

ノニルフェノールGC/MS分析に関する基礎的検討について

○ 東房健一, 柿原俊明
新川電機 株式会社

1. はじめに

平成 24 年 8 月 22 日に「水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等に係る環境省告示について」が発表され、ノニルフェノールが項目追加された。ノニルフェノールはアルキルフェノール類の一種であり、理論上 170 種の異性体を持ち、非イオン界面活性剤の原料として使用され、工業用洗剤として繊維工業、金属加工業などで使用される。

今回、新たに設定された基準値は、水域や類型毎に設定され、最も低い基準値は、0.0006mg/L（海域，生物特 A）で、13 種類の異性体の分離分析が必要となる極微量分析と高い分離性能が要求されます。

そこで、本検討は、このノニルフェノール分析が現有の GC/MS を用いた分析に対し、十分な機能を有しているか。また、GC/MS 分析上の課題、問題点を抽出、検討した結果、若干の知見が得られたのでここに報告する。

2. 検討内容

ノニルフェノール分析の検討は、

- ・ 環境省報道発表資料（平成23年12月13日付け） 別紙3ノニルフェノール測定法
（以下、マニュアル法という。）
- ・ JISK0450-60-10（2007） 工業用水・工場排水中の4-ノニルフェノールの異性体別試験方法
（以下、JIS法という。）

を主な文献として実施した。

2.1 分離カラムの選定

① 分離状態の確認（FID測定）

ノニルフェノールのGC/MSの分析に使用するカラムは、マニュアル法では、DB-5MSが、JIS法では、DB-5等が記載又は測定例として記載されています。

そこで、本検討では、弊社保有している5系のカラムを用いて、それぞれのカラムでの分離状態を確認することとした。（Table_1参照）

Table_1 検討に使用したカラムとその内容

使用カラム	カラム長等	型番
Agilent J&W DB-5	30m × 0.25mm × 0.25um	122-5032
Agilent J&W DB-5MSUI	30m × 0.25mm × 0.25um	122-5532UI
Agilent J&W HP-5MS	30m × 0.25mm × 0.25um	19091S-433
Agilent J&W VF-5MS	30m × 0.25mm × 0.25um	CP8944
Agilent J&W DB-5	20m × 0.18mm × 0.18um	121-5022

② 組成比の算出（FID測定）

ノニルフェノールの濃度算出を行う場合には各異性体の組成比が必要となる。各異性体の組成比は、水素炎イオン(FID)検出器を用い、標準溶液をクロマトグラフに注入し、異性体の保持時間に相当するピークのピーク面積を読み取り、得られた面積の合計と各異性体の面積比から組成比を求めた。これを、JISに記載されている7種類の市販標準溶液×3機関のデータと比較した。

なお、測定に使用した標準溶液の濃度は、10 μg/Lを用いた。

その他 GC (FID) の条件は、以下の条件で実施した。

ガスクロマトグラフ分析計 Agilent 7890A

カラム : Table_1
 注入方法 : スプリットレス
 キャリアガス流量* : 線速度 35cm/sec
 オープン温度* : 50°C (4min)→8°C/min→280°C (5min)
 注入口温度 : 240 °C
 ガスセーバー : OFF
 検出器 : FID
 温度 : 280°C 水素流量 : 40ml/min
 空気流量 : 450ml/min メイクアップ流量 : 30ml/min

注 * : マニュアル又は JIS に記載された条件 (キャリアガス流量は、各カラムとも線速度 35cm/sec とした。)

2.2 GC/MS 測定

2.1 の FID 測定で行った分離状態の確認及び組成比の算出結果から本分析に適したカラムを選定し、それぞれのカラムでの検量線を作成した。検量線は、標準液原液から濃度 0.01~1 μ g/ml のジクロロメタン溶液を作成し、この検量線溶液 1 μ l を GC/MS に注入し、対象物質のピーク面積比により作成した。

なお、マニュアル等でのサロゲート物質と内部標準物質は使用せず、絶対検量線での傾向を観察することとした。

使用した GC/MS 装置は、Agilent 7890A+5975C (アジレント・テクノロジー) を使用し、測定に使用する選択イオンはマニュアルに記載された Table_2 のノニルフェノール (NP) 定量及び確認イオンを使用し、その他の GC/MS 条件は、GC (FID) 測定時の条件と同様の昇温条件及び線速度を用いた。

Table_2 対象物質と選択イオン

NP	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)
1	121	163
2	135	220
3	135	107
4	149	191
5	135	163
6	149	191
7	135	220
8	163	121
9	149	107
10	163	121
11	135	220
12	191	163
13	149	107

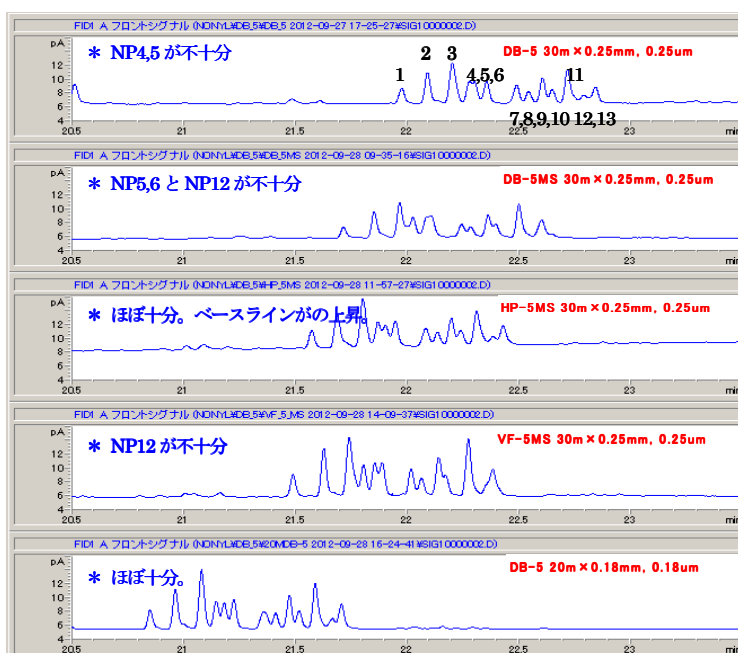
3. 結果と考察

3.1 分離状態の確認と組成比の算出

Fig. 1にFID検出器を用い、カラム別にノニルフェノール標準溶液 (10 μ g/L) を分析した結果のクロマトグラムを示した。

全てのクロマト上には、13種類の異性体ピークがほぼ、確認されるものの、ピークによってはピークトップの確認が不十分な部分も確認され、特に、NP4, 5, 6とNP12が顕著であることが判明した。

カラム別では、NP1~NP13全てのピークのピークトップが確認されるカラム及びベースラインの乱れがないものは少なく、本検討した中では、マニュアル、JISに記載されたカラム (DB-5系) が無難であると考えられ、これを以後の検討対象カラムとした。



* 昇温条件及び線速度を統一して採取。クロマト上の番号は NP 番号。

Fig. 1 カラム別分離状態 (クロマトグラム)

分離状態から選定したカラム (DB-5, DB-5MS) に加え、カラム長20mのDB-5の3種類のカラムについて、FID測定から得られたクロマトグラムの各ピーク面積値から組成比を算出し、JISに記載されている組成比と共に、Table_3に併記した。

これにより、各カラムともほぼ、JIS記載の範囲 (最大-最小) と同等な結果を示しているが、NP6が各カラムとも若干高い組成比を示していることが認められた。

Table_3 ノニルフェノール各異性体の組成比

標準	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8	NP9	NP10	NP11	NP12	NP13	合計
1	5.3	12.7	14.2	7.0	6.1	6.9	6.5	4.5	9.3	4.8	13.4	2.9	6.5	100.1
2	5.5	12.4	17.5	6.6	7.5	6.9	6.7	3.6	7.8	4.0	12.3	5.4	3.8	100
3	3.9	16.1	18.6	6.8	9.3	6.9	5.8	2.1	5.5	3.0	14.8	3.8	3.5	100.1
4	4.8	12.4	18.4	6.5	7.5	6.6	6.8	3.4	7.6	3.9	12.4	4.0	5.7	100
5	6.2	10.7	13.7	6.9	5.8	6.8	7.2	4.7	9.2	5.2	13.7	2.7	7.2	100
6	5.6	11.7	16.4	6.9	7.2	6.8	6.7	4.0	8.3	4.4	12.8	3.0	6.2	100
7	5.1	12.0	19.4	6.6	7.9	6.5	7.3	3.1	6.7	3.7	11.9	4.4	5.5	100.1
Max	6.2	16.1	19.4	7.0	9.3	6.9	7.3	4.7	9.3	5.2	14.8	5.4	7.2	
Min	3.9	10.7	13.7	6.5	5.8	6.5	5.8	2.1	5.5	3.0	11.9	2.7	3.5	
Ave	5.2	12.6	16.9	6.8	7.3	6.8	6.7	3.6	7.8	4.1	13.0	3.7	5.5	
DB-5	5.4	11.6	16.1	6.4	6.6	7.9	6.7	4.1	8.0	4.7	12.2	3.6	6.7	100
DB-5MS	4.9	10.8	13.9	8.3	6.2	9.1	6.0	4.7	8.4	5.2	13.1	1.4	8.0	100
DB-5 20m	5.0	11.1	15.5	6.8	6.8	7.9	6.4	4.3	8.0	5.1	12.7	3.1	7.3	100

黄色 : JIS 記載範囲を卓越した部分

3.2 GC/MS による測定結果

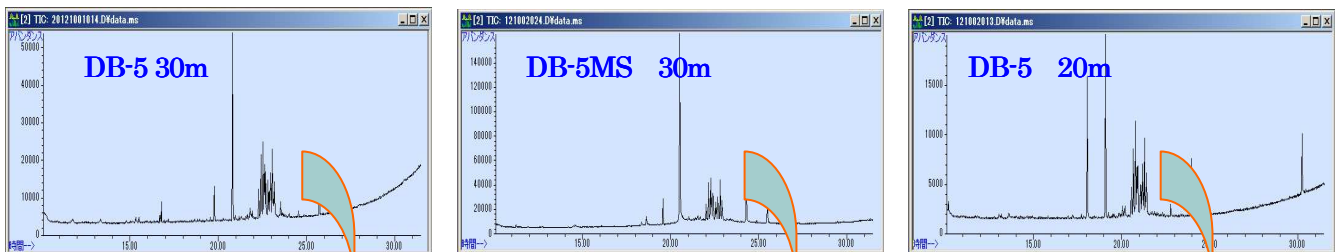
選定した3種のカラムを用いて、GC/MSにて検量線測定を行った。

検量線系列はマニュアルに記載されている濃度 (混合) 0.01~1ug/ml を用い、絶対検量線を作成した。なお、マニュアルに定義されている試料の定量下限値 0.06mg/L は、前処理での濃縮倍率 1000 倍とすると、検量線系列の溶液濃度 0.05mg/L に、ほぼ相当するものである。

Fig. 2に、この0.05mg/L溶液のTICクロマトグラムとマニュアルに記載のある定量イオン (table_2) のマスククロマトグラム重ね描きを示した。

これより、各カラムとも、ほぼ、カラム分離が十分でなかった部分も、イオンで分離が行われているが、NP3やNP12とNP13の分離判断が困難な場合も確認された。特に、DB-5とDB-5MSの30mカラムでは、NP3のm/z : 135でのモニターでは、ショルダーピークとなり、垂直分割でのピークアサインが必要となると判断されることから、JISに記載されているm/z : 149のモニターを行う必要があると考えられる。

TIC クロマトグラム



マスククロマトグラム

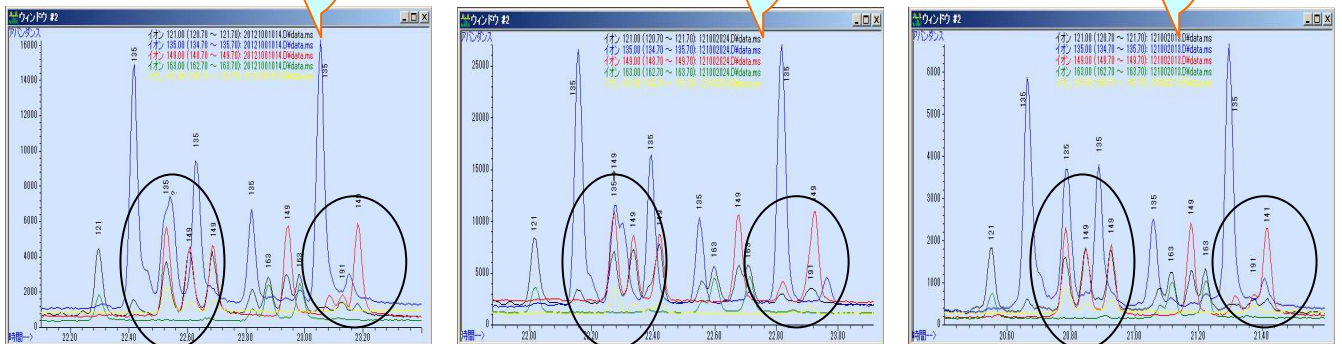


Fig.2 ノニルフェノール0.05mg/Lのカラム別TICクロマトグラム及びマスククロマトグラム

検量線系列のピークアサインは、マニュアルに記載されている定量イオンと確認イオンに、必要に応じて第三イオンをモニターして実施した。Fig. 3にDB-5MS カラムでの各異性体のピークアサイン画面(QEdit)を示したが、各異性体とも、定量及び確認イオンのピークが単離し、十分な感度を有している場合は、この2イオンのモニターで十分であると思われるが、単離しない又は十分な感度を有しない場合には、第三イオンでのモニター確認も必要と思われる結果を示している。

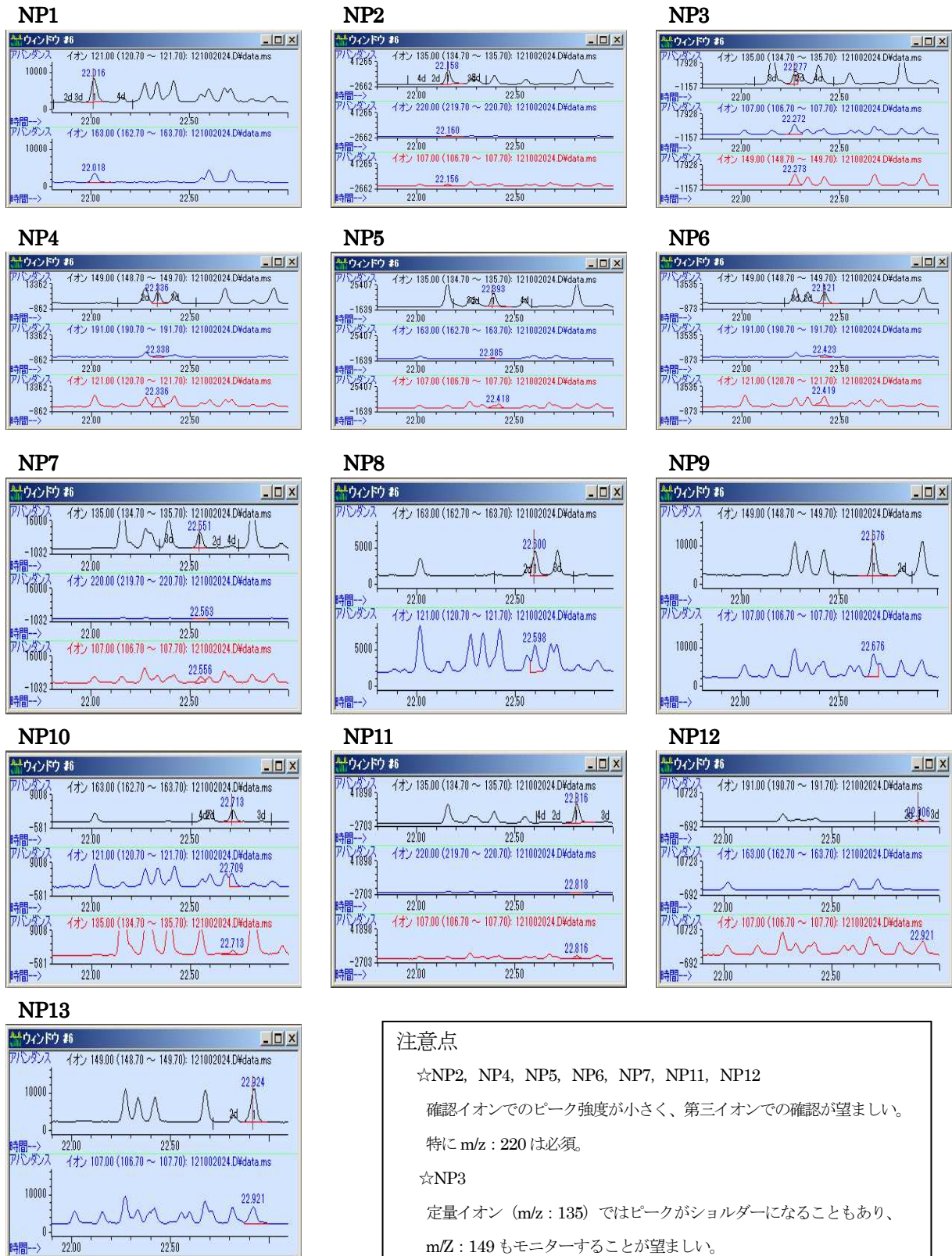


Fig. 3 ピークアサインの例 (DB-5MS : 0.05mg/L)

前述したピークアサインの注意点を踏まえ、3種類のカラムでの濃度（混合）0.01~1ug/mlの検量線系列の絶対検量線結果をTable_4に示した。各カラム及び各異性体の相関係数は、0.998以上と良好な直線性を有していた。なお、この検量線は、混合濃度値を用いたものであり、実際は、Table_3の組成比を考慮して、検量線濃度をFig. 4のように変更するか。又は、計算結果に組成比を乗じて濃度計算を行うかのいずれかが必要となる。

Table_4 各カラム別、各異性体別の検量線相関係数

	DB-5_30m	DB-5MS_30m	DB-5_20m
NP1	1.000	1.000	1.000
NP2	1.000	1.000	0.999
NP3	1.000	0.999	0.999
NP4	0.999	1.000	0.999
NP5	0.999	1.000	0.999
NP6	1.000	0.999	0.998
NP7	1.000	1.000	0.999
NP8	1.000	0.999	0.999
NP9	0.999	1.000	0.999
NP10	1.000	0.999	0.999
NP11	0.999	0.999	1.000
NP12	0.999	0.999	1.000
NP13	0.999	0.999	0.999

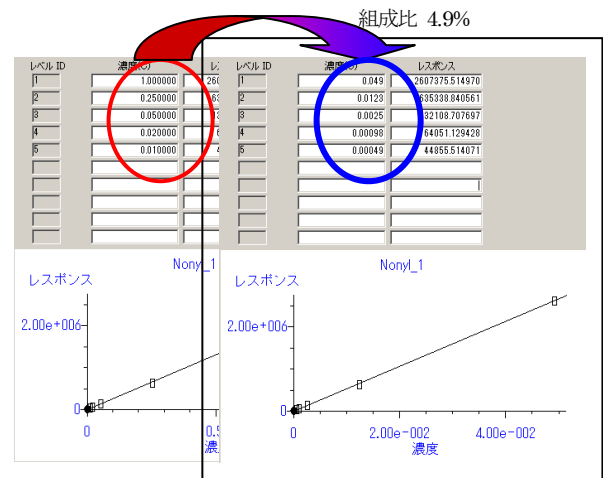


Fig. 4 組成比を考慮した検量線例 (NP1)

次に、この検量線を用いて濃度0.05mg/Lの5回測定結果から標準偏差を算出し、JISに記載のある定量範囲の下限値を算出した結果をTable_5に示した。

Table_5 定量範囲の下限値の算出結果 (DB-5MS)

No	物質名	組成比率 (%)	121002027.L	121002028.L	121002029.L	121002030.L	121002031.L	Average	SD	RSD	3σ	定量下限値 (mg/L) 0.06	判定
			std_3 4	std_3 4	std_3 4	std_3 4	std_3 4						
1	Nonyl_1	4.9	0.0019	0.0017	0.0017	0.0018	0.0018	0.0018	6.64E-05	3.72	0.000199	0.00294	○
2	Nonyl_2	10.8	0.0043	0.0041	0.0039	0.0038	0.0038	0.0040	0.000231	5.81	0.000694	0.00648	○
3	Nonyl_3	13.9	0.0052	0.0055	0.0055	0.0049	0.0052	0.0053	0.000274	5.20	0.000821	0.00834	○
4	Nonyl_4	8.3	0.0037	0.0033	0.0031	0.0031	0.0030	0.0032	0.00025	7.73	0.00075	0.00498	○
5	Nonyl_5	6.2	0.0028	0.0025	0.0024	0.0024	0.0024	0.0025	0.000189	7.60	0.000566	0.00372	○
6	Nonyl_6	9.1	0.0039	0.0040	0.0036	0.0035	0.0037	0.0038	0.000192	5.11	0.000577	0.00546	○
7	Nonyl_7	6.0	0.0028	0.0025	0.0025	0.0024	0.0023	0.0025	0.000194	7.76	0.000583	0.0036	○
8	Nonyl_8	4.7	0.0019	0.0017	0.0016	0.0017	0.0017	0.0017	9.21E-05	5.35	0.000276	0.00282	○
9	Nonyl_9	8.4	0.0037	0.0033	0.0032	0.0031	0.0031	0.0033	0.000275	8.40	0.000825	0.00504	○
10	Nonyl_10	5.2	0.0021	0.0020	0.0020	0.0019	0.0018	0.0019	0.0001	5.14	0.0003	0.00312	○
11	Nonyl_11	13.1	0.0055	0.0051	0.0048	0.0048	0.0046	0.0050	0.000349	7.02	0.001047	0.00786	○
12	Nonyl_12	1.4	0.0006	0.0006	0.0005	0.0005	0.0006	0.0006	3.74E-05	6.74	0.000112	0.00084	○
13	Nonyl_13	8.0	0.0034	0.0032	0.0031	0.0030	0.0030	0.0031	0.000174	5.54	0.000523	0.0048	○

5. まとめ

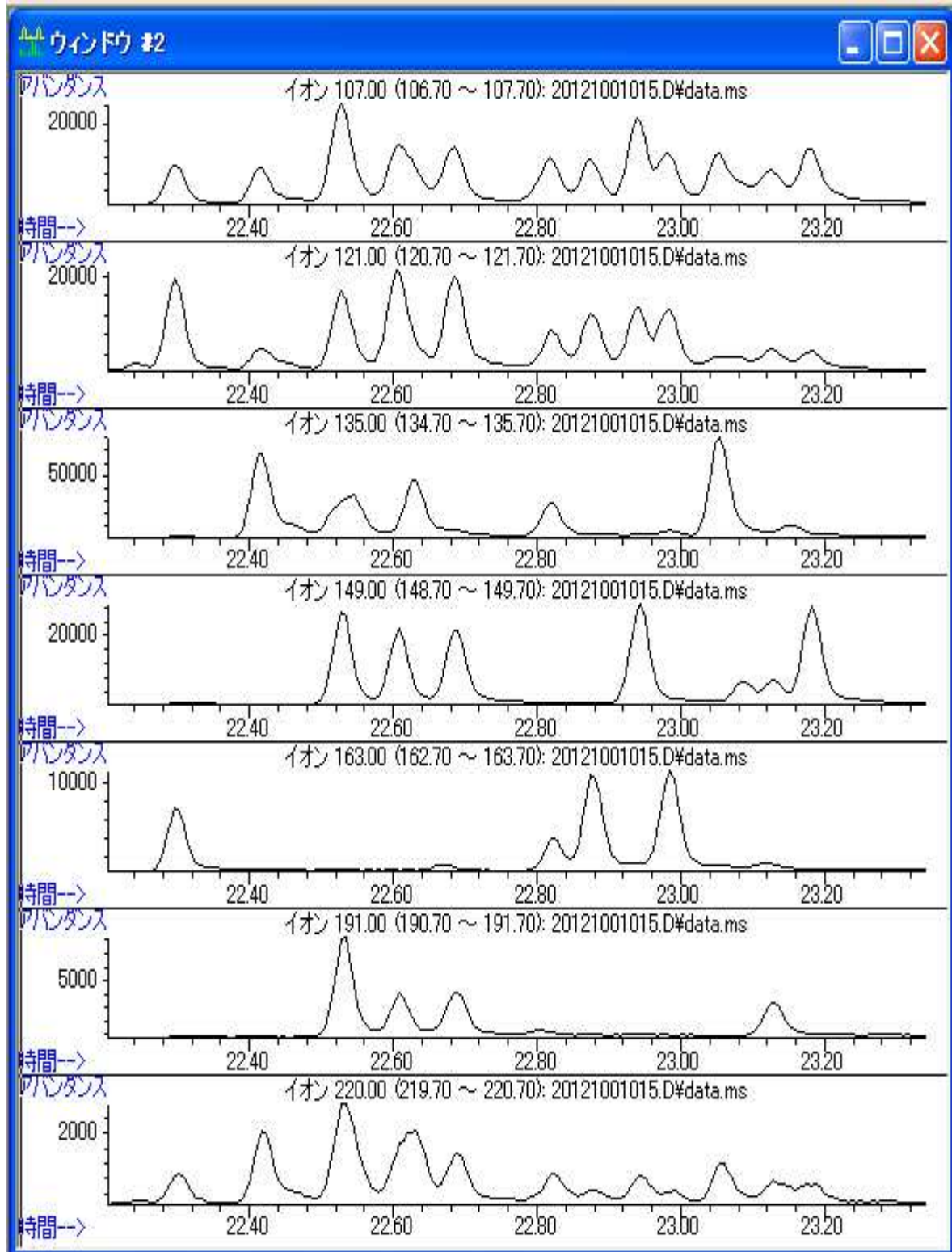
「生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等に係る環境省告示について」で追加されたノニルフェノールをGC/MSで測定するにあたり、GC/MS分析上の課題、問題点を抽出、検討した結果、以下のことが確認できた。

- ① ノニルフェノール標準品中の各異性体組成比は、GC(FID)にて容易に測定出来るものの、カラムによっては、分離が不十分な異性体も存在することから、カラムの選定も重要である。
- ② GC/MS測定では、選択イオンでの分離は、ほぼ、可能であるが、一部の異性では、ショルダーピークとなり、アサインが難しいものも存在している。
- ③ GC/MSアサイン時では、確認イオン強度が小さく、確認できない異性体もあり、この場合は、第三イオンでの確認も必要であると考えられる。
- ④ マニュアルに示されている検量線範囲で、その最低濃度0.01mg/Lを定量・確認イオンとも検出させるのは、良好な装置状態でないと難しい異性体が存在する。

以上の結果から、ノニルフェノールをGC/MSで測定する場合に、マニュアル等に記載されているカラム、昇温条件、定量・確認イオンなどをそのまま使用しても不完全な部分もあり、当該物質の分析を行う場合には、十分な検討を行う必要があるものと考えられます。

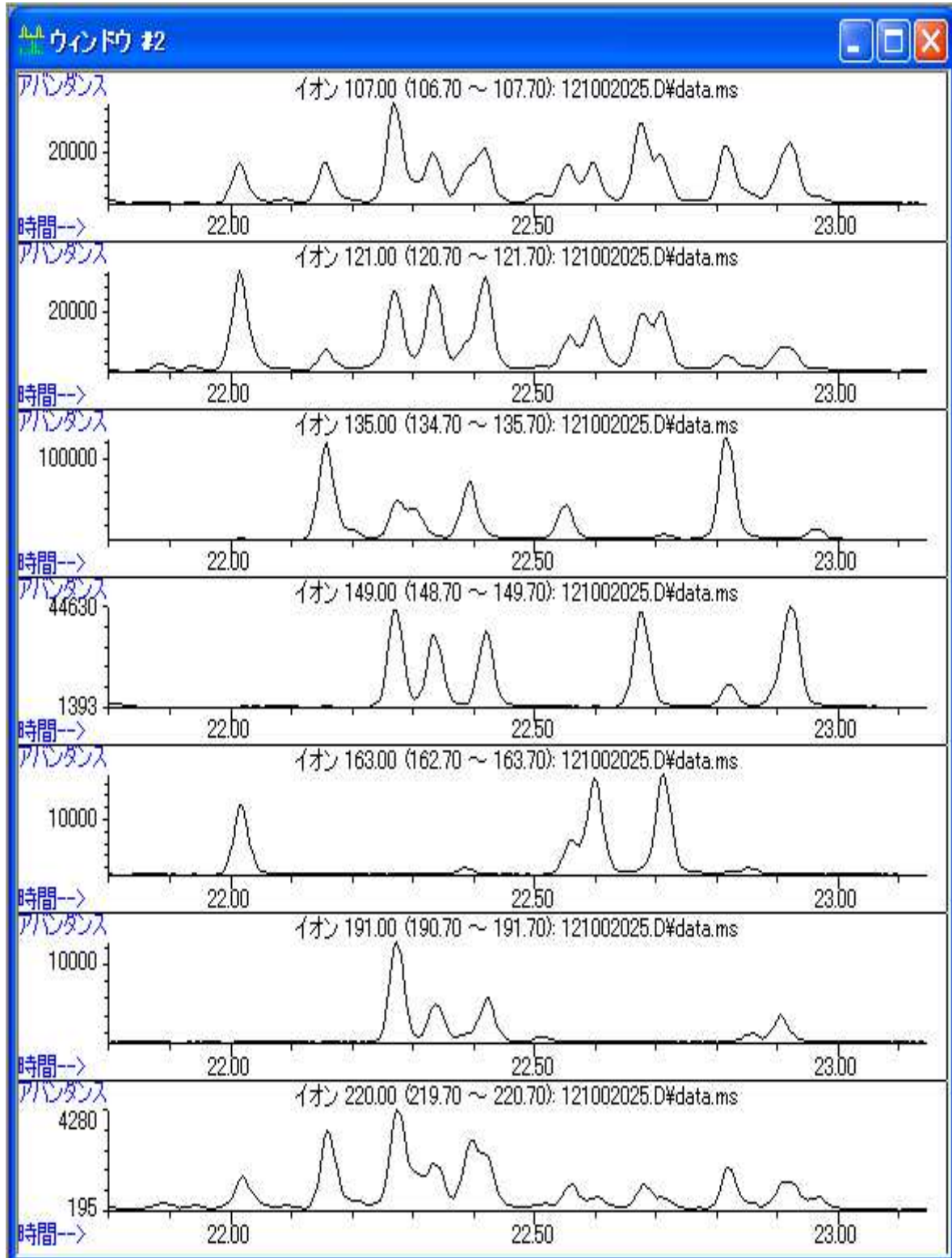
別図_1 キャピラリーカラムにDB-5 (長さ30m 内径0.25mm 膜厚0.25 μ m)
を用いたときのクロマトグラム

濃度 : 0.25mg/L



別図 2 キャピラリーカラムにDB-5MS(長さ30m 内径0.25mm 膜厚0.25 μ m)
を用いたときのクロマトグラム

濃度 : 0.25mg/L



別図_3 キャピラリーカラムにDB-5 (長さ20m 内径0.18mm 膜厚0.18 μ m)

を用いたときのクロマトグラム

濃度 : 0.25mg/L

