

高速液体クロマトグラフィーによる微量有機防汚剤の分析

Microanalysis of Organic Antifouling Agents on High Performance Liquid Chromatography



技術研究所
第2部
清田光晴
Mitsuharu
KIYOTA

SUMMARY

High performance liquid chromatograph (HPLC) with a photo diode array detector was applied in order to measure quantity of organic antifouling (A/F) agents leaching from ship bottom paint film.

Nine types of A/F agents were separated and quantitatively analyzed simultaneously on HPLC using the reversed-phase of combination of octadecyl-modified polymer gel column and a gradient of water-acetonitrile and acetonitrile. UV spectra, three dimensional chromatograms and contour line chromatograms of the A/F agents obtained from the photo diode array detector were very effective aid to establish an instrumental micro-analysis method to find out trace of A/F agents leaching from test sample paint films.

As a result, the leaching quantity could be detected within the range of 5 to 17 ppb on this method.

要 旨

フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、船底塗膜から溶出する微量な有機防汚剤の定量分析法を検討した。オクタデシル基結合型のポリマー系充填剤カラムを用い、水 / アセトニトリルとアセトニトリルのグラジエント法による逆相系 HPLC により 9 種類の有機防汚剤の同時分析が可能となった。フォトダイオードアレイ検出器により有機防汚剤の UV スペクトル、三次元クロマトグラム、等高線クロマトグラムが得られ、詳細な解析に有効な分析法を確立した。その結果、最適な分析法により塗膜から溶出する微量な有機防汚剤の検出が ppb レベルで可能となった。本検討で使用した塗膜からの溶出量は 5ppb から 17ppb であった。

1. はじめに

船底塗料には、藻類やフジシボなどの海産生物の付着を防止する目的で数種類の有機防汚剤を添加することが多い。これらの有機防汚剤の残存量や溶出量の分析は、船底塗料設計における防汚効力やその持続性などの防汚性能の評価基準として重要な測定である。塗膜から溶出する有機防汚剤を直接定性定量分析することができれば、塗膜の防汚性能の重要な評価手法のひとつとなる。そこで、海水中に溶出した微量の有機防汚種類を、HPLC により分析することが可能であるか検討を試みた。

HPLC による分析において、金属との配位結合の強い有機防汚剤の溶出挙動、および有機防汚剤の分子構造による特有の UV 吸収プロフィールを利用したフォトダイオードアレイ検出器によって 9 種類の有機防汚剤の同時測定を行った。

2. 実験

2.1 試料

藻類やフジツボなどの海産付着生物に対して忌避作用あるいは生育抑制作用が認められ、船底塗料に使用されている代表的な9種類の有機防汚剤を用いて測定条件を検討した(図1)。これら有機防汚剤を添加したアクリル樹脂系塗膜を溶出試験に用いた。

2.2 溶出試験

塗膜からの有機防汚剤の溶出試験は、6cm×10cmの塗膜片を水温20℃の海水1Lに3時間浸漬して行った。塗膜片は被覆鉄線で上部から吊りし、下層からエアによるバブリングを2000~2500ml/minで行なった。溶出試験は遮光下で実施した。

2.3 装置

HPLCは島津社製と東ソー社製の装置を用いた。検出器にはフォトダイオードアレイ検出器(SPD - M10AVP)を用

いた。固定相はオクタデシル基結合型のシリカ系充填剤(ODS カラム(TSK gel ODS - 80Ts) およびオクタデシル基結合型のポリマー系充填剤カラム(TSK gel Octadecyl - 2PW)を使用した。

2.4 測定法

代表的な分離分析法としてはHPLCとガスクロマトグラフィーがあるが、ガスクロマトグラフィーは熱による試料の分解の恐れがあるため、HPLCを使用して有機防汚剤の測定を行った。

HPLCは、分離の場に固定した状態で試料と相互作用する固定相と、移動しながら相互作用する移動相がある。疎水性固定相としてオクタデシル基結合型充填剤、親水性移動相として極性の大きい水/アセトニトリル混合溶媒を使用した逆相分離により有機防汚剤の測定を行った。図1の9種類の有機防汚剤の同時測定にフォトダイオードアレイ検出器を使用した。フォトダイオードアレイ検出器により、UVスペクトル、三次元クロマトグラム、等高線クロマトグラムが得られ、9種類の有機防汚剤の同定を行なった。

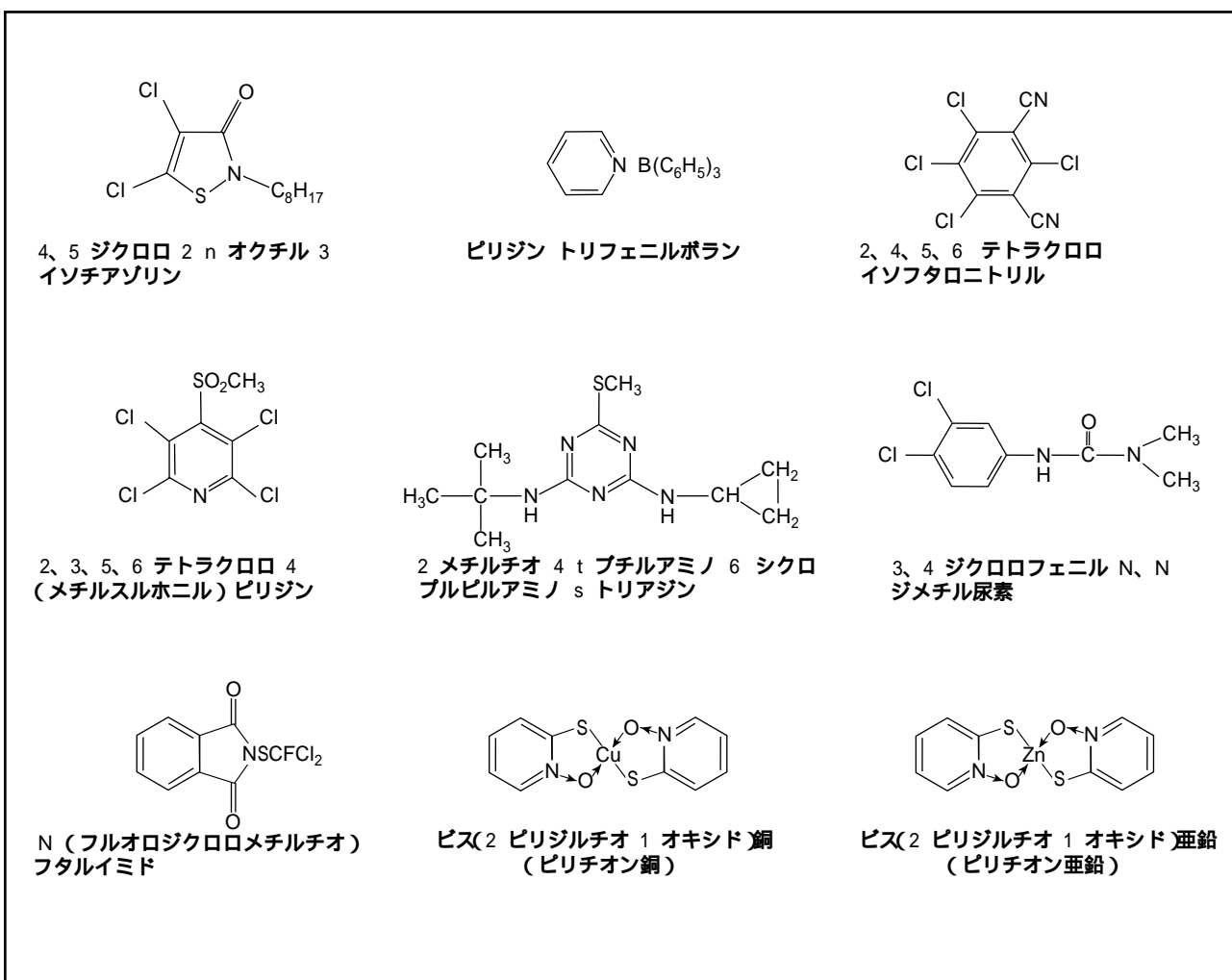


図1 試料に用いた有機防汚剤種

3. 結果および考察

3.1 シリカ系充填剤カラムによるピリチオン銅の測定

HPLCに使用される代表的なオクタデシル基結合型シリカ系充填剤(ODS)を固定相に、水 / アセトニトリル(70 / 30)組成を移動相に用いてピリチオン銅を測定した。

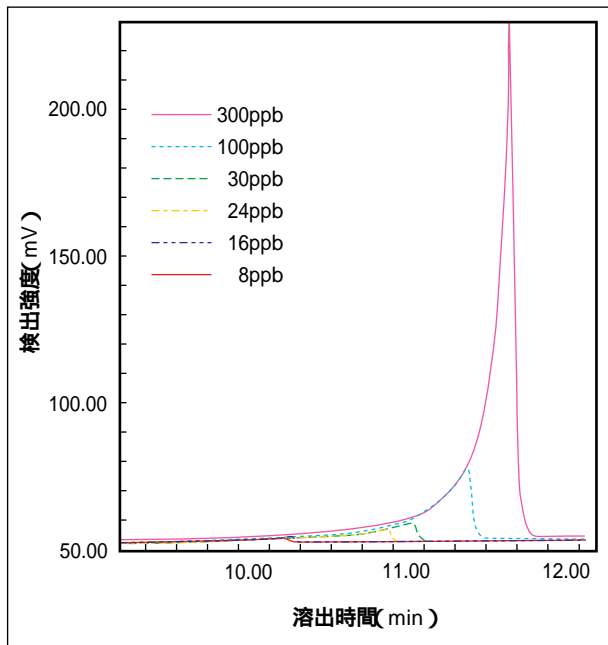


図2 シリカ系充填剤カラムを使用したピリチオン銅の溶出挙動
測定条件 カラム : TSKgel ODS-80TsQA(4.6mm × 15cm)
移動相 : H₂O/CH₃CN(70/30)

図2に8、16、24、30、100、300ppbの試料濃度のピリチオン銅を用いて測定した6種類のクロマトグラムを示した。各濃度のピリチオン銅のクロマトグラムは最適な分布曲線であるガウス型曲線からはずれ、分布曲線が前に傾きリーディングを示した。このように分布曲線がガウス型曲線からはずれる場合、最適な分離が行われていないと言える。図2のクロマトグラムのピーク頂点の溶出時間とピークの立ち上がり点から水平に戻る点までのピーク面積はHPLCの定性定量性の精度において重要であり、定性的な検出のため溶出時間は一定であることが必要である。

図2の8、16、24、30ppbのピリチオン銅のクロマトグラムにおいて溶出時間の試料濃度に対する影響を図3に示した。ピリチオン銅は試料濃度が高くなると溶出時間が長くなる傾向にあり、試料濃度に対し溶出時間が変動するため溶出時間を指標とする定性的な検出が困難であった。

図2の8、16、24、30ppbのピリチオン銅のクロマトグラムにおいてピーク面積の試料濃度に対する変化(検量線)を図4に示した。ピリチオン銅は20ppb以下でバラツキが大きく定量性が低かった。これは分布曲線がリーディングを示すため

ピークの立ち上がり点の検出に誤差を含みピーク面積が変動するためであった。

以上から、オクタデシル基結合型シリカ系充填剤カラムを使用したピリチオン銅の測定では、最適な分離が行われずリーディングの分布曲線となり、定性定量性の精度が低かった。

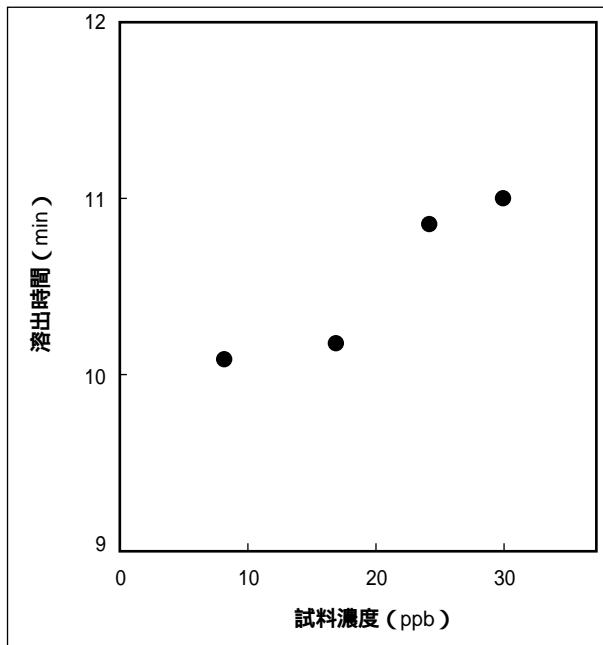


図3 試料濃度に対する溶出時間の変化
(シリカ系充填剤カラムを使用)

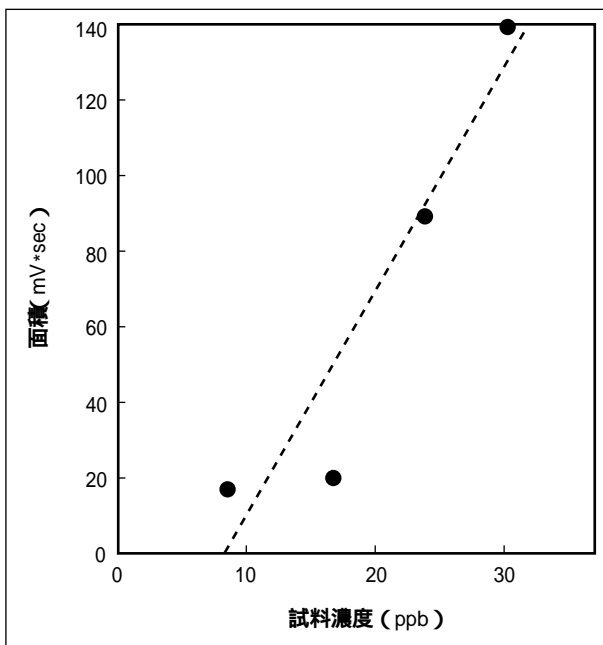


図4 検量線 (シリカ系充填剤カラムを使用)

3.2 ポリマー系充填剤カラムによるピリチオン銅の測定

オクタデシル基結合型ポリマー系充填剤を固定相に、

50mMリン酸二水素カリウム水溶液 / アセトニトリル(70 / 30)組成を移動相に用いてピリチオン銅を測定した。

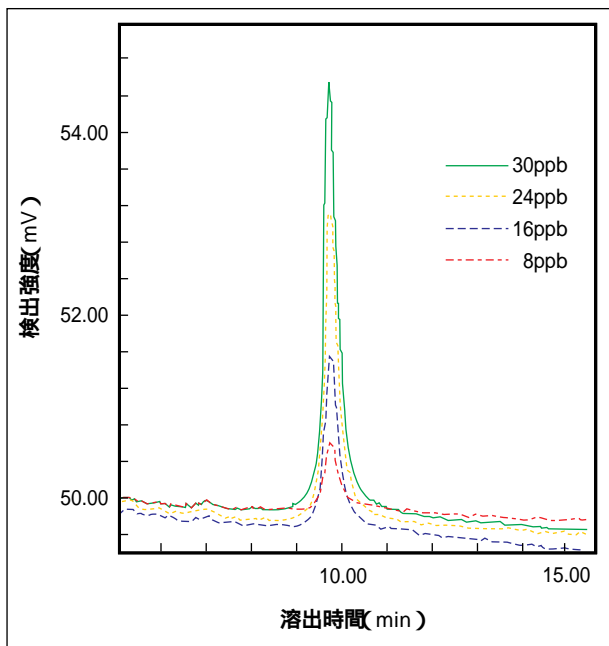


図5 ポリマー系充填剤カラムを使用したピリチオン銅の溶出挙動
測定条件 カラム : TSKgel Octadecyl 2PW(6.0mm × 15cm)
移動相 : 50mM KH₂PO₄/CH₃CN(70/30)

図5に8、16、24、30ppbの試料濃度のピリチオン銅を用いて測定した4種類のクロマトグラムを示した。ピリチオン銅は各濃度において最適な分布曲線であるガウス型分布曲線を示した。

図5の8、16、24、30ppbのピリチオン銅のクロマトグラムにおいて溶出時間の試料濃度に対する影響を図6に示した。試料濃度に対するピリチオン銅の溶出時間は一定であり溶出時間を指標とする定性的な検出が行えることがわかった。

図5の8、16、24、30ppbのピリチオン銅のクロマトグラムにおいてピーク面積の試料濃度に対する変化(検量線)を図7に示した。低濃度域でもバラツキが小さく図4のシリカ系充填剤カラムで測定した検量線と比較して定量精度が向上した。

ピリチオン銅がシリカ系充填剤のカラムにおいて分布曲線のリーディングを示したのは、ピリチオンとシリカ中に含まれる微量金属成分との配位結合が主原因であったと考える。このため、金属成分が含まれないポリマー系充填剤を用いることでピリチオン銅はガウス型分布曲線に近似した最適な分離が行われた。ピリチオン亜鉛においてもピリチオン銅と同じ傾向であった。

微量金属成分との配位結合形成が分離に影響するピリチオン銅およびピリチオン亜鉛の分析では、ポリマー系充填剤を用いることにより定性定量の精度が高い最適な分離が行われる事がわかった。

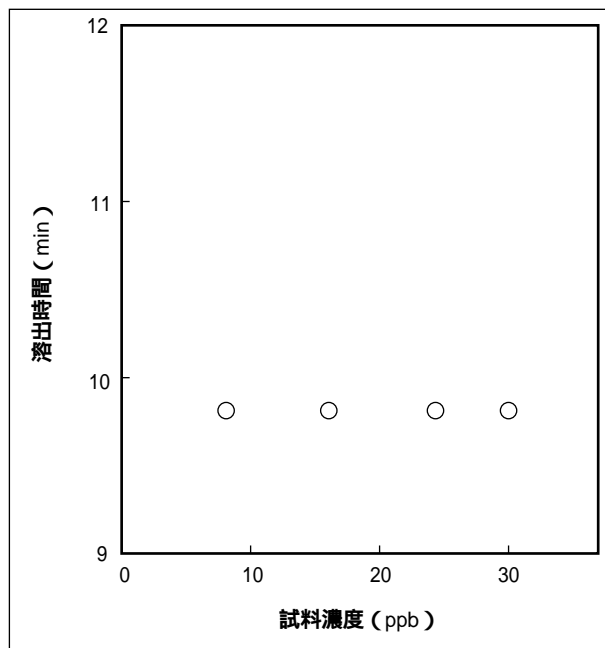


図6 試料濃度に対する溶出時間の変化
(ポリマー系充填剤カラムを使用)

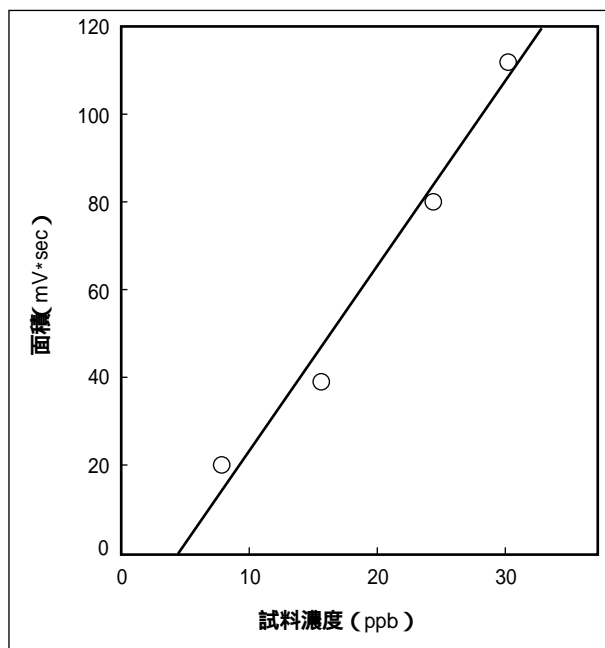


図7 検量線 (ポリマー系充填剤カラムを使用)

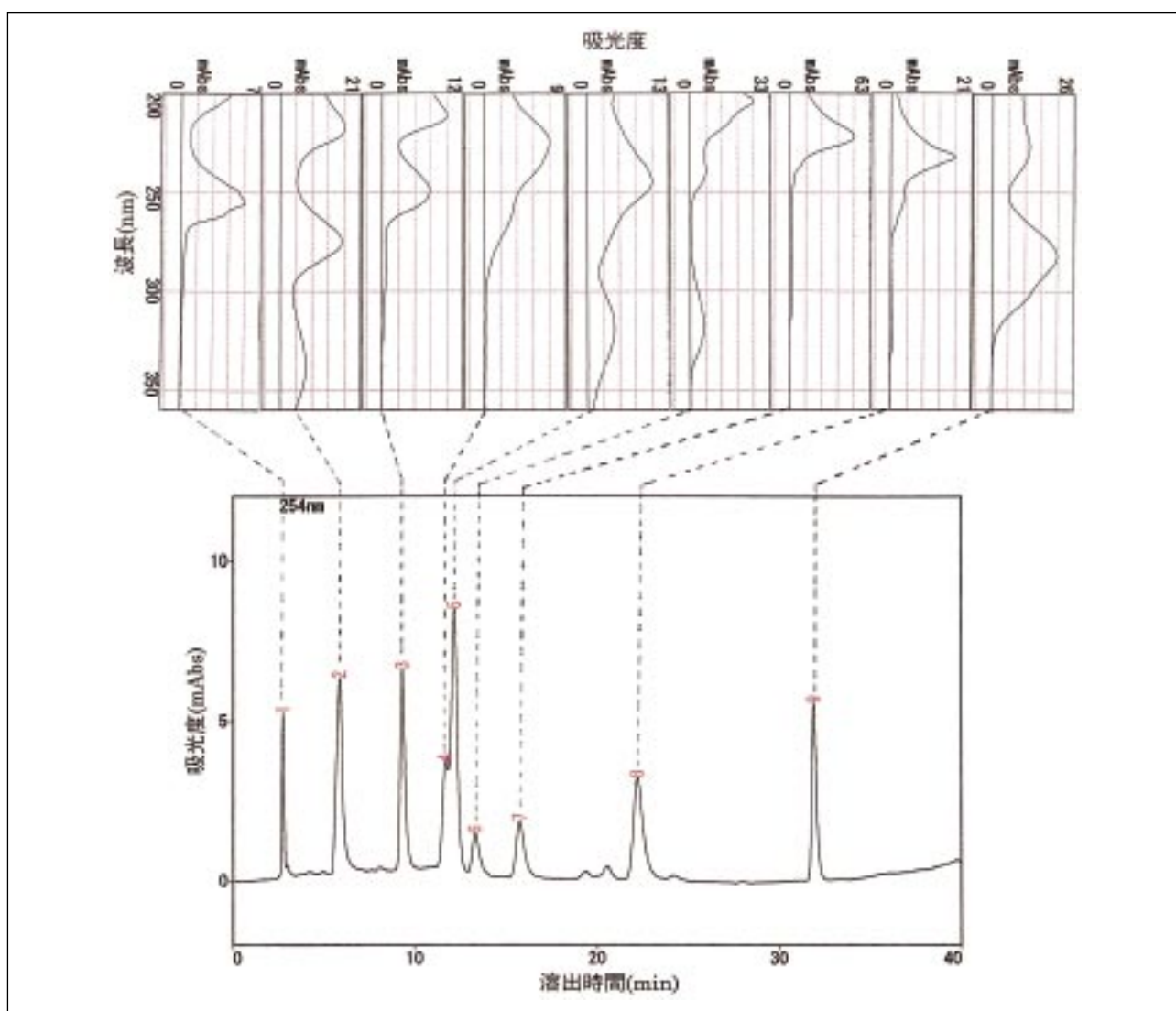
3.3.9 種類有機防汚剤の同時測定

図1の9種類の有機防汚剤のHPLCによる同時測定を試みた。既に述べた様に、シリカ系充填剤の固定相を用いるとピリチオン銅およびピリチオン亜鉛はピリチオンと金属成分との配位結合の影響によりガウス型分布曲線からはずれるが、ポリマー系充填剤の固定相を用いると定性定量の精度が高いガウス型分布曲線に近似することがわかったので、固定相にオクタデシル基結合型ポリマー系充填剤を用いて9種類の有機防汚剤の同時測定を検討した。

その結果、移動相にA組成液;50mMリン酸二水素カリウム水溶液 / アセトニトリル(80 / 20)+0.04%リン酸、B組成液;アセトニトリル+0.2%トリフルオロ酢酸(T F A)を用い、0min(100%A組成液) 15min(100%A組成液) 35min(30%B組成液)のグラジエントにより9種類の有機防汚剤の同時測定が行なえる事がわかった。

図8に9種類の有機防汚剤の紫外吸収波長254nmで測定したクロマトグラムとフォトダイオードアレイ検出器による各ピークの200nmから360nmのUVスペクトルを示した。各有機防汚剤は特有のUV吸収を持つことから、溶出時間とともにUVスペクトルも定性指標となった。x軸方向に溶出時間、y軸方向に測定した波長、z軸方向に吸光度を示した三次

元クロマトグラムを図9に、溶出時間と測定波長に対する吸光度の等高線表示を行った等高線クロマトグラムを図10に示した。図8に示した紫外吸収波長254nmで測定したクロマトグラムと比較して図9の三次元クロマトグラムは溶出種類の全体像が把握できる。図10に示した等高線クロマトグラムから9種類の有機防汚剤の最大吸光度の波長が確認され、9種類の有機防汚剤に対し個別に最大吸光度の検出波長を選択することで高感度な分析が行える。また、溶出時間が6分付近のピリチオン亜鉛や溶出時間が32分付近のジクロロオクチルイソチアゾリンは他の有機防汚剤にほとんど認められない吸収帯が280nmにあった。ピリチオン亜鉛やジクロロオクチルイソチアゾリンは280nmで検出することにより



測定条件 カラム : TSKgel Octadecyl 2PW(7.2mm × 15cm)
 移動相 : A液 50mM KH₂PO₄/CH₃CN(80/20)+0.04%リン酸
 B液 CH₃CN + 0.2%TFA
 グラジエント : 0 min (100%A液) 15 min (100%A液) 35 min (30%B液)
 試料 : 1.ピリジントリフェニルボラン(2ppm) 5.ピリチオン銀(1ppm)
 2.ピリチオン亜鉛(1ppm) 6.テトラクロロメチルスルホニルピリジン(6ppm)
 3.ジクロロフェニルジメチル尿素(1ppm) 7.フルオロジクロロメチルチオフタルイミド(6ppm)
 4.メチルチオブチルアミノシクロプロピルアミノトリアジン (1ppm) 8.テトラクロロイソフタロニトリル(2ppm)
 9.ジクロロオクチルイソチアゾリン(1ppm)

図 8 9 種類有機防汚剤の同時測定

選択的に高感度で測定することができる。溶出時間が5分付近、20分付近、24分付近の200nmから220nmに等高線表示が認められ、有機防汚剤に由来すると思われる不純物と考えられる。

このようにフォトダイオードアレイ検出器による三次元クロマトグラムや等高線クロマトグラムによって9種類の有機防汚剤の全体像が把握され、UVスペクトルのピーク位置の違いを読み取ることにより、9種類の有機防汚剤の定量分析に適した分離性の良い検出波長の決定や、目的成分のみ高感度に測定する選択的分析に適した検出波長が決定できる。また、未知成分や不純物成分の解析が可能であり、多種類の有機防汚剤の同時分析には最適であった。

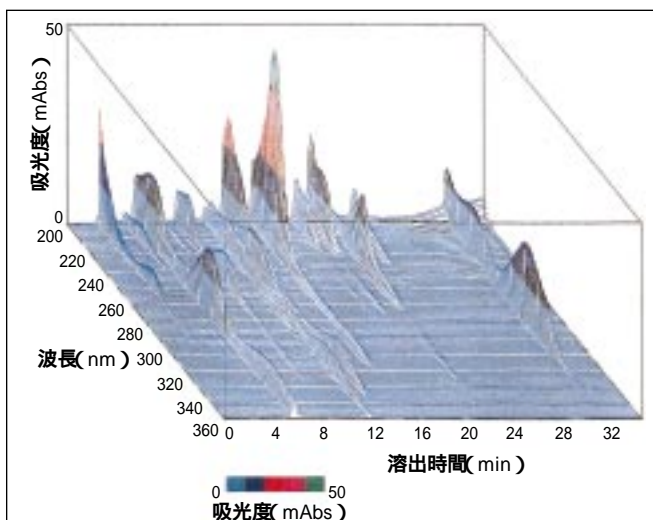


図9 9種類有機防汚剤の三次元クロマトグラム

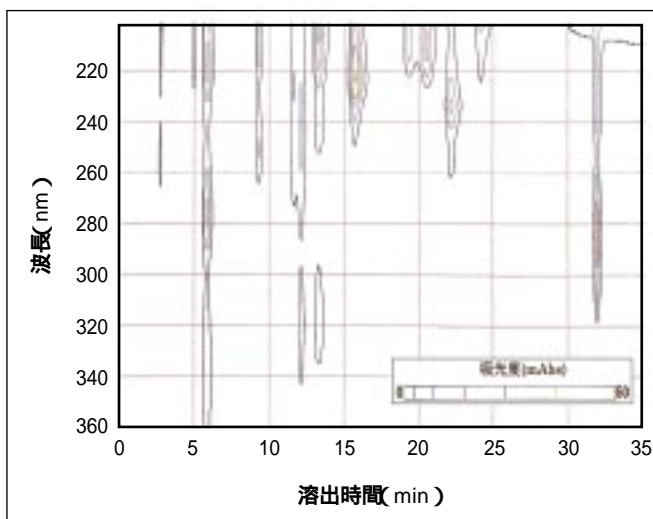


図10 9種類有機防汚剤の等高線クロマトグラム

3.4 塗膜から溶出する有機防汚剤の定量

表1に示した配合の塗膜片から溶出した有機防汚剤の測定を行った。塗膜片Aには5種類の有機防汚剤を各1Wt%添加し、塗膜片Bには5種類の有機防汚剤を各2Wt%添加した。塗膜片AおよびBは塗膜のエージングのため海域に20日間浸漬を行なった。その後、塗膜片AおよびBは実験室で海水1Lに遮光下で3時間浸漬した(図11)。この浸漬海水を塗膜片AおよびBの有機防汚剤の溶出量測定試料とした。

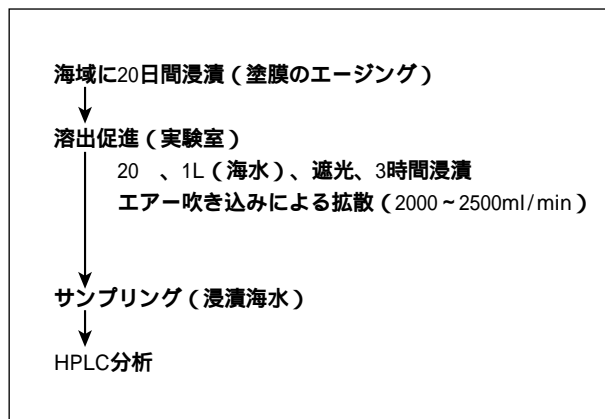


図11 有機防汚剤の塗膜中からの溶出操作法

塗膜片を浸漬していない海水に有機防汚剤と同一の溶出時間出現するピークが認められた。これらのピークは極微量ではあるがブランク値として定量値を補正した。各塗膜片からは有機防汚剤が数ppbから数十ppbの範囲で溶出が確認された(表2)。

ピリチオン銅およびジクロロオクチルイソチアゾリンは塗膜中の含有量が多い塗膜片Bで塗膜からの溶出量が多かった。一方、ジクロロフェニルジメチル尿素は、塗膜中の含有量の多少によらず塗膜からの溶出量はほぼ同じであった。また、フルオロジクロロメチルチオフタルイミドは塗膜中の含有量が多い塗膜片Bにおいては塗膜からの溶出が検出されたが、塗膜中の含有量が少ない塗膜片Aからは検出できなかった。

フルオロジクロロメチルチオフタルイミドは塗膜片Aからの溶出量が検出下限以下であったと考える。しかし、フルオロジクロロメチルチオフタルイミドは海水に溶解後、時間の経過とともにクロマトグラムが変化した。図12にフルオロジクロロメ

表1 塗膜試料中の有機防汚剤含有量 Wt%

	ピリチオン亜鉛	ピリチオン銅	ジクロロオクチルイソチアゾリン	ジクロロフェニルジメチル尿素	フルオロジクロロメチルチオフタルイミド
塗膜A	1	1	1	1	1
塗膜B	2	2	2	2	2

表 2 塗膜片からの溶出有機防汚剤量 (ppb)

	ピリチオン亜鉛	ピリチオン銅	ジクロロオクチル イソシアゾリン	ジクロロフェニル ジメチル尿素	フルオロジクロロ メチルチオフタルイミド
塗膜A	N.D.	8	5	15	N.D.
塗膜B	N.D.	17	8	13	5

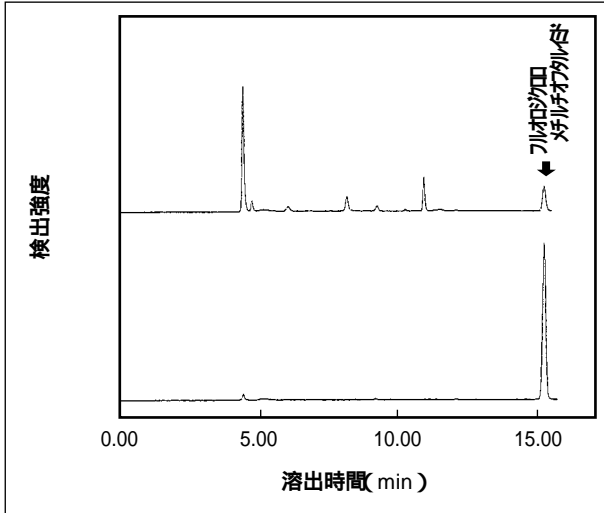


図12 フルオロジクロロメチルチオフタルイミドの溶出挙動

検出波長：230nm
有機防汚剤の溶解直後の試料
溶解後、遮光下18時間静置後の試料

有機防汚剤は特定な環境下において分解する場合が存在し、塗膜からの溶出試験方法の更なる検討が必要である。

HPLCの分析法において、従来からの固定単波長のUV検出器の場合は、ピークの同定が一定の変動係数を有する溶出時間に限られてしまい情報不足であったが、フォトダイオードアレイ検出器を用いることにより、特有のスペクトル波形が得られ同定に確かな情報が与えられるようになった。

チルチオフタルイミドの溶解直後の試料(1)と遮光下で18時間静置後(2)の試料のクロマトグラムを示した。溶解直後(1)では溶出時間が15分付近にフルオロジクロロメチルチオフタルイミドのピークが現れるが、18時間静置後の試料(2)では、15分付近のピークが減少するとともに4分から12分の溶出時間帯に6種類のピークが出現した。この4分から12分の溶出時間帯に出現したピークはフルオロジクロロメチルチオフタルイミドの分解組成物であったと考える。有機防汚剤は遮光下においても分解する可能性があることが確認された。

ピリチオン亜鉛は塗膜片Aおよび塗膜中の含有量が多い塗膜片Bにおいても、本測定条件で塗膜からの溶出が検出できなかった。

4. 結 論

本法により各種有機防汚剤の溶出量を、元素量ではなく成分量として、直接分離定量することが可能になり、防汚性能や持続性の評価に有効な分析法が確立できた。特に、船底塗料において代表的な9種類の有機防汚剤を35分の測定時間により同時分析することが可能となった。しかし、