

固相抽出-電気化学検出器付きHPLC法によるビスフェノールA、エストロゲン分析法

東京都環境科学研究所分析研究部 ○ぬで島智恵子、吉岡秀俊、備藤敏次、東野和雄、植田忠彦

A Study on the Analysis for Bisphenol A and Estrogen by High-performance Liquid Chromatography with an Electrochemical Detector ,Chieko NUDEJIMA,Hidetoshi YOSHIOKA,Toshiji BITO,Kazuo HIGASHINO,Tadahiko UETA(The Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection Analytical Research Division)

1. はじめに

外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の疑いが持たれている物質の分析方法として、ビスフェノール A は誘導体化 GC/MS 法、17β - エストラジオールは ELISA 法が示されているが、その前処理は煩雑である。

そこでビスフェノール A を誘導体化することなく、エストロゲンと同時に分析する方法の検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

あらかじめ、アセトニトリル、メタノール、超純水、各 3 ml でコンディショニングした Oasis™ HLB カートリッジに塩酸（1 M）で pH3.5 に調整した試料水 100ml を 10mL/min で通水する。抱合体の影響が考えられる下水処理水などの試料水については別に報告する。

通水後、5 %メタノール水溶液 3ml で洗浄を行い、アセトニトリル 7ml で溶出した。ロータリーエバポレーターで乾固後、移動相で 100 μl にメスアップし、その 5 μl を注入する。

HPLC 条件は表 1 に示す。

3. 実験結果及び考察

（1）試料溶液の保存方法

採水後、保存状態の違いでビスフェノール A の濃度に変化がみられるかどうかを検討するために、2 ヶ月間濃度の測定を行った。

実験方法として、河川水（志茂橋）と海水（st35）の各 2 L を採水したものを 1 L ずつガラス瓶に分けて、一方はそのまま、もう一方には L-アスコルビン酸を 1 g 添加して保存した。

5 日おき程度で 1 ヶ月間測定を行い、更に 1 ヶ月後測定を行った。

その結果を図 1 に示す。河川水、海水ともに 1 ヶ月程度の保存ではアスコルビン酸の添加の有無にかかわらず、ビスフェノール A の濃度の減少は見られなかった。

2 ヶ月経過すると、ビスフェノール A の濃度の減少がわずかに見られるが、アスコルビン酸の添加の有無による濃度の違いは見られなかった。

（2）抽出溶媒量の検討

前処理の過程で固相カートリッジに吸着させた後、どの程度の量のアセトニトリルで抽出が十分に行えるの

表 1 HPLC 条件

HPLC	: LC 600(GL Sciences)
ECD	: ED 623(GL Sciences)
カラム	: Inertsil ODS-3(2.1×250mm)
移動相	: CH ₃ CN/H ₂ O(40/60)、50mM NaClO ₄ 、pH2.6 (H ₃ PO ₄ で調整)
流速	: 0.2ml/min
注入量	: 5 μl
カラム温度	: 35

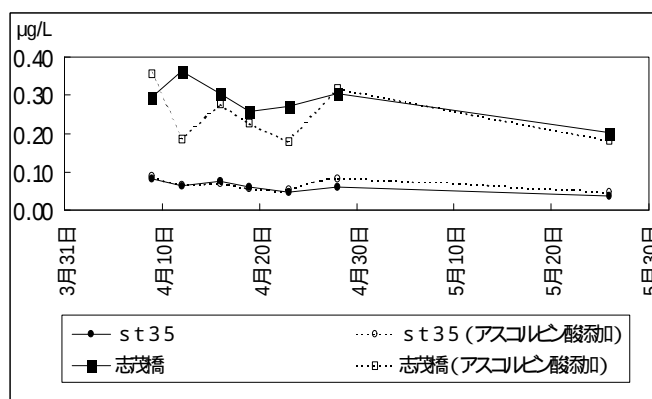


図 1 ビスフェノール A の経時変化

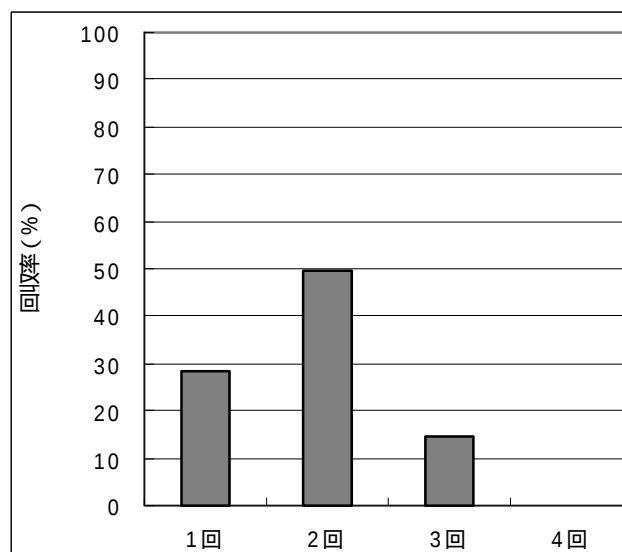


図 2 ビスフェノール A の溶出率

か、抽出に必要なアセトニトリルの量の検討を行った。

超純水 100ml に、ビスフェノール A、17β-エストラジオール、エストリオール、エストロン各 10ng を添加したものを試料として、前処理を行った。抽出する際、アセトニトリルで 2ml ずつ抽出を行った。

結果を図 2 に示す。ビスフェノール A は 6ml のアセトニトリルで 90%以上の回収率が得られた。4 回目に抽出された溶液にはビスフェノール A は検出されなかった。また、エストロゲンについても 6ml で十分抽出できることがわかった。

従って、抽出に必要なアセトニトリルの量は 7ml が適当であると思われる。

(3) 電気化学検出器の最適印加電圧の検討

ECD の印加電圧の違いで、ビスフェノール A とエストロゲン 3 種のピーク面積がどのように変化するか検討し、これら 4 種の物質が特異的に検出できる ECD の印加電圧設定に関する検討を行った。

標準試料としてビスフェノール A、エストリオール、17β-エストラジオール、エストロンの濃度各 1 μg/ml の混合標準液を HPLC に 5 μl 注入した。

その結果、図 3 に示すようにエストロンについては、900mV 以上でないとピークが現れず、また、4 種類の物質全てについて印加電圧を上げるほどピーク面積が大きくなることがわかった。

しかし、実際に河川水などを測定する際に、エストリオールについて 800~900mV ではピークが分離できているのに、950mV 以上になると夾雑物質の影響でピークが正しく認識されないことがわかった。

従って、900mV が適当であると思われる。

4. まとめ

以上のような結果から、2. 実験方法と表 1 に示したような条件で、添加回収実験を行った。

試料溶液として 100ml の超純水に、ビスフェノール A、17β-エストラジオール、エストリオール、エストロン各 10ng を添加したものをを用いた。その結果、4 種すべてにおいて 90%以上の回収率が得られた。

従って、この方法によりビスフェノール A と 3 種のエストロゲンの同時分析が可能であった。今後は、同時分析を行える他の物質についての検討を行う予定である。

5. 参考文献

1) 環境庁水質保全部水質管理課:平成 10 年度 10 月 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) - 8 ~ 25、 - 1 ~ 10

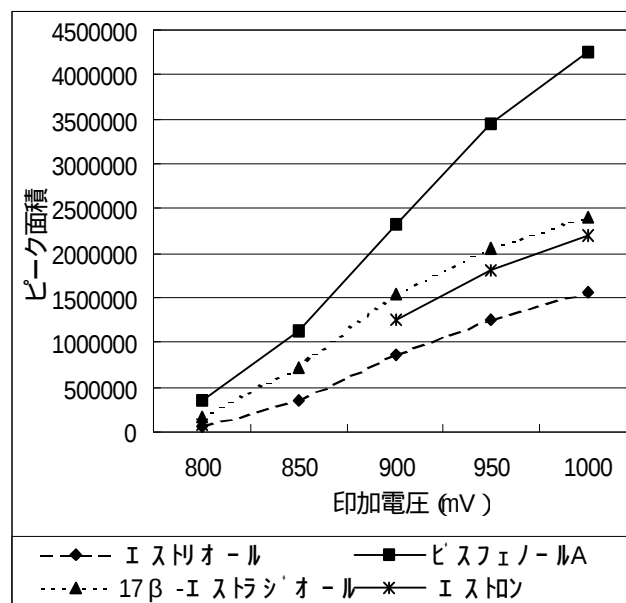


図 3. 印加電圧の変化によるピーク面積の変動