

フェノールの定量法とその関連環境ホルモンへの応用について

近畿職業能力開発大学校 登 成 健之介

Quantitative Analysis of Phenol and its Application to Phenol Related Endocrine Disrupters

Kennosuke TONARI

要約 フェノールの定量法には臭素との反応性を用いた滴定法や *p*-ニトロアニリンのジアゾニウム塩との反応を用いた吸光分析法等が知られており、これらの方法の信頼性を確認する共に、これらの方法によるフェノール関連環境ホルモン（ビスフェノール A とノニルフェノール）への適応性について検討した。

フェノールにおける滴定法の反応条件、試薬量を検討し、得られた適正条件をビスフェノール A、ノニルフェノールの滴定にも適用することにより、再現性ある結果が得られることが判った。また、吸光分析法におけるフェノール、ビスフェノール A およびノニルフェノールは直線性ある検量線が得られるが、ビスフェノール A およびノニルフェノールは濃度による吸光度変化が小さいため、感度上昇させる方法の必要性が認められた。

緒言

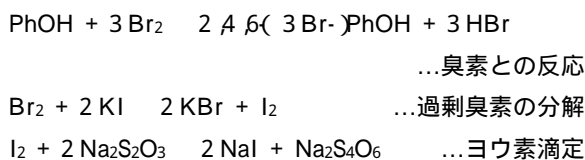
フェノールはプラスチック製造原料の他、染料等、各種化学製品に多用され、その影響については環境上、注目されている物質であり、その類縁体であるビスフェノール A は接着剤はじめ、ポリカーボネート系の食器に用いられ、環境ホルモン作用（外因性内分泌攪乱化学物質）を有するとされている。また、ノニルフェノールは界面活性剤として使用される他、プラスチック製品、潤滑油にも用いられ、最近、環境ホルモン作用が確認された物質である。⁽¹⁾⁽²⁾ これらフェノール類似物質の定量法として、フェノールの既知定量法（臭素との反応性を用いた滴定法⁽³⁾⁽⁴⁾と *p*-ニトロアニリンを用いたジアゾ化法による吸光分析法⁽⁵⁾）の適用性を検討した。

実験方法

2 - 1) フェノール滴定

本法は臭素酸カリウムと臭化カリウムより臭素を発生させ、定量的にトリプロモフェノールができることを用いた方法で、未反応の臭素はヨウ化カリウムでヨウ素とし、チオ硫酸ナトリウム（ハイポ）で滴定する方法である。⁽³⁾⁽⁴⁾

即ち、



2 - 2) フェノール滴定試薬調整

- ・フェノール（1500ppm）…市販特級試薬フェノール150mgを100mlの三角フラスコにとり、水を加えて加温溶解し、100mlにメスアップする。
- ・0.05M - 臭素液…0.7gの市販特級臭素酸カリウム

- と3.75g 臭化カリウムを250ml のメスフラスコにとり、水で250ml にメスアップする（冷暗所保存）。
- ・30%ヨウ化カリウム...市販特級ヨウ化カリウム30g をビーカーにとり、水70ml を加え、褐色試薬瓶に保存する。
- ・0.05N - チオ硫酸ナトリウム...市販特級試薬チオ硫酸ナトリウム・5水和物12.5g と炭酸ナトリウム0.1g を1L のメスフラスコにとり水でメスアップする。

2 - 3) フェノール滴定操作法

フェノール (1500ppm) 2 ml を密栓付き三角フラスコ100ml にとり、0.05M - 臭素液10ml を加える。次に濃塩酸 1 ml を加え、25 ~ 30 秒、時々攪拌し、30分放置する。その後、30%ヨウ化カリウム 6 ml を添加し、0.05N - チオ硫酸ナトリウムで滴定を始め、色が薄くなるとデンプン指示薬数滴加え、さらに滴定を続け、しばらく色がつかない時点を終点とする。(滴定量 a_1 ml)

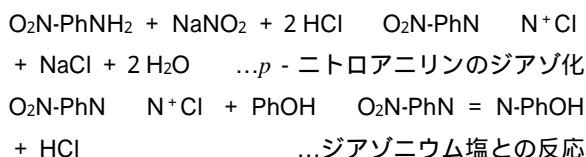
同様操作で、フェノールの代わりに、水 2 ml 用いて空試験を行う (滴定量 b_1 ml)。

- ・1500ppmフェノール 2 ml サンプルングすると2.97mg
 $\text{PhOH} = 0.032\text{mmol} \quad 0.096\text{mmol Br}_2 = 0.0192\text{meq Br}$
- ・0.05M- Br_2 10ml は 0.5mmol $\text{Br}_2 = 1\text{meq Br}$
 従って、フェノールと反応して余る臭素量は
 $1 - 0.0192 = 0.808\text{meq Br}$
 0.05N - チオ硫酸ナトリウム理論滴定量 : $a_1 = 16.16\text{ml}$ 、 $b_1 = 20\text{ml}$ となる。
 また、0.05N - チオ硫酸ナトリウム 1 ml 0.05meq Br
 $0.05 \times 1 / 6\text{mmol PhOH} = 0.783\text{mg PhOH}$
 であり、この場合の理論フェノール量は $0.783 (b_1 - a_1) = 0.783 (20 - 16.16) = 3.00\text{mg}$ でサンプルング時のフェノール量とほぼ一致する。

2 - 4) フェノール吸光分析

p-ニトロアニリンをジアゾ化した後、これがフェノールのパラ位と反応することを用いた吸光分析法である。⁽⁵⁾

即ち、



2 - 5) フェノール吸光分析試薬調整

- ・フェノール (30ppm) ...先の1500ppm フェノールを50倍に薄めて調整する。
- ・1%アラビヤガム溶液... 1g のアラビヤガムを水100ml に加え、加熱溶解して作成する。
- ・5%酢酸ナトリウム... 5g 酢酸ナトリウムを水95ml に加える。
- ・*p*-ニトロアニリン塩酸溶液...特級濃塩酸40ml をビーカーにとり、市販特級 *p*-ニトロアニリン1.5g を加え溶解させる。この溶液を500ml のメスフラスコに移し、水でメスアップする。
- ・10%亜硝酸ナトリウム溶液...10g の特級亜硝酸ナトリウムを水90ml に溶解させる。
- ・ジアゾ化試薬...上記 *p*-ニトロアニリン塩酸溶液25ml をビーカーにとり、10%亜硝酸ナトリウム溶液0.75ml を使用直前に加え、褐色瓶に保存する。

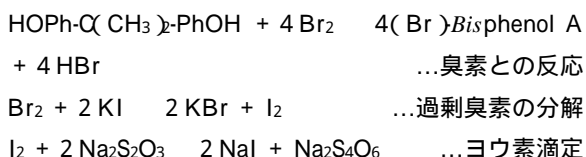
2 - 6) フェノール吸光分析操作

30ppm のフェノール (0 ~ 4 ml) を100ml のメスフラスコにとり、それぞれに1%アラビヤガム溶液1ml、5%酢酸ナトリウム1ml、上記ジアゾ化試薬1ml を加え、1分後に20%炭酸ナトリウム溶液2ml を加え、水で100ml とし、水を対照に470nm の吸光度測定し、検量線を作成する。

3 - 1) ビスフェノール A の滴定

フェノールの滴定結果 (結果と考察参照) をふまえ、環境上問題となっているビスフェノール A への応用を検討した。この時、臭素はビスフェノール A の水酸基のオルト位に理論上、4モル反応すると考えられる。

即ち、



3 - 2) ビスフェノール A の滴定試薬調整

- ・ビスフェノール A (1000ppm) ...100mg の市販1級ビスフェノール A を100ml のメスフラスコにとり、少量のメタノールで溶解後、水で100ml とする。
- その他、0.05M - 臭素液、30%ヨウ化カリウムおよび0.05N - チオ硫酸ナトリウムは前出 (2 - 2) フェノールの試薬調整項を参照した。

3 - 3) ビスフェノール A 滴定操作

ビスフェノール A (1000ppm) 5 ml を密栓付き三角フラスコ100ml にとり、0.05M - 臭素液10ml を加える。次に濃塩酸 1 ml を加え、25 ~ 30 、時々攪拌し、30分作用させた後、30%ヨウ化カリウム 6 ml を添加し、0.05N - チオ硫酸ナトリウムとデンプン指示薬で滴定する (滴定量 a_2 ml)。

同様操作で、ビスフェノール A の代わりに、水 5 ml 用いて空試験を行う (滴定量 b_2 ml)。

・ビスフェノール A (1000ppm) 5 ml サンプルング
 $5 \text{ mg} = 0.022 \text{ mmol}$ $4 \times 0.022 \text{ mmol Br}_2 = 0.176 \text{ meq Br}$

・0.05M- Br_2 10ml は $0.5 \text{ mmol Br}_2 = 1 \text{ meq Br}$
 ビスフェノール A との反応で余る臭素量は $1 - 0.176 = 0.824 \text{ meq Br}$

従って、0.05N - チオ硫酸ナトリウムの理論滴定量： $a_2 = 16.48 \text{ ml}$ 、 $b_2 = 20 \text{ ml}$

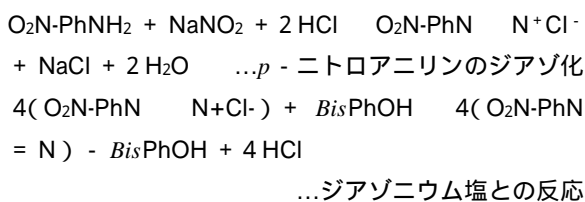
また、0.05N - チオ硫酸ナトリウム 1 ml 0.05 meq Br
 $0.05 \times 1 / 8 \text{ mmol BisPhenol A} = 1.425 \text{ mg BisPhenol A}$

この場合の理論ビスフェノール A 量は $1.425 (b_2 - a_2) = 1.425 (20 - 16.48) = 5.02 \text{ mg}$ で当初サンプルング量とほぼ一致する。

3 - 4) ビスフェノール A 吸光分析

フェノールの場合と同様、*p*-ニトロアニリンのジアゾニウム塩とカップリング反応させる。この時、ジアゾニウム塩はビスフェノール A のオルト位に理論上、4モル反応すると考えられる。

即ち、



3 - 5) ビスフェノール A 吸光分析試薬

・ビスフェノール A (20ppm) ...先の1000ppm フェノールを50倍に薄めて調整する。
 その他の試薬はフェノール吸光分析時調整したものをを用いる。

3 - 6) ビスフェノール A 吸光分析操作

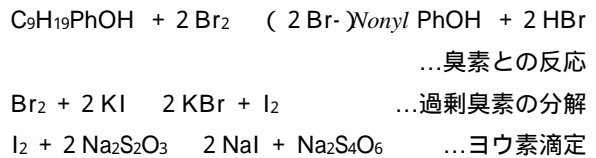
20ppm のビスフェノール A (0、1、2、4、8

ml) を100ml のメスフラスコにとり、それぞれに 1% アラビヤガム溶液 1 ml、5% 酢酸ナトリウム 1 ml、ジアゾ化試薬 1 ml 添加、1分後、20%炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加え、水で100ml とし、水を対照に480 nm の吸光度測定し、検量線を作成する。

4 - 1) ノニルフェノールの滴定

環境ホルモン作用が確認されたノニルフェノールについて実施した。臭素はノニルフェノールの水酸基のオルト位に理論上、2モル反応すると考えられる。

即ち、



4 - 2) ノニルフェノール滴定試薬調整

・ノニルフェノール (1000ppm) ...100mg の市販 1 級ノニルフェノールを100ml のメスフラスコにとり、少量のメタノールで溶解後、水で100ml とする。

その他の0.05M - 臭素液、30%ヨウ化カリウム、0.05N-チオ硫酸ナトリウムは前出 (2 - 2) フェノールの試薬調整項を参照した。

4 - 3) ノニルフェノール滴定操作

ノニルフェノール (1000ppm) 10ml を密栓付き三角フラスコ100ml にとり、0.05M - 臭素液10ml 加える。次に濃塩酸 1 ml を加え、25 ~ 30 、時々攪拌し、30分作用させた後、30%ヨウ化カリ 6 ml 添加し、0.05N - チオ硫酸ナトリウムとデンプン指示薬で滴定する。(滴定量 a_3 ml)

同様操作で、ノニルフェノールの代わりに、水10ml 用いて空試験を行う (滴定量 b_3 ml)。

・ノニルフェノール(1000ppm)10ml サンプルング：
 $10 \text{ mg} = 0.0455 \text{ mmol}$ $2 \times 0.0455 \text{ mmol Br}_2 = 0.182 \text{ meq Br}$

・0.05M- Br_2 10ml は $0.5 \text{ mmol Br}_2 = 1 \text{ meq Br}$
 ノニルフェノールとの反応で余る臭素量は $1 - 0.182 = 0.818 \text{ meq Br}$

従って、0.05N - チオ硫酸ナトリウムの理論滴定量：

$a_3 = 16.4 \text{ ml}$ 、 $b_3 = 20 \text{ ml}$

また、0.05N - チオ硫酸ナトリウム 1 ml 0.05

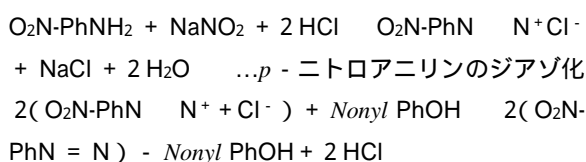
meq Br $0.05 \times 1 / 4 \text{ mmol Nonyl Phenol} = 2.75 \text{ mg}$

この場合の理論ノニルフェノール量は
 $2.75 (b_3 - a_3) = 2.75 (20 - 16.4) = 9.9 \text{ mg}$ で当
 初サンプリング量とほぼ一致する。

4 - 4) ノニルフェノール吸光分析

フェノールの場合と同様、*p*-ニトロアニリンのジアゾニウム塩とカップリング反応させる。この時、ジアゾニウム塩は理論上、ノニルフェノールの水酸基のオルト位に2モル反応すると考えられる。

即ち、



...ジアゾニウム塩との反応

4 - 5) ノニルフェノール吸光分析試薬

・ノニルフェノール (100ppm) ...先の1000ppm フェノールを10倍に薄めて調整する。

その他の試薬はフェノール吸光分析時調整したものを用いる。

4 - 6) ノニルフェノール吸光分析操作

100ppmのノニルフェノール(0、1、2、4、8 ml)を100mlのメスフラスコにとり、それぞれに1%アラビヤガム溶液1ml、5%酢酸ナトリウム1ml、ジアゾ化試薬1mlを添加、1分後に、20%炭酸ナトリウム溶液2mlを加え、水で100mlとし、水を対照に480nmの吸光度測定し、検量線を作成する。

結果および考察

(1) フェノール滴定

1500ppmのフェノール5mlに対して、塩酸酸性下、0.05M-臭素液10ml作用させ、室温下、45分反応後、30%ヨウ化カリウム3ml加えて、遊離ヨウ素を0.05N-チオ硫酸ナトリウムで滴定した。結果は、Table 2のMethod-1に示すように、7.52mgの理論量フェノールに対して、7.05、6.24、5.95、6.62mgとばらついた結果になった。

反応条件を検討すべく、臭素液との反応時間と反応温度を検討した。その結果、Table 1に示すように、反応時間が短いと、遊離ヨウ素が多くなり、チオ硫酸ナトリウムの消費量も多くなるが、反応時間が長いと、遊離ヨウ素が少なくなり、チオ硫酸ナトリウムの消費も少なくなる (Table 1の15分と30分のデータ対比)。

温度の効果については近接しているためか、大差ない結果であった。

従って、反応条件としてはフェノール理論量に近い値が出る25~30、30分反応させる方法をとった。

次に、フェノール量と各試薬の添加量を検討した。

Table 2のMethod-2では1500ppmフェノールを2ml使用し、これは3mgフェノール(0.032mmol)にあたり、これと反応する臭素量は $0.032 \times 3 \text{ mmol} = 0.096 \text{ mmol}$ である。実際添加した臭素量は0.05M-Br₂ 10mlゆえ、0.5mmolで、過剰量は $0.5 / 0.096 = 5.2$ 倍である。一方、添加臭素量(0.5mmol)に対して、分解に必要なヨウ化カリウムは1mmolであるが、30%ヨウ化カリウム6ml使ったので、 $(30/70) \times 6 / 167 = 15.4 \text{ mmol}$ にあたり、過剰量は $15.4 / 1 =$

Table1 . Reaction Conditions for Iodometric Titration of Bromine and Phenol

Temperature	0.05N-Na ₂ S ₂ O ₃	Calculated	15min.	30min.
25 ~ 30	Blank (b ₁)	20 ml	18.0	17.4
	Sample (a ₁)	10.4ml	9.4	7.9
	Difference (b ₁ - a ₁)	9.6ml	8.6	9.5
	Phenol*	7.52mg	7.3	7.4
30 ~ 35	Blank (b ₁)	20 ml	17.8	17.0
	Sample (a ₁)	10.4ml	9.2	8.5
	Difference (b ₁ - a ₁)	9.6ml	8.6	8.5
	Phenol*	7.52mg	6.7	6.7

*0.05N-Na₂S₂O₃ 1 ml 0.783mg PhOH, $0.783 \times 9.6 = 7.52 \text{ mg}$ 1500ppm Phenol (5 ml) and 0.05M-Bromine (10ml) were reacted under the conditions described above. After which, 30% KI (3 ml) was added for the iodometric titration.

Table2 . Comparison of Methods in Quantitative Analysis of Phenol

	Method- 1		Method- 2	
	Added		Added	
1 500ppm PhOH	5 ml	0 .08mmol	2 ml	0 .032mmol
Theoretical Br ₂ *	-	0 .24mmol	-	0 .096mmol
0 .05 M-Br ₂	10ml (0 .5mmol)	ca. x 2 over theor. Br ₂	10ml (0 .5mmol)	ca. x 5 .2 over theor. Br ₂
Theoretical KI**	-	1 mmol	-	1 mmol
30% KI	3 ml (7 .7mmol)	ca. x 7 .7 over theor. KI	6 ml (15 .4mmol)	ca. x 15 .4 over theor. KI
Results	Calculated PhOH : 7 .52mg 7 .05, 6 .24, 5 .95, 6 .62 (mg)		Calculated PhOH : 3 .00mg 2 .86, 2 .85, 2 .87, 2 .85 (mg)	

* Stoichiometric Amount of Br₂ to react with added Phenol

** Stoichiometric Amount of KI to react with added Br₂ 1 500ppm Phenol and 0 .05M-Br₂ were reacted at 25 ~ 30 °C for 30min. from the result shown in Table1.

15 .4倍にあたる。

Method- 2 にみるように、大過剰の試薬量が計算値のフェノール含量に近いことが判るので、今後使用の試薬についてはこの量比を用いることにした。

(2) フェノール吸光分析

30ppm のフェノールを 2 - 6) のようにして測定し、検量線を作成した。

Fig .1より直線性の検量線が得られた。

試料の確認として、約10ppm に調整した試料液50 ml を100ml にメスアップし、この10ml を100ml メスフラスコにとり、2 - 5) に示した各試薬を同量添加

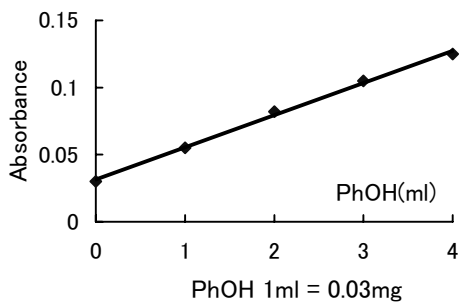


Fig .1 . Plot of Phenol Concentration and its Absorbance at 470nm

し、100ml とした後、470nm の吸光度を測定した。

その結果、吸光度は0 .077で Fig .1の検量線から1 .8 ml のフェノール量にあたり、試料液の濃度 (Xmg/ml) とすれば次式より

$$(50X) \times 10/100 = 0 .03 \times 1 .8$$

$X = 0 .0108\text{mg/ml} = 10 .8\text{ppm}$ であることが判り、10ppm に近いことが判明した。

(3) ビスフェノール A の滴定

フェノールの滴定法に準じ、3 - 3) の方法で行った。

ビスフェノールA (1 000ppm) 5 ml は 5 mg = 0 .022 mmol ビスフェノール A にあたり、これと反応する必要臭素量は $4 \times 0 .022 = 0 .088\text{mmol}$ である。これに対して、0 .05M-Br₂ 10ml 使用 (0 .5mmol) しているので、過剰臭素量は $0 .5/0 .088 = 5 .7$ 倍である。一方、0 .5mmol の臭素の分解には 1 mmol のヨウ化カリウムが必要であるが、実際は30%ヨウ化カリウム 6 ml 使用したので、 $(30/70) \times 6 /167 = 15 .4\text{mmol}$ にあたり、必要臭素量の15 .4倍用いている。滴定結果を Table 3 に示す。

Table3 . Measurement of Bisphenol A by Iodometric Titration

0 .05N-Na ₂ S ₂ O ₃	Calculated	1	2	3
Blank (b ₂)	20 ml	17 .9	17 .6	17 .4
Sample (a ₂)	16 .5ml	14 .3	14 .1	14 .0
Difference(b ₂ - a ₂)	3 .5ml	3 .6	3 .5	3 .4
Bisphenol A*	4 .99mg	5 .13	4 .99	4 .85

*0 .05N-Na₂S₂O₃ 1 ml 1 .425mg BisPhOH A, $1 .425 \times 3 .5 = 4 .99\text{mg}$

滴定値はいずれも計算値の±5%以内で、満足できる結果が得られた。

(4) ビスフェノール A の吸光分析

20ppm のビスフェノール A を 3 - 6) のようにして測定し、検量線を作成した。

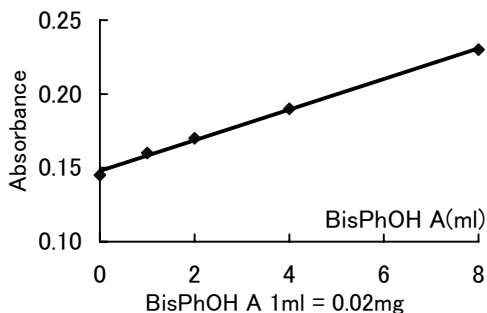


Fig 2 Plot of BisphenolA Concentration and its Absorbance at 480nm

Fig 2より直線性があることが判り、確認として、約10ppm に調整した試料液50ml を100ml にメスアップし、この10ml を100ml メスフラスコにとり、3 - 6) に示した各試薬を同量添加し、100ml とした後、480nm の吸光度を測定した。

その結果、吸光度は0.175で Fig 2の検量線から2.8 ml のビスフェノール A 量にあたり、試料液の濃度 (Xmg/ml) とすれば次式より

$$(50X) \times 10/100 = 0.02 \times 2.8$$

$$X = 0.0112\text{mg/ml} = 11.2\text{ppm}$$

(5) ノニルフェノールの滴定

4 - 3) に示す方法で測定した。

即ち、1000ppm のノニルフェノール10ml サンプルは 10mg = 0.0455mmol のノニルフェノールにあたり、これと反応する必要臭素量は $2 \times 0.0455 = 0.091\text{mmol}$ である。これに対して、0.05M-Br₂ 10ml 使用 (0.5mmol) しているので、過剰臭素量は $0.5 / 0.091 = 5.5$ 倍である。一方、0.5mmol の臭素の分解には 1 mmol のヨウ化カリウムが必要であるが、実際には30%ヨウ化カリウム 6 ml 使用したので、 $(30/70) \times$

$6 / 167 = 15.4\text{mmol}$ にあたり、必要臭素量の15.4倍用いた。滴定結果を Table 4 に示す。

滴定値は計算値の±5%以内で、満足できる結果を得た。

(6) ノニルフェノールの吸光分析

20ppm のノニルフェノールを検討したが、吸光度が小さく、適切な検量線が得られなかったため、100 ppm のものを調整、4 - 6) の方法で測定し、検量線を得た。

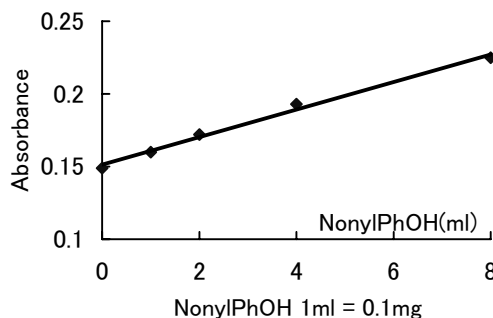


Fig 3 Plot of Nonylphenol Concentration and its Absorbance at 480nm

試料の確認として、約30ppm に調整した試料液の 25ml を100ml のメスフラスコにとり、メスアップ後、その20ml をさらに100ml のメスフラスコにとり、各試薬を 4 - 6) の方法で同量添加し、480nm の吸光度を測定した。吸光度は0.166で1.5ml のノニルフェノールにあたり、試料液の濃度を (Xmg/ml) とすれば、次式より30ppm が得られた。

$$(25X/100) \times 20 = 0.1 \times 1.5$$

$$X = 0.03\text{mg/ml} = 30\text{ppm}$$

検討濃度における滴定法はフェノールの反応条件、試薬量をビスフェノール A、ノニルフェノールにも適用することにより再現性が得られることが判った。吸光分析法によるフェノール、ビスフェノール A およびノニルフェノールは直線性ある検量線が得られるが、ビスフェノール A、ノニルフェノールについては、濃度による吸光度の差が小さいため、その適応性には制限があると思われ、感度の改良が望まれる。

いずれにしても、河川中の環境ホルモンは通常 ppm

Table4 . Measurement of Nonyl phenol by Iodometric Titration

0.05N-Na ₂ S ₂ O ₃	Calculated	1	2	3
Blank (b ₃)	20 ml	17.9	17.2	17.8
Sample (a ₃)	16.4ml	14.3	13.7	14.4
Difference(b ₃ - a ₃)	3.6ml	3.6	3.5	3.4
Nonyl phenol*	9.9mg	9.9	9.6	9.4

*0.05N-Na₂S₂O₃ 1 ml 2.75mg Nonyl PhOH, 2.75 × 3.6ml = 9.9mg

以下の濃度で存するため、実際の分析にあたっては大量試料からの濃縮、精製操作が必要になる。

結論

- 1) フェノールにおける滴定法の反応条件、試薬量をビスフェノール A、ノニルフェノールの滴定にも適用することにより、再現性ある結果が得られることが判った。
- 2) 吸光分析法におけるフェノール、ビスフェノール A およびノニルフェノールは直線性ある検量線が得られるが、ビスフェノール A およびノニルフェノールの濃度における吸光度には顕著な差が認められなかった。

謝辞

本実験にご協力をいただいた本校産業化学科卒業生の山上真紀子さん、谷口祥子さん、小西孝典君に深謝いたします。

[参考文献]

- (1) 佐来栄治、早川修二、市岡高男、加藤進
三重県環境センター研究報告 第19号 1 ~ 9 p
(1999) 河川水中のノニルフェノール、ビスフェノール A の分析
- (2) 馬場二夫、渡辺悠二、河村葉子、山田耕平、藤井正美 日本食品化学会誌 8、121~127p
(2001) ポリカーボネート食器から高濃度のビスフェノール A が検出された原因解明に関する研究
- (3) 第13改正 日本薬局方解説書 日本薬局方解説書編集委員会編(廣川書店)平成8年9月(第2刷)フェノール D - 930 ~ D - 933
- (4) 新実験化学講座 第13巻 日本化学会編(丸善)1977年 フェノール 50~53p
- (5) 定量分析の実験と計算 3 機器分析 高木誠司著(共立出版)1961年フェノールのジアゾカップリングによる定量、43~44p