

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19550089

研究課題名（和文） ノニルフェノール側鎖の構造解析手法の確立

研究課題名（英文）：A method for structural analysis of alkyl side chain in nonylphenols

研究代表者

角井 伸次（TSUNOI SHINJI）

大阪大学・環境安全研究管理センター・助教

30252604

研究成果の概要：ノニルフェノール（NP）は、内分泌かく乱作用を示す物質で、数多くの異性体の混合物である。しかし、それらは分離、構造解析、合成が困難なため、ノニル基のベンゼン環に結合した炭素（ α 位）以外の構造は解明することができなかった。本研究では、アセトニトリルを試薬イオンとして用いた化学イオン化－タンデム質量分析により、さらに環から離れた β 位と γ 位の炭素の分岐構造に関する情報が得られることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ノニルフェノール、構造解析、化学イオン化、アセトニトリル、異性体

1. 研究開始当初の背景

- ・ノニルフェノール（NP）は、異性体により異なる内分泌攪乱作用を示す（ref. 2,3）
- ・NP混合物中、10数種類の異性体の構造が決定されている（ref. 1,4,5）
- ・NPは、異性体により環境中の挙動が異なる（ref. 6,7）

このような背景の下、NPの異性体別分析法の開発が取り進められているが、以下に示

したように多くの問題点がある。

- ・異性体間の内分泌攪乱作用の差を考慮していない
- ・クロマトグラフィーによる分離が困難である
- ・構造未確認の異性体が多い
- ・異性体の標準品が入手できない（合成が困難である）
- ・20種類以上の異性体のうち、構造が確定し

ている 10 種類程度の異性体のみを分析対象としている

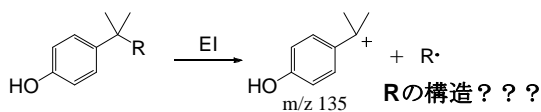
これらの問題は、ノニルフェノール (NP) の構造を解析できないことが大きな要因である。つまり、構造が判明すれば合成し、それを標準品として用いることにより、精確に定量することができ、さらに内分泌攪乱性も評価することが可能となる。

2. 研究の目的

ノニルフェノールの内分泌攪乱性を大きく左右する側鎖の分岐情報を GC-MS で得ることである。

3. 研究の方法

一般に NP の EI-マススペクトルは、ベンジル位で解裂が起こるため α 位以外の構造情報はほとんど得ることができない (下図)。



本研究では、EI よりソフトなイオン化である CI (化学イオン化) を用いて、より分子イオンに近いイオンを生成させ、タンデム質量分析によりそのイオンの構造を解析することを計画した。さらに NP に加えてトリメチルシリル化 (TMS 化) した NP についても検討を行った。検討項目を以下にまとめた。

(1) EI-MS 分析と解析

- ① NP
- ② NP-TMS

(2) イソブタン CI-MS 分析と解析

- ① NP
- ② NP-TMS
- ③ NP-TMS のタンデム質量分析

(3) アセトニトリル CI-MS 分析と解析

- ① NP
- ② NP-TMS

③ NP-TMS のタンデム質量分析

(4) NP-TMS のアセトニトリル CI-MS 分析におけるフラグメンテーションの解析

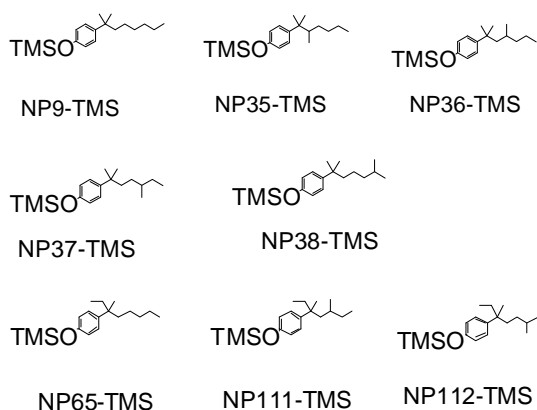
- ① ベンゼン環の影響
- ② 反応イオンの影響
- ③ 標識化合物を用いた検討
- ④ $[\text{M}+13]^+$ の生成機構

(5) NP-TMS のアセトニトリル CI-MS-MS 分析におけるフラグメンテーションの解析

(6) NP 混合物の分析と解析

4. 研究成果

分析した NP 異性体のトリメチルシリル誘導体は以下に示した。項目ごとに記載する。



(1) EI-MS 分析と解析

① NP

まず、 α 位がジメチル分岐した NP 異性体について EI-MS 測定した。これらの異性体 (NP35、NP36、NP37、NP38、NP9、命名は ref. 13 による) はそれぞれ α 位の構造が同じで、メチル分岐の位置が異なる異性体である。これらの異性体の EI-スペクトルにほとんど差はなく、すべての異性体が $m/z\ 135$ の安定なベンジルフラグメントを生じる。

また、 α 位がエチルメチル分岐した 3 種類の異性体 (NP65、NP111、NP112、命名は ref. 13) についても EI-MS 測定を行った。

これらの異性体もまた、安定なベンジルフラグメント(m/z 149, 191)を生じ、異性体間のマススペクトルに違いが無かった。つまり、ノニル基の α 位以外の部分の構造に関する情報を読み取ることが出来ない。

② NP-TMS

GCで極性化合物を測定する場合、極性基の誘導体化が行われる。NPの誘導体化としては、一般的に、ヒドロキシル基のTMS化がよく行われる。

NP-TMSについても、 α 位がジメチル分岐した5種類の異性体についてEI-MS測定を行った。マススペクトルからは、安定なベンジルフラグメント(m/z 207)が顕著に生成し、NP-TMSのEI-MS測定でも、ノニル基の α 位以外の構造に関する情報は得られなかった。

(2) イソブタンCI-MS分析と解析

次に解裂を抑える目的でイソブタンを用いた5種類のNPもしくは5種類のNP-TMSについて化学イオン化を行った。

① NP

NPをイソブタンCI-MS測定した場合、やはり安定なベンジルフラグメント(m/z 135)が顕著に生成した。また、わずかであるが、分子イオンピーク $[M+1]^+$ (m/z 221)が生成した。しかし、イソブタンCI-MSでNPを測定した場合でも、異性体間のマススペクトルに違いは無く、ノニル基の位以外の構造に関する情報は得られなかった。

② NP-TMS

NP-TMSの場合にも、安定なベンジルフラグメント(m/z 207)がベースピークとなり、その他のフラグメントからも、異性体間でマススペクトルは生じなかった。しかし、NP-TMSのイソブタンCI-MS測定では、 $[M+1]^+$ (m/z 293)が

豊富に生成した。

③ NP-TMSのタンデム質量分析

イソブタンCI-MSで生成した分子量関連イオン $[M+1]^+$ (m/z 293)が豊富に生成したので、このイオンについてCI-MS/MS測定を行ったが、5種類のNP-TMSのタンデムマススペクトルを解析することは困難であった。

(3) アセトニトリルCI-MS分析と解析

イオン化試薬にアセトニトリルを用いたCI-MSで5種類のNPおよび5種類のNP-TMSを測定した。

① NP

アセトニトリルCI-MSでは、イソブタンでの $[M+1]^+$ が生成せず、代わって $[M+13]^+$ (NP: m/z 233)が生成した。

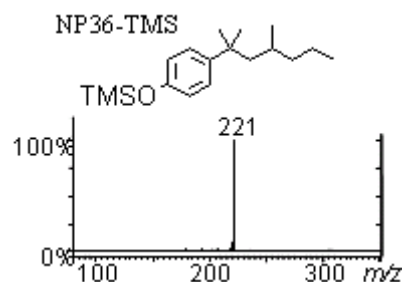
② NP-TMS

NPと同様に、 $[M+13]^+$ (NP-TMS: m/z 305)が生成した。これは、分子イオンピークより質量数が大きいことから、NPもしくはNP-TMSに試薬イオンが付加し生成したものと考えられる。

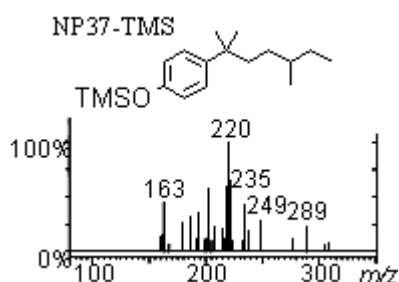
③ NP-TMSのタンデム質量分析

アセトニトリルCI-MSで生成した $[M+13]^+$ (NP: m/z 233、NP-TMS: m/z 305)のうち、特に豊富に生成したTMS誘導体でCI-MS/MS測定を行った。

これら5種類のNP-TMSのうち、 β 位(NP35-TMS)、 γ 位(NP36-TMS)にメチル分岐がある異性体では、 m/z 305から選択的に m/z 221にフラグメンテーションした。



これら以外の異性体では、フラグメンテーションが非選択的でスペクトルが複雑であった。



(4) フラグメンテーションの解析

$[M+13]^+$ の生成機構を検討した。

① ベンゼン環の影響

種々の化合物を検討した結果、ベンゼン環のある化合物で、 $[M+13]^+$ のイオンが生成することがわかった。たとえば、ベンゼン環を持たないアルコールの TMS 誘導体では $[M+13]^+$ のイオンが生成しなかった。

このことから、ベンゼン環は $[M+13]^+$ の生成直接関与していることがわかった。

② 反応イオンの影響

CI 条件化においてアセトニトリルを試薬ガスとして用いた場合、アセトニトリルから発生するイオンのうち、どのイオンが $[M+13]^+$ の反応イオンとして働いているかについて検討した。

CI 条件化におけるアセトニトリルから発生するイオンは m/z 40 (CH_2CN)、42 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{NH}$)、54 ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{N}=\text{CH}_2$) の三種類である。

装置の設定により、反応させるイオンをかえることにより、 $[M+13]^+$ の生成には m/z 40 ($+\text{CH}_2\text{CN}$) が関与していることがわかった。

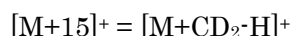
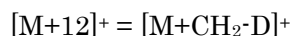
③ 標識化合物を用いた検討

フェニル基の水素が重水素化された NP- d_4 では、 $[M+12]^+$ (m/z 308) のイオンが生成したこと、アセトニトリルに代わり

CD_3CN を用いた場合、 $[M+15]^+$ (m/z 307) のイオンが生成したこと、 $[M+13]^+$ のイオンに関して次の事が分かった。



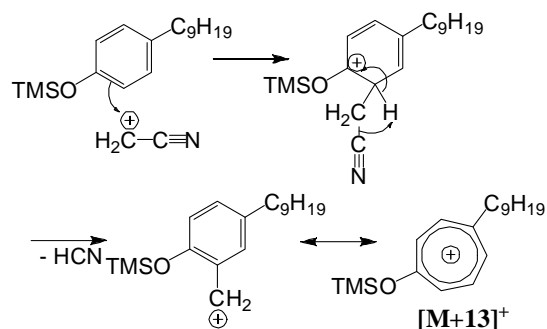
ここで、 CH_2 はアセトニトリルから発生した m/z 40 のイオンに由来しており、H は NP のベンゼン環上の水素である。



また、 $[M+13]^+$ のイオンが生成するにはベンゼン環が必須条件であることから、 m/z 40 のイオン由来のメチレンは試料分子のベンゼン環に付加していると思われた。

④ $[M+13]^+$ の生成機構

以上の検討から、考えられる $[M+13]^+$ の生成機構を下に示す。



アセトニトリルから発生した m/z 40 のイオンが NP-TMS の酸素原子の σ 位に求電子攻撃をする。その後、求電子攻撃を受けた炭素原子に結合していた水素原子が CN 基と共に HCN の形で脱離する。その結果生成した $[M+13]^+$ のイオンは、共鳴安定化によりトロピリウムイオン構造を取っていると考えられる。

このような $[M+13]^+$ のトロピリウムイオンの生成に関しては、既にイオン化試薬にジメチルエーテル (DME) (ref. 11) やテトラヒドロフラン (THF) (ref. 12) 等を用いた CI-MS では報告例がある。しかし、

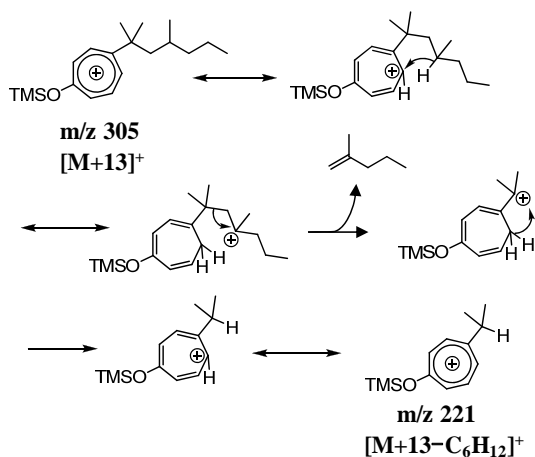
アセトニトリルによる[M+13]⁺の報告例は無く、本研究が初めてである。

(5) NP-TMSのアセトニトリルCI-MS-MS分析におけるフラグメンテーションの解析

NP-TMSをアセトニトリルCI-MSで測定したときに生成する[M+13]⁺ (*m/z* 305)のイオンについて、CI-MS/MS測定を行った。合成したNP異性体を用いて、フラグメントが選択的な異性体とフラグメントが非選択的な異性体に分類した。

フラグメントが選択的なNP異性体は、主に①γ位が第3級の構造、②γ位が第2級でβ位が第3級の構造、という二つのグループに分けることができた。また、これらのNP異性体のフラグメンテーションの質量電荷比はそれぞれ、*m/z* 193(305-C₈H₁₆)、*m/z* 221(305-C₆H₁₂)、*m/z* 235(305-C₅H₁₀)、*m/z* 249(305-C₄H₈)、であることから、*m/z* 305から選択的にアルケンが脱離していることを示唆している。

[M+13]⁺のCI-MS/MSで、考えられるフラグメンテーション機構を以下に示す。



γ位が第三級のNP-TMSの場合、トロピリウムイオンから、ノニル基のγ位へのカチオン転位が生じる。その後、ノニル基の開裂によって、多置換アルケンが脱離する。さらに、カチオン部分は転位により安定なトロピ

リウムイオン構造をとると考えられる。

γ位が第二級でβ位が第三級のNP-TMSの場合も、同様の機構でフラグメンテーションをする。

これら以外のNP-TMSの場合、より不安定なカチオンへのカチオン転位、もしくは、安定な多置換アルケンが脱離しない、という構造上の制約があるため、フラグメンテーションが非選択的になったものと考えられる。

β位とγ位の分岐で以下の表にまとめた。

		γ炭素		
		2級	3級	4級
β炭素	2級	非選択的	選択的	非選択的
	3級	選択的	選択的	非選択的
	4級	選択的	選択的	非選択的

*表中背景がグレーのセルは機構より推定。

(6) NP異性体混合物(NPmix)の分析と解析

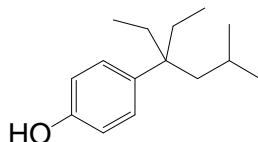
アセトニトリルCI-MS/MS測定を行ったが、これだけではやはり情報量が不十分であった。原因は、GCでの分離が不十分であることおよび、含有率が少ない異性体が他の異性体と分離が不十分である場合特に解析が困難であった。そこで、EI-MS測定とアセトニトリルCI-MS/MS測定を併用することにより、市販のNP異性体混合物(NPmix)中の未知異性体の構造解析を行った。

さらに、NPmixのNMR測定から、α位が第2級、第3級の構造の場合、ベンジルプロトンが存在するが、測定から、NPmix中でα位が第2級、第3級の構造の異性体の含有率を推測したところ、3.5%以下であることが分かり、NPmix中の異性体の大部分はα位が第4級の構造であると推定された。このことは、合成時の機構とも矛盾しない。α位が第4級の構造である異性体は40種類である

(ジアステレオマーは除く)。この前提条件と EI と CI の情報を併用し解析を行った。

このようにして構造を限定していくことにより、以下の構造の NP の存在を確認することができた。

また、未知異性体の主要なピークの構造を数種類に限定することもできた。



さらにこれまで他の研究グループにより報告された異性体も、確認することができた。

今後は、他の化合物への応用、他の試薬ガスでの検討など広がっていくと期待される。

References

- 1) T.F. Wheeler, J.R. Heim, M.R. Latorre, A.B. Janes, *J. Chromatogr. Sci.*, 35, 19-30, (1997).
- 2) Y.S. Kim, T. Katase, S. Sekine, T. Inoue, M. Makino, T. Uchiyama, Y. Fujimoto, N. Yamashita, *Chemosphere*, 54, 1127-1134 (2004).
- 3) T.G. Preuss, J. Gehrhardt, K. Schirmer, A. Coors, M. Rubach, A. Russ, P.D. Jones, H.T. Ratte, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5147-5153 (2006).
- 4) B. Thiele, V. Heinke, E. Kleist, K. Guenther, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (12) 3405-3411 (2004).
- 5) A.S. Ruß, R. Vinken, I. Schuphan, B. Schmidt, *Chemosphere*, 60, 1624-1635 (2005).
- 6) 堀井勇一、片瀬隆雄、金 倫碩、山下信義、*分析化学*, 53, 1139-1147 (2004).
- 7) Y.S. Kim, T. Katase, Y. Horii, N. Yamashita, M. Makino, T. Uchiyama, Y. Fujimoto, T. Inoue, *Marine Pollut. Bull.*, 51, 850-856 (2005).
- 8) T. Ieda, Y. Horii, G. Petrick, N. Yamashita, N. Ochiai, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 7202-7207 (2005).
- 9) M. Moeder, C. Martin, D. Schlosser, J. Harynuk, T. Gorecki, *J. Chromatogr. A*, 1107, 233-239, (2006).
- 10) H. Shioji, S. Tsunoi, Y. Kobayashi, T. Shigemori, M. Ike, M. Fujita, Y. Miyaji, and M. Tanaka. *J. Health Sci*, 52(2), 132-141 (2006).
- 11) J. Brodbelt, C.C. Liou, T. Donovan. *Anal. Chem.*, 63, 1205 (1991).
- 12) S.H. Tzing, A. Ghule, J.Y. Chang, Y.C.

Ling, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 811 (2003).

- 13) K. Guenther.; E. Kleist.; B. Thiele. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 542 (2006).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) [雑誌論文] (計 0 件)

(2) [学会発表] (計 2 件)

- ① 発表者：角井伸次、近藤和宏、小林陽介、芝田育也

発表表題：化学イオン化および電子イオン化質量分析を用いるノニルフェノール異性体の構造決定

学会名：日本分析化学会第 57 年会

発表年月日：平成 20 年 9 月 1 2 日

発表場所：福岡大学

- ② 発表者：角井伸次、小林陽介、志村優子、近藤和宏、塩路浩隆、田中 稔、芝田育也

発表表題：化学イオン化タンデム質量分析を用いるノニルフェノール異性体の構造解析

学会名：日本分析化学会第 56 年会

発表年月日：平成 19 年 9 月 20 日

発表場所：徳島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角井 伸次 (TSUNOI SHINJI)

大阪大学・環境安全研究管理センター・助教

研究者番号：30252604

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者