

報告

高速液体クロマトグラフィーによる化学物質の分析

—フェノール類、除草剂等10物質の分析及び大気採取方法の検討—

吉岡秀俊 泉川碩雄 清宮隆治
小山 功 早福正孝

1 はじめに

一般に有機化学物質の分析方法は、ガスクロマトグラフ(以下、「GC」と記する。)法が主として用いられており、近年では、GC-質量分析(GC-MS)法が主流になりつつある。しかし、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた環境大気中の有機化学物質の分析例はまだ少ない。HPLCは、GCやGC-MSほど熱エネルギーをかけることなく、穏やかな条件下で低分子量から高分子量の物質までを分離定量できる利点を有するため、環境分析への応用が期待でき、最近ではHPLC-MSも注目を集めている。

本報告では、当研究所で実施している「化学物質による環境汚染に関する研究」(以下「総合的研究」という。)の平成元年度対象物質の中から、GC-MSでは分析しにくい6物質を選択し、HPLCを用いて分析した場合の検討結果の詳細を説明するとともに、環境大気採取方法について検討した結果を述べる。また、近年社会的関心が高まっているゴルフ場散布農薬のHPLC分析法の検討結果も若干加える。

2 実験

(1) 分析対象物質

ア 「総合的研究」平成元年度対象物質

①2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(以下、「2,4-D」と記する。), ②2,4,6-トリクロロフェノール, ③2-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)プロピオン酸(「2,4,5-Tp」), ④2,3,4,6-テトラクロロフェノール, ⑤ペンタクロロフェノール(「PCP」)及び⑥ヘキサプロモベンゼン

イ その他除草剤

① α -(2-メチル-4-クロロフェノキシ)プロピオン酸ジメチルアミン(「MCPP」), ②2-クロロ-4,

6-ビス(エチルアミノ)-S-トリアジン(「CAT」, シマジンも一般的名称), ③2-メトキシ-3,6-ジクロロ安息香酸ジメチルアミン(「MDBA」)及び④2-(α -ナフトキシ)-N,N-ジエチルプロピオンアミド(「ナプロバミド」)

(2) 機器及び分析条件

ア HPLC

マルチソルベント送液システム Waters 600型に、手動インジェクター-K6U型又は自動インジェクター-712 Wisp型, 紫外吸光度検出器 Model 481型(いずれも Wates社製)及びインテグレートC-R3A型(島津製作所製)を接続して使用した。

イ HPLCの分析条件

(ア) ヘキサプロモベンゼン以外の物質の場合

カラム: NOVA PAK C₁₈ (3.9mm×15cm Waters社製)

移動相: アセトニトリル40%+水58.8%+酢酸1.2%

UV検出器: 波長 254nm, レンジ 0.01(AUFS)

注入量: 10 μ l~20 μ l

プレカラム: カラム前部に, NOVA PAK C₁₈ カートリッジを装着したプレカラムモジュールを取り付けた。

カラム温度: 40°C

流量: 1 l/min

(イ) ヘキサプロモベンゼンの場合

カラム: NOVA PAK C₁₈又は Zorbax ODS(4.6mm×25cm Du Pont Instruments社製)

移動相: アセトニトリル80%+水20%(NOVA PAK C₁₈の場合)又はアセトニトリル100%(Zorbax ODSの場合)

その他は, (ア)の分析条件と同じである。

(3) 大気吸着管

ア 架橋ポリスチレン樹脂 XAD-2を充填した吸着

管

(ア) ORBO-44

ORBO-44 (Supelco 社製) は、内径 6 mm のガラス管に、精製した XAD-2 (クロモソルブ102相当品) を一層目に 0.1 g 及び二層目に 0.05 g 充填し、一層目前部、層間及び二層目後部にガラスウールを詰めたものである。なお、ORBO-44 は National Institute Occupational Safety and Health (NIOSH) の分析法に合うように作られている。

(イ) 試作吸着管

Amberlite XAD-2 をソックスレー抽出器に入れて、約 24 時間アセトン洗浄した後、アセトン溶液中に保存した。使用時に内径 11 mm、クロマト部の長さ 9 cm の特注カラムクロマト管に、XAD-2 を 6.5 cm の長さ (XAD-2 乾重量 2 g) になるように充填した。なお、XAD-2 の両端は、2 ~ 4 μm のガラスウールを詰めて保持した。

イ ココナツ活性炭を充填した吸着管

ORBO-32 (large, Supelco 社製) は、ORBO-44 と同様のガラス管に、精製したココナツ活性炭を一層目に 0.4 g 及び二層目に 0.2 g 充填し、一層目前部にガラスウールを、層間及び二層目後部にウレタンフォームを詰めたものである。ORBO-32 も NIOSH 法に合うように作られている。

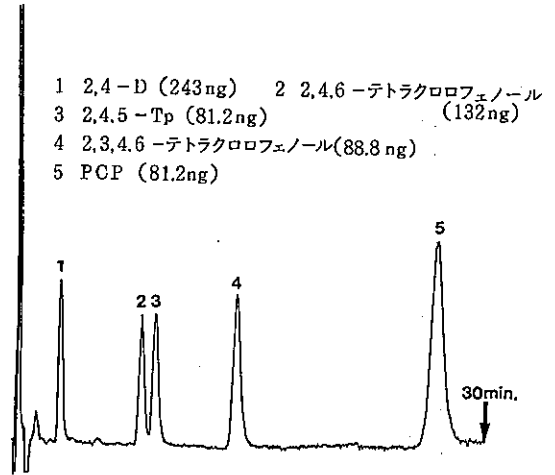
(4) 標準試薬等

2, 4-D, CAT 及び PCP は残留農薬試験用標準品、2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール及びヘキサプロモベンゼンは一級品、2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール及び 2, 3, 5, 6-テトラクロロフェノールは化学用 (以上和光純薬製) を使用した。2, 4, 5-Tp は Gr (ナカライテックス製) を使用した。

また、MCP P 及び MD B A の標準には、トリメック F 液剤 (東洋グリーン社製、MCP P 12.0%, MD B A 2.5%, 2, 4-D 26.0% 及び水、界面活性剤等 59.5% 含有) を使用した。ナプロバミドの標準には、クサレス (中外製薬社製、ナプロバミド 50.0% 及び鋳物質微粉等 50.0% 含有) を使用した。

3 結 果

(1) 標準を用いた場合の HPLC のクロマトグラム



- 1 2,4-D (243 ng)
- 2 2,4,6-テトラクロロフェノール (132 ng)
- 3 2,4,5-Tp (81.2 ng)
- 4 2,3,4,6-テトラクロロフェノール (88.8 ng)
- 5 PCP (81.2 ng)

HPLC 条件

移動相：アセトニトリル 40% + 水 58.8% + 酢酸 1.2%
 流量：1 ml/min
 カラム：NOVA PAK C₁₈ (3.9 mm × 15 cm) + NOVA PAK C₁₈ カートリッジ
 カラム温度：40 °C
 UV 波長等：254 nm, 0.01 AUFS

図 1 2, 4-D 等のクロマトグラム例

ODS 系逆相分配カラムを使用した HPLC 分析条件〔2(2)イ(ア)〕のクロマトグラムの例を図 1 に示した。なお、以後に示す図は、すべて図 1 と同じ縮尺にした。

本法は、酢酸を添加して pH = 3 程度にしたアセトニトリルと水を移動相にしており、極めて簡便である。

位置異性体の分離を調べた結果は、下記のとおりであった。試薬が市販されている 2, 4, 5- と 2, 4, 6-トリクロロフェノール及び 2, 3, 4, 6- と 2, 3, 5, 6-テトラクロロフェノールの分離を調べた結果、トリクロロフェノールの異性体は分離し得なかった。2, 3, 4, 6- 及び 2, 3, 5, 6-テトラクロロフェノールについては、不完全ながら分離された (図 2)。感度 (検量線直線範囲内の単位質量当りの面積積算値) は、トリクロロフェノールの場合、2, 4, 6- に比べ 2, 4, 5- の方が 1.7 倍高い。テトラクロロフェノールの場合、2, 3, 4, 6- に比べ 2, 3, 5, 6- の方が 1.3 倍高い。

ヘキサプロモベンゼンを分析する場合も、移動相を変えるだけで、同一カラムを用いて 8 分ほどで分析できる。

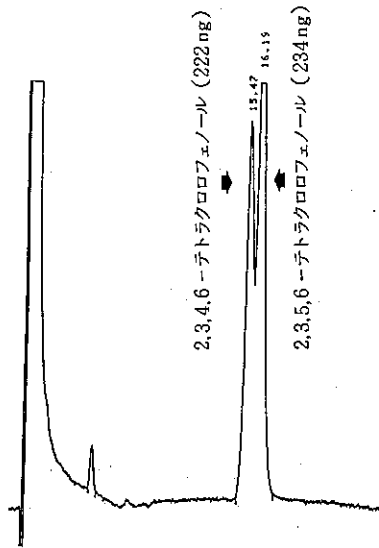


図2 2, 3, 4, 6-及び2, 3, 5, 6-テトラクロロフェノールのクロマトグラム

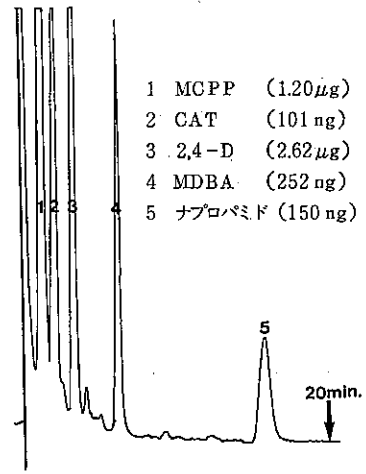


図3 除草剤のクロマトグラム例

ただし、実試料の分析には、目的ピーク付近の分離がさらに優れた25cmのODS系カラム Zorbax ODSを用いた。

また、2, 4-D及び、2, 4, 5-Tpのほかに、近年問題となっているゴルフ場散布農薬のうち除草剤として使用されるMCPP,CAT,MDBA及びナプロバミドも酢酸を用いた同条件下で、20分弱で分析できる(図3)。なお、MCPPとMDBAについては、2, 4-D標準を用いてトリメック中の2, 4-Dの濃度を求めた後、三成分の組成比から濃度を決定し、GC-MSによって同定した。HPLCとGC-MSを用いた場合の定量下限値の比較をした結果は次のとおりであった。標準溶液濃度で比較して、2, 4-Dは約100倍、MDBAは約30倍HPLCの方が下限値が低く、CATは同程度であり、ナプロバミドはGC-MSの方が約30倍低かった。(ただし、キャピラリーGC-MSへの注入量は、HPLCのおおよそ1/10以下である。)

以上の10物質について、標準を用いて求めた定量下限値及び検出限界値は、表1程度と考えられた。

(2) 標準添加回収試験

ア ORBO-44に対する添加回収試験 (50ml/minで24時間通気)

表1 定量下限値及び検出限界値

物質名	定量下限	検出限界
2,4-D	0.06 μg	0.02 μg
2,4,6-トリクロロフェノール	0.05	0.02
2,4,5-Tp	0.04	0.01
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	0.04	0.01
PCP	0.03	0.01
ヘキサプロモベンゼン	0.005	0.001
MCPP	0.2	0.05
CAT	0.01	0.003
MDBA	0.02	0.005
ナプロバミド	0.1	0.03

吸着樹脂 XAD-2 からの抽出溶媒としてアセトン、アセトニトリル及びトルエンについて検討した結果、アセトンが最も高い回収率を示したので、抽出溶媒はアセトンを用いることにした。

ORBO-44の一層目のXAD-2に標準を添加し、実試料のサンプリングと同じ条件である流量50ml/minで24時間通気した。その後の操作は実試料と同様である。(内容物を10ml遠沈管に入れてアセトンを5ml加え、20分間超音波抽出した後、4ml分取し窒素気流中で加温蒸

発させて約0.2mlに濃縮し、加温をやめて乾固させる。残留物をアセトニトリル0.2mlに転溶して、ポアサイズ0.45 μmのフィルター（クロマトディスク4N、クラボウ製）を通した液の20 μlをHPLCに供する。）

その結果、フェノール類及びヘキサプロモベンゼンは、90%以上の回収率であったが、2, 4, 5-TPは50%であり、2, 4-Dにいたっては、ほとんど回収されなかった。

そこで、グラスウールに同量の標準を添加して、上記と同様に大気を通気した後、グラスウールからの回収率を調べた。その結果2, 4-Dが79%とやや低めではあるが、2, 4-D及び2, 4, 5-TPも保持されることが確認された。（グラスウールの量を増やすか、より密なものを使用することにより、回収率は向上する。）

これらの結果をまとめて表2に示した。

表2 XAD-2 (ORBO-44) 及びグラスウールの添加回数試験 (50ml/minで24時間通気)

物質名	添加量 (μg)	回収率 (%)	
		樹脂	グラスウール
2,4-D	6.1	Tr	79
2,4,6-トリクロロフェノール	3.3	100±6.4*	61
2,4,5-TP	2.0	50±1.9	46
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	2.2	91±3.4	83
PCP	2.0	91±4.1	88
ヘキサプロモベンゼン	0.44	95±4.8	27

* n = 3

イ ORBO-32 (large) に対する添加回収試験 (未通気)

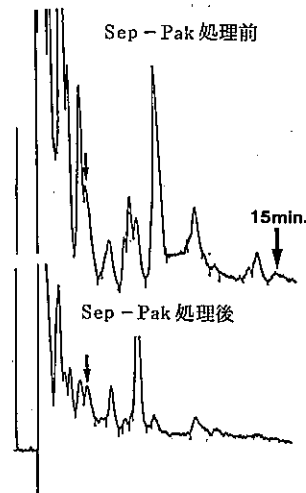
GC-MSを用いて分析する対象物質を添加したORBO-32からの抽出溶媒を検討したところ、二硫化炭素が優れていた。しかし、HPLCの対象物質のうちヘキサプロモベンゼンを除いては、二硫化炭素では抽出されなかった。ヘキサプロモベンゼンについては、活性炭から抽出される妨害物質に起因すると思われる巨大なピークと重なり定量不可能であった。

(3) ORBO-44採取による環境大気実試料の分析結果の補足

分析結果については、「総合的研究」の報文を参照されたい。ここでは、2, 4-Dについて述べる。

多くの環境大気実試料のクロマトグラムには、2, 4-Dと同じ保持時間をもつ微小ピークが存在したが、2, 4-Dが流出しない条件でSep-Pak C₁₈ (Waters社製)を通した試料溶液にも同じピークが現れることを確認し、2, 4-Dによるピークではないと判断した。

すなわち、一度n-ヘキサンに再溶解した試料をSep-Pak C₁₈カートリッジにのせ、n-ヘキサン15mlを流出させ、濃縮乾固後アセトニトリルに転溶した液を、再度HPLCに供して処理前のクロマトグラムと比較した(図4)。



矢印は、2, 4-Dの保持時間を示している。

図4 Sep-Pak C₁₈による2, 4-Dの存在確認

(4) XAD-2を用いた試作吸着管に対する添加回収試験

添加回収試験は、以下のとおり行った。

XAD-2樹脂部に標準を添加する(吸着管-1)。吸着管-1の後部に無添加のXAD-2吸着管(吸着管-2)を連結する。さらに、吸着管-1の前部に活性炭を充填した吸着管を連結する。次に流量0.5 l/minで24時間室内空気を通気する。その後、吸着管-1及び-2にそれぞれ200mlの分液ロートを付けてアセトン150mlを流出させる。流出液をKD濃縮し、窒素気流中で濃縮乾固後アセトニトリル0.5mlに転溶した後フィルターを通した液をHPLCに供する。(なお、吸着管を3本連結したために、これ以上の流量では、使用したダイアフラム

表 3 XAD-2 吸着管の添加回収試験結果
(0.5 l/minで24時間通気)

物 質 名	添加量 (μg)	回 収 率 (%)		
		吸着管-1	吸着管-2	ガラスウール
2,4-D	12	Tr	ND	100
2,4,6-トリクロロフェノール	6.6	90 \pm 3.4*	ND	28
2,4,5-Tp	4.1	66 \pm 2.6	ND	91
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	4.4	100 \pm 0.2	ND	97
PCP	4.1	94 \pm 2.8	ND	95
ヘキサンプロモベンゼン	0.87	96 \pm 0.7	ND	77

* n = 3

ポンプの容量を越える。))

また、ガラスウールに、同量の標準を添加して、同様に通気した。

これらの結果をまとめて表3に示した。

2, 4-D はガラスウールに保持され、吸着樹脂から

は溶出しない。同じ官能基を有する2, 4, 5-Tp もガラスウールに保持される。一方、2, 4, 6-トリクロロフェノールは、ガラスウールよりも吸着樹脂に保持される。また、吸着管-2には移動していない。

本吸着管は、XAD-2 が安価であること、また試料採取後分液ロートを取り付けて、クロマト管として使用できるので分析操作が簡略化できるという利点がある。

XAD-2 は多くの物質を吸着できるため、他の物質についても応用できよう。

参 考 文 献

- 1) 桑田一弘：高速液体クロマトグラフ法を用いる環境試料の分析，公害と対策，20，p.793 (1984)
- 2) 篠原亮太ら：Amberlite XAD-2 樹脂のよる水中微量有機物の抽出法の検討，分析化学，26，p.856 (1977)