

LC-MS法によるフェノール定量のための基礎実験

蒲生 啓司 ・ 中島 佳織

(教育学部 化学教室)

Fundamental Study on the Quantification of Phenol by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Keiji GAMOH and Kaori NAKASHIMA

Laboratory of Chemistry, Faculty of Education

Abstract: A microanalytical LC-MS method for the determination of phenol as its 4-aminoantipyrine derivative has been studied. Derivatization conditions for phenol were optimized by liquid chromatographic method. Under reversed-phase liquid chromatographic conditions the phenol derivative have been analyzed using electrospray ionization (ESI) methods. The protonated molecular $[M+H]^+$ ion and deprotonated molecular $[M-H]^+$ ion were detected as pseudo-molecular ions by positive and negative MS detection. In this case $[M+H]^+$ ion of phenol derivative was more sensitively detected than its $[M-H]^+$ ion. A low detection level (approx. 50 pg) of the phenol derivative was attained in the selected-ion monitoring mode with the electrospray positive ionization. The LC-MS analysis of the phenol derivative could be very useful for trace analysis of phenol if the phenol-d₆ would be used as a internal standard.

キーワード: LC-MS, エレクトロスプレイイオン化法, フェノール, 4-アミノアンチピリン,
高速液体クロマトグラフィー

緒 言

水道の普及に伴い水質管理への取り組みがなされてきたが、今日の水道水をめぐる環境条件は決して好ましい状況といえるものではない。水道水に対する国民のニーズは多様化し、より質の高い水道水の供給が求められてきたことから、水質基準、快適水質項目、監視項目が設定されている。水道の水質は健康に直接関係する問題であると共に生活利用上の利便性の指標となることからその重要性はますます大きくなっており、それに伴って、水質試験も、給水される水道水の適否を判断するだけにとどまらず、より精密かつ高感度な分析法が望まれている^{1), 2)}。

水道法でいうフェノール類とは、4-アミノアンチピリンにより呈色するフェノール、クレゾール、ナフトール及びカテコール類をさすが、フェノール類が自然水に含まれていることはなく、フェノールやクレゾールを原料とする化学工場や石炭ガスパラント等の排水に含まれたり、アスファルト舗装の道路に流れた雨水等に含まれることがある。水道との関係では、以前は送水管等に内面塗料としてターエポキシ樹脂塗料を用いていたので、これを塗布した鋼管を用いた場合、乾燥や洗管不

足によりフェノール類が溶出することがあった。

フェノールの毒性は、タンパク質や細胞原形質を凝固させて死滅させる作用のほか、皮膚や粘膜からの吸収によって、刺激及び麻痺症を起こすとされている。フェノール自身は、 $0.1\text{mg}/\ell$ 以下では異臭を感じないが、フェノールを含む原水を塩素処理するとクロロフェノールが生成し、これが水道水に異臭味を与えることから水質基準が定められてきた。1950年の『飲料水の判定基準とその試験方法』に初めて判定項目にフェノールとして記載されて以来、フェノールの水質基準値は推移し、1992年の水質基準に関する省令の改正（厚生省令第69号）では、臭味発生防止の観点から従来通り『フェノール類として $0.005\text{mg}/\ell$ 以下』とされている。

フェノール類は、工場排水を初めとして家庭雑廃水、あるいは喫煙雰囲気下の空気中からも検出される^{3), 4)}。いずれも極微量の濃度範囲であるために、定量にあたっては、高感度分析法が要求される。これまで、排水中のフェノールの定量に関する公定法^{5), 6)}としては、4-アミノアンチピリン吸光光度法が採用されている。また、1993年版上水試験方法では、定量法として4-アミノアンチピリン法及びその迅速法に、ガスクロマトグラフ-質量分析法とガスクロマトグラフ法が追加された。4-アミノアンチピリン法は、溶媒抽出を併用することによってより高感度に定量できる。しかしながら、本誘導体化反応は選択性に乏しく、幾種かのフェノール類も同時に反応してしまうために、そのままでは反応に関与するフェノール類のトータルの定量値を示すことになる。そのため、分離化学的に検出の選択性を向上させるために、誘導体化法とクロマトグラフィ法と併用させた定量法が、幾つか提案されている^{7), 8)}。

一方、質量分析法も、その選択的検出法という点では優れた方法である。今日、液体クロマトグラフ-質量分析(LC-MS)法は、高感度分析が達成されるが故に、様々な分野において微量分析の手段として用いられているが、フェノール類のLC-MS法に関する基礎的なデータはあまり報告されていない。本法が、実用的なレベルで使えるか否かを知るためには、高感度分析を達成するための最適化を検討する必要がある。幸いフェノールの重水素体(フェノール- d_6)が市販されているので、内部標準物質として使うことができる。LC-MS法によるメリットの一つは、特殊な誘導体化を必要としないことがあげられるが、被測定物質の質量数があまりにも小さい場合には、時として誘導体化が有効な場合もある。フェノールの場合には、前述のように、4-アミノアンチピリン法という確立された誘導体化法があるので、その方法に則った。

本研究では、微量のフェノール定量におけるLC-MS法を適用すべく、誘導体化法に基づく最適化を図りながら、イオン化に係わる諸条件の設定を行うことで、定量のための最適条件を見出すことを目的とした。

実験方法

1. 試薬⁹⁾

4-アミノアンチピリン標準溶液： Na_2CO_3 0.64 g および NaHCO_3 0.34 g を水100mlに溶かし、これに4-アミノアンチピリン 0.09 g を加えて溶かす。フェリシアン化カリウム標準溶液：ほう酸2.6 g を水200mlに溶かし、フェリシアン化カリウム0.38 g を加えて溶かす。フェノール水溶液(0.01M)：フェノール0.094 g を水100mlに溶かす。なお、これらの溶液は使用の都度調製した。

2. 測定機器及び測定条件

本研究で用いた測定機種は、分光光度計(島津製作所製UV-160)、高速液体クロマトグラフ(島津製作所製、UV検出器SPD-6AV、送液ポンプLC-6A、データ処理装置クロマトパックC-R4Aから

成る)である。高速液体クロマトグラフィーでは、分離カラムとして、島津製作所製Shim-pack CLC-ODS (6.0mmi.d.×150mmL.)を用い、移動相として、70%メタノール水溶液を流量1.0ml/minで用いた。LC-MSの測定は、分離カラムとして日本分光製Crestpak ODS- μ (2.0mmi.d.×150mmL.)を用い、移動相として65%メタノール水溶液を流量100 μ l/minで用いた。MS部は、VG Quattro II (micromass社製)を用いた。

3. 測定原理及び方法

本吸光光度法におけるフェノール定量のための測定原理としては、Fig.1に示した通りフェノールがフェリシアン化カリウムを酸化剤として4-アミノアンチピリンと反応することにより、溶液を呈色させる物質を生成する反応機構に従っている。

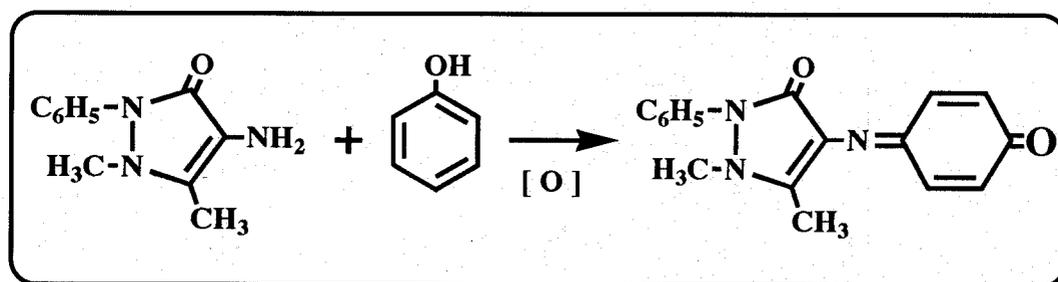


Fig.1 Reaction scheme of phenol and 4-aminoantipyrine.

実験の手順として、4-アミノアンチピリンの溶液をサンプル管に入れ、フェノールの標準溶液、フェリシアン化カリウムの溶液の順に加え、反応後10分経過した試料を高速液体クロマトグラフに注入し、得られるクロマトグラムから目的のピーク面積を算出し、検量線を作成する。その際、本法における最適化を図るために以下の諸条件を検討した。その項目としては、1) 反応生成物のUV及びVIS領域におけるスペクトルの測定 2) 反応生成物のNMRスペクトルの測定 3) 反応生成物を用いたときの検出下限 4) 反応生成物の経時変化 5) フェノールと4-アミノアンチピリンの反応比の変化における反応生成物の収量である。それらの条件検討後、最適条件を求め、その条件下で種々の濃度に調製したフェノールを用いて検量線を作成した。更に、6) フェノールの検出下限を測定した。

以上のHPLC法における最適条件の検討結果を受けて、LC-MS法による計測を行った。LC-MS法では、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法¹⁰⁾を用い、イオン源温度を80°C、キャピラリー電圧を4.5kVに設定して、コーン電圧を30V又は40Vに変化させ、正イオンモード (ESI⁺) 及び負イオンモード (ESI⁻) で質量スペクトルを記録した。ESI法でのSIM (Selected Ion Monitoring) 測定では、SIM選択イオンとして、m/z 294 (正イオンモード) 及び292 (負イオンモード) を用いた。

結果及び考察

1. 反応生成物のUV及びVIS領域におけるスペクトルの測定

反応生成物を乾燥した後、5mg正確に秤量し、①クロロホルム、②メタノール：水=80：20とした混合溶液を溶媒として、それぞれ100ml加えたものを分光光度計に供し、UV及びVIS領域でスベ

クトルを測定した。その結果、Fig.2に示すように①の吸収極大は460nmに、②の吸収極大は500nmに認められた。以後、高速液体クロマトグラフィーによる分析の際、移動相として、メタノール/水の混合溶液を用い、検出波長500nmで測定を行なうことにした。

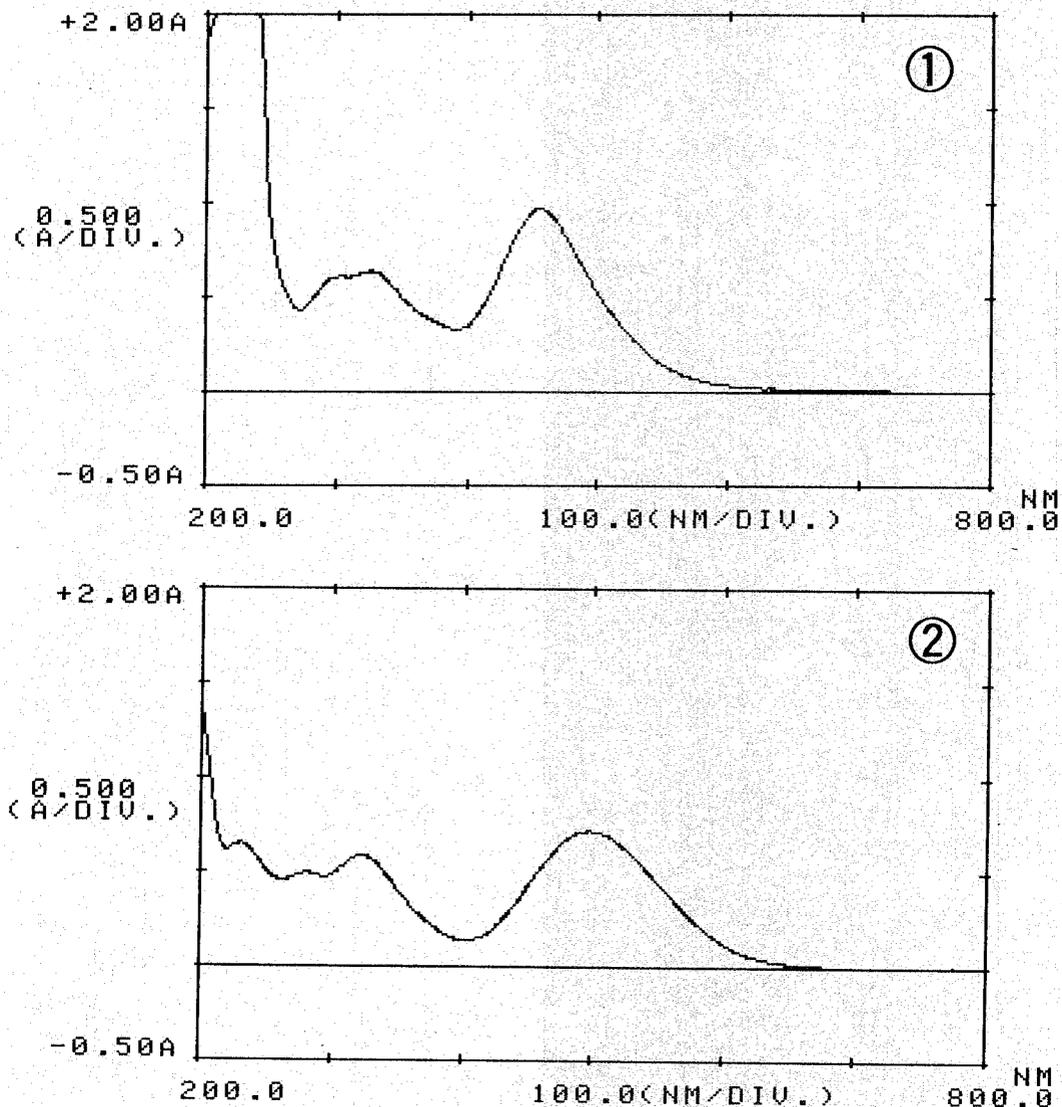
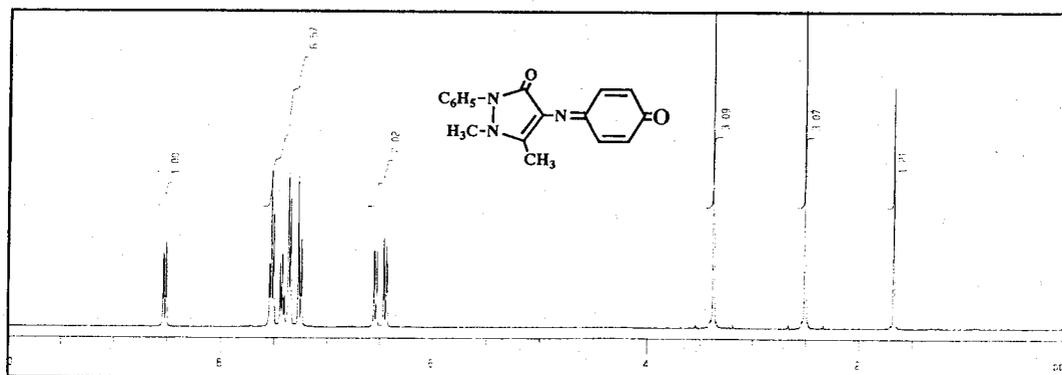


Fig.2 UV-VIS spectra of the reaction product in chloroform (①) and 80% methanol (②).

2. 反応生成物のNMRスペクトルの測定

反応生成物の¹H-NMRスペクトル(重クロロホルム中)をFig.3に示したが、スペクトルのパターンは、反応式に示した生成物の構造を支持している。

Fig.3 $^1\text{H-NMR}$ spectra of the reaction product.

3. 反応生成物の固体における検出下限

取り出した反応生成物を用いたときの検出下限を知るために、高速液体クロマトグラム(HPLC)を使用して測定を行なった。それによって得られたクロマトグラムをFig.4に示した。ここで、クロマトグラム(a)は、反応液を直接注入して得られたクロマトグラムで、同じく、(b)は、生成した反応生成物のクロマトグラムを示している。ここで得られたクロマトグラムのピーク面積値により検量線を作成しFig.5に示した。多少のばらつきはあるが、直線性の良好な検量線が得られた。検出下限濃度は、反応生成物の濃度が $0.02\text{mg}/\ell$ 、すなわち注入絶対量として 0.1ng ($=100\text{pg}$) ($S/N=3$)であった。

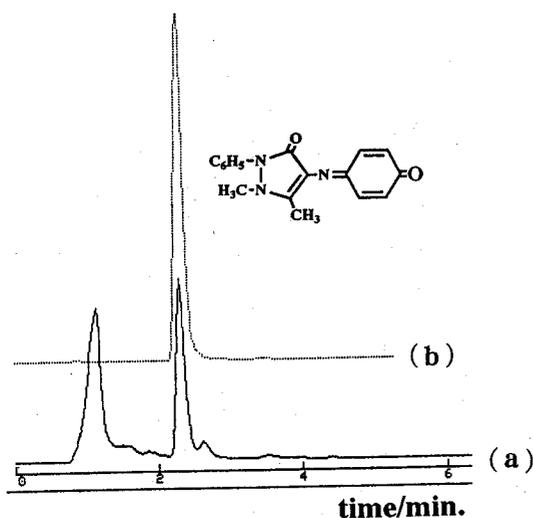


Fig.4 Liquid chromatogram of the reaction solution (a) and the reaction product (b) detected at 500nm. Conditions: column, CLC-ODS (6.0mm i.d. \times 150mm L.) ; mobile phase, 70% methanol/30% water ; flow rate 1.0ml/min.

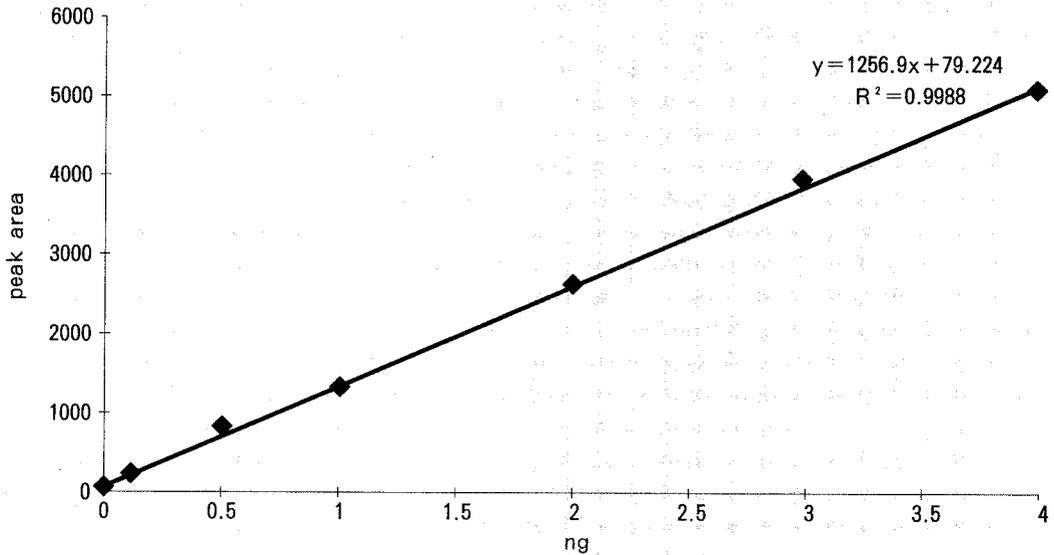


Fig.5 Standard curve of the reaction product by liquid chromatography.

4. 反応生成物の経時変化

反応後、時間が経過するごとに、生成物の生成量に変化が現われるのかどうかを観察するために、反応させてから2分後、10分後、20分後、50分後についてHPLCによって追跡した。その結果をFig. 6に示した。試薬を反応させてから、HPLCに注入するまでの時間を変えてみたのだが、顕著な差はなかった。

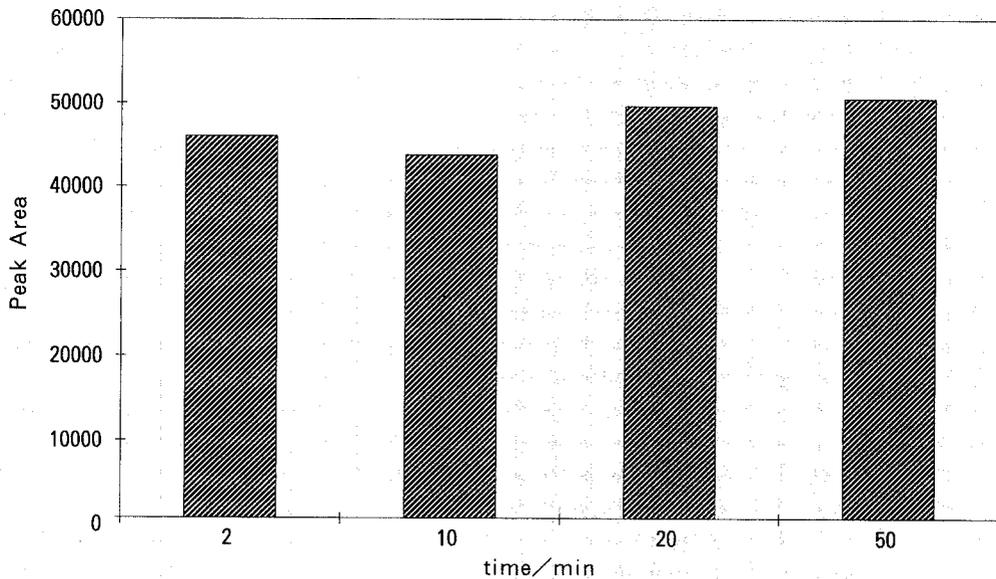


Fig.6 Time course of the peak intensity of the reaction product in water.

5. フェノールと4-アミノアンチピリンの反応比の変化における生成物の収量

フェノールと4-アミノアンチピリンの反応比を変えたときに生成物の収量に差はあるのかどうかを、フェノールの濃度を一定にして、4-アミノアンチピリンの濃度を变化させることで、HPLCによって比較した。今回、フェノール濃度は①0.5mM、②0.1mMの2通りで行なった。その結果をそれぞれTable 1, Table 2, 及びFig.7, Fig.8に示した。①のときは、1:40で最大の収量を示した。1:80になると減少を示したので、1:40が最適な比率であった。②のときは、1:40についても測定を行なったのだが、ピークが複数に分かれ目的のピークの確認ができなかった。しかし結果的には、1:10で最大の収量を示した。

Table 1 Peak areas of the reaction product by HPLC.

Molar ratio of phenol (0.5mM) to 4-aminoantipyrine is 1:80, 1:40, 1:20, 1:10 and 1:1.

	1:80	1:40	1:20	1:10	1:1
1	167,658	272,508	175,519	97,308	2,837
2	240,010	260,610	170,837	96,398	2,835
3	264,819	265,326	171,895	85,691	2,503
4	276,286	266,887	166,098	84,426	2,574
5	270,912	267,402	168,687	96,731	4,689
平均	243,937	266,547	170,607	90,111	3,088
RSD(%)	18.4	1.6	2.1	6.9	29.4

Table 2 Peak areas of the reaction product by HPLC.

Molar ratio of phenol (0.1mM) to 4-aminoantipyrine is 1:20, 1:10, 1:5 and 1:1.

	1:20	1:10	1:5	1:1
1	60,340	114,484	68,721	9,804
2	79,312	133,052	81,341	15,669
3	96,111	143,270	100,456	18,110
4	106,486	147,976	101,222	18,946
5	107,365	148,732	102,141	21,120
平均	89,233	137,503	90,776	16,730
RSD(%)	22.3	10.4	16.6	25.9

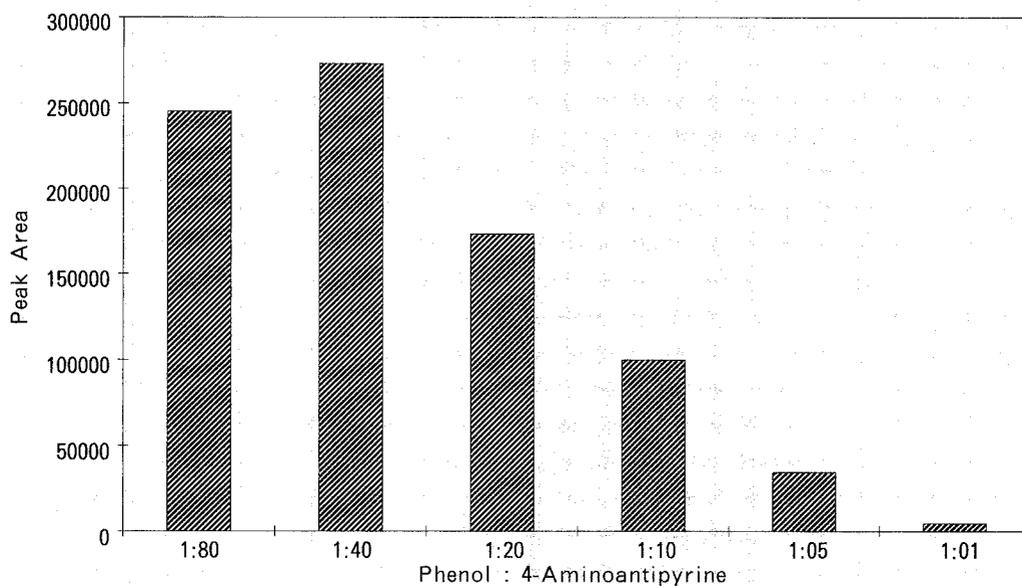


Fig.7 Optimization of the molar ratio of phenol 0.5mM to 4-aminoantipyrine.

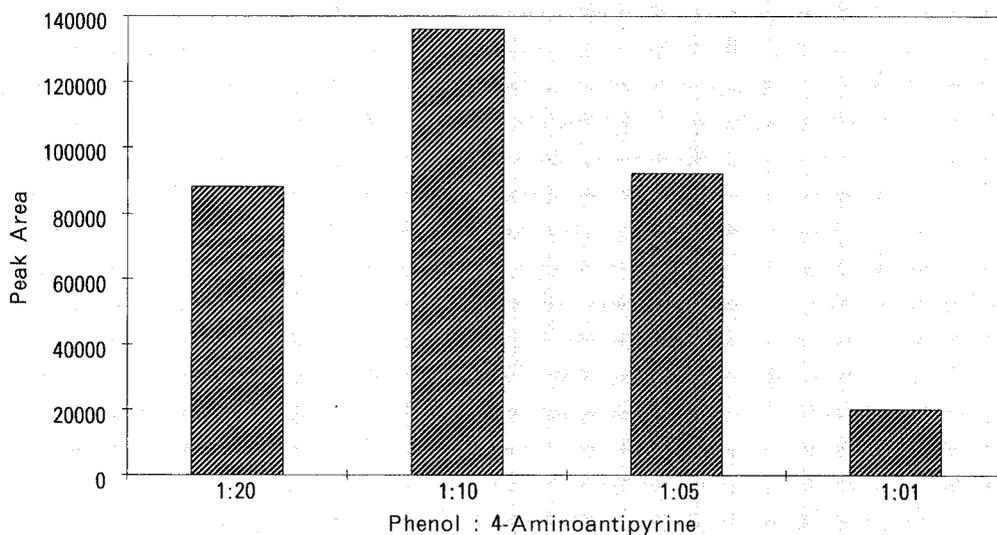


Fig.8 Optimization of the molar ratio of phenol 0.1mM to 4-aminoantipyrine.

6. フェノールの検出下限

フェノールの検出下限を知るために、フェノールと4-アミノアンチピリンの反応濃度比を一定に保ってHPLCによって測定した。その反応比はフェノール：4-アミノアンチピリン=1：20，1：10の2通りで行った。その結果をFig.9に示した。これまでの検討結果から、反応生成物の固体の検出

限界を考えると、フェノール濃度として340nM程度の検出下限が期待できるとして測定を行った。しかし結果としては、1:20の比で行ったとき、フェノール濃度 $1.08\mu\text{M}$ ($0.1\text{mg}/\ell$)が限界となった。反応濃度比を1:30, 1:40等に増やすことでより検出下限が下がる可能性があるのかを、これからの検討課題としておきたい。

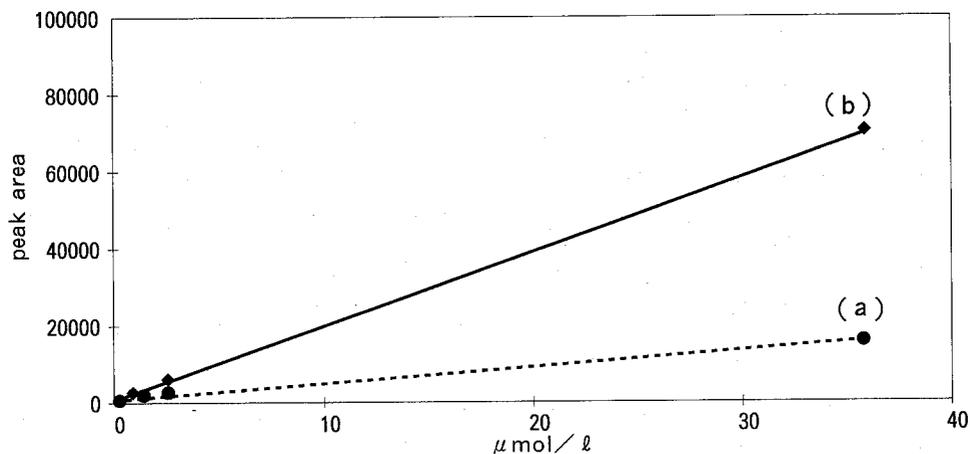


Fig.9 Standard curve of phenol by HPLC ; molar ratio : of phenol to 4-aminoantipyrene in the reaction : (a) 1:10 , (b) 1:20.

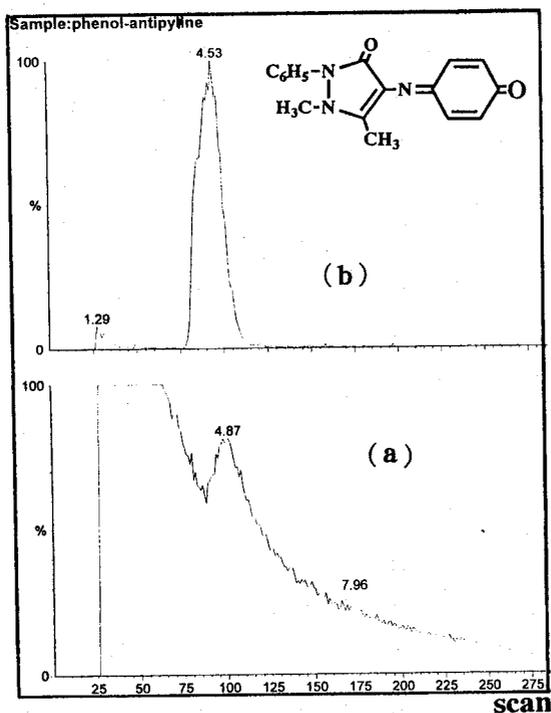


Fig.10 Total ion chromatogram(a) and selected ion (m/z 294) chromatogram(b) obtained from 10ng of the reaction product.

7. エレクトロスプレイオン化 (ESI) LC-MS法による反応生成物の分析

上述の実験により得られた反応生成物 (10ng) のトータルイオンクロマトグラム (TIC) と選択的イオンクロマトグラム (SIM) を比較した (Fig.10). 図より明らかなように, TICモードでの測定は事実上不可能であり, SIMモードによる測定によって定量が可能であることが分かった.

また, ESI⁺及びESI⁻モードと, コーン電圧値の違いによって得られるクロマトグラムのピーク面積値を比較した結果, Table 3に示すように, コーン電圧を40Vに設定した時のESI⁺モードが最も大きい値を示したので, 以下それに従って測定を行った.

Table 3 Comparison of peak area detected by positive mode (ESI⁺) with peak area detected by negative mode (ESI⁻).

Cone(V)	ESI ⁺	ESI ⁻
30	150,136	6,525
40	207,323	6,701

また, ESI⁺及びESI⁻モードと, コーン電圧値の違いによって得られるクロマトグラムのピーク面積値を比較した結果, Table 3に示すように, コーン電圧を40Vに設定した時のESI⁺モードが最も大きい値を示したので, 以下それに従って測定を行った.

エレクトロスプレイオン化 (ESI) LC-MS法によって得られる反応生成物

のマススペクトルをFig.11に示した. m/z 294に擬分子イオン $[M+H]^+$ に対応するピークが観察され, 更にナトリウムイオンが付加した m/z 316のイオンが検出された.

今回は内部標準物質を用いてないので, 定量に関する情報はこれ以上得られないが, 反応生成物のみを希釈して得られる擬分子イオン $[M+H]^+$ に対応するピーク面積値からは, おおよそ50pg程度までは十分検出が可能であると考えられる.

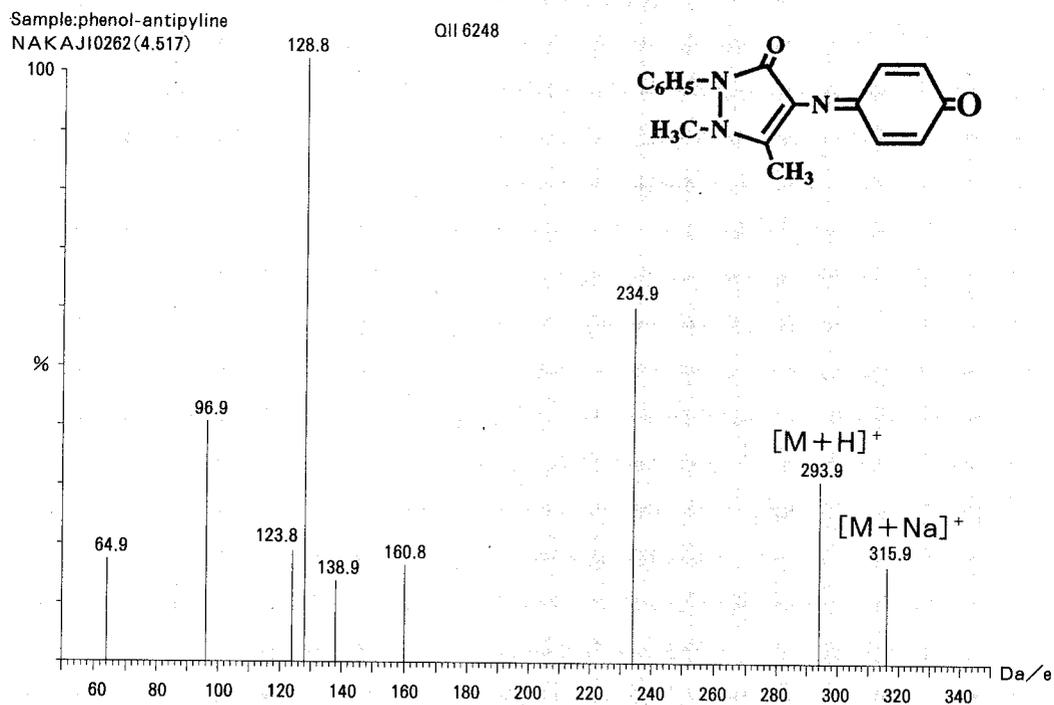


Fig.11 Positive-ion ESI mass spectrem obtained from 10ng of the reaction produc.

結 語

以上本研究の内容は、環境中の微量フェノールをLC-MS法により定量するための基礎的な検討である。誘導体化法とLC-MS法を併用することによる最大のメリットは、クロマトグラフィーによる選択的分離と共に、特定のイオン種のみを検出できる点にあると考えられる。フェノールのような低分子の化合物にとっては、誘導体化によって分子量が数倍大きくなることは、より選択性を高めることにはたらいっている。問題は、誘導体化反応の収率（効率）である。誘導体化によって得られる反応生成物自身が本来持つ検出下限と、実際にフェノールから得られる検出下限には、大きな隔りがある。一般に、被測定試料の濃度が低くなればなるほど、反応の効率は低下するが、この点は、反応条件の設定により克服できるものであると考えている。今後、環境試料への応用と共に、内部標準法を取り入れた、フェノールのLC-MS分析法の確立を目指していきたい。

謝 辞

本研究を推進するにあたり、研究費の一部は、平成9年度教育改善推進費によった。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 日本水道協会：上水試験方法，(1993年版)。
- 2) 日本水道協会：上水試験方法解説編 (1993年版)。
- 3) 合田 健編著：“水環境指標”，p.184 (1979)，(思考社)。
- 4) K. Kuwata, M. Uebori, Y. Yamazaki : Anal. Chem., 53, 1531 (1981)。
- 5) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993)。
- 6) JIS K 0101, 工業用水試験方法 (1991)。
- 7) K. Kuwata, M. Uebori, Y. Yamazaki : Anal. Chem., 52, 857 (1980)。
- 8) 伊藤純一，広沢幸弘，小俣雅嗣：分析化学，43, p.959 (1994)。
- 9) 大倉洋甫，財津潔，中島憲一郎，山口政俊：吸光光度法—有機編 (1984)。
- 10) M. Yamashita and J. B. Fenn : J. Phys. Chem., 88, (1984)。

平成9 (1997)年9月30日受理

平成9 (1997)年12月25日発行

