

Technical Report

順相LCを利用した複雑混合物中成分の分画とGC×GCによる混合物評価法への応用

Application of the normal phase LC-fractionation to the GC×GC-based method for a mixture assessment

頭士 泰之¹、山取 由樹¹、羽成 修康²、恒見 清孝¹、永田 淳³、長尾 優³、廣岡 恵³、田中 幸樹³

Abstract:

製品や環境中の化学物質について、成分網羅的に存在実態を把握して、その情報をリスク評価に繋げていくための方法が求められている。揮発性-半揮発性物質について成分網羅的に検出・把握が可能なGC×GCは、複雑な組成をした混合物の評価にも有効であるが、現状ではその適用範囲に限られる。これに対しLC分画を利用し、化学的特性に応じた混合物の分離を行うことで、混合物評価におけるGC×GCの利便性を向上させることができる。本報では、このLC分画手法の仕組みおよび手順と、GC×GCによる解析手法とLC分画手法とを連携させた場合の効果について解説する。

Keywords: LC分画、GC×GC、複雑混合物、物性評価、環境動態評価、リスク評価

1. はじめに

環境中には様々な化学物質が混然一体となって存在する¹⁻³。すなわち我々が日々の生活の中で暴露している化学物質は多種多様である。しかしながら、現代の化学物質管理の体制の中では、こうした種々の化学物質全てについての暴露状況が正しく把握されているわけではない⁴。実際的には高リスクの懸念される化学物質から情報収集が進められ優先的に評価がなされている。このアプローチが重要であると同時に、成分網羅的に環境中化学物質を把握してその情報をリスク評価に繋げていくための方法の開発も重要と言える。

揮発性-半揮発性物質について成分網羅的な検出・把握を可能とする分析装置に2次元ガスクロマトグラフ (GC×GC) がある⁵。このGC×GCでは保持時間から、対象物質とGCカラムの液相との相互作用を測ることができ、検出された物質について様々な物性・環境動態の情報を分析データから直接得ることができ⁶⁻⁸、混合物のリスク評価に繋がられる可能性を秘めている。ただし、現状ではこの手法は、適用可能な物質種に限られており、石油製品など物質種が炭化水素類のみなど均質であることが自明な混合物試料には効果的であるものの、様々な物質種を含む環境試料や変化体などを含む不均質な試料については、適用範囲の判断が煩雑となり、実際場面での活用に課題がある。このような状況に対し、GC×GCへの画分 (フラクション) 導入を想定した順相液体クロマトグラフ (LC) による混合物成分の分画方法が有効である。化学的性質に応じて多数成分をクロマトグラフィー技術により大分類し、フラクションを収集できるこのLC分画を利用することで、適用範囲の限られたGC×GCの解析手法であっても、その利便性が向上することが見込める。本報では、このLC分画手法の仕組みおよび手順と、GC×GCによる解析手法とLC分画手法とを連携させた場合の効果について解説する。

2. 試料・装置分析について

分析用試薬：順相LCでの分画条件最適化のために、非極性物質である炭化水素類、中程度の極性を示す脂肪酸メチルエステル類 (FAME)、極性物質であるアルコール類とアミン類を含む Programmed Test Mix (Sigma-Aldrich, Product No. 47304 Table 1) と、中程度の極性を示すFAMEと極性物質であるヒドロキシ脂肪酸メチルエステル類を含む Bacterial Acid Methyl Ester (BAME) Mix (Sigma-Aldrich, Product No. 47080-U Table 2) の2種の市販試薬を用いた。

Table 1 Programmed Test Mixの化合物リスト

ID	Chemical name	RT1 (Min)	RT1 (Min)	CAS No.	SMILES
1	2,3-Butanediol	5.7	1.1	513-85-9	CC(C(C)O)O
2	Decane	7.7	1.2	124-18-5	CCCCCCCCC
3	Dicyclohexylamine	21.7	3.3	101-83-7	C1CCC(CC1)NC2CCCC2
4	2,6-Dimethylaniline	10.7	4.4	87-62-7	c1(ccc(c1N)C)C
5	2,6-Dimethylphenol	10.7	3.9	576-26-1	Cc1cccc(c1O)C
6	2-Ethylhexanoic acid	10.0	2.4	149-57-5	CCCCC(CC)C(=O)O
7	Methyl decanoate	17.4	3.1	110-42-9	CCCCCCCCC(=O)OC
8	Methyl laurate	27.0	3.6	111-82-0	(CCCCCCCCCCCC)OC(=O)C
9	Methyl undecanoate	21.4	3.8	1731-86-8	CCCCCCCCCCC(=O)OC
10	Nonanal	9.4	2.0	124-19-6	C(CCCCCCCC)=O
11	1-Octanol	8.7	1.9	111-87-5	CCCCCCCCO
12	Undecane	9.7	1.3	1120-21-4	C(CCCCCCCCC)C

1 産業技術総合研究所 エネルギー・環境領域 安全科学研究部門
2 産業技術総合研究所 計測標準総合センター 物質計測標準研究部門
3 島津製作所 分析計測事業部

Table 2 Bacterial Acid Methyl Ester (BAME) Mixの化合物リスト

ID	Chemical name	RT1 (Min)	RT1 (Min)	CAS No.	SMILES
1	Methyl undecanoate	22.1	2.4	1731-86-8	CCCCCCCCC(=O)OC
2	Methyl (±)-2-hydroxydecanoate	22.1	3.0	71271-24-4	CCCCCCCC(C(=O)OC)O
3	Methyl dodecanoate	27.1	2.7	111-82-0	CCCCCCCCC(=O)OC
4	Methyl tridecanoate	32.1	2.7	1731-88-0	CCCCCCCCC(=O)OC
5	Methyl 2-hydroxy dodecanoate	32.4	3.3	51067-85-7	CCCCCCCCC(C(=O)OC)O
6	Methyl (±)-3-hydroxy dodecanoate	33.7	3.6	72864-23-4	CCCCCCCC(C(=O)OC)O
7	Methyl myristate	37.4	2.8	124-10-7	CCCCCCCCC(=O)OC
8	Methyl 13-methyl tetradecanoate	40.7	2.8	5129-59-9	CC(C)CCCCC(=O)OC
9	Methyl 12-methyl tetradecanoate	40.7	2.8	5129-66-8	CCC(C)CCCC(=O)OC
10	Methyl pentadecanoate	42.4	2.7	7132-64-1	CCCCCCCCC(=O)OC
11	Methyl 2-hydroxy tetradecanoate	42.7	3.3	56009-40-6	CCCCCCCCC(C(=O)OC)O
12	Methyl 3-hydroxy tetradecanoate	44.1	3.6	55682-83-2	CCCCCCCC(C(=O)OC)O
13	Methyl 14-methyl pentadecanoate	45.4	2.8	5129-60-2	CC(C)CCCCC(=O)OC
14	Methyl cis-9-hexadecanoate	45.7	3.2	1120-25-8	CCCCC=CCCC(=O)OC
15	Methyl palmitate	47.1	2.9	112-39-0	CCCCCCCCC(=O)OC
16	Methyl 15-methyl hexadecanoate	50.1	2.7	6929-04-0	CC(C)CCCCC(=O)OC
17	Methyl cis-9,10-methylene hexadecanoate	50.7	3.2	36254-90-7	CCCCC[C@H]1C[C@H]1CCCCC(=O)OC
18	Methyl heptadecanoate	51.4	3.0	1731-92-6	CCCCCCCCC(=O)OC
19	Methyl 2-hydroxy hexadecanoate	52.1	3.5	16742-51-1	CCCCCCCCC(C(=O)OC)O
20	Methyl linoleate	54.1	3.6	112-63-0	CCCC/C=C/C/C=C\C(=O)OC
21	Methyl oleate	54.7	3.3	112-62-9	CCCCCCC/C=C\C(=O)OC
22	Methyl trans-9-octadecanoate	54.7	3.3	1937-62-8	CCCCCCC/C=C/C(=O)OC
23	Methyl stearate	56.1	2.9	112-61-8	CCCCCCCCC(=O)OC
24	Methyl methylene octadecanoate	59.1	3.3	3971-54-8	CCCCCCCC1CC1CCCCC(=O)OC
25	Methyl nonadecanoate	60.1	3.0	1731-94-8	CCCCCCCCC(=O)OC
26	Methyl eicosanoate	64.1	3.0	2390-09-2	CCCCCCCCC(=O)OC

実試料：複雑混合物として、普通乗用車の使用済みエンジンオイル（走行距離 11,000 km 以上）を用いた。エンジンオイルは原液（5 μ L）をヘキサン-純水抽出後、濃縮し定容したものを分析試料とした。

LC 分画：市販試薬および実試料について、Table 3 に示す条件をもとに高速液体クロマトグラフ（HPLC、Fig. 1）での分離条件の最適化を行った。溶媒グラジエントと画分収集時間については、後述する。



Fig. 1 LC分画に用いたHPLC

Table 3 順相LCによる分画のための条件

Instrument	: SHIMADZU Prominence UFLC
Mobile phase	: A) Hexane/MTBE = 98/2, B) MTBE
LC column	: SUPELCOSIL LC-SI (100 mm \times 3 mm, 5 μ m)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Temperature	: 30 $^{\circ}$ C
Detector	: SPD-20AV (190 nm)
Injection volume	: 2 μ L

機器分析：GC \times GC-四重極型タンデム質量分析計（MS/MS）でEIでのスキャンモード分析（ m/z 50-500、scan rate 12 Hz）を行った。カラムコンビネーションはDB-1ht（10 m \times 0.53 mm I.D., 0.17 μ m film thickness）とBPX50（1 m \times 0.1 mm I.D., 0.1 μ m film thickness）を選択した。縦軸方向の保持時間となるモジュレーション時間は20秒とした。試料導入はスプリットモード（スプリット比100:1）とした。

3. 市販試料によるLC分画の最適化

市販試料 Programmed Test Mix について、Table 3 に示した条件で LC 分画を行った。なお、溶媒グラジエントについては 0 - 10 min (A)、10 - 30 min (B) とし、溶媒の切り替えはカラム直前の位置でのバルブスイッチングで行った。画分の収集時間は 1.5 - 4 min (フラクション1)、4.0 - 10 min (フラクション2)、10 - 20 min (フラクション3) とした。市販試薬に対する LC 分画で得られるクロマトグラムは Fig. 2 に示した通りであり、大きく 2 つの成分に分離できていることが分かる。

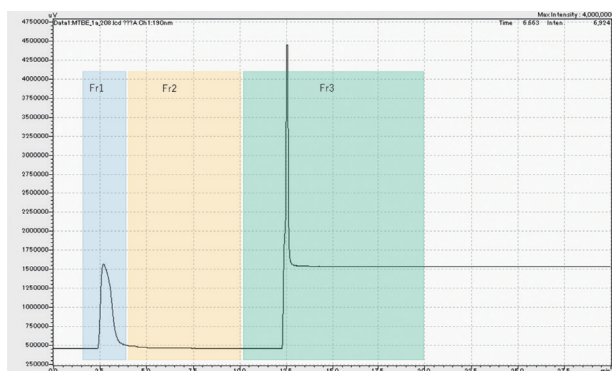


Fig. 2 市販試薬 Programmed Test Mix の LC 分画

さらに各フラクション中の成分について、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) での分析確認を行うと、フラクション1には非極性物質である炭化水素類、フラクション2には中程度の極性をしめす脂肪族メチルエステル類、フラクション3には極性物質であるフェノール類やアミン類が得られていることが分かる (Fig. 3)。ジシクロヘキシルアミン、ノナールについては溶出が確認できなかった。これについては、カラム内シリカへの強い吸着の影響が考えられる。

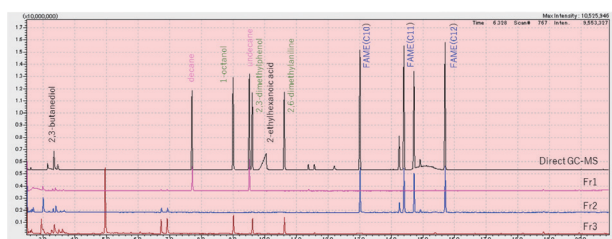


Fig. 3 市販試薬 Programmed Test Mix に対する LC 分画で得られた各フラクション中の GC-MS 分析結果

もう一つの市販試薬である BAME についても、フラクション2に 20 種の脂肪酸メチルエステル類、フラクション3には 6 種のヒドロキシ脂肪酸メチルエステル類がすべて確認された。しかしながら、使用済みエンジンオイル試料に適用した場合には、フラクション3中に、フラクション1に収集されるべき脂肪族・芳香族炭化水素類が溶出している現象が確認された。これは、管内に残存してしまっていたフラクション1の成分が、移動相溶媒の切り替えによりフラクション3の収集タイミングで再溶出してくるためだと考えられた。そこで、移動相溶媒の切り替えを試料インジェクション前のタイミングで行うグラジエントシステムに変更し、溶媒グラジエントに

ついては、0 - 10 min (A)、10 - 20 min (B)、20 - 30 min (A) とし、画分の収集時間は 1.5 - 3.5 min (フラクション1)、3.5 - 10 min (フラクション2)、15 - 25 min (フラクション3) とした。

この分析メソッドとすることにより、Programmed Test Mix の市販試薬、BAME の市販試薬、使用済みエンジンオイル試料ともにフラクション間の成分キャリアオーバーの抑えられたきれいな 3 分画が得られた。使用済みエンジンオイル試料の分画については、次章で詳述する。この最適化条件を用い LC 分画を実施することで、非極性成分、中程度の極性成分、極性成分といったように化学的特性に応じて、混合成分を分離し、さらに詳細に分析を実施することができる。

4. 使用済みエンジンオイルの各フラクション中成分のキャラクタリゼーション

使用済みエンジンオイルに対し最適化した条件での LC 分画を行うことで、Fig. 4 に示したクロマトグラムが得られる。フラクション3の範囲にみられるベースラインの上昇は、ブランク試料でも確認されており、溶媒である MTBE による影響と考えられる。

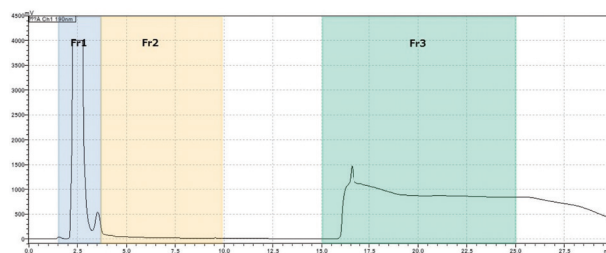


Fig. 4 使用済みエンジンオイルの LC 分画

フラクションを収集して濃縮後、GC×GC に導入し成分のキャラクタリゼーションを行ってみると、フラクション1には鎖式炭化水素類、環式炭化水素類、芳香族炭化水素類が含まれていることが確認された (Fig. 5)。フラクション2には目立った化合物ピークは確認されず、フラクション3にはごく少数の化合物ピークが確認された。このことから多くの燃焼生成物や混入物を含むと考えられる使用済みエンジンオイルについて、その大部分は非極性の脂肪族および芳香族炭化水素類から成り、低シグナル強度である少数の極性成分を含んでいるということが把握できる。すなわち、変化体などを含む不均質な混合物に対しても、LC 分画を用い化学特性に応じた成分分離を行うことで、簡便にその組成概要を知ることができる。

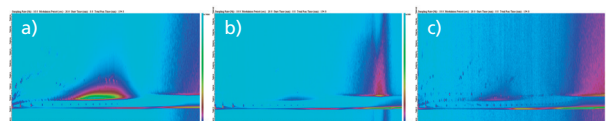


Fig. 5 使用済みエンジンオイルに対する LC 分画各フラクションの GC×GC-MS/MS 分析結果
a) フラクション1、b) フラクション2、c) フラクション3についてそれぞれ窒素パーズ濃縮し 200 μ L としたもの

5. GC×GCを利用した物性・動態評価との連携

LC分画を行い、化学的性質に応じた分離あるいはフラクション確認を導入することで、現状では適用範囲の限られているGC×GC物性・環境動態解析が、複雑な組成をした混合物に対しても利用しやすくなる効果がある。Fig. 6はGC×GCによるLFER理論9に則った環境動態解析を行った例を示している。



Fig. 6 混合物に含まれる陸生生物への蓄積が懸念される成分を示した例 (構造式はNISTライブラリサーチMF \geq 700で自動同定されたもの)

図中の濃い色をした領域は、その域内に溶出するピークが、その物性のために陸生成物に蓄積しやすい性質を持っていることを示している。実際にエンジンオイル中に溶出したこれらピークについて、NISTライブラリとGC×GC-MS/MSのスキャンモードによるスペクトル照合を行い、一致度の高かったもの (MF \geq 700) の構造式を示している。ライブラリサーチ結果からはいくつかのピークは極性物質と判断され、GC×GCの物性・環境動態解析の適用範囲外として除外して考える必要がある。しかし、LC分画を実施し、フラクション1のみをGC×GCへ導入する (あるいは他のフラクションに極性成分が検出されないことを確認した上で試料全体をGC×GCへ導入する) ことで、この領域に表れているピークはすべて、解析の適用範囲内である非極性物質であることが分かる。このLC分画により、GC×GCで検出されたピークが解析手法の適用範囲内か否か1つ1つ確認する手間がなくなり、混合物に含まれる非常に多数の成分について一挙に評価を進めることができるようになる。課題としては、そのほかのフラクションにピークが確認された場合、この物性・環境動態解析がまだ適用できないこと、リスク評価の実施を考えた際に解析できる項目が少ない点があるが、それらについては別途での拡張があり得る。

本報で示したように、LCでの分画は、特に複雑な組成をした混合物に対し、化学的性質に応じた成分の分離・識別を可能とし、その後続く網羅分析手法や解析手法と組み合わせることで、要素技術としてリスク評価に資するものと期待できる。

参考文献

- (1) Schymanski, E. L.; Singer, H. P.; Slobodnik, J.; Ipolyi, I. M.; Oswald, P.; Krauss, M.; Schulze, T.; Haglund, P.; Letzel, T.; Grosse, S.; Thomaidis, N. S.; Bletsou, A.; Zwiener, C.; Ibáñez, M.; Portolés, T.; de Boer, R.; Reid, M. J.; Onghena, M.; Kunkel, U.; Schulz, W.; Guillon, A.; Noyon, N.; Leroy, G.; Bados, P.; Bogianni, S.; Stipaničev, D.; Rostkowski, P.; Hollender, J., Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, (21), 6237-6255.
- (2) Brack, W.; Ait-Aissa, S.; Burgess, R. M.; Busch, W.; Creusot, N.; Di Paolo, C.; Escher, B. I.; Mark Hewitt, L.; Hilscherova, K.; Hollender, J.; Hollert, H.; Jonker, W.; Kool, J.; Lamoree, M.; Muschket, M.; Neumann, S.; Rostkowski, P.; Ruttkies, C.; Schollee, J.; Schymanski, E. L.; Schulze, T.; Seiler, T.-B.; Tindall, A. J.; De Aragão Umbuzeiro, G.; Vrana, B.; Krauss, M., Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 2016, 544, 1073-1118.
- (3) Hashimoto, S.; Zushi, Y.; Takazawa, Y.; Ieda, T.; Fushimi, A.; Tanabe, K.; Shibata, Y., Selective and comprehensive analysis of organohalogen compounds by GC × GC-HRTofMS and MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research* 2015, 1-12.
- (4) 頭士泰之, 複雑混合物も含めた混合物の国内外における規制と評価手法に関する最近の動向. 製品含有化学物質のリスク管理、情報伝達の効率化, 技術情報協会: 2017; pp 182-194.
- (5) Bertsch, W., Two-Dimensional Gas Chromatography. Concepts, Instrumentation, and Applications – Part 1: Fundamentals, Conventional Two-Dimensional Gas Chromatography, Selected Applications. *Journal of High Resolution Chromatography* 1999, 22, (12), 647-665.
- (6) Nabi, D.; Gros, J.; Dimitriou-Christidis, P.; Arey, J. S., Mapping Environmental Partitioning Properties of Nonpolar Complex Mixtures by Use of GC × GC. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, (12), 6814-6826.
- (7) Nabi, D.; Arey, J. S., Predicting Partitioning and Diffusion Properties of Nonpolar Chemicals in Biotic Media and Passive Sampler Phases by GC × GC. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, (5), 3001-3011.
- (8) Zushi, Y.; Nagata, J.; Nabi, D. In GC×GC-based property estimation for risk assessment of complex petrochemical mixture including the generated compounds in the engine oils, SETAC North America Focused Topic Meeting, Texas, USA, 2017.
- (9) Goss, K.-U.; Schwarzenbach, R. P., Linear Free Energy Relationships Used To Evaluate Equilibrium Partitioning of Organic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, (1), 1-9.