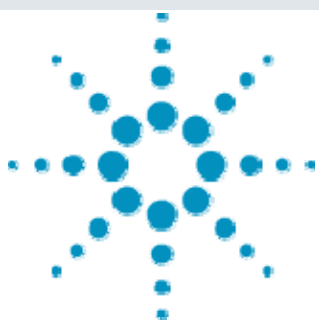




ペンタフルオロベンジル誘導体化を用いる 負イオン化学イオン化(NCI)法による 高感度分析



＜要旨＞ ペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体化の簡略化を図り、フェノール性水酸基を有するフェノール類 16 種及びエストロゲン 5 種に適用し、NCI 法での高感度分析を試みました。EI 法に比較して、平均で数十倍程度の感度の向上が認められました。さらに、河川水への適用を図り、固相抽出 (50~100 倍) により対象化合物の抽出を行い、PFB 誘導体化後 NCI 法を用いることで sub-ng/L レベルの検出が可能となりました。

Key Words: NCI 法、ペンタフルオロベンジル化、アルキルフェノール類、フェノール、2,4-ジメチルフェノール、クロロフェノール類、ニトロフェノール類、エストロゲン、GC/MS

1. はじめに

負イオン化学イオン化 (NCI) 法のうち電子捕獲型の反応を利用するタイプのものは、電子親和性の高い化合物に対して高感度、高選択的検出が可能です。そのため、NCI 法は、ポリハロゲン化合物、芳香族ニトロ化合物、多環芳香族炭化水素類、リン酸エステルなどが対象化合物となる環境分野の微量定量分析に利用されています。また、電子親和性の低い化合物であっても、活性水素を持つ官能基を有する化合物の場合は、誘導体化により電子親和性を高めてから NCI 法で測定することが可能であり、この目的のためペンタフルオロベンゾイル誘導体、ペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体などが利用されています。本アプリケーションニュースでは、フェノール類 (17 化合物) 及びエストロゲン (5 化合物) について、GC/NCI-MS を用いる高感度分析法を検討しました。これらの化合物は、そのままでは NCI 法で感度がないためフェノール性水酸基に PFB 基の導入を試み、誘導体化法はできるだけ簡略化を行いました。さらに、河川水への適用を図りました。

2. 方法

使用装置 : Agilent6890GC/5973MSD

2.1 PFB 誘導体化条件

Lee らと同様な手法で誘導体化反応を行った後、オリジナルの手法ではカラムクロマトグラフィーを用いるクリーンアップ操作などが必要で煩雑ですが、できるだけ簡略化を図りました。固相抽出のアセトン溶出液 1ml を 2ml バイアルに移し、10%無水炭酸カリウム水溶液 100 μ l 及び 5%ペンタフルオロベンジルブロミド (PFBB r) アセトン溶液 100 μ l を加えキャップをして、60°C で 1 時間反応させ PFB 誘導体としました。この反応液に窒素ガスを吹き付けて約

100 μ l まで濃縮し、ヘキサン 1ml 及び精製水 0.5ml を加え十分振り混ぜた後有機層を GC/MS に注入しました。Fig.1 に、PFB 誘導体化のフロー図を示しました。Fig.2 に、フェノールの PFB 誘導体化反応を示しました。

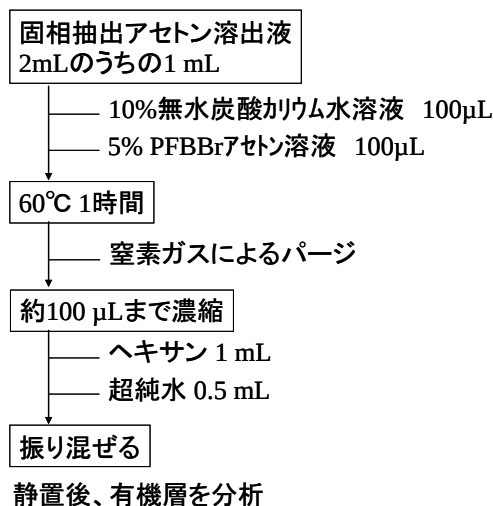


Fig.1 PFB 誘導体化のフロー図

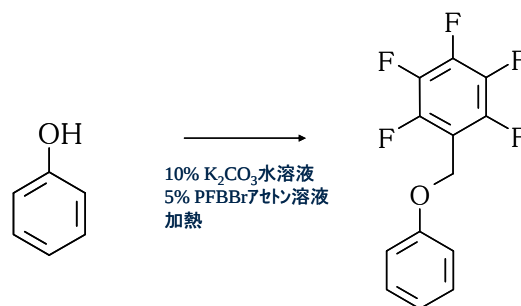


Fig.2 フェノールの PFB 誘導体化反応



2.2 フェノール類

2.2.1 アルキルフェノール類 (4-t-butylphenol, 4-n-pentylphenol, 4-n-hexylphenol, 4-t-octylphenol, 4-n-heptylphenol, nonylphenol, 4-n-octylphenol)

pH3.5 に調整した河川水 100ml から固相抽出 (3M 社 Empore Disk SDB-XD 47mm) により対象化合物の抽出を行い、溶出液 (アセトン) を最終的に 2ml としました。溶出液のうち 1ml を用い、PFBBBr によりフェノール性水酸基を誘導体化しました (60℃ 1 時間)。メタンを試薬ガスとした GC/NCI-MS により測定を行いました。(カラム: HP-5MS 30m, 0.25mm, 0.25μm, 注入量: 2μl (スプリットレス)、オープン温度: 90℃ (1.5min)-20℃/min-180℃ (0min)-8℃/min-280℃ (5min))

2.2.2 フェノール、2,4-ジメチルフェノール、クロロフェノール類及びニトロフェノール類

(phenol, 2,4-dimethylphenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol, 4-chloro-3-methylphenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol)

pH2 に調整した河川水 100ml から固相抽出 (3M 社 Empore Disk SDB-XD 47mm) により対象化合物の抽出を行い、溶出液 (アセトン) を最終的に 2ml としました。溶出液のうち 1ml を用い、PFBBBr によりフェノール性水酸基を誘導体化しました (80℃ 1 時間)。メタンを試薬ガスとした GC/NCI-MS により測定を行いました。(カラム: DB-5.625 30m, 0.25mm, 0.25μm, 注入量: 2μl (スプリットレス)、オープン温度: 90℃ (1.5min)-20℃/min-160℃ (0min)-8℃/min-280℃ (1min))

2.3 エストロゲン (17α-estradiol, estrone, 17β-estradiol, ethynyl estradiol, estriol)

pH3.5 に調整した河川水 200ml (サロゲートとして 17β-estradiol-2,4,16,16-d4 400pg) から固相抽出 (Excelpak SPE-ENV/124) により対象化合物の抽出を行い、溶出液 (アセトン) を最終的に 2ml としました。溶出液のうち 1ml を用い、ペンタフルオロベンジルブロミド (PFBBBr) によりフェノール性水酸基を誘導体化し (60℃ 1 時間)、N-トリメチルシリルイミダゾールによりアルコール性水酸基を誘導体化しました。メタンを試薬ガスとした GC/NCI-MS により測定を行いました。(カラム: HP-5MS 30m, 0.25mm, 0.25μm, 注入量: 4μl (スプリットレス)、オープン温度: 150℃ (1.5min)-10℃/min-310℃ (5min))

3. 結果

3.1 NCI 質量スペクトル

PFB 誘導体の NCI 法の質量スペクトルは、全化合物で解離型共鳴捕獲反応により生成した [M-PFB]⁻ がベースピークとなり、その他のフラグメントイオンはほとんど観察されないため、PFB 誘導体化 NCI 法は、定量に極めて有効であることが分かりました。

Fig. 3 に、4-t-butylphenol の誘導体化なし及び PFB 誘導体の EI 質量スペクトル、PFB 誘導体の NCI 質量スペクトルを示しました。

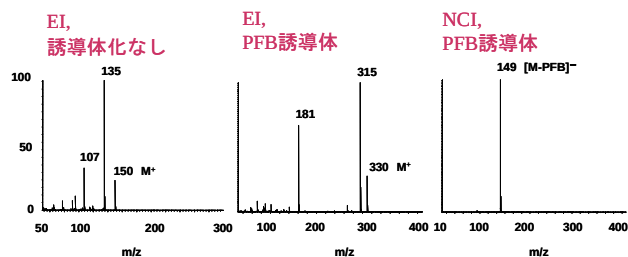


Fig. 3 4-t-butylphenol の質量スペクトル

3.2 NCI 法と EI 法の感度比較

NCI 法と EI 法の検出限界 (標準溶液) を比較すると、アルキルフェノールでは誘導体化せず EI 法により測定した場合より 67 から 300 倍の感度があることが分かりました。Fig. 4 に、アルキルフェノール類 (標準アセトン溶液) を 2.1 により PFB 化し、GC/NCI-MS により測定し得られた SIM クロマトグラムを示しました。NCI 法での検出限界 (S/N=3) は、1.0~33pg/ml でした。

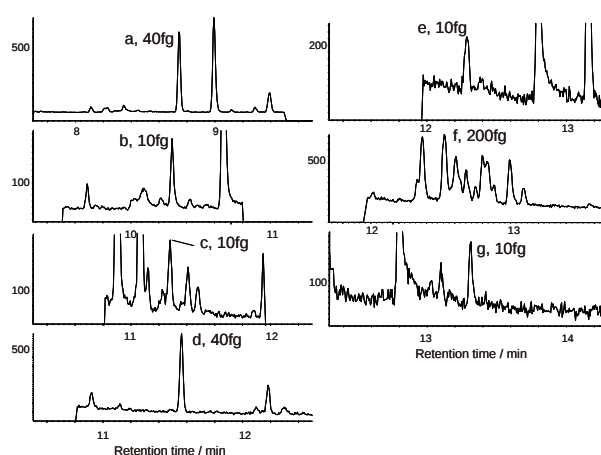


Fig. 4 アルキルフェノール PFB 誘導体の NCI-SIM クロマトグラム

(a): 4-t-butylphenol (20pg/ml); (b): 4-n-pentylphenol (5pg/ml); (c): 4-n-hexylphenol (5pg/ml); (d): 4-t-octylphenol (20pg/ml); (e): 4-n-heptylphenol (5pg/ml); (f): nonylphenol (100pg/ml); (g): 4-n-octylphenol (5pg/ml) injection volume: 2μl

フェノール、2,4-ジメチルフェノール、クロロフェノール類及びニトロフェノール類では TMS 誘導体を EI 法で測定した場合より 3.3 から 26 倍高感度でした。Fig. 5 に、フェノール類 11 種 (標準アセトン溶液) を 2.1 により PFB 化し、GC/NCI-MS により測定し得られた SIM クロマトグラムを示しました。NCI 法での検出限界 (S/N=3) は、1.3~20pg/ml でした。

(2-methyl-4,6-dinitrophenol 及び 2,4-dinitrophenol は除く)



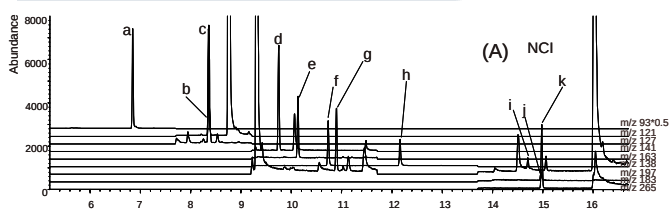


Fig.5 フェノール類 11 種の PFB 誘導体の NCI-SIM クロマトグラム (1 ng/ml)

a, phenol; b, 2,4-dimethylphenol;
c, 2-chlorophenol; d, 4-chloro-3-methylphenol;
e, 2,4-dichlorophenol; f, 2-nitrophenol;
g, 2,4,6-trichlorophenol; h, 4-nitrophenol;
i, 2-methyl-4,6-dinitrophenol;
j, 2,4-dinitrophenol; k, pentachlorophenol.

エストロゲンではTMS誘導体をEI法で測定した場合より12から25倍の感度があることが分かりました。Fig.6 にエストロゲン（標準アセトン溶液）を2.1によりPFB化し、GC/NCI-MSにより測定し得られたSIMクロマトグラムを示しました。NCI法での検出限界（S/N=3）は、5.6~13.6pg/mlでした。

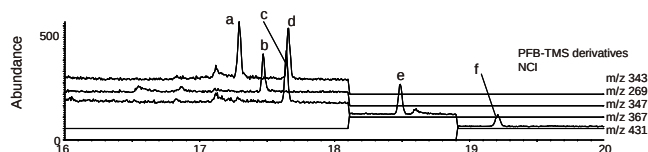


Fig.6 エストロゲンの PFB-TMS 誘導体の NCI-SIM クロマトグラム(100 pg/ml)

(a) 17 α -estradiol; (b) estrone;
(c) 17 β -estradiol-2, 4, 16, 16-d₄;
(d) 17 β -estradiol; (e) ethynyl estradiol; (f) estriol

3.3 回収率

河川水からの回収率は、アルキルフェノール類（濃度：10 から 5000ng/l）で 77.9 から 101.5%（RSD：4.1 から 12.1%）で、フェノール、2,4-ジメチルフェノール、クロロフェノール類及びニトロフェノール類（2-methyl-4,6-dinitrophenol 及び 2,4-dinitrophenol は除く）（濃度：100 から 1000ng/l）で 81.2 から 106.3%（RSD：5.1 から 8.0%）で、エストロゲン（濃度：2ng/l）で 85.8 から 126.5%（RSD：6.2 から 13%）でした。これらの化合物の河川水での検出限界は、sub-ng/L（sub-ppt）でした。

4. まとめ

PFB 誘導体化を 2mL バイアル内で簡便に行うことが可能でした。アルキルフェノール類は、PFB 誘導体とすると NCI 法に対して非常に高感度で、EI 法よ

り 67 から 300 倍高感度でした。フェノール、2,4-ジメチルフェノール、クロロフェノール類及びニトロフェノール類は、PFB 誘導体とすると NCI 法に対して非常に高感度で、EI 法に比較して 3 から 60 倍高感度でした。エストロゲンは、PFB-TMS 誘導体とすると NCI 法に対して非常に高感度で、EI 法（TMS 誘導体）より 12 から 25 倍高感度でした。これらの化合物では、固相抽出（スチレンジビニルベンゼン系）により抽出を行い、PFB 誘導体化後 NCI 法を用いることで sub-ng/L（sub-ppt）の分析が可能でした（濃縮倍率：50~100 倍）。

5. 参考文献

- [1] H. B. Lee, L. D. Weng, A. S. Y. Chau, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1086 (1984)
- [2] 中村貞夫, 滝埜昌彦, 代島茂樹, 分析化学, 49, 181 (2000)
- [3] 中村貞夫, 滝埜昌彦, 代島茂樹, 分析化学, 49, 329 (2000)
- [4] S. Nakamura, M. Takino, S. Daishima, Analyst, 126, 835 (2001)
- [5] S. Nakamura, T. H. Sian, S. Daishima, J. Chromatogr. A, 919, 275 (2001)

【MS-200709-002】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies