

図-23 5 μg/L添加系通常処理系 (後半調査)

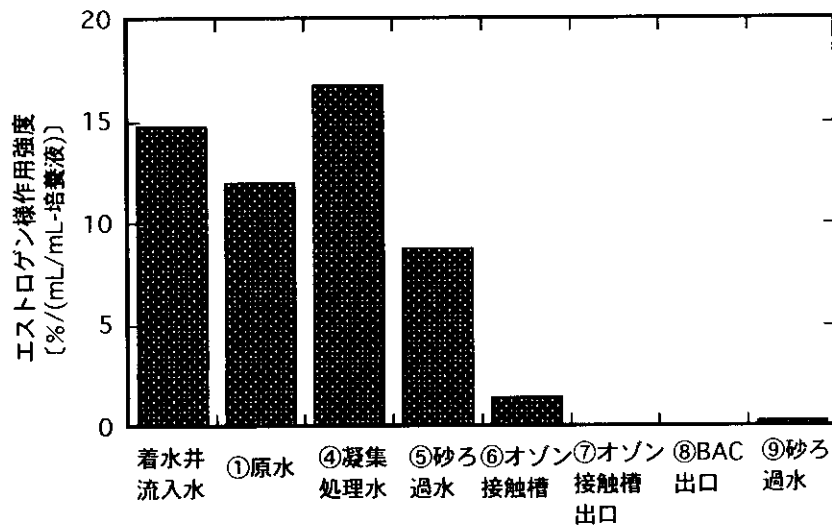


図-24 5 μg/L添加系高度処理系 (後半調査)

## 参 考 文 献

- 1) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Final Report, 1998.
- 2) 平成10年度厚生科学研究費補助金 内分泌かく乱化学物質の水道水からの暴露等に関する調査研究報告書, 5.2 MVLN アッセイ, pp.206-228, 1999.
- 3) S.Itoh, H.Ueda, T.Nagasaka, G.Nakanishi and H.Sumitomo, Evaluating Variation of Estrogenic Effect by Drinking Water Chlorination with the MVLN Assay, Proceedings of The 3<sup>rd</sup> IWA Specialized Conference on Hazard Assessment And Control of Environmental Contaminants-ECOHAZARD '99-, 5-8 Dec.1999, Otsu, Japan, pp.92-99.
- 4) M.Pons, D.Gagne, J.C.Nicolas, M.Mehtai, A New Cellular Model of Response to Estrogens: A Bioluminescent Test to Characterize (Anti)Estrogen Molecules, BioTechniques, Vol.9, No.4, pp.450 - 459, 1990.

- 5)環境庁水質保全局水質管理課，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），1998.
- 6)水町昌代，小田原光宏，山本仁史，アルキルフェノール及びビスフェノールAの同時分析法に関する検討，第50回全国水道研究発表会講演集，pp.562-563,1999.
- 7)E.M.Thurman and R.L.Malcolm, Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, Environmental Science & Technology, Vol.15, No.4, pp.463-466, 1981.
- 8)Y.Goda, A.Kobayashi, K.Fukuda, S.Fujimoto, M.Ike and M.Fujita, Development of the ELISAs for Detection of Hormone-Disrupting Chemicals, Proceedings of The 3<sup>rd</sup> IWA Specialized Conference on Hazard Assessment And Control of Environmental Contaminants-ECOHAZARD '99-, 5-8 Dec.1999, Otsu, Japan, pp.121-128.
- 9)生物起因の異臭味水対策の指針 1999年版，日本水道協会，345p., 1999.

分担研究報告書 9

ビスフェノールAの塩素処理による反応生成物の同定と  
エストロゲン様作用の評価

分担研究者 相澤貴子、国包章一

# ビスフェノールAの塩素処理による反応生成物の同定とエストロゲン様作用の評価

国立公衆衛生院水道工学部 相澤 貴子、大久保慎二、国包章一  
北京大学 胡建英

## 1. はじめに

昨年度、水道水を対象に実施した33種類の内分泌攪乱化学物質実態調査において検出された物質は主としてフェノール化合物であった。また、水道用資機材からの溶出試験においてもフェノール化合物が溶出することが確認された。フェノール化合物は化学反応性が高い特性があることから、水道におけるフェノール化合物が引き起こす内分泌攪乱作用を正確に評価し、制御するには、塩素処理による反応生成物を同定し、そのエストロゲン様活性の寄与を考慮しなければならない。

反応生成物の同定にはGC/MS法やLC/MS法等の分析手段が用いられているが、反応メカニズムが明らかにされていない反応では、これらの分析手段のみではすべての副生成物を同定するには多大な時間を要する。水道の塩素処理副生成物の生成メカニズム解明では、フェノール類と塩素との反応経路がモデルとなって研究されているケースが多いが、これらの反応メカニズムに関する研究は簡単な構造のフェノール類が扱われている。ビスフェノールAのような若干複雑な構造では、フェノール類と塩素との反応メカニズムは明らかにされておらず、GC/MS法やLC/MS法のみでは完全な塩素分解生成物の同定は不可能であり、LC/NMR法などの導入も必要になってくる。

一方、有機合成分野で化学反応経路を予測するには分子軌道法がよく使われている。分子軌道法は有機反応化学を“経験則”から脱却させ、有機反応を統一的に理解することができる。環境分野では処理プロセスや環境中における化学物質の分解経路に関する研究も実験に基づく経験則で論議されており、分子軌道法の応用は殆ど行われていないのが現状である。

上記の背景に踏まえて、本研究では水道原水からの検出頻度が高いビスフェノールAをモデル物質とし、塩素との反応メカニズムを理論計算から推定し、LC/MSによる塩素処理分解物の測定結果に基づき理論値と実験値を比較、解釈することとした。また、ビスフェノールAの塩素処理によってエストロゲン様活性が変化する可能性があるため、エストロゲンレセプター結合活性で評価することとした。

## 2. 実験方法

### 2.1 反応経路に関する計算方法

ビスフェノールAと塩素との反応解析に必要な部分電荷、HOMO軌道密度、分子軌道エネルギー、最適化構造、反応座標、振動スペクトル(IR)は半経験分子軌道法プログラムのCACHÉ MOPAC(CACHÉ Scientific社)のPM3ハミルトニアンを用いて得られた。

### 2.2 塩素処理条件

BPA濃度が0.5mg/L、リン酸緩衝液でpH 7.5に調製した試料水(7L)から1Lを反応前の試料水として採取した。その後、試料水に塩素濃度が1.46mg/Lになるように塩素水を添加し、25℃一定で反応を開始させた。反応開始10、30、60分後に反応液を各1L採取した後、残留塩素を消去した。反応前及び後の試料はSPE-GLF固相カートリッジ(GLF、横河アナリティカルシステムズ製)に通水し、ジクロロメタンで抽出し、溶媒を窒素パーズにより完全除去した後、DMSOで0.1mLまでメスアップした。調製した試料の一部はエストロゲンレセプター結合アッセイ試験(Full-Range Beacon 2000, PanVera社)に、2μLはLC/MS分析用に供した。

### 2.3 LC/MS分析条件

本実験で使用したLC/MSはAPCIを取り付けた日立M-1200H型、LCは日立L-6200型ポンプを用いた。分離カラムはシリカ充填CAPCELL PAKC18UG120 S3(4.6mmx150mm、粒子径3μm、資生堂社製)を用いた。標準試料の注入量は2μLで、流速は1mL/minに設定して負イオンモードで測定を行った。

溶離液はアセニトリル-0.1%酢酸水溶液を実験に供した。

MS測定条件:SIMとScanモードのスイッチングレートは20.033amu/s;分解能:48;測定マス幅:150-550amu;霧化温度:180°C;脱溶媒温度:400°C;ドリフト電圧:80V

溶離液条件:0.1%酢酸の割合を最初の80%から17分後に50%、55分に45%、60分に40%を変化させるグラジエント条件を用いた。

### 2.4 蛍光偏光度法によるエストロゲンレセプター結合アッセイ

エストロゲンレセプター結合アッセイはEDC Assay Kit(宝酒造社製)を用いた。蛍光偏光度法の測定は、蛍光偏光度測定システム Full-Range Beacon 2000(Pan Vera社製)を用い、360nmの励起波長と530nmの蛍光波長を用いて測定を行った。

48μLの10mMスクリーニング緩衝液の中で2μLのDMSO標準試料を加え、エストロゲン受容体と蛍光エストロゲン物質との複合体を50μL添加して、室温で競合反応させた。1時間放置後に反応系の蛍光偏光度を測定し、蛍光偏光度と化学物質添加濃度との関係から対象物質のエストロゲン受容体結合活性を測定した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 LC/MS法による副生成物の同定

ビスフェノールAを塩素との反応10分後のLC/MS法で測定したときのクロマトグラムを図-1に示す。クロマトグラム上には数多くのピークが現れた。表-1は反応時間毎の各ピークに対応したマスペクトルをまとめた。表-1からA、C、EとGの四つのピークはビスフェノールAの塩素置換数それぞれ1、2、3、4に相当すると推測できるが、マスペクトルから塩素の置換位置を決めることは困難であった。その他のピークは明らかにビスフェノールAの塩素置換物ではなく、文献報告から副反応によるフェノールの二量体の可能性が高いと推測できるが、その構造は表-1の情報だけでは特定できなかった。

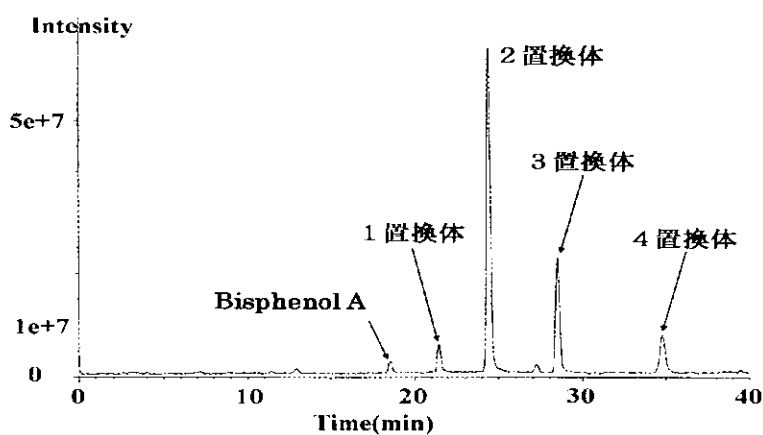


図-1 B P Aの塩素処理試料の LC/MS クロマトグラム (反応時間 10 分後)

	保持時間	m/z(%相対強度、RI)		
		10min	30min	60min
A	21.31	261(100)	—	—
B	22.71	311(100),295(70)	311(100),293(65)	313(100),295(65)
C	24.59	295(100)	295(100)	295(100)
D	26.0	278(100)	278(100)	278(100)
E	28.5	331(100)	331(100)	331(100)
F	29.49	381(100),363(60)	381(100),363(60)	381(100),363(60)
G	34.72	365(100)	365(100)	365(100)
H	51.2	421(100),457(100)	491(100),455(20), 331(100)	491(100),455(20), 331(20)
I	60.38	457(100)	457(100)	457(100)
J	63.5		357(100)	357(100)
K	65.1		525(100)	525(100)

表-1 ビスフェノールAの塩素反応生成物の LC/MS スペクトル

### 3. 2 分子軌道法による反応経路解析

#### 3. 2. 1 塩素置換反応経路解析

前記のようにLC/MSのみで反応生成物の同定には情報が乏しく、困難な場合が多い。そのために、ビスフェノールAと塩素との反応経路の解析を分子軌道法により推定した。

まずビスフェノールAについての計算結果を述べる。キーワードESPを用いて静電ポテンシャル電荷を求め、水素原子以外のベンゼン環上の炭素原子の値を比較した(図-2)。図-2のように、電荷が支配する反応の場合、ビスフェノールAのC4またはC19原子

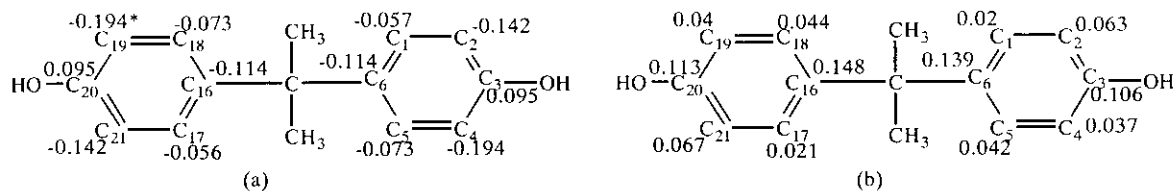


図-2 ビスフェノールAの静電ポテンシャル電荷(各原子の部分電荷)(a)、およびHOMO密度(b)

の静電ポテンシャル電荷が最も負の値が大きく、塩素分子における正電荷をもつCl原子の求電子を最も受けやすいと考えられる。一方、HOMO(最高被占軌道エネルギー)におけるビスフェノールAの各原子の密度を図-2(b)に示した。各原子のHOMO密度を比較すると、図-2(b)に示したようにC6またはC16原子で最も大きくなっており、求電子攻撃を受けやすいと考えられる。従って、塩素がベンゼン環の置換位置を決めるには、塩素とビスフェノールAとの反応は分子軌道的な反応か、それとも静電ポテンシャルを見るべきかを決めなければならない。そのためには、塩素置換反応の遷移状態を求め、活性化エネルギーの大きさを比較する必要がある。

まず、C2に塩素原子の攻撃を受けた生成物を最適化し、図-3の様な構造を得た。この構造をもとに図に示したCとC1原子距離を縮小する方向(結合する方向)に変化させてポテンシャル曲線を描くと図-4に示したようになり、両原子の距離が3.6Åの時の構造が遷移状態に近いと考えられた。続いて、CとC1距離が3.7Åの構造をもとに、キーワードTSを用いて遷移状態の構造を最適化した。得られた遷移状態の振動解析をキーワードFORCEを用いて行った結果、虚の振動数一つが得られた。得

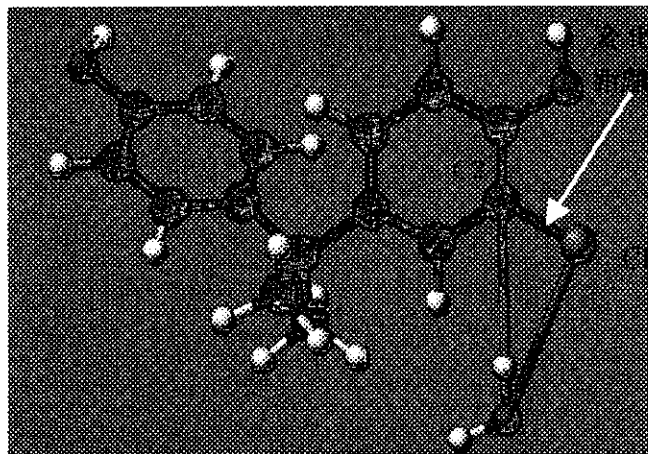


図-3 C2に塩素攻撃を受けた生成物の構造と変化させた距離

られた遷移状態のIRC計算を行った結果、反応原系と生成系が得られ、その活性化エネルギーは0.08kcal/molであった。

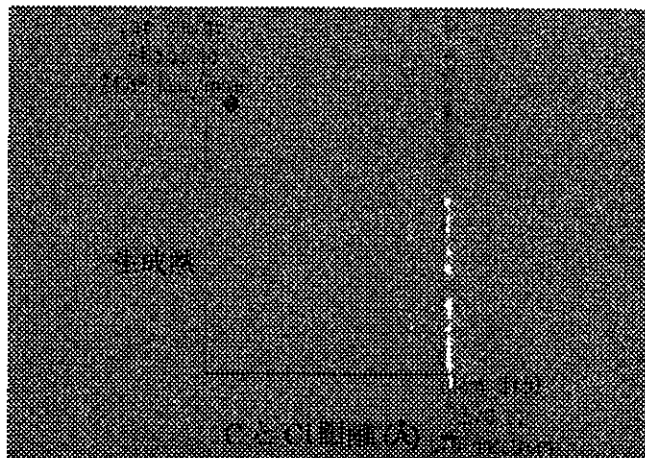
これと比較するために、HOMO密度がC2より高く、部分電荷がC2より負から遠いC6位置の塩素置換反応の遷移状態のIRC計算を行った。図一5はC6に塩素原子の攻撃を受けた生成物を最適化したもので、この構造をもとに図に示したC6とCl原子距離を1.7から2.5と伸ばす方向（結合が切れる方向）に変化さ

せポテンシャル曲線を得た。遷移状態に近い構造をもとにIRC計算を行うと、図一6に示したような反応原系と生成系が得られた。図一6より反応活性化エネルギーは0.04kcal/molで、上記反応より倍近く高くなっている。その結果から、ビスフェノールAベンゼン環への置換は分子軌道反応に基づく反応が支配的であると示唆された。しかしながら、C6への置換反応が立体障害を受けるために、反応速度

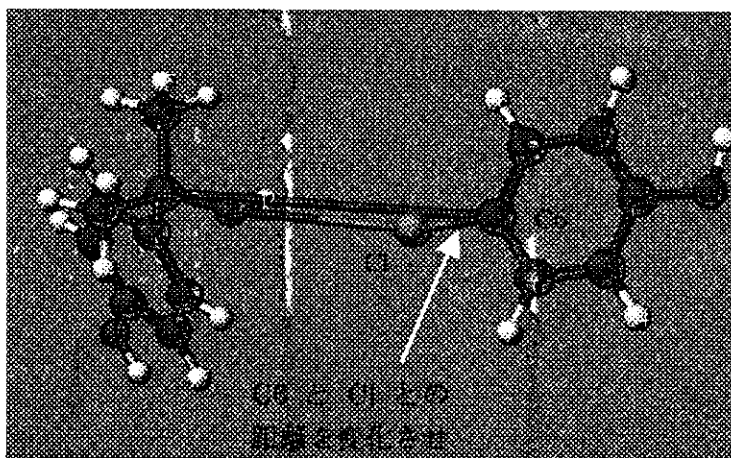
は必ずしもC2への置換反応より早いと断言できず、立体効果を考慮する必要がある。

上記計算から、塩素とビスフェノールAとの反応で最初に生成される生成物は図8-1に示した反応経路のうちの(1)モノクロビスフェノールA、(2)モノクロフェノール、(3)p-ヒドロキシエチルジプロパノールである。

この三種類の生成物は塩素とさらに反応し、新たな生成物が形成される。どのような反応生成物が形成されるかを検討するために、モノクロビスフェノールA(1)の静電ポテンシャルとHOMO密度を計算し、図一7に示した。図のようにビスフェノールAと同様に分子軌道反応が支配的な場合には、塩素原子がHOMO密度が高いC6またはC5に優先的に攻撃すると考えられる。その他の原子のHOMO密度がとても低いため、LC/MS法で



図一4 C2とCl距離を変化させた場合のポテンシャル曲線 (Minimum energy path)



図一5 C6に塩素攻撃を受けた生成物の構造と変化させた距離



検出された塩素置換数 3 と 4 の生成物は非常に生成しにくい。一方、静電ポテンシャル電荷を比較すると、C19、C4 と C21 の電荷値からその三原子に塩素を置換し、塩素置換数 3 と 4 の生成物が生成されると考えられる。そのため

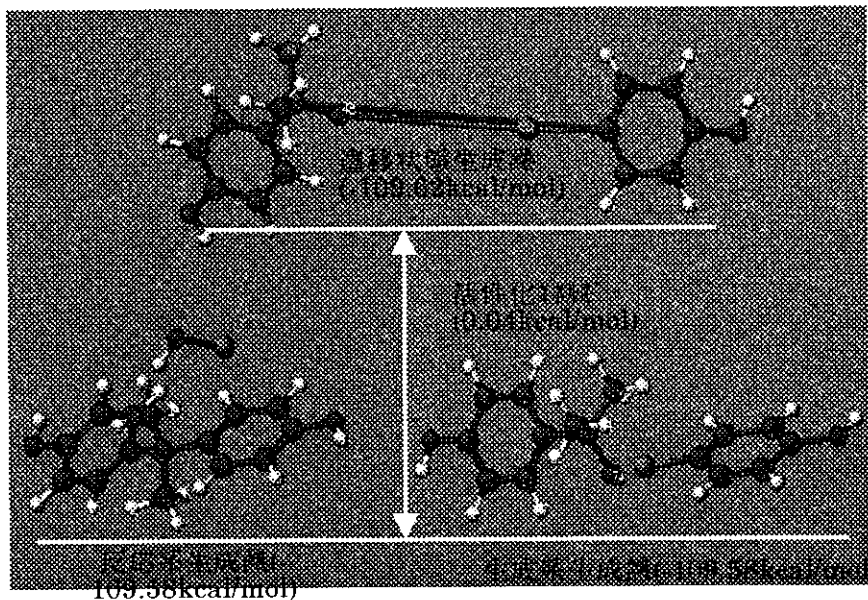


図-6 C6に攻撃する場合における反応系、遷移状態、生成系フェノールA (I)の

C19、C5 への塩素置換反応の活性化エネルギーを計算し、その結果を表-2に示した。表-2より反応速度論として考えると、C19 への塩素置換活性化エネルギーが最も低く、反応速度論的に優先であることが明らかである。従って、(1)と塩素との反応は電荷が支配的な反応で、(4)のジクロロビスフェノール A が主に生成される。(4)の静電ポテンシャルを計算し、塩素との反応生成物は(5)のトリクロロビスフェノール A となり、さらに反応を進むと、テトラクロロビスフェノール A(6)が生成されるとの計算結果が得られた (図-8-1)。

### 3.2.2 二量体の構造

フェノールと塩素との反応で、フェノールや塩素化フェノールの二量体が生成するとされている。本研究では、

表-2 反応生成物 (I) の C19、C5 への付加反応性

反応位置	HOMO 密度	部分電荷	活性化エネルギー
C19	0.01	-0.194	0.07kcal/mol
C5	0.106	-0.058	0.14kcal/mol

分子軌道法による計算では至らなかったが、LC/MS法の結果と上置換反応経路から図-8-2に示した(11)-(16)のような構造を持つ物質の可能性が高い。今後、分子軌道法を用いてその反応メカニズムをさらに検討する必要がある。

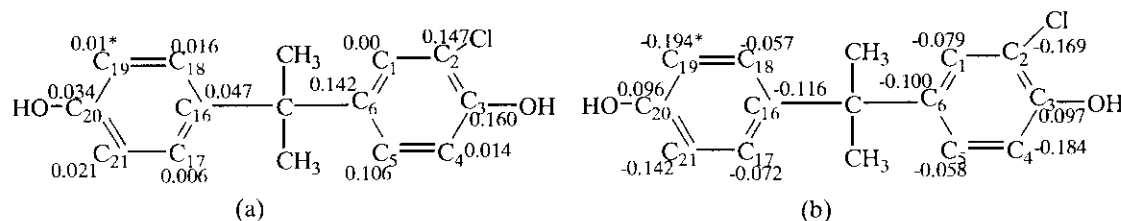


図-7 モノクロロビスフェノールA(I)の HOMO 密度 (a) と静電ポテンシャル電荷 (b)

### 3.3 塩素処理がエストロゲンレセプター結合活性へ及ぼす影響

前記のように、ビスフェノール A と塩素とが反応する事によって、多くの副生成物が新たに生成される。水道水にビスフェノール A が存在する際、ビスフェノール A が引き起こす内分泌攪乱作用を評価するには、その副生成物の活性を考慮する必要がある。そのために、ビスフェノール A の塩素反応時間に対するエストロゲンレセプター結合活性の変化を調べ、その結果を図-9に示した。図-9より、エストロゲンレセプター結合活性は塩素反応時間が増す毎に高くなることが確認された。濃縮倍率で換算した EC50 値は、それぞれ 11610 (0分)、2992 (10分)、1094 (30分)、473.9 (60分) であり、反応 60 分後には反応開始前の 24 倍も活性が高くなった。

上記エストロゲンレセプター結合活性の増加には塩素罹患体や二量体の生成量の増加が関与していると考えられるが、どの副生成物に起因するかを調べるためには、BPA の塩素処理で生成した塩素置換体や二量体等の標準品が必要である。しかしながら、現段階では標準品が入手できないため、生成物の同定には至らなかった。副生成物量の定量化とエストロゲンレセプター結合活性との関連についての解析は今後の課題としたい。

## 4. まとめ

ビスフェノール A をモデル物質とし、塩素との反応メカニズムを理論計算から推定し、LC/MS による塩素処理分解物の測定結果に基づき理論値と実験値を比較、解釈した。

ビスフェノール A を塩素との反応生成物を LC/MS 法で測定した結果、クロマトグラム上数多くのピークが現れ、マススペクトル解析の結果ビスフェノール A に塩素が各々 1, 2, 3, 4 付加した塩素付加物とフェノールの二量体と推測される副生成物が測定された。

分子軌道法を用いて反応経路の解析を行った結果、ビスフェノール A のベンゼン環への塩素置換反応は分子軌道に基づく反応が支配的であり、反応初期の副生成物はモノクロロビスフェノール A、モノクロロフェノール、4-ヒドロキシフェニルイソプロパノールと推定された。これらの反応生成物は更に塩素と反応し、最終生成物としてはテトラクロロビスフェノール A、トリクロロフェノール、4-ヒドロキ-3,5-ジクロロシルフェニルイソプロパノールになると推定された。一方、二量体の生成にはジメチルフェノール等が出発物質となり 6 個の反応生成物が生成されると推定された。

さらに、ビスフェノール A の塩素処理によって生成された分解生成物についてエストロゲンレセプター結合アッセイを行った結果、エストロゲンレセプター結合活性の増加が認められ、塩素罹患体や二量体の生成量の増加が関与していると考えられた。

これらの確認には、BPA の塩素処理で生成する塩素置換体や二量体等の標準品が必要であり、現段階では標準品が入手できないため、今後の検討課題となった。

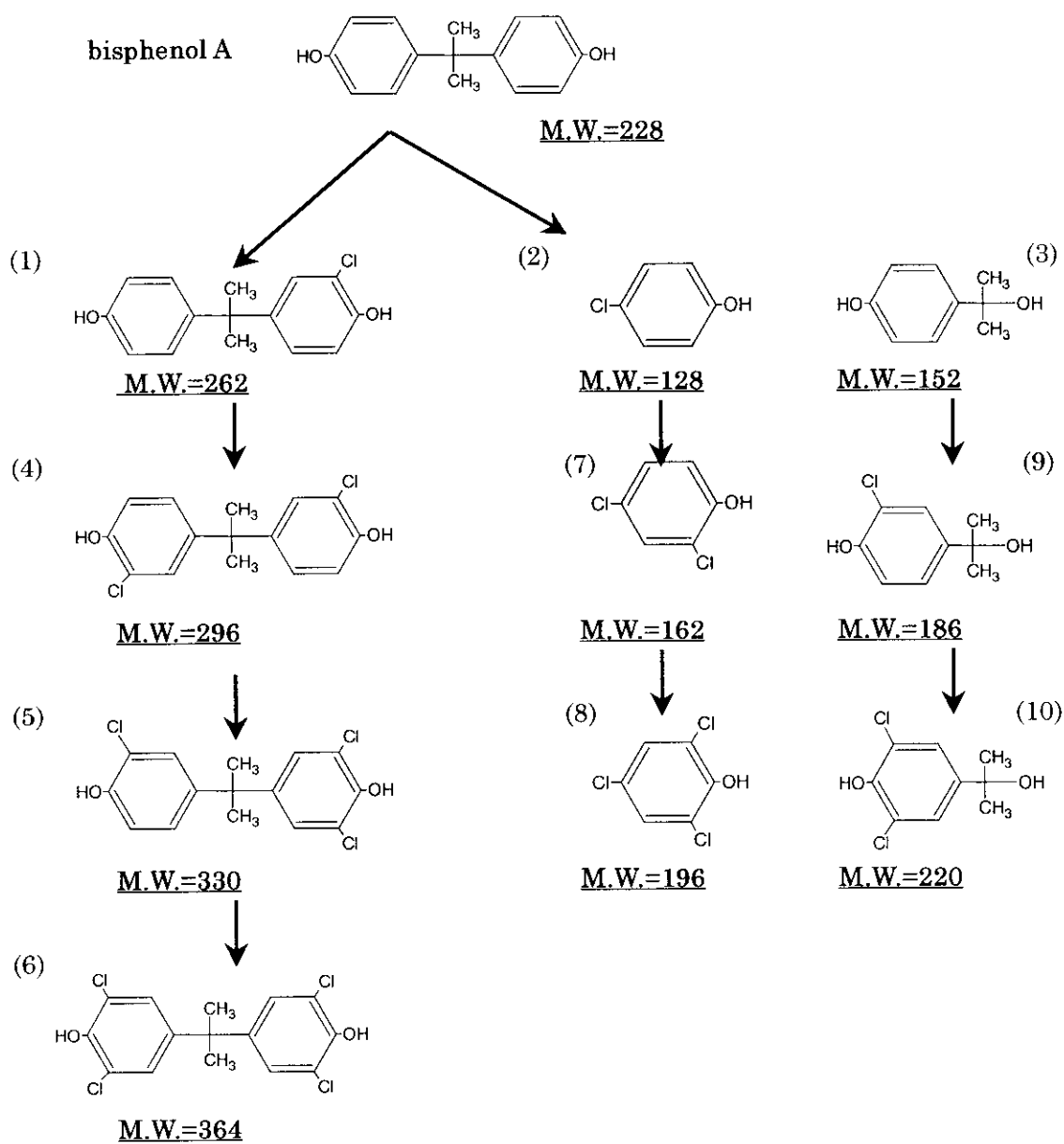


図-8-1 ビスフェノール A の塩素置換反応

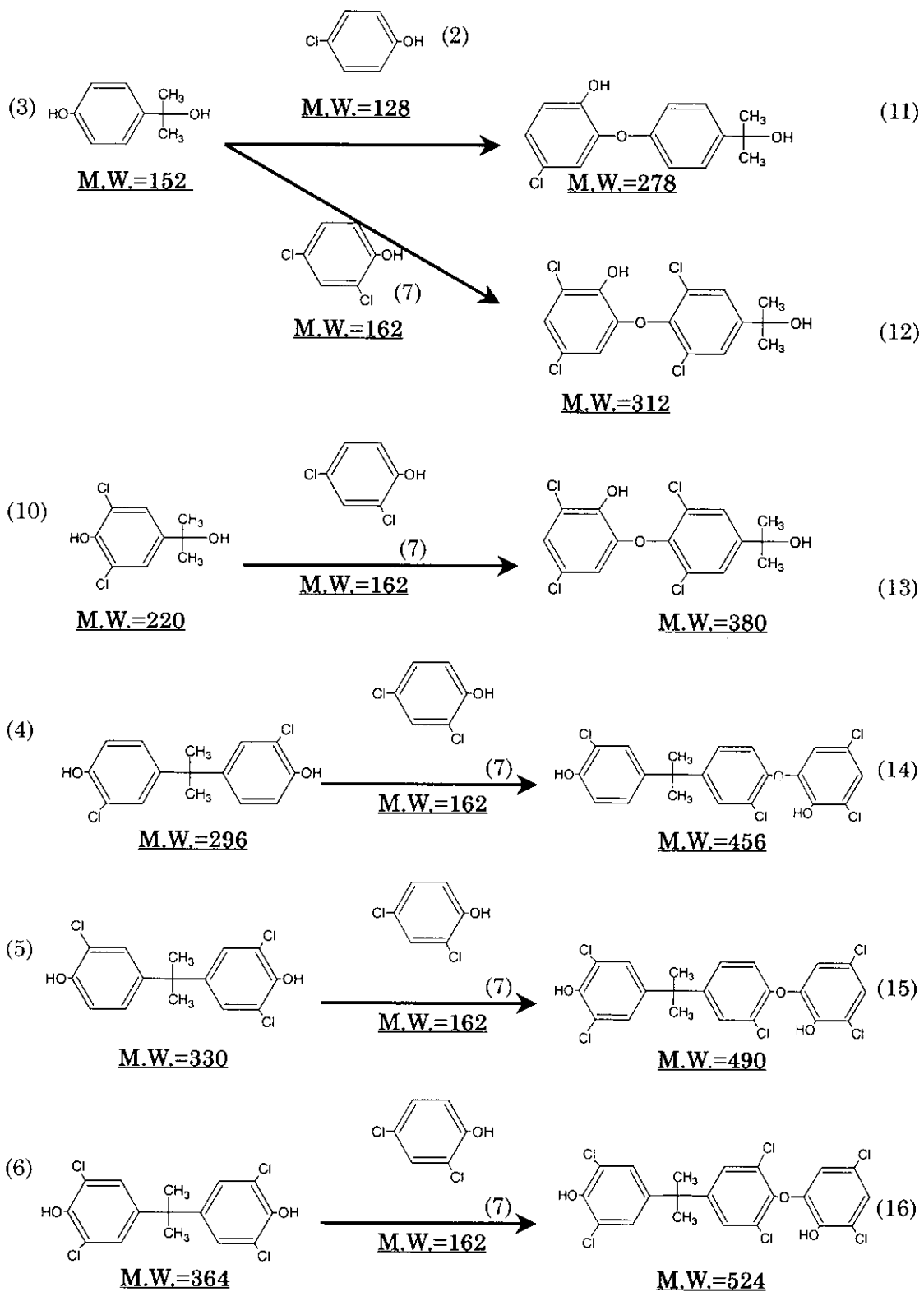


図-8-2 ビスフェノール A の塩素処理において生成が予測されるフェノール類二量体

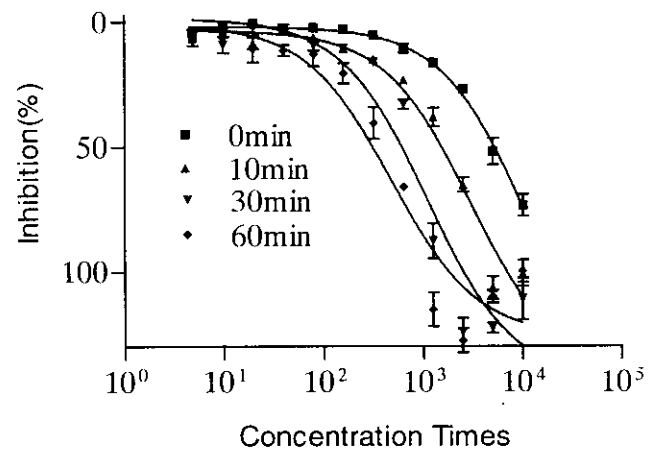


図-9 BPA 塩素処理試料の反応時間に対するエストロゲンレセプター結合活性の変化

## 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(10mmφ×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
Scath 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

### <sup>1</sup>H NMR 測定条件

装置	: UNITY INOVA 500 (バリアン)
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 μL
カラム	: SGE 社、BPX-5 25m×0.22mm I.D.×0.25 μm Film
カラム温度	: 60°C(1min)---10°C/min-→300°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°C

#### MS

イオン化法	: EI
イオン化電圧	: 70eV
イオン源温度	: 250°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×250mm(分析時) Capcel Pak UG120 306 φ×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) - > (0 : 100)、hold for 10min



流 速 : 1mL/min(分析時)  
 15mL/min(分取時)  
 検 出 : UV254nm  
 注入量 : 10  $\mu$  L(分析時)  
 200  $\mu$  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

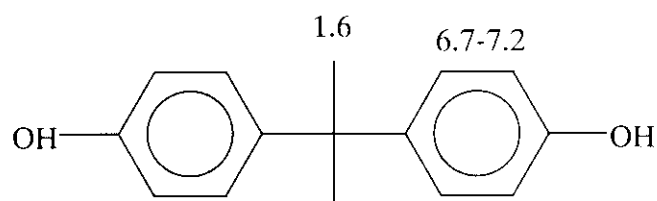
スキャン回数 (回)	推定分子量 (M.W.)	目的成分
71~86	364,524	
365~392	220	
575~589	234	
599~626	196	
667~678	202	
695~709	380	
727~751	364	4塩素化ビスフェノールA
826~842	322	
855~865	356	

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<sup>3</sup>)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、<sup>13</sup>CNMR 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。