

DNPH誘導体化-HPLC法を用いた空气中アルデヒド類分析において検出された 未知物質についての考察

大貫 文^a, 菱木 麻佑^a, 斎藤 育江^a, 鈴木 俊也^a, 保坂 三継^b

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 誘導体化-液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いた空气中アルデヒド類分析において, 測定対象物質の定量を妨害する未知物質が複数検出された. 未知物質を含む試料をHPLCにより分析してピーク毎に分取し, ガスクロマトグラフ/質量分析計及びHPLCによって同定した結果, 未知物質は2,4-ジニトロヨードベンゼン (DNIB), フルフラール及びメチルイソブチルケトン (MIBK) であった. DNIBは, オゾン除去管内のヨウ化カリウムに由来するヨウ素と, アルデヒド用捕集管内のDNPHとの反応により生成したと推測された. オゾン除去管内の結露がヨウ素の生成, つまりヨウ化カリウムの溶解を促進すると考えられ, 結露を防ぐため, 使い捨てカイロで捕集管を加温した. その結果, 加湿空気を24時間通気した場合にもヨウ化カリウムは溶解しなかった. 雨天時の外気や夏季の多湿空気などを測定対象とする際には, カイロによる加温法を用いることでDNIBによる妨害を防ぐことができると考える. フルフラール及びMIBKはDNPHと誘導体を形成するカルボニル化合物である. 室内に存在する化学物質が多様化している現在, 測定対象以外のカルボニル化合物が検出される可能性は高い. 測定対象物質の定量妨害や誤同定を防ぐためには, 日々の分析において検出される標準物質のUVスペクトル等を把握しておくことが必要である.

キーワード: 2,4-ジニトロヨードベンゼン, フルフラール, メチルイソブチルケトン, 使い捨てカイロ

はじめに

空气中アルデヒド・ケトン類濃度の測定に際しては, アルデヒド・ケトン類のカルボニル基と2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下DNPHと略す) を反応させ, 生成されたDNPH誘導体を, 高速液体クロマトグラフ (以下HPLCと略す) で分析する方法が一般的である¹⁾. この方法を用いたアルデヒド類の一斉分析において, 測定対象物質の定量を妨害する未知物質が検出された事例が複数見られた. 未知物質として考えられるのはDNPH誘導体化された標準物質以外のカルボニル化合物や, DNPH誘導体及び未反応DNPHの分解生成物である^{2,3)}. 未知物質が分解生成物であった場合, 検出された原因を調査し, 定量妨害を防ぐ必要がある. そこで筆者らは, DNPH誘導体化-HPLC法において検出された未知物質について, ガスクロマトグラフ-質量分析計 (以下GC-MSと略す) 分析により原因物質を同定し, 分解生成物については生成抑制のための対応策を検討したので報告する.

実験方法

1. 測定対象空気試料

次の3試料から検出された未知物質について, 調査を行った.

試料1: 都内外気, 平均気温29.5°C, 平均相対湿度73.2

%.

試料2: 新築未入居住宅室内空気, 平均気温30.8°C, 平均相対湿度64.8%.

試料3: 新築未入居オフィスビル室内空気, 平均気温15.6°C, 平均相対湿度49.4%.

2. 試薬及び捕集管

TO11/IP-6Aアルデヒド/ケトン-DNPH 15Mix, メタクロレイン-DNPH, 2-ブタノン-DNPH, シクロヘキサノン-DNPHはスペルコ製を用いた. フルフラール, メチルイソブチルケトン (以下MIBKと略す), 2-ヘキサノン, リン酸 (85%), エタノール及びアセトニトリル (HPLC用) は和光純薬製を用いた. 2,4-ジニトロヨードベンゼン (以下DNIBと略す) は東京化成製を, DNPHはナカライテスク, ジクロロメタンは関東化学製を用いた.

捕集管はDNPH誘導体化用のアルデヒド用サンプラーを (Sep-Pak XPoSure, ウォーターズ製), オゾン除去管はヨウ化カリウムが充填されたオゾンスクラバー3種 (ウォーターズ製, GLサイエンス製, 和光純薬製) を用いた.

3. 装置及び分析条件

HPLCは, LC-10AT-SPD M10Avp (島津製作所製) を用いた. 分析条件は, カラム: ZORBAX Bonus RP (250

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

mm×4.6 mm, 粒径5 μm, アジレント・テクノロジー製), カラム温度: 40°C, 移動相A: アセトニトリル50:水50:テトラヒドロフラン0.1, 移動相B: アセトニトリル80:水20:テトラヒドロフラン0.1, グラジエント (B%): 25% (14 min) -25%/min-100% (9 min), 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 10 μL, 検出波長: 360 nm (200-400 nm) であった.

GC-MSはGC2010-GCMS QP2010 (島津製作所製) を用いた. 分析条件は, カラム: DB-1 (30 m×0.25 mm, 膜厚1 μm, アジレント・テクノロジー製), オープン温度: 50°C (1 min) -25°C/min-200°C (0 min) -3°C/min-280°C (3 min), キャリアーガス: ヘリウム (100 kPa), 検出器温度: 250°C, SCANモード (m/z 45-350) であった.

4. 空気中アルデヒド類の測定

空気の採取方法は, 上流にオゾン除去管を連結した捕集管に, 試料空気をアクティブ法により24時間 (流速0.1 L/min) 採取した. その後, 捕集管内のDNPH誘導体をアセトニトリル5 mLで溶出し, HPLC分析を行った. 標準物質のHPLCクロマトグラムをFig. 1に示す.

5. 未知物質のGC-MS分析による同定とHPLCによる確認

HPLCクロマトグラム上で検出された未知物質のHPLC溶出液を分取後, 分取液に約1/3量のジクロロメタンを加え混和した. この溶液を室温で一晩放置, 上層の溶媒層を分取し, 窒素気流下で濃縮した. この濃縮液をGC-MSにより分析し, WILEY7及びNIST147のライブラリーで検索した. ヒット率が80以上または最上位の物質を候補物質とした.

候補物質については試薬を購入し, HPLC分析により溶出時間及びUVスペクトルの確認を行った. なお, DNPH誘導体を作成する必要がある物質は, Andrewらの方法⁴⁾に準じ, 次の方法により作成した. すなわち, リン酸5 mLにDNPHを 0.5×10^{-3} mol加え, 60 °Cの水浴中で加温溶解した. 溶解液を室温まで放冷後, エタノール5 mL及びカル

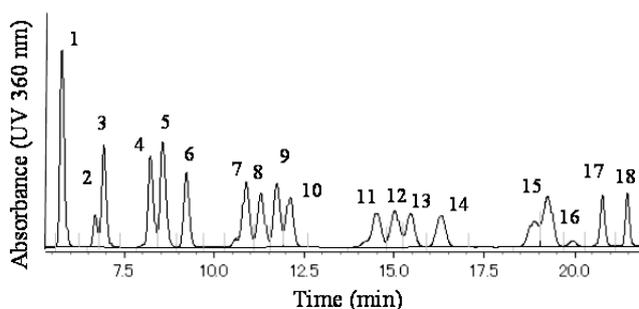


Fig.1 HPLC Chromatogram of Standard of DNPH derivatives

- 1, Formaldehyde. 2, (Z)-Acetaldehyde. 3, (E)-Acetaldehyde.
4, Acetone. 5, Acrolein. 6, Propionaldehyde. 7, Crotonaldehyde.
8, 2-Butanone. 9, Methacrolein. 10, Butylaldehyde.
11, Benzaldehyde. 12, Cyclohexanone. 13, Isovaleraldehyde.
14, Valeraldehyde. 15, *o,m,p*-Tolualdehyde. 16, (Z)-Hexanal.
17, (E)-Hexanal. 18, 2,4-Dimethylbenzaldehyde.

ボニル化合物 1×10^{-3} molを攪拌しながら徐々に加えた. 室温で1時間及び約10°Cで一晩反応させた後, 遠心分離し (2500 rpm, 10 min), リン酸をアスピレーターで除去した. 残渣を冷水で洗浄を3回行った後, エタノールを加えて, 沸騰水浴中で溶解した. 低温室で再結晶化させた後, ガラスろ過し, 得られた針状結晶を真空乾燥させた.

6. 採取時における捕集管の加温実験

上流にオゾン除去管を連結した捕集管に, 加温あり及びなしの条件を設け, 測定対象の空気をアクティブ法により24時間 (流速0.1 L/min) 採取して, アセトニトリル5 mLで溶出し, HPLC分析を行った. オゾン除去管及び捕集管の加温には市販の使い捨てカイロを利用した. 使い捨てカイロは平均温度52°C, 40°C以上の持続時間16時間と表示された製品であった.

1) 加湿空気によるヨウ化カリウムの溶解

Fig. 2に示すように, 水を入れたインピンジャーを通過させて加湿空気を調製し, (a) 室温のまま (22.1°C) または (b) 加温した条件で通気し, オゾン除去管内のヨウ化カリウムが溶解して捕集管に影響を及ぼすかどうかを調べた. この時, オゾン除去管は異なるメーカーの3製品 (A-C) を用いた.

2) 加温の有無によるアルデヒド類濃度の比較

外気のアルデヒド類濃度を測定し, 加温の有無による定量値の比較を行った. 測定は湿度の異なる日を選んで1回ずつ実施し, 18成分を定量した (各n=2).

結果及び考察

1. 未知物質の同定

試料1~3を分析して得られたHPLCクロマトグラムをFig. 3に, 未知物質のUVスペクトルをFig. 4に示す. 3試料から

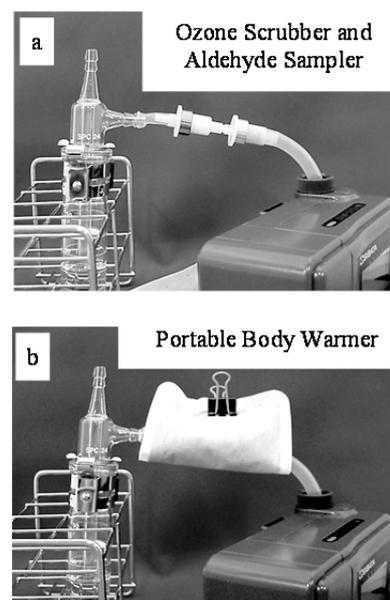


Fig.2 Collection Method of the Humidification Air

4物質の未知物質が検出され、溶出時間の早い順に Unknown Chemical (以下UCと略す) -1~UC-4とした。UC-1は(Z)-アセトアルデヒド、UC-2はプロピオンアルデヒド、UC-3はクロトンアルデヒド、UC-4はトルアルデヒドの溶出時間と一部が重なることが分かった。また、それぞれの紫外線吸収スペクトル(UVスペクトル)の極大吸収波長(λ_{max})は、UC-1が274 nm、UC-2が390 nm、UC-3が382 nm、UC-4が369 nmで、UC-2~UC-4のスペクトルは未反応DNPHのスペクトル(357 nm)と類似していた。

各未知物質の分取精製後、GC/MS分析により検索した結果、候補物質は、UC-1はDNIB、UC-2及びUC-3はフルフラール-DNPH、UC-4は2-ヘキサノン-DNPHであった。上記3物質及び2-ヘキサノンの異性体であるMIBKのDNPH誘導体についてHPLC分析による同定を行った。その結果、UC-1はDNIB、UC-2及びUC-3はフルフラール-DNPH、UC-4はMIBK-DNPHであることが判明した。

フルフラール-DNPHについては2本のピークが検出されたが、これは構造異性体によるものと考えられた。また、UC-4の候補物質である2-ヘキサノン-DNPHについては、UC-4の溶出時間と異なっていたため、UC-4ではないと判断した。

2. DNIBによる妨害を防ぐ方法の検討

1) DNIBが検出された理由の推測

DNIBはDNPHと同じベンゼン環を持ち、かつヨウ素を含む構造である(Fig. 5)。このことから、捕集管内のDNPHとヨウ素とが反応し、DNIBが生成されたと考えられた。

ヨウ素の発生源は、オゾン除去管に含まれるヨウ化カリウムと考えられた。ヨウ化カリウムは潮解性を有した水に溶けやすい物質で、その溶解は吸熱反応である。通気した空气中に水蒸気が多く存在すると、①ヨウ化カリウムが潮解、②溶解時の吸熱反応により空气中的水蒸気が凝集、除去管内に結露が発生、③水分によりヨウ化カリウムの溶解が促進、④溶解したヨウ素が下流の捕集管に流入、⑤ヨウ素とDNPHと反応、以上の5経路を経てDNIBが生成されたと推測された。

そこで、DNIBによる妨害を防ぐために、結露を防止してヨウ化カリウムの溶解を抑制し、DNIBの生成を防ぐことが有効と考えられ、そのための方法として、空気採取時にオゾン除去管及び捕集管を加温する方法を検討した。

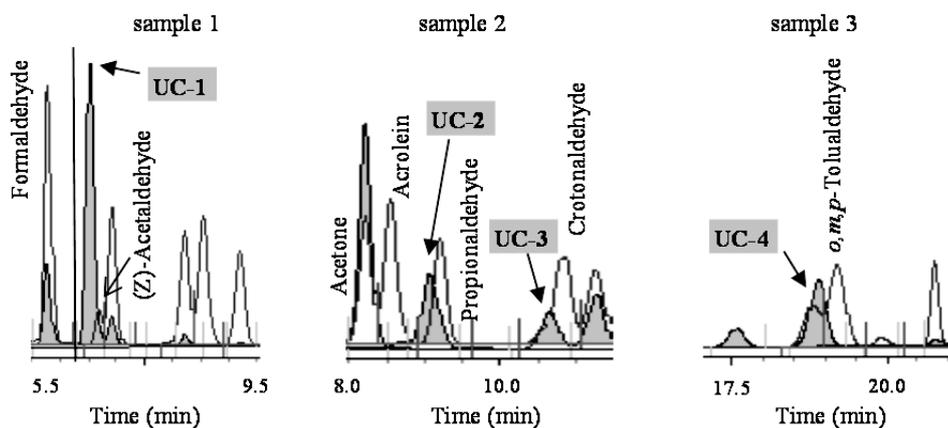


Fig.3 HPLC Chromatogram of Standard and Samples

Chromatogram of a solid line is standard, and gray filling are samples.

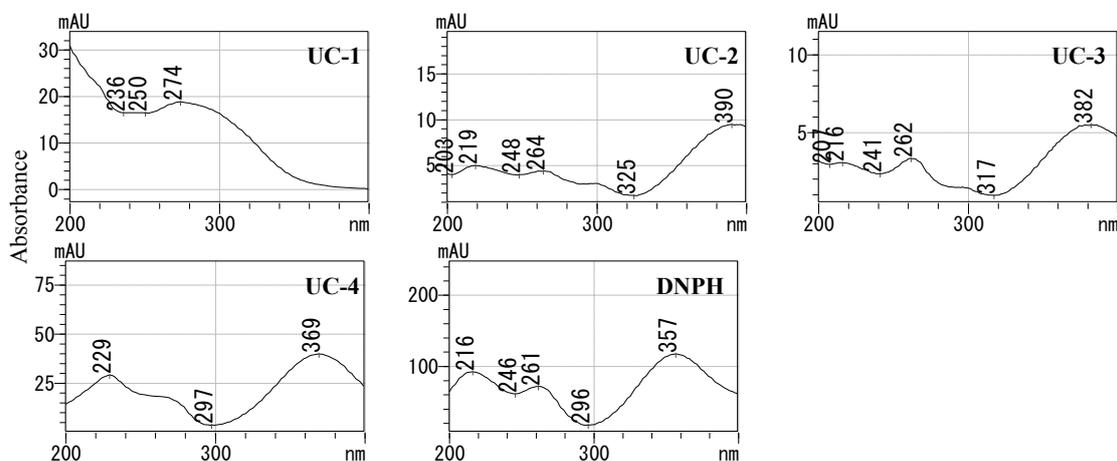


Fig. 4 UV Spectra of Unknown Chemical (UC) and DNPH

2) 採取時における捕集管の加温実験

(1) **加温時の捕集管温度** カイロによる加温時の捕集管温度及び外気温の変動をFig. 6に示す. 開始から約20時間の捕集管温度は外気温に比べ10~20°C高く, 20~24時間についても5~10°C高い状態を保っていた. これにより, 24時間の採取時間において吸熱反応による冷却を緩和し, 結露を防ぐ可能性があることが分かった.

(2) **加湿空気によるヨウ化カリウムの溶解** 加湿空気を24時間通気した後のオゾン除去管(上流側)及び捕集管(下流側)をFig. 7に示す. 捕集管等は, (a)左からA-RT(オゾン除去管A, 室温), A-hot(オゾン除去管A, 加温), B-RT(オゾン除去管B, 室温), B-hot(オゾン除去管B, 加温), C-hot(オゾン除去管C, 加温), (b)C-RT(オゾン除去管C, 室温)である.

室温の場合, いずれもオゾン除去管内のヨウ化カリウムが溶解し, 下流の捕集管内DNPHを変色させた. 一方, 加温した場合にはヨウ化カリウムの溶解は確認されず, 捕集管内DNPHの変色も見られなかった.

(3) **加温の有無によるアルデヒド類濃度の比較** 外気2か所のアルデヒド類濃度をTable 1に示す. 平均気温, 平均相対湿度及び最大相対湿度は, 外気1がそれぞれ23.3°C, 54%及び75%, 外気2がそれぞれ29.2°C, 76%及び92%であった.

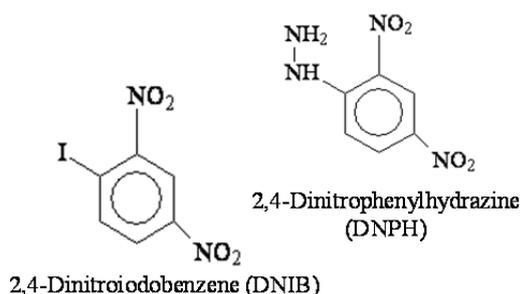


Fig.5 Structural Formula of DNPH and DNIB

外気からは測定対象の18成分のうち, ホルムアルデヒド, アセトアルデヒド及びアセトンが検出された.

検出された3物質について, 加温の有無による濃度差は見られず, 加温によるDNPH誘導体の分解等は生じないと考えられた. なお, 今回の測定では, 全てのオゾン除去管内においてヨウ化カリウムの溶解は確認されなかった.

3. カルボニル化合物について

試料2及び試料3において検出された未知物質は, カルボニル化合物のフルフラール(Fig. 3, UC-2, UC-3)及びMIBK(Fig. 3, UC-4)であった.

フルフラールは木材の燃焼や炭水化物の熱分解により生成され, 自動車の排気ガスにも含まれている⁵⁾. また, アーモンド様香気を持つ合成香料で, ココア, コーヒー, パン, 果物, 野菜などに含まれている物質である⁶⁾. MIBKは樹脂の溶解性に優れ揮発しやすいため, 塗料やインキ等の溶剤に広く使用されており⁷⁾, 市販の壁紙から放散する場合も認められた. 両物質とも空气中に広く存在しており, 今後も検出される可能性は高い. また, 近年の新築住宅における化学物質は多様化しており⁸⁾, これらの2物質以外にもカルボニル化合物が検出される可能性は高い. したがって, 測定対象物質を正確に定量するためには, それら物

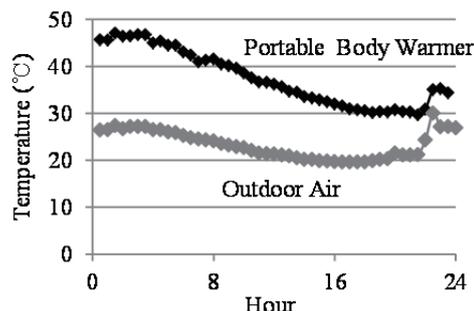


Fig.6 Temperature of Ozone Scrubber and Aldehyde Sampler

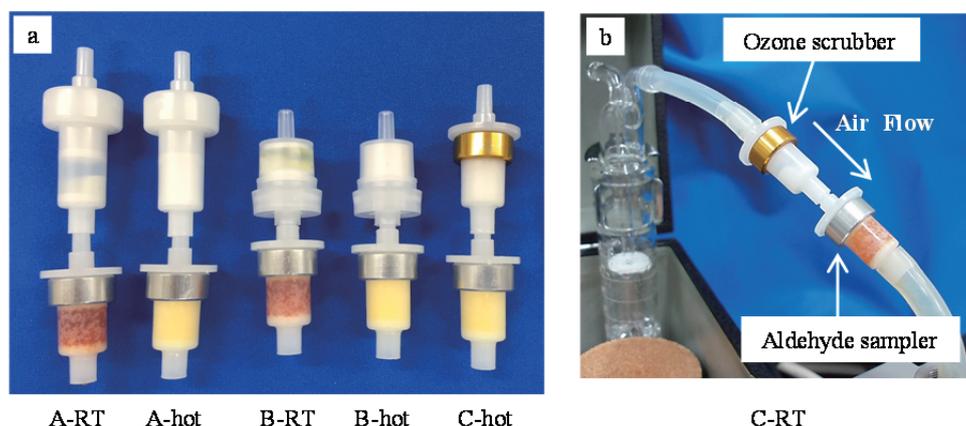


Fig.7 Ozone Scrubber and Aldehyde Sampler after the 24 Hours Collection

- (a) A,B-RT : Ozone scrubber A,B and aldehyde sampler were at the room temperature.
 A,B,C-hot : Ozone scrubber A,B,C and aldehyde sampler were heated by a portable body warmer.
 (b) C-RT : Ozone scrubber C and aldehyde sampler were at the room temperature.

質を同定し測定対象物質と分離する必要がある。本研究では、①未知物質の分取及び精製、②GC/MSによる分析及びライブラリー検索、③候補物質のHPLC分析による再確認、の3工程により未知物質を同定した。この工程をより簡便にするために、カルボニル化合物の推測方法を検討した。

1) 保持時間及び λ_{\max} を用いた未知物質推測方法の検討

フルフラール及び MIBK を含むカルボニル化合物の構造式及び分子量と、DNPH 誘導体の保持時間及び極大吸収波長 (λ_{\max}) を示す (Table 2)。

分子量と保持時間との関係を調べた結果、分子量が小さい順に溶出することが分かった。しかし、鎖状物質と環状

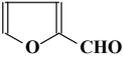
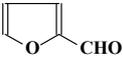
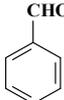
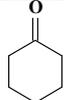
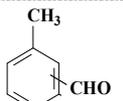
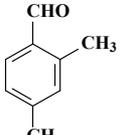
Table 1 Concentration of Aldehydes in the Outdoor Air

Sample	Scrubber	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
		Formaldehyde	Acetaldehyde	Acetone
Outdoor 1	C-hot	4.4	4.3	15.4
	C-hot	4.3	4.2	15.1
	C-OT	4.5	3.6	14.4
	C-OT	4.4	3.6	14.5
Outdoor 2	C-hot	3.4	2.0	15.5
	C-hot	3.3	2.0	13.7
	C-OT	3.2	2.0	16.1
	C-OT	3.1	1.9	13.8

C-hot : Ozone scrubber C and aldehyde sampler were heated by a portable body warmer.

C-OT : Ozone scrubber C and aldehyde sampler were at the temperature of the outdoor air.

Table 2. Chemical Material Information and Retention Time (tR), Maximum Absorbance Wavelength (λ_{\max}) of the DNPH Derivative

Chemicals	Structural Formula	Molecular Weight	DNPH-derivative	
			tR (min)	λ_{\max}
Formaldehyde	H-CHO	30.02	5.84	354
Acetaldehyde	CH ₃ -CHO	44.04	(Z) 6.74 (E) 6.98	362
Acetone	CH ₃ -CO-CH ₃	58.08	8.28	369
Acrolein	H ₂ C=CH-CHO	56.06	8.59	374
Furfural 1*		96.09	9.09	390
Propionaldehyde	C ₂ H ₅ -CHO	58.08	9.24	362
Furfural 2*		96.09	10.73	382
Crotonaldehyde	CH ₃ CH=CH-CHO	70.09	10.87	381
2-Butanone	C ₂ H ₅ -CO-CH ₃	72.11	11.30	369
Methacrolein	H ₂ C=C(CH ₃)-CHO	70.09	11.71	374
n-Butylaldehyde	C ₃ H ₇ -CHO	72.11	12.06	365
Benzaldehyde		106.12	14.45	384
Cyclohexanone		98.14	14.96	372
Isovaleraldehyde	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -CHO	86.13	15.36	360
Valeraldehyde	C ₄ H ₉ -CHO	86.13	16.19	361
Methylisobutylketone*	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -CO-CH ₃	100.16	(Z) 17.73 (E) 19.07	369
<i>o,m,p</i> -Tolualdehyde		120.15	18.74 19.16	388
Hexanal	C ₅ H ₁₁ -CHO	100.16	(Z) 19.98 (E) 20.91	361
2,4-Dimethylbenzaldehyde		134.18	21.68	388

*DNPH derivatives of furfural and MIBK were made for this examination.

物質の保持時間をみると、分子量が同程度の場合、例えばシクロヘキサノン (MW : 98.14) と MIBK (MW : 100.16) 及びヘキサナール (MW : 100.16) では、環状のシクロヘキサノンの方が5分以上早く溶出した。つまり、ある鎖状物質 A と保持時間が近い未知物質が検出された場合、それが環状物質であれば鎖状物質 A の分子量よりも大きい分子量を持つ物質であることが推測された。

また、構造式と λ_{\max} との関係については、構造式によって波長範囲が異なることが分かった。飽和鎖状アルデヒド類の波長範囲は 354~365 nm, ケトン類は 369 nm, 不飽和及び環状アルデヒド類は 374~390 nm とそれぞれ集中していたことから、未知物質の λ_{\max} より構造式の推測が可能であると考えられた。

以上のことから、標準物質以外のカルボニル化合物が検出された際には、 λ_{\max} から構造式が、保持時間と構造式から分子量が推測でき、前述の①及び②の工程を省略した簡便な同定法として利用できると考える。

ま と め

空气中アルデヒド類測定法の一つであるDNPH誘導体化-HPLC法において複数の未知物質が見られる試料があった。検出された未知物質を分離同定した結果、DNIB, フルフラール-DNPH及びMIBK-DNPHであることが分かった。

DNIBはオゾン除去管内のヨウ化カリウムが溶解し、流出したヨウ素と捕集管内のDNPHとが反応して生成されたと考えられた。ヨウ化カリウムが溶解した原因として、採取空气中の水蒸気によりヨウ化カリウムが潮解、溶解時の吸熱反応により捕集管が冷却、結露が生じ、その水分により溶解が促進されたと考えられた。そこで、採取時に捕集管等を使い捨てカイロで加温した結果、ヨウ化カリウムの溶解及びDNIBの生成を抑制することが可能であることが

分かった。雨天時の外気や夏季の多湿空気等、水分の多い空気試料を採取する機会は多く、使い捨てカイロによる加温法は、それらに適用できる簡便で有効な方法であることが確認された。

フルフラール及びMIBKのようなカルボニル化合物は、カルボニル基と誘導体を生成させるDNPH誘導体化-HPLC法において、今後も検出される可能性が高い。特に、室内空气中化学物質の発生源は、建材、食品、生活用品など幅広く、どのような物質が検出されるか予想がつかない。測定対象物質の定量妨害や誤同定を防ぐためには、日々の分析において検出される標準物質のUVスペクトル等を把握しておくことが必要である。

文 献

- 1) 光崎 純, 平野耕一郎, 白砂裕一郎, 他 : 室内環境学会誌, 11(2), 125-134, 2008.
- 2) Waters : アルデヒドサンプラーマニュアル, 2001.
- 3) 池浦太莊, 柳川正男, 大野ちづ子 : 大気環境学会誌, 36(4), 195-207, 2001.
- 4) Andrew G.H.Lea, Graeme D.Ford, Susan Fowler : International Journal of Food Science and Technology, 35, 105-112, 2000.
- 5) 国際医薬品食品衛生研究所 : CICAD, No.21 2-furaldehyde, 2006.
- 6) 印藤元一 : 合成香料, 増補改訂版, 230, 2005, 化学工業日報社, 東京都.
- 7) 東 賢一, 池田耕一, 久留飛克明, 中川雅至, 長谷川あゆみ, 森 有紀子, 山田裕巳 : 建築に使われる化学物質事典, 第一版, 336-338, 2006, 風土社, 東京都.
- 8) 大貫 文, 齋藤育江, 多田宇宏, 他 : 東京健安研七周年報, 60, 245-251, 2009.

Consideration of the Interfering Chemicals detected in an Aldehyde Analysis in the Air by using a DNPH-HPLC MethodAya ONUKI^a, Mayu HISHIKI^a, Ikue SAITO^a, Toshinari SUZUKI^a and Mitsugu HOSAKA^a

Several chemicals that interfere with the quantitative analysis of a target substance were detected in an analysis of aldehydes by using the DNPH derivatization/HPLC method. The HPLC fraction of the interfering chemicals was analyzed by GC-MS, and the interfering chemicals were identified as 2,4-dinitroiodobenzene (DNIB), furfural, and methylisobutylketone (MIBK). It was suggested that DNIB was the reaction product of DNPH and iodine generated by the dissolution of potassium iodide in the ozone remover. The generation of iodine by the dissolution of potassium iodide was considered to be promoted by dew condensation in the ozone remover. In order to prevent the dew condensation, when the ozone remover and aldehyde sampler were heated with a portable body warmer for 24 h, the potassium iodide did not dissolve. In the measurements of aldehyde in humid air such as on a rainy day and in the summer, it is possible to prevent the production of DNIB by heating the samplers by a portable body warmer. Furfural and MIBK are carbonyl compounds and react with DNPH. Recently, various chemicals have been present in indoor air, carbonyl compounds other than the target substance are more likely to be detected. It is necessary to understand the UV spectra of the standard substances detected in routine analysis in order to prevent a quantitative analysis of the target substance and misrecognition with an interfering chemical.

Keywords: 2,4-dinitroiodobenzene, furfural, methylisobutylketone, portable body warmer

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

