

固相抽出装置（溶出用）における陰イオン界面活性剤の測定にかかる 残存トルエン溶媒の影響の除去方法について

金成 徹 平澤恭子 斎藤和男
理化学グループ

要 旨

陰イオン界面活性剤の分析方法については、「平成 15 年 7 月 22 日厚生労働省告示第 261 号水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」により、固相抽出－高速液体クロマトグラフ法に改められ、さらに非イオン界面活性剤の測定方法として固相抽出－吸光度法が新たに追加された。いずれも前処理に固相抽出があるものの使用溶媒が異なり、特に非イオン界面活性剤の測定にはトルエンを使用し、固相抽出装置に残存したトルエンが、陰イオン界面活性剤の定量の際の高速液体クロマトグラフにおいて、ピークとして検出されることから、今回、固相抽出装置に残存するトルエンの洗浄方法について検討した。

固相抽出装置の洗浄方法としては、水、アルコール系の溶媒置換のみでなく、配管部品等を分解してメタノールに浸漬して超音波洗浄する方法が有効であった。

キーワード：固相抽出装置、陰イオン界面活性剤、PS-2、HPLC、ヘッドスペース GC/MS

はじめに

「平成 19 年度福島県試験検査精度管理事業（陰イオン界面活性剤（理化学Ⅱ）」において、ある参加機関より、非イオン界面活性剤の固相抽出の際の抽出溶媒として用いたトルエンの残存影響があるとの指摘があり、今回、固相抽出装置の洗浄方法について検討した。

材料と方法

1 概要

固相抽出装置（溶出用）をトルエン溶媒で満たし、所定の方法で経路を洗浄した後、メタノールで溶媒置換し、固相（ミニカラム）から溶出させたものを検体とし、陰イオン界面活性剤の定量方法と同様に測定し、トルエンピークの有無を確認する。

また、トルエンピークの確認のため、検体を希釈したものをヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計により測定する。

2 使用機器・試薬等

1) 固相抽出装置：Sep-pak concentrator（ウォーターズ社製）溶出用ポンプ 1 台及び濃縮用ポンプ 5 台。なお、今回、検討したのは、

溶出用ポンプの方である。

2) 蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」とする）

LC-VP シリーズ（島津製作所製）

測定条件は下記のとおり。

使用カラム：Shim-pak VP-ODS（4.6mm × 250mm）

カラム温度：40℃

溶離液：水：アセトニトリル（35:65）（過塩素酸ナトリウム 12.3g/L）

流速：1mL/分

試料注入量：20μL

蛍光検出器：励起波長 221nm，蛍光波長 284nm

3) ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計（以下「HS GC/MS」とする）

HP-7694 及び HP-5890/5972MSD（Agilent 社製）

測定条件は下記のとおり。

恒温槽：60℃（30 分間）

使用カラム：HP624（長さ 60m × 内径 0.32mm × 膜厚 1.8μm）

カラム温度：40℃（7 分）→ 8℃/分→ 180℃（0 分）→ 15℃/分→ 260℃（1 分）

検出器温度：280℃

モニターイオン：91, 92（トルエン）, 174, 176

(内標 4-ブロモフルオロベンゼン)

なお、測定に際しては、予め市販ミネラルウォーター水 10mL を入れたヘッドスペース容器に、測定溶液（メタノール溶媒）をマイクロシリンジで適宜希釈し、測定した。

4) 標準品及び試薬等

①陰イオン界面活性剤混合標準液（各 1mg/ml メタノール溶液）（和光純薬社製）

② 23 種 揮発性有機化合物混合標準液（各 1mg/ml メタノール溶液）（和光純薬社製）

（HS GC/MS の標準溶液として使用）

③ 4-ブロモフルオロベンゼン(125µg/mL) (GLサイエンス社製)

（HS GC/MS 測定時の内部標準物質として使用）

④固相カラム（ミニカラム）Sep-pak PS-2（ウォーターズ社製）：使用時には、メタノール、蒸留水各 5mL でコンディショニングしたものを使用した。

⑤使用水：蒸留水（高速液体クロマトグラフ用）（和光純薬社製）市販のボトル詰めされたミネラルウォーター水（HS GC/MS 測定時に使用）

⑥過塩素酸ナトリウム一水和物：試薬特級（和光純薬）

⑦その他の使用溶媒（トルエン、メタノール等）は、和光純薬社製の高速液体クロマトグラフ用又は残留農薬試験用の規格のものを使用した。

⑧塩化ナトリウム：残留農薬試験用（和光純薬）（HS GC/MS 測定時に使用）

3 固相抽出装置（溶出用）の溶媒置換による洗浄方法の検討

固相抽出装置（溶出用）の内部をトルエンで満たして 10 分間放置し、その後、下記の溶媒置換を行い、固相抽出装置（溶出用）の内部を洗浄した。

1) 最初に蒸留水で溶媒置換

①蒸留水（20mL/分×5分間）

②蒸留水（20mL/分×5分間）後、メタノール（20mL/分×5分間）

③蒸留水（20mL/分×5分間）後、アセトン（20mL/分×5分間）

2) アルコール等の溶媒の後に蒸留水で溶媒

置換

①メタノール（20mL/分×3分間）後、蒸留水（20mL/分×3分間）

②エタノール（20mL/分×3分間）後、蒸留水（20mL/分×3分間）

③イソプロピルアルコール（20mL/分×3分間）後、蒸留水（20mL/分×3分間）

④アセトン（20mL/分×3分間）後、蒸留水（20mL/分×3分間）

上記の操作後に溶媒をさらにメタノールで置換し、陰イオン界面活性剤測定の際のミニカラムの溶出（メタノール 1m/分×5分間 5mL）に使用した。

4 汚染箇所の特定

上記の溶媒置換のみによる方法では、いずれもトルエンピークの除去に至らなかった。

そこで固相抽出装置の汚染箇所を特定するために、装置を分解し、各部品にシリンジを用いてメタノール 5mL を流し、溶出した溶液を測定した。

1) 溶媒入口～チェックバルブ（シリンジの手前）

2) シリンジ部分単体

3) チェックバルブ～三方バルブ手前

4) 三方バルブ～溶媒出口

さらに高濃度汚染の確認できた箇所について、各部を細かく分解し、同様にメタノール 5mL をシリンジで流し、その溶出液を測定した。

5 超音波洗浄によるトルエン除去

溶媒置換のみでは除去しきれなかった汚染箇所を把握後、その箇所を分解しメタノールに浸漬したものを超音波洗浄（10分間）し、同様にメタノール 5mL をシリンジで流して得られた溶出液を測定した。

結果

1 固相抽出装置（溶出用）の溶媒置換による洗浄方法

1) トルエンピークの確認

トルエンをメタノールで希釈したものを段階的に調製し、陰イオン界面活性剤の定量の際と同様の条件の HPLC で測定し、ピークの

確認を行った。

本試験系では、トルエン 50ppb において S/N=2.3 であった。

また、トルエンの保持時間は、C12 のピークの直前であり、陰イオン界面活性剤を含む場合（定量下限値：各成分 0.4ppm（濃縮前の検水 500mL の濃度としては各成分 0.004ppm））のピーク分離は可能であるが、ブランク等でこの付近にピークが無い場合は、測定機器上では C12 の最初のピークとして認識された。

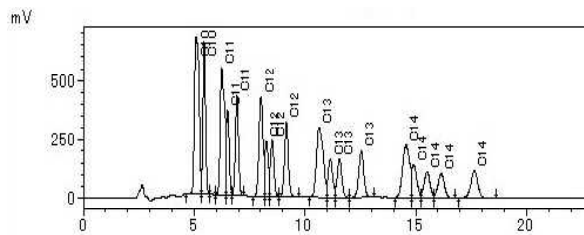


図1 標準品のみのクロマトグラム

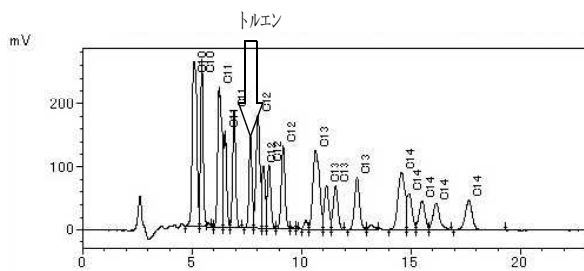


図2 添加回収のクロマトグラム

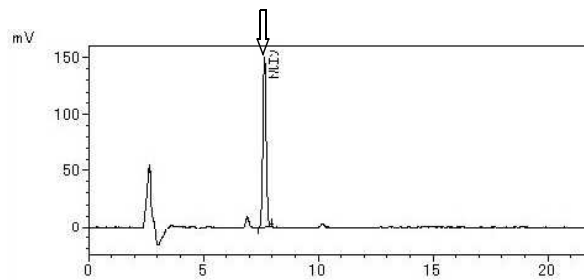


図3 トルエンのみのクロマトグラム

2) 最初に蒸留水で溶媒置換 (20mL/分×5分間) を行った場合、メタノール (20mL/分×5分間)、アセトン (20mL/分×5分間) のいずれの場合もトルエンのピークが大きく検出され、固相 (ミニカラム) に予め添加した陰イオン界面活性剤のピーク (C12) にかぶるほどであった。

3) アルコール等 (メタノール, エタノール, イソプロピルアルコール及びアセトン) の溶媒の後に蒸留水で溶媒置換 (20mL/分×3分間) したのものについても、今回実施した 20mL/分×3分間程度の量では除去できず、いずれも大きなトルエンピークが検出された。なお、トルエン濃度を HS GC/MS で希釈して測定したところ 34.8 ~ 65.7ppm であった。

2 汚染箇所の特定

上記試験後にトルエンで汚染された固相抽出装置の各部を分解し、シリンジでメタノールを流して得られた溶液を測定した結果、シリンジ単体からは検出されず、途中の管路及びバルブ等からトルエンが検出された。

表1 固相抽出装置の各部からの溶出液中のトルエン濃度 (単位: ppm)

固相抽出装置の経路	トルエン濃度	各パーツ	トルエン濃度
溶媒入口～チェックバルブ	1.1	入口の管	0.2
		シリンジの接続管	1.1
シリンジ単体	<0.02	—	—
チェックバルブ～三方バルブ	1.5	チェックバルブ	<0.02
		三方バルブ	1.2
三方バルブ～溶媒出口	2.1	切替バルブ	<0.02
		出口の管	<0.02

注: HS GC/MS 自体の定量下限値は 0.2ppb であるが、メタノール溶媒の希釈が 100 倍 (100μL → 10mL) であるため、この場合の定量下限値は 0.02ppm となる。

3 超音波洗浄等によるトルエン除去

1) トルエン濃度の高かったシリンジの接続管及び三方バルブについて分解し、メタノールに浸漬して 10 分間の超音波洗浄を行った。
2) 2 のトルエン濃度の測定を行ったシリンジの接続管及び三方バルブに再度シリンジによりメタノールを通過させ、溶出した溶液を希釈して HS GC/MS で測定し、超音波洗浄

後にも同様の操作を行い、濃度変化を比較した。

表2 超音波洗浄による洗浄前後のトルエン濃度 (単位：ppm)

名 称	洗浄前	洗浄後	除去率
シリンジの接続管	0.27	0.04	85%
三方バルブ	1.29	0.03	98%

3) 上記後に入口の管を新品に交換し、固相抽出装置を組み立て直し、メタノールを導入し、溶出させたメタノールを希釈して HS GC/MS で測定したところ、溶出液のトルエン濃度は 0.21ppm にまで低減した。

再度、固相抽出装置をすべて分解し、メタノールに浸漬し 10 分間超音波洗浄後に組み直し、同様にメタノールを溶出させ希釈して HS GC/MS で測定したところ溶出液のトルエン濃度は 0.13ppm になった。

4 固相 (ミニカラム) 自体のトルエン残存の確認

固相 (PS-2) をコンディショニングしないでメタノール溶出 (5mL) させた溶液とコンディショニング (メタノール 5mL → 水 5mL) 後にメタノール 5mL で溶出させた溶液を HPLC で測定したところ、トルエンと同じ保持時間にピークが見られた。得られた溶液を 100 倍希釈して HS GC/MS で確認したところトルエンが検出された。

なお、コンディショニング及び溶出は 10mL ディスポシリンジを用い、固相抽出装置を用いなかった。

表3 固相 (PS-2) 由来のトルエン濃度

固相 (PS-2)	トルエン濃度
コンディショニング無しでメタノール 5mL で溶出	0.42ppm
コンディショニングしたものをメタノール 5mL で溶出	0.02ppm

考 察

固相抽出装置の取扱説明書では、使用時に 20mL/分で 3 分間程度のパージ後に使用する

こととされている。

固相抽出装置のデッドボリュームは約 17mL であり、内部の 5mL シリンジ (2 本) には、下死点でシリンジごとに約 0.3mL 程度の溶媒が残存した。

ここで 5mL シリンジの 1 回吐出容量 4mL、シリンジ内のデッドボリュームを 0.3mL という実測値を用いて、置換割合を計算すると付表 1 のとおりとなった。

付表 1 固相抽出装置内のシリンジ残存溶媒 (1本あたり) の置換割合

シリンジの往復回数	累計吐出容量 (mL)	累計置換割合 (%)	シリンジ内拡散を考慮した時 (%)
1	4mL	92.5	92.5
2	8mL	96.25	99.43
3	12mL	97.5	99.95
4	16mL	98.13	99.996
5	20mL	98.5	99.9997
6	24mL	98.75	99.99998
7	28mL	98.93	99.999998
8	32mL	99.06	99.9999999

※シリンジ内のデッドボリュームを実測値 0.3mL として計算

従って、シリンジが 8 往復した場合、シリンジ内に残存する前溶媒濃度は、

1) シリンジ内の残存溶媒が洗浄溶媒に溶解しない場合は、約 1% の濃度 (10,000ppm) で残存する可能性がある。

2) シリンジ内の残存溶媒が洗浄溶媒に完全に溶解し、シリンジ内の拡散も考慮した場合は、0.0000001% (1ppb) まで低減される。従って 2 本のシリンジがついている固相抽出装置の場合は、60mL 程度の溶媒量で溶媒に可溶性物質であれば置換は可能であると思われる。

今回、溶媒置換後のシリンジ単体からトルエンピークが検出されなかったことから、シリンジ単体としてはメタノールによる溶媒置換のみで洗浄可能であると判断できる。ところが、今回行った溶媒置換による洗浄方法のみでは、固相抽出装置からの溶出液からトルエンピークが検出され、どれも不十分な結果であった。

また、メタノール量を 20mL/分× 15 分間に増加した場合でも低減効果は無かった。このため、トルエンの残存箇所として固相抽出装置の管路系が疑われ、個々にメタノールを流して測定したところ、一定量のトルエンが検出された。

管路系のバルブ内に残存するトルエンの除去方法として、メタノールに浸漬して超音波洗浄を行う方法は、本検討で行った溶媒置換のみの方法と比較して、トルエン除去の効果が見られた。

さらに、固相 (PS-2) 自体にもトルエンが含まれていることが判明し、メタノール・水によるコンディショニングを行わないで測定した場合、陰イオン界面活性剤の定量にも支障が生じると思われる。

まとめ

- 1 陰イオン界面活性剤の固相溶出用の固相抽出装置に、非イオン界面活性剤の固相溶出溶媒であるトルエンが残存した場合、C12 の直前に妨害ピークが現れ、陰イオン界面活性剤の定量に影響を及ぼすことがある。
- 2 固相抽出装置の洗浄方法としては、水、アルコール系の溶媒置換だけでなく、配管部品等を分解してメタノールに浸漬して超音波洗浄する方法が有効であった。
- 3 陰イオン界面活性剤の測定に用いる PS-2 の固相自体にもトルエンが残存するため、使用前のコンディショニングは重要である。
- 4 陰イオン界面活性剤の測定に際し、トルエンによる影響を完全に防ぐためには、溶出溶媒ごとに専用の固相抽出装置を用いるか、ディスポーシングによる固相からの溶出といった固相抽出装置の洗浄が不要となる方法を取ることが望ましいと思われる。

引用文献

- 1) 中野憲. 固相抽出装置等における高濃度汚染の除去方法について. 福島県試験検査技術発表会抄録 2004:6
- 2) 厚生労働省. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法. 厚生労働省告示第 261 号 平成 15 年 7 月 22 日