

環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

－LC/MSを用いた水質中モノハロゲン化フェノール類の分析法－

An Analytical Method of Mono Halogenated Phenols in Water
by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS).

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴（水質第二科）

Toyohiro Urayama, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka,
Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

【調査研究】

環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究
-LC/MSを用いた水質中モノハロゲン化フェノール類の分析法-
An Analytical Method of Mono Halogenated Phenols in Water
by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS).

浦山豊弘，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴（水質第二科）
Toyohiro Urayama, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka,
Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

要 旨

環境試料(水質)中のモノクロロフェノール類，モノブロモフェノール類の多成分同時分析法を検討した。分析法は，逆相系固相で抽出しLC/MS-SIMで，ESI法（Negative）とAPCI法（Negative）を併用して測定する方法とした。

[キーワード：ハロゲン化フェノール類，クロロフェノール類，ブロモフェノール類，多成分分析，LC/MS]

[Key words：Halogenated Phenols, Chloro Phenols, Bromo Phenols, Simultaneous Analysis, LC/MS]

1 はじめに

クロロフェノール類は，染料中間体，農薬原料，殺菌剤などとして，ブロモフェノールは消毒剤などとして使用されており，特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(PRTR法)の第二種指定化学物質に指定されている。

ハロゲン化フェノール類の分析は，従来からGC/MS法で行われてきた¹⁾が，極性が強いことからGC/MSでは高感度分析が困難であり，エチル化，トリメチルシリル化等の複雑な誘導体化操作を行った後，GC/MSで測定する方法が行われてきた。このため筆者らは，アルキルフェノールを誘導体化操作を省略してLC/MSで直接測定することを試み，水質について，クロロフェノール類3物質及びブロモフェノール類3物質を同時に分離分析する方法を確立したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

- 4-クロロフェノール-d 4：CDN社製(98%)
- 4-ブロモフェノール-d 4：CDN社製(98%)
- メタノール：LC/MS用
- 固相カートリッジ：Oasis HLB Plus (Waters社製)

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を下記に示す。

(LC条件I)

カラム：Atlantis T3 C18 3 μ m 2.1mm ϕ ×150mmL
(Waters社製)

移動相：A：水，B：メタノール

0～1min A：B=90：10

1～25min A：90→40 B：10→60 linear gradient

25～30min A：B=40：60

30～30.5min A：40→90 B：60→10 linear gradient

30.5～43min A：B=90：10

流量：0.2mL/min

カラム温度：40℃

注入量：10 μ L

(LC条件II)

カラム：XBridge C18 3.5 μ m 2.1mm ϕ ×150mmL
(Waters社製)

移動相：A：0.001%アンモニア水，B：0.001%アンモニア/アセトニトリル

0～1min A：B=80：20

1～15min A：80→20 B：20→80 linear gradient

15～15.5min A：20→80 B：80→20 linear gradient

15.5～28min A：B=80：20

流量，カラム温度，注入量：LC条件Iと同一

(MS条件)

使用機種：Micromass Quattro micro API

Cone：30V, SourceTemp：100℃, DesolvationGas：

700L/hr, ConeGas：50L/hr,

DesolvationTemp：400℃, Capillary：3kV,

APCI ProbeTemp：200℃, Corona:5μA

イオン化法：ESI Negative及びAPCI Negative

モニターイオン：

クロロフェノール 127 (M-H)⁻, 129 (確認用)

ブロモフェノール 171 (M-H)⁻, 173 (確認用)

4-クロロフェノール-d4 131 (M-H)⁻

4-ブロモフェノール-d4 175 (M-H)⁻

2.3 分析方法

図1に示す分析方法について検討した。その詳細は次のとおりである。

アスコルビン酸が添加された試料500mLにサロゲート溶液(1μg/mL,メタノール)を10μL添加し十分に混和した後,10mLのメタノールと20mLの精製水でコンディショニングした固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に10mL/min.で通水した。通水終了後の固相カートリッジに精製水15mLを通して洗浄した後,窒素ガスを5分間通気して間隙水を除き,メタノール5mLを用いて溶出した。溶出液は40℃以下で窒素ガスを吹き付けて濃縮した後,メタノール/水(1:1 v/v)で1mLに定容し,測定用試料液とした。

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 測定法の検討

測定法についてはSRM(MS/MS)測定も検討したが,SRM測定では対象物質のプロダクトイオンの強度が弱く高感度分析が不可能であったことから,イオン強度が強くS/N比の良い測定が可能なSIM(シングルMS)測定を採用した。

3.1.2 イオン化法の検討

対象6物質を同時分析することを目的にイオン化条件を検討したが,ESI法では図2に示すようにNegativeモードで2-クロロフェノール及び2-ブロモフェノールのピークを検出できないことが判明した。そこで,ESI法よりも中極性の物質に対するイオン化能力が高いAPCI法によるイオン化を行ったところ,

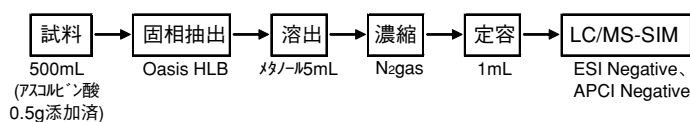


図1 分析フロー図

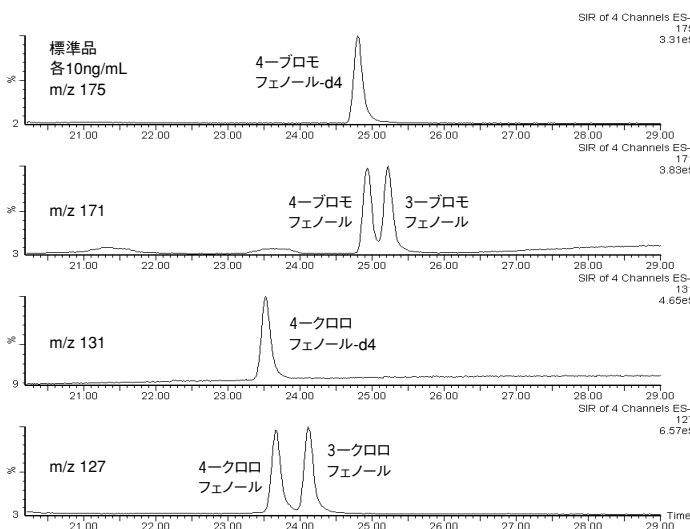


図2 標準品のクロマトグラム (ESI Negative、Atlantis T3 C18)

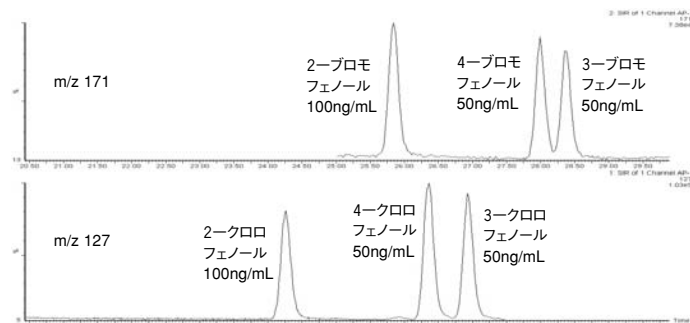


図3 標準品のクロマトグラム (APCI Negative、Atlantis T3 C18)

図3のように2-クロロフェノール及び2-ブロモフェノールが測定できるようになった。

ESI法とAPCI法の感度を比較すると,2-体以外の4物質はESI法の方が感度が良かったため,2-クロロフェノール及び2-ブロモフェノールについては,ESI法のイオン化プローブを装着した状態でAPCI法と同様の化学イオン化をESI法と同時に与えるESCI法での分析を検討した。環境試料(瀬戸内海,岡山県水島沖)をESCI法で測定した結果を図4-1に示したが,ESCI法では海水無添加試料から2-クロロフェノールと考えられるピークが検出されたが,APCI法で測定した場合には図4-2に示すように当該ピークは検出されず,ESCI法で検出されたピークは2-クロロフェノールとは異なる妨害ピークであり,APCI法が選択性の面

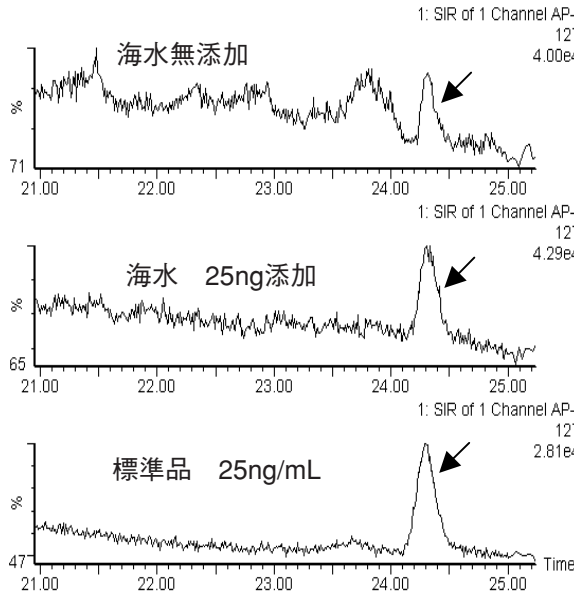


図4-1 海水のクロマトグラム
(2-クロロフェノール (ESCI))

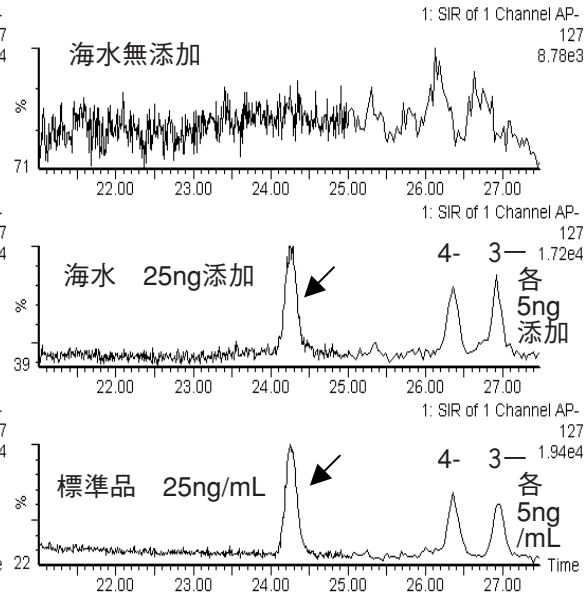


図4-2 海水のクロマトグラム
(2-クロロフェノール (APCI))

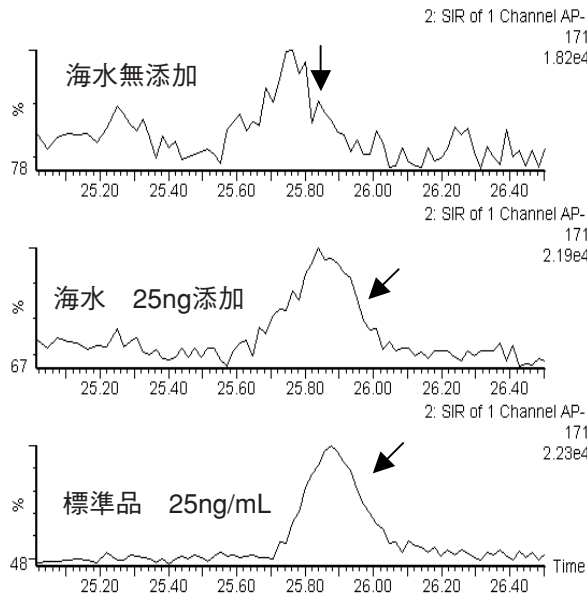


図4-3 海水のクロマトグラム
(2-ブロモフェノール (ESCI))

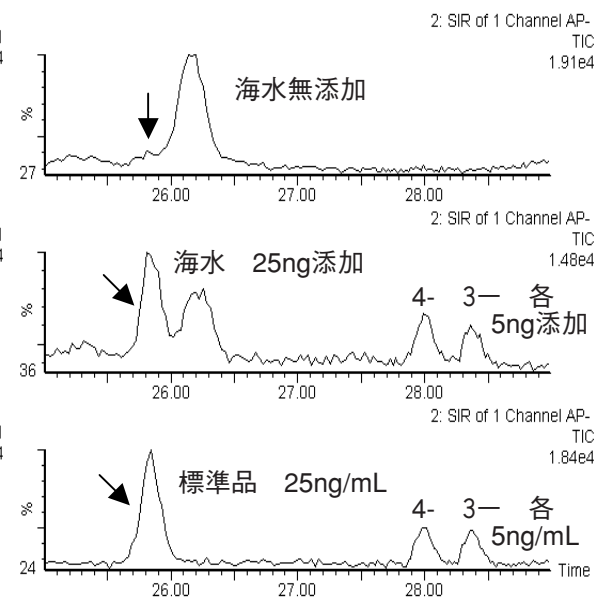


図4-4 海水のクロマトグラム
(2-ブロモフェノール (APCI))

で優れていることが判明した。また、2-ブロモフェノールについても、APCI法が明瞭なピークを与え(図4-3、図4-4)、3及び4-体のハロゲン化フェノール類についてはESI法が良好なクロマトグラム(図4-5、図4-6)を示した。

3.1.3 HPLCカラムと分離条件の検討

対象物質はそれぞれ3種類の異性体を有し、各異性体は測定イオンが同一であるため、液体クロマトグラ

ムでピークを相互分離する必要がある。

当センターでは、平成18年度に組成式が同一のアルキルフェノール類5物質分析法を開発し、HPLCで相互分離するための条件を報告した²⁾が、今回は、この検討結果を応用して、ODS(C18)系カラムのAtlantis T3 C18を用い、移動相を10%メタノールから60%メタノールまで24分間で緩やかにグラジエントする(LC条件I)ことによりピークを相互分離することができた

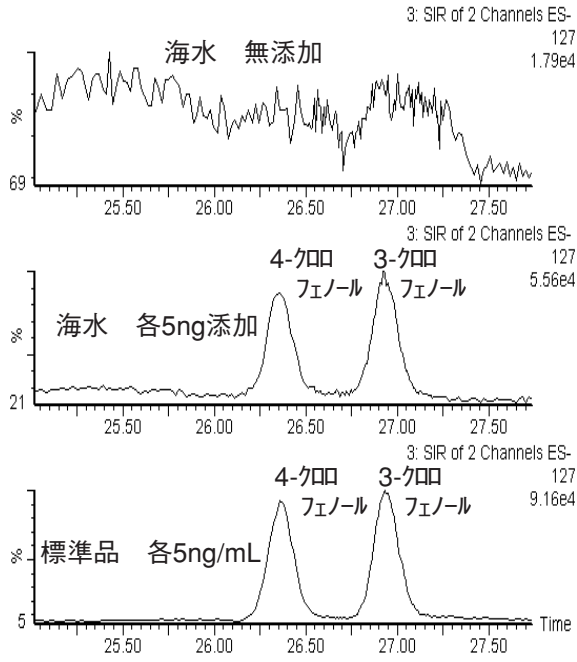


図4-5 海水のクロマトグラム
(3及び4-クロロフェノール (ESI))

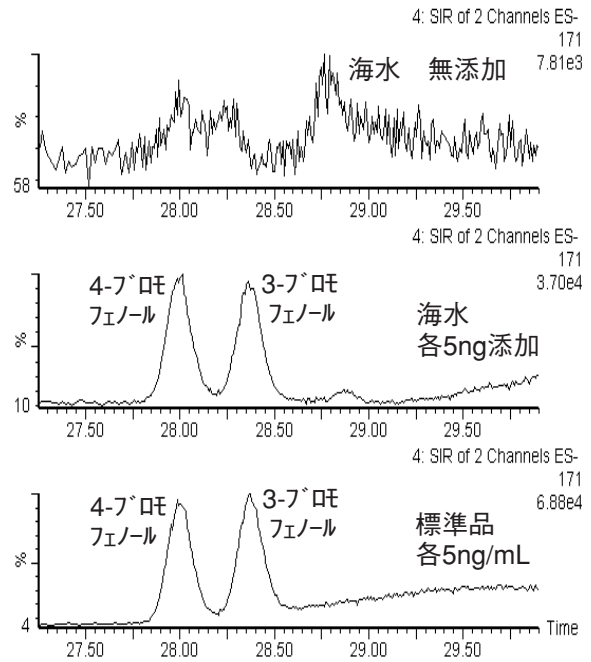


図4-6 海水のクロマトグラム
(3及び4-ブロモフェノール (ESI))

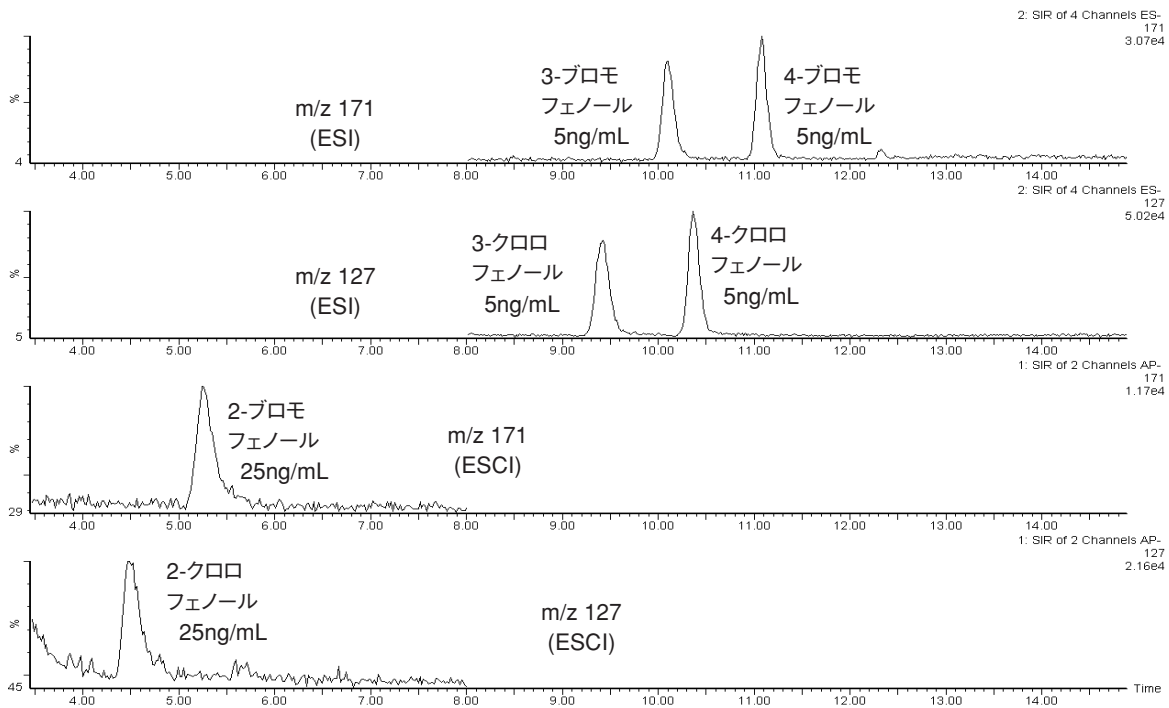


図5 XBridge C18 カラムにおける分離 (LC条件II)

(図2, 図3)。しかし, 本分析法はSRM法に比較して選択性が低いSIM法により測定するため妨害成分の影響が懸念されることから, ことなるHPLC分離条件の検討を行った。HPLCカラムにXBridge C18を用いて移動相をアンモニア水/アセトニトリル系にしたクロマ

トグラムを図5に示したが, XBridge C18は3-クロロフェノールと4-クロロフェノール及び3-ブロモフェノールと4-ブロモフェノールの保持時間がそれぞれ逆転し, 各ピーク間の距離も大きく離れることから, Atlantis T3 C18カラムで検出された場合の同定や, 夾

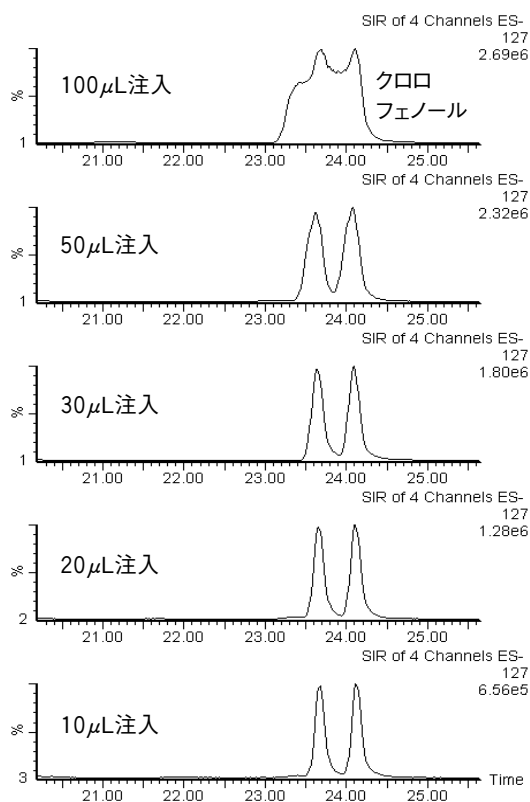


図6-1 注入量とピーク形状(クロロフェノール)
(50%メタノール/水の測定試料)

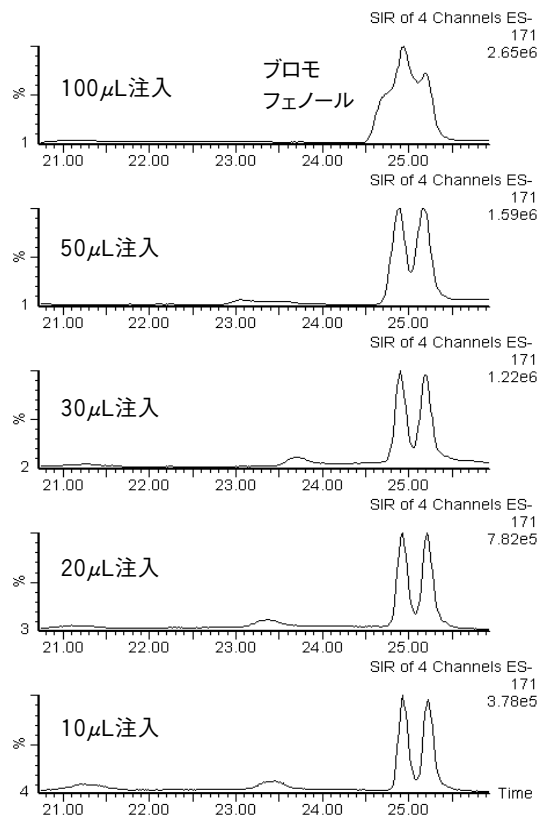


図6-2 注入量とピーク形状(ブロモフェノール)
(50%メタノール/水の測定試料)

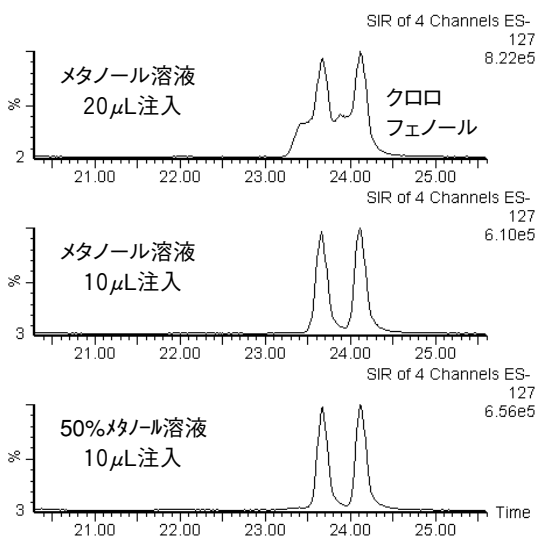


図6-3 注入溶媒の影響(メタノール)

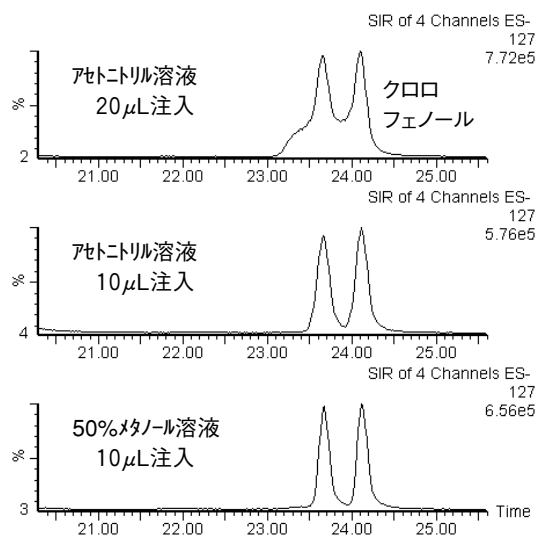


図6-4 注入溶媒の影響(アセトニトリル)

雑物のピークが現れた場合に効果的であると考えられる。なお、XBridgeは塩基性でも使用できるが、塩基性では使用できないカラムが多いことに注意する必要がある。

3.1.4 注入量等の検討

注入溶媒をメタノール/水(1:1 v/v)とした場合は、図6-1,6-2に示すとおり50 μLまで増やしてもややピー

クが広がるだけでピーク形状の変化は見られなかった。感度が必要な時には注入量を増加できることが確認された。しかし、対象物質はLCカラムとの相互作用がやや小さいため、100 μLではリーディングしてピーク形状が崩れた。

一方、注入液を純メタノール溶液や純アセトニトリル溶液にした場合は、注入量が10 μLまでは、ピーク

形状が崩れることはなかったが、注入量を20 μ Lにした場合はリーディングしてピーク形状が崩れた(図6-3,6-4)。

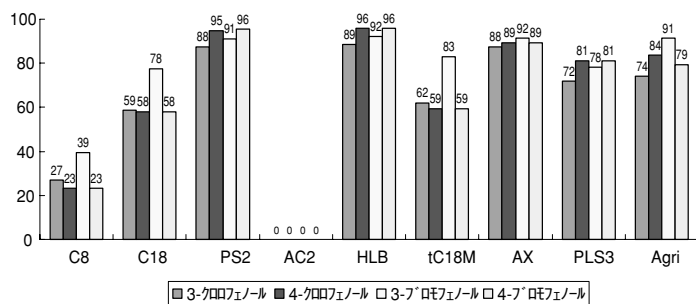


図7 固相カートリッジと回収率

表1 分解性スクリーニング試験

物質名	pH	1 初期濃度 (μ g/L)		5 日後の残存率 (%)	
		1	1時間後の残存率 (%)	暗所 (%)	明所 (%)
2-クロロフェノール	5	1	100	92	87
	7	1	100	100	96
	9	1	100	100	17
3-クロロフェノール	5	0.5	100	98	96
	7	0.5	100	98	98
	9	0.5	100	97	79
4-クロロフェノール	5	0.5	100	52	45
	7	0.5	100	56	91
	9	0.5	100	93	34
2-ブロモフェノール	5	1	100	90	86
	7	1	100	100	97
	9	1	100	100	12
3-ブロモフェノール	5	0.5	100	99	98
	7	0.5	100	99	98
	9	0.5	100	100	74
4-ブロモフェノール	5	0.5	100	55	53
	7	0.5	100	55	91
	9	0.5	100	100	42

表2 添加回収実験結果(海水)

試料名	物質名	分析法	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率 (%)
海水	2-Chlorophenol	APCI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	25	7	39	79	17	—
	3-Chlorophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	5	7	9.7	97	4.5	—
	4-Chlorophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	55
			500	5	7	10.2	102	4.2	55
	2-Bromophenol	APCI	500	無添加	2	3	—	—	—
			500	25	7	43	79	11	—
	3-Bromophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	5	7	10.2	102	4.7	—
	4-Bromophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	59
			500	5	7	10.1	101	4.7	58

3.2 固相抽出条件の検討

9種類の固相カートリッジカラムを用いて添加回収実験を行った。実験は精製水100mLに標準品各10ng添加して通水・脱水後、メタノール5mLで溶出を行い、更にアセトニトリル5mLで溶出した。

図7に示すとおり湿潤性逆相ポリマーであるOasis HLBが最も回収率が高く、ついでSep-Pak PS-2, Oasis MAX等が高い回収率を示した。なお、いずれの固相でもメタノール5mLで溶出し、アセトニトリル画分に溶出した物質はなかった。

3.3 分解性スクリーニング試験結果

環境水中における分解性を検討するため、分解性スクリーニング試験を行い、その

結果を表1に示した。特に4-クロロフェノール・4-ブロモフェノールにおいて、暗所でも分解性が確認されたので、水質試料の採取時にアスコルビン酸を添加することとした。

3.4 添加回収実験

低濃度回収実験の結果を表2～3に示した。

海水試料への添加回収(表2)では、3-クロロフェノール、4-クロロフェノール、3-ブロモフェノール、4-ブロモフェノールは、4-クロロフェノール-d4、4-ブロモフェノール-d4をサロゲートに用いた相対回収率で97～102%と100%に近い値となったが、2-クロロフェノール、2-ブロモフェノールは79%とやや低い値であった。また、サロゲートの回収率も55～59%とやや低い値であった。

河川水試料への添加回収(表3)では、いずれの物質も4-クロロフェノール-d4及び4-ブロモフェノール-d4をサロゲートに用いた相対回収率で97～108%と100%に近い値となり、サロゲ

表3 添加回収実験結果（河川水）

試料名	物質名	イオン化法	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	相対回収率 (%)
河川水	2-Chlorophenol	ESCI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	25	2	51	103	14	—
	3-Chlorophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	5	2	9.7	97	4.6	—
	4-Chlorophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	58
			500	5	2	9.8	98	3.8	59
	2-Bromophenol	ESCI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	25	2	54	108	8.4	—
	3-Bromophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	—
			500	5	2	9.8	98	5.7	—
	4-Bromophenol	ESI	500	無添加	2	ND	—	—	64
			500	5	2	9.8	98	6.0	63

表4 検出下限値及び定量下限

物質	イオン化法	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	検出下限値 (MDL)(ng/L)	定量下限値 (MQL)(ng/L)
2-Chlorophenol	APCI	500	1	26	68
3-Chlorophenol	ESI	500	1	1.7	4.4
4-Chlorophenol	ESI	500	1	1.7	4.3
2-Bromophenol	APCI	500	1	18	46
3-Bromophenol	ESI	500	1	1.9	4.8
4-Bromophenol	ESI	500	1	1.8	4.8

トの回収率も58～64%と海水よりやや高い値であった。

3.6 検出下限値

検出下限値を表4に示したが、2-クロロフェノール、2-ブロモフェノールを除き、2ng/L以下の検出下限値が得られ、高感度な測定が可能であった。

4 まとめ

モノハロゲン化フェノール類の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はSRM測定での感度が低く、SIM法で測定する必要があった。
- 2) 対象の6物質のうち3物質ずつが組成式が同一のアルキルフェノール類であり測定イオンが同一であるため、緩やかなグラジエントによりピークを相互分離した。
- 3) 2-クロロフェノール及び2-ブロモフェノールはESI法ではイオン化効率が低く測定できなかったが、APCI法またはESCI法では、他の異性体と同等のイオン化効率を示し、全異性体の同時分析が

可能であった。

- 4) 環境試料を分析した結果、ESCI法では2-クロロフェノールと誤認されるピークが確認されたが、APCI法では妨害は認められなかった。
- 5) 水質試料前処理は、湿潤性逆送ポリマーであるOasis HLB Plusが最も回収率が高かった。
- 6) 分解性スクリーニング試験において、暗所でも徐々に分解することが確認されたため、試料採取時にアスコルビン酸を添加して分解を抑制することとした。
- 7) 環境試料への添加回収試験では、感度が低い2-クロロフェノール及び2-ブロモフェノールの相対回収率がやや低下したが、その他の物質は100%に近い相対回収率を示した。

なお、本研究は環境省委託の平成19年度化学物質分析法開発調査（環境安全課）³⁾と連携して実施した。

文 献

- 1) 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）、参考法：アルキルフェノール類とビスフェノールAの分析法（エチル誘導体化法）、1998年10月
- 2) 浦山豊弘、劔持堅志、吉岡敏行、藤原博一、中桐基晴：LC/MSを用いた水質及び底質中アルキルフェノール類の分析法、岡山県環境保健センター年報31, 77-85, 2007
- 3) 環境省環境保健部環境安全課：平成19年度化学物質分析法開発調査報告書（2-クロロフェノール、3-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2-ブロモフェノール、3-ブロモフェノール、4-ブロモフェノール）、掲載予定、2008