
365~392	220	
575~589	234	
599~626	196	
667~678	202	
695~709	380	
727~751	364	4塩素化ビスフェノールA
826~842	322	
855~865	356	

ESI での負イオン検出のため、一般的には脱プロトン化イオンしか検出されないが、分子量情報に加えて、塩素元素由来のアイソトープパターンから塩素置換数も加味し、上記の如く定性を行った。

表 5 試料 1・画分 B の LC/ESI/MS 測定結果

スキャン回数 (回)	推定分子量 (M.W.)	目的成分
66~80	364	
245~260	186	
370~399	220	
455~465	302	
500~520	286	
530~540	334	
550~560	262	1塩素化ビスフェノールA
575~580	234	
580~590	359	
622~635	296	2塩素化ビスフェノールA
652~667	338	
677~687	330	3塩素化ビスフェノールA
694~702	380	
729~745	364	4塩素化ビスフェノールA

質量分析測定法に合わせて、構造の概要把握のため、LC/NMR 測定も行った。一般的に NMR(LC-NMR)測定においては、ビスフェノール A 骨格を有する化合物の場合、メチル (CH_3) 部位のプロトンが 1.6ppm に、アロマティックに結合したプロトンが 6.7 から 7.2ppm に検出される。塩素が置換した事によるケミカルシフトの変動については未知の部分も多いが、上記ビスフェノール A のケミカルシフトを基に LC-NMR にて測定されたスペクトルの解釈を行った。



ビスフェノール A の構造および期待されるプロトンのケミカルシフト

LC-MS 測定にて、ビスフェノール A の塩素置換体と考えられる分子量を有する化合物について LC-NMR にて確認を行った結果、試料 1・画分 A についてはリテンションタイム 22 分から 24 分にかけて 1.6ppm および 7.2~7.4ppm にプロトンが確認され、ビスフェノール A 骨格を有する化合物と考えられた。この成分については塩素 4 置換ビスフェノールに相当する分子量(M.W.366)が LC-MS 測定で得られているが、NMR 測定時の 1.6ppm 付近および 7.2~7.4ppm 付近に 2 本ずつのピークが認められることより、塩素の置換形式の異なる化合物等が重なって検出されている可能性も示された。また、リテンションタイム 13

分から 16 分にかけては、7.3ppm 付近にアロマトニックに結合したプロトン由来のピークが認められたが、1.6ppm 付近にメチル基に相当するプロトンが検出されておらず、ビスフェノール骨格を有しない成分と考えられた。この成分については LC-MS 測定にて分子量 196、塩素 3 個を有する化合物であることが認められており、トリクロロフェノールと推定された。

試料 1・画分 2 においても、LC-NMR 測定の結果、リテンションタイム 10 分から 19 分にかけて 1.6ppm 付近および 6.7~7.4ppm にビスフェノール A 骨格を有すると考えられる成分が検出された。NMR での各ピークの分離パターンは単一成分ではない可能性も示唆しており、この際も塩素の置換形式の異なる化合物等が重なって検出されている可能性も示された。

今回の NMR 測定ではビスフェノール A のどの部位に塩素が置換したかは断定できなかったが、¹³CNMR 測定等により、詳細に置換部位の特定が可能と考えられた。

目的成分の LC 分取操作に先立ち、試料中の各成分の溶出パターンを確認するため LC/UV(コンベンショナルカラム)測定を行った。試料 1・画分 A についてはブロードなピーク形状が示され、複数成分の混在により十分分離出来ていないためと考えられた。リテンションタイム 26~27 分に 4 塩素置換ビスフェノール由来のピークが観測された。試料 1・画分 B においてはリテンションタイム 25~30 分にビスフェノール A の塩素 1~4 置換体が観測された。試料 1・画分 C においては観測される濃度で成分は存在していないと考えられた。

主要成分(LC-UV)について、分取を行った。試料 1・画分 A についてはリテンションタイム 13~17、24~27.5、31~34 分の成分をそれぞれ分取した。また、試料 1・画分 B についてはリテンションタイム 25~27 の成分を分取した。その結果、テトラクロロビスフェノール A が 3.5mg、トリクロロフェノールが 2.5mg 採取されたが、その他の成分については十分な量は採取されなかった。

3.2 試料 2

新たに 1g のビスフェノール A を塩素処理した試料から抽出操作を行った。抽出操作法は試料 1 と同様に操作を行った。濃縮後に LC/UV 測定を行った結果、リテンションタイム 17.3 分に 1 塩素化ビスフェノール A、18.8 分に 2 塩素化ビスフェノール A、20.5 分に 3 塩素化ビスフェノール A、22.3 分に 4 塩素化ビスフェノール A と考えられる成分が観測された。LC 分取時においては測定時の LC 条件のまま、繰り返し注入することで各成分の単離を行った。1 塩素化ビスフェノール A 画分を試料 2・ピーク 1、2 塩素化ビスフェノール A 画分を試料 2・ピーク 2、3 塩素化ビスフェノール A 画分を試料 2・ピーク 3、4 塩素化ビスフェノール A 画分を試料 2・ピーク 4 とし、更に、リテンションタイム 23~30 分の複数成分(試料 2・ピーク 5)についても分取を行った。

各分取画分については GC/MS にて成分の確認を行った。

試料 2・ピーク 1 について GC/MS 測定を行った結果、リテンションタイム 17.97 分に塩素 1 置換ビスフェノール A(M.W.262)が観測され、その他に、トリクロロフェノール(M.W. 196)、分子量 220 を示す成分等が観測された(表 6)。この分子量 220 の化合物については分子内に塩素 2 個を持つと推定されたが、その構造は不明である。

表 6 試料 2・ピーク 1 の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
8.68	196	2,4,6-Trichlorophenol
11.92	234	不明
12.18	220	不明
12.35	220	不明
17.97	262	Monochlorobisphenol A
22.32	?	炭化水素類

試料 2・ピーク 2 について GC/MS 測定を行った結果、リテンションタイム 18.37 分と 19.77 分に塩素 2 置換ビスフェノール A(M.W.296)が観測された。これら 2 つの塩素 2 置換ビスフェノール A はそのマススペクトルが異なっていることから、塩素の置換様式が異なっている(構造異性体)と考えられた。更に、リテンションタイム 8.72 分にトリクロロフェノール(M.W.196)が観測された(表 7)。

表 7 試料 2・ピーク 2 の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
8.72	196	2,4,6-Trichlorophenol
18.37	296	Dichlorobisphenol A
19.77	296	Dichlorobisphenol A

試料 2・ピーク 3 について GC/MS 測定を行った結果、リテンションタイム 20.08 分に塩素 3 置換ビスフェノール A が観測され、21.40 分に塩素 4 置換ビスフェノールが少量観測された(表 8)。

表 8 試料 2・ピーク 3 の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
20.08	330	Trichlorobisphenol A
21.4	364	不明

試料 2・ピーク 4 について GC/MS 測定を行った結果、リテンションタイム 21.6 分に塩素 4 置換ビスフェノール A が観測された(表 9)。

試料 2・ピーク 5 について GC/MS 測定を行った結果、10 成分以上が確認された。いずれの成分も分子内に 3~6 個の塩素を有しているが、その構造については推定できていない。

表 9 試料 2・ピーク 4 の GC/MS 測定結果

リテンションタイム (分)	推定分子量 (M.W.)	推定成分
20.08	364	Tetrachlorobisphenol A

回収した各画分の回収量を測定した結果、表 10 に示した内容で回収された。

表 10 各画分の回収量

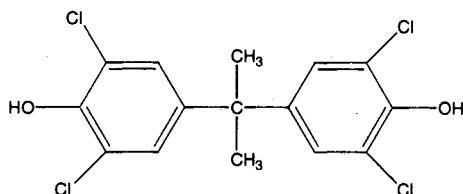
画分名	目的成分	回収量(g)
試料 2・ピーク 1	塩素 1 置換ビスフェノール A	0.0012
試料 2・ピーク 2	塩素 2 置換ビスフェノール A	0.0058
試料 2・ピーク 3	塩素 3 置換ビスフェノール A	0.0391
試料 2・ピーク 4	塩素 4 置換ビスフェノール A	0.0452
試料 2・ピーク 5	なし	0.1011

より詳細な構造解析のために、上記回収成分試料の一部を NMR 測定用試料とした。

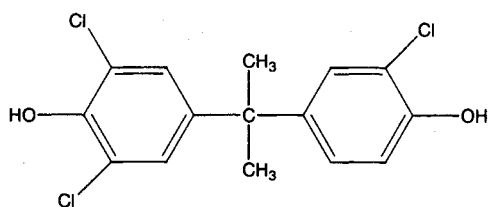
3.3 塩素処理副生成物の NMR による構造解析

4 種類の分取物 (ピーク 1, 2, 3, 4。以下 P1, P2, P3, P4 と表す) について ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT、二次元 NMR 測定を行ない (P1, P2 は試料量が多くないため、 ^1H NMR などの一部の測定のみ)、分子量の結果を考慮して解析し、以下の結果を得た。また NMR の帰属表を作成した。

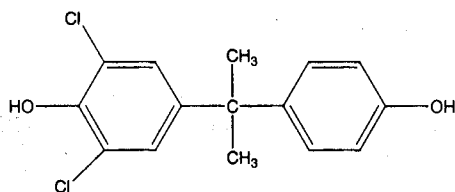
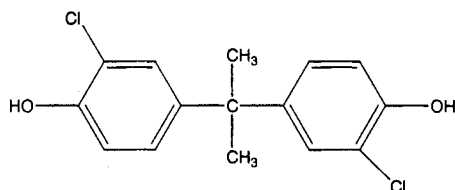
P4 の構造 :



P3 の構造 :



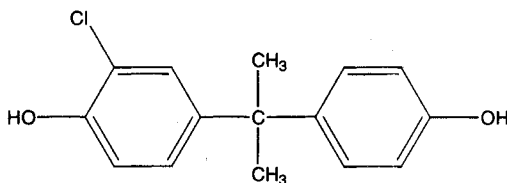
P2 の推定構造 :



存在比 (モル比). 1(上) : 0.25(下)

P2 には他に、トリクロロフェノールが、上記のモル比で0.15含まれていると推定された。

P1 の推定構造 :



これ以外の成分の詳細は不明であった。

4. まとめ

ビスフェノール A を塩素処理した際に生成する化合物について GC/MS、LC/MS、LC/NMR 法にて同定を行うと共に、LC 法にて各成分の分取を行った。

ビスフェノール A の塩素置換体(H-Cl 交換体, Cl=1,2,3,4)に加えて、クロロフェノール類も検出されたが、塩素を含有する数種の化合物の構造については推定ができなかった。

各塩素数毎に成分の分取を行った結果、塩素 1 置換ビスフェノール A が 1.2mg(トリクロロフェノール、構造不明成分混在)、塩素 2 置換ビスフェノール A が 5.8mg(トリクロロフェノール、構造不明成分混在)、塩素 3 置換ビスフェノール A が 39.1mg、塩素 4 置換ビスフェノール A が 45.2mg 回収された。回収された化合物の一部は NMR 測定に使用したため、内分泌攪乱作用の確認実験や浄水処理における除去性、さらに詳細な ^{13}C NMR 測定などのデータを選ぶには今後、更に分取操作と実験を実施する必要がある。