

報 文

## 液体クロマトグラフィー/質量分析法による魚介類中の ノニルフェノール及びオクチルフェノールの定量

堀江 正一<sup>①</sup>, 小林 晴美<sup>1</sup>, 石井 里枝<sup>1</sup>, 斉藤 貢一<sup>2</sup>,  
中澤 裕之<sup>2</sup>, 牧野 恒久<sup>3</sup>

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いた魚介類及び食肉中のノニルフェノール (4-NP) 及びオクチルフェノール (4-OP) の簡易かつ迅速な定量法を検討した。前処理は、メタノールで抽出し、マルチモードカートリッジを用いて試験溶液を調製した。LC/MS 条件は、4-NP, 4-OP 共ネガティブモードを用い、測定は脱プロトン化分子 ( $m/z$  205.1, 219.1) を用いた選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用した。移動相は揮発性の酢酸 (0.005%) 及び酢酸アンモニウム (1 mM) を用いることにより、感度良く検出できた。SIM 法による検量線はいずれも 0.5~50 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。本法による 10 ng/g 添加時の回収率は 72.1~89.6%, 標準偏差は 10% 以内であった。本法による検出限界は 0.5~2 ng/g であった。本法を用いて市販魚介類及び食肉について NP 及び OP の汚染実態調査を実施したところ、シジミ、ツブ貝等から微量の 4-NP が検出された。

### 1 緒 言

ノニルフェノール (NP), オクチルフェノール (OP) にはエストロゲン様作用があるとされ、内分泌系に対するかく攪乱作用が疑われている<sup>1)2)</sup>。NP, OP は非イオン性界面活性剤 {nonylphenoethoxylate (NPEO), octylphenoethoxylate (OPEO)} や樹脂の安定剤や抗酸化剤の原材料として汎用されている。2000 年における NP, OP の生産量は約 16500 トン及び 10000 トンである。環境中へ放出された NPEO, OPEO は、生態系において容易に分解され、NP, OP を生成する<sup>3)4)</sup>。このことから、NP, OP の河川や下水処理水への汚染が問題視され、水生生物への影響が懸念されている。NP, OP の魚類に対するエストロゲン様作用は強いとされてきたが<sup>5)6)</sup>、NP については平成 13 年 8 月に、OP についても平成 14 年 6 月、魚類に対して内分泌攪乱作用が確認された<sup>7)8)</sup>。

我々は、NP, OP に汚染された魚介類や容器包装から移行した食品を経由して、NP, OP を日常的に摂取している可能性がある。したがって、実際にヒトがどの程度 NP, OP に暴露されているか知ることは極めて重要である。現在まで、河川水、工場排水、土壌等の環境試料中の NP, OP 濃度については、液体クロマトグラフィー (LC)、高

速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS), ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) 法等を中心に数多くの報告がなされている。しかし、市販されている魚介類、食肉や食事中的分析例は少ない<sup>9)~11)</sup>。そこで今回、LC/MS を用いた魚介類、食肉中の NP, OP の高感度分析法を検討したので報告する。なお、NP, OP には分岐タイプと直鎖タイプの構造異性体があるが、工業用として使用され、環境中から検出されているものは専ら分岐タイプなので<sup>12)13)</sup>、分岐タイプの 4-NP 及び 4-*t*-OP を中心に検討した。

### 2 実 験

#### 2.1 試料及び試薬

魚介類及び食肉は埼玉県内で市販されているものを用いた。

標準品: 4-ノニルフェノール (4-NP, 異性体混合物, 分岐型), 4-*n*-ノニルフェノール (4-*n*-NP, 直鎖型) 及び重水素化 4-*t*-オクチルフェノール 4-*t*-OP(d) は林純薬工業製の環境分析用試薬, 4-*t*-オクチルフェノール (4-*t*-OP, 分岐型) 及び 4-*n*-オクチルフェノール (4-*n*-OP, 直鎖型) は関東化学製の環境分析用試薬を用いた。

$\beta$ -グルクロニダーゼ: Sigma 製 Type H-2 ( $\beta$ -glucuronidase 115000 units/mL, sulfatase 4500 units/mL)。

標準溶液: 各標準品 20 mg を精秤し、メタノール 100 mL に溶解して標準原液を調製し、適宜 70% メタノールで希釈して標準溶液とした。

<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

<sup>2</sup> 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

<sup>3</sup> 東海大学医学部: 259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

Table 1 Operating conditions of LC/MS for octylphenol and nonylphenol

MS conditions		HPLC conditions	
Ionization	ESI, Negative	Column	Cadenza CD-C18 (100 × 2 mm)
Fragmentor	100 V	Eluent	Gradient
Nebulizer	N <sub>2</sub> (30 psi)	Flow rate	0.2 mL/min
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500 V	Injection size	20 µL
SIM ion	<i>m/z</i> 205.1, 210.1, 219.1		

A = 50% acetonitrile (containing 0.005% acetic acid, 1 mM ammonium acetate); B = acetonitrile

Time/min	A, %	B, %
0	80	20
10	40	60
20	30	70

Isolute multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd. 製, カートリッジはあらかじめメタノール 10 mL 及び水 5 mL の順で洗浄した後使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。精製水の調製にはオルガノ製超純粋製造装置 Model-S を使用した。

## 2・2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Agilent 製 1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は Table 1 に示した。

## 2・3 検量線の作成

安定同位体標識内部標準物質 4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>) を 10 ng 含んだ 4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP 及び 4-*n*-OP の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 50 ng/mL の混合標準溶液を調製し, その 20 µL を高速液体クロマトグラフ/質量分析計に注入する。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し, それぞれモニターイオンにより得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め, 4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP 及び 4-*n*-OP と 4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>) の面積比より検量線を作成した。

## 2・4 試験溶液の調製

試料 5 g を取り, メタノール 15 mL 及び内部標準 4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>) 50 ng を加えてホモジナイズ抽出後, 遠心分離し, 上澄みを分取した。必要に応じてメタノールを加え, 上澄みの全量を 15 mL とした。上澄み 3 mL (試料 1 g 相当) を取り, 精製水 7 mL を加えた後, Isolute multimode カートリッジに負荷し, カートリッジを 50% メタノール 3 mL で洗浄後, メタノール 5 mL で溶出した。溶出液に 0.1 M KOH 溶液 0.1 mL を加え, 窒素気流下で約 0.1 mL に減圧濃縮後, 70% メタノールで 1.0 mL とした。抱合体

の分析は, 上澄み 3 mL に 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2 mL, 精製水 5 mL 及び β-グルクロニダーゼ 30 µL を加え, 十分混合した後, 37°C で 10 時間インキュベートした。その後の操作は上記に示した遊離体と同様に行った。

## 2・5 包装材の溶出試験

市販魚介類の包装材に使用されていたラップフィルム及びトレイからの NP 及び OP の溶出試験は次のように行った。ラップフィルム, トレイを 5 × 5 cm に切り取ったものを内径 9 cm のガラス製シャーレに入れ, *n*-ヘプタン 25 mL {4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>), 20 ng 含む} を加えて時々振とうしながら室温で 60 分間浸漬した。*n*-ヘプタン溶液に KOH 溶液 0.1 mL を加え, 窒素気流下で約 0.1 mL に減圧濃縮後, 70% メタノールで 2.0 mL とし, 試験溶液とした。

## 3 結果及び考察

### 3・1 LC/MS 測定条件の検討

一般に, 工業用としては NP 及び OP 共に分岐タイプの 4-NP 及び 4-*t*-OP が用いられている。したがって, 環境中から検出される NP, OP は分岐タイプのものである<sup>12)13)</sup>。そこで, 分岐タイプの 4-NP 及び 4-*t*-OP を中心に, 試薬標準品として市販されている直鎖タイプの 4-*n*-NP 及び 4-*n*-OP も含めて LC/MS 測定条件を検討した。

NP は疎水性が高いことから, インターフェースには大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 法が利用されている。一方, 最近では操作性に優れているエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) 法を用いた NP, OP の分析法も数多く報告されている。そこで, APCI 法及び ESI 法を用いて検出感度を比較した結果, いずれの成分も感度的に同程度であった。そこで, インターフェースには操作性に優れている ESI 法を選択した。次に, イオン化モードを検討した結果, いずれもフェノール性水酸基を有していることから negative mode が適していた。また, 移動相に微量の酢

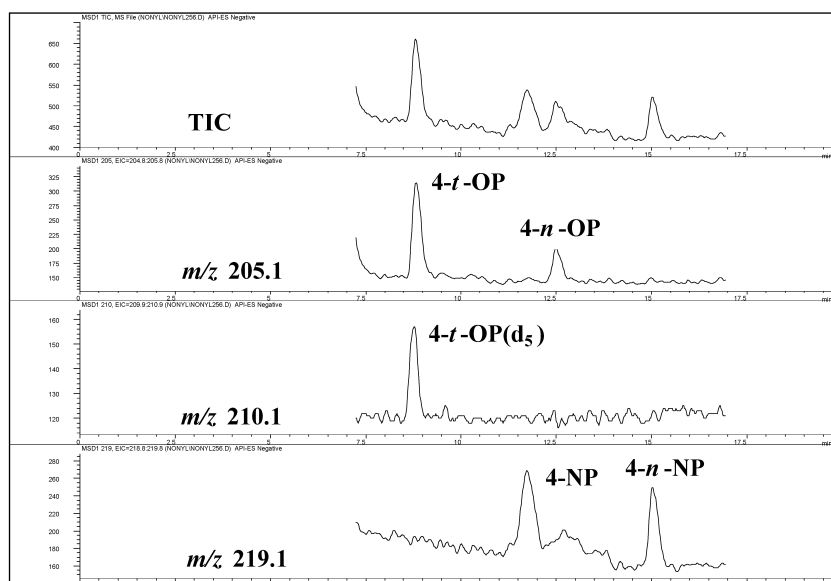


Fig. 1 Typical LC/ESI/MS-SIM chromatograms of standard mixture (1 ng/mL)

酸及び酢酸アンモニウムを加えることにより、各成分共より高感度に検出された<sup>14)</sup>。しかし、酢酸及び酢酸アンモニウムの濃度が高くなるに従い検出感度は逆に低下することから、酢酸濃度は0.005%、酢酸アンモニウム濃度は1 mMとした。更に、分析対象物質間の疎水性が大きく異なることから、グラジエント溶出法を採用した。なお、検出感度に及ぼすカラムの影響も見られ、検討した中では Cadenza CD-C18 (インタクト製) が最も優れていた。

次にイオン強度に及ぼすフラグメンター電圧の影響を検討した結果、各成分の脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  ( $m/z$  205.1, 219.1, 210.1) を効率良く生成する 100 V に設定した。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、Table 1 に示す条件を設定した。本条件によって得られた 4-NP, 4-n-NP, 4-t-OP, 4-n-OP の検出限界は、SIM モードで 0.5 ng/mL (絶対量として 10 pg) であった。本法による検量線はいずれも 0.5~50 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。混合標準溶液 1 ng/mL の代表的な LC/ESI/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 1 に示す。

### 3・2 前処理法の検討

**3・2・1 抽出及びクリーンアップ** 試料の前処理法の開発に当たっては実験器材や試薬からの汚染を極力少なくすることが求められる<sup>15)</sup>。実際、前処理法を構築するに当たり、実験環境や実験器材・試薬から 4-NP の微量汚染が問題となった。そこで、より信頼性の高い前処理法を構築するため、4-NP の溶出量が少なくかつクリーンアップ効果に優れたカートリッジを検討した。その結果、Isolute multimode が最も夾雑成分の除去効果に優れ、かつ 4-NP の溶出量が少なかった (0.2 ng/cartridge 以下)。なお、ガ

ラスバイアル瓶のキャップに用いるセプタムからも NP の汚染がみられるものもあった。セプタムには NP の溶出のない両面テフロン用を選択した。本法により得られた代表的なシジミ及びツブ貝抽出液のクロマトグラムを Fig. 2, 3 に示す。なお、試料によっては 4-n-NP の溶出位置に妨害ピークが出現し、分析が困難な場合があった。工業用としては専ら分岐タイプの 4-NP が使用されていることから、これ以降直鎖タイプの 4-n-NP は分析対象から除外することにした。

**3・2・2 酵素による加水分解** 魚介類や哺乳類に摂取された NP, OP は、グルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体として存在する可能性が高いことから<sup>16)~19)</sup>、抱合体も分析対象とした。4-t-OP 及び 4-NP 抱合体 (約 500 ng/mL) を含む溶液 100  $\mu$ L を 2・4 に記載した試料上澄み 3 mL に添加して加水分解条件を検討した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ量を 10, 30 及び 50  $\mu$ L と変えて加水分解率に及ぼす影響を調べた結果、いずれの量においても 37°C, 5 時間インキュベートすることによりほぼ完全に加水分解された。そこで、本法では酵素量は 30  $\mu$ L, インキュベーション時間は 10 時間とした。

**3・2・3 酵素反応に及ぼす MeOH 含量の影響** 次に、試料抽出液がメタノールであることから、酵素反応に及ぼす MeOH 含量の影響を検討した。酵素反応溶液中のメタノール含量を 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60% と変えて  $\beta$ -グルクロニダーゼの酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、メタノール含量が 50% までは酵素活性はほとんど阻害されず、抱合体の 90% 以上が加水分解された。そこで、上澄みであるメタノール抽出液 3 mL に 0.2 M 酢酸緩衝液 2 mL 及び精製水 5 mL を加え、インキュベートする

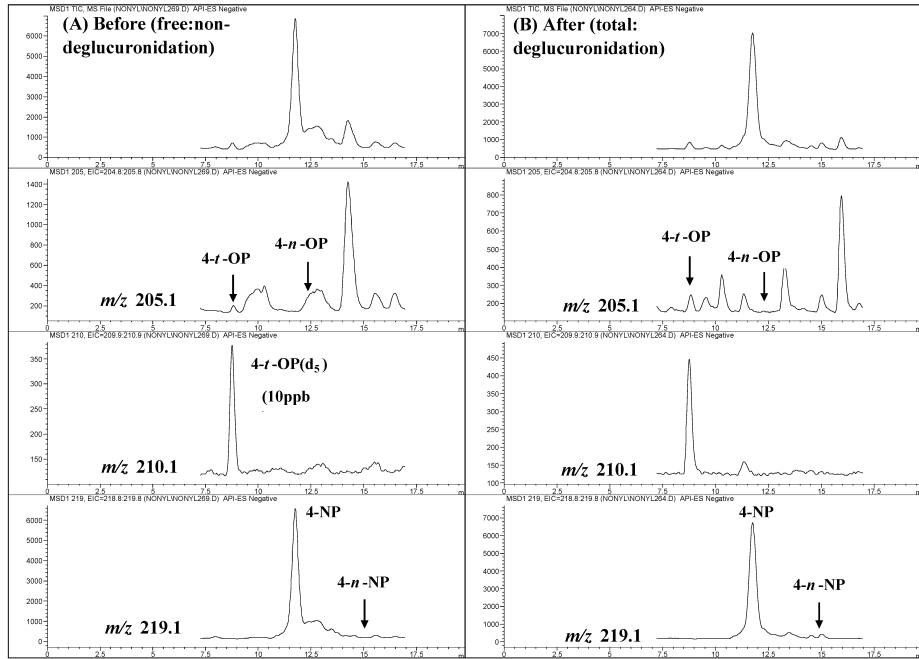


Fig. 2 Typical LC/ESI/MS-SIM chromatograms of (A) before and (B) after deglucuronidation of freshwater clam extracts

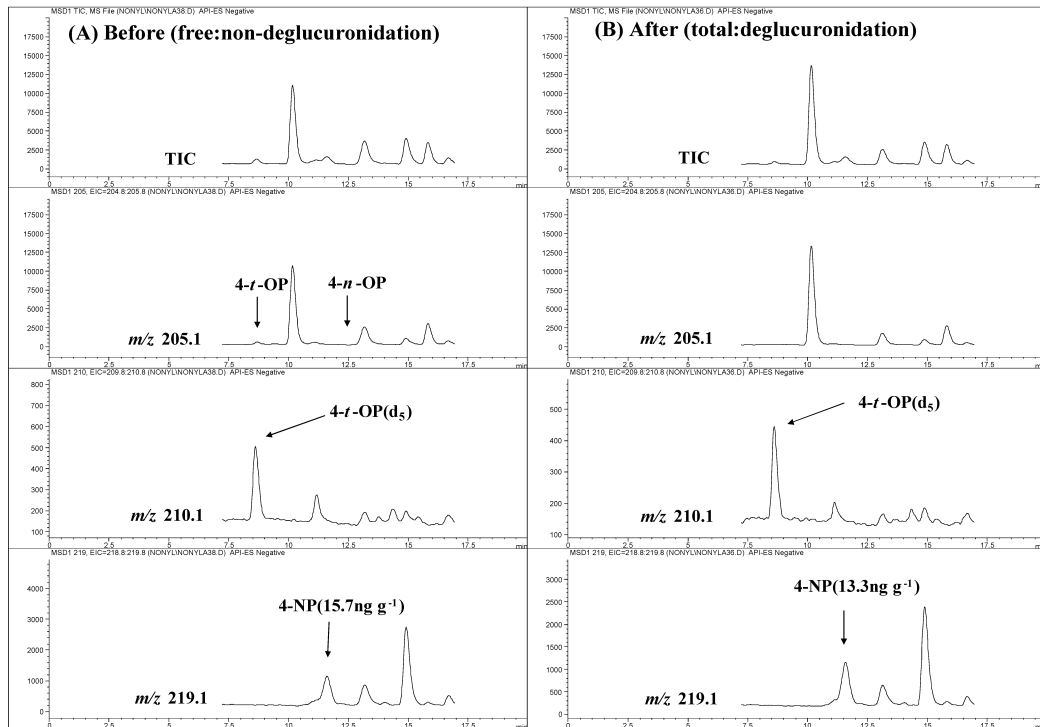


Fig. 3 Typical LC/ESI/MS-SIM chromatograms of (A) before and (B) after deglucuronidation of grain shellfish extract

ことにした。

**3・2・4 0.1 M KOH による揮散防止効果** NP, OP は減圧乾固時に揮散し、特に分岐タイプの多くが損失した {メタノールで調製した 10 ng/mL 混合標準溶液 1 mL を 40℃, 10 分間減圧乾固したときの残存量は, 4-NP = 16%,

4-n-NP = 82%, 4-t-OP = 9%, 4-n-OP = 52%, 4-t-OP(d<sub>5</sub>) = 10% であった). そこで, NP, OP が弱酸性を有するフェノール化合物であることから, 0.1 M KOH 溶液 0.1 mL を乾固時に加えることにより揮散を抑制可能か検討した. 0.1 M KOH 溶液 0.1 mL を加えることにより,

Table 2 Recoveries of octylphenol and nonylphenol from fish, shellfish and meat

Sample	Recovery (mean ± S.D., n = 5), %			
	4- <i>t</i> -OP	4- <i>n</i> -OP	4-NP	4- <i>t</i> -OP( <i>d</i> <sub>5</sub> )
Yellowtail	85.6 ± 7.6	73.3 ± 6.2	84.2 ± 9.1	86.3 ± 5.7
Freshwater clam	89.6 ± 5.7	81.3 ± 5.6	86.3 ± 7.8	84.7 ± 4.8
Pork	81.3 ± 7.2	72.1 ± 6.6	79.5 ± 8.3	83.3 ± 6.7

Samples were spiked with 10 ng/g of each drug.

Table 3 Concentration of OP and NP in fish, shellfish and meat

Sample	Inspection number	Free (non-deglucuronidation)			Total (deglucuronidation)		
		4- <i>t</i> -OP	4- <i>n</i> -OP	4-NP	4- <i>t</i> -OP	4- <i>n</i> -OP	4-NP
Horse mackerel	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Yellowtail	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sardine	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rainbow trout	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flounder	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sweet fish	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mackerel	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pacific saury	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Shad	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Striped pigfish	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Freshwater clam	7	Tr	ND	ND ~ 64.1	1.0	ND	ND ~ 88.9
Littleneck clam	3	ND	ND	ND ~ 2.0	ND	ND	ND ~ 2.7
Clam	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Grain shellfish	2	ND	ND	4.3 ~ 15.7	ND	ND	5.4 ~ 13.3
Scallop	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Turban shell	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sea snail	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Surf clam	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sea squirt	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Wakame seaweed	6	ND	ND	ND ~ 14.3	ND	ND	ND ~ 11.0
Chicken	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pork	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Beef	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: 4-*t*-OP < 0.5 ppb, 4-*n*-OP < 0.5 ppb, 4-NP < 2.0 ppb

いずれの成分も 95% 以上残存した。なお、減圧濃縮時のロータリエバポレーターからの 4-NP の汚染を防ぐために、エバポレーター内はよく洗浄し、減圧濃縮は窒素気流下で行った。

### 3・3 添加回収実験

4-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP 及び内部標準 4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>) を、ハマチ、シジミ及び豚肉に 10 ng/g の濃度で添加し、回収率を求めた。その結果、ハマチ、シジミ及び豚肉はいずれの成分も 70% 以上の回収率であった {Table 2, 4-*t*-OP(*d*<sub>5</sub>) での補正なし}。本法による 4-*t*-OP, 4-*n*-OP の検出限界は 0.5 ng/g (S/N 3) であった。一方、4-NP はハマチ及びシジミ共に操作空試験値 (最終試験溶液 1 mL に対して 0.32 ± 0.18 ng/mL) が観測された。一般に操作空試験値が観測された場合の検出限界 LOD は、操作空試験値の平均値プラス標準偏差の 3 倍と定義されている。したがって、試料中の 4-NP の検出下限値は信頼性を考慮し

て 2 ng/g とした。

### 3・4 魚介類, 食肉中の NP, OP 濃度

本法により、埼玉県内で市販されていた魚介類, 食肉等, 計 52 検体を分析した。今回分析した中では、一部のシジミ (7 検体中 2 検体), ツブ貝 (2 検体中 2 検体) 及びワカメ (6 検体中 1 検体) から微量の 4-NP が検出された。また、4-NP が 88.9 ng/g 検出されたシジミからは、同時に 1 ng/g の 4-*t*-OP も検出された。

ヒトやラット, マウス等では NP, OP は経口摂取後, 速やかにグルクロン酸抱合体に代謝され, 血中や尿中には主にグルクロン酸抱合体として存在するとされている<sup>16)~19)</sup>。一方, 貝類からの NP 検出例に関する報告はなされているが, 遊離体のみ測定しており, 代謝に関する報告は見られない<sup>20)21)</sup>。そこで, 今回の調査で微量の 4-NP が検出されたシジミ及びツブ貝について, 遊離体と抱合体を含めた総量を測定した。Table 3 に示すとおり, シジミ及びツブ貝



Table 4 Thermal stability of residual 4-nonylphenol in freshwater clam and grain shellfish

Sample		NP	Rate, %
Freshwater clam	Boil liquid	3.4 ng/100 mL	1.0
	tissues	337.1 ng (61.4 ng g <sup>-1</sup> )	99.0
Grain shellfish	Boil liquid	2.5 ng/100mL	2.2
	tissues	108.7 ng (15.1 ng g <sup>-1</sup> )	97.8

Ten pieces of freshwater clam and one piece of grain shellfish were boiled in 100 mL of water for 5 minutes, respectively.

中から検出された 4-NP は、その多くが遊離体であり、抱合体はほとんど検出されなかった。このことから、シジミ、ツブ貝のグルクロン酸抱合体活性は低いと考えられる。

次に、シジミ及びツブ貝に含まれる 4-NP の加熱調理における安定性を調べた。シジミ 10 粒、ツブ貝 1 粒をそれぞれ 100 mL の沸騰水中で 5 分間加熱調理後、沸騰水中への移行量及びシジミ、ツブ貝中の濃度を調べた。貝中に含まれる 4-NP は沸騰水中にはほとんど移行せず、貝中に残存していた (Table 4)。また、加熱処理後においてもその濃度に変化はほとんど見られず、安定であった。なお、Fig. 2, 3 に市販魚介類の代表例として 4-NP が検出されたシジミ及びツブ貝抽出液の LC/ESI/MS-SIM クロマトグラムを示した。

### 3・5 魚介類中の NP 濃度と包装材の影響

魚介類の NP 及び OP 汚染の原因として、環境汚染由来によるものと、魚介類が包装されていた包装材由来によるものが報告されている<sup>9)10)</sup>。そこで、今回の調査で NP が検出されたシジミ (2 検体) 及びツブ貝 (2 検体) について、これらの検体が包装されていた包装材 (ラップフィルム、トレイ) について、NP 及び OP の溶出試験を行った。その結果、今回 NP が検出されたシジミ及びツブ貝に用いられていた包装材からの NP 及び OP の溶出量は、いずれも 1 ng/cm<sup>2</sup> 以下であった。更に、シジミ及びツブ貝は、殻は包装材と接触しているが、貝の中身は接触していない。以上のことから、今回 NP が微量検出された貝類の汚染原因は、包装材からの影響は極めて少なく、環境汚染由来によるものと考えられる。

## 4 結 語

最近、NP、OP は魚類に対して内分泌攪乱作用を示すことが明らかにされた。しかし、魚類と異なりラットやマウス等の哺乳類に対するエストロゲン様作用は非常に弱いとされている。更にその代謝体であるグルクロン酸抱合体は、エストロゲン様作用をほとんど示さないとされている。今回、市販魚介類、食肉等計 52 検体を分析した結果、一部のシジミ等を除き、4-NP、4-t-OP は検出限界以下であった。分析数が少なく、今回の調査から我々が食してい

る多くの食品中の NP、OP レベルを評価することは困難である。しかし、NP、OP の界面活性剤への使用が年々大きく減少しており、NP、OP の河川水や水道源水中の汚染レベルは年々低下している。また、食品への移行が考えられる容器包装への使用も少なくなっている。したがって、我々が暴露されている OP、NP の量は極めて少ないレベルであると推定される。今後、我々が食品等を經由して摂取する OP、NP 量は更に減少していくと考えられる。

## 文 献

- 1) A. M. Soto, H. Justicia, J. W. Wray, C. Sonnenschein: *Environ. Health Perspect.*, **92**, 167 (1991).
- 2) R. White, S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter: *Endocrinology*, **135**, 175 (1994).
- 3) W. Ginger, P. H. Brunner, C. Schaffner: *Science*, **225**, 623 (1984).
- 4) M. Ahel, W. Giger, M. Koch: *Water. Res.*, **28**, 1131 (1994).
- 5) J. P. Sumpter, S. Jobling: *Environ. Health Perspect.*, **103**, 173 (1995).
- 6) D. Y. Shang, R. W. Macdonald, M. G. Ikonomou: *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1366 (1999).
- 7) 環境省総合環境政策局環境保健部編: 「ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告」(2001年8月)。
- 8) 環境省総合環境政策局環境保健部編: 「魚類を用いた生態系への内分泌攪乱作用に関する試験結果について」(2002年6月)。
- 9) 佐々木久美子, 高附 功, 根本 了, 今中雅章, 衛藤修一, 村上恵美子, 豊田正武: *食品衛生学雑誌*, **40**, 460 (1999).
- 10) 根本 了, 高附 功, 佐々木久美子, 豊田正武: *食品衛生学雑誌*, **41**, 377 (2000).
- 11) 樋口雅之, 宮田大典, 川村誠二, 植田英一, 今中雅章, 外海泰英: *食品衛生学雑誌*, **45**, 339 (2004).
- 12) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori: *J. Health Sci.*, **46**, 282 (2000).
- 13) M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo: *Anal. Chem.*, **73**, 5886 (2001).
- 14) 堀江正一, 吉田栄充, 石井里枝, 小林 進, 中澤裕之: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **48**, 579 (1999).
- 15) 厚生労働省医薬局化学物質安全対策室編: 「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会 中間報告書追補」(平成 13 年 12 月)。
- 16) S. Muller, P. Schmid, C. Schlatter: *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **5**, 257 (1998).
- 17) D. R. Doerge, N. C. Twaddle, M. I. Churchwell, H. C.

- Chang, R. R. Newbold, K. B. Delclos: *Reproductive Toxicol.*, **16**, 45 (2002).
- 18) A. Arukwe, A. Goksoyr, R. Thibaut, J. P. Cravedi: *Marine Environ. Research*, **50**, 141 (2000).
- 19) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa: *Anal. Chim. Acta*, **486**, 41 (2003).
- 20) T. Tuda, K. Suga, E. Kaneda, M. Ohsuga: *J. Chromatogr. B*, **746**, 305 (2000).
- 21) T. Tuda, K. Suga, E. Kaneda, M. Ohsuga: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **68**, 126 (2002).

---

## Determination of Nonylphenol and Octylphenol in Fish and Shellfish by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry

Masakazu HORIE<sup>1</sup>, Harumi KOBAYASHI<sup>1</sup>, Rie ISHII<sup>1</sup>, Koichi SAITO<sup>2</sup>,  
Hiroyuki NAKAZAWA<sup>2</sup> and Tsunehisa MAKINO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

<sup>3</sup> School of Medicine, Tokai University, Bohseidai, Isehara-shi, Kanagawa 259-1193

(Received 20 July 2007, Accepted 17 October 2007)

A simple and reliable method using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS) has been developed for the determination of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-octylphenol (4-OP) in seafood and meat. LC separation was performed on a Cadenza CD-C18 column (100 × 2 mm i.d.) with a gradient system of 50% acetonitrile (containing 1 mM ammonium acetate and 0.005% acetic acid)-acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The negative ionization produced molecular related ions: (M - H)<sup>-</sup>, at *m/z* 205.1 and 219.1 for 4-OP and 4-NP, respectively. The calibration graphs for 4-NP and 4-OP were rectilinear from 0.5 to 50 ng/mL with selected ion monitoring (SIM). The compounds were extracted with methanol, and the extracts were cleaned up on a Isolute Multimode cartridge (500 mg). The method involves enzymatic deconjugation by β-glucuronidase and correction of the stable isotopically labeled internal standard, 4-octylphenol-d type. The recoveries of the compounds from seafood fortified at a level 10 ng/g was 72.1 ~ 89.6%, with high precision. The limits of detection of the compounds in seafood were 0.5 ~ 2 ng/g.

**Keywords** : nonylphenol; octylphenol; alkylphenol; seafood; fish; LC; mass spectrometry; LC/MS.