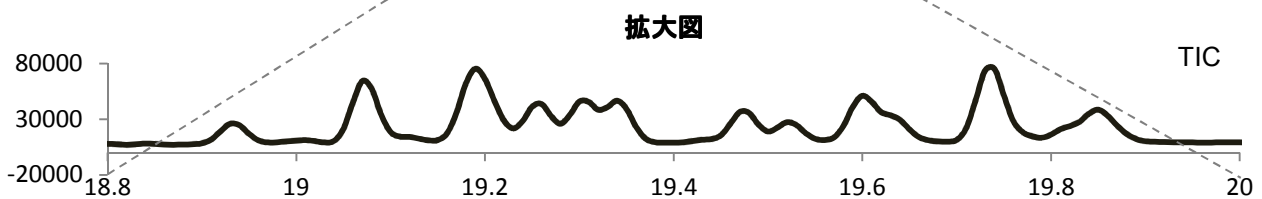
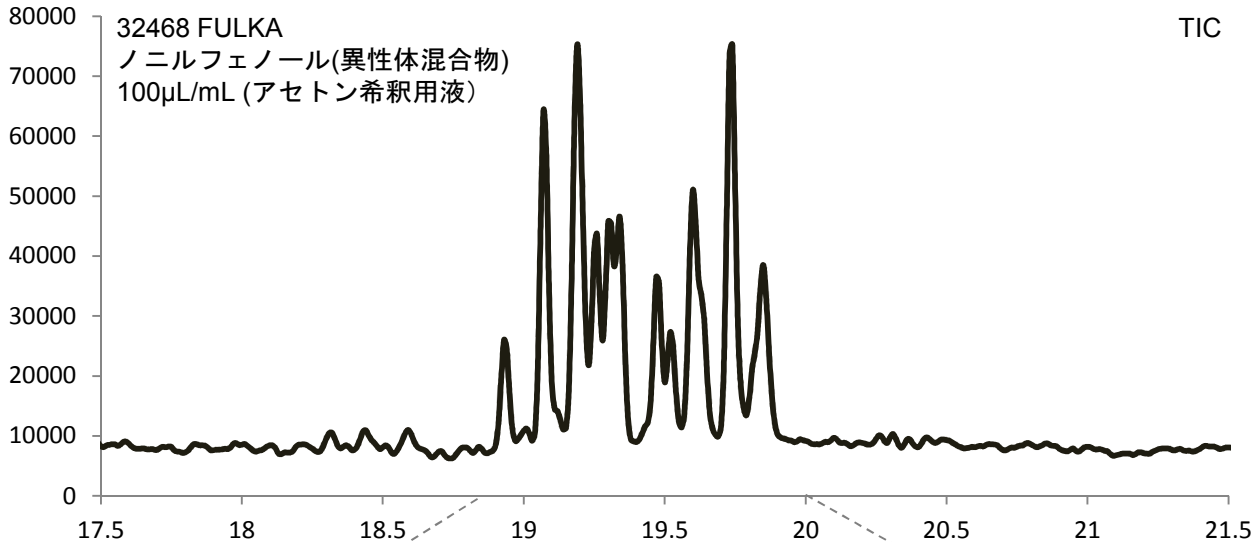
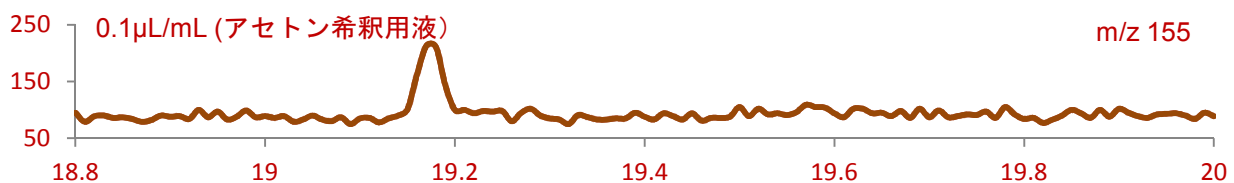
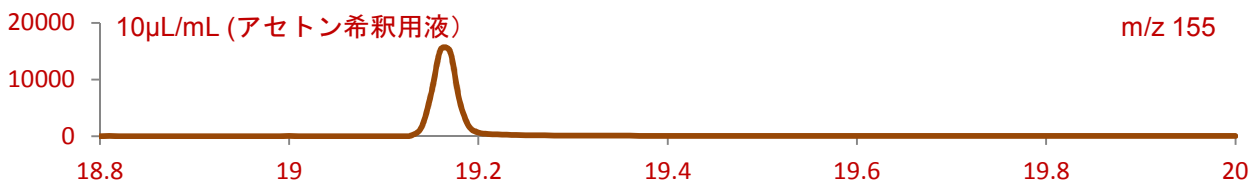


ノニルフェノール測定例



32468 FULKA, ノニルフェノール(異性体混合物), 1000 μg/mL in acetone



33574 FULKA, 13Cラベル化 4-(3,6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール, 10 μg/mL in acetone

分析カラム

28471-U SUPELCO, SLB-5MS 0.25 (ID) × 30(m) df=0.25μm ¥83,000

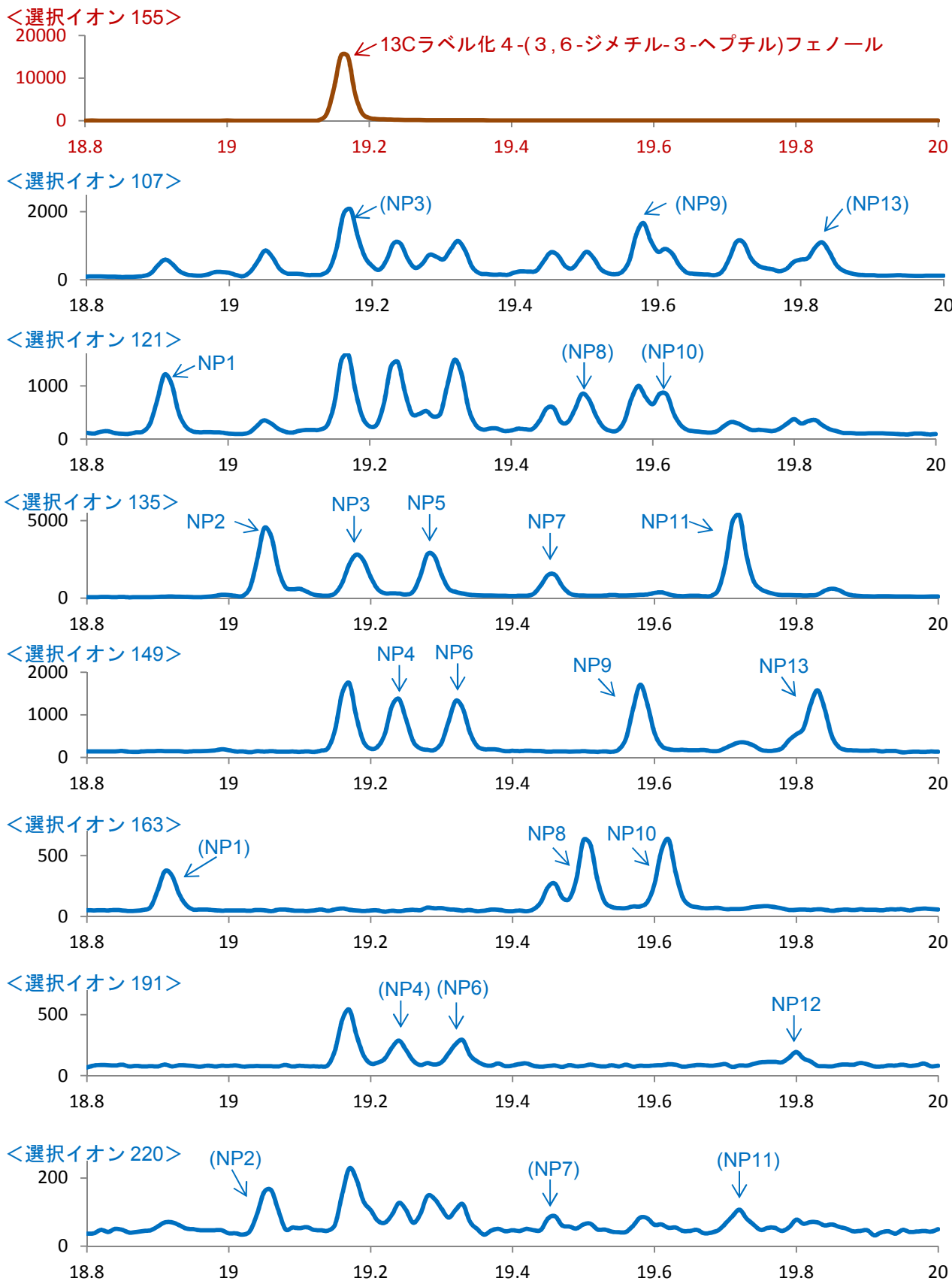
GC-MS条件

[GC-2010]
 INJ:280°C, スプリットレス, カラム線速度: 40cm/sec
 オープン温度: 50°C 1min/hold, 8°C/min to 250
 [GCMS-QP2010 Ultra]
 イオン源温度 :230.00 °C, インターフェース温度 :250.00 °C

定量・確認イオン条件 (m/z)

Ch1-m/z :107.00	Ch6-m/z :149.00
Ch2-m/z :111.00	Ch7-m/z :155.00
Ch3-m/z :113.00	Ch8-m/z :163.00
Ch4-m/z :121.00	Ch9-m/z :191.00
Ch5-m/z :135.00	Ch10-m/z :220.00

キャピラリーカラム 28471-U SUPELCO, SLB-5MS 0.25 (ID) × 30(m) df=0.25μmを用いた際の
32468 FULKA ノニルフェノール(異性体混合物)10μL/mL (アセトン希釈用液) のクロマトグラム



注) 図中の () ピークは確認イオン

新たな ^{13}C 標識した内部標準を用いた ISO/CD 18857-2 に従った表面水と廃水中のアルキルフェノール類、アルキルフェノールエトキシレート類及びビスフェノール A の分析における研究所間試験

Olaf P. Heemken, Member of Working Group DIN NA 119-01-03-02-02 "Phenols with GC" olaf.heemken@hanse-analytics.de
Ernst Stottmeister, Convener of Working Groups ISO TC 147/SC 2/ WG 17 "Phenols" and DIN NA 119-01-03-02-02 "Phenols with GC" ernst.stottmeister@uba.de

Analytix Issue 4, 5・2007 合併号にて報告したように、アルキルフェノール類とその短鎖エトキシレート類は、内分泌攪乱の特性があるため、相当な環境関連性があります。このため、これらの物質はいくつかの国際的な測定プログラムに導入されています。ヨーロッパにおける表面水の最も重要な監視プログラムには "Water Framework Directive" 2000/60/EC 及び北東大西洋の水のための "OSPAR Convention for the Protection of the Marine Environment" があります。

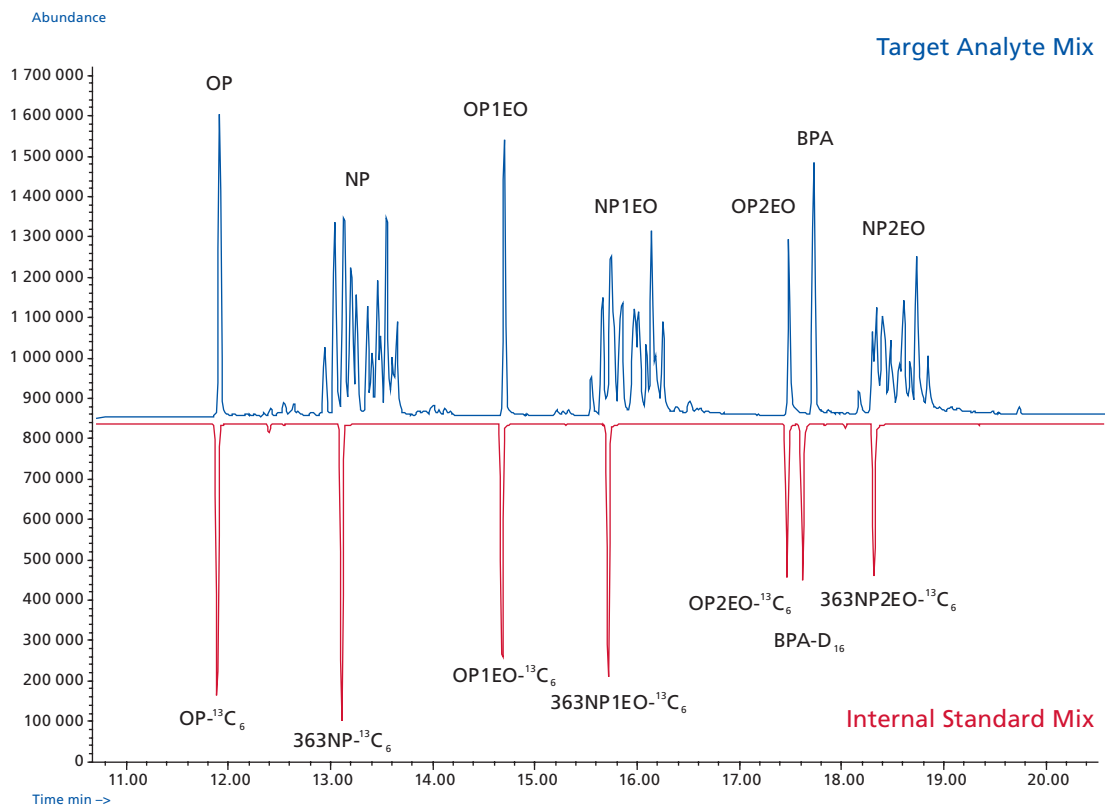
アルキルフェノール類、ノニルフェノール及びそのエトキシレート誘導体は異性体の工業上の混合物であるため、特殊な分析課題があります。Figure 1 は、工業的なノニルフェノール及びモノ、ジ-エトキシレートのクロマトグラムを示します。パターン中の各々のピーク関係は試料や標準によって異なってくるものの、これらの同定はクロマトグラムのピークパターンをもとにしています。ノニルフェノール及びそのモノ、ジ-エトキシレートと共に溶出する物質は、測定において妨害になります。これらの三つの分析物は、クロマトグラムのパターンに属する全ピークの合計量から定量されるため、これは結果に大きな影響を与えます。分

析者は、多成分分析物に起因する試料からの目的のピークだけをとるようには注意しなければなりません。複雑な環境試料においては、GC-MS を用いても前述したような妨害が生じます。これらの化合物を測定する難しさは、異なる研究所間での試験結果が大きくばらついた^[1,2]という事実からも例証されます。現在の分析手順のもうひとつの欠点は、適切な同位体標識された内部標準の欠落です。

これらの理由により、固相抽出及び GC/MS を用いた無ろ過の水試料中のアルキルフェノール類、アルキルフェノールエトキシレート類及びビスフェノール A の測定法の ISO 標準法を開発するように、German Institute for Standardisation (DIN と称される) は、2006 年 4 月に新規項目提案を国際標準化機構 (ISO) に提示しました。

最終評価のため ISO/CD 18857-2^[3] と称される方法の性能や、異なる研究所で得た分析結果の比較可能性についての情報、及び多成分分析物 (例えば、ノニルフェノール異性体の工業的混合物) を定量するために、特別に開発された内部標準の適合性などを評価する

Figure 1 目的分析物の混合物及び内部標準混合物のクロマトグラム



ために、研究所間試験により整合性を立証しました。研究所間試験はISO 5725^[4]に従って評価し、二種の複製の無ろ過水試料で行いました。: 0.05~0.4 µg/Lの分析物濃度の目的化合物を含む表面水 (2 × 1 L) 及び0.1~5 µg/Lの濃度の目的化合物を含む廃水 (2 × 100 mL)。全研究所は、ドラフト試験法に規定された手順に正確に従うことが求められました。つまり、応用された方法は下記のステップから成ります。:

- (1) 水試料を硫酸あるいは塩酸を用いてpH 2に酸性化します。
- (2) Table 2に記載されている¹³C 標識内部標準を加えます。
- (3) 固相抽出を行い、カートリッジを乾燥させます。
- (4) 溶出し、抽出液の濃縮及び再濃縮を行います。
- (5) MSTFAで誘導体化します。
- (6) トリメチルシラン誘導体の測定及び定量を行います。

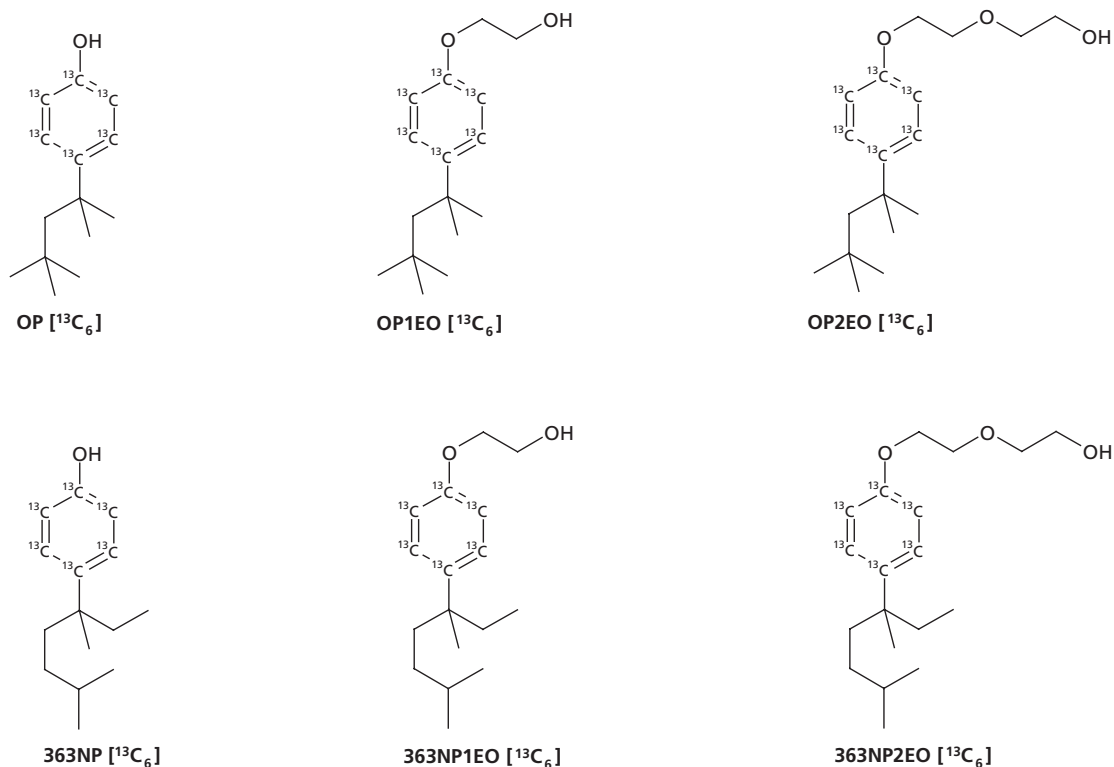
方法の詳細は、References^[3]をご参照ください。研究所間試験は連邦環境庁 (Bad Elster, Germany) により組織され、2007年11月から始まりました。4つの異なる国 (オーストリア、カナダ、イタリア、ドイツ) の

14研究室が参加しました。4つの国の13の研究室が結果を報告しました; ひとつの研究室が離脱しました。

Table 1に今回の試験結果の要約を示します。方法の精確さは回収率により示され、方法の精度は異なる研究室間の比較可能性の評価基準として再現性の変動係数 CV_R を測定し、繰り返し精度 CV_I を研究室内部の精度の評価基準としました。データより、ISO/CD 18857-2をもとに開発された方法は、水試料中のオクチルフェノールとノニルフェノール及びそれらのモノ、ジ-エトキシレートの定量分析のための確実な方法であることを示します。ビスフェノールAもこの方法により測定することができます。得られた結果は、良好な精確さと再現性を有していました。この内容で開発された同位体標識した標準物質は、ISO/CD 18857-2に特定されている全化合物の精確で精密な定量を可能とする信頼できる内部標準であることが証明されました。

シグマ アルドリッチは、オクチルフェノールとノニルフェノール及びそれらのモノ、ジ-エトキシレートの定量分析のためのISO/CD 18857-2中の同位体標識し

Figure 2 ¹³C標識したオクチルフェノール、ノニルフェノール及びそのエトキシレート類の分子構造



(continued on page 12)

た化合物の全範囲を現在提供しています。Table 2の一覧は、対応する製品番号にて利用可能な濃度を示します。¹³C 標識した化合物を GC-MS で分析する場合、LC-MS/MS で分析するのに理想的な二重水素化した化合物もあることを加筆します。

References

- 1] Loos, R.; Wollgast, J.; Castro-Jimenez, J.; et al., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2008, 27 (1), 89–95.
- 2] Sobiecka, E.; Van der Sloot, H.; Hansen, N.; Gawlik, B. M., Project HORIZONTAL Validation Report, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg 2007, ISBN 978-92-79-07123-2.
- 3] International Standardisation Organisation, ISO/CD 18857-2, 2008.
- 4] International Standardisation Organisation, ISO/CD 5725-6, 1994.

Table 1 表面水中のオクチルフェノールとノニルフェノール (OP、NP)、対応するエトキシレート類 (_{1,2}EO) 及びビスフェノールA (BPA) の ISO/CD 18857-2 の研究室間検証からの性能データ

Matrix	Compound	No. of labs. *	Results used*	Outliers [%]	Total mean**	Assigned value**	Recovery [%]	CV _R [%]	CV _F [%]
spiked surface water [ng/L]	OP	13	26	0.0	53.7	50.0	107.3	19.0	2.5
	OP ₁ EO	11	22	15.4	86.2	88.0	98.0	10.0	2.0
	OP ₂ EO	12	24	7.7	68.7	68.0	101.0	15.9	3.4
	NP	13	26	0.0	216.1	150.0	144.1	29.5	7.8
	NP ₁ EO	13	26	0.0	234.5	190.0	123.4	23.3	6.2
	NP ₂ EO	10	20	23.1	306.3	290.0	105.6	13.6	3.1
	BPA	12	24	0.0	82.8	80.0	103.4	23.4	3.8
spiked waste water [µg/L]	OP	11	22	15.4	1.55	1.50	103.6	10.8	3.5
	OP ₁ EO	12	24	7.7	1.27	1.30	97.3	13.9	2.5
	OP ₂ EO	12	24	7.7	0.87	0.90	96.5	14.1	4.1
	NP	12	24	7.7	3.80	3.50	108.6	16.8	5.5
	NP ₁ EO	12	24	7.7	3.91	4.10	95.4	14.5	3.9
	NP ₂ EO	13	26	0.0	3.84	3.80	101.1	21.9	4.2
	BPA	12	24	7.7	1.18	1.20	98.2	22.5	1.9

* without outliers

** all mass concentrations in ng/l (surface water) or µg/l (waste water)

Table 2 ¹³C 標識化したオクチルフェノール、ノニルフェノール及びその対応するエトキシレート類 (アセトン溶液)

品名	容量/濃度	Cat. no.	Package size	Cat. no.
4-tert-octylphenol (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33565-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33566-10ML
4-tert-octylphenol monoethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33563-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33564-10ML
4-tert-octylphenol diethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33229-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33244-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33574-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33575-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol monoethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33572-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33573-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol diethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	1 mL / 10 µg/mL	33207-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33222-10ML
4-tert-octylphenol (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33557-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33559-10ML
4-tert-octylphenol monoethoxylate (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33523-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33525-10ML
4-tert-octylphenol diethoxylate (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33254-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33257-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33569-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33571-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol monoethoxylate (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33567-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33568-10ML
4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol diethoxylate (Ring D ₂)	1 mL / 10 µg/mL	33249-1ML	10 mL / 1 µg/mL	33252-10ML
Target analyte mix according to ISO/CD 18857-2			10 mL / 1 µg/mL	33623-10ML
内部標準 mix according to ISO/CD 18857-2			10 mL / 1 µg/mL	33627-10ML

ISO 18857-2 ¹³C ラベル化体および重水素体内部標準を使用するアルキルフェノール、アルキルフェノールエトキシレートの分析

シグマ アルドリッチは、GC-MS、LC-MS用同位体ラベル化化合物を販売しています。

Olaf P. Heemken, Member of ISO/DIN working group "Phenols with GC," Olaf.Heemken@hanse-analytics.de
Nicole Amann, Product Manager Analytical Standards, Sigma-Aldrich Nicole.Amann@sial.com

アルキルフェノールは、非イオン系テンサイド類、紙の分散剤、革製品、農薬製剤の乳化剤、穴あけや浮選の補助剤として広く試用されているアルキルフェノールエトキシレートを合成するためのスタート物質です。その中でノニルフェノール(NP)とオクチルフェノール(OP)のエトキシレートは、最も重要な物質です。エトキシレートは、約100種類あります。アルキルフェノールエトキシレートは、年間全世界で使用量が約600,000トンで膨大に生産されています[1]。

40年以上の間、広く普及した結果、アルキルフェノールとアルキルフェノールエトキシレートは、至る所に存在する環境汚染物質となり[2,3]、食品中にも見かけるようになりました[4]。環境下において、長鎖アルキルフェノールエトキシレートは、すぐにその対応するアルキルフェノールに分解します。アルキルフェノールの物理化学的性質は、水の存在に特別な関連があります。第一に多くの水溶性物質は、高い毒性があります。第二にアルキルフェノールエトキシレートと比較して、OPとNPは、高い安定性があり、水溶性が低いため生物濃縮の高い可能性があります。この生物濃縮の環境への影響は、アルキルフェノールが、エストロゲンのような活性を見せたり、魚や水生哺乳類の雄の妊性を混乱させたりするように重大な懸念となっています[5]。同じメカニズムが1,2つのエトキシ基を持つOPとNPの短鎖エトキシレートに存在します。

OPとNPまたそれらのモノ、ジエトキシレートの環境影響は、モニタリングプログラムとして国内外の法律で迅速に監視されています。最も重要な協定の一つは、海洋環境保護のためのOSPAR協定です。1988年からOP、NPとNPエトキシレートは、優先化学物質として指定されています。他の基本となる法律は、the European Water Framework Directive 2000/60/ECです。この指示書のAnnex Xは、NPとOP(テスト中)を優先有害物質として指定

しています。これらの法律の目的は、これらの物質の排出と損出を地表水において20年以内にゼロにすることを監視するためです。環境中におけるこれらの化合物のモニタリング効果と法律順守の検証のため、信頼性のある厳格な分析法が不可欠です。しかし、アルキルフェノールやそれらのエトキシレートの分析は、そもそもラベル化内部標準物質が一部存在しない理由で大変難しく、しばしばOP、NPやそれらのエトキシレートのn-異性体が内部標準物質として代わりに使用する際、n-異性体が分岐した異性体と違った吸着や溶出の性質をみせ、誤った結果になることがあります。

その他、分析の難しさは、NP自身に起こります。生産工程で使用する工業グレードNPは、異性体の錯体混合物です。Figure1のGC-MS分析は、主に分岐パラ-異性体(>90%)、分岐オルソ-異性体(<10%)と微量のデシルフェノールの混合物を示しています。パラ-異性体は、さらに約10種類の化合物から構成されています。NPエトキシレートは、工業グレードNPからの異性体と同じパターンを示します。工業グレードNPの最も一般的な異性体の一つが、4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol(363-NP)で、構造とMSスペクトラムは、Figure1.に示します。

Table 1 ラベル化オクチル-、ノニルフェノール、エトキシレートスタンダード溶液(アセトン溶液)

品名	Cat. No.	Cat. No.
¹³ C ₆ -ラベル化:	1 mL, 10 µg/mL	10 mL, 1 µg/mL
4-tert-Octylphenol (Ring ¹³ C ₆)	33565-1ML	33566-10ML
4-tert-Octylphenol monoethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	33563-1ML	33564-10ML
4-tert-Octylphenol diethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	33229-1ML	33244-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol (Ring ¹³ C ₆)	33574-1ML	33575-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol monoethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	33572-1ML	33573-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol diethoxylate (Ring ¹³ C ₆)	33207-1ML	33222-10ML
重水素体:		
4-tert-Octylphenol (Ring D ₂)	33557-1ML	33559-10ML
4-tert-Octylphenol monoethoxylate (Ring D ₂)	33523-1ML	33525-10ML
4-tert-Octylphenol diethoxylate (Ring D ₂)	33254-1ML	33257-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol (Ring D ₂)	33569-1ML	33571-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol monoethoxylate (Ring D ₂)	33567-1ML	33568-10ML
4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol diethoxylate (Ring D ₂)	33249-1ML	33252-10ML

Cat. No.	ブランド	品名	容量
33623-10ML	Riedel	Alkylphenol Target Analyte Mix アセトン溶液	10 mL
33627-10ML	Riedel	Alkylphenol Internal Standard Mix アセトン溶液	10 mL
33629-1EA	Riedel	Alkylphenol Kit for DIN EN ISO 18857-2	1 Kit

アルキルフェノール、アルキルフェノールエトキシレート分析用製品

Cat. No.	ブランド	品名	容量
442876	Supelco	Bisphenol A-d16	50 mg
394866-5ML	Aldrich	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	5 mL
394866-10X1ML	Aldrich	導体化試薬グレード(MSTFA)	10 x 1 mL
394866-25ML	Aldrich		25 mL

NPのモノやジエトキシレートも同様に4-(3,6-dimethyl-3heptyl)phenol-monoethoxylate(363-NP1EO)と4-(3,6-dimethyl-3heptyl)phenol-diethoxylate(363-2EO)が主要な異性体になります。これら異性体の確かなフラグメントパターン作成には、工業グレードNPやそのエトキシレート分析用の望ましい内部標準が必要です。NPとそのモノ、ジ、エトキシレートの ^{13}C -ring-ラベル化体および363-重水素体化合物は、この要求に応え合成しました。

OP分析は、NP分析とは違い、よく4-tert-octylphenolと呼ばれる4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenolとそのエトキシレートの一つの異性体のみ販売になります。この化合物OPとエトキシレートは、内部標準として合成し、他の異性体は販売していません。Figure 2は、上記に記述したNPとOP、そのエトキシレート分析用として合成した同位体-ラベル化高純度内部標準物質の一覧です。GC-MS用には、 $^{13}\text{C}_6$ 体、LC-MS用には、D2体を販売しております。

実際に、ドイツにおいてビスフェノールAを含んだOP、NPとそれらのモノ、ジ、エトキシレートのISO 18857-2表面水中分析で、固相抽出(SPE)を使用し、MSTFAで誘導体化後、GC-MSで定量した方法が良い結果を出しています。

研究室間のクロスチェックを含んだ広範囲の実験で、Figure 2に掲載した内部標準物質の安定性が証明され、目的物質の正確で厳密な測定結果となりました。そして、全ての内部標準物質がISO 18857-2に収録されました。最終の評価は、2007年10、11月に国際的に研究室間でテストが行われました。

シグマ アルドリッチは、ISO 18857-2に記載されたOP、NOとそれらのモノ、ジ、エトキシレート分析用ラベル化体を全種類販売することになりました。製品の種類と濃度は、Table 1に記載しています。

Figure 1 GC-MS of technical grade nonylphenol and detailed mass spectrum of isomer 363-NP

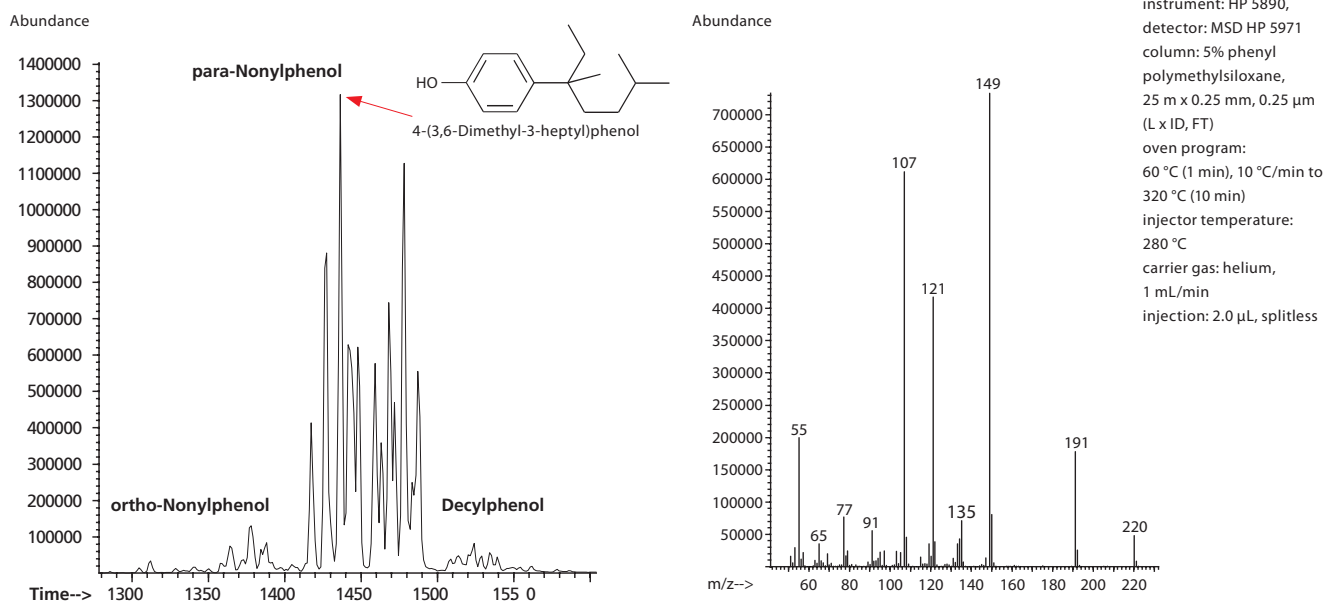
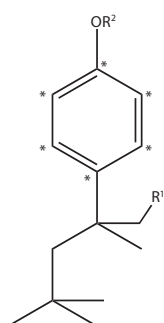


Figure 2 Molecular Structures of ^{13}C -labelled octyl- and nonylphenol and associated ethoxylates. * = ^{13}C



	R ¹	R ²
[$^{13}\text{C}_6$]-4-tert-OP	H	H
[$^{13}\text{C}_6$]-4-tert-OP1EO	H	CH ₂ H ₂ OH
[$^{13}\text{C}_6$]-4-tert-OP2EO	H	CH ₂ H ₂ OCH ₂ CH ₂ OH
[$^{13}\text{C}_6$]-363 NP	CH ₃	H
[$^{13}\text{C}_6$]-363 NP1EO	CH ₃	CH ₂ H ₂ OH
[$^{13}\text{C}_6$]-363 NP2EO	CH ₃	CH ₂ H ₂ OCH ₂ CH ₂ OH

References

- Groshart, C. P.; Okkerman, P. C.; Wassenberg, W. B. W. Chemical Study on Alkylphenols. Rijksinstituut voor Kust en Zee, Netherlands, Report RIKZ/2001.029.
- Heemken, O. P.; Reincke, H.; Stachel, B.; Theobald, N. The Occurrence of Xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea. Chemosphere 2001, 45, 245–259.
- Xie, Z.; Lakaschus, S.; Ebinghaus, R.; Caba, A.; Ruck, W. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. Environ. Poll. 2006, 142, 170–180.
- Gunther, K.; Heinke, V.; Thiele, B.; Kleist, E.; Prast, H.; Raecker, T. Endocrine Disrupting Nonylphenols Are Ubiquitous in Food. Environ. Sci. Technol. 2002, 36, 1676–1680.
- Nimrod, A. C.; Benson, W. H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Crit. Rev. Toxicol. 1996, 26, 335–364.