

<報 文>

要監視項目フェノールの測定について*

大 野 ちづ子**

キーワード ①フェノール ②固相抽出 ③GC/MS ④LC/MS/MS

要 旨

水生生物保全のために設定された要監視項目であるフェノールの測定について、公定法に記載された固相抽出法では、ブランクの関係から検出下限値が指針値の1/10を満たすことは不可能であるので、前処理法を改良してGC/MSで測定する方法を検討し、同時に水溶性の高い物質に汎用されているLC/MS/MS法での測定法についても検討を行い、両者におけるフェノールの測定の最適条件を検討した。

1. はじめに

水生生物保全の観点から、要監視項目として設定されたフェノールは、公定法ではジクロロメタンによる溶媒抽出法が採用され、GC/MSで測定することとなっている。

しかし、備考で溶媒抽出に代えて固相抽出を行うことができることもされている。ジクロロメタンは有害性があり、できる限り使用を控えたいので固相抽出を採用したいところであるが、公定法では固相抽出の条件等の記述が少なく、試料量は50 mlと非常に少量で、これだけの試料量では採取地点の試料の均一性を図るには不十分であり、またブランク値も高いことから、試料量を多くして検出下限値を下げる必要があり、試料量の再検討が必要である(環境省の化学物質分析法開発検討会では試料量は最低100mlは必要であるとの結論が出ている)。また、固相もどのような固相を使用するのが適切であるかの記載がなく、誘導体化する場合は確実にヘキサン転溶するために食塩は

必要であるが、誘導体化しない場合には unnecessaryな食塩の添加もされており、検出下限値も不明である。

そこで、公定法を改良した前処理法でのGC/MS測定法と、同じ前処理を行いLC/MS/MSで測定した場合を比較した結果を報告する。

2. 測定法の検討

2.1 装置条件

2.1.1 GC/MS

表1にGC/MSの測定条件を示す。

2.1.2 LC/MS/MS

表2にLC/MS/MSの測定条件を示す。

2.2 試薬、器具等

使用した試薬および器具

- ・フェノール：1 mg/ml 水溶液 関東化学(株)製
- ・フェノール-d₆：関東化学(株)製
- ・メタノール：LC/MS 用
- ・酢酸エチル：残留農薬試験用

*Study of analytical method for the determination of phenol in water samples as monitored substances for the conservation of aquatic life

**Chizuko OHNO (徳島県保健環境センター) Tokushima prefectural institute of public health and environmental sciences

- ・ 1 mol/L 塩酸：和光純薬(株)製容量分析用
- ・ 精製水：超純水製造システム(milliQ Gradient-A10, ミリポア製)により製造された水
- ・ コンセントレーター：Waters 社製 Concentrator Plus
- ・ 窒素ガス吹きつけ濃縮装置：DTU-1C タイテック(株)製
- ・ 目盛付濃縮管：GL-SPE 濃縮管透明テーパー 7 ml GL サイエンス(株)製
検討に使用した固相
- ・ Sep-Pak PS-2 Plus：Waters 製(PS-2 と省略)
- ・ Oasis HLB Plus：Waters 製(HLB と省略)
- ・ PS@Liq：昭和電工製(PS@Liq と省略)
- ・ EZ カートリッジ RP-1：住友 3M 社製(RP-1 と省略)
- ・ Aquisis PLS-3 カートリッジ：ジーエルサイエンス社製(PLS-3 と省略)

表 1 GC/MS 測定条件

Instrument	GC: Trace GC ultra MS: Trace DSQ	Thermo Fisher Scientific 社製
Column	DBVRX 60m, 0.25mm, 1.4μm	J&W Scientific 社製
Column temp.	40°C (1min)→190°C (5min) rate 5°C/min	
Flow rate	constant flow 1mL/min	
Inj. temp.	150°C	
Source temp.	200°C	
Monitor ion	Phenol (66) Phenol-d6 (99)	
Relative ion	Phenol (94) Phenol-d6 (71)	

表 2 LC/MS/MS 測定条件

Instrument	LC: Waters2695 MS/MS: Quattro Micro	Waters 社製 Micro Mass 社製
Column	Cadenza CD-C18 150mm, 2mm, 3μm	Imtakt 社製
Column temp.	40°C	
Mobile Phase	A: water B: methanol 0min : A=80 B=20 linear gradient 5-12min : A=20B=80 12-17min : A=80B=20	
Flow rate	0.2mL/min	
Capillary	3kV	
Cone	30eV	
Source temp.	100°C	
Desolvation temp.	300°C	
Desolvation gas	500L/hr	
Cone gas	50L/hr	
Phenol Q1>Q3	92.8>64.8	
Phenol-d6Q1>Q3	98>70	
Ionization	ESI-negative	

2.3 標準液の調製

2.3.1 検量線用標準液

フェノール標準液(1 mg/ml)をメタノールで段階的に希釈して0.05~2 μg/mlの検量線用標準液を作成する。各標準液には、サロゲート内標準溶液を0.1μg/mlとなるように添加する。

2.3.2 サロゲート内標準原液

フェノール-d₆を正確に10mg 精秤し、メタノールで100mlとする(100μg/ml)。

2.3.3 サロゲート内標準溶液

サロゲート内標準原液をメタノールで10倍に希釈し、10μg/mLのサロゲート内標準溶液とする。

2.4 検量線

検量線用標準液をGC/MS法は各2 μl, LC/MS/MS法は10μlを装置に注入し、対象物質のサロゲートに対する相対ピーク面積と濃度比から検量線を作成する(図1, 2)。

2.5 固相と通水条件の検討

ブランクが少なく、回収率が高い固相を選択するために、公定法どおりの方法で前処理し、ブランク試験を行い、精製水での添加回収試験を行った。

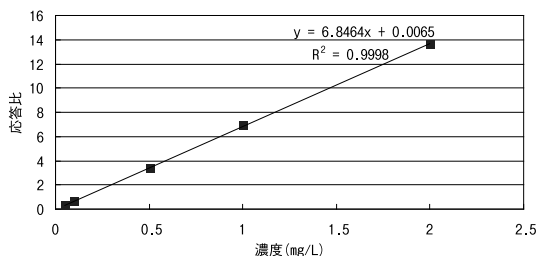


図 1 GC/MS 検量線の一例

Compound name : phenol
Correlation coefficient : r = 0.999986, r² = 0.999973
Calibration curve : 0.00706311 * x + -0.0236058
Response type : Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type : Linear, Origin : Exclude, Weighting : Null, Axis trans : None

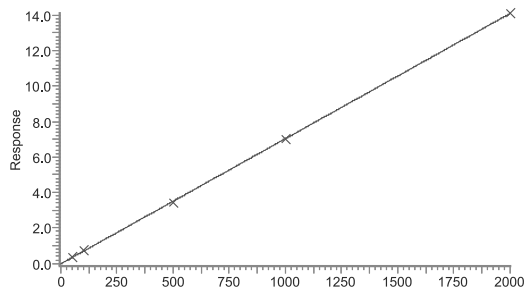


図 2 LC/MS/MS 検量線の一例

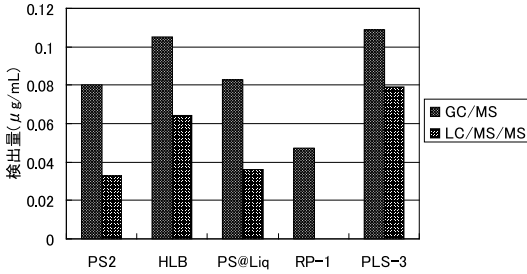


図3 各固相のブランク

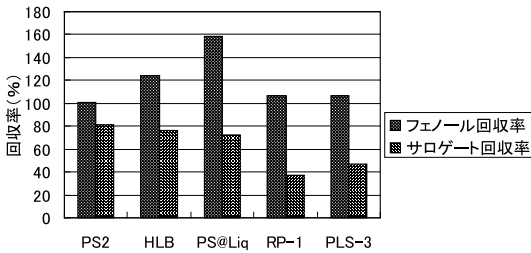


図4 GC/MSでのフェノール回収率とサロゲート回収率

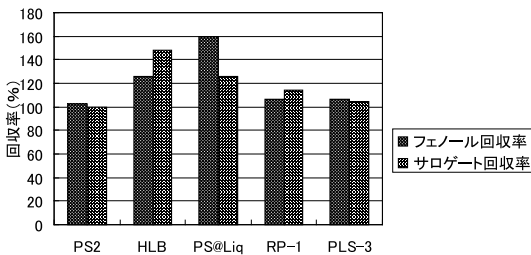


図5 LC/MS/MSでのフェノール回収率とサロゲート回収率

ブランク試験は、精製水50mlに食塩1gを添加し、1 mol/L塩酸でpHを3にし、サロゲート内標準溶液を10μl添加して公定法どおりに酢酸メチル、メタノール精製水で前処理した各固相に10ml/minで通水した。通水後、精製水10mlで固相を洗浄し、窒素ガスで乾燥し、メタノール2ml、酢酸エチル2mlでバックフラッシュ溶出を行い、窒素ガスで1mlに濃縮して試料液とした。添加回収試験は、精製水50mlにフェノールを0.5 μg添加し、後はブランク試験と同様の操作を行った。

2.5.1 ブランク試験結果

各固相のブランク試験の結果を図3に示す。

2.5.2 公定法どおりの前処理による精製水での回収結果

GC/MSとLC/MS/MSでのフェノール回収率と

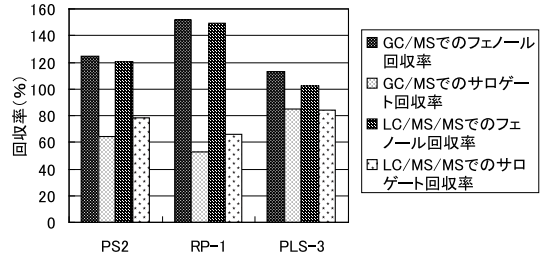


図6 食塩無添加, pH調整後通水した場合の回収率

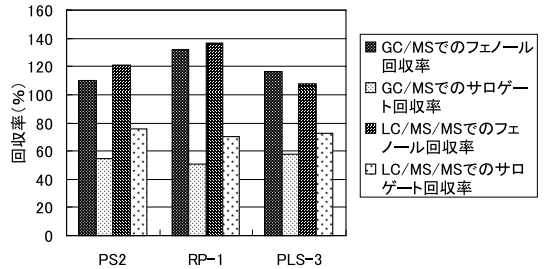


図7 食塩無添加, pH調整なしで通水した場合の回収率

サロゲート回収率を図4, 5に示す。

これらの結果から、ブランク値が低いのはRP-1であるが、GC/MSでのサロゲート回収率が悪かった。HLBとPS@Liqはフェノール、サロゲートともに回収率が100%を大きく超える場合があり、固相からの溶出も考えられたので、HLBとPS@Liqは固相の選択からはずした。

2.5.3 pH調整による回収率への影響

試料量を200mlとし、食塩の添加なしでpH3に調整して通水した場合と、pH調整しないで通水した場合の添加回収試験結果を図6, 7に示す。

この結果から、pH調整なしでは回収率が低下したので、フェノールの解離を抑えるためにpH3での通水は必要であるが、食塩を添加する必要はない。固相は、PLS-3がフェノール、サロゲートともに回収率がよく、RP-1はサロゲートの回収率が悪いためにフェノールの回収率が100%を大きく超えている。しかし、PLS-3は図3で示すようにブランク値がやや高いこともあり、今回固相としてPS-2を選択した。

2.6 IDL(装置検出下限値)測定

本来、IDLはS/Nが10程度の標準溶液を装置に注入して測定するが、GC/MSとLC/MS/MSでは感度が異なるので、感度が低いLC/MS/MSに合わせた検量線最低濃度(0.05μg/ml)を両者に注入し

表 3 GC/MS 測定 IDL

注入量 (μl)	2
注入液濃度	フェノール50ng/mL
1回目 (ng/ml)	64.9
2回目 (ng/ml)	62.7
3回目 (ng/ml)	59.7
4回目 (ng/ml)	59.7
5回目 (ng/ml)	60.6
6回目 (ng/ml)	59.1
7回目 (ng/ml)	60.4
n	7
平均	61.0
標準偏差 (ng/ml)	2.066
片側 t(n-1, 0.05)	1.943180274
IDL (ng/ml)	8.03
IQL (ng/ml)	20.7
試料量 (ml)	200
最終液量 (ml)	1
試料換算値 (μg/l)	0.0401

表 4 LC/MS/MS 測定 IDL

注入量 (μl)	10
注入液濃度	フェノール50ng/mL
1回目 (ng/ml)	48.0
2回目 (ng/ml)	50.0
3回目 (ng/ml)	52.7
4回目 (ng/ml)	52.5
5回目 (ng/ml)	48.4
6回目 (ng/ml)	52.8
7回目 (ng/ml)	50.5
n	7
平均	50.7
標準偏差 (ng/ml)	2.031
片側 t(n-1, 0.05)	1.943180274
IDL (ng/ml)	7.89
IQL (ng/ml)	20.3
試料量 (ml)	200
最終液量 (ml)	1
試料換算値 (μg/l)	0.0395

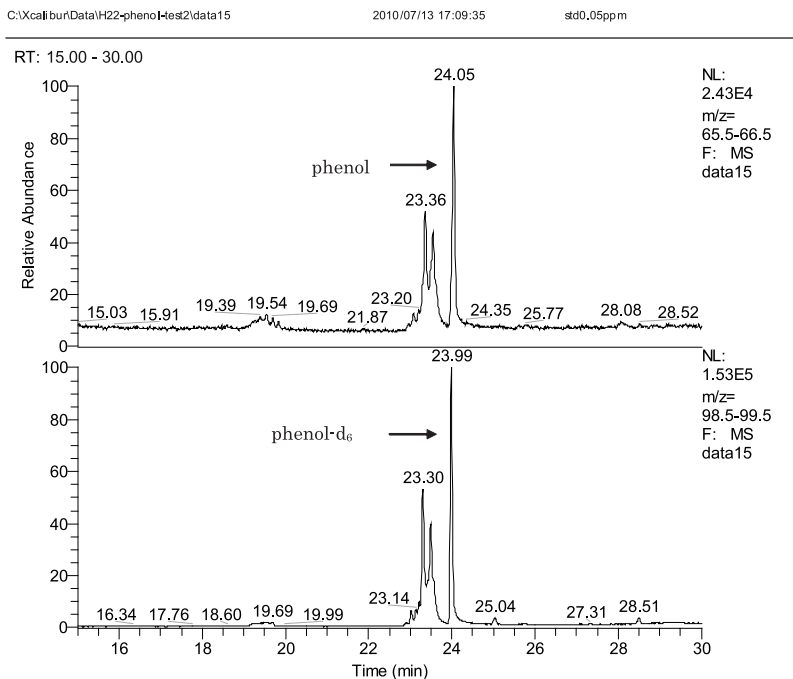


図 8 GC/MS IDL 測定 標準品(0.05 mg/L)クロマトグラム

てIDLを測定した(表 3, 4 および図 8, 9)。

この結果, GC/MS, LC/MS/MS の両者でIDLはほとんど同じであった。

2.7 MDL(測定法検出下限値)測定

図 10 の測定フローにより, B 類型の河川水200 ml にフェノールを0.5μg 添加しMDL測定を行った(表 5, 6 および図 11, 12)。ブランクが検出され

表5 GC/MS測定MDL,MQL

試料量	(ml)	200
標準添加量	(ng)	500
試料換算濃度	(ng/l)	2500
最終液量	(ml)	1
注入液濃度	(ng/ml)	500
装置注入量	(μ l)	2
装置ブランク①	(ng/ml)	80.0
無添加平均②	(ng/ml)	128.0
結果1	(ng/L)	2475.0
結果2	(ng/L)	2020.0
結果3	(ng/L)	1930.0
結果4	(ng/L)	1980.0
結果5	(ng/L)	2355.0
結果6	(ng/L)	2710.0
結果7	(ng/L)	1915.0
平均値	(ng/L)	2197.9
標準偏差		314.8
n=		7
片側t(n-1,0.05)=		1.943180
MDL	(ng/L)	1223
MQL	(ng/L)	3148
S/N		2011
CV%		14.3
フェノール回収率 (%)		87.9
サロゲート回収率 (%)		71.1

MDL=t(n-1, 0.05) * σ - 1 * 2
MQL= σ - 1 * 10

表6 LC/MS/MS測定MDL,MQL

試料量	(ml)	200
標準添加量	(ng)	500
試料換算濃度	(ng/l)	2500
最終液量	(ml)	1
注入液濃度	(ng/ml)	500
装置注入量	(μ l)	10
装置ブランク①	(ng/ml)	53.0
無添加平均②	(ng/ml)	115.0
結果1	(ng/L)	2800.0
結果2	(ng/L)	2155.0
結果3	(ng/L)	2075.0
結果4	(ng/L)	1955.0
結果5	(ng/L)	2305.0
結果6	(ng/L)	2610.0
結果7	(ng/L)	2000.0
平均値	(ng/L)	2271.4
標準偏差		321.7
n=		7
片側t(n-1,0.05)=		1.943180
MDL	(ng/L)	1250
MQL	(ng/L)	3217
S/N		51
CV%		14.2
フェノール回収率 (%)		90.9
サロゲート回収率 (%)		64.1

MDL=t(n-1, 0.05) * σ - 1 * 2
MQL= σ - 1 * 10

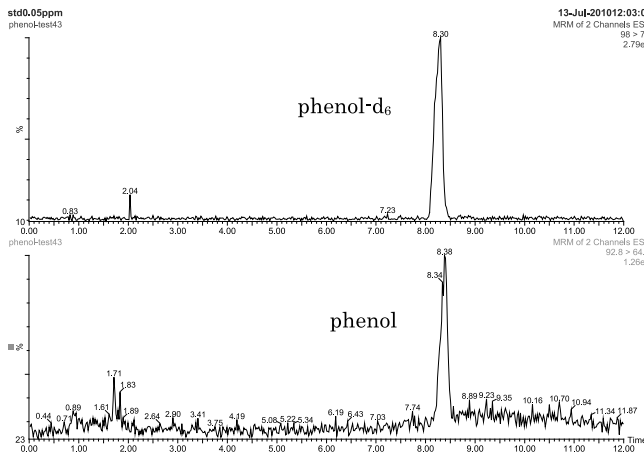


図9 LC/MS/MS IDL測定標準品(0.05 mg/L)クロマトグラム

たので試料量として200mlは必要であり、添加濃度もIDLの50倍程度とした。結果1～7の検出濃度は無添加平均を差し引いた濃度である)。

- ① 装置ブランク：試料マトリックスのみがない状態で、他は同様の操作を行い測定した値
- ② 無添加平均：MDL算出用試料に標準を添

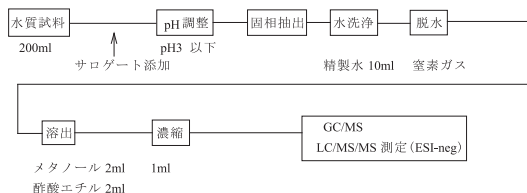


図10 測定フロー

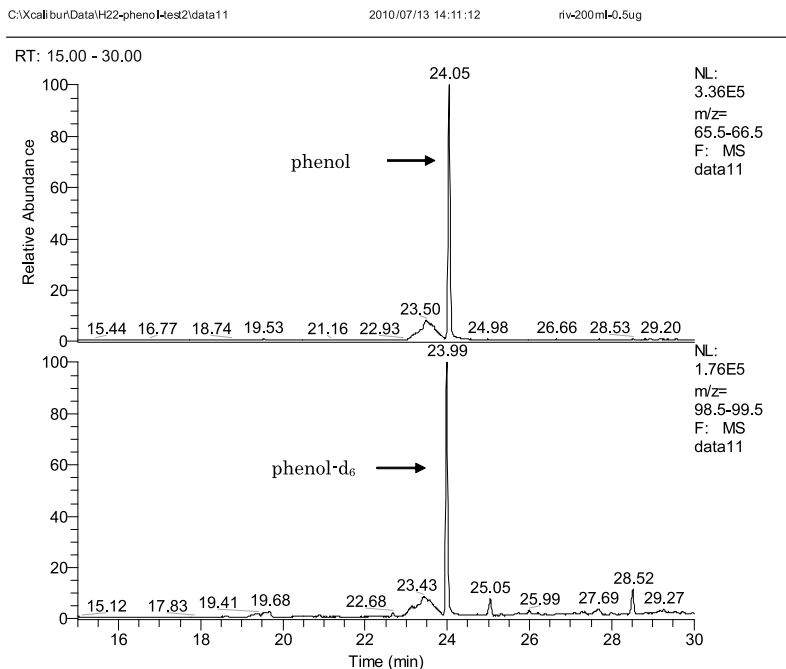


図 11 GC/MS 河川水添加回収(0.5 µg 添加)クロマトグラム

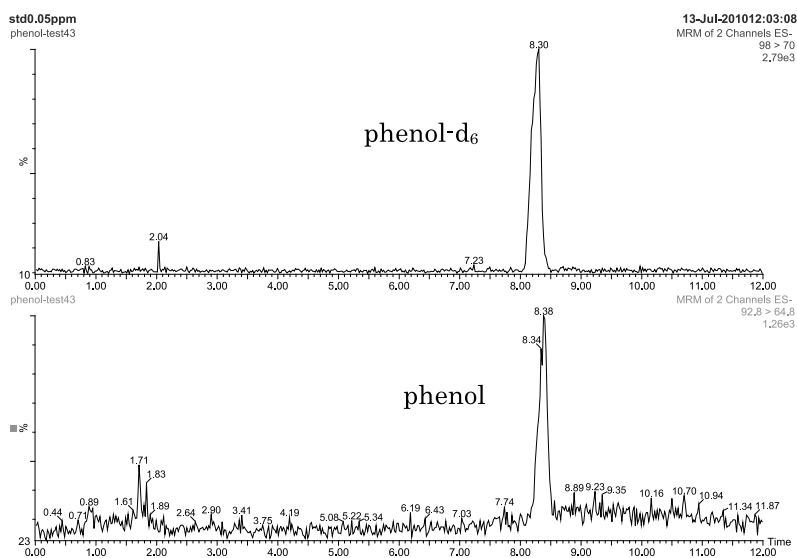


図 12 LC/MS/MS 河川水添加回収(0.5 µg 添加)クロマトグラム

加していない状態で含まれる濃度の平均値

この結果から、GC/MS法、LC/MS/MS法でほとんど同じMDL、MQLが得られた。本来、無添加平均が検出された場合は無添加平均でMDLを算出すべきであるが、回収試験も兼ねて標準品を添加して行ったので、MDL、MQLの値が高くなった。

2.8 通水量が回収率に及ぼす影響

河川水を用いて、通水量の適量値を求めた。河川水100ml、200ml、500mlにフェノールを0.5µg添加し、図10の測定フロー図に従って回収率を求めた(図13)。

この結果、100mlの通水量と比較して、サロ

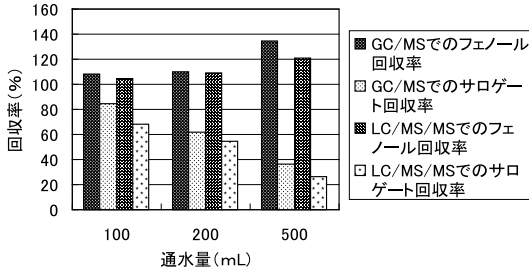


図 13 河川水通水量による回収率の変化

表 7 溶出液を濃縮しない場合のブランク値とサロゲート回収率

通水量 (mL)	GC/MS 測定 フェノール濃度 ($\mu\text{g/L}$)	GC/MS でのサロ ゲート回収率 (%)	LC/MS/MS 測定 フェノール濃度 ($\mu\text{g/L}$)	LC/MS/MS での サロゲート回収 率 (%)
100	0.31	100.7	0.20	103.0
200	0.27	101.2	0.19	92.0
500	0.21	44.2	0.19	42.8

ゲート回収率は200mlでやや低下し、500mlでは大きく低下した。

2.9 溶出液の濃縮が回収率に及ぼす影響

フェノールは沸点が低いので、溶出液の窒素ガス吹きつけによる濃縮操作が回収率に影響を及ぼしているのではないかと考えられたので、精製水100ml, 200ml, 500mlにサロゲートのみを添加して、溶出液を濃縮しないで4mlにメスアップし、そのまま測定した。その結果を表7に示す。この結果、サロゲートの回収率が低くなる原因は、窒素ガス吹きつけによる濃縮操作であることが判明した。また、500ml通水した場合は図13の河川水での添加回収試験結果と同様に、サロゲートの回収率が大きく低下したのは、固相からの破過であることが判明した。

しかし、MDL 測定の結果から、 $1\mu\text{g/L}$ の要求感度を満たすためには、200mlまでしか通水できないことを考えると、1mlに濃縮することは必須であり、サロゲート法を用いることから、濃縮操作を操作フローに入れることとした。

2.10 GC/MS法とLC/MS/MS法のデータ相関

ブランク試験、回収試験等における両者のデータの相関を図14に示す。この結果、両者の相関は非常によく、どちらで測定しても遜色のないものと思われる。

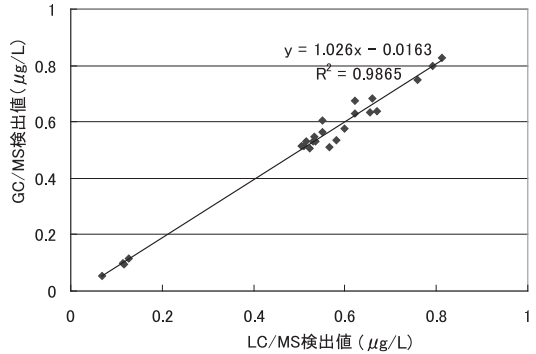


図 14 GC/MSとLC/MS/MSのデータ相関

3. まとめ

要監視項目であるフェノールの測定法について、誘導体化をしない固相抽出-GC/MS法による公定法を改良し、前処理条件を検討した。また、同様の前処理を行った試料液をLC/MS/MSでも測定法を検討し、GC/MS法、LC/MS/MS法ともに同程度の精度と検出下限値が得られることが判明した。

ブランクが検出されることと、固相からの破過を勘案した結果、試料量は200mlが最適である。

食塩の添加は不必要であるが、pHを3以下にして通水することは必要である。定量下限値を下げるために溶出液を1mlに濃縮することは必要であるが、濃縮操作がサロゲートの回収率の低下を起こしていることも判明した。しかし、サロゲート法を用いる限りは、許容範囲での回収率である。

測定法の検出下限値(MDL)は、やや高濃度のフェノールを添加回収したために $1.2\mu\text{g/L}$ となったが、無添加平均で算出すれば $1\mu\text{g/L}$ 以下になるとと思われる。GC/MS法とLC/MS/MS法での測定データの相関は $R^2=0.987$ であり、どちらで測定しても遜色のない結果となった。

—引用文献—

- 1) 環境省環境管理局水環境部長：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(付表1)，平成15年11月5日