

## 同位体標識ホルムアルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体の イオン化とフラグメンテーション及びそれを用いた液体クロマトグラフ タンデム質量分析計による環境分析

山本敦史、市原真紀子、寺尾知子

### Ionization and Fragmentation of 2,4-dinitrophenylhydrazine Derivative of Mass-labeled Formaldehyde and Environmental Analysis Using Liquid Chromatograph/tandem Mass Spectrometer

Atsushi YAMAMOTO, Makiko ICHIHARA and Tomoko TERAO

#### Abstract

A method of analyzing formaldehyde was developed using stable isotope labeled reagent. The reaction products derivatized using 2,4-dinitrophenylhydrazine could easily generate deprotonated molecules in electrospray ionization of liquid chromatograph/tandem mass spectrometer running in negative ion mode. The fragmentation pathway of unlabeled and labeled derivatives in collision induced dissociation was examined and optimal selection of selective reaction monitoring was determined. The derivatives generated were extracted by solid phase extraction. The validation of the analytical method was conducted with river water samples. The limit of detection estimated by analyses of samples fortified with formaldehyde was  $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Formaldehyde was detected in 17 out of 20 samples, with concentrations of 7.2 to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . No samples exceeded the guideline value.

**Keywords:** formaldehyde; dinitrophenylhydrazine; derivatization; river pollution

## I 緒言

ホルムアルデヒドは環境基本法における水生生物の保全に関して要監視項目として指針値が設定されている。その他にも水道法における水質基準を始め、建築基準法、有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律、食品衛生法の器具・容器包装の規格基準等多くの分野において基準値による規制の対象となっている。

ホルムアルデヒドの環境中への放出源は、メラミン系合成樹脂やポリアセタール樹脂や染料製造工場の排水等がある。ホルムアルデヒド自体の反応性は高く、環境中に放出されたホルムアルデヒドは速やかに分解すると考えられるが、一方で、飲料水においては処理原水中に含まれる有機物が塩素処理やオゾン処理によって分解されその一部がホルムアルデヒドとなることがある。本年5月にもメッキ事業者からの排

水処理を委託された産業廃棄物処理業者が、酸化処理によりホルムアルデヒドを生じる成分を含む排水を利根川水系に排出し、埼玉県や千葉県の浄水場では国の基準値である  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$  を超える恐れがあるとして一時取水停止の措置がとられた。化学物質排出把握管理促進法における PRTR 制度の集計結果によると、当該の物質は国内での排出量の約九割が今回のメッキ事業者からのものとなっており、同様な事例が大阪市の近隣で起ることは考えにくい。環境での規制に関しては、平成15年に水生生物の保全に係る環境基準に関してホルムアルデヒドは要監視項目とされ、最も厳しい河川及び湖沼における生物特Aの類型において指針値  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$  が定められている。ホルムアルデヒドは、分子が低分子であることや適切な発色団を持たないこと、反応性の高さ等の要因のためにそのまま分析することは困難である。液体試料、気体試料におけるアルデヒド、ケトン分析

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

にはヒドラジン系等の誘導体試薬を使用することが一般的であり、Vogel らが総説をまとめている[1]。環境分析に多く用いられている方法では、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) や O-(ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン (PFBOA) を用いる誘導体化法が知られている。これらの誘導体化試薬は、速やかな反応性や生成する誘導体の安定性が求められる。しかしながら分析対象としていないケトン、その他のアルデヒドも同様の誘導体化反応を起こすため、実験室で用いるアセトンによる汚染や、金属イオン等の夾雑成分が多く含まれる試料ではこれらの誘導体化反応の効率低下が起ることが知られている[2,3]ため、分析をする上での誘導体化の反応効率の再現性を維持するには十分な注意が必要である。正確な分析のためには内部標準物質を用い、反応効率の低下による感度の変化を補正することが有効であると考えられる。これまで分光学的検出器や、電子捕獲型検出器がホルムアルデヒド誘導体の検出に用いられてきたが、質量分析では安定同位体標識試薬を内部標準物質に用いることが可能である。現在では試薬メーカーからホルムアルデヒドの安定同位体標識試薬が市販されている。今回、安定同位体標識ホルムアルデヒドの誘導体化を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)、液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC/MS/MS) で検出する方法について検討したので報告する。

## II 実験

### 1) 試薬

$^{13}\text{C}$  と二つの  $^2\text{H}$  で標識された同位体標識ホルムアルデヒドは CIL 社製の標準を用いた。非標識体は和光純薬製のメタノール溶液を用いた。PFBOA は関東化学社製のものを用いた。DNPH はシグマアルドリッチ社から購入したものをアセトニトリルにて再結晶したものを用いた。アセトニトリル、メタノールは、残留農薬試験用のものを、ブランクの測定に用いる水は関東化学社製の金属分析用超純水を使用した。

### 2) 機器

GC/MS はアジレント社製 6890/5973 MSD を用いた。カラムはアジレント社製 DB-1 を用い、電子エネルギーを 70 eV とした電子イオン化による測定を行った。イオン源温度は 250°C、注入量は 2  $\mu\text{L}$  とした。LC/MS/MS はウォータース社製 Acquity UPLC/Xevo TQ を用いた。カラムはウォータース社製 Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) を用いた。移動相は 5 mM の酢酸アンモニウムを含む水とメタノールを用い、流量を 0.35 mL  $\text{min}^{-1}$  とするグラジエント分析を行った。イオン化にはネガティブイオンモードによるエレクトロスプレーイオン源を用いた。標識体、非標識体につ

いてそれぞれマススペクトルを取得し、開裂の解析を行ったのち、定量に用いる選択イオンモニタリング (SIM) ないし選択反応モニタリング (SRM) に用いるイオンの組合せを選択した。内部標準物質とのシグナル強度比により定量を行った。

### 3) 試料水の PFBOA による誘導体化

平成 15 年「水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について(通知)」の付表 2 に従い、試料水 50 mL を 100 mL 分液ろうとに測りとり、同位体標識もしくは非標識ホルムアルデヒドを 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ 、PFBOA は 0.06  $\text{mg mL}^{-1}$  となるように添加した。2 時間室温で静置した後、ヘキササン 2 mL、塩化ナトリウム 15 g、硫酸 (1+1) 0.8 mL を加えて 10 分間振とうし、酸を捨てた後 0.1 N 硫酸 2 mL で洗浄した。ヘキササン相を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水した試料を機器分析に供した。

### 4) 試料水の DNPH による誘導体化と固相抽出

試料水 15 mL を 20 mL 試験管に測りとり、同位体標識ホルムアルデヒドを 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  となるように添加した。誘導体化は Kieber らの報告[4]に基づき、DNPH 10 mg を濃塩酸/アセトニトリル/水 (2:1:5) 10 mL にこした誘導体化溶液を試料に 150  $\mu\text{L}$  添加し、混和し室温で 1 時間反応させた。生成した誘導体は予めメタノールと水でコンディショニングした Waters OASIS HLB カートリッジ (30 mg) にバキュームマニフォールドを用い減圧しながら通液することで抽出し、メタノール 1 mL で溶出させた。この溶出液を機器分析に供した。

### 5) ホルムアルデヒド標準、同位体標識ホルムアルデヒド添加時の添加方法による差異の検討

ホルムアルデヒドは単体では蒸気圧が 25°C で 517 kPa と揮発性物質であるが、一方でホルムアルデヒド水溶液からの揮散は殆どないことが知られている。今回の検討では誘導体化前のホルムアルデヒド添加はメタノール溶液を試料水に添加することで行った。添加する際、温度の違いとして室温での添加と氷浴で冷却しながらの添加、器具としてホールピペットまたはマイクロシリンジのそれぞれの方法によって溶液調製を行った。調製したホルムアルデヒド溶液についてそれぞれ同じ前処理を行い、調製方法による差異を確認した。

### 6) 同位体標識体共存時の誘導体生成の線形性の確認

定量は非標識誘導体と標識誘導体の感度比を用いて行うが、この感度比の非標識体濃度に対する線形性の確認を、濃縮後の非標識体濃度相当で 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ 、標識体濃度相当で 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  となるように各溶液を調製したものをを用いて行った。

## 7) 添加回収試験による分析法の妥当性の検討

実際の水質試料では標識誘導体の感度は等量添加しているにもかかわらず変動しており、特に平野川上流部等の有機物を多く含む試料では大きく感度が減少していた。Figure 1 の地点 4 から採取した河川水試料について  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  濃度が上昇するように非標識体の添加を行い、無添加の河川水試料との濃度差から回収率の確認を行った。

## 8) 水質試料の採取と環境分析

2010 年 7 月 27 日および 28 日に Figure 1 に示す地点で採水を行った。研究所に搬入後速やかに確立した方法を用い前処理を行い、測定を行った。

## III 結果と考察

## 1) ホルムアルデヒド誘導体のイオン化とフラグメンテーション

PFBOA を用いた非標識誘導体の GC/MS における電子イオン化マスペクトルを Figure 2 に示した。基準ピークとして  $m/z$  181 のイオンが見られ、これはペンタフルオロベンジル基に由来するイオンと考えられた。他のイオンは  $m/z$  181 に比較して強度が 1/10 以下であり、 $m/z$  181 以外のイオンを定量に用いることは好ましくないと考えられた。標識誘導体が電子イオン化でイオン化する際も同様にペンタフルオロベンジル基に由来する  $m/z$  181 のイオンが基準ピークとして得られ、非標識誘導体と標識誘導体を区別することはできなかった。また、LC/MS/MS におけるエレクトロスプレーイオン化及び、大気圧化学イオン化を用いてこの PFBOA 誘導体をイオン化することも試みたが定量分析に用いることができるイオンを得ることはできなかった。

一方、DNPH を用いた誘導体では LC/MS/MS におけるネガティブイオンモードにおけるエレクトロスプレーイオン化で基準ピークとして  $m/z$  209 の誘導体の脱プロトン化分子が得られた。同位体標識誘導体からも  $m/z$  212 の脱プロトン化分子が得られていることから、アミノ基のプロトンが脱離していると考えられた。このイオンをプレカーサーイオンとしたプロダクトイオンスペクトルを Figure 3 に示した。芳香族ニトロ基を含む化合物は複雑な転移反応を起こして開裂することが多い。 $m/z$  151, 179 のフラグメントイオンの生成機構としては Scheme 1, 2 のような機構が考えられる。一方で 133, 163 といったプロダクトイオンに関しては標識元素の数が 3 であるにもかかわらず、標識誘導体のプロダクトイオンでは  $m/z$  が 1 しか増えていないイオンが見られていた。フラグメンテーションの際に水素原子をやり取りすることで安定なイオンと中性分子の構造をつくることは知られている[5]が、 $^2\text{H}$  が選択的にこれらの反応に関与していることも考えられた。しかしながら、Figure 4 に

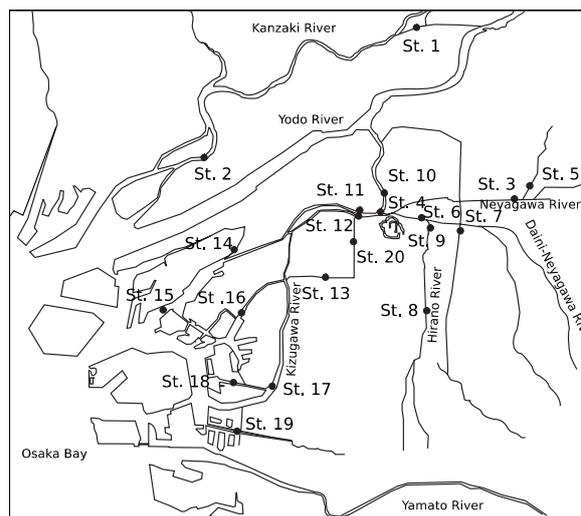


Figure 1 Sites of water sampling.

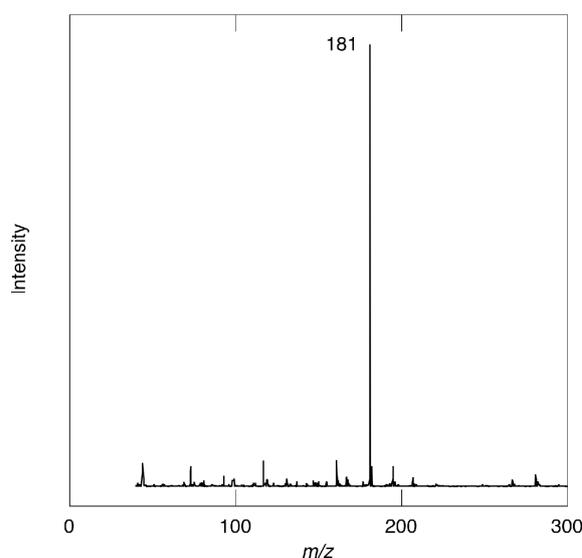


Figure 2 Mass spectrum of PFBOA-formaldehyde in the electron ionization.

示したようにこれらのイオンを SRM に指定した際の感度を比較した場合、予測されたフラグメンテーションの機構と一致していないものも見られたため、より複雑な芳香族ニトロ基特有の反応を起こしていることも考えられた。標識誘導体に関して、標識元素数の異なるプロダクトイオンが複数生成しているとすれば、いずれかの SRM を用いた分析ではその感度は非標識誘導体に比較して 1:1 で対応しないことになる。そのため定量に用いる SRM のプロダクトイオンには近傍にイオンが生成していない  $m/z$  46, 76 のイオンを用いることとした。定量にはプロダクトイオンに  $m/z$  46 を生じる SRM を用いた。 $m/z$  46 は  $\text{NO}_2^-$  と考えられるが 76 の生成機構は現段階では不明である。LC/MS/MS の最終的な測定条件を Table 1 に示した。

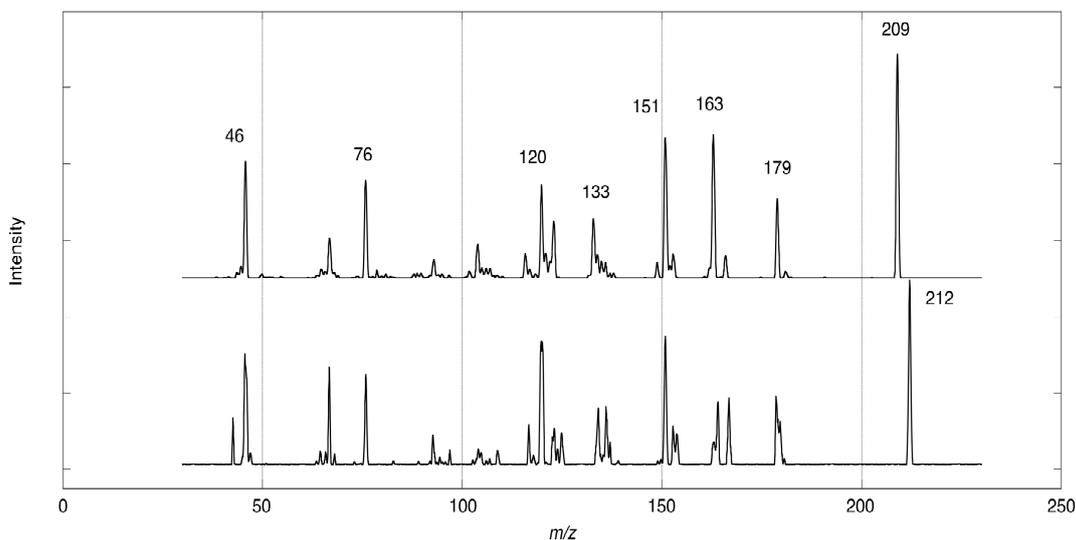
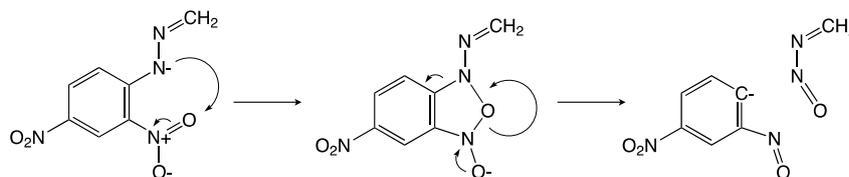
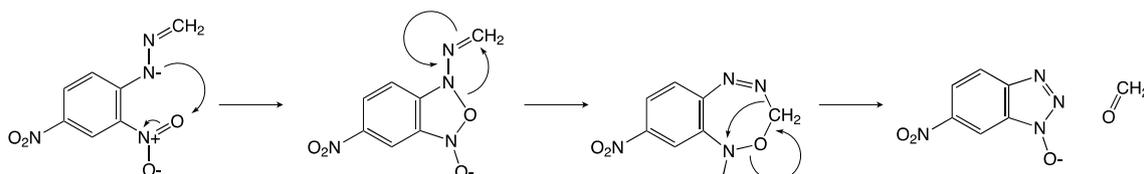


Figure 3 Product ion spectra of native (top) and labeled (bottom) DNPH-formaldehyde in the electrospray ionization.



Scheme 1 Suggested formation pathway of the fragment ion with an  $m/z$  of 151.



Scheme 2 Suggested formation pathway of the fragment ion with an  $m/z$  of 179.

## 2) ホルムアルデヒド標準、同位体標識ホルムアルデヒド添加時の添加方法による差異の検討

各添加方法を用いて前処理し生成した誘導体の LC/MS/MS 測定における感度を Table 2 に示した。各条件で差異は見られず、添加方法により揮発などの影響を受けることはないと考えられた。

## 3) 同位体標識体共存時の誘導体生成の線形性の確認

調製した非標識体濃度  $0-1000 \mu\text{g L}^{-1}$  と誘導体感度比の間で一次の回帰式の  $r^2$  は 0.9997 であり、良好な直線性が得られていると考えられた。

## 4) 添加回収試験による分析法の妥当性

非標識体添加試料と無添加試料の定量結果を Table 3 に示した。添加していない河川水試料からも平均で  $10.3 \mu\text{g L}^{-1}$  のホルムアルデヒドが検出されていた。もとも含まれていた量に比較して多い量が添加されたと考えられたが、回収率は 116 % とやや高めの数値となつ

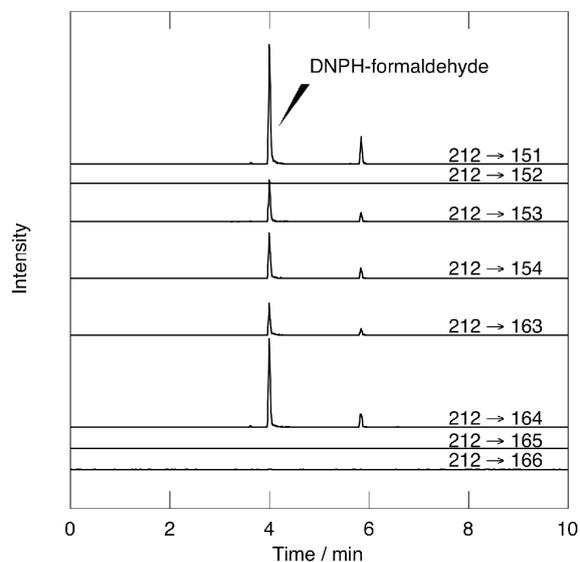


Figure 4 SRM chromatograms of labeled DNPH-formaldehyde of putative product ion and ions with adjacent  $m/z$  values.

**Table 1** The working parameters for mass spectrometer.

Capillary voltage / kV	3	Column	Acquity UPLC BEH Shield RP18 1.7 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 100 mm
Source temperature / $^{\circ}\text{C}$	150	Mobile phase	A: 5 mM $\text{CH}_3\text{COOH}$ $\text{H}_2\text{O}$ B: 5 mM $\text{CH}_3\text{COOH}$ MeOH
Desolvation gas temperature / $^{\circ}\text{C}$	400	Flow rate / $\text{mL min}^{-1}$	0.35
Desolvation gas flow / $\text{L h}^{-1}$	800	Gradient	A(60%) 0 min $\rightarrow$ (60%) 1 min $\rightarrow$ (0%) 7 min $\rightarrow$ (0%) 8 min $\rightarrow$ (60%) 8.1 min $\rightarrow$ (60%) 10 min
SRM	Cone voltage / V		Collision energy / eV
209.0 $\rightarrow$ 46.0	18		10
209.0 $\rightarrow$ 76.0	18		14
212.0 $\rightarrow$ 46.0	18		10
212.0 $\rightarrow$ 76.0	18		14

**Table 2** Peak intensity with different methods to add formaldehyde.

	Peak intensity		
	Syringe	Immersed volumetric pipette <sup>a</sup>	Volumetric pipette
Room temperature	2736	3047	2912
	2320	2764	2706
	2741	2793	2770
Ice bath	2510	2591	2628
	2976	2504	2737
	2754	2701	2575

<sup>a</sup> The tip of the pipette was immersed in the liquid.

た。添加試料の定量値の相対標準偏差は 1.5% と良好であった。 $\alpha = 0.01$ 、自由度 6 における Student の  $t$  値 3.143 と添加試料の定量値の標準偏差の積から求めた検出下限値は  $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$  であった。ホルムアルデヒド濃度の低い河川水を用い、より低い添加濃度で回収試験を行うことが可能であれば、より検出下限を低くできると考えられたが、今回はこの値を検出下限とした。定量下限以下の値となるが、今回のブランク値は上水試験方法において求められている  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  を超えており他の報告例[2]に比較して高いものであった。今後ブランクの低減の検討も含めてより正確な分析法としていく必要があると考えられた。

### 5) 河川中のホルムアルデヒド濃度

**Table 4** に採取した河川中のホルムアルデヒド濃度を示した。調査した 20 地点の内、17 地点で今回の定量下限値を上回り、濃度は  $7.2\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$  の範囲であった。類型指定のある地点において指針値を超過した地点はなかった。寝屋川水域の地点で若干高めの値となる傾向が見られた。PRTR 制度における 2010 年度集計

**Table 3** Concentration of unfortified and fortified river samples.

	Concentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Unfortified	Fortified
Blank	1.3	
1	12.0	45
2	11.6	44
3	10.6	45
4	11.1	45
5	9.1	46
6	7.5	46
7	10.5	45
Average	10.3	45
RSD <sup>a</sup> (%)	15	1.5
Recovery (%)		116

<sup>a</sup>RSD, relative standard deviation.

**Table 4** Concentration of formaldehyde in the aquatic environment.

Station #	Formaldehyde / $\mu\text{g L}^{-1}$	Station #	Formaldehyde / $\mu\text{g L}^{-1}$
1	(6.1) <sup>a</sup>	11	11
2	11	12	13
3	14	13	17
4	20	14	8.4
5	12	15	(6.7)
6	14	16	7.2
7	11	17	8.8
8	20	18	(7.1)
9	11	19	9.8
10	10	20	13

<sup>a</sup>braket, below the limit of quantitation.

結果では平野、放出、此花の各下水処理場に年間数トン程度排出している事業者が存在していた。

ホルムアルデヒドの生分解性は高いとされており下水処理においてもある程度除去されることが考えられる。しかしながらホルムアルデヒドに関しては届出外排出による寄与が届出排出量に対して、大阪府下で 96:4 と大きく見積もられており、調査した地点において届出外の排出源からの影響を受けている可能性もある。ホルムアルデヒドは公共用水域水質測定調査における測定の対象であり、今後も水環境中のホルムアルデヒド濃度の監視を継続していくことが必要と考えられた。

#### IV 結論

安定同位体標識試薬を用いたホルムアルデヒドの分析法の検討を行った。DNPH を用いた誘導体は LC/MS/MS において測定可能であり、同位体標識誘導体と非標識誘導体を分離することができた。標識誘導体と非標識誘導体の感度比と非標識体濃度の間には良好な線形性があった。生成した誘導体を固相抽出により抽出し LC/MS/MS によって分析する方法を確立し、添加回収試験で分析法の妥当性を評価した。検討した方法を用いて河川中のホルムアルデヒド濃度を測定したところ採水した 20 地点中 17 地点で定量下限値以上の値となり、濃度範囲は 7.2-20  $\mu\text{g L}^{-1}$  であった。

#### 参考文献

- 1) Vogel M, Büldt A, and Karst U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000; 366: 781-791.
- 2) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点 –ホルムアルデヒド(平成 20 年度)大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2000; 45: 40-49.
- 3) Lin YL, Wang PY, Hsieh LL, Ku KH, Yeh YT, and Wu CH. Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *J. Chromatogr. A* 2009; 1216: 6377-6381.
- 4) Kieber RJ and Mopper K. Determination of Picomolar Concentration of Carbonyl Compounds in Natural Waters, Including Seawater, by Liquid Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 1990; 24: 1477-1481.
- 5) 中田尚男. 有機偶数電子イオンのフラグメンテーションにおけるマスシフト則 日本質量分析学会誌 2002; 50: 173-188.