

報 文

オンライン濃縮法を用いる水試料中の微量フェノール類の
自動フローインジェクション分析酒井 忠雄^{®1}, 藤本 俊一¹, 樋口 慶郎², 手嶋 紀雄¹Determination of Phenols at Low Levels in Water Samples Using Automatic
Flow Injection Analysis Coupled with On-Line Solid-Phase ExtractionTadao SAKAI¹, Shun-ichi FUJIMOTO¹, Keiro HIGUCHI² and Norio TESHIMA¹¹ Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247, Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0392² FLA Instruments Division, Ogawa & Co., Ltd., 3-1-25-501, Hio-cho, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-0029

(Received 22 July 2005, Accepted 22 September 2005)

An automatic flow injection method was proposed using the on-line solid-phase extraction of trace phenols and color development with 4-aminoantipyrine. Phenols at low levels in water samples were pre-concentrated onto OASIS HLB for 20 min at 2 ml min⁻¹. After elution, color development occurred in the merging zone with 4-aminoantipyrine buffered at pH 10 and hexacyanoferrate(III). The absorbance was measured at 505 nm. The calibration graph for phenol was linear over the range of 0.25 ~ 10 ng ml⁻¹ with RSD < 1%. The proposed method could be applicable to the analysis of phenols in tap and river water.

Keywords : solid-phase extraction; trace phenol analysis; automatic flow injection method; 4-aminoantipyrine method.

1 緒 言

フェノールは、火薬類、肥料、合成樹脂、製剤など様々な芳香族化合物の製造に使われている。また、床、汚水だめなどの清掃に使われ、0.2% 溶液は静菌作用、1% 以上で殺菌作用があるとされている¹⁾。フェノールの毒性はラットでは経口吸収で半数致死量 (LD₅₀) は 0.53 g/kg、イヌでは 0.5 g/kg であり、農薬などと比べると強い毒性を有するほうではない¹⁾。

水道法では 4-アミノアンチピリン (4-AA) により呈色するフェノール、クレゾール、ナフトール、カテコールなどを含めフェノール類として取り扱われている。上水道水中にフェノール類及びその関連化合物が含まれると不快臭

や不快味を与える。また食品工業では製品の異臭味による品質低下を招くことになるが、臭気除去処理をしても完全ではなく、フェノール類の流入を防ぐ必要がある。フェノール類は自然水に含まれることはなく、工場排水、アスファルト道路からの流水等から検出されることがある。

排水基準におけるフェノール類の許容限界濃度は 5 µg ml⁻¹²⁾、また水道法に基づく基準ではフェノール量として 5 ng ml⁻¹ 以下である³⁾ことが定められている。フェノール類の分析法としては JIS K 0102 に 4-AA 吸光光度法 (4-AA 法) が定められ、25 ~ 500 ng ml⁻¹ の低濃度範囲ではクロロホルムを用いる溶媒抽出法が規定されている⁴⁾。また、1993 年に上水試験方法の中に迅速法としてガスクロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ-質量分析法が追加された⁵⁾。4-AA 法は安価で簡便法であるが、定量下限が高く、微量分析には不十分である。そこで固相抽出法を用いる濃縮-定量法が検討された。ジメチルフェネチルシランを化学結合させたシリカゲルミニカラムを用いる高速液体

¹ 愛知工業大学工学部応用化学科: 470-0392 愛知県豊田市八草町八千草 1247

² 株式会社小川商会フローインジェクション分析機器事業部: 657-0029 兵庫県神戸市灘区日尾町 3-1-25-501

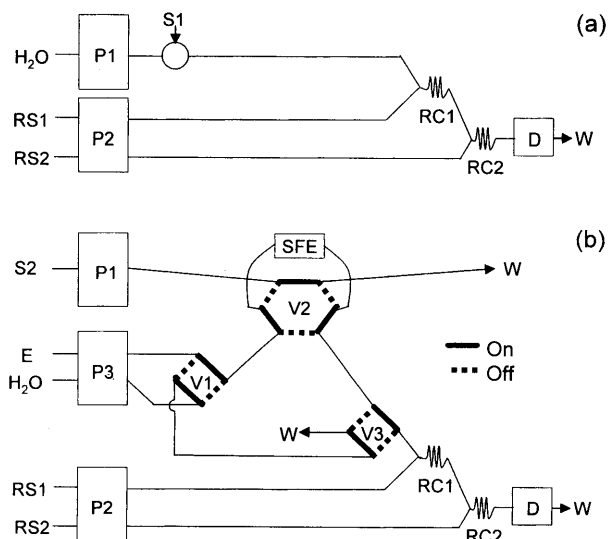


Fig. 1 Flow Diagram for phenols determination

(a) Normal flow injection analysis, (b) solid phase extraction-flow injection analysis. Six modes were controlled by switching automatically three valves (see Table 1). S1: phenol in aqueous solution; S2: phenol buffered at pH 4; P1: pump {(a) 1.5 ml/min; (b) 2.0 ml/min}; P2: pump (1.0 ml/min); P3: pump (1.0 ml/min); SFE: solid phase extraction column; V1, V2 and V3: automatic switching valves; E: eluent of 90% methanol; RS1: 0.15% 4-AA in $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_3$; RS2: 0.6% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; RC1: reaction coil 1 (0.5 mm i.d., 2 m); RC2: reaction coil 2 (0.5 mm i.d., 2 m); D: spectrophotometric detector (505 nm); W: waste

クロマトグラフィー (HPLC) では 2 ml の試料に対してフェノール、クレゾール類では 0.05 ng ml^{-1} が定量下限である⁶⁾。ジビニルベンゼン-親水性メタクリル酸エステル共重合ゲルによる濃縮-HPLCでは 200 ml の試料が濃縮され、 0.5 ng ml^{-1} を濃縮したときの相対標準偏差は 7% と大きい⁷⁾。4-スルホベンゼンジアゾニウム塩とフェノール類とのカップリング-メンブランフィルター捕集濃縮-HPLCで高感度化が図られ、2 ml を濃縮したときの検出限界 ($S/N=3$) はフェノールでは 40 pg ml^{-1} が報告されている⁸⁾。一方、飲料水中の 13 種類のフェノール関連化合物をポリスチレンによるオフライン濃縮-スタッキングキャピラリー電気泳動法で分析したが、検量線の範囲は $20 \sim 700 \text{ ng ml}^{-1}$ である⁹⁾。また、環境試料中のフェノール類の多成分同時分析を目的にスタッキング-キャピラリー電気泳動法が試みられ、23 種のフェノール誘導体の分離が行われたが、フェノール及び *o*-クレゾールに対する検出限界は約 11 ng ml^{-1} である¹⁰⁾。著者ら¹¹⁾は Sep-Pak C_{18} 及び Porapak R_{DX} カートリッジを用いる固相抽出法で $1 \sim 8 \text{ ng ml}^{-1}$ のフェノールの分析を可能にした。一方、フェノール分析の迅速化あるいは自動化・高感度化を図る

ためにフローインジェクション分析 (FIA) が導入され、 5 ng ml^{-1} ¹²⁾ 及び 0.2 ng ml^{-1} ¹³⁾ の検出限界が報告されている。更に、FIA の自動化及び濃縮法に関する報告もある^{14)~16)}。しかし、水道水を対象として現場分析においては、 1 ng ml^{-1} の定量下限が求められているため、更に高感度化を図る必要がある。

本研究では、3つのバルブを自動制御するオンライン濃縮 FIA 法によって $0.25 \sim 10 \text{ ng ml}^{-1}$ のフェノール類の定量が可能となったので報告する。

2 実験

2.1 装置

吸収スペクトル及び吸光度の測定には、日本分光製 V-560 型紫外・可視分光光度計を使用した。pH の測定には堀場製 F-22 型 pH メーターを用いた。

Fig. 1 にフローシステムを示す。ポンプ 1 (P1) は相馬光学製 Intelligent Pump S-4000, P2 はサヌキ工業製 SR-3300, P3 はエフ・アイ・エー機器製 Dual Pump 201 を用いた。検出器は相馬光学製 UV-VIS S-3702, バルブは小川商会製自動制御バルブ (3 連バルブ version 1.00) を、レコーダーとして CHINO 製 EB-22005 を用いた。反応コイルは内径 0.5 mm のテフロンチューブを使用した。また、濃縮のためのカラムは Waters 製 OASIS HLB Extraction Column ($2.1 \times 20 \text{ mm}$) を用いた。

2.2 試薬

$100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液は、シグマアルドリッチジャパン製フェノール (特級 99%) 0.10 g を蒸留水で溶かし、1 l として調製した。

o-及び *m*-クレゾールはナカライテスク製を用い、また、1-ナフトールは片山化学製を用いて、同様の操作により、それぞれ $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 溶液を調製した。これらの試薬は使用に際して適宜希釈して用いた。

0.15% 4-AA 水溶液は、4-AA (シグマアルドリッチジャパン製、試薬特級) 0.75 g を蒸留水 500 ml に溶かして調製した。

0.6% フェリシアン化カリウム溶液は、フェリシアン化カリウム (ナカライテスク製、試薬特級) 3.0 g を蒸留水 500 ml に溶かして調製した。

緩衝液は塩化アンモニウム 1.07 g にアンモニア水 7.8 ml を加え、更に蒸留水を加えて 100 ml として調製した。この溶液の pH は 10 である。また、pH 4 の緩衝液はリン酸二水素カリウム 2.72 g を蒸留水に溶かして 100 ml として調製し、pH の微調整には希リン酸を用いた。

溶離液は 99% メタノール (和光純薬製、試薬特級) を蒸留水で希釈して 90% メタノール水溶液とした。

蒸留水は Advantec Aquarius GSH-200 で精製したものを

Table 1 FIA protocol for valves switching

	Mode					
	Conditioning 1	Conditioning 2	Concentration	Conditioning 3	Elution	Measurement
V1	off	off	off	on	on	on
V2	on	on	off	off	on	on
V3	on	off	off	off	off	on
Start time for each mode	0 s	35 s	37 s	20 min 37 s	20 min 39 s	21 min 1 s
Working time	35 s	2 s	20 min 00 s	2 s	22 s	1 min 59 s
What for?	— ^{a)}	— ^{b)}	— ^{c)}	— ^{d)}	— ^{e)}	— ^{f)}

a) Washing column with water, and removing water from channel between V1 and V3. b) Not to deliver water toward to detector. c) Concentration of phenol onto column. d) Removing water from channel between V1 and V3. e) Elution of phenol, and removing water from channel between V2 and V3. f) Obtaining a FIA peak

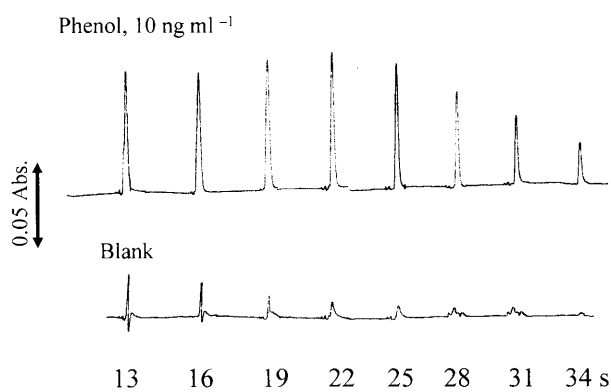


Fig. 2 Peak profiles with working time of elution mode

After this working time, V3 was switched from off position to on position to be measurement mode.

用いた。

3 結果と考察

3.1 流路の設計

まず 4-AA-フェノール発色法を導入した FIA 法の基本流路構成の検討を行った。Fig. 1 (a) に示す流路（濃縮機能を除いた流路）を用いて、基礎となる条件を求めた。送液にはダブルプランジャーポンプ 2 台を用い、キャリアーは蒸留水を 1.5 ml min^{-1} で、試薬は 0.1% 4-AA と 0.3% フェリシアン化カリウムをそれぞれ 0.5 ml min^{-1} で送液し、505 nm で吸光度を測定した。この流路では $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲で良好な検量線が得られたが、検出器の感度を増幅することにより、 $10 \sim 70 \text{ ng ml}^{-1}$ の検量線を得ることができた。しかし、この濃度範囲では河川水及び水道水中のフェノール類の定量には対応できない。したがって、これらの低濃度水試料にも対応できる固相抽出によるオンライン濃縮法の検討を行った。

前述の基礎検討を踏まえ、六方バルブ 1 つと四方バル

ブ 2 つを自動制御する装置を用いて Fig. 1 (b) に示す流路を設計した。溶離液 (E) は 90% メタノール、RS1 は pH 10 の緩衝液を含む 0.15% 4-AA 溶液、RS2 は 0.6% フェリシアン化カリウム溶液、試料溶液は pH 4 に調整したものを送液した。Table 1 にバルブ切り替えに対する FIA プロトコルを示す。Conditioning 1 モードで、まずカラムに蒸留水を通してカラムを洗浄し、かつ V1 と V3 間のライン中の水を取り除き、90% メタノールに置き換える。Conditioning 2 モードではカラムを洗浄した水が検出器に流れ込まないようにする。Concentration モードでは 20 分間 pH 4 に調整した試料水を連続送液し、フェノール類を濃縮する。Conditioning 3 で V1 と V2 間のライン中の水を取り除き、90% メタノールに置き換える。Measurement モードのバルブ状態で測定が行われる。一連のバルブ操作は自動的に制御され、このサイクルが繰り返し行われる。測定試料を入れ替えるときだけ、自動制御バルブを止める必要がある。

10 ng ml^{-1} フェノール標準溶液を用いて、Elution モードから Measurement モードに移行する際の V3 の切り替え時間について 13～34 秒の間で検討した。時間ごとの試料と空試験液とのピーク形状を Fig. 2 に示す。19 秒では水によるノイズの出現が見られ、25 秒以上では濃縮された試料の一部が検出器へ向かう前に排出されてしまうため、ピークの減少が観察された。そこで本実験では 22 秒を選択した。

3.2 反応コイル RC1 及び RC2 の長さの影響

10 ng ml^{-1} フェノールを用いて RC1 及び RC2 の長さを $0.5 \sim 5 \text{ m}$ の範囲で変化させ、吸光度に対する影響を検討した。濃縮時間は 10 分で行った。1 m 以下では空試験液の吸光度が大きくなるため、本実験では RC1, RC2 共に 2 m を選択した。その結果、空試験液の吸光度は極めて小さく、一定となった。

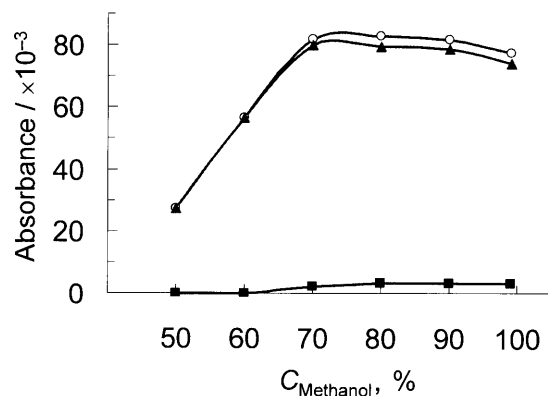


Fig. 3 Effect of methanol concentration as eluent on (■) blank, (○) 10 ng ml^{-1} phenol and (▲) net absorbance

3.3 4-AA 及びフェリシアン化カリウムの濃度の影響

4-AA 溶液の濃度を $0.05 \sim 0.4\%$ の範囲で変化させ、4-AA による発色強度への影響を検討したところ、 $0.15 \sim 0.2\%$ 付近で最も高い吸光度を示し、空試験液の影響も観察されなかった。本実験では 0.15% を用いた。

フェリシアン化カリウムの濃度は $0.1 \sim 0.7\%$ の範囲で変化させた。 0.2% から徐々に吸光度の増大が見られ、 0.6% 以上ではほぼ一定の吸光度が得られた。ここでは 0.6% を選択した。

3.4 溶離液濃度の影響

著者らによる固相抽出に関する報告¹¹⁾でフェノールの溶離液としてメタノールを用いたことから、本研究でも溶離液としてメタノールを用いた。メタノールの原液とそれを蒸留水で希釈して調製した $50 \sim 90\%$ のメタノールを用いて、フェノールの溶離への影響を調べた。その結果を Fig. 3 に示す。 60% 以下では溶離は極めて悪いが、 70% 以上ではほぼ一定の吸光度が得られ、完全に溶離されているものと思われる。本実験では 90% を選択した。

3.5 試料溶液の pH の影響

フェノールの OASIS HLB への抽出に対する pH の影響を検討した。OASIS のようなポリマー充填剤への保持は、分子型のフェノールが好ましい。 10 ng ml^{-1} フェノール標準溶液に各種 pH の緩衝液を加えた。pH は $3 \sim 7$ の範囲で変化させた。pH が高くなるにつれ、若干吸光度の減少がみられた。フェノールの pK_a は 10 であるが、この減少はフェノールが若干解離していくためであると考えられる。pH 4 付近で最大かつ一定の吸光度が得られたので、試料を濃縮する前に、試料水を pH 4 に調整することとした。

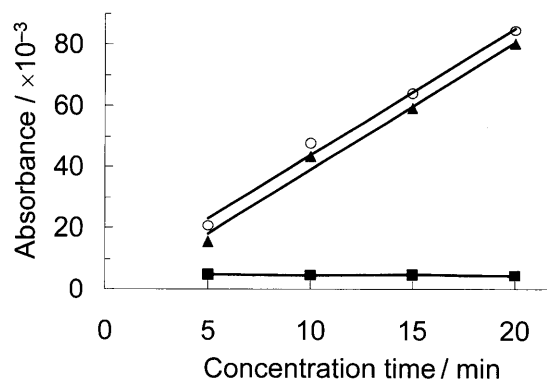


Fig. 4 Effect of concentration time on (■) blank, (○) 10 ng ml^{-1} phenol and (▲) net absorbance

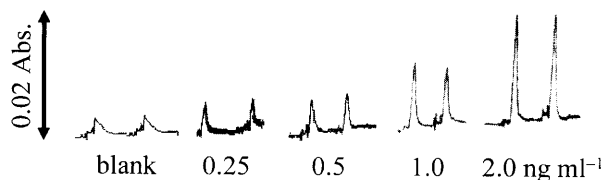


Fig. 5 Typical flow signals for phenol

3.6 試料の濃縮時間の影響

10 ng ml^{-1} フェノール標準溶液を 2 ml min^{-1} の速度で 5, 10, 15, 20 分間カラムに送液し、送液時間と濃縮率との関係について検討を行った。その結果を Fig. 4 に示す。濃縮時間が長くなるにつれ、空試験液のピークは増加しないが、フェノールのピークが定量的に増加した。しかし、実試料を分析する上では更に長時間による濃縮は必然性がなく、本実験では 20 分間の濃縮で、数百 pg ml^{-1} のフェノールの分析が可能なので、20 分を最大とした。

3.7 検量線

濃縮時間を 20 分間とし、フェノール、*o*-クレゾール、*m*-クレゾール、1-ナフトールの検量線を作成したところ、フェノールは $0.25 \sim 10 \text{ ng ml}^{-1}$ の範囲で $y = 8.3 \times 10^{-3}x$ (y は吸光度, x はフェノール濃度 (ng ml^{-1})) の相関が得られ、 $n = 3$ の相対標準偏差は 1% 以下と良好であった。また、*o*-クレゾール、*m*-クレゾール、1-ナフトールでは $1 \sim 5 \text{ ng ml}^{-1}$ の範囲で良好な直線が得られ、それぞれ $y = 6.2 \times 10^{-3}x$, $y = 4.7 \times 10^{-3}x$, $y = 2.1 \times 10^{-3}x$ となった。20 分間濃縮でのフェノールのフローシグナルを Fig. 5 に示す。

試料処理速度は 23 分に一試料であるため、迅速分析とは言えないが、アンバーライト XAD-4 樹脂を用いる FIA では $0.5 \sim 60 \text{ ng ml}^{-1}$ を 8 h^{-1} で¹²⁾、また、類似の方法では $10 \sim 1000 \text{ ng ml}^{-1}$ を 12 h^{-1} で分析している¹⁷⁾。しかし、

Table 2 Determination of phenols in tap and river waters

	Sample taken ^{c)} /ml	Added phenol/ng ml ⁻¹	Found/ng ml ⁻¹	In sample/ng ml ⁻¹	Recovery, %
Tap water ^{a)}	400	0	1.02	1.28	—
	400	0.25	1.26	1.26	96
	400	0.50	1.51	1.26	98
	400	1.00	2.07	1.34	105
	400	2.00	3.03	1.29	101
				Ave. 1.29 ± 0.03	
Upper reaches ^{b)}	400	0	4.52	5.65	—
	400	5	9.28	5.35	95
	400	10	14.8	6.00	103
				Ave. 5.67 ± 0.33	
Middle reaches ^{b)}	400	0	7.08	8.85	—
	400	10	17.6	9.50	105
	400	20	27.7	9.63	103
				Ave. 9.33 ± 0.41	

a) The tap water sample taken at our laboratory (Aichi Institute of Technology) on February 22nd, 2005. b) The river water sample taken at the upper or middle reaches of the Ohgi river in Nagoya on March 5th, 2005. c) A 400 ml of tap or river water was taken into a 500 ml volumetric flask, an appropriate amount of buffer solution was added to the sample, and then the sample was diluted to 500 ml with distilled water.

水道水に適用できる定量下限を考慮すると他法と比べ優れていると考える。

3・8 水道水中のフェノール回収試験

水道水 400 ml を 500 ml メスフラスコにとり, 最終濃度が 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ng ml⁻¹ になるようフェノール標準溶液を加え, pH 4.0 の緩衝液を適量加え, 蒸留水で 500 ml に希釈した. その試料水を本法により測定し, 回収率を求めるとともに, 水道水中に含まれるフェノールを測定した. その結果を Table 2 に示す. $n=3$ の回収率は 96% から 105% であり, この水道水中のフェノール濃度は 1.29 ng ml⁻¹ であった. また, 河川水 400 ml に 5~20 ng ml⁻¹ のフェノール標準溶液を添加し, 同様な操作を行い, フェノール濃度を算出した (Table 2). 回収率は河川上流部では 95~103%, 中流部では 103~105% で, 平均含有量は前者は 5.7 ng ml⁻¹, 後者は 9.3 ng ml⁻¹ であった. また他の河川水を採取し, 同様な操作をした後, 本法と既報¹⁾を用いてフェノール類の分析を行ったところ, $n=3$ に対して 7.11 ng ml⁻¹ 及び 7.08 ng ml⁻¹ の値を得, 両方法の良い一致が見られ, 本法の有用性が確認された.

4 結 言

自動制御機能を有する六方及び四方バルブと OASIS HLB Extraction Column (2.1 × 20 mm) カラムを併用した微量フェノール類の自動 FIA 法を確立した. これまでの報告の中で最も感度的に優れた方法によるフェノールの測定範囲は 0.5~60 ng ml⁻¹ であったが, 本法では 0.25~10 ng ml⁻¹ の範囲で相対標準偏差 1% 以下で測定ができ, 河川水及び水道水への適用が可能であった. 試料処理速度としては速くないが, 濃縮・溶離・検出が自動化されており, 定量下限を考慮するとフェノールの微量分析法として

有用であると考ええる.

本研究費の一部は, 文部科学省学術フロンティア推進事業「21 世紀を支えるための材料の開発—環境, エネルギー, 情報に資する材料開発のための基礎研究—」によった.

文 献

- 1) 内藤裕史, 横手規子監訳: “化学物質毒性ハンドブック”, II-271 (2000), (丸善).
- 2) 総理府令第 35 号排水基準を定める総理府令, 別表第 28 昭和 46 年.
- 3) 上水道試験方法解説編: p. 508 (1993), (日本水道協会).
- 4) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993).
- 5) 上水道試験方法: p. 395 (1993), (日本水道協会).
- 6) 高見勝重, 望月京司, 加茂智子, 杉前昭好, 中本雅雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 601 (1987).
- 7) 清水尚登, 井上嘉則: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 1107 (1994).
- 8) 伊藤純一, 広沢幸弘, 小俣雅嗣: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 959 (1994).
- 9) I. Rodriguez, M. I. Turnes, M. H. Bollain, M. C. Mejuto, R. Cela: *J. Chromatogr. A*, **778**, 279 (1997).
- 10) S. Morales, R. Cela: *J. Chromatogr. A*, **846**, 401 (1999).
- 11) 酒井忠雄, 手嶋紀雄, 粥川真帆, 沢村里美: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 677 (2000).
- 12) J. Moller, M. Martin: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **329**, 728 (1988).
- 13) Z.-L. Zhi, A. Rios, M. Valcarcel: *Analyst*, **121**, 1 (1996).
- 14) C. Kwade, R. Voigtlander, K. Cammann: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **342**, 426 (1992).
- 15) W. Frenzel, S. Krekler: *Anal. Chim. Acta*, **310**, 437 (1995).
- 16) J. F. van Staden, H. E. Britz: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**, 1066 (1997).
- 17) W.-L. Song, Z.-L. Zhi, L.-S. Wang: *Talanta*, **44**, 1423 (1997).

要 旨

JIS K 0102 では $100 \sim 500 \text{ ng ml}^{-1}$ 範囲のフェノール類の定量は容易であるが、 $10 \sim 50 \text{ ng ml}^{-1}$ レベルになると検出が困難となり、溶媒抽出法を用いる必要がある。しかし、操作の煩雑性、研究環境の汚染等を考慮すると固相抽出法の導入が好ましい。そこで、OASIS HLB による固相抽出と 4 アミノアンチピリン発色法を組み合わせたフローインジェクション分析法を検討したところ、 $0.25 \sim 10 \text{ ng ml}^{-1}$ のフェノールを 23 分ごとに自動測定することができた。フェノール類濃縮後、メタノールで溶離し、pH 10 に調整した 4 アミノアンチピリンとフェリシアン化カリウムにより発色させ、その吸光度を 505 nm で測定する。相対標準偏差も上記の濃度範囲内で 1% 以下と良好で、水試料中の微量フェノール類の定量に応用できた。