

# LC-MS/MS を用いた環境水中のフェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールの同時分析法の検討

上嶋明子

Consideration of Simultaneous Analysis of Phenol and 2,4-Dichlorophenol  
in Environmental Water Using LC-MS/MS

Akiko UEJIMA

## 1. はじめに

フェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールは、フェノール類の一種であり、水生生物の保全に係る要監視項目に指定されている。当センターでは、水質汚濁防止法に基づき公共用水域での常時監視を行っている。

上記 2 物質の測定法は、各々固相抽出・誘導体化・ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法と規定されている。しかし昨今、世界的な情勢を背景としたヘリウム (He) ガス供給不足が社会的な課題となっており、当センターでも今年度より以前と同量の入手が困難となっている。GC/MS 法では He ガスを使用するが、100%を輸入に頼る日本では、今後も影響を受けるのは避けられない。

そこで、He ガスを使用しない代替測定法として、水道法 (昭和三十二年法律第百七十七号) 第二十条第一項の規定に基づく水質検査 別表第 29 の 2<sup>1)</sup>を基とした、固相抽出・液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) 法でのフェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールの同時分析の検討を行ったので、結果をここに報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試験操作方法

固相抽出法の前処理フローを図 1 に示す。操作に用いた分析機材は、超純水、メタノール、アセトンで洗浄したものを使用した。前処理操作における濃縮は 10 倍とした。乾燥した固相カラムをメタノールで 1mL となるように溶出し、超純水を加えて 5mL に定容した液を LC-MS/MS で定量した。操作ブランクには、超純水を使用した。

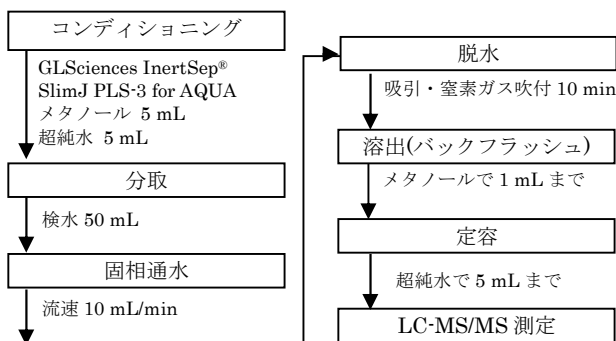


図 1 前処理フロー (固相抽出法)

### 2. 2 標準液の調製

フェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールの標準原液は、フェノール類 6 種混合標準液各 1 mg/mL メタノール溶液 (ジーエルサイエンス(株)) を用いた。フェノール類 6 種混合標準液には、フェノール、2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,6-ジクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノールが含まれる。標準液をメタノールで 2 mg/L に希釈したものを、更に超純水で希釈し、2~40 µg/L とした。

検量線作成には、標準液 5 点、2、4、10、20、40 µg/L を用いた。

### 2. 3 LC-MS/MS 分析条件

高速液体クロマトグラフは Nexera、タンデム質量分析計は LCMS8050 (ともに(株)島津製作所製) を用いた。機器分析条件およびモニターイオンを表 1 に示す<sup>2)</sup>。イオン化法には、大気圧化学イオン化 (APCI) 法を使用した。APCI を用いることで、フェノールのような低極性の物質も測定可能となる。

表 1 機器分析条件

System	SHIMADZU LCMS-8050 ジーエルサイエンス (株) 製
Column	InertSustain C18 HP (100 mm L×2.1 mm I.D., 3µm)
Mobile Phases	A Water B Methanol
Flow Rate	0.5 mL/min
Time Program	B conc.40% (0 min)-95% (4.8-5.4 min)-40% (5.41-7.5 min)
Col. Temp	40 °C
Injection Vol.	50 µL
Detection	MS MRM
Ionization Mode	APCI-negative
MRM Transition	Phenol: m/z 93.0>65.0 2,4-Dichlorophenol: m/z 161.0>125.0

### 2. 4 固相カラムの洗浄方法の検討

含塩する環境水も試料とするため、通水後の固相カラムの洗浄方法を検討した。LC-MS/MS にとって含塩は装置の不具合につながるため、除塩操作は重要である。洗浄検討条件は下記の通りとした。

- ①超純水 20mL (10mL×2 回)
- ②超純水 20mL (5mL×3 回+2.5mL×2 回)
- ③超純水 20mL (4mL×4 回+2mL×2 回)

試料には汽水湖水 (塩化物イオン 2350 mg/L) を用いた。残塩の確認方法は、洗浄後の固相カラムを超純水 2mL で溶出した液中の塩化物イオン濃度をイオンクロマトグラ

フ IC-2010 (東ソー(株)製) で定量して評価した。塩化物イオン濃度が、操作ブランクと同レベルで、かつそれ以上低減しない点を洗浄の終点とした。

## 2. 5 検量線の確認

標準液 2~40 µg/L で作成したフェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールの検量線について、直線性を確認した。また、標準液 2~40 µg/L を 10 サンプルあけて繰り返し 4 回測定することで、検量線の妥当性を確認した。

## 2. 6 装置定量下限値 (IQL) 試験操作

「要調査項目等調査マニュアル (水質、底質、水生生物) 2008 年 3 月、環境省水・大気環境局水環境課」(以下「要調査項目等調査マニュアル」という。) に準拠し、次のとおり算出した。

検量線の最低濃度付近に相当する標準溶液を 7 回繰り返し測定し、次式より IQL の試料換算値を求めた。

$$IQL \text{ 試料換算値} = 10 \sigma_1 \times \frac{1}{c}$$

$\sigma_1$  : 標準偏差  
c : 濃縮率

## 2. 7 方法定量下限値 (MQL) 試験操作

要調査項目等調査マニュアルに準拠し、次のとおり算出した。

既知濃度試料を用いて、所定の操作により前処理、測定、同定および定量を行った。この操作を 6 回繰り返し測定し、次式より MQL の試料換算値を求めた。

$$MQL \text{ 試料換算値} = 10 \sigma_2 \times \frac{1}{c}$$

$\sigma_2$  : 標準偏差  
c : 濃縮率

## 2. 8 添加回収試験

超純水および環境水 3 種 (河川水、湖沼水、夾雑物の多い河川水 (以下、負荷河川水という)) に標準液を添加し、固相抽出法にて回収率を求めた。

# 3. 結果および考察

## 3. 1 固相カラムの洗浄方法の検討

通水後の固相カラム洗浄方法の検討結果を表 2 に示す。洗浄方法③超純水 20 mL (4 mL×4 回+2 mL×2 回) にて除塩できることを確認した。

表 2 固相カラム洗浄後の塩化物イオン濃度 (mg/L)

検体種	洗浄方法	洗浄量 (mL)				
		0	10	15	20	24
超純水	①	167	5.94		0.116	
	②	113		0.875	0.294	
	③	186			0.114	0.158
湖沼水	①	2417	53.6		0.463	
	②	497		6.41	0.159	
	③	723			0.113	0.167

## 3. 2 検量線の確認

4 回繰り返し測定した検量線を図 2 に、その評価結果を表 3 に示す。フェノールおよび 2,4-ジクロロフェノールとも直線性は、2~40 µg/L の濃度範囲にて相関係数 0.996 以

上と良好だった。各濃度点の精度 (変動係数) と真度 (設定濃度からの乖離率) を評価したところ、2 物質とも変動係数は 20% 以下であり、設定濃度との差は平均で ±20% 以内と目標を満たした。以上の評価結果から、検量線の最低濃度は 2 µg/L としてもよいが、4 µg/L とすれば低濃度領域の測定精度がさらに向上するとみられた。

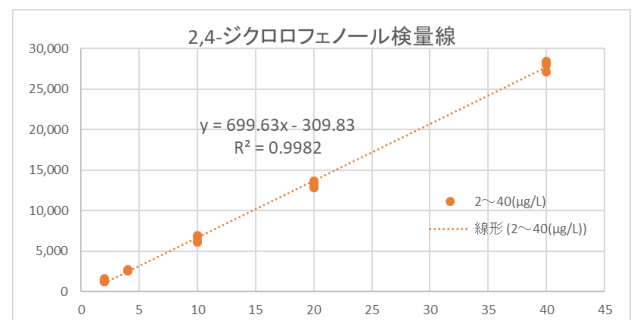
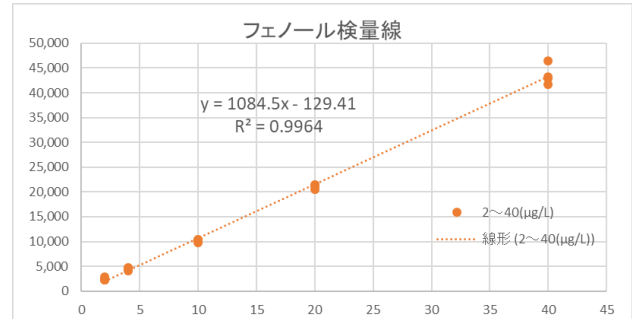


図 2 検量線 (各濃度繰り返し測定)

表 3 検量線の評価結果

フェノール							
設定濃度 (µg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	平均値	標準偏差	変動係数 (%)
2	2.81	2.16	2.23	2.38	2.39	0.29	14.6
4	4.42	4.40	4.12	3.87	4.20	0.26	6.6
10	9.70	9.64	9.53	9.19	9.51	0.23	2.3
20	19.9	19.7	19.8	19.1	19.61	0.37	1.8
40	42.9	39.9	38.6	39.7	40.28	1.85	4.6

設定値からの乖離率						
設定濃度 (µg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	平均値	±20%
2	40%	8%	12%	19%	20%	○
4	11%	10%	3%	-3%	5%	○
10	-3%	-4%	-5%	-8%	-5%	○
20	-1%	-2%	-1%	-5%	-2%	○
40	7%	0%	-4%	-1%	1%	○

## 2,4-ジクロロフェノール

2,4-ジクロロフェノール							
設定濃度 (µg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	平均値	標準偏差	変動係数 (%)
2	2.28	2.72	2.27	2.17	2.36	0.25	12.3
4	4.32	4.21	4.04	4.15	4.18	0.12	2.9
10	10.10	9.47	9.08	10.3	9.74	0.56	5.6
20	19.9	18.7	19.2	19.7	19.38	0.53	2.7
40	40.7	40.3	41.1	39.2	40.34	0.82	2.1

設定値からの乖離率						
設定濃度 (µg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	平均値	±20%
2	14%	36%	14%	9%	18%	○
4	8%	5%	1%	4%	5%	○
10	1%	-5%	-9%	3%	-3%	○
20	0%	-6%	-4%	-2%	-3%	○
40	2%	1%	3%	-2%	1%	○

### 3. 3 IQL および MQL の算出

IQLとMQLの算出結果と指針値を表4に示す。IQLは、2物質とも試料換算値で0.1 µg/Lであった。MQLは、フェノールが0.4 µg/L、2,4-ジクロロフェノールが0.2 µg/Lと、いずれも最も厳しい指針値の10分の1(公定法の定量下限値)を満たした。

MQLの算出結果を踏まえれば、試料の濃縮率は10倍よりも20倍(例えば、試料量100 mL、最終濃縮率5mL)で前処理を行い、検量線の最低濃度を4 µg/Lとすることによって、低濃度試料の測定精度向上に繋がる可能性がある。

表4 装置定量下限値および方法定量下限値 (µg/L)

	IQL	MQL	最も厳しい指針値
フェノール	0.1	0.4	10
2,4-ジクロロフェノール	0.1	0.2	3

### 3. 4 添加回収試験

超純水および環境水3種における添加回収試験結果を表5に示す。超純水および環境水における回収率は、フェノールで77~111%(ブランク補正值)、2,4-ジクロロフェノールで75~107%と、要調査項目等調査マニュアルの許容範囲70~120%内と良好だった。

表5 添加回収試験結果

検体種類	濃縮前の検水濃度 (µg/L)	試行数 n	回収率(%)		
			フェノール		2,4-ジクロロフェノール
			-	BL補正值	
超純水	0.4	4	106~124	90~111	89~105
	2	3	81~107	77~104	96~101
河川水	0.4	3	103~117	90~111	81~92
	2	1	88	83	101
湖沼水	0.4	3	96~117	-	88~101
	2	1	94	86	107
河川水(負荷河川水)	0.4	1	87	-	75

## 4. まとめ

供給不足が懸念されるHeガスを使用しない測定方法として、LC-MS/MS法を用いた環境水中のフェノールおよび2,4-ジクロロフェノールの同時分析方法を検討した。

試料の濃縮倍率は10倍(試料量50mL、最終濃縮量5mL)とし、LC/MSでのイオン化法には、大気圧化学イオン化(APCI)法を使用した。

前処理操作において固相カラムの洗浄方法を検討した。その結果、固相カラムへの試料通水後は、超純水を数回に分けて計20mLで洗浄すれば、汽水湖水でも除塩できた。

標準液2~40 µg/Lの各濃度5点で繰り返し測定して検量線を作成した。その結果、2物質とも相関係数は0.996以上と良好であった。検量線を評価すると、変動係数は20%以下であり、設定濃度との差は平均で±20%以内と目標を満たした。

装置定量下限値(IQL)と方法定量下限値(MQL)を試料換算値で求めた。IQLは2物質とも0.1 µg/Lであった。

MQLは、フェノールが0.4 µg/L、2,4-ジクロロフェノールが0.2 µg/Lと、いずれも最も厳しい指針値の10分の1を満たした。

超純水および環境水(河川水、湖沼水および負荷河川水)への添加回収試験を行った。その結果、フェノールで77~111%(ブランク補正值)、2,4-ジクロロフェノールで75~107%といずれも良好だった。

以上の試験結果から、固相抽出-LC-MS/MS法による環境水中のフェノールおよび2,4-ジクロロフェノールの同時分析は、公定法(誘導体化-GC/MS法)に代わる測定方法として十分適用できる可能性が示された。

## 謝辞

本研究は、(株)島津製作所等、関係者の方々の多大なご協力を賜り実施できたものです。ここに感謝申し上げます。

## 参考文献

- 厚生労働省：平成15年厚生労働省告示第261号「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」
- 株式会社 島津製作所：Application News No. C96 LC/MS トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いたフェノール類の分析