

短報

ノニルフェノールの分析法の検討

藤川和浩・永島聡子・古閑豊和・松本源生・馬場義輝

ノニルフェノールの公定法における固相カラム及び溶出溶媒について検討を行った。

2種類の固相カートリッジカラム (HLB、PS-2) を比較検討した結果、PS-2 に比べてHLBがノニルフェノールの保持時間付近での妨害ピークがカラムから溶出しにくい利点を持つ結果が得られた。

溶出溶媒は、アセトンで溶出しジクロロメタンに転溶した場合と、ジクロロメタンで溶出した場合を比較検討した結果、ピーク形状やピークエリアにほとんど差が見られなかった。

このことから、ジクロロメタンで溶出することで前処理工程の時間短縮が可能と考えられた。

[キーワード：ノニルフェノール (NP)、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)、固相抽出、水生生物保全水質環境基準]

1 はじめに

ノニルフェノール (以下、NP と略す) は、内分泌攪乱物質 (いわゆる環境ホルモン) として毒性が疑われていたが、新たな毒性情報が明らかとなったことから、平成 24 年 8 月 22 日に全亜鉛に続く水生生物保全水質環境基準項目として、告示、施行された。NP の構造を図 1 に示す。

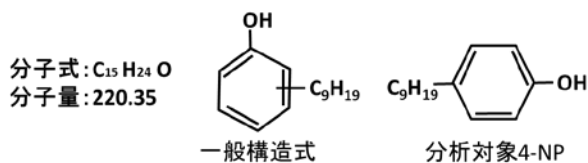


図 1 ノニルフェノールの構造

NP の分析方法は、固相抽出を行った後、GC/MS 測定を行うこととなっている。固相カラムの充填剤としては、シリカゲルに逆相系化合物を化学結合したもの又は、合成吸着剤 (多孔性のスチレンジビニルベンゼン共重合体又はこれと同等の性能を有するもの) を充填したものとなっている。

今回、それに該当するものとして、Waters 社の 2 種類の固相カラム (HLB、PS-2) について検討を行った。

固相カラムからの溶出溶媒については、アセトンで溶出し濃縮した後、ジクロロメタンで転溶することになっている。東京都の古谷¹⁾らは、アルキルフェノール類の一斉分析法について、ジクロロメタンでの溶出で良好な回収率が得られたと報告している。そこで、アセトン溶出とジクロロメタン溶出について比較検討した。

2 実験方法

2-1 試薬

- 1) 水: ミリポア製 Academic A10 により調整 (ミリQ 水)
- 2) アセトン: 残留農薬・PCB測定用 (和光純薬製)
- 3) ジクロロメタン: 残留農薬・PCB測定用 (和光純薬製)
- 4) 硫酸ナトリウム (無水): 残留農薬・PCB測定用 (和光純薬製)
- 5) 4-NP標準液: (1 $\mu\text{g/mL}$ ジクロロメタン溶液)
4-NP標準試薬 (1000 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液 (シグマアルドリッチ製)) をジクロロメタンで希釈したもの
- 6) サロゲート溶液: (10 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液)
4-(1,4-ジメチル-1-エチルペンチル)フェノール ($^{13}\text{C}_6$) サロゲート溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液 (Cambridge Isotope Laboratories (CIL) 製)) をアセトンで希釈したもの
- 7) 内標準原液: (1000 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液)
4-n-NP-2, 3, 5, 6- d_4 (関東化学製) 10 mg を全量フラスコ 10 mL に採り、アセトンを標線まで加えたもの
- 8) 内標準液: (10 $\mu\text{g/mL}$ ジクロロメタン溶液)
内標準原液をジクロロメタンで希釈したもの
- 9) 検量線標準液: 4-NP標準液を 5-500 μL の範囲で段階的に採り、これらにサロゲート溶液 5 μL 及び内標準液 5 μL を加え、ジクロロメタンで全量を約 0.5 mL に調製したもの

2-2 器具及び装置

- 1) カートリッジ型固相カラム:
Waters製 Oasis HLB plus LP Extraction Cartridge (抽出用)

Waters製 Sep-Pak plus PS-2 Cartridge (抽出用)
Waters製 Sep-Pak Dry Cartridge (脱水用)

- 2) 固相抽出装置 (コンセンレーター) :
Waters製 CHRATEC Sep-Pak Concentrator SPC10-P
- 3) 乾燥機:エムエス機器製 DRI-BLOCK DB-3L
- 4) 遠心分離機:久保田製作所製
ユニバーサル冷却遠心機 KUBOTA 5800
- 5) 目盛付き共栓試験管: NRK製 円錐 16-P 白
- 6) 水素炎イオン検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FID): 島津製作所製 GC-QP 2010 plus FID
- 7) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS):
島津製作所製 GC/MS-QP 2010 ultra

2・3 GC/MSの分析条件

- 1) キャピラリーカラム: アジレント・テクノロジー製
HP-5ms 長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m
- 2) キャリアーガス流量: He 1.2 mL/min
- 3) カラム昇温プログラム:
50 $^{\circ}$ C (1min) \rightarrow 8 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (5 min)
- 4) 気化室温度: 250 $^{\circ}$ C、注入量: 2 μ L (スプリットレス)
- 5) イオン化電圧: 70 eV、イオン源温度: 200 $^{\circ}$ C、インターフェース温度: 280 $^{\circ}$ C

2・4 異性体の組成比の分析

市販されている NP 標準試薬は 13 異性体の混合溶液であるため、GC-FID を用いて、4-NP 標準液 (1 μ g/mL) を測定し、各対象物質の保持時間に相当するピークについて、ピーク面積を読み取り、得られた面積の合計と各対象物質の面積比から異性体の組成比を求めた。

2・5 NPの分析法

NPの分析フローを図2に示す。

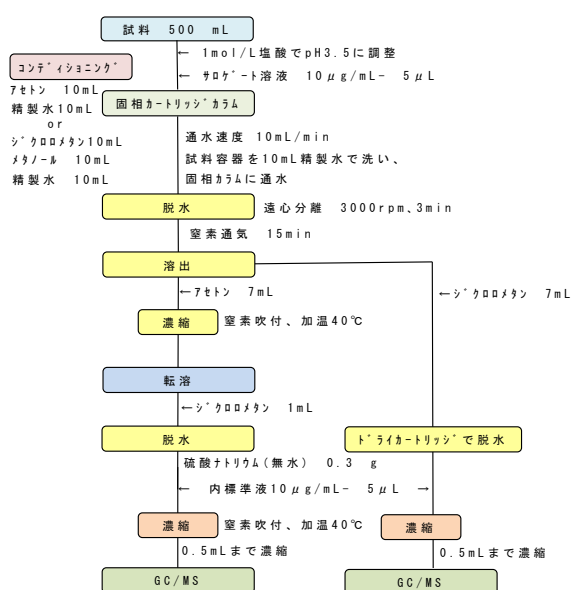


図2 NPの分析フロー

標準品の添加回収実験は以下の方法で行った。500 mL のメスシリンダーにミリQ水 500 mL を採り、4-NP標準液 (1 μ g/mL) を調整濃度になるように加えた。その後、塩酸 (1 mol/L) を加えてpHを約 3.5 に調整し、更にサロゲート溶液を5 μ L加え、カートリッジ型カラムに固相抽出装置で加圧により毎分流速 10 mLで流下させた。

試料容器を水 10 mLで洗い、洗液をカラムに通水し、カラムを 3000 rpmで 3 分間遠心分離した後、窒素ガスで約 15 分間通気し、水分を除去した。

アセトン溶出の場合は、溶出後、窒素吹付により濃縮した後、ジクロロメタンに転溶し、硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、共栓試験管に受けた。ジクロロメタン溶出は固相カラムの下方にドライカートリッジを接続し、上端からジクロロメタンを緩やかに通し、NPを溶出させ、共栓試験管に受けた。それぞれの共栓試験管に内標準液を 5 μ L加えた後、約 40 $^{\circ}$ Cに加温し、溶出液に窒素ガスを緩やかに吹き付けて濃縮し、約 0.5 mLにした。

検量線用の標準溶液は、4-NP標準液 (1 μ g/mL) 0、25、50、100、150、200、250 μ Lをとり、それらにサロゲート溶液を 5 μ L、内標準液を 5 μ L添加し、ジクロロメタンで全量を 0.5 mLとした。

3 結果と考察

3・1 標準試薬の異性体の組成比

使用したシグマアルドリッチ製の 4-NP標準液をGC-FIDで分析し、得られた 13 異性体の組成比の結果を表1に示す。

表1 NPの13異性体の組成比

分析値の組成比	文献値の組成比	
	シグマ1	シグマ2
NP1 4.8 %	4.8	5.1 %
NP2 13.1 %	12.0	12.0 %
NP3 16.0 %	18.0	19.0 %
NP4 6.2 %	6.5	6.6 %
NP5 7.3 %	7.5	7.9 %
NP6 7.4 %	6.6	6.5 %
NP7 6.2 %	6.8	7.3 %
NP8 3.6 %	3.4	3.1 %
NP9 8.2 %	7.6	6.7 %
NP10 4.1 %	3.9	3.7 %
NP11 13.0 %	12.0	12.0 %
NP12 4.5 %	4.0	4.4 %
NP13 5.6 %	5.7	5.5 %
total 100 %	98.8	99.8 %

左側が今回測定した結果であるが、シグマアルドリッチ製の 2 種類の 4-NP 標準試薬について堀井ら²⁾が行った分析結果と比較した結果、組成比はほぼ同様であった。

3・2 NPの13異性体の保持時間

本条件で測定した NP の定量用 (確認用) 質量数、及び保持時間を表 2 に示す。

4-NP 標準物質及びサロゲート物質は、保持時間 18.06–18.94 の約 1 分間に 14 本のピークに分離検出された。

表2 NPの定量用質量数及び保持時間 (QP-2010 ultra)

異性体番号	物質名	定量用質量数 確認用質量数	保持時間 (min)
1	4-(2,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	121(163)	18.06
2	4-(2,4-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(220)	18.18
3	4-(3,6-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	135(107)	18.30
4	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(191)	18.36
5	4-(2,5-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(163)	18.40
6	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(191)	18.44
7	4-(3-エチル-2-メチルヘキサン-2-イル)フェノール	135(220)	18.58
8	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163(121)	18.64
9	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(107)	18.70
10	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163(121)	18.75
11	4-(2,3-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135(220)	18.82
12	4-(3-メチルオクタン-3-イル)フェノール	191(163)	18.90
13	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149(107)	18.94
サロゲート	13Cラベル化4-(1,4-ジメチル-1-エチルペンチル)フェノール	155(113)	18.29
内標準物質	4-n-ノニルフェノール2,3,5,6-d4	111(224)	20.33

3-3 固相カラムの検討

2 種類の固相カラム (HLB、PS-2) について、妨害ピークの確認を行った。アセトンでコンディショニングを行った後、アセトンで溶出した場合、ほぼ同程度の妨害ピークが見られたが、PS-2 ではNPのピーク検出範囲(保持時間 18.06–18.94 分)のうち 18.9 分付近の異性体番号 12 (感度が低い)に該当する質量数 191 のピークと固相カラムからの妨害ピークとの重なりが見られた。また、ジクロロメタンで同様の操作を行った結果、HLBは 18.06–18.94 分に妨害ピークが少なかったことから、HLBを使用することとした。その比較結果のクロマトグラムを図3に示す。

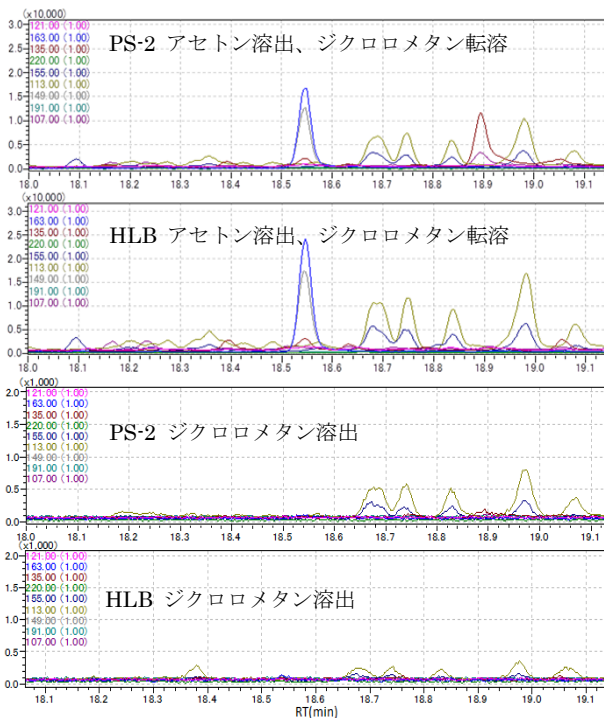


図3 HLB、PS-2 のアセトン溶出-ジクロロメタン転溶及びジクロロメタン溶出時のクロマトグラム

3-4 検量線

標準液をGC/MS測定し、4-NPとサロゲートの面積比から検量線を作成した。NPの 13 異性体のうち、異性体番号 4 の検量線を図4に示す。NP濃度 0–500 μg/Lにおいて相関性は良好であった。他の異性体も同様であった。

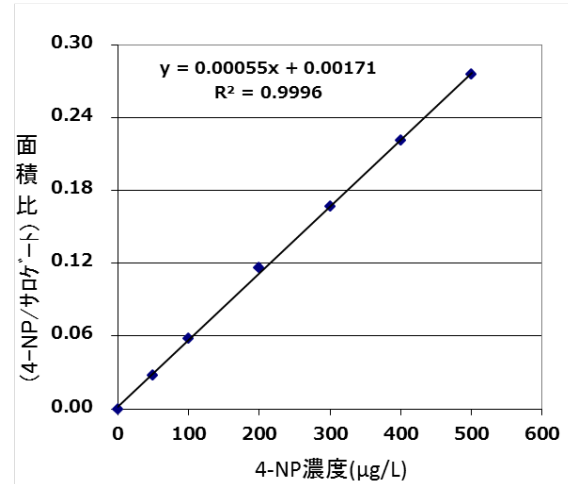


図4 NP(異性体4)の検量線

3-5 溶出溶媒の検討

アセトンで溶出し、ジクロロメタンに転溶した場合とジクロロメタンで溶出した場合を比較するため、HLBを用いて添加回収実験を行った結果、ピーク形状やピークエリアにほとんど差が見られなかった。また、妨害ピークはジクロロメタン溶出の方がアセトン溶出の場合より少なかった。

分析したクロマトグラムを図5に、データを表3に示す。アセトン溶出、ジクロロメタン転溶の回収率は 97–128 %、ジクロロメタン溶出の回収率は 101–123 %でほぼ同様の結果が得られた。

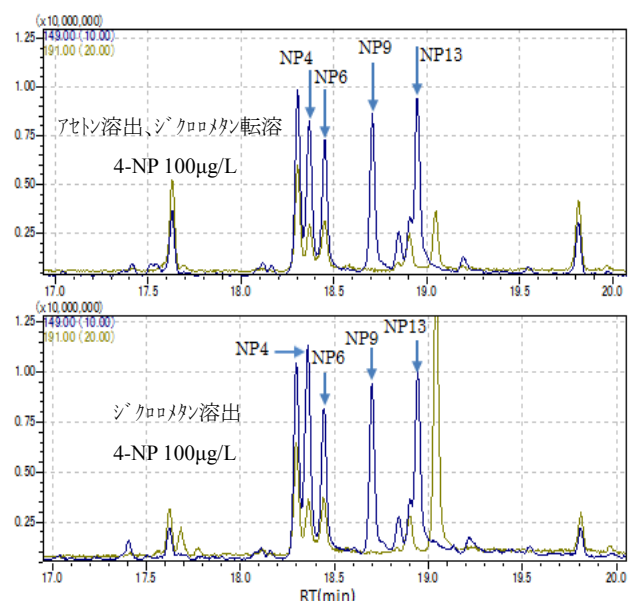


図5 HLBカラムのアセトン溶出-ジクロロメタン転溶(上図)とジクロロメタン溶出(下図)時のクロマトグラム

このことから、ジクロロメタンで溶出した方が、転溶及び濃縮操作を省くことができ、前処理時間の短縮ができる。本結果より、この方法を行うことでより多くの検体を分析することが可能となるため、有効性が高いと考えられる。

表3 HLBカラムの溶出溶媒を比較した分析データ

アセトン溶出後、ジクロロメタン転溶した場合のNP 100 µg/L								
ID#	化合物名	濃度	濃度単位	保持時間	定量イオン	確認イオン	面積	回収率
1	NP1	122.69	ppb	18.068	121	163	1088523	123
2	NP2	122.66	ppb	18.183	135	220	6294188	123
3	NP3	116.48	ppb	18.307	135	107	4183986	116
4	NP4	118.97	ppb	18.367	149	191	1721977	119
5	NP5	114.07	ppb	18.410	135	163	4257757	114
6	NP6	127.91	ppb	18.450	149	191	1619790	128
7	NP7	121.31	ppb	18.587	135	220	1646790	121
8	NP8	96.82	ppb	18.645	163	121	631532	97
9	NP9	123.70	ppb	18.707	149	107	1665330	124
10	NP10	124.36	ppb	18.756	163	121	659972	124
11	NP11	119.70	ppb	18.829	135	220	7307293	120
12	NP12	101.55	ppb	18.906	191	163	194842	102
13	NP13	109.15	ppb	18.948	149	107	1963871	109
14	サロゲート	0.00	ppb	18.301	155	113	16640445	-
15	IS	1.00	ppb	20.332	111	224	7669311	-

ジクロロメタンで溶出した場合のNP 100 µg/L								
ID#	化合物名	濃度	濃度単位	保持時間	定量イオン	確認イオン	面積	回収率
1	NP1	117.72	ppb	18.062	121	163	1149677	118
2	NP2	120.26	ppb	18.178	135	220	6780027	120
3	NP3	112.56	ppb	18.300	135	107	4428407	113
4	NP4	122.85	ppb	18.358	149	191	1967428	123
5	NP5	108.65	ppb	18.404	135	163	4433319	109
6	NP6	114.91	ppb	18.444	149	191	1578957	115
7	NP7	117.13	ppb	18.578	135	220	1755636	117
8	NP8	100.59	ppb	18.639	163	121	653125	101
9	NP9	115.77	ppb	18.700	149	107	1699494	116
10	NP10	114.12	ppb	18.749	163	121	649086	114
11	NP11	111.05	ppb	18.823	135	220	7388374	111
12	NP12	108.62	ppb	18.902	191	163	231932	109
13	NP13	105.75	ppb	18.943	149	107	2082513	106
14	サロゲート	0.00	ppb	18.294	155	113	16761897	-
15	IS	1.00	ppb	20.326	111	224	8442742	-

(英文要旨)

Examination of the Analysis Method of Nonyl Phenol

Kazuhiro FUJIKAWA, Satoko NAGASHIMA, Toyokazu KOGA,
Gensei MATSUMOTO and Yoshiteru BABA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

We investigated solid-phase columns and elution solvents for analysis of nonyl phenol.

As a result of comparing two types of solid-phase cartridge columns (HLB and PS-2), HLB was shown to be advantageous in that interference peaks did not elute it from a column near the retention time of nonyl phenol.

As a result of comparing the elute with dichloromethane versus that with acetone, and partitioned into dichloromethane, as for the elution solvent, a difference was hardly seen in peak shape and area.

From this, it was considered that shortening the time for preprocessing was possible by eluting it with dichloromethane.

[Keywords ; Nonyl phenol(NP) , Gas Chromatography Mass Spectrometry(GC/MS) , Solid phase extraction , Water Quality Standard to protect Aquatic Creatures]

4 まとめ

NPの分析法を検討した結果、以下のことがわかった。

- 1) シグマアルドリッチ製の標準試薬をGC-FIDで測定した結果、13 異性体の組成比は、文献値とほぼ同様の結果が得られた。
- 2) 2種類の固相カートリッジカラム (HLB、PS-2) をアセトンとジクロロメタンで溶出して比較検討した結果、PS-2 に比べてHLBがNPの保持時間付近で妨害ピークがカラムから溶出しない利点を持つ結果が得られた。
- 3) 固相カラムからの溶出溶媒は、アセトンで溶出しジクロロメタンに転溶した場合と、ジクロロメタンで溶出した場合を比較検討した結果、ピーク形状やピークエリアにほとんど差が見られなかった。

ジクロロメタンで溶出することで前処理工程の簡略化 (転溶、濃縮操作なし) が可能で、有効な方法と考えられた。今後、継続して再現性確認や環境実試料を用いた評価、検討を必要とする。

文献

- 1) 古谷達夫ら：東京都下水道局技術調査年報，(6-8)，441-446，2000。
- 2) 堀井勇一ら：分析化学 59，4，319-327，2010。