

ノニルフェノール分析におけるキャピラリーカラムの選定について

Selection of Optimal Capillary GC Column for 4-Nonylphenol Analysis

砂古口 博文

Hirofumi SAKOGUCHI

要 旨

平成24年8月22日に水生生物保全環境基準にノニルフェノールが追加された。ノニルフェノールの公定法は、様々な異性体の混合物である4-ノニルフェノールのうち、代表的な13異性体の比率をGC-FIDで求めて、それぞれの異性体について、GC/MSで定量を行う方法である。しかしながら、公定法で例示されたカラムDB-5MSは、GC-FIDでは13異性体すべてのピークを確認することができなかった。そこで、DB-5MSと同じ液相を持つカラムの中から、13異性体すべてのピークが得られるカラムを探索したところ、HP-5MS UIやInertCap 5MS/NPなどいくつかのカラムを選択することができた。

キーワード：4-ノニルフェノール 異性体比率 GC-FID

I はじめに

平成24年8月22日に水生生物保全環境基準にノニルフェノールが追加され、同日、施行されている（環境省告示127号）¹⁾。分析方法は、昭和46年12月28日付け環境庁告示59号の付表11が指定されている（以下、「公定法」とする。）²⁾。公定法では、様々な異性体の混合物である4-ノニルフェノール（ノニル基が複雑な枝分かれ構造となっているため理論上170種類の異性体が存在する）のうち、代表的な13種の異性体について、GC/MSで定量を行うことになる。そのためには、あらかじめ、13種類の異性体の比率をGC-FIDで求めておく必要がある。同一機関で保有している機器であったとしても、通常、GC/MS装置のGC部とGC-FIDのGCは明らかに世代が異なる装置であるのが一般的であると考えられる。したがって、同一機関で分析したとしても、GC/MSの分析結果とGC-FIDでの分析結果は異なったものになることが想定される。すなわち、同一機関で出したFIDとMSの結果であっても、実際には、二つ以上の異なる機関から得られたデータであると考えられることから、より適切なデータがあれば、他機関のデータを利用するのも許容されるのではないかという考えのもと、平成26年度環境測定分析統一精度管理ブロック会議³⁾において、「異性体比が文献上明らかな標準品はあるか。また、こういった標準品を使用し、その文献値またはメーカーの分析値があれば、そのまま使用してもよいか。」という主旨の質問をしたところ、「同一メーカーの標準品であっても、測定機

関が異なれば、異性体組成比に差が生じている。同一機関であっても、機器が異なれば結果に違いが発生する。同一機関で、FIDとMSで同じGCを用いて、同一条件で分析する必要がある。」という主旨の回答をいただいた。これを受け、保有するGC/MS装置にFID検出器を増設し、公定法で例示されているキャピラリーカラムDB-5MS²⁾で分析を実施したところ、GC/MSでは例示された通り13本のピークを確認できた。しかし、同条件のGC-FIDでは、分離不十分で13本のピークを確認することができなかった（図1）。そこで、公定法に例示されているDB-5MSと同系統の5%フェニル系液相を持つ同サイズの手持ちのカラム等から、GC-FIDで13本のピークが確認できるカラム及びその条件を探索したところ、いくつか最適なカラム・条件等があったので報告する。あわせて、標準物質について、メーカー間の相違、製造時期による相違を調査したので報告する。

II 方法

1 キャピラリーカラムの選定方法

公定法には、「内径0.25mm、長さ30mの化学結合型溶融シリカ製のものであつて、内面にメチルシリコーン系固定相液体を0.25 μ m程度の厚さで被覆したもの又は、これと同等以上の分離性能を有するもの」と記載があり、例示されたカラムは、「DB-5MS」であった²⁾ため、今回検討したキャピラリーカラムはこれと同じく、5%フェニル系液相を持つ内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ mのカ

ラムから選択した。芝本らによると、5%フェニル系液相を持つカラムでもメーカー毎に若干その構造等が異なり、大きく4つのタイプに分類されるという⁴⁾。今回、検討

したカラムについて、この分類に従って分類したものを、表1に示した。

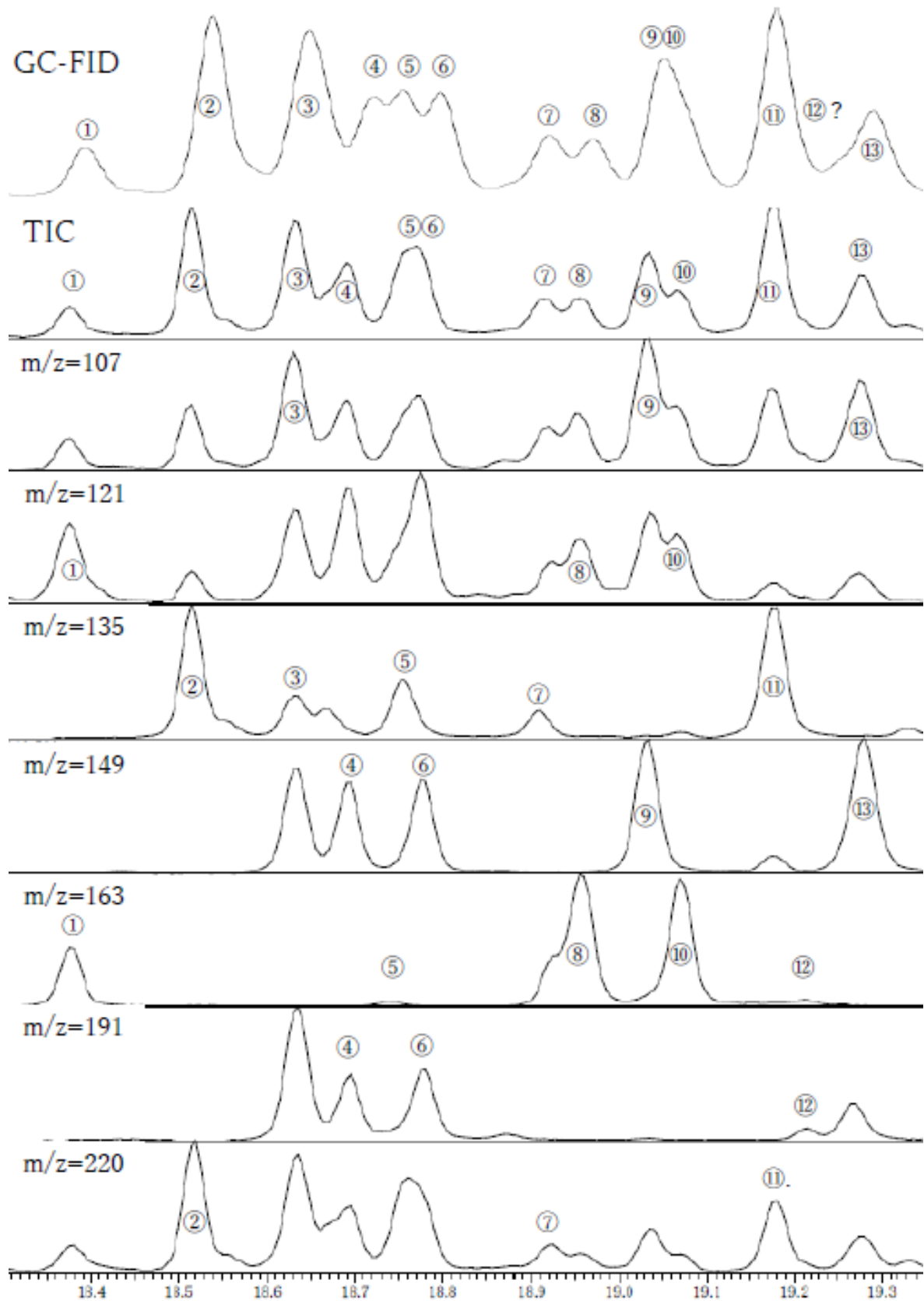
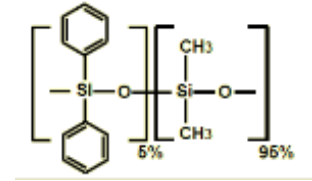
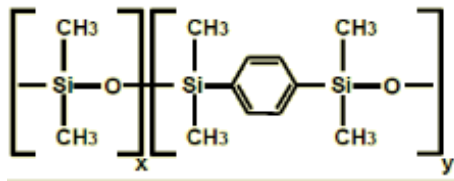
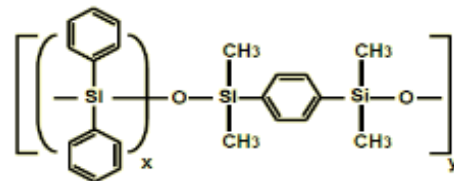
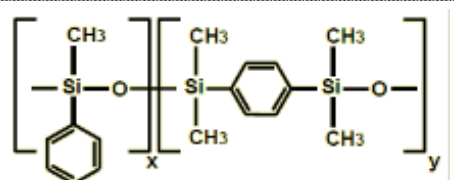


図1 キャピラリーカラム DB-5MS(内径 0.25mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μ m)による4-ニルフェノール異性体のクロマトグラム(図中の丸数字は、ノニルフェノール異性体番号を表す。)

表1 検討したカラムとその液相構造

カラム液相タイプ	液相構造	メーカー名	カラム名称
Type A		Agilent J&W Agilent J&W Agilent J&W Supelco ジーエルサイエンス	DB-5 HP-5MS HP-5MS UI SPB-5 InertCap 5MS/NP
Type B		Agilent J&W (旧VARIAN) Agilent J&W	VF-5MS DB-5MS
Type C		※	※
Type D		SGE	forte BPX-5

※ Type Cのカラムとして、Supelco製SLB-5msがあるが、長さ60mもしくは内径0.32mmのカラムしか保有していなかったため、今回の検討からは除外した。

GC/MS(SIM)で分析し、得られたマスクロマトグラムと公定法に例示のあったマスクロマトグラムを見比べて、ピーク位置を特定し、トータルイオンカレントクロマトグラム(TIC)とGC-FIDにおけるクロマトグラムを重ね合わせて、ピーク位置を特定し、成分の分離を見た。使用したGC/MS装置のカラム流量は、流量、線速度、圧力が設定できるものの、あくまでも流量及び線速度は実測値でなく、圧力からの計算値であるため、圧力を調整し、ピーク分離の改善を行った。当該GC/MSの取扱説明書によれば、内径0.25mm、長さ30mのカラムの圧力設定の目安が75~150kPaであるため、75、100、150kPaで分析を行い、これらのクロマトグラムを参考に適宜圧力の調整を行い、適切な圧力値を求めた。流量の計算値が、75kPaで1.30mL/分、150kPaで2.64mL/分であったため、MS部の真空ポンプの負荷を低減するため、可能な限り、低い圧力を選択した。

13異性体すべてのピークトップが確認できたクロマト

グラムは、画像ファイル化し、Windows7付属の画像加工ソフト(mspaint.exe)を用いて、日本工業規格「ガスクロマトグラフィー通則(JIS K 0114:2012)⁵⁾の11.3 a)1)垂線法で規定された手法により、ピーク切りを行った。これをアメリカ国立衛生研究所(NIH)で開発され、無償で配布されている画像解析ソフト「Image J」⁶⁾⁷⁾を用いて、各ピークの面積値を算出し、比率を求めた。

2 装置及び分析条件

今回使用した装置及び分析条件については、以下に示す。

(1) GC/MS

GC/MS装置：島津製作所製GCMS-QP2010 Ultra

(GC部：島津製作所製GC-2010 Plus)

カラムサイズ：内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m

昇温条件：50 $^{\circ}$ C(1分)-8 $^{\circ}$ C/分-280 $^{\circ}$ C(5分)

気化室：250 $^{\circ}$ C

キャリヤーガス：ヘリウム
 注入モード：高圧スプリットレス(210kPa、1.5分)
 サンプルング時間：1分
 キャリヤーガス制御：線速度一定
 MSインターフェイス温度：280°C
 イオン源温度：200°C
 イオン化法：EI
 検出モード：SIM
 モニターイオン：107、111、113、121、135、149、155、
 163、191、220、224

当該GC/MS装置におけるキャリヤーガス流量は圧力の
 みに制御しており(流量及び線速度は圧力からの計算値)、
 取扱説明書の記載に従い、75~150kPaで検討した。

(2) GC-FID

GC装置：島津製作所製GC-2010 Plus
 (2(1)のGC/MS装置のGC部である。)
 検出器：島津製作所製FID-2010 Plus
 カラムサイズ：内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m
 昇温条件：50°C(1分)→8°C/分→280°C(5分)
 気化室：250°C
 キャリヤーガス：ヘリウム
 注入モード：高圧スプリットレス(210kPa、1.5分)
 サンプルング時間：1分
 キャリヤーガス制御：線速度一定
 検出器温度：280°C
 メイクアップガス：ヘリウム、30mL/分
 燃料ガス：水素、40mL/分
 助燃ガス：空気、40mL/分
 キャリヤーガス流量については、2(1)と同様

(3) 試薬

ジクロロメタン 関東化学製ダイオキシン類分析用
 アセトン 関東化学製ダイオキシン類分析用
 4-ノニルフェノール 関東化学製環境分析用
 4-ノニルフェノールについては、比較のため、東京化
 成製も用いた。

III 結果

1 各カラムにおける分離について

各カラムのキャリヤーガス圧力75、100、150kPaにお
 けるクロマトグラムを図2に示した。

DB-5：75kPaでは、NP4とNP5が分離せず、NP9とNP10
 は、NP9のピークのショルダー程度にしか、NP10が分離
 していなかった。圧力を上昇させると、分離が改善し、
 150kPaでは、13異性体すべてのピークトップを確認する
 ことができた。

HP-5MS：75kPaでは、NP4とNP5が分離せず、NP9とNP10
 は、NP9のピークのショルダー程度にしか、NP10が分離
 していなかった。圧力を上昇させると、NP4とNP5の分
 離が改善し、150kPaでは分離した。NP9とNP10も100
 kPa以上では分離した。しかしながら、NP12とNP13の
 分離は圧力上昇に伴い、悪化し、150kPaでは、NP12のピ
 ークはNP13のピークのショルダー程度になるまで、分離
 が悪化した。13異性体すべてのピークトップが確認でき
 る圧力は、100~150kPaの間にある可能性が考えられた。

HP-5MS UI：75kPaでは、NP4とNP5が分離せず、NP9と
 NP10は、NP9のピークのショルダー程度にしか、NP10が
 分離していなかった。圧力を上昇させると、NP4とNP5の
 分離が改善し、150kPaでは分離した。NP9とNP10も100
 kPa以上では分離した。しかしながら、NP12とNP13の
 分離は圧力上昇に伴い、悪化し、150kPaでは、NP12のピ
 ークはNP13のピークのショルダー程度になるまで、分離
 が悪化した。13異性体すべてのピークトップが確認でき
 る圧力は、100~150kPaの間にある可能性が考えられた。

SPB-5：75kPaでは、NP4とNP5が、NP9とNP10が分離
 していなかった。圧力を上昇させると、NP4とNP5の分
 離が改善し、150kPaでは分離不十分ながらも、それぞ
 れのピークトップが確認できる程度には分離した。NP9と
 NP10も150kPaでは、同様に、分離不十分ながらも、そ
 れぞれのピークトップが確認できる程度には分離した。

InertCap 5MS/NP：75kPaでは、NP4とNP5が分離せず、
 NP9とNP10は、NP9のピークのショルダー程度にしか、
 NP10が分離していなかった。圧力を上昇させると、NP4と
 NP5の分離が改善し、150kPaでは分離した。NP9とNP10
 も100kPa以上では分離した。150kPaでは、13異性体す
 べてのピークトップを確認することができた。

VF-5MS：75kPaでは、NP4とNP5が、NP9とNP10が分
 離してなかった。圧力を上昇させると、NP4とNP5は完
 全に分離し、NP9とNP10は分離する傾向を見せ、150kPa
 では、NP10はNP9のピークのショルダー程度には分離し
 た。しかしながら、分離していたNP12とNP13は、150kPa
 ではそのピークは一体化した。

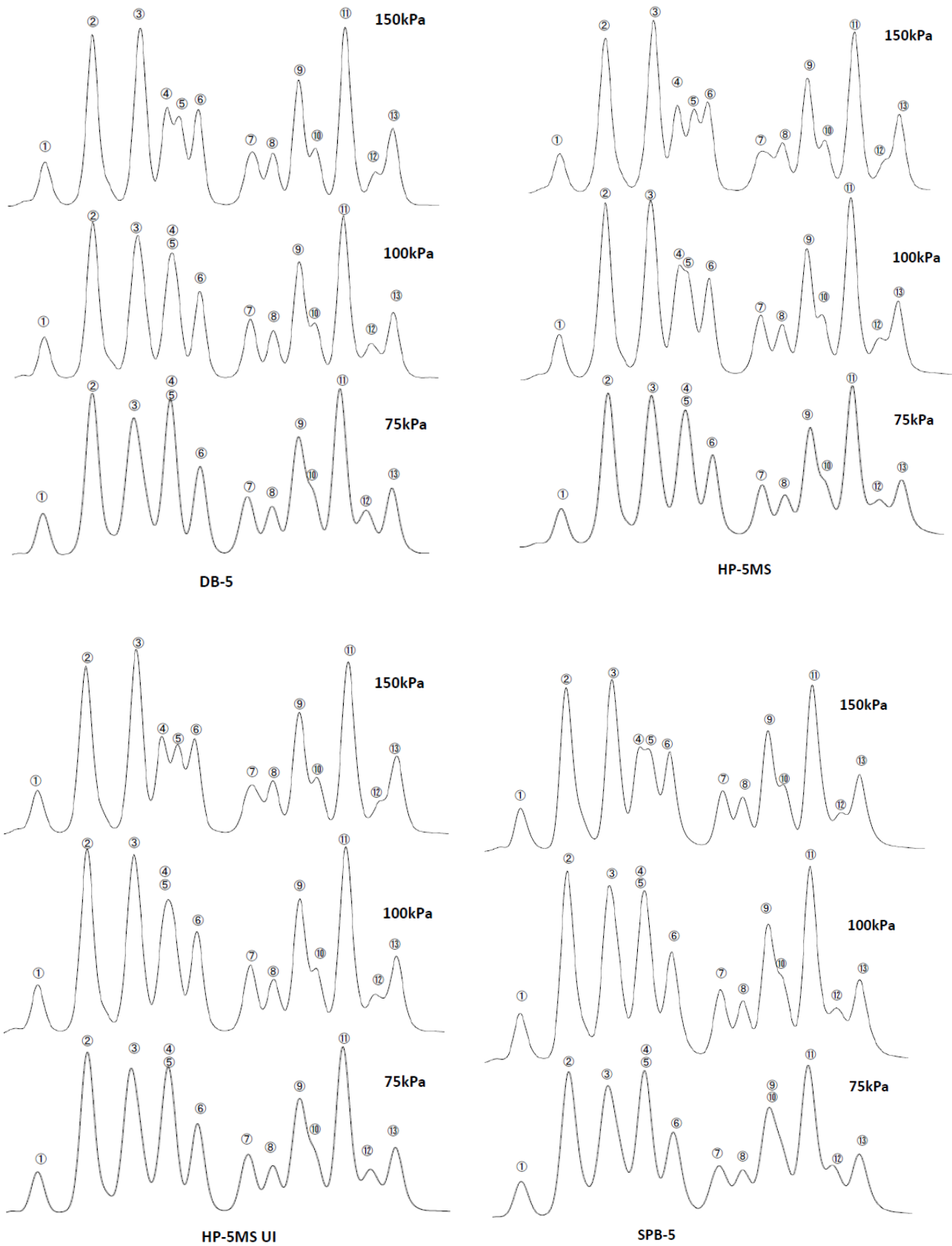


図2-1 各キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m)による4-ノニルフェノール異性体の圧力別クロマトグラム(図中の丸数字は、ノニルフェノール異性体番号を表す。丸数字が縦に並んでいるピークは、分離不能ピークを表す。)

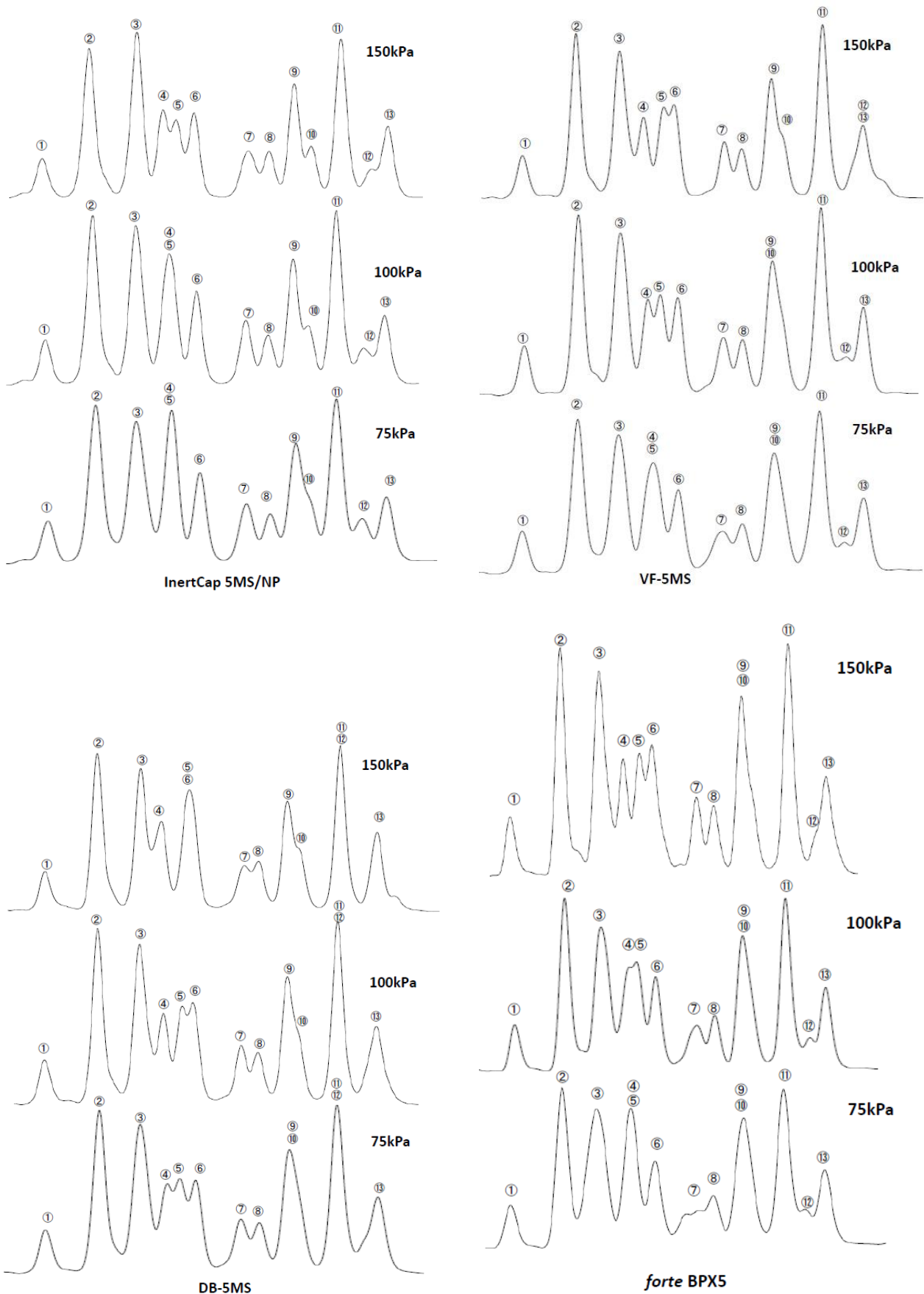


図2-2 各キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m)による4-ノニルフェノール異性体の圧力別クロマトグラム(図中の丸数字は、ノニルフェノール異性体番号を表す。丸数字が縦に並んでいるピークは、分離不能ピークを表す。)

DB-5MS: キャリアーガス圧力を75~150kPaに変化させても、NP11とNP12は分離しなかった。NP9とNP10は圧力上昇にしたがって、分離する傾向を見せ、150kPaでは、NP10はNP9のピークのショルダー程度には分離した。75kPaでは、NP5、NP6、NP7は分離していた。しかしながら、圧力を上昇させると、NP5とNP6の分離は改善した。その一方で、NP6とNP7のピークは一体化した。

forte BPX-5: キャリアーガス圧力を75~150kPaに変化させても、NP9とNP10は分離しなかった。NP4とNP5は圧力上昇に伴い分離するようになった。しかし、逆にNP12とNP13はピークが一体化した。

以上のことから、4-ノニルフェノール13異性体すべてのピークトップが確認できる可能性のあるカラムは、表1のType Aの液相構造を持つカラムに限定されることが明らかとなった。

なお、公定法に例示されたカラムであるDB-5MSは、Type Bの液相構造を持つカラムであり、今回の検討においては、GC-FIDでは、分離がうまくいかず、不適切なカラムであったと言わざるを得ない。

2 各カラムの最適な圧力値について

今回検討したType Aの液相構造を持つ5つのカラムについて、4-ノニルフェノールの13異性体の分離が最良と考えられるクロマトグラムをそのキャリアーガス圧力値とともに図3に示し、そのクロマトグラムにおける異性体比率を表2に示した。

SPB-5は、150kPaでのみ13異性体のピークトップが確認できた程度であり、NP4とNP5、NP9とNP10は分離不十分であった。特に、NP4とNP5の比率は他のカラムと比較すると若干差異が認められた。それ以外は、ほぼ同程度の異性体比率であった。

SPB-5とDB-5の最適キャリアーガス圧力は150kPaであり、それでもって、13異性体のピークトップがやっと確認できた程度であった。そのため、最適なカラムであるとの結論には至らなかった。HP-5MSは、この5つのカラムの中で最も低いキャリアーガス圧で最高の分離が得られたが、NP12のピークは、NP13のピークのショルダー程度にしか分離していなかった。HP-5MS UIとInertCap 5MS/NPは、ほぼ同程度の分離が得られた。若干の差ではあるが、HP-5MS UIのほうが低いキャリアーガス圧力で同程度に分離するクロマトグラムが得られたので、HP-5MS UIを選択することにした。

3 標準物質におけるメーカー差等について

この条件で、他のメーカーから販売されている標準物質を分析し、メーカー間の差を見ることにした。今回用いたメーカーの標準品については、過去に購入した標準品も残存していたので、これらについても分析を行った。関東化学製の標準品は、2001年(平成13年)ごろ購入し、開封済みのもので、冷蔵庫で保存しておいたものである。東京化成製の標準品は、2002年(平成14年)ごろ購入し、開封後、香川県環境保健研究センターの敷地内に設置してある危険物屋外貯蔵所で保管していたものである。これらの分析結果は表3に示した。

2002年ごろに購入した東京化成製の標準品が劣悪な環境下で保管されていたためか、あるいは、製造方法の変更起因するものかは、不明である。今年購入したものは、組成比に明らかな差異が認められた。関東化学製については、冷蔵庫で保管していたためか、2014年に購入したものと大きい差はなかった。

表2のデータと表3のデータは同じ標準である。しかし、GC-FID分析を実施した日時が異なっているため、若干結果が異なっている。これを考慮に入れると、少なくとも、冷蔵庫で保管する限りにおいては、十数年程度なら、特段の変質はないものと考えられる。また、近年購入したものについては、少なくとも、関東化学製と東京化成製は同一の標準品であると言えるかもしれない。

IV まとめ

4-ノニルフェノールの分析において、公定法に例示されたカラムであるDB-5MSでは、GC-FID分析において、4-ノニルフェノールの13異性体すべてのピークが確認できなかったため、DB-5MSと同じ5%フェニル系液相を持つカラムの中からより適切な選定を行った。その結果、DB-5MSとは異なる液相構造を持つカラムの中からいくつか適切なカラムが見つかり、分離パターンやキャリアーガス圧力等からAgilent製HP-5MS UIというカラムを選定した(ほかに同程度の分離を示すカラムに、ジーエルサイエンス製InertCap 5MS/NPがあった)。キャリアーガス圧力は、100~150kPaの範囲から適切な圧力値を設定する必要がある。

このカラムを用いて、様々な標準品を分析したところ、保存状態が適切であるならば、10年以上保存できることが明らかとなった。また、今回、用いた標準品において、メーカー間の差はほとんどないことも明らかとなった。

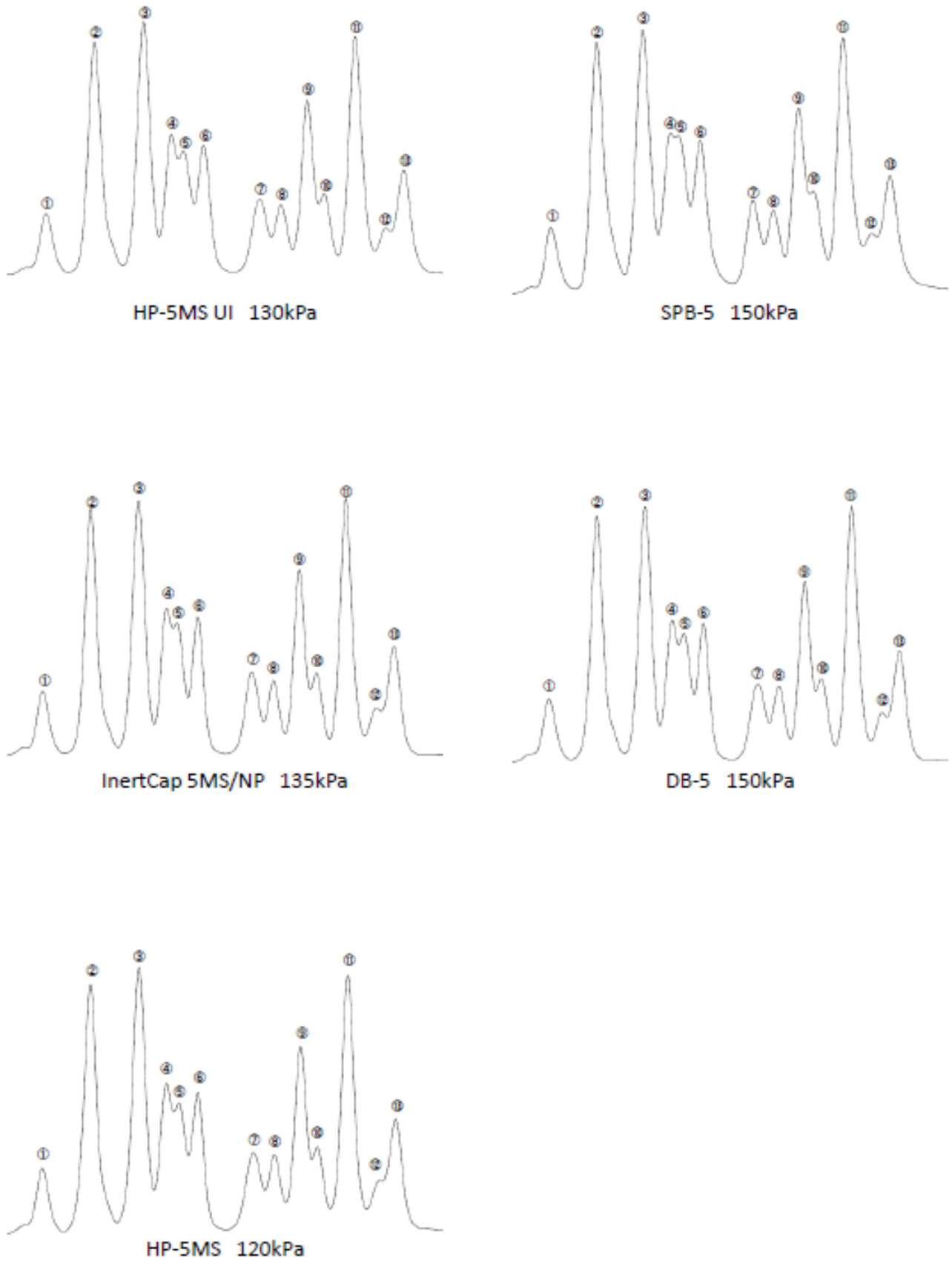


図3 Type Aの液相構造を持つ各キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m)による4-ニルフェノール異性体のGC-FIDクロマトグラムと最適カラム圧力

表2 Type Aの液相構造を持つ各キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m)による4-ノニルフェノール異性体比率

	HP-5MS UI	InertCap 5MS/NP	HP-5MS	SPB-5	DB-5
NP1	3.6 %	3.6 %	3.5 %	3.4 %	3.6 %
NP2	14.9 %	14.8 %	14.8 %	14.5 %	14.8 %
NP3	15.2 %	15.1 %	15.2 %	14.8 %	14.9 %
NP4	7.1 %	7.5 %	7.5 %	6.2 %	7.0 %
NP5	6.3 %	5.7 %	6.0 %	7.0 %	6.4 %
NP6	7.3 %	7.2 %	7.3 %	8.5 %	7.2 %
NP7	4.9 %	5.2 %	5.2 %	4.8 %	5.2 %
NP8	3.9 %	4.0 %	3.9 %	3.9 %	4.0 %
NP9	9.7 %	10.0 %	10.0 %	9.5 %	9.8 %
NP10	3.9 %	3.8 %	3.7 %	4.1 %	4.0 %
NP11	14.4 %	14.3 %	14.2 %	14.2 %	14.1 %
NP12	2.1 %	2.2 %	2.3 %	2.2 %	2.2 %
NP13	6.6 %	6.7 %	6.5 %	6.9 %	6.7 %

表3 キャピラリーカラム HP-5MS UI(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m)によるメーカー別4-ノニルフェノール標準の異性体比率

メーカー名	関東化学		東京化成		
	購入年	2001年ごろ	2014年	2002年ごろ	2016年
NP1		3.6 %	3.6 %	5.4 %	3.8 %
NP2		15.3 %	15.0 %	11.8 %	15.0 %
NP3		15.4 %	15.2 %	15.8 %	15.2 %
NP4		7.6 %	7.2 %	6.6 %	7.2 %
NP5		6.1 %	6.5 %	6.9 %	6.3 %
NP6		7.7 %	7.5 %	8.7 %	7.9 %
NP7		4.9 %	4.9 %	6.2 %	4.8 %
NP8		3.7 %	3.9 %	3.8 %	3.8 %
NP9		9.6 %	9.6 %	7.7 %	9.4 %
NP10		3.7 %	3.8 %	4.4 %	3.8 %
NP11		14.2 %	14.1 %	12.5 %	14.0 %
NP12		1.9 %	2.2 %	2.6 %	2.2 %
NP13		6.5 %	6.4 %	7.6 %	6.6 %

文献

- 1) 環境省告示第127号:水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件(平成24年8月22日).
- 2) 環境庁告示第59号:水質汚濁に係る環境基準について(昭和46年12月28日).
- 3) 平成26年度環境測定分析統一精度管理ブロック会議議事録—中国・四国支部—, [http://www.env.go.jp/air/tech/seidokanri/block/pdf/block26-08.pdf] (2016年9月30日アクセス).
- 4) 芝本繁明, 岡村嘉之:島津アプリケーションノートNo.24(食品), 5%フェニル系キャピラリーカラムでの分離挙動評価(2011.07)
- 5) 日本工業規格:JIS K0114:2012 ガスクロマトグラフィー通則, 2012
- 6) Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- 7) Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* **9**, 671-675, 2012.