

ノニルフェノールの測定方法

1 試薬

(1) 水

日本工業規格K0557に規定するA 1～A 4の水（注1）

(2) アセトン

日本工業規格K8040に規定する濃縮300以上のもの（注2）

(3) ヘキサン

日本工業規格K8825に規定する濃縮300以上のもの（注2）

(4) ジクロロメタン

日本工業規格K8117に規定する濃縮300以上のもの（注2）

(5) 硫酸ナトリウム（無水）

残留農薬試験用（注2）

(6) ノニルフェノール標準原液（ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

ノニルフェノール標準品10 mgを全量フラスコ100 mlに採り、アセトンを標線まで加えたもの

(7) ノニルフェノール標準液（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

ノニルフェノール標準原液（ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）1 mlを全量フラスコ100 mlに採り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの

(8) サロゲート溶液（ $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

^{13}C ラベル化4-(3, 6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノールサロゲート溶液（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）1 mlを全量フラスコ100 mlに採り、アセトンを標線まで加えたもの（注3）

(9) 内標準原液（ $1\text{mg}/\text{ml}$ ）

4-n-ノニルフェノール- d_4 の標準品100 mgを全量フラスコ100 mlに採り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの

(10) 内標準液（ $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

内標準原液（ $1\text{mg}/\text{ml}$ ）1 mlを全量フラスコ100mlに採り、ジクロロメタンを標線まで加えたものから、1 mlを全量フラスコ100mlに採り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの

（注1）使用前に空試験を行い、対象物質の保持時間に相当する位置にピークがないことを確認する。ミネラルウォーターを用いても良い。

（注2）対象物質の保持時間に相当する位置にピークがないことを確認する。開封後は、汚染のない場所に保存する。

（注3）サロゲート物質について、回収率が50～120%で安定的に得られることを確認したうえで、直鎖型の ^{13}C ラベル化4-n-ノニルフェノールなどを用いてもよい。

2 器具及び装置 (注4)

(1) 固相カラム (注5)

内径 10mm、長さ 30~50 mmのカートリッジ。カラム充填剤は、シリカゲルに逆相系化合物を化学結合したもの又は合成吸着剤を充填したもの。合成吸着剤は、多孔性のスチレンジビニルベンゼン共重合体又はこれと同等の性能をもつもの。使用前に、アセトン約10 ml、次いで水約10mlを通して洗浄する。

(2) 目盛り付き共栓試験管 10~20ml。0.5ml及び1 mlの目盛のあるもの

(3) カラムクロマトグラフ管 内径約20mm、長さ約200 mmのコック付きガラス管

(a) カラム充てん剤

カラムクロマトグラフ用のシリカゲル (粒径150~250 μ m) を約130 $^{\circ}$ Cで15 時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。その95gを共栓三角フラスコにとり、かき混ぜながら、水 5mlを滴加する。軽く栓をし、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう器で約30分間振り混ぜる。

(b) カラムクロマトグラフ管の作り方

カラムクロマトグラフ管の底部にガラスウール (あらかじめヘキサンで洗浄したもの) を詰め、少量のヘキサンを加えてガラスウール間の気泡を除去する。次いで、カラム充てん剤約15gをビーカーにとり、ヘキサンを加えてスラリー状にし、これを気泡が入らないようにカラム用管に流し込む。均一に充填するために、充てん剤を流し込んだ後、カラム用管に縦横の振動を与えるとよい。その上部に硫酸ナトリウム (無水) を約 2 cmになるように積層した後、コックを操作し、ヘキサンが硫酸ナトリウム (無水) 層よりわずかに上部になるようにする。

(4) 円筒形滴下漏斗

(5) 濃縮器用フラスコ

(6) 濃縮器

ロータリーエバポレーター、クデルナーダニッシュ濃縮器又はスニーダーカラムであって、濃縮時における試料溶媒に接触する部分のガラス器具類を水及びアセトンで洗浄したもの

(7) マイクロシリンジ 容量1~10 μ lのもの

(8) ガスクロマトグラフ質量分析計

(a) キャピラリーカラム

内径0.25mm、長さ30mの化学結合型溶融シリカ製のものであって、メチルシリコーン系固定相液体を厚さ0.25 μ m程度に被覆したもの又は同等以上の分離性能をもつもの

(b) キャリヤーガス

ヘリウム (純度99.9999vol%以上) であって線速度を毎秒20~40cmとしたもの

(c) 試料導入部

スプリットレス法により温度を220~280 $^{\circ}$ Cに保つことができるもの

(d) インターフェース部

温度を280 $^{\circ}$ C程度に保つことができるもの

- (e) イオン源
温度を230℃以上に保つことができるもの
- (f) カラム槽昇温プログラム
50℃で1分保ち、50～300℃の範囲で、毎分8℃で昇温を行うことができるもの
- (注4) ガラス器具等は十分な洗浄を行い、対象物質による汚染がないことを確認してから使用する。使用前に水で洗浄した後、さらにアセトンで洗浄・放置してアセトンを揮散させ、約200℃で約2時間加熱し、汚染のない場所で放冷する。
- (注5) ディスク形でもよい。この場合、試料の流量及び溶出溶媒の必要量は、あらかじめ確認しておく。

3 試験操作

(1) 試験液の調製

- (a) 試料(注6)を振り混ぜて均一化した後、500mlをとり、塩酸(1mol/L)を加えてpH約3.5に調整し、サロゲート溶液(0.1μg/ml)0.5mlを加えた後、固相カラムに加圧法又は減圧法によって、試料を毎分5～10mlで通す。(注7)
- (b) 試料容器を水10mlで洗い、洗液を固相カラムに通水し、約30分間窒素ガスを吹き付け、水分を除去する。(注8)
- (c) 固相カラムの上端からアセトン4mlを、固相カラムからの溶出液の液滴が連続しない程度に流下させ、目盛付き共栓試験管に受ける。
- (d) 目盛付き共栓試験管を約40℃の水浴中で、窒素を緩やかに吹き付けて濃縮させ、ジクロロメタンに転溶し約1mlにする。更に硫酸ナトリウム(無水)約0.3gを加えて脱水する。(注9)
- (e) 全量をカラムクロマトグラフ管に流し込み、コックを操作し液面が硫酸ナトリウム(無水)層のわずか上部にある状態にする。目盛付き共栓試験管をジクロロメタン0.5～1mlで洗い、洗液はカラムクロマトグラフ管に合わせる。(注10)
- (f) カラムクロマトグラフ管に円筒形滴下漏斗を装着し、ジクロロメタン-ヘキサン混合液(3+7)50mlを毎分約1mlで流下させ、液面が硫酸ナトリウム(無水)層のわずか上部にある状態でコックを閉め、流出液は捨てる。
- (g) 円筒形滴下漏斗から、ジクロロメタン-ヘキサン溶離液(3+2)100mlを毎分約1mlで流下させ、溶出液を濃縮器用フラスコに受ける。(注11)
- (h) 溶出液を、濃縮器を用いて、約40℃の水浴中で約5mlに濃縮する。(注12)
- (i) 濃縮液を目盛付き共栓試験管に移し、濃縮器用フラスコをジクロロメタン2～3mlで洗浄し、洗液を目盛付き共栓試験管に合わせる。続いて内標準液(0.1μg/ml)0.5mlを加えた後、約40℃の水浴中で窒素を緩やかに吹き付けて約0.5mlに濃縮する。(注9)

(2) 空試験液の調製

水500mlを用いて、(1)の操作を行う。(注13)

(3) 分析

- (a) 表に掲げる定量イオン、確認イオンを用い、モニターする。

表 定量イオン及び確認イオン

番号	異性体名	定 量 イオン	確 認 イオン
NP 1	4-(2, 4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	121	163
NP 2	4-(2, 4-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	220
NP 3	4-(3, 6-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	135	107
NP 4	4-(3, 5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	191
NP 5	4-(2, 5-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	163
NP 6	4-(3, 5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	191
NP 7	4-(3-エチル-2-メチルヘキサン-2-イル)フェノール	135	220
NP 8	4-(3, 4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163	121
NP 9	4-(3, 4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	107
NP 10	4-(3, 4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163	121
NP 11	4-(2, 3-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	220
NP 12	4-(3-メチルオクタン-3-イル)フェノール	191	163
NP 13	4-(3, 4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	107
	¹³ Cラベル化 4-(3, 6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール	155	113
	4-n-ノニルフェノール-d ₄	111	224
※ NP 4-NP 6、NP 8-NP 10、NP 9-NP 13：立体異性体			

- (b) 空試験液及びガスクロマトグラフ質量分析用試料各 1 μ lをマイクロシリンジを用いて採り、ガスクロマトグラフに注入し、検量線標準液の対象物質の保持時間と一致していることを確認しておく。対象物質のクロマトグラムピークの位置は別図を参考にする。(注14)
- (c) 保持時間に相当する位置のピークについて、ピーク面積を測定する。対象物質とサロゲート物質のピーク面積の比、サロゲート物質と内標準物質のピーク面積の比を求める。(注15)
- (d) あらかじめ4により作成した検量線を用い、対象物質とサロゲート物質のピーク面積の比から、対象物質とサロゲート物質の濃度比を求め、ノニルフェノールの各異性体の組成比(注16)を用い、次の式によって試料中の異性体ごとの濃度(μ g/L)を算出する。

$$\text{試料中の対象物質の濃度 } (\mu\text{g/L}) = (a - b) \times f \times n \times (1000 / \text{試料量 (ml)})$$

この式において、a、b、f 及び n は、それぞれ次の値を表す。

- a 検量線から求めた対象物質とサロゲート物質の濃度比
- b 空試験について検量線から求めた対象物質とサロゲート物質の濃度比
- f 各異性体の組成比
- n 添加したサロゲート物質の質量 (μ g)

(注6) 懸濁物が多いときには、あらかじめろ過操作を行う。ろ過操作は、アセトンで洗浄

したろ過材（孔径 1 μ m のガラス繊維ろ紙）を用いて吸引ろ過する。ろ過材ごとピーカーに移してアセトン約 10 ml を加え、超音波洗浄器を用いて溶出させる。これを 2 ～ 3 回繰り返し溶出液を合わせ、濃縮器を用いて約 5 ml まで濃縮し、試料に合わせる。

- (注 7) 懸濁物が多いときには、溶媒抽出を用いてもよい。溶媒抽出は、試料を 1 mol/L 塩酸で pH 約 3 前後に調整し、サロゲート溶液 (0.1 μ g/ml) 0.5ml を加えた後、塩化ナトリウム 30g を加え（海水には添加しない。）十分混合して溶解する。この溶液にジクロロメタン 50ml を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出を 2 回行い、ジクロロメタン層を合わせる。硫酸ナトリウム（無水）で脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 1 ml まで濃縮したものを、(e) のカラムクロマトグラフ管に流し込み、以降同様に行う。
- (注 8) 長時間通気すると、回収率が低下するおそれがあるので注意する。
- (注 9) 直ちに次の操作を行わない場合は、この濃縮液を -20°C の暗所に保存する。また、窒素を吹き付ける操作では、濃縮液が飛散しないように注意する。濃縮液の表面が動いているのがようやく見える程度に窒素の流量を調節する。乾固させると窒素の吹き付けによって対象物質が揮散することがあるので注意する。
- (注 10) 妨害物質が無視できる程度に少ない試料については、(e) ～ (h) の操作を省略することができる。
- (注 11) 事前に既知量の標準物質を添加したものをを用いて、対象物質の溶出パターンを確認し、カラムクロマトグラム操作に必要なジクロロメタン-ヘキサン混合液 (3 + 7) 及びジクロロメタン-ヘキサン溶離液 (3 + 2) の量を求めておく。
- (注 12) 濃縮器にロータリーエバポレーターを用いる場合は、約 40°C の水浴中で減圧濃縮し、乾固しないように注意する。クデルナーダニッシュ濃縮器を用いる場合は、減圧方式ではなく、大気圧下、 75°C 以下で加熱して濃縮する。濃縮終了後、スニーターカラムを濃縮部に付けたまま装置からとり外し、スニーターカラムの上部から少量のジクロロメタンを加えて洗浄し、スニーターカラムを付けたまま放冷する。
- (注 13) 空試験値は可能な限り低減化を図る。
- (注 14) 試料中の対象物質の定量イオンと確認イオンとのピーク強度比、及び標準液中の各対象物質の定量イオンと確認イオンとのピーク強度比が $\pm 20\%$ 以内であれば、同じ物質が存在しているものとみなす。
- (注 15) 試料中の対象物質の濃度を算出するときは、試料に添加したサロゲート物質の回収率が 50 ～ 120% にあることを確認しておく。回収率は、試料中のサロゲート物質と内標準物質のピーク面積の比と検量線標準液中のサロゲート物質と内標準物質のピーク面積の比の平均値の百分率とする。
- (注 16) 異性体の組成比は水素炎イオン検出器を用い、試験液の分析と同様に標準原液 (100 μ g/ml) 1 μ l をクロマトグラフに注入する。異性体の保持時間に相当するピークのピーク面積を読み取り、得られた面積の合計と各異性体の面積比から組成比を求める。

4 検量線の作成

検量線標準液として使用するために、標準液（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ） $5 \sim 500 \mu\text{l}$ を目盛付き共栓試験管に段階的にとり、それぞれにサロゲート溶液（ $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ） 0.5 ml 及び内標準液（ $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ） 0.5 ml を加え、約 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ の水浴中で窒素を緩やかに吹き付け、約 0.5 ml に濃縮する。

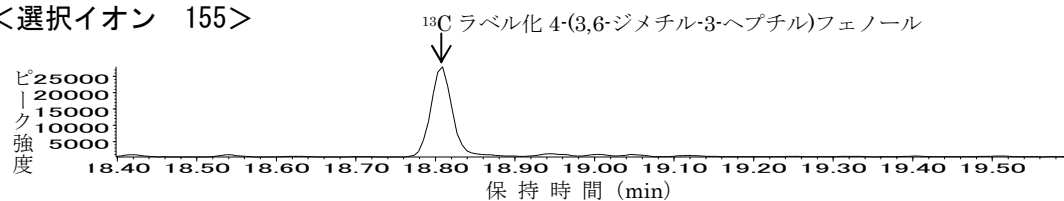
この検量線標準液 $1 \mu\text{l}$ をクロマトグラフに注入し、対象物質とサロゲート物質のピーク面積比により検量線を作成する。

備考

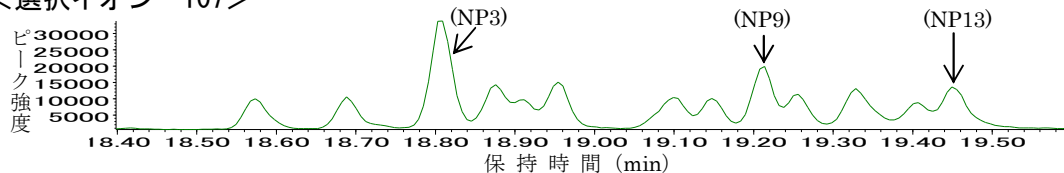
- 1 この測定方法の定量下限は $0.06 \mu\text{g}/\text{L}$ である。
- 2 ここに示す商品は、この測定法使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これらを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。
- 3 この測定方法における用語の定義その他でこの測定方法に定めのない事項については、日本工業規格に定めるところによる。

別図 キャピラリーカラムにDB-5MS(長さ 30m 内径 0.25mm 膜厚 0.25 μ m)を用いたときのクロマトグラム

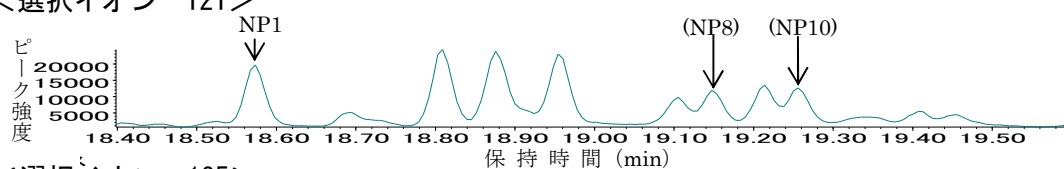
<選択イオン 155>



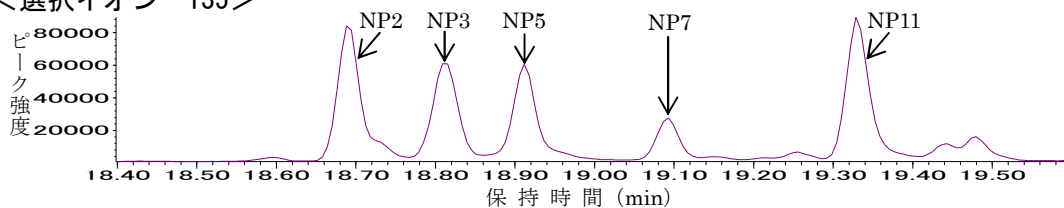
<選択イオン 107>



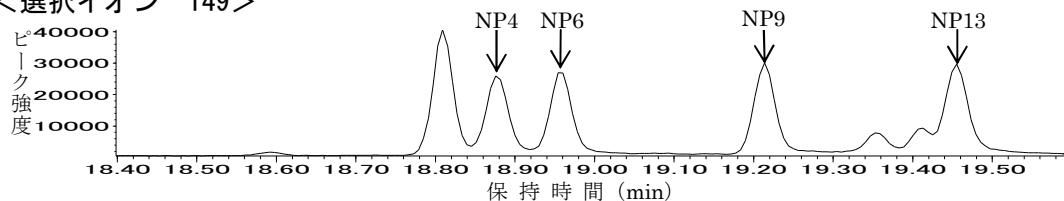
<選択イオン 121>



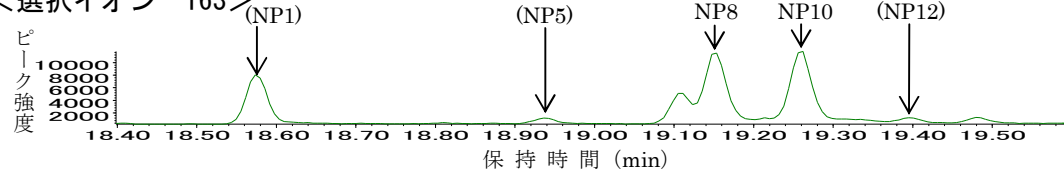
<選択イオン 135>



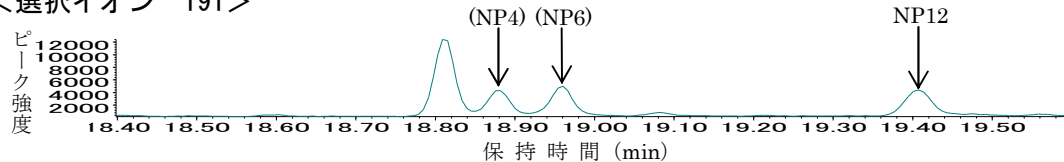
<選択イオン 149>



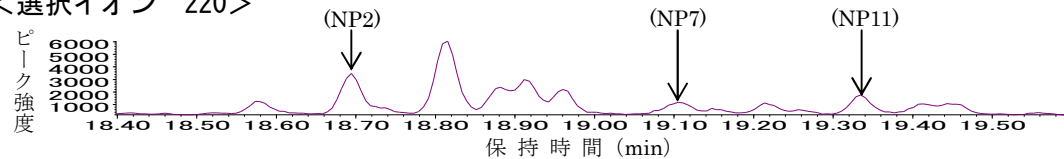
<選択イオン 163>



<選択イオン 191>



<選択イオン 220>



注) 図中の () のピークは確認イオン