研究論文

水中のノニルフェノールポリエトキシレート およびその分解生成物の一斉分析における ミセル動電クロマトグラフィーの評価

角 井 伸 次*・Pham Manh Hoai**・福 島 久美子*
池 道 彦**・藤 田 正 憲**・田 中 稔*

要 旨

河川水中のノニルフェノールポリエトキシレートおよびその分解生成物（エチレンオキシド鎖1～18のノニルフェノールエトキシレート、ノニルフェノール、ノニルフェノキシ酢酸およびノニルフェノキシエトキシ酢酸）の簡便な一斉分析法として、ミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）の評価を行った。Oasis HLB カートリッジ（N-ビニルピロリドン-ジビニルベンゼン共重合体）に試料水1000mlを通して 10^4 倍濃縮し、デオキシコール酸ナトリウムをミセル形成剤とする MEKC により分析した。河川水に添加した試料成分の回収率は82%以上、相対標準偏差は3.0～15%と良好であった。まだ検討すべき課題もあるが、本法が上記物質の簡便な一斉分析法として有望ことが示された。

キーワード：ノニルフェノールポリエトキシレート、分解生成物、一斉分析、ミセル動電クロマトグラフィー

1. はじめに

ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEOs）は工業用に大量に使用されてきた非イオン界面活性剤であり、何らかの処理の後に水環境中に放出されていると考えられるが、この過程で多様な分解物（代謝産物）を生じることが知られている¹⁾。すなわち、好気的生分解でNPnEOsのエチレンオキシド（EO）鎖の短縮が起これ、EO鎖が1および2のノニルフェノールモノエトキシレート（NP1EO）およびノニルフェノールジエトキシレート（NP2EO）、その末端がカルボキシル化されたノニルフェノキシ酢酸（NP1EC）およびノニルフェノキシエトキシ酢酸（NP2EC）が生成し、これら中間分解物は嫌気的生分解によりノニルフェノール（NP）に転換することが報告されている²⁾。NPには内分泌攪乱性のあることが認められていることから、親化合物の界面活性剤、中間分解物およびNPによる河川水などの水環境汚染が懸念されている。したがって、水圏中のこれらNPnEOs親化合物と

その分解生成物の分析が重要であり、ガスクロマトグラフィー（GC）³⁻⁵⁾ および液体クロマトグラフィー（LC）⁶⁻⁸⁾ が主な分析法として用いられている。GCでは誘導体化を採用してもEO鎖が5以上のNPnEOsの分析は困難である。また、LCでEO鎖の短い分解物まで分離するには、サイズ排除と逆相吸着の混合モードカラムを厳密なグラジエントプログラム下で操作しなければならない。近年、キャピラリー電気泳動法（CE）は簡便な操作で高分離能が達成されるためにさまざまな分野で注目されている。CEのNPnEOs分析への応用として、イオン性ミセル形成剤を用いるCEの一つのモードであるミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）によるEO鎖長の平均が10のNPnEOs ($n_{ave}=10$) 試料の分析が報告されているが⁹⁾、個々のピークの同定はされておらず、またNPやNPnECsは含まれていない。

そこで本研究では、GCでは不可欠な誘導体化をすることなく、LCでは分離困難なEO鎖の短い分解生成物、とくにイオン性物質のNPnECsと電気的に中

*大阪大学環境安全研究管理センター Shinji TSUNOI, Kumiko FUKUSHIMA, Minoru TANAKA

**大阪大学大学院工学研究科 Hoai Manh PHAM, Michihiko IKE, Masanori FUJITA

2004年7月14日受付

2004年12月6日受理

性物質である NPnEOs の相互分離の可能性を有する MEKC に着目し、NP および NPnECs ($n=1\sim 2$) を含めた NPnEOs ($n=1\sim 18$) の簡便な一斉分析法として、MEKC の評価を行った結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬

NP はキシダ化学製、NPnEOs ($n_{ave}=2, 5, 10$) は東京化成工業製、NPnEOs ($n=1\sim 4$) は NPnEOs ($n_{ave}=2$) をシリカゲルカラムで分離した。NP1EC と NP2EC は NP1EO と NP2EO をそれぞれ Jones 酸化¹⁰⁾ して合成した。ミセル形成剤のデオキシコール酸ナトリウムには和光純薬製のものをを用いた。

2.2 固相抽出

試料濃縮用の固相抽出には、Waters 製 Oasis HLB カートリッジ (500mg, 6mL) をアセトン (5mL)、メタノール (5mL)、水 (10mL) の順にコンディショニングして使用した。5mM HCl で pH3 に調整した試料水 (100 または 1000mL) を $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過した後 (河川水の場合のみ)、固相カートリッジに流量 10mL/min で流し、アスピレーターで吸引脱水後、アセトン (10mL) で溶出した。この溶出液を窒素気流下で乾固後、水 - n -プロパノール (1:1) (100 μL) に溶解し、MEKC 測定した。

2.3 MEKC 測定

MEKC 測定装置には、大塚電子製の CAPI-3200 ダイオードアレイ検出器付キャピラリー電気泳動システムを用いた。キャピラリーは内径 $50\mu\text{m}$ 、長さ 52cm (有効長 40cm) のヒューズドシリカ、印加電圧は 15kV、測定温度は 25℃、検出波長は 195nm で測定した。試料注入は落差法 (25mm, 2sec) で行い、泳動液には 75mM SDC を含む 80mM ホウ酸緩衝液 (pH7.5) と n -プロパノール (10%) 混合溶液を $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過して用いた。一回の測定が終了した後は 0.1M NaOH (10min)、泳動液 (10min) で順次洗浄し、次の測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 MEKC 測定条件の最適化

本研究は、NP、NPnECs ($n=1\sim 2$) および NPnEOs ($n=1\sim 18$) の疎水性ノニル基の方ではなく、親水基の違いによる一斉分析を MEKC で簡便に行おうとするものであり、まず標準試料を用いてそのための測定

条件の最適化を検討した。

3.1.1 ミセル形成剤

ミセル形成剤の選択が分離の選択性を大きく左右するので、まず最初にミセル形成剤から検討した。MEKC で最もよく使用されているドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の場合、NPnEOs は EO 鎖の長いものから順に溶出し、NP および NPnECs は NP1EC, NP2EC, NP の順に溶出した。しかし、NP は NP1EO と同時に溶出し、また NPnECs も NPnEOs ピークと重なってしまうため一斉分析は不可能であった。

次に、胆汁酸塩類のデオキシコール酸ナトリウム (SDC) とコール酸ナトリウム (SC) をミセル形成剤に用いたところ、SDS の場合と同様に NPnEOs は EO 鎖の長いものから順に溶出し、NP と NP1EO は同時に溶出するものの、NP, NP1EC, NP2EC の順に溶出し、NPnECs を NPnEOs および NP と分離することができた。この場合も同時に溶出する NP と NP1EO を分離するため、SDC と SDS との混合ミセル、さらにこれら一鎖一親水基型界面活性剤と分離特性が大きく異なる二鎖二親水基型界面活性剤¹¹⁻¹²⁾ についても検討したが、両ピークを分離することはできなかった。

また、SDC と SC はほぼ同等の分離能を示したため、安価な SDC をミセル形成剤として、種々の測定条件の最適化を検討した。

3.1.2 その他測定条件

分離能以外に、検出感度、分析時間などの最適化のため、SDC 濃度、緩衝液、有機モディファイアー、印加電圧、測定温度、検出波長について検討した。SDC 濃度は 0~100mM、緩衝液はホウ酸およびリン酸緩衝液、有機モディファイアーは n -プロパノール、メタノールおよびアセトニトリル (0~30%)、印加電圧は 5~25kV、測定温度は 5~35℃、検出波長は 190~210nm で検討し、得られた MEKC 測定の最適条件を表 1 にまとめて示す。

この条件下で得られた NPnEOs ($n_{ave}=5$)、NP および NPnECs ($n=1\sim 2$) 混合物の標準水溶液のクロマトグラムを図 1 に例示する。NP と NP1EO は同時に溶出するが、他の化合物はよく分離できた。

3.2 検量線の直線性と検出限界

単一物質として得られている NP, NPnEOs ($n=1\sim 4$) および NPnECs ($n=1\sim 2$) の 7 種類について、表 1 の最適条件下で検量線を作成し、直線性、再現性および検出限界を評価した。その結果を表 2 に示す。試

表1 MEKC 測定 の最適条件

項 目	条 件
ミセル形成剤	75mM デオキシコール酸ナトリウム (SDC)
緩衝液	80mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.5)
有機モディファイアー	n-プロパノール (10%)
印加電圧	15kV
測定温度	25℃
検出波長	195nm

表2 検出器応答

化合物	濃度範囲 (μM)	相関係数 (r)	検出限界* ¹ (μM)	相対標準偏差* ² (%)
NP	50~1000	0.9975	27	9.6
NP1EO	50~1000	0.9960	23	5.7
NP2EO	50~1000	0.9992	21	11.0
NP3EO	50~1000	0.9976	21	8.7
NP4EO	20~1000	0.9951	10	4.3
NP1EC	50~1000	0.9995	38	7.5
NP2EC	50~1000	0.9972	43	11.0

* 1 標準偏差の3倍 (n=5, 50μM)

* 2 n=5, 50μM

料濃度50~1000 μM (NP4EOは20~1000 μM) 範囲で検量線を作成したところ, 良好な直線性が得られた。また, 50 μM 試料を5回繰り返し測定し, 標準偏差の3倍を検出限界としたときの検出限界は10~43 μM, 相対標準偏差は4.3~11.0%であった。

3.3 純水への添加—固相抽出

上述の検討結果から明らかのように, MEKCは

NPnEOs 親化合物およびその分解生成物に対して優れた分離能を示した。一般に, MEKCでは絶対感度は高いが, 濃度感度が低いため, 河川などの環境水に適用するには $10^3 \sim 10^4$ 倍程度の対象成分の濃縮が必要となる。固相抽出により対象成分を濃縮するため, 最適な固相の選択を行った。水中の汚染物質の固相抽出に汎用されているC₁₈, スチレン—ジビニルベンゼン共重合体 (SDB) およびグラファイトカーボン, 酸性から塩基性の幅広い物質の固相抽出に同じ手順で対応できることで最近開発され注目されているN-ビニルピロリドン—ジビニルベンゼン共重合体 (HLB), そして本研究対象物質中にイオン化しやすいNPnECsが含まれているので強塩基性アニオン交換体とC₁₈を連結したもの (SAX + C₁₈) の5種類について, NP, NP1EC および NP2ECがそれぞれ20 μg/ℓ となるように純水に添加した標準溶液100ml (pH3) を用いて回収率 (10^3 倍濃縮) を検討し, 予備的に固相の選択を行った。

その結果, グラファイトカーボンでは3成分全てが, SAX + C₁₈ではNP1ECとNP2ECが固相に保持され, 回収できなかった。C₁₈, SDBとHLBでは3成分ともアセトンで溶出回収できたが, HLBが最も高い回収率を示した。

2.2節に示した最適化した方法により, NP, NPnEOs (n=1~4), NPnEOs (n_{ave}=5) および NPnECs (n=1~2) を純水1000mlに添加し (5nM (1.1~2.0 μg/ℓ) 溶液), 回収 (10^4 倍濃縮) した結果を表3に示す。

図-1 NPnEOs (n_{ave}=5), NP および NPnECs (n=1~2) 混合物標準水溶液のクロマトグラム

表3 純水からの添加回収結果

化合物	回収率 (%)	相対標準偏差* ¹ (%)
NP + NP1EO	98	14
NP2EO	95	10
NP3EO	92	11
NP4EO	98	15
NP1EC	110	7.3
NP2EC	85	5.5
NPnEOs (n _{ave} =5)	96* ²	8.5

スパイク濃度：5nM (1.1~2.0μg/ℓ)

* 1 n=5

* 2 全ピーク面積より評価

表4 河川水からの添加回収結果

化合物	猪名川		寝屋川	
	回収率 (%)	相対標準偏差* ¹ (%)	回収率 (%)	相対標準偏差* ¹ (%)
NP + NP1EO	101	14	121	15
NP2EO	103	12	90	8.7
NP3EO	82	7.3	91	10
NP4EO	109	5.0	101	13
NP1EC	98	4.5	143	3.0
NP2EC	—	—	—	—

スパイク濃度：5nM (1.1~2.0μg/ℓ)

* 1 n=5

回収率(85~110%)および再現性(相対標準偏差5.5~15%)ともに良好な値が得られた。

3.4 河川水への添加-固相抽出

河川水に本固相抽出を適用する場合、河川水中の共存物質、とくに有機化合物による妨害の有無が問題となる。純水の場合と同様に、河川水(猪名川)に

NP, NP1EC および NP2EC がそれぞれ 2μg/ℓ となるように添加し、1000ml から回収 (10⁴倍濃縮) した時のクロマトグラムを図-2 に示す。NP および NP1EC のピークは SDB (図-2 (b)) および HLB (図-2 (c)) 両固相を用いた時には検出できたが、NP2EC ピークは 26min 前後に現れる大きな河川水中の共存成分のピークと重なって現れた。C₁₈ 固相の場合には、NP ピークしか確認できず、NP1EC および NP2EC ピークはともに大きな共存成分のピークと重なり、確認できなかった (図-2 (a))。また、21~24min 範囲に現れる NPnEOs (n≥5) と思われるピーク強度も弱いことが分かる。さらに、ノイズの大小から、HLB が固相として最適であると判断した。この 26min 前後に現れる妨害ピークはフミン酸を添加すると大きくなることから、河川水中のフミン酸に由来するピークと推定される。なお、シリカゲルを用いるクリーンアップを試みたが、まだ妨害を除去するには至っていない。

NP, NPnEOs (n=1~4) および NPnECs (n=1~2) を猪名川および寝屋川から採取した水に添加し (5 nM 溶液)、回収 (10⁴倍濃縮) した結果を表4 に示す。回収率および再現性ともに良好な値が得られた。なお、寝屋川の場合に、NP1EC (143%) および NP + NP1EO (121%) が 100% を超える高い回収率となったが、これは寝屋川の水中にこれらが高濃度に含まれているためと推定される⁵⁾。

3.5 河川水からの NPnEOs およびその分解生成物の固相抽出

3.4 節の河川水への添加-固相抽出の回収実験のクロマトグラム (図-2) から、EO 鎖が 5 以上の NPnEOs (n≥5) と考えられるピークが認められるの

固相：(a) C₁₈, (b) SDB, (c) HLB.

ピーク：1 = NP, 2 = NP1EC, 3 = NP2EC

図-2 河川水に添加した NP, NP1EC および NP2EC の回収 (10⁴倍濃縮)

(a) 寝屋川, (b) 猪名川

図-3 河川水の固相抽出物のクロマトグラム

で、本法で両河川水を 10^4 倍濃縮し、MEKC測定を行った。その時に得られたクロマトグラムを図-3に示す。NPnEOs ($n_{ave}=5$) を標準添加すると、各ピーク面積が増大することにより、ピークの確認を行った。EO鎖が5から15のNPnEOsが存在することが分かる。また、その構造の類似性からNP8EOの検出器に対する感度がNP4EOと同じと仮定すると、例えばNP8EOの濃度は寝屋川水中には $4.7 \mu\text{g}/\ell$ 、猪名川水中には $6.0 \text{mg}/\ell$ と見積もられた。

4. ま と め

本研究は、誘導体化をすることなく、NPおよびNPnECs ($n=1\sim 2$) を含むNPnEOs ($n=1\sim 18$) の簡便な一斉分析がMEKCで行えるかどうかを検討し、以下のことが明らかとなった。

- (1) MEKC ミセル形成剤をいくつか検討したところ、SDCを用いるとNPとNP1EO以外の上記成分の一斉分離が行えた。
- (2) 標品が単一物質として得られているNP、NPnEOs ($n=1\sim 4$) およびNPnECs ($n=1\sim 2$) を純水へ添加し、Oasis HLB 固相抽出、 10^4 倍濃縮を行うことにより、これらを85~110%の回収率(相対標準偏差5.5~15%)で、 $10\sim 43 \mu\text{M}$ レベル(相対標準偏差4.3~

11%)まで検出可能なことが分かった。

- (3) 河川水への同様の添加回収では、回収率82~143%、相対標準偏差3.0~15%であり、バックグラウンドも比較的安定していることが示された。しかし、NP2ECのピークは河川水中のフミン酸に由来すると推定される大きなピークと重なって現れた。
- (4) 今回の検討結果から、MEKCでは回収率、再現性も良好で、GCおよびHPLCでは困難なNPnEOsおよびその分解生成物の簡便な一斉分析法への可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Fujita, M., Ike, M., Kaku, H., Sakaguchi, Y., Asano, M., Maki, H., Nishihara, T.: Behavior of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plant in Japan -biotransformation and ecotoxicity-, *Wat. Sci. Technol.*, **42**, 23-30 (2000)
- 2) Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C.: 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science*, **225**, 623-625 (1984)
- 3) Rudel, R.A., Melly, S.J., Geno, G.S., Brody, J.G.: Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage and groundwater on Cape Cod, Massachusetts, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 861-869 (1998)
- 4) Diaz, A., Ventura, F., Galceran, M.T.: Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain

- nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method, *Anal. Chem.*, **74**, 3869-3876 (2002)
- 5) Pham, M.H., Tsunoi, S., Ike, M., Kuratani, Y., Kudou, K., Pham, H.V., Fujita, M., Tanaka, M.: Simultaneous determination of degradation products of nonylphenol polyethoxylates and their halogenated derivatives by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry after trimethylsilylation, *J. Chromatogr. A*, **1020**, 161-171 (2003)
- 6) Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J.: Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **72**, 4322-4330 (2000)
- 7) Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A.: Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **75**, 4811-4817 (2003)
- 8) Jahnke, A., Gandrass, J., Ruck, W.: Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1035**, 115-122 (2004)
- 9) Herrero-Martinez, J.M., Fernandez-Marti, M., Simo-Alfonso, E., Ramis-Ramos, G.: Determination of alkylphenol ethoxylates by micellar electrokinetic chromatography with bile salts, *Electrophoresis*, **22**, 526-534 (2001)
- 10) Marcomini, A., Corcia, A.D., Samperi, R., Capri, S.: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products, *J. Chromatogr. A*, **644**, 59-71 (1993)
- 11) Harino, H., Tsunoi, S., Yoshioka, J., Araki, T., Masuyama, A., Nakatsuji, Y., Ikeda, I., Tanaka, M.: Separation of pollutant phenols by micellar electrokinetic chromatography with double-chain surfactants having two sulfonate groups, *Anal. Sci.*, **14**, 719-724 (1998)
- 12) Harino, H., Tsunoi, S., Sato, T., Tanaka, M.: Applicability of micellar electrokinetic chromatography with double-chain surfactant having two sulfonate groups to the determination of pollutant phenols in water, *Anal. Sci.*, **16**, 1349-1351 (2000)

Evaluation of Micellar Electrokinetic Chromatography for Simultaneous Analysis of Nonylphenol Polyethoxylates and Their Degradation Products in Water

Shinji TSUNOI, Hoai Manh PHAM, Kumiko FUKUSHIMA, Michihiko IKE
Masanori FUJITA, Minoru TANAKA

ABSTRACT

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was used preliminarily to evaluate the simple, simultaneous analysis of nonylphenol polyethoxylates (NPnEOs) and their degradation products (NPnEOs: n = number of ethoxy units; 1-18, nonylphenol, nonylphenoxycetic acid and nonylphenoxyethoxycetic acid) in water. A 1000 ml water sample was loaded into a cartridge packed with Oasis HLB, copoly (N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene). After concentrating the eluate (10^4 times), the concentrate was subjected to MEKC with sodium deoxycholate as the micelle-forming reagent. More than 82% of the analytes spiked to the Ina and Neya river waters were recovered with good reproducibility (relative standard deviation = 3.0-15%). Thus, the application of this simple method to the simultaneous analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in water is promising, though further improvement is needed.

Key Words : nonylphenol polyethoxylates, degradation products, simultaneous analysis, micellar electrokinetic chromatography