

# Readout

HORIBA Technical Reports

特集 赤外線ではかる

July 1993 ■ No.7

---

## HPLC分離／ピンポイント濃縮／ 顕微FTIRによる界面活性剤の 高感度検出と同定法

Determination of trace amount of non-ionic Surface active reagent by HPLC with micro-FTIR using pin-point condensation technique  
---High sensitivity detection and HPLC separation method for polyethylene glycol ether and polyethylene glycol alkylphenyl ether---

磯 節子・池田昌彦

Setsuko ISO, Masahiko IKEDA

(Pages23-28)

---

株式会社 堀場製作所



# HPLC分離／ピンポイント濃縮／顕微FTIRによる 界面活性剤の高感度検出と同定法

Determination of trace amount of non-ionic surface active reagent by  
HPLC with micro-FTIR using pin-point condensation technique  
---High sensitivity detection and HPLC separation method for polyethylene  
glycol alkyl ether and polyethylene glycol alkylphenyl ether ---

磯 節子\*・池田 昌彦  
Setsuko Iso, Masahiko Ikeda

## 【要約】

ODSを分離カラム，アセトニトリルを溶離液としてポリオキシエチレングリコール(POE)系非イオン界面活性剤を分離した．POEアルキルエーテルはRI検出器で100ppm，POEアルキルフェニルエーテルはUV検出器で5ppmが限界であった．溶出液をフッ素樹脂コーティングした鏡面金属板に滴下すると，溶媒の蒸発にともない約2分後には局所に集中し，液滴の外径は滴下直後と比較し1/100程度になり濃縮される．この残渣を顕微FTIRで反射測定すると赤外スペクトルが得られる．アセトニトリル中の不純物はHPLCポンプの直後にODSカラムを設置することにより減少し，POEアルキルエーテルとPOEフェニルエーテルとの判定限界が100倍改善された．

## Abstract

POE non-ionic surfactants were separated by normal (nonreversed)-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using ODS column and acetonitrile as elutant. Polyethylene glycol alkyl ether (AE) and polyethylene glycol alkylphenyl ether (APE) were determined by HPLC with RI detector down to 100ppm, with UV detector down to 5ppm respectively. Pin-point condensation technique using perfluorated polymer film on SUS mirror was used to elution from HPLC. Spectra of residual were measured by microscope/FTIR in the reflection mode. Impurities of acetonitrile were removed by ODS column which is located between pump and sample injection port. This method improved 100 times to ascertain the identify of AE and APE.

## 1. はじめに

近年，エレクトロニクス業界では，従来のフロン洗浄から，代替方法としてポリオキシエチレングリコール(POE)エーテル型非イオン界面活性剤の使用が進んでいる．POEエーテル型非イオン界面活性剤には，POEアルキルエーテル(AE)と，POEフェニルエーテル(APE)がある．APEは，河川や湖沼などの水中では，AEに比べ微生物によって分解されにくいことが分かっている<sup>1, 2)</sup>．これらの界面活性剤は，使用後に排水として放流するときには何らかの排水処理が必要となる．この排水処理システムは，界面活性剤の種類を同定し，最適条件で処理できるように設計しなければならない．すなわち，AEあるいはAPEの判定と，それぞれの定量分析が重要となる．

\* オルガノ株式会社

ところで、現在工場排水中の非イオン界面活性剤の試験方法は、JIS K 0102に規程されているが、この方法ではテトラチオシアナコバルト(II)酸アンモニウム溶液を用いており、非イオン界面活性剤の分子中のオキシエチレン鎖(モル付加数)の違いや側鎖の種類により吸収感度が異なる<sup>3)</sup> ために、未知物質の種類によっては正しい定量分析が困難である。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で非イオン界面活性剤を分離し定量分析する方法がある。この方法は、まず官能基の確認のための定性分析を行い、次に定量分析を行うため煩雑である。また、ppmレベルの微量の定性分析に必要な標準物質の選択のための一般的な方法はまだ確立されていない。

構造が既知の非イオン界面活性剤の定量分析を行うときは、紫外線の吸収帯をもたないAEに対しては、水酸基を誘導体化した後、逆相HPLCで分離して紫外線検出する。一方APEは、順相HPLCで分離した後、紫外線吸収と蛍光で検出することにより、1ppmまでの定量分析が報告されている<sup>4)</sup>。

今回筆者らは、POE系非イオン界面活性剤混合物を逆相HPLCで分離し、その溶出液を筆者らが先に開発したピンポイント濃縮法<sup>5, 6)</sup> で処理・濃縮し、残渣を顕微FTIRで赤外線スペクトルを測定することにより、1ppmレベルのAEとAPEを判別する技術を開発した。

本稿では、1ppmレベルのAEまたはAPEをHPLCで定量分析をする前に必要となる標準物質の構造に関する情報を、確実かつ迅速に得る方法を検討した結果を報告する。

## 2. 方法

### 2.1 試薬

モル負荷数とHPLC溶出時間(リテンションタイム)の関係を求めるための試薬には、東京化成(株)製の特級試薬、POEラウリルエーテル(C<sub>12</sub>)、POEオレイルエーテル(C<sub>18</sub>)、POEオクチルフェニルエーテル(C<sub>8</sub>)、およびPOEノニルフェニルエーテル(C<sub>9</sub>)を使用した。またAEとAPEのリテンションタイムの検討には、同じく東京化成(株)製の特級試薬、C<sub>18</sub>とC<sub>9</sub> 0.1gを500mlの精製水に溶解し(200ppm)、実験にはこれらを適宜希釈し使用した。また溶離液は、和光純薬の高速液体クロマトグラフィー用アセトニトリルを使用した。

### 2.2 装置

液体クロマトグラフィーは東ソー社のCP-8000で、検出器はUV-8000およびRI-8000、カラムはInertsil ODS-2(4.6mmi.d.×250mm, 5m)を使用した。またプレカラムはTSK ge1 ODS-80TM(3.2mmi.d.×15mm)とし、溶離液濃縮用サンプラーはマイクロニクス(株)のピーク自動検出機能付きX-Yステージを使用した。X-Yステージの移動距離は、X軸が60mm、Y軸が60mm、停止精度は50μmで、スプリット比連続可変機構及びサンプリングノズル下降機構付きである。サンプリングプレートは50mm×50mm×3mmのステンレス板の片面を研磨し、その上にフッ素樹脂を100nmの厚さにコーティングした。FTIRは堀場製作所製の顕微専用FT-530で、カセグレン対物鏡は×25を使用した。固相抽出はWatersのSet-pak tC<sub>18</sub>を用いた。

### 2.3 フッ素系樹脂フィルムを用いたピンポイント濃縮

溶液中の有機物を赤外分光分析で同定するためには、従来から溶媒除去について数多くの方法が検討されてきた。溶媒1 $\mu$ lは、球状にすれば直径約1.2mmとなるが、鏡面研磨した金属板に滴下すると、アセトニトリルでは約3mmに広がる。滴下後溶媒の蒸発は全体的に始まるが、溶質は薄状の数 $\mu$ m~十数 $\mu$ mの無数の小さな島となり、直径3mmの環状残渣として残る。非晶質フッ素系樹脂フィルムをコーティングした鏡面金属板上に100ngのトリトン溶液を滴下すると、図1に示すように、フッ素樹脂と溶液の接触角が大きいため、滴下直後の液滴の大きさは3mm~5mmとなるが、溶媒の蒸発とともに液滴の外径は小さくなり、最終的に直径約100 $\mu$ mの半球状態に凝集・濃縮される。

従来得られる最も薄いポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製フィルムの厚さは12 $\mu$ mであり、1200 $\text{cm}^{-1}$ と1150 $\text{cm}^{-1}$ 付近にCF<sub>2</sub>対称および逆対称伸縮振動や、C-C伸縮振動による非常に強い吸収を示す。従って、このフィルム上に形成された物質の透過または反射スペクトルを測定することが困難であった。今回採用した厚さ0.1 $\mu$ mアモルファスフッ素樹脂フィルムは、フィルム自体による吸収が小さく、750 $\text{cm}^{-1}$ ~4000 $\text{cm}^{-1}$ の範囲のスペクトルを測定することが可能となった。

### 2.4 測定

液体クロマトグラフィーでは、試料100 $\mu$ lを注入し、100%のアセトニトリルを溶離液として1ml/nの速度で分離し、UV検出器の次にRI検出器を取り付けてピークを検出した。UV検出器の測定波長はAPEの最大吸収波長である280nmである。検出器からでてくる溶離液を1/10に分流し、30秒間隔でサンプリングプレートに滴下した。X-Yサンプラーは30秒ごとに6mmずつ移動させた。サンプル注入後15分間で30回のサンプリングを行った。図2にサンプリングシステムのブロック図を示す。サンプリングしたプレートをFT-530のステージに設置し、マスクサイズ10 $\mu$ m $\times$ 10 $\mu$ mに限定し、100回の積算を行って赤外線反射スペクトルを測定した。

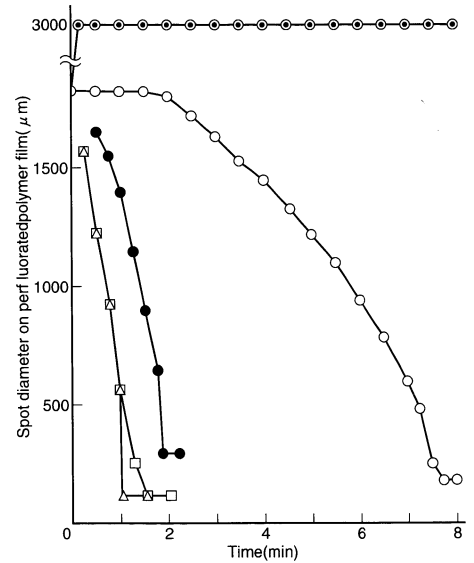


図1 25°Cにおけるトリトンの蒸発時間とスポットサイズの関係  
Evaporation time and spot size of triton at 25°C

1 $\mu$ m of Triton with a concentration of 0.1  $\mu$ l/mL in (○) water, (●) water at 60°C, (□) methanol, (△) acetonitrile on perfluorated polymer film and (◎) water on a SUS plate.

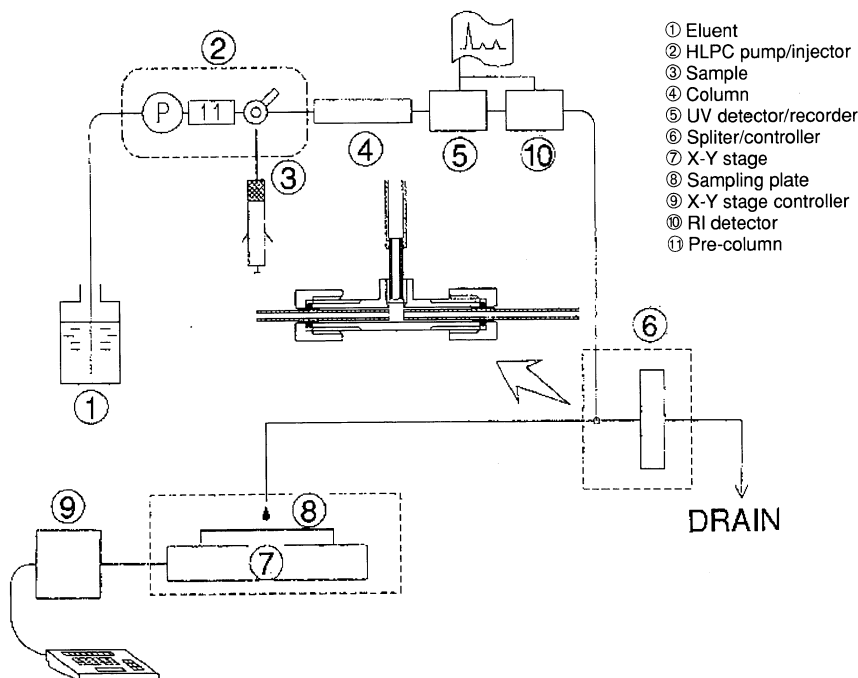


図2 HPLC/ピンポイント・サンプリングシステムのブロックダイアグラム  
Block diagram of HPLC/pin-point sampling system

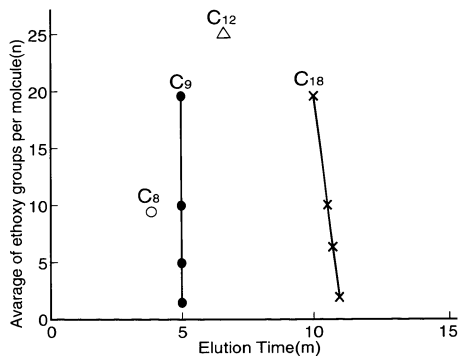


図3 アルキル鎖が異なる非イオン海面活性剤の抽出時間エトキシ基の平均モル付加数の関係  
Relationship between elution time of several non-ionic surfactant alkyl chain and average of ethoxy groups per molecule

C<sub>8</sub>: Polyethylene glycol mono-p-octylphenyl ether  
C<sub>9</sub>: Polyethylene glycol mono-p-nonylphenyl ether  
C<sub>12</sub>: Polyethylene glycol mono-lauryl ether  
C<sub>18</sub>: Polyethylene glycol mono-oleyl ether

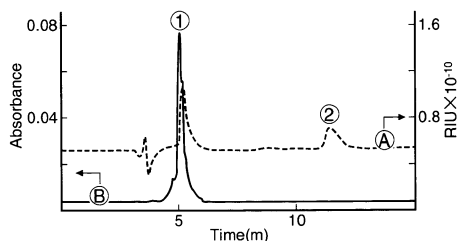


図4 ポリエチレングリコールアルキエーテル(AE) 100ppmとパラポリエチレングリコールフェニエーテル(APE) 100ppmの混合物の典型的なクロマトグラム  
Typical chromatogram of mixture of polyethylene glycol alkyl ether (AE) 100 ppm and p-polyethylene glycol alkylphenyl ether (APE) 100 ppm

(A) : RI Detector, (B) : UV Detector,  
① APE, ② AE

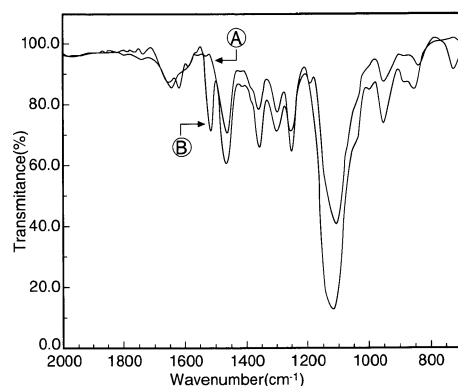


図5 AEとAPEの赤外線スペクトル  
Infrared absorption spectrum of AE and APE

(A) : AE [R-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H]  
(B) : APE [R-φ-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H]

### 3. 測定結果と考察

#### 3.1 EOモル付加数とHPLC溶出時間

親油基であるアルキル鎖と親水基であるエチレンオキシド(EO)を含むPOE系非イオン界面活性剤は、アルキル鎖とEOモル付加数の違いによって、HPLCでの保持時間が変化した(図3)。

C<sub>12</sub>とC<sub>18</sub>はいずれもAEである。C<sub>18</sub>の溶出時間は、EOモル付加数が10につき約30秒の割合で早くなった。C<sub>12</sub>については、C<sub>18</sub>と同様のEOモル付加数の異なった試料についての検討はできなかったが、C<sub>18</sub>を基準とする場合、アルキル基一個について約1分間溶出時間は早くなったことから、EOモル付加数の増加にとともにC<sub>18</sub>と同様に变化するものと推定される。

一方、C<sub>8</sub>とC<sub>9</sub>はいずれもAPEである。C<sub>9</sub>の保持時間は、EOモル付加数の違いによる差異は少なく殆ど同一であるが、AEと同様アルキル基の数とともに変化した。市販の界面活性剤の親油基には分布があるため、クロマトグラムの保持時間だけでPOE系界面活性剤の種類を決定する事が困難である。

#### 3.2 UVとRIを検出器としたクロマトグラム

図4に標準物質としてC<sub>18</sub>とC<sub>9</sub>をそれぞれ100ppmを含んだ混合物を注入して得られるクロマトグラフを示す。UV検出器では、注入約5分後にC<sub>9</sub>のピークだけが現れている。一方RI検出器では、注入約5分後にC<sub>9</sub>が、約11分後にC<sub>18</sub>による小さなピークが検出されている。RI検出器の検出限界は、ベースラインのノイズや不純物の影響が現れて、C<sub>18</sub>とC<sub>9</sub>はそれぞれ20ppmと100ppm程度となる。UV検出器の検出限界はC<sub>9</sub>で約5ppmであった。

#### 3.3 溶離液のピンポイント濃縮/F T I Rによる同定

POE系界面活性剤の赤外スペクトルは、図5に示すように、APEにはベンゼン核特有の1600cm<sup>-1</sup>と1500cm<sup>-1</sup>付近に2つの吸収帯がみられ、AEと容易に判別できる。

C<sub>18</sub>とC<sub>9</sub>それぞれ1ppmの混合物をHPLCに注入し、溶離液をX-Yサンプラーでサンプリングし、ピンポイント濃縮後残渣をFT-530で測定した。注入約5分後のフラクションとC<sub>9</sub>単体の赤外スペクトルを図6に示す。また約11分後フラクションとC<sub>18</sub>単体のスペクトルの比較を図7に示す。これらのスペクトルが一致しており、5分後のフラクションがC<sub>9</sub>であり、11分後のフラクションがC<sub>18</sub>によるものであると判定できる。

1ppmのC<sub>18</sub>とC<sub>9</sub>をHPCLに注入し、そのピークトップの溶出液をピンポイント濃縮すると、最終径が約20μmの一つの球状の残渣となり、5回の再現精度はCV値で約3%であった。またC<sub>18</sub>のピンポイント濃縮残渣を10μm×10μmに視野を絞って中心部の赤外スペクトルを測定すると、1150cm<sup>-1</sup>の吸光係数は約0.8となった。しかし、一つの溶出ピークを溶出開始から終了までの間を順次サンプリングし、それらをピンポイント濃縮して赤外スペクトルを測定した。それらの吸光度プロファイルは、HPCLと比べてなめらかでなく、凹凸したものとなった。この原因は、試料が球状で濃度によって半径が異なり、顕微FTIRで測定すると、光軸上における光学的厚さが変化する、さらに光軸の中心に試料を再現性よく設置することが困難なことなどである。

### 3.4 溶離液中の不純物の影響

溶離液であるアセトニトリルに含まれる不純物は、PPMレベルの微量測定のさいには大きな妨害原因となる。アセトニトリルを蒸発させた残渣つまり不純物は、テトラヒドロフランに可溶性であるため、ODSのプレカラムをポンプの直後に取り付けて除去した。1mlのアセトニトリルを直接ピンポイント濃縮したとき、ODSカラムで不純物を除去した後の残渣の赤外スペクトルを図8に示す。不純物の除去処理により、 $2800\text{cm}^{-1}$ 付近のCHに由来の影響は約1/20に低減した。

### 3.5 実際試料への応用

Sep-pak  $\text{tC}_{18}$ を固定充填剤とした吸着カラムを、メタノール5mlと水10mlでコンディショニングを行った。このカラムに工場排水試料50mlを流し、無機イオンなどの不純物を除去したのち、100%のアセトニトリル2mlで固相抽出した。この抽出液を $100\mu\text{l}$ だけHPLC注入したところ、UV検出器には5.04分後にピークが、またRI検出器には5.22分後の大きなピークと7.67分後に小さなピークがあるクロマトグラムが得られた。図4に示すように、AEのリテンションタイムは11.55分程度であったが、実試料のリテンションタイムは7.67分になった。この原因は、標準物質としてアルキル鎖が $\text{C}_{18}$ 、モル負荷数10のものを用いたためである。

一方、図3ではアルキル鎖が変化するとリテンションタイムも変化することを示している。実際試料のリテンションタイムが7.67分であることから、実際試料は $\text{C}_{18}$ 以下であることが推定できる。また、赤外スペクトルから、5.22分後のピークはAPEで、7.67分後のピークがAEと判定することができた。UV検出器とRI検出器のピーク出現時間に差異がある原因は、UV検出器とRI検出器間の空間容量によるものと考えられる。

## 4. まとめ

FTIRとHPLCを組み合わせ、HPLCの溶離液の赤外スペクトルから物質の同定を行い、HPLCの標準物質の選択のための新しい方法を検討した。本方法を、工場排水中に含まれるPOE系非イオン界面活性剤を、逆相HPLCで分離し、ピンポイント濃縮し、顕微FTIRによる赤外スペクトル分析に応用した。AEとAPEが混合している試料に対しては、最小1 ppmまでの定性が可能であった。これはHPLCのUV検出器による定量限界と同等であり、HPLC分析における標準物質の選定には有効な方法である。従来から行われているHPLCの溶離液を、FTIRを用いた拡散反射法<sup>6)</sup>でStahl's色素試験溶液の分析を行った場合に比べ、30倍以上定性能力が向上した。

今後の課題は、固相抽出による前処理を行ってさらに低濃度の定性が可能とすること、定量精度向上のために、ピンポイント濃縮の最終径の一定化を図ること、さらに、HPLCで分離された近接ピークが一つの液滴としてピンポイント濃縮サンプリングされないよう分解能を維持することなどである。

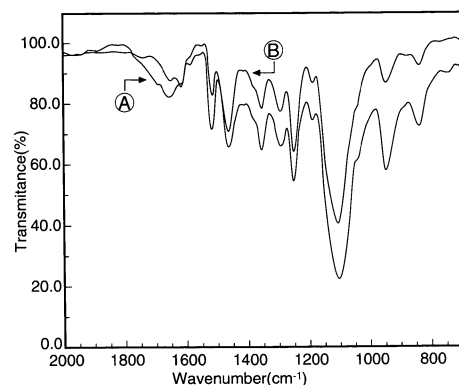


図6 基板に濃縮したAPEの赤外線スペクトル  
Infrared spectrum of  $10\mu\text{g}$  of APE collected on substrate

- (A): Infrared spectrum of  $10\mu\text{g}$  of APE after elution from HPLC collected on perfluorated polymer on SUS mirror
- (B): Reference spectrum of  $10\mu\text{g}$  of APE

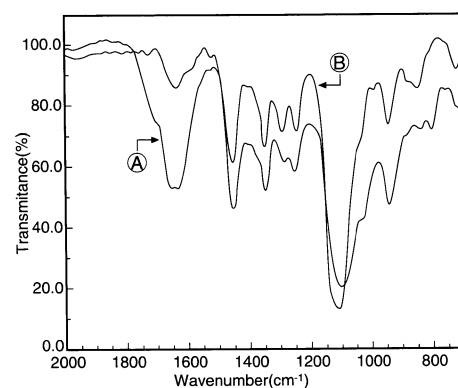


図7 異なる基板に濃縮したAEの赤外線スペクトル  
Infrared spectrum of  $10\mu\text{g}$  of AE collected on substrate

- (A): Infrared spectrum of  $10\mu\text{g}$  of AE after elution from HPLC collected on perfluorated polymer on SUS mirror
- (B): Reference spectrum of  $10\mu\text{g}$  of AE

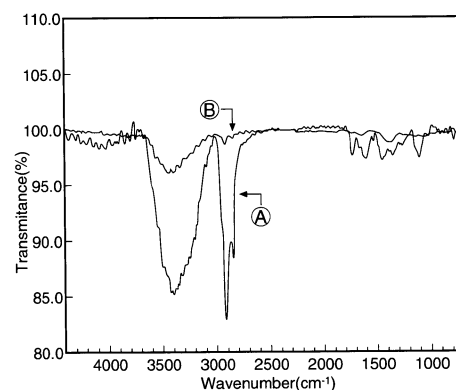


図8 アセトニトリルの残渣の赤外線スペクトル  
Infrared spectrum of residual in acetonitrile

- (A): Residua of HPLC grade acetonitrile in 1 ml
- (B): Residua of acetonitrile in 1 ml eluted from ODS pre-column

参考文献

- 1) 伊藤伸一, 内藤昭治, 畝本 力: 衛生化学, 33, 416 (1987).
- 2) 伊藤伸一, 内藤昭治, 畝本 力: 衛生化学, 34, 424 (1988).
- 3) 三浦恭之, 鈴木裕子, 長谷譚真人, 康 智三: 分析化学38, T15 (1989).
- 4) M.Kudo, H.Ozawa, S.Fudano and K.Tsuji: Journal of Chromatography, 287, 337 (1984).
- 5) M.Ikeda and H.Uchihara: Applied Spectroscopy, 46, 1431(1992).
- 6) D.Kuehl and P.Griffiths: Journal of Chromatographic science, 17, 471 (1979).



磯 節子

Setsuko Iso

オルガノ株式会社  
総合研究所分析センター主任  
環境計量士



池田 昌彦

Masahiko Ikeda

(株)堀場製作所  
分析センター副部長  
理学博士, 技術士





