

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解明

GC/MS 分析のノウハウ（ブランクの扱いなど）
及び LC/MS 分析（フェノール類など）について

主任研究者 中澤 裕之
星薬科大学

分担研究者 松岡 広和、佐久井 徳広、滝埜 昌彦
横河アナリティカルシステムズ株式会社

研究要旨

内分泌攪乱化学物質の GC/MS を用いる微量分析において、分析の注意点やブランクの扱いなど分析上のノウハウに関する知見を報告する。

また、内分泌攪乱化学物質の疑いのあるジクロロフェノール、ビスフェノール A 及びアルキルフェノール類の微量分析において、LC/MS を用いる高感度分析法の知見を報告する。

A．研究目的

内分泌攪乱化学物質の分析では、極低濃度までの測定が要求される。そのため、これまでの通常分析においてはそれほど注意を払う必要のなかった部分がクローズアップされてきている。これら化学物質の中でも特に注目度の高いフタル酸エステル類、ビスフェノール A について、分析の注意点やブランクの扱いなど GC/MS 分析上のノウハウに関する知見を報告する。

また、内分泌攪乱化学物質の分析は、通常 GC/MS を用いる手法が多く使用されている。しかし、極性物質の測定においては、誘導体化が不要で再現性も優れている LC/MS を用いる手法が注目されてきた。例えば、ジクロロフェノール、エストラジオール更にはビスフェノール A、アルキルフェノールといった水酸基を有した弱酸性化合物は、吸着性が強いため GC/MS 分析において前処理で誘導体化を行う必

要がある。しかし、誘導体化は複雑なため、より簡便な手法として LC/MS が注目を集めている。そこで、大気圧イオン化法(API)を使用した LC/MS 法の高感度化についての知見を報告する。

B．研究方法

使用した GC/MS は通常の四重極タイプである。また、使用した LC/MS の構成図は図.1 に示す。この図に示したイオン源は API の代表的イオン源であるエレクトロスプレーイオン化(ESI)法である。また分析条件については各分析手法でのクロマトグラムに示した。

C．研究結果及び考察

1．GC/MS 分析上のノウハウ

1-1．フタル酸エステル類の分析

(1) フタル酸エステルの汚染に対する解決ポイント

フタル酸エステル類の汚染があった時、全体からひとつひとつ汚染源を特定していくのではなく、なにも無い状態からひとつひとつ条件を付加していくことが肝要である。

段階的解決のポイントに関する知見を報告する。

(2) 装置ブランク

フタル酸エステルブランクチェックメソッドを読み込み、インジェクターにシリンジを装着せず GC/MS をスタートさせる。なお、1 回目の分析では必ずフタル酸エステルのピークは検出される。この原因として、スプリットベントラインが汚染されていることが考えられる。この汚染は大量のキャリアガス (200ml/分) でパージすることにより、低減することができる。通常かなり汚染されていても、装置ブランクはパージ流量のコントロールによりほぼ解消される。

装置ブランクおよび溶媒ブランクの一例を図 2 に示す。

(3) 注入ブランク

フタル酸エステルのピークが無くなれば、次にシリンジを装着して同じように空打ちする。ピークが検出されれば、セプタム、ライナー、ゴールドシール、カラムの順にチェックする。この中で効果が大きいのは、ゴールドシールの交換である。また、セプタムの交換はくれぐれも容器から出したばかりの新品を付けず、あらかじめアルミホイルにくるみオープンで焼いておいたものを使用する。新品を使用する場合は、アルミ缶に入ったグリーンセプタムが望ましい。また、マイクロシールセプタムを使用する場合も十分に焼出しを行う。装着後の汚染に気付いた際、注入口の温度を 320 度位にしてしばらく放置しておく。また、

カラムは注入口側を 30cm 位切ると良い。同時にピーク形状の改善も期待できる。

(3) 溶媒ブランク

フタル酸エステルのピークが無くなれば (DBP は少し残ることもある)、抽出に使用する溶媒を測定する。バイアルキャップも袋から出し、デシケータ等に保存して置くと良い。バイアルキャップはテフロンタイプが良い。しかし、シリンジで孔があくと収縮しないので、サンプルを放置しておくことはできない。シリコン製のバイアルキャップは使用しない方が良い。イオン 147 にブランク (シロキサン) が存在し、同位体イオンの関係でイオン 149 の妨害となりかねないためである。

市販品溶媒の中で最もクリーンなものは、DBP のみ少量検出される。DEP や DEHP が検出される溶媒は、程度にもよるが抽出溶剤としては控えた方が良い。溶媒ブランクの確認は、抽出操作を行う前に必ず行う必要がある。なお、空打ちを行っているので、溶媒を注入すると流路よりフタル酸エステル類が洗い流されてくることがある。2 回目に検出された成分の感度が下がるようであれば、下がりきるまで何回か打って確認する。

(4) 操作ブランク

実際の抽出操作に従ってサンプルを入れず、溶媒だけで行う。器具の汚染は殆ど DEHP である。器具は使用直前に分析済みの溶媒でかるく流す。溶媒ブランクと同様の値が理想である。

(5) リファレンス

実際の抽出操作に従ってリファレンスとなる水の測定を行う。現在のところフタル酸エステルの含まれない

水はない。また、前処理はなるべく簡素化することが望ましい。濃縮はコンタミやパージによる飛散があるため、行わない方がよい。さらに、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウムの添加はどんなに焼き出したものでもコンタミは避けられないので、少量の添加が望ましい。

(6) サンプル測定

サンプルの測定値とブランク値との差が小さく、しかもブランク値が高い時、その差を分析値として採用すべきかは疑問の残るところである。

1-2. ビスフェノールAの分析

(1) ビスフェノールAのブランクに対する解決ポイント

ビスフェノールAのブランクはなかなか無くならない。これはビスフェノールが吸着性の強い化合物であること、そのために誘導体化をしなければならないこと、さらに分析カラムにポリカーボネートが使用されていることなどが考えられる。従って、GC/MS分析より測定感度は下がるが、HPLCやLC/MS分析の方が望ましいと言える。しかし、ここではビスフェノールAのGC/MS分析におけるブランク解決方法に関する知見を報告する。

(2) 吸着

ビスフェノールAはフェノール水酸基が2つあるため、極性が強く吸着も強い。特にガラスライナーには吸着し、5%ほど残ってしまう。

(3) 誘導体化

ビスフェノールAはGC/MSにより、誘導体化せずそのまま分析しても1ppb位まで検出できるが、誘導体化分析が一般的である。誘導体化はトリメチルシリル(TMS)化が簡単で、1mlのサンプルに対しBSTFAを50~100μl位添加し、20~30分放置すれば簡

単に反応する。一つの水酸基を誘導体化すると5倍ほど感度が上がる。ビスフェノールAの場合は二つ水酸基があるので、そのままの分析より10倍位感度が上がる。この際、水酸基を持つ溶媒(水、メタノール)が入っていると反応しない。誘導体化試薬添加の際、白煙が出てサンプルが多少暖かなれば、反応していない証拠である。

(4) 分析カラム

ビスフェノールAの分析に際して、まず溶媒を、次に溶媒にBSTFAを添加した試料を分析してみる。この時、多少のビスフェノールAのピークが確認できるはずである。概略値として0.1~0.2ppbであり、この値をゼロにすることはできない。この原因としてビスフェノールAが誘導体化剤に存在する、ライナーに以前のものが吸着している及びカラムに存在するなどが考えられる。まず、溶媒にBSTFAを添加した試料を1, 2, 4μlと注入してリニアリティーがあれば、誘導体化剤が原因と推定できる。リニアリティーがなく、ガラスライナーを交換して数値が下がれば、吸着が原因と推定できる。カラムの注入口側及びインターフェース側を15cmほど切り、リニアリティーが復活すれば、カラムが原因と推定できる。カラムが原因の場合、カラムのエージングを低温からしっかりすることが肝要である。

(5) サンプル測定

ビスフェノールAは、アルキルフェノールと性質は全く違っており、無極性の溶媒には殆ど回収されない。また、浮遊固形物(SS)には強力に吸着するので、別に回収、抽出し、溶液部と合わせると良い。

2. 大気圧イオン化 (APCI) でのアルキルフェノールの分析

2-1. ESI 法との比較

ビスフェノール類及びアルキル類は、弱酸性の化合物であるイオンモードでの測定が有効である。しかし、水酸基解離は弱く、ESI 法では感度が低いので、APCI 法が有効である。特にアルキルフェノール類の感度は、APCI 法が 3 ~ 10 程度高い(図. 3)。この要因は、APCI では移動相溶媒がイオン化され、そのイオンが分子/イオン反応を起こしてアルキルフェノール類の水酸基からプロトン(H-)を強制的に引抜くためである。従って、アルキルフェノールの様な溶液中で解離が少ない化合物は、APCI が有効である。

2-2. APCI での加圧ガスの影響

APCI でアルキルフェノール類を測定する場合、通常移動相溶媒のイオンがプロトンを引抜く役割をする。しかし、弱酸性化合物である場合その能力は低く、十分にプロトンが脱離せず、イオン化効率が低い場合が多い。そこで、より高率良くプロトンを脱離させるため、加圧ガスに圧縮空気や高純度酸素を使用して通常窒素の場合と比較した。その結果、ビスフェノール A 及び代表的なアルキルフェノール類で高純度酸素を使用することで、感度が 2 倍以上向上した(図. 4)。

この原因は、酸素ガスがイオン源内でイオン化されて O⁻や O₂⁻が大量に発生し、このイオンがプロトンの脱離を促進させたためと考えられる。従って、通常使用される窒素ガスを高純度酸素ガスに変更することは有効である。

2-3. スキマーCID

通常 API 法で測定した LC/MS で得られるマススペクトルは、GC/MS の

EI 法とは異なりフラグメントイオンが少なく、プロトンが付加あるいは脱離した擬分子イオンが主イオンで、構造由来のフラグメントイオンは非常に少ない。しかし図. 1 で示したイオン源のフラグメンターゾーンと呼ばれるキャピラリーとスキマー間では、真空度が 3 torr 程度と低いため、大量の窒素ガスが存在する。従って、キャピラリー出口の印可電圧を高くし、飛び出してくるイオンを加速させることでイオンと窒素ガスとの衝突を増大させ、イオンを解裂させフラグメントイオンを生成させることが可能である。この手法は、スキマーCID(衝突誘導解裂)と呼ばれ、構造解析に用いられる。本研究においてもフラグメンター電圧を変更し、マススペクトルの測定を行った。その結果、100V では擬分子イオンのみが観察されたが、200V では n-アルキルフェノールではアルキル基が脱離したイオン(m/z=106)が特徴的に観察され、t-アルキルフェノールでは t-ペンチル基が脱離したイオンが観察された(図. 5)。

2-4. SIM モードでの分析

微量分析においては SIM モードが有効である。LC/MS においても同様であり、各化合物のベースピークイオンをターゲットイオンとして、SIM モードで測定を行った。その結果、1ppb においてすべてのアルキルフェノール及びビスフェノール A は、検出可能であった(図. 6)。

D. 結論

これまでの研究において、分析の注意点やブランクの扱いなど内分泌攪乱化学物質の分析に関する問題点が明らかになってきた。しかし、ブランクの問題点を抱えての極低濃度にお

ける分析では、分析者の注意力や熟練の差が測定結果の信頼性に大きな影響を与えることは事実である。それをサポートするため、分析上のノウハウや新しい知見については、今後も情報を提供していくつもりである。

また、内分泌攪乱化学物質の分析には従来 GC/MS 法が主に用いられてきた。しかし、誘導体化が必要な化合物も多く、分離分析としてガスクロマトグラフィー法が必ずしも適切とは言えない。HPLC 法は検出器の感度、選択性に問題があった。ところが、近年 LC/MS 法が普及し、LC/MS 法による内分泌攪乱化学物質の分析が注目を集めている。我々は、今後も LC/MS 法の様々な検討を行い、新しい知見については情報を提供していくつもりである。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

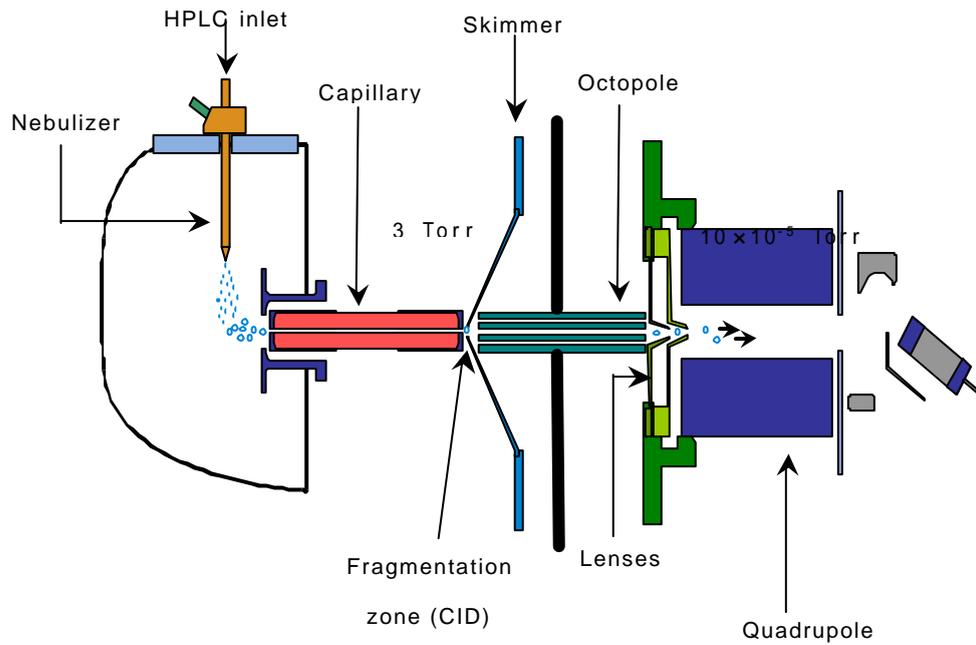


図.1 LC/ESI-MS の構成図

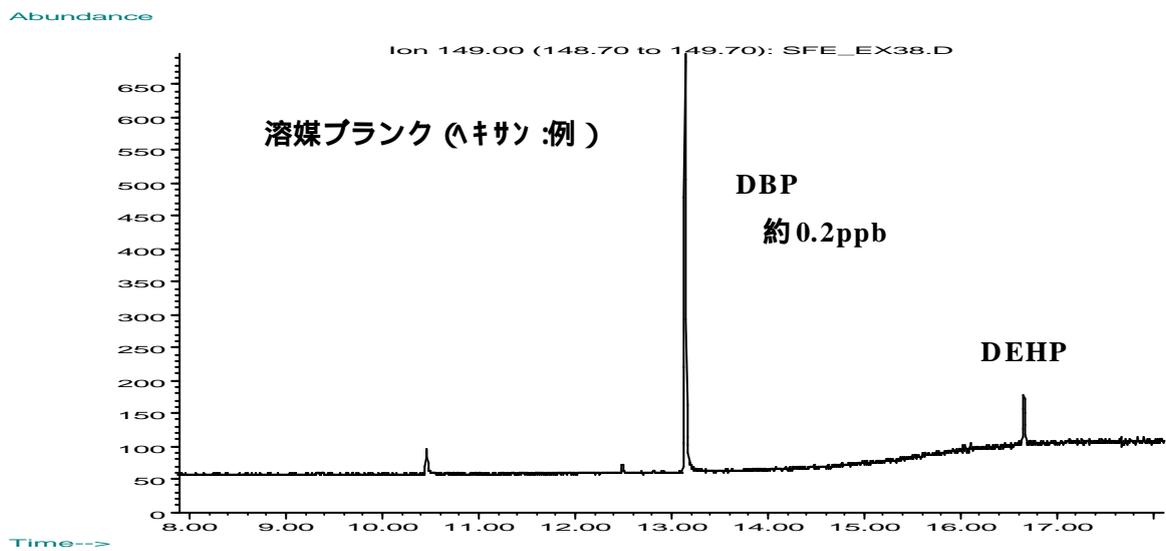
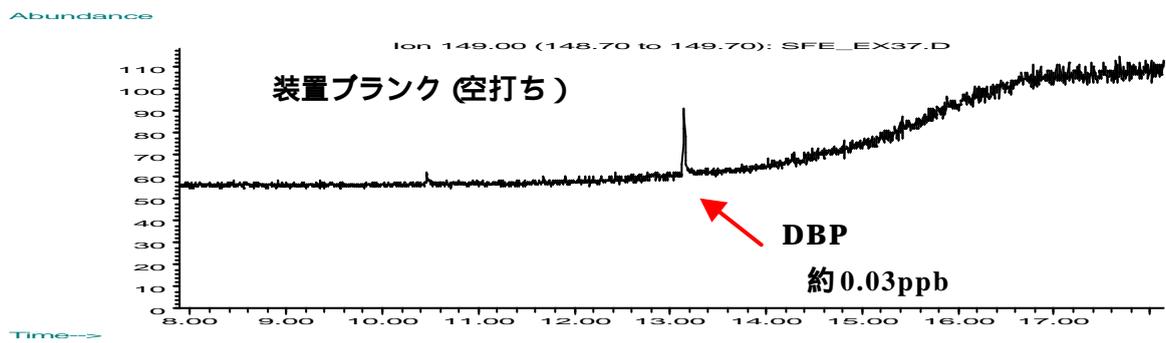


図.2 装置ブランクおよび溶媒ブランク

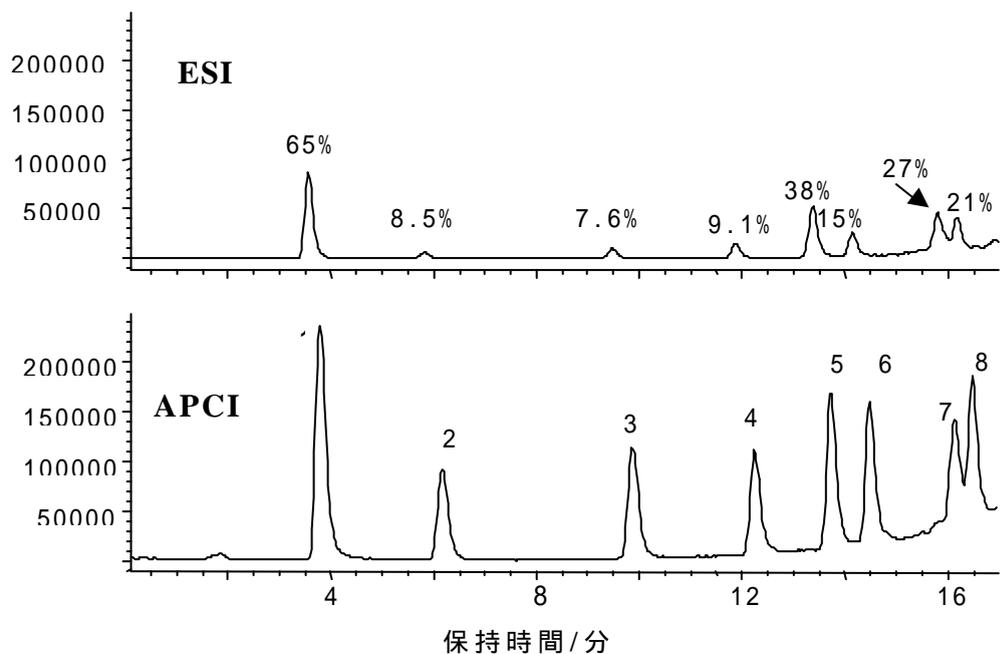


図. 3 ビスフェノール A, アルキルフェノール類の TIC(20ppm)

(Condition)

Column: Zorbax Eclips XDB C18(150mm, 4.6mm, 5 μm), Oven temp: 40

A: MeCN, B: 10mM CH₃COONH₄ 50%A/B --- (20min) --- 100%A, Flow rate: 0.2ml/min

Scan range : 100-500amu, Fragmentor voltage: 60V, polarity: Positive ion mode

1: Bisphenol A, 2: 4-t-Butylphenol, 3: 4-n-Pentylphenol, 4: 4-n-Hexylphenol,

5: 4-t-Octylphenol, 6: 4-n-Heptylphenol, 7: Nonylphenol, 8: 4-n-Octylphenol

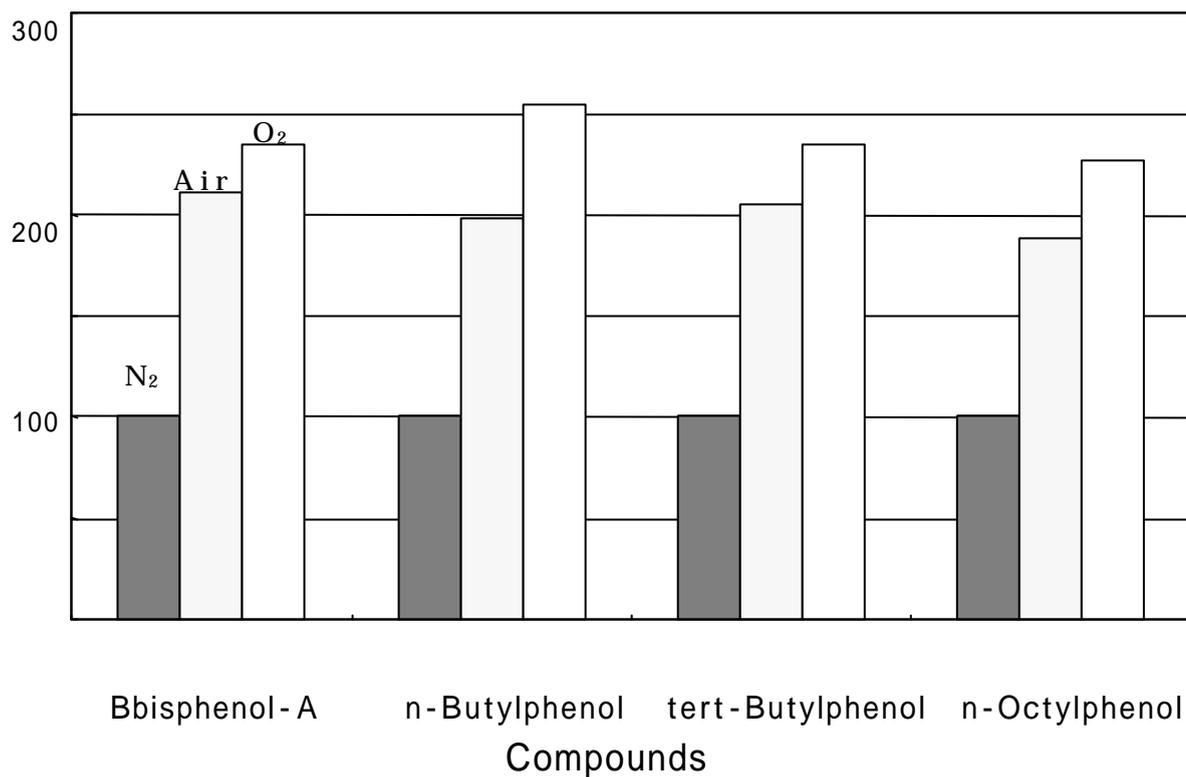


図. 4 APCI 加圧ガスの違いによる各化合物の相対強度 (N₂:100)

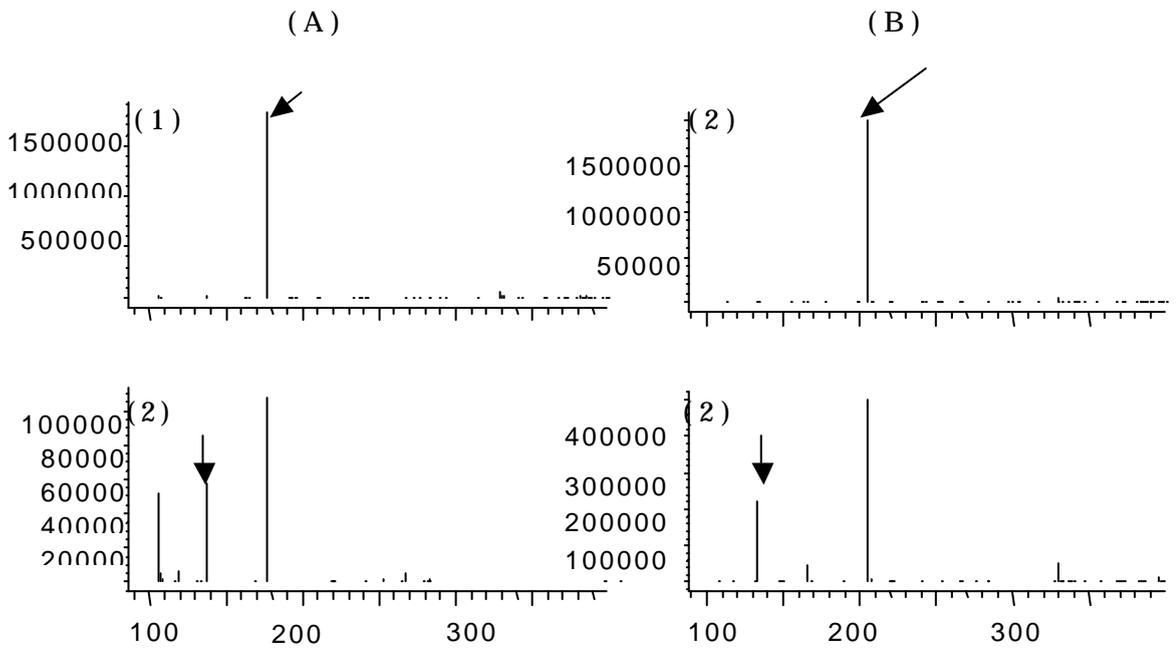


図.5 スキマーCIDによるアルキルフェノール類のマススペクトル

(A):4-n-Hexylphenol, (B):4-t-Octylphenol

Fragmentor Voltage(V) ; (1):100V, (2):200V

:177(M-H)⁻, :205(M-H)⁻, :138)⁻, :133[M-H-(CH₃)₃CHCH₂]⁻,
:106(CH₂C₆H₄O)⁻

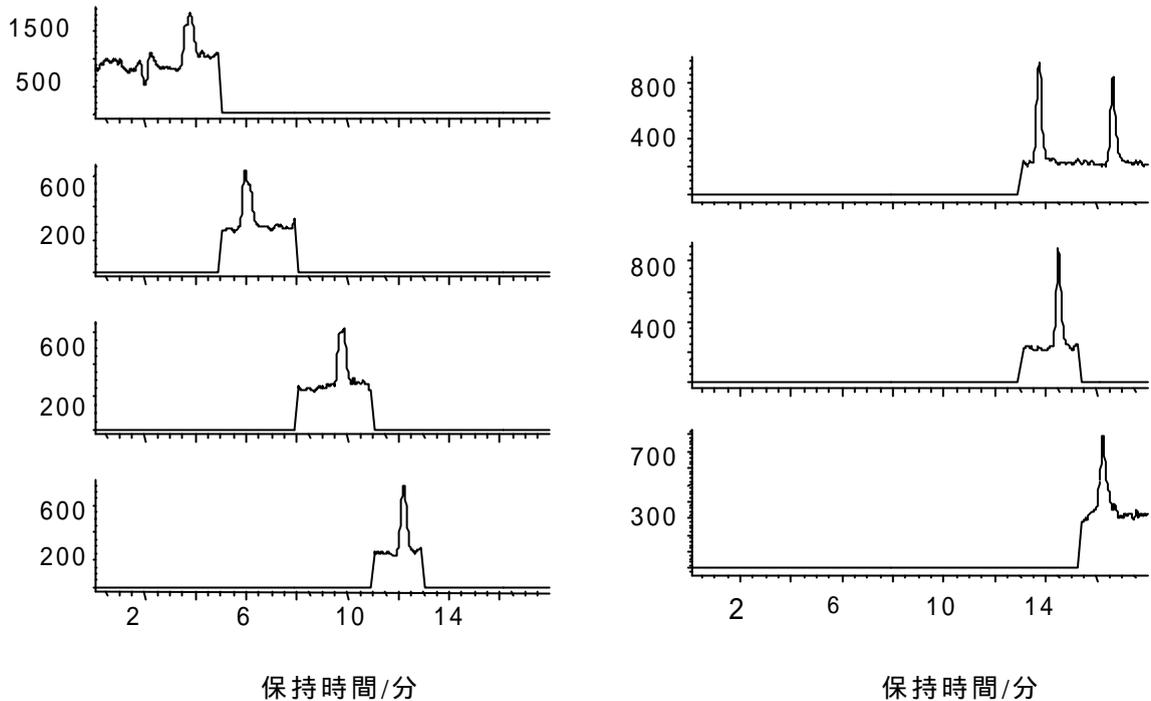


図.6 ビスフェノール A 及びアルキルフェノール類の SIM クロマトグラム

(1ppb)

:Bisphenol A, :4-t-Butylphenol, :4-n-Hexylphenol, :4-n-Pentylphenol
:4-t-Octylphenol, :4-n-Heptylphenol, 7:Nonylphenol, :4-n-Octylphenol

