

Agilent 6475 LC/MS システムを使用した ビスフェノール類の高感度分析

著者

滝埜昌彦

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) を使用したビスフェノール類（ビスフェノール AF (BPAF)、ビスフェノール B (BPB)、ビスフェノール A (BPA)、ビスフェノール S (BPS) およびビスフェノール F (BPF)）の分析について紹介します。

BPA は、プラスチックの原料として使用され、金属の防蝕塗装、電子部品、接着材などの用途に用いられていますが、欧州の REACH 規則に定められた「認可」の対象となり得るいわゆる高懸念物質 (SVHC) に追加されることが、2017 年に公表されました。また、欧州化学品庁 (ECHA) 制限報告書では、成形品中の BPA およびその他のビスフェノール (BPB、BPS、BPF または BPAF) の濃度を合計で 10 mg/kg に制限することを提案されています。そこで、LC/TQ を使用してビスフェノール類の分析法の検討を行いました。その際、測定試料をプラスチック材料と想定して検液溶媒はメタノールとしました。従って、保持の弱い化合物はブレイクスルーやピーク形状の歪みを生じることがあります。一方、Feed 注入¹⁾と呼ばれる注入法は溶出力の強い検液溶媒を用いても、保持の弱い化合物に対してブレイクスルーやピーク形状の歪みを抑えることが可能です。そこで、今回 Feed 注入を用いた LC/TQ によるビスフェノール類の分析について検討を行い、良好な結果が得られたので報告します。

実験

ビスフェノール類標準液は日本食品分析センターより譲り受けました。検量線用標準液は原体をメタノールで溶解し 1 µg/mL 溶液を調製し、適宜希釈しました。試料バイアルはポリプロピレンバイアルを使用しました。

測定条件

システム

1260 Infinity II Flexible Pump (G7104C)
 1260 Infinity II Hybrid Multisampler (G7167C)
 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116A)
 6475 Triple quadrupole LC/MS system

ビスフェノール類の LC/TQ による測定条件は表 1 に示した通り、C18 カラムを用いた 2 mM 酢酸アンモニウムを含む LC/MS 用ボトル超純水（移動相 A）とメタノール（移動相 B）によるグラジエント分析で行いました。また、BPS と BPAF がシステムから溶出することからディレイカラムをポンプとオートサンプラーの間に接続しました。注入量は 10 µL として注入法は Feed 注入法を使用し、Feed 溶媒（注入時に予めニードル、ループを満たす溶媒）は移動相 A と同一としました。イオン化は、Agilent Jet Stream (AJS) テクノロジーによるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を使用しました。今回測定対象のビスフェノール類は、全て負イオンモードで脱プロトン分子がベースピークイオンとして観察されました。従ってこれらイオンをプリカーサーイオンとした多重反応モニタリング (MRM) 方式で測定しました。測定条件は表 1 に示します。

表 1. ビスフェノール類の LC/TQ 測定条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System						
カラム	InertSustain AQ (2.1 mm×100 mm, 1.9 µm) (P/N : 5020-89939)						
ディレイカラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm×50 mm, 5 µm) (P/N:959946-902)						
流速	0.2 mL/min						
移動相	A : 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール						
グラジエント	30 %B → (20 min) → 100 %B						
カラム温度	40 °C						
注入量	10 µL						
Feed 溶媒	2 mM 酢酸アンモニウム水溶液 速度：カラム流速の 20 %						
MS	Agilent 6475 Triple quadrupole LC/MS System						
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS) 負イオンモード						
乾燥ガス	300 °C 10 L/min						
シースガス	300 °C 12 L/min						
ネブライザ圧	50 psi						
キャピラリー電圧	3500 V	化合物	プリカーサー	プロダクト		コリジョンエネルギー (eV)	
		BPS	249	108	92	30	35
		BPF	199	105	93	25	25
		BPA	227	133	211	35	35
		BPB	241	212	211	20	30
MRM イオン	右図	BPAF	335	265	245	25	35

Feed 注入法では、測定中に移動相はニードル内部、ループおよび計量ポンプをバイパスします。従って、キャリアオーバーを低減させるために 2 種類の溶媒でニードル外部、内部（ニードル、ループ、計量ポンプ）および注入シートの洗浄の設定が可能です。ビスフェノール類の測定では、BPAF の疎水性が高いことから洗浄溶媒にはイソプロパノール (S1) およびメタノール (S3) を使用しました。S2 は Feed 溶媒で、内部および注入シートを再コンディショニング過程で置換しました。洗浄条件は表 2 に示しましたが、外部洗浄は注入前、内部および注入シートの洗浄は注入後に実施されます。

表 2. Feed 注入法による洗浄条件

LC	溶媒	洗浄時間	LC	溶媒	洗浄容量
外部洗浄	S1	5 秒	内部洗浄	S1	200 µL
外部洗浄	S3	5 秒	内部洗浄	S3	200 µL
			注入シート	S1	200 µL
			注入シート	S3	200 µL
			再コンディショニング	S2	

結果

Feed 注入法

図 1 に従来のフロースルー注入と Feed 注入法によるビスフェノール類のクロマトグラムを示しました。上段のフロースルー注入では保持の弱い BPS が試料溶媒の影響でピークが割れています。一方、Feed 注入では BPS のピーク形状が改善しています。また全ての化合物の保持時間が Feed 注入で短くなっているのは Feed 注入では分析中に移動相がニードル、ループなどをバイパスすることによりシステム容量が減少したためです。

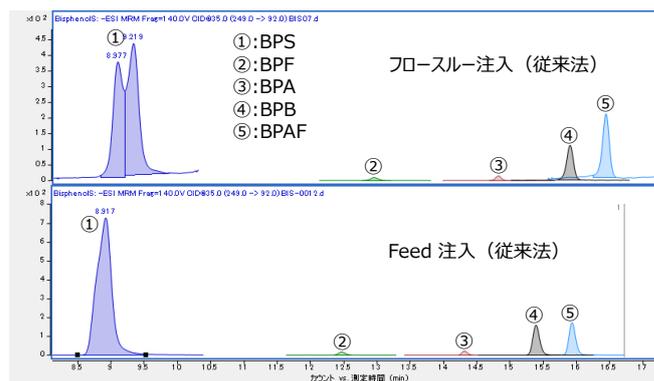


図 1. 注入方式の違いによるビスフェノール類のクロマトグラム

感度、直線性および再現性

図 2 に 0.1 ng/mL の各ビスフェノール類の MRM クロマトグラムを示しました。BPS と BPAF は他のビスフェノール類と比較して感度が 10 倍以上高く、0.01 ng/mL でも測定が可能でした。従って、BPS と BPAF は 0.01 ng/mL、BPF、BPA および BPB は 0.1 ng/mL のクロマトグラムで S/N を求め、その値から検出限界を計算し表 2 に示しました。各ビスフェノール類の検出限界は 0.0002 ~ 0.06 ng/mL でした。

直線性は、図3に検量線を示しましたがBPSとBPAFは0.01～1 ng/mL、その他は0.1～10 ng/mL範囲で全て相関係数が0.9999以上(表3)と良好でした。

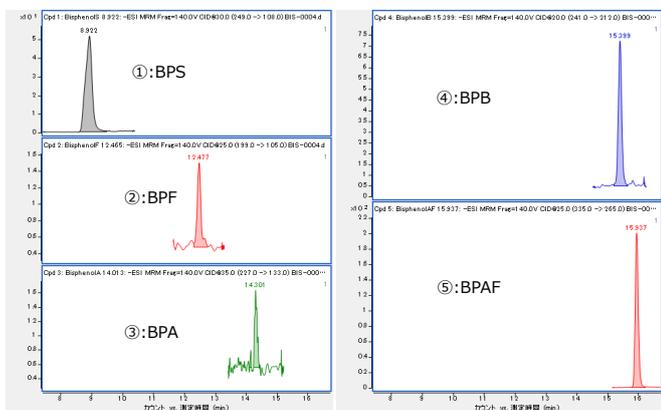


図2. 各ビスフェノール類のMRMクロマトグラム (0.1 ng/mL)

表3. 各ビスフェノール類の感度、直線性および再現性

化合物	検出限界 (ng/mL) ¹	直線性	再現性
		相関係数 ²	相対標準偏差 (%) ³
BPS	0.0012	0.9999	0.68
BPF	0.023	0.9999	2.91
BPA	0.06	0.9999	1.74
BPB	0.006	0.9999	1.28
BPAF	0.0002	0.9999	1.29

1) BPS, BPAF : 0.01 ng/mL その他 : 0.1 ng/mL の S/N から S/N=3 を検出限界として算出
 2) BPS, BPAF : 0.001-1 ng/mL その他 : 0.1-10 ng/mL
 3) 0.2 ng/mL n=5

まとめ

今回、ビスフェノール類の測定法を確立し標準品を用いて感度、直線性および再現性を確認しました。Feed 注入法を使用することで、メタノール溶液においても良好なピーク形状が得られ、高感度分析が可能でした。検出限界は0.0002～0.06 ng/mL、直線性は100倍の濃度範囲で相関係数が0.9999以上、再現性はn=5で相対標準偏差が0.68～2.91%でした。

参考文献

1) 農業分析におけるピーク形状の向上とLOQの改善: Agilent 1260Infinity II ハイブリッドマルチサンプラを用いた極性農薬のLC/MS分析, 5994-6125JAJP (2023)

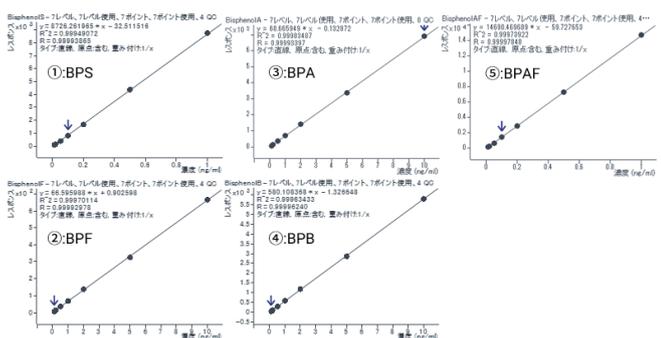


図3. 各ビスフェノール類の検量線

再現性は、0.2 ng/mL 標準液を5回測定した結果の面積値から相対標準偏差を計算しましたが、表3の通り0.68～2.91%と良好でした。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE73473668

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, March 18, 2024

5994-7253JAJP