

## オンライン SPE-GC/MS/MS システムを用いたノニルフェノール分析法の検討

○浅井 智紀, 佐々野 僚一

(株式会社アイスティサイエンス)

### 【はじめに】

ノニルフェノールは環境省が定める水生生物保全環境基準の項目に含まれ、内分泌攪乱物質の一種とされる化合物である。ノニルフェノールは界面活性剤や化学製品製造に使用される薬剤から生成され、近年ではそれらの使用量の増加から環境中に含まれるノニルフェノールの増加を招いている。

従来法によるノニルフェノールの測定法では、多量の試料が必要であり、さらに濃縮操作に時間を必要とするなど測定までの前処理操作に様々なコストを要する。開発した自動前処理装置は、測定に必要な試料量を低減することで、濃縮操作に要する時間や溶媒量の削減などの低コスト化と共に前処理操作から分析までの全自動化を実現した。本演題では、オンライン SPE-GC/MS/MS システムによるノニルフェノール分析法とその結果について報告する。

### 【方法】

#### 《システム概要》

本研究に用いたオンライン SPE-GC システムの概要を図 1 に示した。

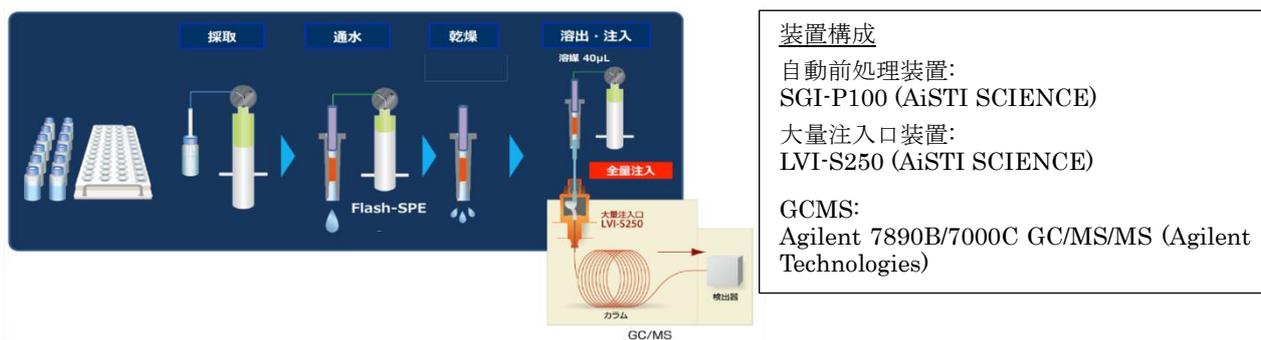


図 1 オンライン SPE-GC システムの概要

#### 《試料調製および前処理方法》

本試験では試料として市販のミネラルウォーターを使用した。ミネラルウォーターにアセトニトリルを 20%(v/v)になるように加えた後、アセトンに溶解した 4-ノニルフェノール標準液(関東化学)を添加して各濃度に調製したものを試験液として使用した。固相はスチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着材を充填した専用の固相カートリッジカラム(Flash-SPE)を使用した。アセトン/ヘキサン混合溶媒、アセトン、超純水を固相カラムに順に通液させてコンディショニングを行った後、試験液 1mL を通水して目的成分を保持させた。次に固相カラムに窒素ガスを吹き付け、十分に乾燥させた。溶出にはアセトン/ヘキサン混合溶媒を用い、固相溶出液 40 μL 全量を大量注入口に注入し、胃袋型インサート内で濃縮した目的成分を GC/MS/MS に導入した。4-ノニルフェノール標準液に含まれる 13 種の異性体(NP1-NP13)を MRM モードにより測定し、それぞれの面積値を積算した。

### Development of methods for analysis of nonylphenol by automatic online SPE-GC/MS/MS system

○Tomonori Asai, Ryoichi Sasano

AiSTI SCIENCE Co., Ltd.

## 【結果と考察】

## 《添加回収試験》

4-ノニルフェノール標準液をアセトン/ヘキサン混合溶媒に溶解して 12.5 ppb (pg/ $\mu$ L)に調製したスタンダード(STD) 40  $\mu$ L (絶対注入力: 500 pg)を直接 GC に注入してピーク面積値を積算した。次に、0.5 ppb に調製した試験液 1 mL (絶対注入力: 500 pg)をオンライン SPE-GC システムに供して得られたピーク面積値から絶対検量線法により回収率を算出した。5 回の連続分析による面積値結果を表 1 に示した。回収率は NP7 が 75%となったが、その他の成分については良好な回収率結果が得られた。また、再現性についても RSD%が 10 以下となる結果が得られた。

表 1 オンライン SPE-GC システムによる回収率評価結果

化合物名	STD	test1	test2	test3	test4	test5	平均値	回収率	RSD%
NP01	25,511	22,242	21,192	23,579	24,317	25,654	23,397	92	7.5
NP02	174,547	164,928	151,598	180,808	171,481	165,702	166,903	96	6.4
NP03	76,671	74,676	70,313	77,518	72,356	75,159	74,005	97	3.7
NP04	60,887	63,362	56,416	66,548	56,230	56,351	59,781	98	8.1
NP05	111,477	97,203	87,019	100,026	98,529	87,999	94,155	84	6.5
NP06	64,344	69,504	60,106	67,703	58,884	59,185	63,076	98	8.1
NP07	60,065	42,149	41,200	49,072	49,215	44,501	45,227	75	8.3
NP08	31,329	30,082	29,581	32,841	30,331	29,837	30,535	97	4.3
NP09	76,604	81,898	76,874	87,742	77,728	81,445	81,137	106	5.3
NP10	25,372	26,405	22,264	26,191	25,304	25,368	25,106	99	6.6
NP11	194,132	181,210	175,930	209,231	203,680	197,172	193,444	100	7.4
NP12	6,230	6,577	5,761	6,643	6,201	6,711	6,379	102	6.2
NP13	96,071	105,432	98,498	114,565	100,989	101,321	104,161	108	6.1

※前処理操作の評価を行うため、内部標準による補正は行わずにピーク面積値の比較により回収率および RSD を算出。

## 《直線性評価》

4-ノニルフェノール標準液を 0.02、0.05、0.1、0.5、1 ppb になるように添加した試験液を調製し、オンライン SPE-GC システムにより 3 回連続分析した平均面積値と RSD を表 2 に示した。NP1-13 の各成分において良好な直線性が得られた。

表 2 直線性評価結果

化合物名	0.02 ppb		0.05 ppb		0.1 ppb		0.5 ppb		1 ppb		R <sup>2</sup> 値
	平均値	RSD%	平均値	RSD%	平均値	RSD%	平均値	RSD%	平均値	RSD%	
NP01	2,171	12.4	3,331	14.8	4,306	15.4	19,995	9.6	47,221	3.6	0.991
NP02	10,537	15.4	16,706	6.3	25,740	9.1	140,225	7.5	333,754	4.7	0.992
NP03	4,222	16.2	7,118	3.5	10,450	7.6	60,231	7.2	146,378	4.5	0.991
NP04	3,047	6.9	5,821	6.5	8,691	10.1	50,665	6.4	117,455	3.7	0.994
NP05	5,295	15.3	9,474	4.1	14,398	6.6	90,680	10.2	195,240	4.2	0.998
NP06	3,165	17.0	5,816	5.4	8,973	7.8	51,829	2.3	122,316	2.7	0.993
NP07	2,607	18.5	4,700	7.3	7,347	9.8	40,158	7.5	96,709	4.0	0.992
NP08	1,511	8.1	2,843	7.7	4,234	8.2	25,521	6.2	63,560	0.8	0.989
NP09	4,653	10.3	8,006	6.7	11,512	9.1	68,023	4.8	163,609	0.6	0.991
NP10	1,542	14.0	2,776	5.0	3,633	7.8	21,658	7.1	49,442	2.2	0.994
NP11	10,911	14.0	17,601	7.5	28,072	5.5	166,984	7.9	403,573	3.6	0.991
NP12	144	26.6	231	19.8	464	10.0	3,385	9.3	9,304	4.9	0.982
NP13	5,184	16.0	9,156	6.9	13,750	10.0	81,631	7.4	203,037	1.5	0.989

## 【結論】

オンライン SPE-GC/MS/MS システムを用いることで、ノニルフェノール分析の前処理工程から測定までを全自動化することができ、前処理に要する時間を 10 分程度に短縮することが可能であった。また、本システムでは手作業による濃縮操作を必要とせず、使用する器具類を減らすことができることからノニルフェノール汚染の低減に貢献できると期待される。

# オンライン SPE-GC/MS/MS システムを用いた ノニルフェノール分析法の検討



株式会社アイスティサイエンス

○浅井 智紀、佐々野 僚一

Beyond your Imagination

**AiSTI SCIENCE**

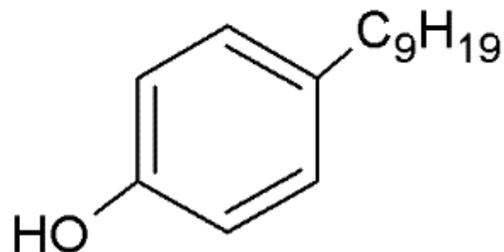
# 目的

## ノニルフェノールの自動前処理～オンライン分析

- ◆ 前処理時間の短縮
  - ↳ 仕事の効率化、処理検体数の増加
- ◆ 再現性
  - ↳ 人的操作による結果のばらつきを減少
- ◆ 試料の少量化
  - ↳ 試料採取時間や輸送コストの低減
- ◆ 使用器具、溶媒量の削減
  - ↳ 前処理コストの削減

# 物性および基準値

測定対象: **4-ノニルフェノール (NP)** [NP1-13の異性体を含む]



分子量: 220.35

## 物性情報

融点:  $-10^{\circ}\text{C}$     沸点:  $293-297^{\circ}\text{C}$

logPow: **3.28**

環境省 「水質汚濁に関わる環境基準」に含まれる

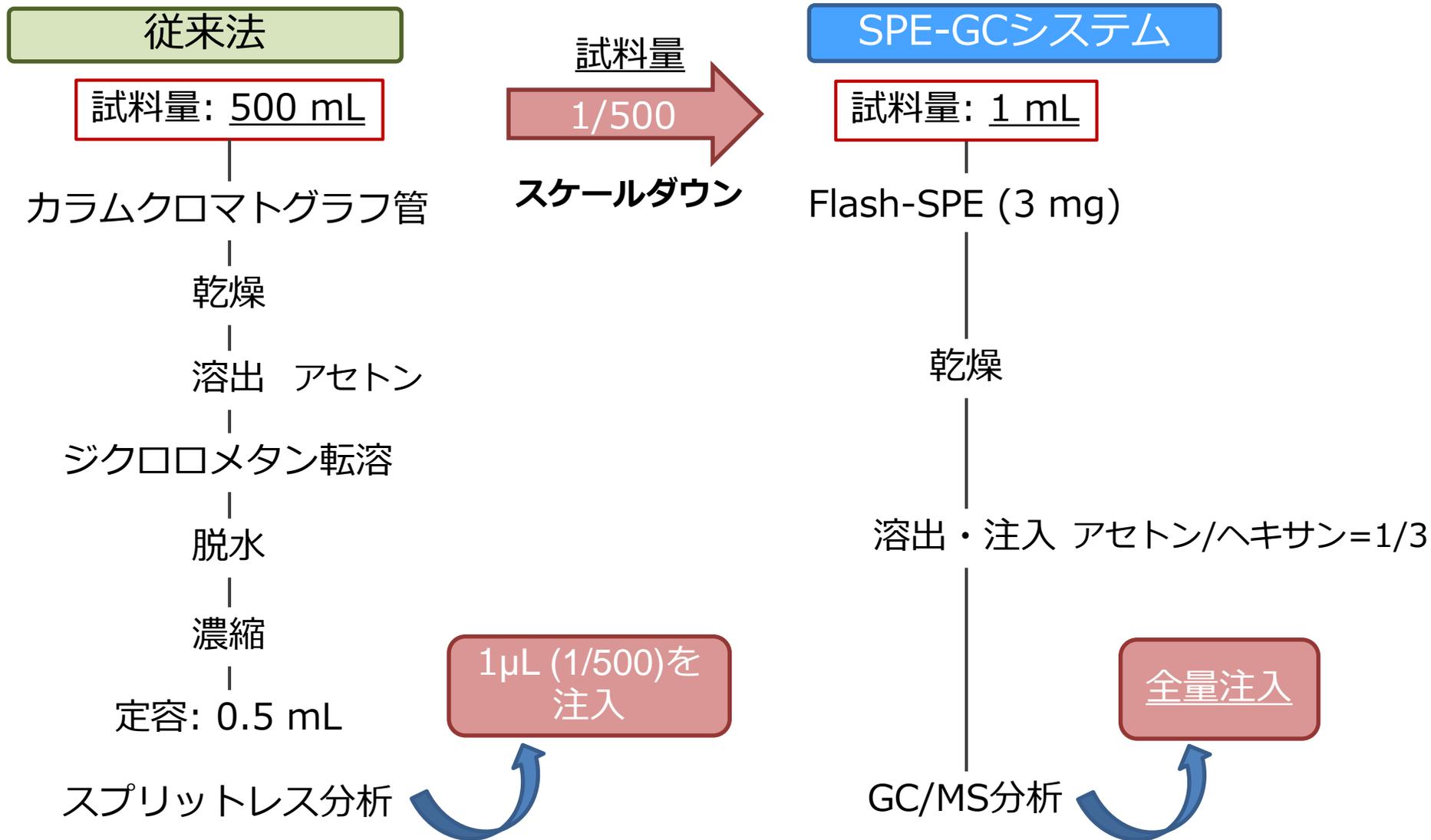
基準値 **0.002-0.0006 mg/L (ppm)**

定量下限値 **0.06  $\mu\text{g/L}$  (ppb)**

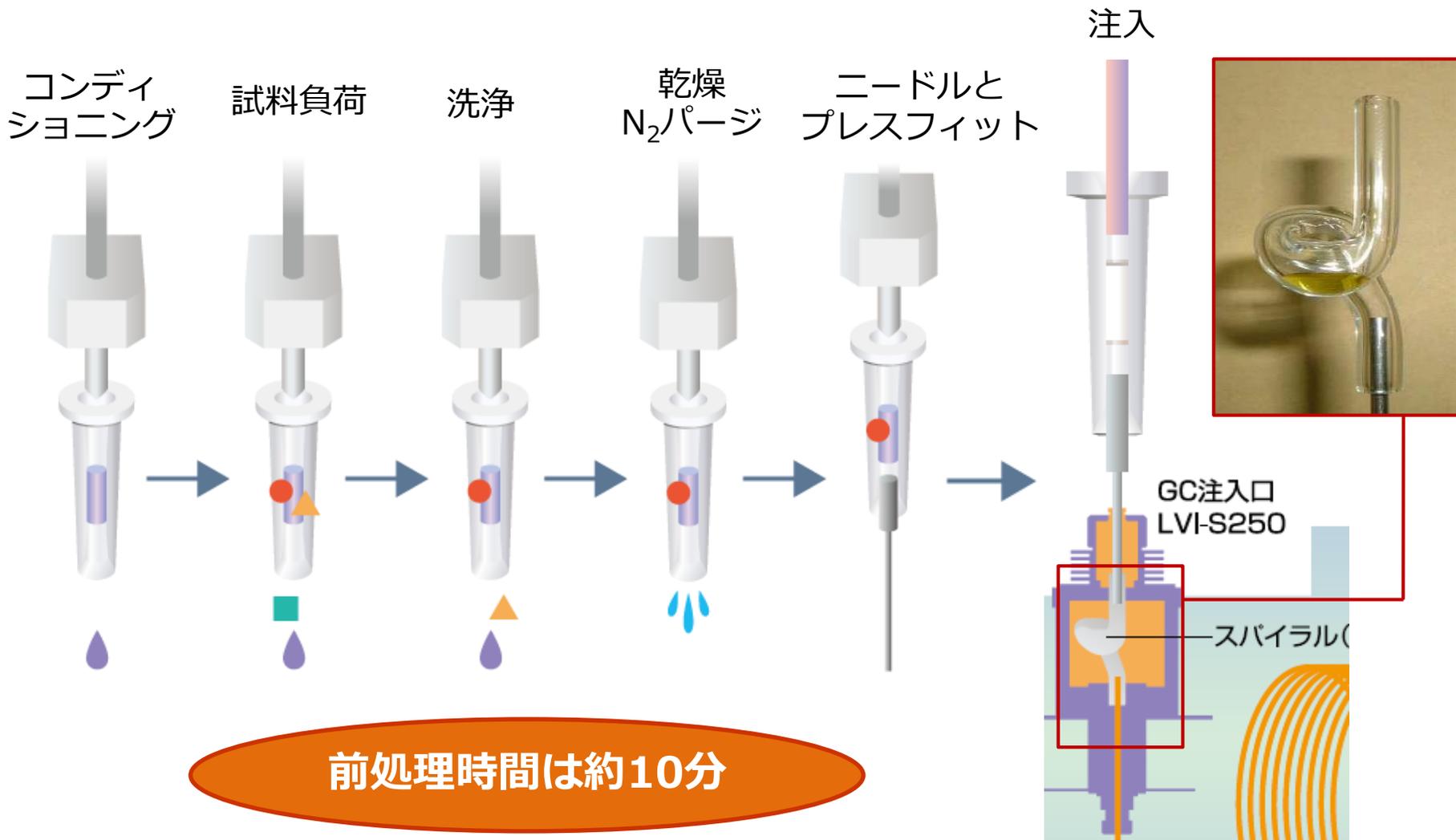
使用用途、生理活性

- 界面活性剤、除草剤、殺虫剤に使用される
- 内分泌かく乱物質として報告されている

# 前処理条件比較



# オンラインSPE-GCシステムについて



# 分析装置条件

## 分析装置

前処理装置： オンラインSPE-GC SGI-P100 [固相カートリッジ: Flash-SPE]

GC/MS： 7000C トリプル四重極GC/MS (アジレント・テクノロジー株式会社)  
[大量注入口装置: LVI-S250 搭載]

## LVI条件

注入モード： 大量注入

昇温条件： 70°C(0.42 min)-120°C/min-240°C-  
50°C/min-290°C(16 min)

## GC条件

カラム： VF-5ms [0.25 mm x 30 m (0.25 μm)]

昇温条件： 60°C(3min)-25°C/min-140°C-5°C/min-  
180°C-25°C/min-310(3min)

スプリットモード： 溶媒ベント

[70 kPa, 150ml/min(0.42 min), 50ml/min(3 min)]

## MS条件

イオン源温度： 230°C    トランスファライン温度： 290°C

測定モード： MRM



※写真はアジレントテクノロジー株式会社の許可の許可を得て使用しております。

# 条件検討項目

## ① 試料調製条件

アセトニトリル添加濃度  
(0%-40%)

## ② 試料負荷量

試料負荷量と面積値相関

## ③ 溶出溶媒量

溶出溶媒量と面積値の関係

## ④ PEG注入量

PEG共注入量と面積値の関係

### SPE-GCフロー

① ② 試料 1 mL (通水速度 10  $\mu$ L/sec)

#### コンディショニング

- アセトン: 500  $\mu$ L
- 10%アセトニトリル水: 200  $\mu$ L

Flash-SPE BEP※ (3 mg)

※ スチレンジビニルベンゼン充填剤

洗浄 10%アセトニトリル水: 100  $\mu$ L

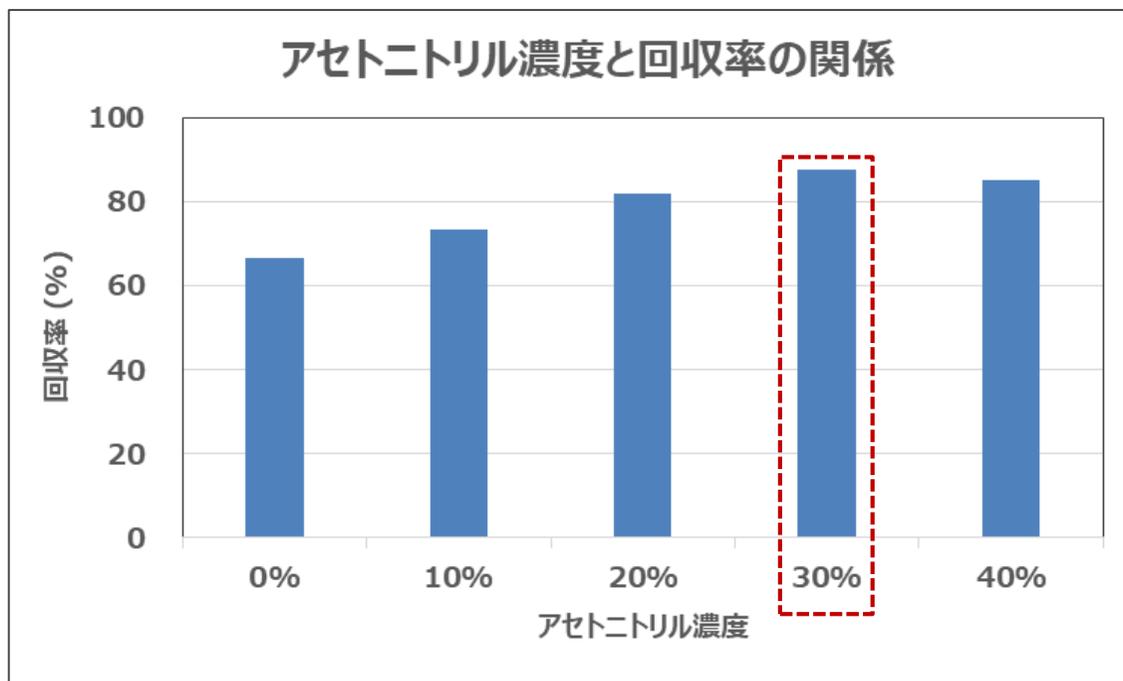
N<sub>2</sub>パージ 90 sec

溶出・注入 ③ ④ PEG添加アセトン/ヘキサン=1/3

GC/MS分析

# 試料調製条件検討

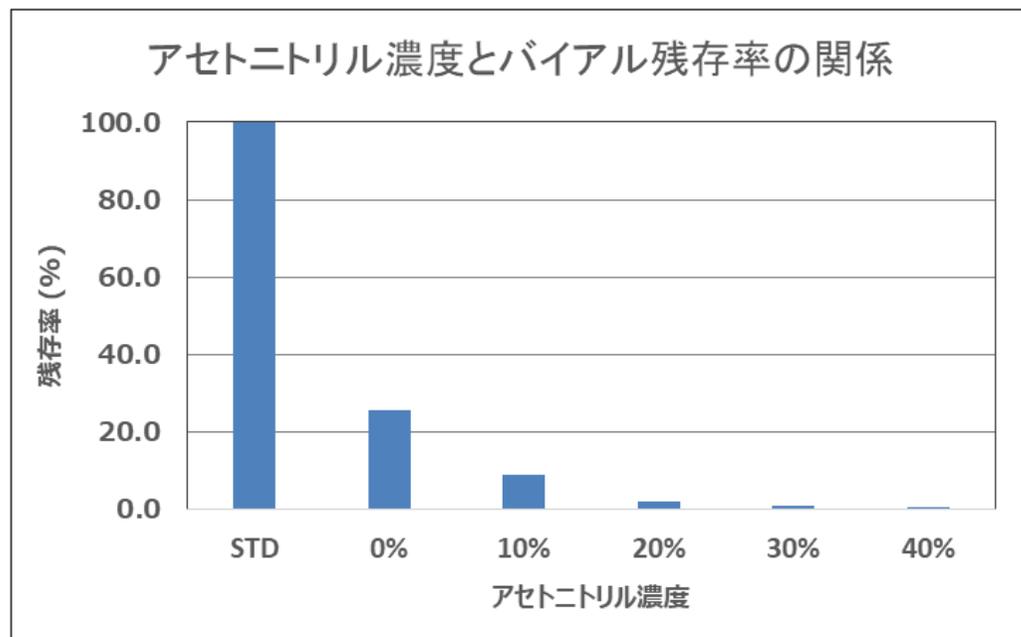
- ① 試料として市販のミネラルウォーターを使用
- ② 試料にアセトニトリル0%-40%の範囲で添加
- ③ 試料pHをHClを加えて酸性(pH=3)に調製
- ④ ノニルフェノール標準液※を添加      ※ 4-ノニルフェノール (関東化学)を標準品として使用



[ノニルフェノール濃度を10 ppbに調製した試料を測定]

# ガラスバイアルへの残存量確認

- ① アセトニトリル濃度の異なる試料(pH=3)を1.5mLバイアルに入れ、ノニルフェノール標準液を添加 (10ppb)
- ② 標準液を試料に添加した後、バイアル内の液をマイクロピペットで除去
- ③ N<sub>2</sub>パージでバイアル内を乾燥させ、アセトン/ヘキサン=1/3を1mL入れてバイアル内に残ったノニルフェノールを溶解し、GCへ注入



➡ 回収率とバイアル残存率の結果より  
アセトニトリル濃度 30%

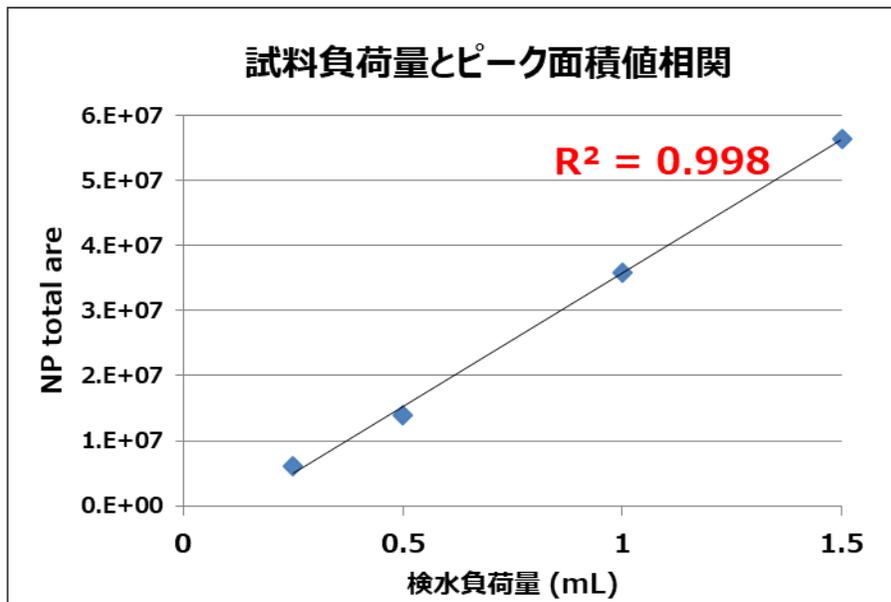
[STDは残量の比較対照としてノニルフェノール標準液をアセトン/ヘキサンに添加(10ppb)したサンプルを測定]

# 試料負荷量、溶出溶媒量検討

- ① 試料をアセトニトリル濃度30%(pH=3)に調製し、ノニルフェノール標準液を添加した試料を測定 (10ppb)

## 試料負荷量確認

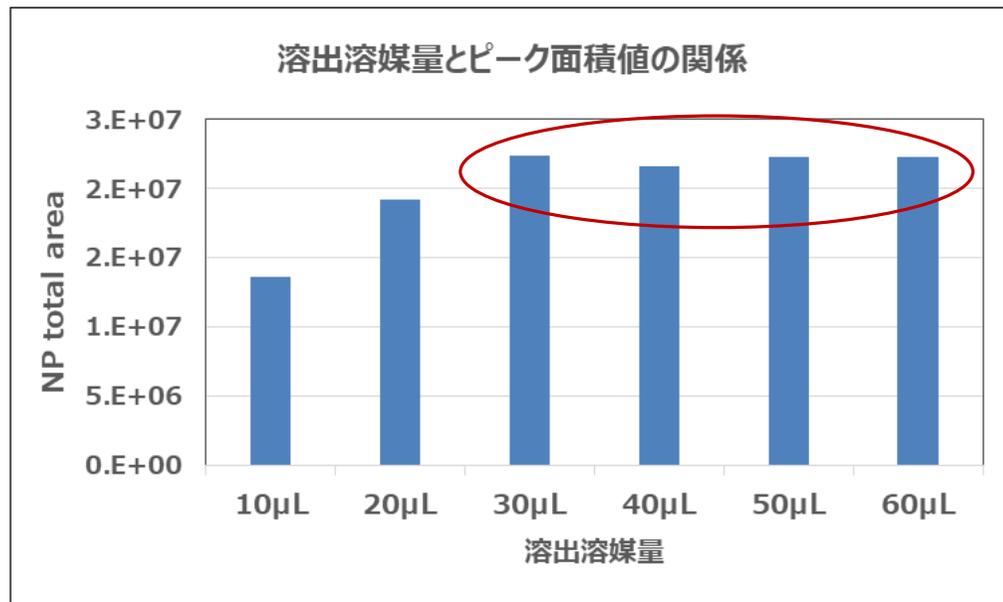
試料の固相負荷量を0.25-1.5 mLまでの範囲で変更し、面積値の直線性を確認



➡ 良好な相関

## 溶出溶媒量結果

溶出溶媒(アセトン/ヘキサン=1/3)量を10-60 μLまでの範囲で変更し、面積値を確認

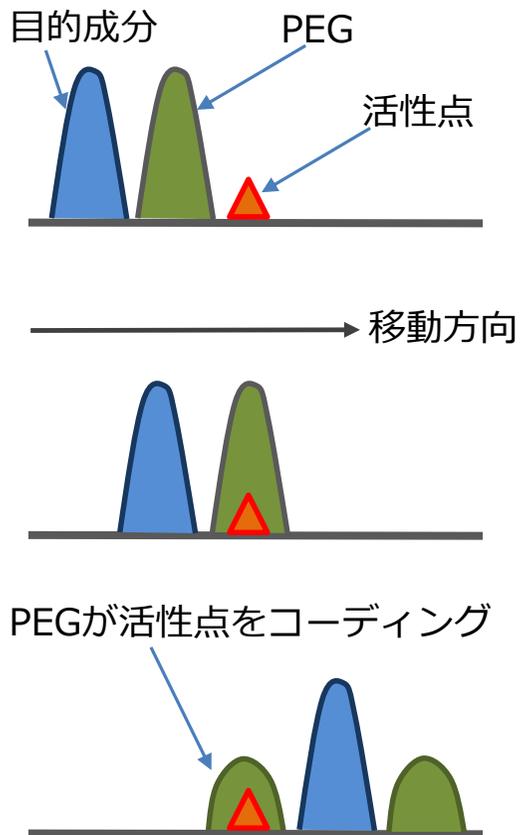


➡ 30μL以上で溶出量は十分

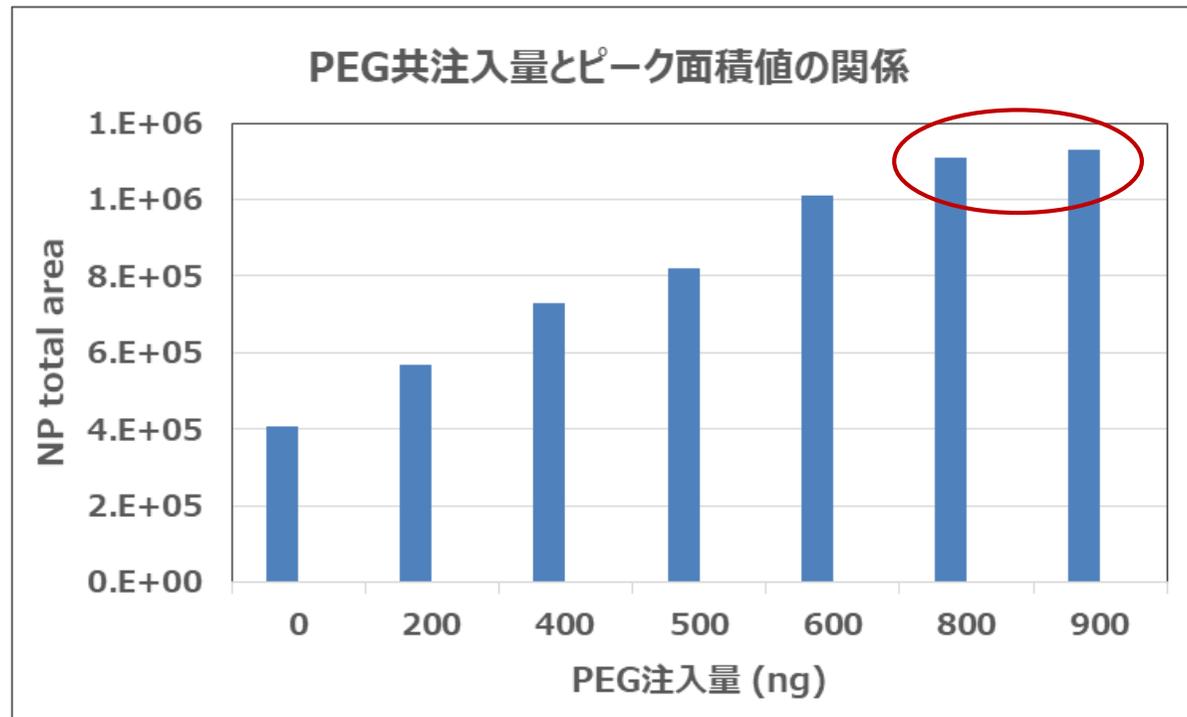
# PEG共注入量

ポリエチレングリコール(PEG)300を使用する目的

- GC/MSのインサート、カラム、イオン源にある活性点をコーディング
- 目的成分の活性点への吸着を防ぐことができる



PEG添加量を変えた10ppbスタンダード(アセトン/ヘキサン=1/3)を測定



➡ PEG共注入量 800ngが効果的

# 検討後フローチャート

## SPE-GCフロー

### ① 試料調製条件

- アセトニトリル濃度 30%

### ② 試料負荷量

- 1mL

### ③ 溶出溶媒量

- 40  $\mu$ L

### ④ PEG注入量

- 800 ng

① ② 試料 1 mL (通水速度 10  $\mu$ L/sec)

#### コンディショニング

- アセトン: 500  $\mu$ L
- 10%アセトニトリル水: 200  $\mu$ L

Flash-SPE BEP※ (3 mg)

※ スチレンジビニルベンゼン充填剤

洗浄 10%アセトニトリル水: 100  $\mu$ L

N<sub>2</sub>パージ 90 sec

溶出・注入 PEG添加アセトン/ヘキサン=1/3  
40  $\mu$ L (PEG300: 20 ppm) ③ ④

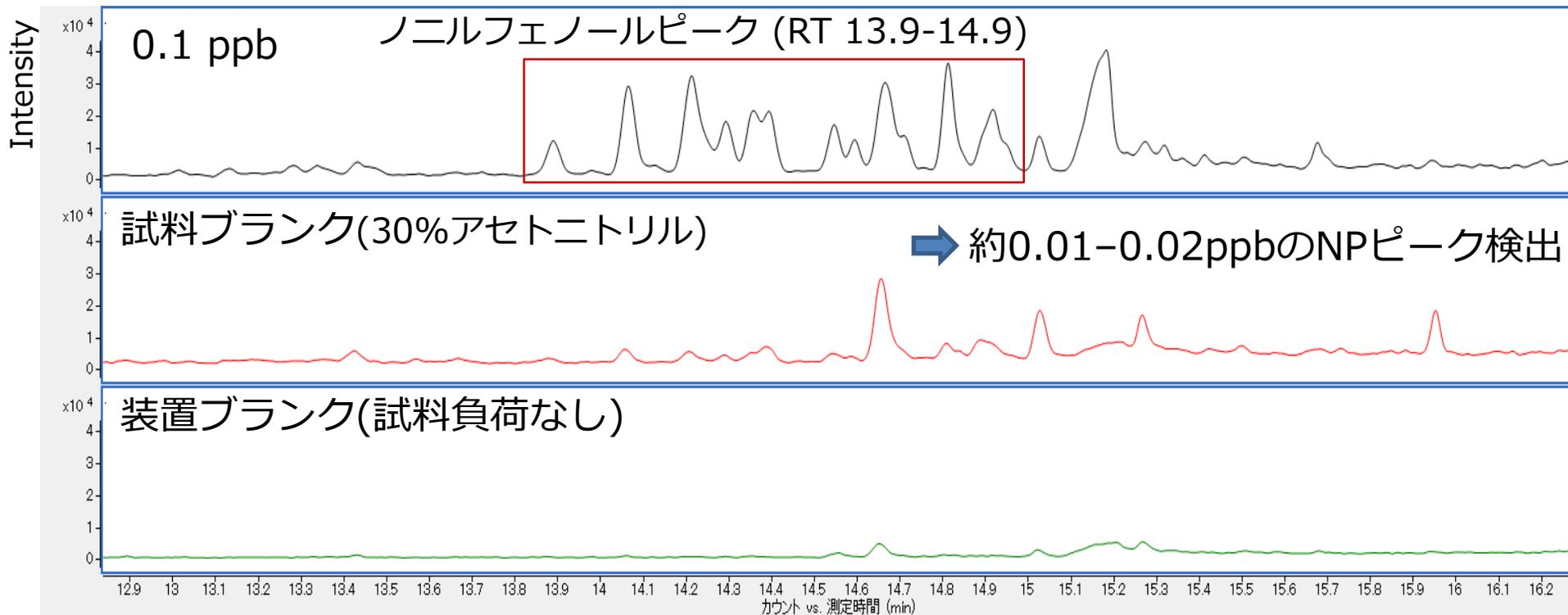
GC/MS分析

# ブランク試験

## ノニルフェノール面積値

	NP01	NP02	NP03	NP04	NP05	NP06	NP07	NP08	NP09	NP10	NP11	NP12	NP13
0.1ppb	13,036	77,832	34,241	24,171	6,153	27,325	3,169	10,364	31,376	9,861	12,747	3,551	47,227
検水ブランク	2,418	8,915	2,711	2,802	597	3,497	140	1,376	4,965	1,154	1,324	580	6,220
装置ブランク	369	829	288	258	50	267	53	354	530	211	356	99	495

## トータルイオンクロマトグラム



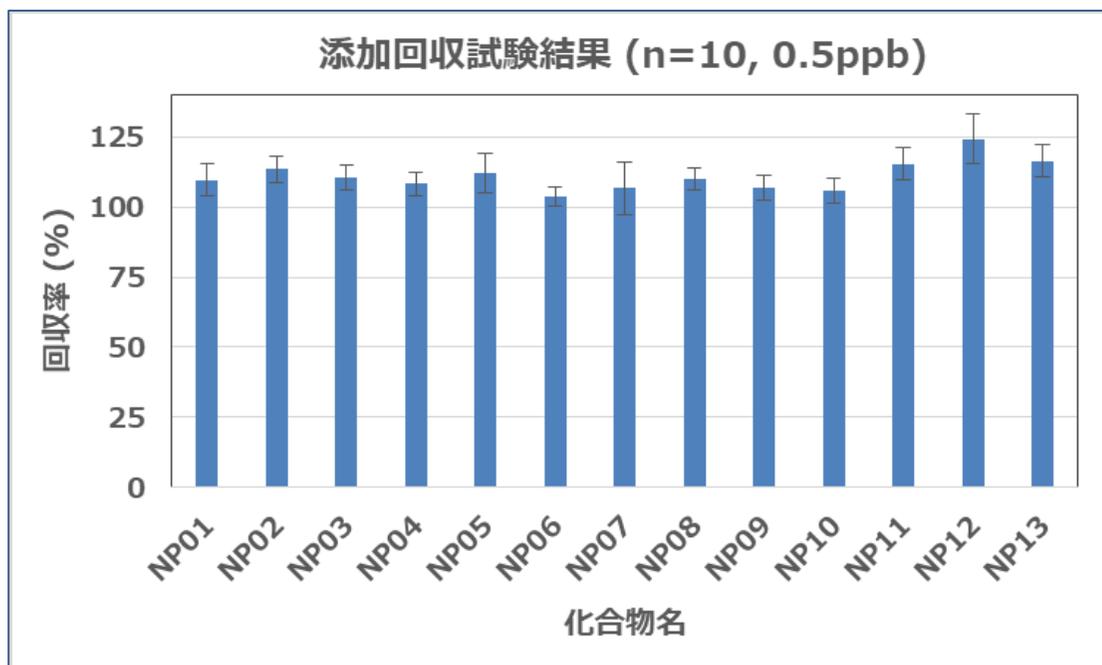
保持時間 (min) 13

# 添加回収試験

- ① 試料をアセトニトリル濃度30%(pH3)に調製し、ノニルフェノール標準液を添加 (0.5ppb)
- ② 溶出液およびスタンダードにPEG300を20ppmになるように添加
- ③ スタンダード40  $\mu\text{L}$  ※1を直接GCに注入して測定した面積値とSPE-GCにより測定した面積値を比較

$$\text{回収率} = \text{SPE-GC面積値} / \text{スタンダード面積値} \times 100$$

※1 固相に負荷した絶対量と直接注入した絶対量が同じになるように濃度調製



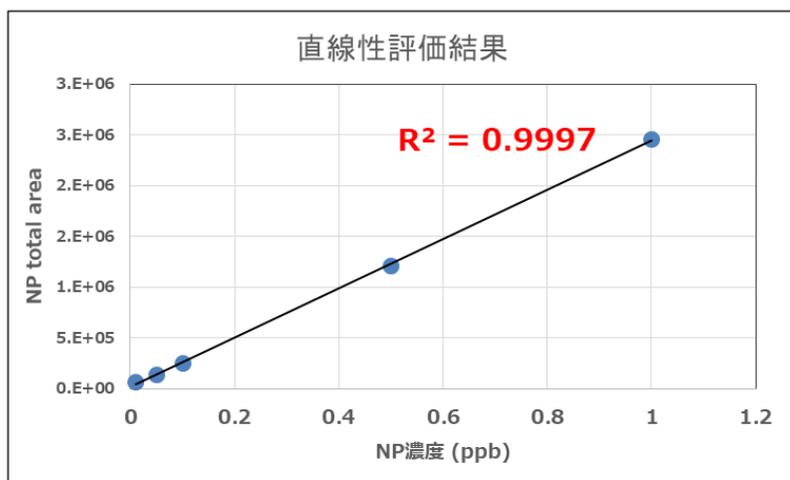
➡ NP1-13において100-120%の回収率結果が得られた

前処理の結果を正確に評価するため、内部標準による補正は行わずに回収率を算出

# 直線性評価 (1-0.01 ppb)

各試料濃度におけるオンラインSPE-GC測定結果 (n=5)

化合物名	1ppb		0.5ppb		0.1ppb		0.05ppb		0.01ppb	
	面積値	RSD%	面積値	RSD%	面積値	RSD%	面積値	RSD%	面積値	RSD%
NP01	112,629	5.0	56,157	6.6	11,677	8.8	7,384	9.0	4,193	3.7
NP02	629,665	5.4	313,868	4.9	65,425	10.8	35,785	6.5	18,626	4.2
NP03	291,684	3.6	142,316	4.5	28,773	10.7	15,617	5.0	7,267	4.8
NP04	204,198	3.2	99,215	5.4	20,885	9.1	11,642	9.4	5,610	10.3
NP05	61,631	6.3	29,934	6.7	5,381	12.8	3,017	14.9	1,709	9.3
NP06	214,821	3.4	102,240	4.0	22,143	13.1	11,897	8.4	5,664	5.6
NP07	27,072	8.1	13,533	3.8	2,887	16.6	1,850	12.7	916	21.0
NP08	80,377	4.3	39,213	3.0	8,561	12.0	4,466	7.7	2,099	11.9
NP09	262,630	3.8	127,286	4.0	26,336	10.8	14,401	6.1	7,419	2.9
NP10	81,711	4.5	40,360	5.2	8,623	8.5	4,847	9.8	2,460	11.4
NP11	99,861	4.6	49,355	4.9	10,647	11.4	5,917	8.7	2,744	16.2
NP12	19,754	5.2	10,643	5.5	2,564	21.7	1,428	16.9	1,242	15.6
NP13	369,663	4.0	184,545	6.0	38,888	12.0	21,194	9.4	9,587	5.0



基準値(0.6ppb)-定量下限値(0.06ppb)を含む濃度範囲で良好な結果が得られた

# まとめ

- ◆ オンラインSPE-GCシステムを使用することにより、試料量を500mLから1mLに減らすことが可能であった。
- ◆ オンラインSPE-GCシステムにより前処理時間を約10分に大幅短縮することが可能であった。
- ◆ 検水をアセトにリル濃度30%、溶出液にPEG300を添加することで回収率および再現性結果の向上が認められた。
- ◆ 前処理の自動化およびオンライン化により使用器具類を減らすことができ、コンタミネーションリスクの減少への貢献が期待された。
- ◆ ノニルフェノール分析におけるオンラインSPE-GCシステムの有効性が示唆された。