

2. 誘導体化-LC-ESI-MS/MS による フェノール類直接注入分析法の開発

山田 圭一
中野 耕太
今中 壮一

要旨： 告示法に定められた水道水中のフェノール類の分析法である固相抽出-誘導体化-GC-MS 法及び固相抽出-LC-MS 法では、濃縮操作が必要であるため採水する試料量が多くなり、LC-MS 法では大気圧化学イオン化 (APCI) 法のプローブを使用する必要がある等、分析操作の煩雑さや効率性に課題がある。そこで、本調査では濃縮操作を省略し、試料水に誘導体化試薬 DMT-MM を添加し誘導体化させたフェノール類をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によって分析する直接注入分析法について検討を行った。その結果、妥当性評価ガイドラインに示された性能パラメータの目標に適合したことから、本法はフェノール類の水道水質検査法として、適用可能であると考えられた。

1. はじめに

フェノールは防腐剤等に利用されている物質の一つであり、水道原水に混入した場合には消毒剤の塩素と反応して臭気発現物質であるクロロフェノール類を生成することが知られている。そのため、異臭味発生防止の観点からフェノール類は水質基準項目として基準値がフェノールの量に換算して 0.005 mg/L 以下と設定されており、フェノール、2-クロロフェノール (2-CP)、4-クロロフェノール (4-CP)、2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP)、2,6-ジクロロフェノール (2,6-DCP) 及び 2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) の 6 物質が測定対象物質として定められている。分析法については、厚生労働省大臣告示「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働省が定める方法」(以下、告示法) では固相抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) 法と固相抽出-液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) 法が示されている。しかしながら、これらの分析法では濃縮操作が必要であるため、500 mL 以上の試料を採水する必要があり、採水業務及び前処理操作に非常に大きな労力を要している。また、近年のヘリウムガスの供給不足や価格高騰からヘリウムガスに依存しない分析法の検討も求められている。さらに、LC-MS を用いた分析の多くはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用しているが、フェノール類の固相抽出-LC-MS 法では大気圧化学イオン化 (APCI) 法を採用しているため、APCI プローブ等を交換する作業が必要となり、作業効率の低下も課題である。このため、近年、ESI 法によるフェノール類の分析法が検討されており、移動相にフッ化アンモニウムを添加することで検出感度を向上させた例¹⁾や、ダンシルクロリドを誘導体化試薬として用いた直接注入による LC-ESI-MS/MS 分析法²⁾が報告されている。

そこで、本調査ではより簡易かつ汎用的にフェノール類の測定が行えるよう、これまでにシアン化物イオン³⁾や脂肪酸⁴⁾の分析に利用されている誘導体化試薬である 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (以下、DMT-MM) に着目し、DMT-MM によるフェノール類の誘導体化を経た直接分析法を検討した。DMT-MM によるフェノール類の誘導体化反応式を図-1 に示す。

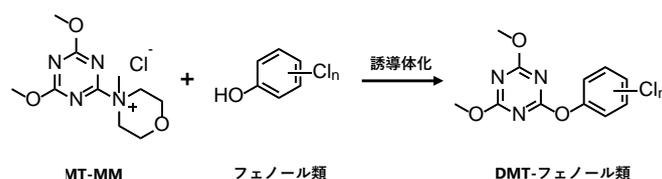


図-1 DMT-MM によるフェノール類の誘導体化反応式

2. 方法

2.1 試薬及び装置

標準試薬はフェノール類 6 種混合標準液 (関東化学製) を用いた。移動相の溶媒はメタノール (LC/MS 用、富士フィルム和光純薬製) を使用した。精製水は Merck 製の超純水製造装置 (Milli-Q Integral 10) で精製したものを使用した。0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液は 10 M 酢酸アンモニウム水溶液 (遺伝子工学研究用、富士フィルム和光純薬) を精製水で希釈して使用した。0.2% DMT-MM 溶液 (以下、DMT 化試薬) は DMT-MM (純度 > 95%、東京化成工業製) をメタノールに溶解させ調製した。0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) はリン酸水素二ナトリウム (無水) 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 (いずれも特級、富士フィルム和光純薬製) を精製水に溶解させ、調製した。2% 四ホウ酸ナトリウム水溶液は四ホウ酸ナトリウム十水和物 (特級、富士フィルム和光純薬製) を精製水に溶解させ調製した。2% リン酸水溶液は 85% リン酸 (特級、富士フィルム和光純薬製) を精製水で希釈し調製した。水質検査法への適用可能性

を評価するための分析装置として、液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計（以下、LC-MS/MS）を使用した。詳細な分析条件を表-1に示す。

表-1 液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計の分析条件

LC条件 (Nexera X2: 島津製作所)				
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 Column 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm			
移動相	メタノール / 0.5 mM酢酸アンモニウム水溶液			
グラジエント条件 (メタノール比率 / 保持時間)	30% (0 min) → 30% (1 min) → 95% (7 min) → 95% (10 min) → 30% (10 min) → 30% (15 min)			
注入量	10 μL			
カラム温度	40 °C			
流速	0.3 mL/min			
MS条件 (LCMS8060: 島津製作所)				
インターフェイス	ESI (positive)			
インターフェイス電圧	2.0 kV			
インターフェイス温度	300 °C			
ネプライザーガス流量	2.0 L/min			
ドライイングガス流量	10 L/min			
ヒーティングガス流量	10 L/min			
DL温度	250 °C			
ヒートブロック温度	400 °C			
コンバージョンダイノード電圧	10 kV			
CIDガス圧力	210 kPa			
MRM条件				
物質名	定量イオン	CE (eV)	確認イオン	CE (eV)
フェノール	234.10 > 134.06	-18	234.10 > 119.04	-5
2-CP	268.05 > 168.02	-18	268.05 > 153.00	-26
4-CP	268.05 > 168.02	-19	268.05 > 153.00	-27
2,4-DCP	302.01 > 201.98	-21	304.01 > 204.00	-23
2,6-DCP	302.01 > 201.98	-21	304.01 > 204.00	-22
TCP	335.97 > 194.92	-29	337.97 > 196.91	-27

表-2 検討した誘導体化処理の条件

番号	誘導体化手順							
①	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	→	室温下 1時間静置				
②	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	→	50 °C 1時間静置				
③	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	2%四ホウ酸 ナトリウム(2 mL)添加	→	室温下 1時間静置	→ 2%りん酸(1 mL) 添加		
④	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	2%四ホウ酸 ナトリウム(2 mL)添加	→	50 °C 1時間静置	→ 2%りん酸(1 mL) 添加		
⑤	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	2%りん酸(1 mL)添加	→	50 °C 1時間静置			
⑥	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	→	→	50 °C 1時間静置	→ 2%四ホウ酸 ナトリウム(2 mL)添加	→ 室温下 1時間静置	→ 2%りん酸(1 mL) 添加
⑦	0.1%DMT化試薬 (2 mL)添加	→	0.5 Mりん酸緩衝液 (pH 6.2, 0.2 mL)添加	→	50 °C 1時間静置	→ 2%四ホウ酸 ナトリウム(2 mL)添加	→ 室温下 1時間静置	→ 2%りん酸(1 mL) 添加

2. 2 添加回収試料の調製

添加回収試験に用いた水道水と原水は、本市柴島浄水場下系浄水及び柴島浄水場において取水している淀川表流水を使用した。また、水道水については、事前に0.3%チオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて脱塩素した後、標準物質を添加した。

2. 3 DMT-誘導体化フェノール類の化学構造の確認

DMT-誘導体化フェノール類の化学構造を確認するため、フェノール類の各濃度が10 μg/Lとなるよう精製水で調製した混合標準液1 mLに対して、0.1%DMT化試薬を0.1 mL添加し、室温下（約20 °C、以下全て同様）で1時間静置したものを測定した。高分解能液体クロマトグラフ質量分析計（以下、LC-HRMS）は、既報⁵⁾に示した分析条件に従い、スキャン分析及びData dependent MSMS (ddMS2)分析を行い、フラグメントイオンサーチ (FISH) によりプロダクトイオンを確認した。

2. 4 誘導体化処理条件の検討

誘導体化処理の条件の検討を行うため、LC-MS/MSを用いて表-1に示した分析条件に従い分析した。加熱または酸塩基の添加の検討では、フェノール類の各濃度が5 $\mu\text{g/L}$ となるよう精製水で調製したフェノール類混合標準液20 mLを用い、加熱条件または酸塩基の添加によって誘導体化効率がどのように変動するかを調べるため、表-2の条件①～⑥について検討を行った。また、緩衝液の添加の検討では、フェノール類の各濃度が5 $\mu\text{g/L}$ となるよう精製水または水道水で調製したフェノール類混合標準液20 mLを用い、表-2の条件⑥または⑦で前処理を行ったものを測定試料とした。

2. 5 反応時間の検討

フェノール類の各濃度が5 $\mu\text{g/L}$ となるよう精製水で調製したフェノール類混合標準液20 mLを用い、表-2の条件⑦に示した加熱工程の反応時間について経時変化を調べた。

2. 6 保存条件の検討

試料の保存条件を検討するために、フェノール類の各濃度が0.5 $\mu\text{g/L}$ となるよう水道水または原水で調製した添加試料20 mLに対して2 mLのメタノールを添加した試料と添加していない試料をそれぞれ遮光下20 $^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽で120時間保存した後、表-2の条件⑦に示した前処理法で誘導体化処理を行い、表-1に示した分析条件に従ってトリプル四重極型質量分析計を用いて回収率を算出した。なお、メタノールを添加していない試料については、120時間保存後に2 mLのメタノールを添加し、誘導体化処理時のメタノールの含有量が同一となるようにした。

2. 7 標準作業手順書 (SOP)

2. 7. 1 溶液の調製

- (1) 0.3%チオ硫酸ナトリウム水溶液チオ硫酸ナトリウム0.3 gを精製水に溶解させ、全量を100 mLとしたもの
- (2) 0.2%DMT 化試薬 DMT-MM 0.1 gをメタノールに溶解させ、全量を50 mLとしたもの
- (3) 0.5 Mリン酸緩衝液 (pH6.2) リン酸水素二ナトリウム (無水) 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物を精製水に溶解させ、モル濃度0.5 M、pH6.2になるよう調製したもの
- (4) 2%四ホウ酸ナトリウム水溶液四ホウ酸ナトリウム十水和物3.8 gを精製水に溶解させ、全量を100 mLとしたもの
- (5) 2%リン酸水溶液85%リン酸2 mLを精製水で希釈し、全量を100 mLとしたもの
- (6) 1mg/Lフェノール類混合標準液市販の1mg/mLフェノール類混合標準原液 100 μL をメタノールで希釈し、全量を100 mLとしたもの。

2. 7. 2 試料の採取及び保存方法

ガラス製25 mL比色管に試料水を満水にし、採水した後、残留塩素が含まれている場合は、直ちに0.3%チオ硫酸ナトリウム水溶液を30 μL 添加する。次に、試料を20 mLまで減らし、メタノール2 mLを添加した後、冷暗所で保存し72時間以内に試験する。

2. 7. 3 前処理方法

メタノール添加後の試料に対して、0.5 Mリン酸緩衝液 (pH6.2) 0.2 mL、0.2%DMT 化試薬1 mLを順次加え、栓で蓋をして混合した後、50 $^{\circ}\text{C}$ で1時間加熱する。放冷後、2%四ホウ酸ナトリウム水溶液を2 mL加え混合し、室温で2分間静置した後、2%リン酸水溶液を1 mL加え、混合する。一定量をLC-MSバイアルに採り、試験溶液とする。濁質のある試料についてはスピッツ管に分注し3,000rpmで20分間、遠心分離を行った後に上清をLC-MSバイアルに採り、試験溶液とする。

2. 7. 4 検量線の作成

標準試料の作成には100 mLのメスフラスコを用い、1mg/Lフェノール類混合標準液を精製水で希釈し、各濃度が0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/L}$ となるよう調製する。

2. 7. 5 分析条件

LC-MS/MSを使用し、表-1に示した分析条件に従い分析を行う。

3. 結果と考察

3. 1 誘導体化試薬の検討

トリメチルシリル化試薬に代表される一般的な誘導体化試薬は測定対象物質との反応性が高い一方で、水と反応しやすい性質を有するため、測定対象物質を固相抽出又は溶媒抽出によって有機溶媒へ転溶し、脱水操作の後に誘導体化を行うため、水分の除去や抽

出による濃縮操作には時間や労力を要する。このため、濃縮操作を経由せずかつ水分の除去を必要としない新たな誘導体化試薬を用いた分析法の確立が求められる。そこで本調査では、水中でも反応の阻害を受けにくく、選択性の高い誘導体化が可能である DMT-MM に着目した。DMT-MM はカルボン酸類⁴⁾ やシアン化物イオン、アジ化物イオン並びに硫化物イオン³⁾ の誘導体化分析法に適用できることが報告されており、これらの物質の酸乖離定数 (pKa) が概ね 4～9 の範囲にある。一方、フェノール類の pKa も 6～10 で近い範囲にあることから⁶⁾、水中で DMT-MM によるフェノール類の誘導体化が可能であると考えられたため、DMT-MM による誘導体化を経た直接注入分析法の検討を行うこととした DMT-MM による誘導体化が可能な物質及びフェノール類の pKa 値を図-2 に示す。

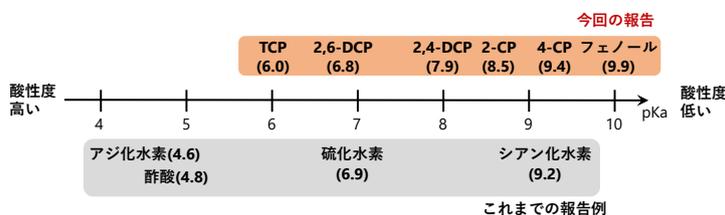


図-2 DMT-MM による誘導体化が可能な物質及びフェノール類の pKa 値

3. 2 DMT-誘導体化フェノール類の化学構造の確認

DMT-MM によって前処理を施したフェノール類混合標準液の検液を LC-HRMS によってスキャン分析を行い、誘導体化反応によって生成する誘導体の化学構造の確認を行った。LC-HRMS 測定によって得られた各誘導体のプロダクトイオン及びプリカーサーイオンの測定精密質量の m/z 及びイオン式を表-3 に示す。その結果、6 種の全てのフェノール類において、誘導体と推定されるプリカーサーイオンのピークが確認され、計算精密質量と測定精密質量は質量誤差 5 ppm 以下で一致した。次に、プロダクトイオンについても FISH により構造推定を行った結果、DMT-フェノール誘導体として妥当なフラグメントイオンが検出されているため、図-1 に示した誘導体化反応が進行していると考えられた。以上の結果より、DMT-MM を用いた誘導体化処理を経ることで LC-HRMS によるフェノール類の検出が可能であることが示されたため、LC-MS/MS による直接分析法の分析条件の最適化を行った。

表-3 各誘導体のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの測定精密質量及びイオン式

	プリカーサーイオン		プロダクトイオン	
	m/z	イオン式	m/z	イオン式
フェノール	234.0874	$[C_{11}H_{11}N_3O_3+H]^+$	134.0601 119.0366	$[C_8H_8NO]^+$ $[C_7H_5NO]^+$
2-CP	268.0483 270.0453	$[C_{11}H_{10}N_3O_3Cl+H]^+$	152.9976 168.0212 170.0181	$[C_7H_4NOCl]^+$ $[C_8H_7NOCl]^+$
4-CP	268.0481 270.0451	$[C_{11}H_{10}N_3O_3Cl+H]^+$	152.9977 168.0213 170.0181	$[C_7H_4NOCl]^+$ $[C_8H_7NOCl]^+$
2,4-DCP	302.0092 304.0062 306.0032	$[C_{11}H_9N_3O_3Cl_2+H]^+$	172.9669 174.9639 187.9665 189.9634 201.9822 203.9792	$[C_6H_3OCl_2]^+$ $[C_7H_4NOCl_2]^+$ $[C_8H_6NOCl_2]^+$
2,6-DCP	302.0092 304.0062 306.0032	$[C_{11}H_9N_3O_3Cl_2+H]^+$	172.9668 174.9639 187.9661 189.9635 201.9821 203.9793	$[C_6H_3OCl_2]^+$ $[C_7H_4NOCl_2]^+$ $[C_8H_6NOCl_2]^+$
TCP	335.9701 337.9671 339.9641	$[C_{11}H_8N_3O_3Cl_3+H]^+$	235.9429 237.9400 194.9168 196.9138	$[C_8H_5NOCl_3]^+$ $[C_6H_2OCl_3]^+$

3. 3 誘導体化条件の最適化

誘導体化試薬の DMT-MM はメタノールへの溶解性が高く、メタノール中で安定⁷⁾ であることから、DMT-MM 溶液をメタノールで調製している。このため、分析の移動相についても検液と同一の溶媒となるよう、有機溶媒系移動相はメタノールとした。また、水系移動相は分析感度が高く、安定的な保持時間を示した 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液とし、誘導体化条件の検討を行った。

3. 3. 1 加熱または酸塩基の添加

加熱または酸塩基の各条件における LC-MS 分析で得られた各物質の面積値を図-4 に示す。

酸塩基を添加せず、加熱による反応の促進を期待し、中性条件下の室温で反応させる条件①を 50 °C に変更した条件②で誘導体化を行った結果、条件①対比で 6 種全てのフェノール類の面積値が増加したことから、反応温度を高めることで誘導体化反応が促進されたと考えられた。

次に、pH の上昇によりフェノール類の酸素原子上の水素イオンが乖離することで反応が促進されることを期待し、2% 四ホウ酸ナトリウム水溶液を添加した結果、室温で反応を行った条件③及び加熱条件で反応を行った条件④の両条件下では、フェノール、2-CP、4-CP 及び 2,4-CP において、条件①、②対比で反応の促進効果が見られた。その一方で、2,6-DCP 及び TCP については誘導体化効率が大きく低下した。

また、酸を添加した条件⑤ではほとんど反応が進行しなかったが、これは pH の低下によりフェノール性ヒドロキシ基の水素イオンの乖離が抑制されたためと考えられた。

これらのことから、中性条件で加熱した条件②と、塩基を添加した条件③で誘導体化効率が向上する対象物質が異なることが分かった。条件②では 2,6-DCP 及び TCP の面積値が条件①対比で約 5 倍に増加しているため、フェノールの 2 位及び 6 位に塩素原子を有している物質は立体障害が大きく加熱が必要であったと考えられた。また、条件③ではフェノール、2-CP、4-CP 及び 2,4-CP の面積値が条件①対比で 4~67 倍に増加しており、これらの物質は図-2 で示した通り 6 種のフェノール類の中でも pKa 値が高いため、フェノールの酸素原子上の水素イオンを乖離させるために塩基の添加が必要であると考えられた。したがって、pKa 値が高い物質群と立体障害の大きい物質群の両者は誘導体化反応に適切な反応条件が異なっていると考えられた。このため、誘導体化処理の反応を 2 段階で行うことで 6 種のフェノール類の効率的な誘導体化が進行するのではないかと考えられたため、条件⑥に示す手順で誘導体化を行い、分析を行ったところ、6 物質間の面積値の偏りを最小に抑えられた。

これらの結果から、本分析法における誘導体化は条件⑥に示す 2 段階反応が最適であると考えられた。

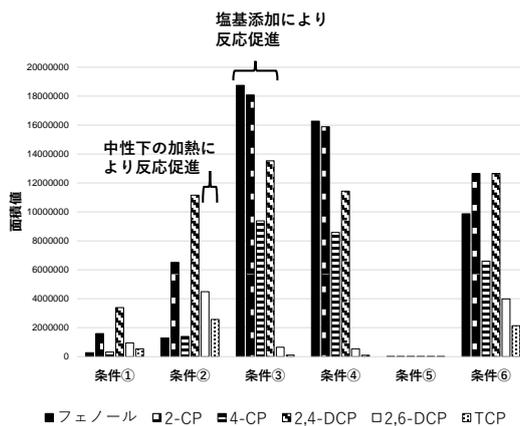


図-4 加熱または酸塩基添加条件の検討結果

3. 3. 2 緩衝液の添加

水道水試料における分析法の妥当性を評価するため、精製水および水道水に標準物質を添加した試料を条件⑥を用いて分析し、回収率を調査した。LC-MS 分析で得られた各物質の面積値を図-5 に示す。

表-2 に示す条件⑥の精製水と水道水の結果を比較すると、両者において面積値が大きく異なることがわかった。これは誘導体化反応の進行に伴い塩化水素が発生し、精製水には緩衝能がないため pH が低下するが、水道水は水道水中のアルカリ成分等の常在成分による緩衝能を有するため pH の低下が抑制され、水道水中の方が誘導体化効率が高くなったためであると考えられた。したがって、誘導体化反応の前に、リン酸緩衝液を添加し pH の低下を抑制することで、精製水及び水道水中の両者において効率的に反応が進行するのではないかと考え検討を行った。その結果、条件⑦に示す 0.5 M リン酸緩衝液 (pH6.2) を添加した際に精製水及び水道水中で面積値に大きな差は確認されなかったため、リン酸緩衝液の添加が必要になると考えられた。

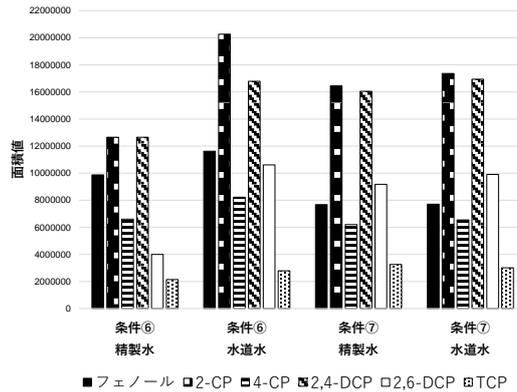


図-5 緩衝液添加条件の検討結果

3. 3. 3 反応時間

条件⑦の加熱工程について15分から75分で経時変化を調べた結果を図-6に示した。加熱による反応促進が期待される物質である2,6-DCP及びTCPについては、15分後から60分後までは時間の経過とともに面積値が増加したが、60分後と75分後では面積値に大きな差は見られなかった。したがって、分析作業時間の効率性や6種のフェノール類の面積値の推移等を考慮し、加熱工程の反応時間は60分が最適であると考えられた。次に、四ホウ酸ナトリウム水溶液を添加した後の室温反応の工程について、2分、5分、10分で経時変化を調べた結果、面積値の変動がほとんど確認されなかったことから、室温反応の工程は2分間で十分であると考えられた。

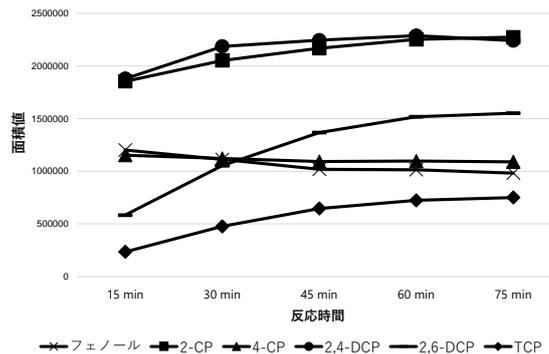


図-6 加熱工程の面積値の経時変化

3. 4 保存条件の検討

告示法に定められた分析法では、フェノール類の生分解を抑制⁸⁾するために、「速やかに試験できない場合は、試料1Lにつき硫酸銅(5水塩)1g及びリン酸(1+9)を加えてpH値を約4とし、冷暗所に保存し、72時間以内に試験する」ことが示されている。今回検討した誘導体化分析法では表-2の条件⑤及び図-4の条件⑤に示した通り、誘導体化前にリン酸を添加した際に誘導体化反応が阻害されることが確認されたため、リン酸を保存剤として使用した場合、誘導体化処理前にリン酸緩衝液を添加し再度中性に戻す作業が生じる。また、pH値を4にして保存した試料の場合には、リン酸緩衝液を大過剰量添加する必要がある。このため、告示法の硫酸銅塩及びリン酸水溶液を保存剤として添加する方法ではなく、pHが変動しない新たな保存剤について検討を行った。フェノール類の一種であるノニルフェノールについては硫酸銅以外の保存剤が検討されており、河川水試料にメタノールを保存剤として添加することで、ノニルフェノールが14日間安定であることが報告されている⁹⁾。したがって、フェノールやクロロフェノール類においても、メタノールに同様の保存剤としての効果が発現すると考えられたため、標準物質を添加した試料にメタノールを添加し、120時間経過後の試料を測定することでフェノール類の回収率を調査した。水道水または原水試料に標準物質を添加し120時間経過後の各物質の回収率を表-4に示す。

水道水ではメタノールの添加の有無に関わらず各物質が90%以上回収されたが、原水ではメタノールを添加していない試料でフェノール、2-CP、4-CPの回収率が8~48%まで大きく低下した。しかし、メタノールを添加した試料では各物質は87~98%の良好な回収率が得られており、メタノールの添加によりフェノール類の生分解が抑制されたと考えられた。したがって、メタノールの添加によって告示法で定められた72時間を超える120時間の保存時間でもフェノール類の分解が抑制されているため、メタノールがフェノール類の保存剤として適用可能であると考えられた。以上の結果より、未知試料については採水直後にメタノールを添加し冷暗所に

て保管し72時間以内に前処理及び分析を行い、標準試料については試料調製後にメタノールを添加し前処理及び分析を行うこととした。

表-4 保存時のメタノール添加の有無と回収率 (%) (n=1)

メタノールの添加	水道水		原水	
	無し	有り	無し	有り
フェノール	95	91	12	89
2-CP	98	98	48	97
4-CP	95	91	8	87
2,4-DCP	98	99	94	98
2,6-DCP	95	101	95	96
TCP	93	98	96	92

3. 5 妥当性評価

これまでの結果を基に、試料の採取及び保存方法、前処理方法、検量線の作成方法、分析条件について2.7 標準作業手順書(SOP)を作成し、厚生労働省が示した水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインに定められた妥当性評価を行った。検量線の濃度範囲については、2-CP、4-CP、2,4-DCP、2,6-DCP、TCPは0.1 µg/L~2.0 µg/Lとした。フェノールは空試験から0.1 µg/Lの1/3~1/10程度に相当する面積値のピークが検出されたため、定量下限濃度を0.2 µg/Lと設定し、検量線の濃度範囲は0.2 µg/L~5.0 µg/Lとした。各物質の検量線の定量下限濃度のクロマトグラムを図-7に示す。

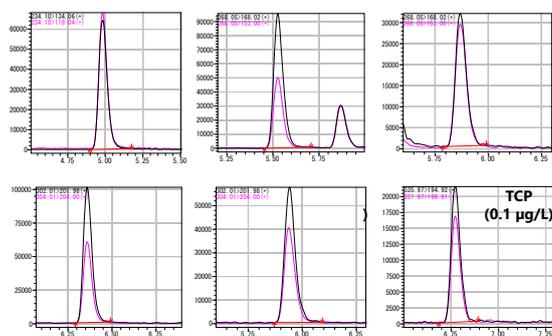


図-7 各物質の検量線の定量下限濃度のクロマトグラム

妥当性評価結果を表-5に示す。フェノール類の各物質の各検量点について検量線の評価(5併行)を行った結果、真度は98.6~102.9%、併行精度は0.3~5.7%であり妥当性評価ガイドラインが示す目標値の真度80~120%、併行精度20%以下を満たす結果が得られた。また、各物質の濃度が定量下限濃度となるよう水道水に添加した試料を用いて添加回収試験を行った。その結果、水質基準値の1/25~1/50の濃度において、併行精度0.9~5.8%、室内精度2.9~6.7%、真度100.6~104.2%であり、妥当性評価ガイドラインが示す目標値の併行精度20%以下、室内精度25%以下、真度70~130%を満たす結果が得られた。また、水道水添加試料のクロマトグラムを図-8に示すが、妨害ピーク等は見られず、選択性についても十分に確保できていると考えられた。以上の結果より、本分析法が水道水中のフェノール類の分析法として有効であることが示された。

ただし、告示法として採用にあたり、リン酸緩衝液の最適な添加量やメタノールの保存効果については水質の影響を大きく受けるため、今後はさらなる検討の余地があると考えられる。

表-5 妥当性評価結果

	検量線の評価 (n=5)		添加試料の評価 (n=5)			検量線濃度 範囲 (µg/L)
	真度 (%)	併行精度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	
フェノール	99.1~100.4	0.4~4.7	2.2	5.3	101.1	0.2~5.0
2-CP	98.9~101.8	0.6~5.7	1.2	6.7	103.6	0.1~2.0
4-CP	98.8~100.7	0.3~3.0	5.8	4.6	104.0	0.1~2.0
2,4-DCP	98.6~101.6	0.7~4.1	0.9	2.9	104.2	0.1~2.0
2,6-DCP	98.6~102.5	0.7~4.6	2.1	6.2	104.4	0.1~2.0
TCP	98.7~102.9	0.3~3.6	0.6	3.4	100.6	0.1~2.0
目標値	80~120	≤20	≤20	≤25	70~130	-

注：添加濃度はフェノールのみ0.2 µg/L、その他は0.1 µg/Lとした。

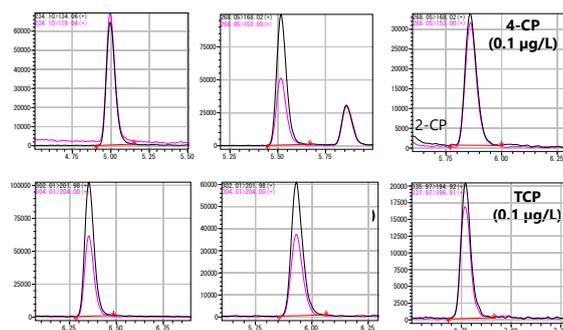


図-8 水道水添加試料のクロマトグラム

4. 結論

DMT-MM を誘導体化試薬として使用したフェノール類の LC-ESI-MS/MS 分析による直接注入分析法を検討した結果、次の知見が得られた。

- (1) フェノール類を DMT-MM で前処理をした試料を HRMS で分析することにより、DMT-フェノール誘導体が生成することが確認された。
- (2) 物質毎に誘導体化条件により反応速度は異なるが、2段階反応を経た誘導体化処理を行うことで、各フェノール類を効率的に誘導体化させることができた。
- (3) 試料の保存剤としてメタノールを添加することで、72 時間以上の保存時間でもフェノール類が分解することなく、回収されることを確認した。
- (4) 水道水にフェノール類を添加し、0.1 µg/L 又は 0.2 µg/L に調製した試料に対する妥当性評価を行った結果、妥当性評価ガイドラインが定めている性能パラメータを全ての項目で満たしていることを確認した。

現在、告示法ではフェノール類の分析法は固相抽出-誘導体化-GC-MS 法及び固相抽出-LC-MS (APCI) 法が定められているが、小規模な水道事業者では採水作業や固相抽出操作、APCI プローブの導入等、フェノール類検査の負担が大きいと想定される。しかしながら、本論文で報告した誘導体化 LC-ESI-MS/MS 分析法では固相抽出が不要であるため採水量はわずか 25 mL と大幅に削減されているだけでなく、分析前処理操作も誘導体化試薬や緩衝液等の添加のみで簡略化されており、ESI プローブで測定が可能であることから、本法は、現行の水質検査で使用している分析機器の活用ができ、非常に簡便でかつ精度の高い分析法であると考えられた。

【参考文献】

- 1) 古川浩司、川口寿之、中澤智子、佐藤亮平、船坂鎌三、奥村明雄：固相抽出-LC/MS/MS-ESI 法による水道水中のフェノール類分析の検討、水道協会雑誌、91(1)、2-12 (2022)。
- 2) 岩間紀知、窪田吉洋、中村弘揮：ダンシルクロリド誘導体化-液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法による水道水中フェノール類の測定、環境科学会誌、35(2)、94-102 (2022)。
- 3) 掛橋秀直、志摩典明、鎌田寛恵、西岡裕、石川亜香里、浅井龍太郎、新田篤志、和田美暁、中野史保子、松田駿太郎、佐々木啓子、鎌田徹、三木昭宏、片木宗弘：ジメトキシトリアジン (DMT) 誘導体化によるシアン化物の新規分析法の開発、日本法科学技術学会誌、25(2)、141-150 (2020)。
- 4) 島津製作所：GC/MS による生体試料中の短鎖脂肪酸の分析、Application News No. M273。
- 5) 山田圭一、中野耕太、今中壮一：誘導体化ノンターゲットスクリーニング法を活用した水質異常原因物質の特定、水道協会雑誌、92(11)、2-13 (2023)。
- 6) 倉田泰人：環境におけるフェノール類の分析、埼玉県公害センター研究報告、19、1-32 (1992)。
- 7) Kunishima, M., Kawachi, C., Hioki, K., Terao, K., Tani, S.: For-mation of carboxamides by direct condensation of carboxylic ac-ids and amines in alcohols using a new alcohol and water-soluble condensing agent: DMT-MM, Tetrahedron, 57(8), 1551-1558 (2001)。
- 8) Carter, M. J., Huston, M. T.: Preservation of phenolic compounds in Wastewaters, Environ. Sci. Technol. 12(3), 309-313 (1978)。
- 9) 内藤宏孝：液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による水環境試料中のノニルフェノール関連物質の定量、愛知県環境調査センター所報、39、27-34 (2012)。

本報告は、水道協会雑誌にて報告したものである。

(山田圭一、中野耕太、今中壮一：誘導体化-LC-ESI-MS/MSによるフェノール類直接注入分析法の開発、水道協会雑誌、93(11)、2-11 (2024))