

短報

紫外線吸収剤ベンゾフェノン-4の分析法開発及び環境調査

高橋浩司

環境水中に含まれるベンゾフェノン-4の分析法を開発した。本分析法で用いた LC/MS/MS による分析対象物質の装置検出下限値は0.26 pgであり、検量線は0.5-100 µg/Lの範囲で直線性が確認された。固相抽出法による前処理を行う本分析法の検出下限値及び定量下限値は、それぞれ 0.019 µg/L 及び 0.049 µg/L であった。添加回収試験の結果、河川水での回収率は105%、海水での回収率は101%であった。本分析法で福岡県内の河川水及び海水を測定したところ、対象物質は検出されなかった。

[キーワード：ベンゾフェノン-4、紫外線吸収剤、LC/MS/MS]

1 はじめに

化学物質による環境への負荷は、人の健康や生態系に様々な影響を与える可能性があるが、近年の化学物質の種類と量の増加に対し、その毒性や汚染実態については明らかになっていない。そのため、環境中における化学物質の実態調査が必要であるが、毎年数多くの新規化学物質が出現し、その物性も多様であり、適切な分析法が不明なものも多く存在する。環境省は、一般環境中の化学物質の残留状況の把握を目的として「化学物質環境実態調査」を実施しており、福岡県においても当該調査を受託し取り組んでいる。特に「分析法開発調査」においては、毎年1物質以上の開発を継続して行っており、その後の「初期環境調査」や「詳細環境調査」等に貢献している。

今回、分析法開発調査としてベンゾフェノン-4の分析法の開発を行った。この物質は、図1に示す構造をもつ化学物質で、別名オキシベンゾン-4あるいはスリソベンゾンであり、退色防止や紫外線防御を目的としてスキンケア製品、ボディ・ハンドケア製品、日焼け止め製品等に用いられている。医薬部外品（薬用化粧品）または化粧品に配合する場合には、配合量の上限範囲が定められている。急性毒性はラット（経口）のLD50は3530 mg/kg、ウサギ（経皮）のLD50は>5000 mg/kgであり¹⁾、急性毒性や皮膚感作性のリスクは低いとされているが^{2,3)}、その一方で内分泌かく乱作用が懸念されている物質である。

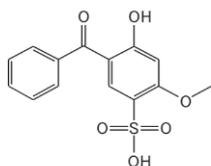


図1 ベンゾフェノン-4の構造

2 方法

2・1 試薬

ベンゾフェノン-4の標準物質は、SIGMA-ALDRICH製のSulisobenzone analytical standard（純度 ≥ 97.5%）を用いた。

メタノール及び超純水は富士フィルム和光純薬製のLC/MS用を用いた。ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2・2 標準液の調製

ベンゾフェノン-4標準品20 mgを正確に量り取り、メタノールで20 mLとして1000 µg/mLのベンゾフェノン-4標準原液を調製した。この標準原液をメタノールで希釈し、濃度1000 µg/L溶液を調製した。この1000 µg/L溶液をメタノール/超純水（1:1）で順次希釈し、0.50-100 µg/Lの検量線用標準液を作成した。

2・3 試料の前処理及び試験液の調製

試料100 mLを、あらかじめメタノール及び超純水各10 mLでコンディショニングした固相カートリッジに10 mL/minで通液した。通液終了後の固相に超純水10 mLを通して洗浄した後、注射器で空気を10 mL通気して固相中の水分を除去した。メタノール6 mLを用いて10 mLメスフラスコに溶出し、超純水を用いて10 mLに定容し、試験液とした。

2・4 測定

ベンゾフェノン-4の測定には液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS、島津製作所製 Nexera X2/島津製作所製 LCMS-8050）を用いた。測定条件を表1に示す。

表1 ベンゾフェノン-4のLC/MS/MS測定条件

LC

移動相：A: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液
 B: メタノール
 0→1 min A: 70 B: 30
 1→9 min A 70 → 5 B: 30 → 95
 9→15 min A: 5 B: 95
 15 min→25 min A: 70 B: 30
 流量：0.2 mL/min
 カラム温度：40° C
 注入量：2 μL

MS/MS

イオン化法：ESI-Negative
 インターフェース電圧：3.0 kV
 ヒーティングガス流量：10 L/min
 ドライイングガス流量：10 L/min
 ネブライザーガス流量：2 L/min
 インターフェース温度：300° C
 脱溶媒部 (DL) 温度：250° C
 ヒートブロック温度：400° C
 モニターイオン (コリジョン電圧)：
 定量イオン m/z 307.0 > 211.0 (35 V)
 確認イオン m/z 307.0 > 227.0 (23 V)

2・5 環境試料の採取

環境試料として、河川水は福岡県内の雷山川、海水は大牟田沖で採取した。試料はガラス容器に採取後、速やかに試験操作を行った。また、福岡県内の海水浴場 12 か所における遊泳期間中の表層水について、実態調査を行った。

3 結果及び考察

3・1 検量線の作成及び装置検出下限値の算出

検量線用標準液 2 μL を LC/MS/MS に注入し、対象物質の濃度と得られたピーク面積から検量線を作成した。検量線は低濃度用 (0.50-10 μg/L) と高濃度用 (5.0-100 μg/L) をそれぞれ作成した (図 2)。決定係数 (R^2) は低濃度用が 0.9997、高濃度用が 0.9983 であり、両者ともに直線性は良好であった。

また、装置検出下限値 (IDL) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁴⁾に従い、最低濃度の検量線用標準液を 7 回繰り返し測定し算出した。その結果、本研究で用いた LC/MS の IDL は 0.26 pg (IDL 試料換算値 0.013 μg/L) であった。

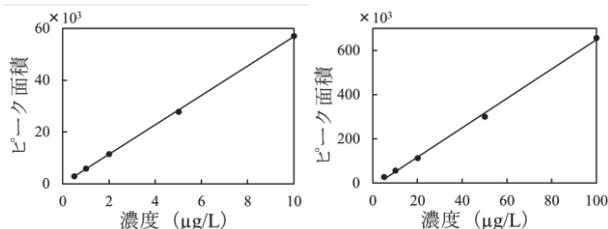


図2 検量線 (左：低濃度、右：高濃度)

3・2 分析方法の検討

3・2・1 固相カートリッジの検討

試料前処理における固相カートリッジとして、Oasis HLB、Sep-Pak PS2、Sep-Pak C18、Sep-Pak tC18 (Waters 製) の 4 種類を検討した。超純水 100 mL にベンゾフェノン-4 を 0.02 μg 添加して試験液とした。各固相をメタノール 10 mL、超純水 10 mL でコンディショニングした後、試験液を通液した。通液後、各固相を超純水 10 mL で洗浄し、メタノール 6 mL で溶出した後、超純水で 10 mL に定容して測定した。結果を表 2 に示す。回収率及び操作性等を考慮し、固相カートリッジは Oasis HLB を選択した。

表2 固相カートリッジの検討結果

固相カートリッジ	回収率
Oasis HLB	104%
Sep-Pak PS2	100%
Sep-Pak C18	81%
Sep-Pak tC18	81%

3・2・2 分析カラムの検討

LC/MS/MS 分析に用いるカラムについての検討を行った。検討したカラムは下記のとおりである。

- ① XBridge C18 (5 μm, 2.1×150 mm, Waters 製)
- ② InertSustain C18 (5 μm, 2.1×150 mm, ジーエルサイエンス製)
- ③ InertSustain AQ-C18 (5 μm, 2.1×150 mm, ジーエルサイエンス製)
- ④ Scherzo SS-C18 (3 μm, 2.0×150 mm, インタクト製)
- ⑤ InertSustain PFP (5 μm, 2.1×150 mm, ジーエルサイエンス製)
- ⑥ XSelect CSH Phenyl-Hexyl (5 μm, 2.1×150 mm, Waters 製)
- ⑦ InertSustain Phenyl (5 μm, 2.1×150 mm, ジーエルサイエンス製)

上記のカラムを用いて標準液を測定した結果、④及び⑤のカラムでは対象物質のピークが確認されなかった。ピークが確認された①、②、③、⑥、⑦のクロマトグラムを図 3 に示す。⑦のカラムは、ベースラインの変動が見られた。対象物質の保持時間や理論段数等を考慮し、分析カラムは InertSustain C18 を選択した。

3・2・3 分析法の設定

以上の検討結果をもとに、図 4 のとおりベンゾフェノン-4 の分析方法を設定した。

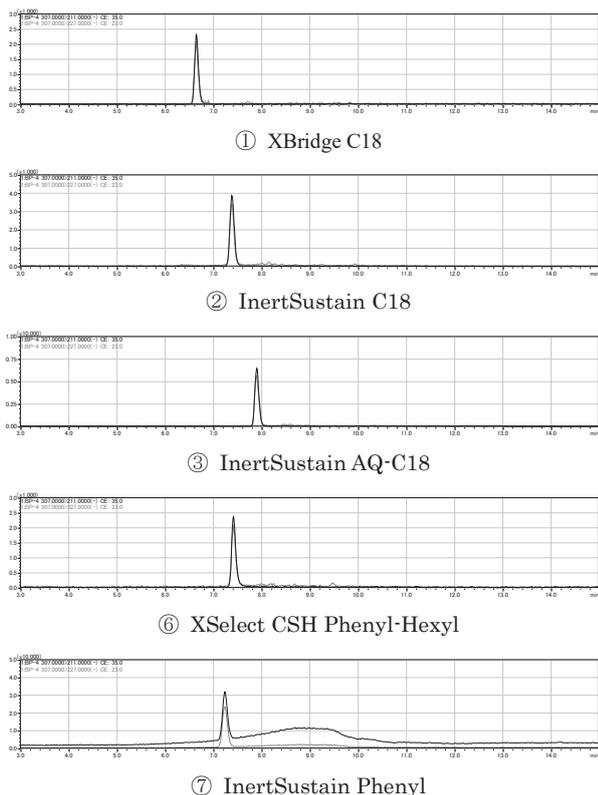


図3 分析カラム検討時のクロマトグラム

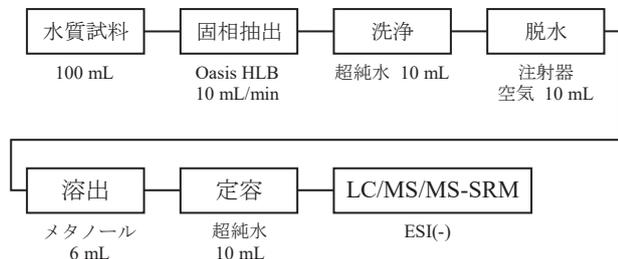


図4 分析法のフローチャート

3・3 分析法の検出下限値及び定量下限値の算出

前項で設定した分析法により、「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁴⁾に従い、検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) の算出を行った。河川水 100 mL に対象物質 0.01 µg を添加し、7 回繰り返し測定して算出した。その結果、本分析法の MDL は 0.019 µg/L、MQL は 0.049 µg/L であった。

3・4 添加回収試験

環境水を用いた添加回収試験を行った。河川水 100 mL に対象物質 0.01 µg 添加したときの回収率は 105% (変動係数 4.7%)、海水 100 mL に対象物質 0.05 µg 添加したときの回収率は 101% (変動係数 2.5%) であり、回収率の許容範囲の目安とされる 70~120% を満足していた。

3・5 分解性スクリーニング試験

ベンゾフェノン-4 の水中での安定性を確認するための分解性スクリーニング試験を実施した。pH による分解性試験として、pH を 5、7、9 に調整した河川水 100 mL に対象物質を 0.25 µg 添加し、1 時間後及び 7 日後に分析を実施した。また、光による分解性試験として、pH 7 の試験液については明所で 7 日間放置したものについても分析した。結果を表 3 に示す。7 日間放置後の残存率は 93~100% であり、いずれの条件においても対象物質の分解は認められなかった。

表 3 分解性スクリーニング試験結果

pH	調製濃度 (µg/L)	検出濃度 (µg/L) (残存率)		
		1 時間 放置後	7 日間放置後	
			暗所	明所
5	2.5	2.4 (96%)	2.4 (96%)	—
7	2.5	2.4 (97%)	2.5 (98%)	2.5 (100%)
9	2.5	2.4 (97%)	2.3 (93%)	—

3・6 保存性試験

環境試料及び粗抽出液中のベンゾフェノン-4 の保存性について調査を行った。試料中の保存性については、河川水及び海水各 100 mL に対象物質を 0.02 µg 添加し、7 日間冷蔵保存した後、固相抽出以降の操作を行い測定した。粗抽出液の保存性については、河川水及び海水各 100 mL に対象物質 0.02 µg を添加し、固相抽出を行った後の抽出液を 14 日間冷蔵保存し、測定した。標準液の保存性は、低濃度 (2 µg/L) 及び高濃度 (100 µg/L) の標準液を 1 か月冷蔵保存した後に測定した。結果を表 4 に示す。対象物質の検出濃度は調製濃度の 98~104% であり、いずれの試験液においても保存性は良好であった。

表 4 保存性試験結果

試料名	調製濃度 (µg/L)	検出濃度 (µg/L) (残存率)		
		7 日間	14 日間	1 か月
河川水 試料	0.20	0.197 (99%)	—	—
河川水 粗抽出液	2.0	—	2.07 (104%)	—
海水 試料	0.20	0.197 (99%)	—	—
海水 粗抽出液	2.0	—	2.01 (101%)	—
標準液 低濃度	2.0	—	—	1.96 (98%)
標準液 高濃度	100	—	—	101 (101%)

3・7 環境試料の分析

本法を用いて福岡県内の河川水（雷山川）及び海水（大牟田沖）を測定した結果、ベンゾフェノ-4 はいずれも検出されなかった。

また、県内 12 か所の海水浴場の表層水を調査した結果、いずれの地点からもベンゾフェノ-4 は検出されなかった。

4 まとめ

環境水中に含まれるベンゾフェノン-4 の分析法を開発した。本分析法で用いた LC/MS/MS による分析対象物質の IDL は、0.26 pg (IDL 試料換算値 0.013 µg/L) であり、0.50~100 µg/L の範囲で直線性 ($R^2 > 0.998$) が確認された。固相抽出法による前処理を行う本分析法の MDL 及び

MQL は、0.019 µg/L 及び 0.049 µg/L であった。河川水 100 mL に対象物質 0.01 µg 添加したときの回収率は 105% (変動係数 4.7%)、海水 100 mL に対象物質 0.05 µg 添加したときの回収率は 101% (変動係数 2.5%) であった。本分析法で福岡県内河川水及び海水を測定したところ、対象物質は検出されなかった。

文献

- 1) PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- 2) R.L. Elder, J.Am. Coll. Toxicol. 2(5), 35-77 (1983)
- 3) S. Schauder, H. Ippen, Contact Dermatitis 37(5), 221-32 (1997)
- 4) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 27 年度版)

(英文要旨)

Development of an analytical method for determination of benzophenone-4 in environmental water

Koji TAKAHASHI

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

This method provides procedures for the determination of benzophenone-4 in water samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). One hundred mL of water sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus) at a flow rate of 10 mL/min. After the cartridge is washed with 10 mL of ultrapure water, the benzophenone-4 is eluted with 6 mL of methanol through the cartridge. The eluate is then adjusted to 10 mL with ultrapure water for LC/MS/MS-SRM analysis. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) of benzophenone-4 are 0.019 and 0.049 µg/L, respectively. The average recovery ($n = 7$) from river water samples added with 0.010 µg was 105%, and the relative standard deviation (RSD) was 4.7%. The average recovery ($n = 5$) from sea water samples added with 0.050 µg was 101%, and the RSD was 2.5%.

[Key words ; benzophenone-4, UV absorber, LC/MS]