



Simultaneous Determination of Pyridine-Triphenylborane Anti-Fouling Agent and Its Degradation Products Using Capillary Zone Electrophoresis

KAEWCHUAY, NETNAPIT

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Date of Publication)

2013-09-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5803

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005803>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



平成25年2月6日

学位審査報告書

論文題目（外国語の場合は、その和訳を併記すること。）

Simultaneous Determination of Pyridine-Triphenylborane Anti-Fouling Agent and Its Degradation Products Using Capillary Zone Electrophoresis
 (キャピラリーゾーン電気泳動法によるピリジントリフェニルボラン防汚剤及び分解生成物の同時定量)

論文提出者 海事科学専攻、氏名 Netnapit Kaewchuay

論文審査の結果の要旨

別紙1のとおり

最終試験の結果の要旨

別紙2のとおり

学位授与の可否及び学位に付記する専攻分野の名称

博士（学術）

審査委員

区 分	職 名	氏 名
主 査	教授	福士恵一
副 査	教授	佐藤正昭
副 査	教授	岡村秀雄
副 査	教授	中野 武
副 査		印

氏名	Netnapit Kaewchuay		
論文題目	Simultaneous Determination of Pyridine-Triphenylborane Anti-Fouling Agent and Its Degradation Products Using Capillary Zone Electrophoresis (キャピラリーゾーン電気泳動法によるピリジントリフェニルボラン防汚剤及び分解生成物の同時定量)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	福士恵一
	副 査	教授	佐藤正昭
	副 査	教授	岡村秀雄
	副 査	教授	中野 武
	副 査		印
要 旨			
<p>本論文は、船底防汚剤として使用されているピリジントリフェニルボラン (PTPB) 及びその分解生成物であるジフェニルボリン酸 (DPB)、フェニルボロン酸 (MPB)、フェノールのキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) による高感度同時定量法を確立し、実試料に適用した結果をまとめたものである。本論文は、緒言、4つの章、結論から構成されている。</p> <p>緒言では、本研究の背景と目的について述べている。すなわち、船底防汚剤の役割及び使用頻度の高い防汚剤について、構造式を示しながら紹介している。また、本研究における分析対象である PTPB の分解過程、分解生成物、生物毒性等、現在までに明らかにされた結果について文献を引用しながら説明している。さらに、PTPB 及びその分解生成物 (今後、PTPB 等と呼ぶ) の従来の定量法及びそれらの問題点について述べている。次いで、CZE 装置の構成、原理、電気泳動移動度、電気浸透流、試料導入法、検出法について詳述している。</p> <p>第1章では、造船所で採取した塗料片中の PTPB 等を固相抽出後、電場増幅試料導入法 (field amplified sample injection, FASI) により試料を導入し、CZE により定量した結果をまとめている。まず、泳動液としてホウ酸ナトリウム水溶液 (pH 9.8) を用い、FASI における最適条件について検討した。その結果、FASI における最適条件は、水プラグ注入時間: 2 s、試料注入電圧: 5 kV、試料注入時間: 6 s であった。FASI により、PTPB、DPB の検出限界 (LOD) を真空吸引法の LOD と比較し、約 30 倍低下できた。なお、LOD 及び再現性の向上を期待し、試料吸引側のキャピラリー先端と電極先端との距離を長くしたが、あまり改善は見られなかった。次いで、大阪湾沿岸 2 箇所の造船所において採取した塗料片より分析目的成分を固相抽出し、FASI-CZE を用い、標準添加法により定量した。その結果、PTPB は 0.045-0.63、DPB は 0.015-0.36、MPB は 1.7-22、フェノールは 1.2-16 µg/g (乾燥重量) 検出された。これらの結果は、検量線を用いた定量結果とほぼ一致した。したがって、本法は塗料片分析法として簡単で有用な方法であるが、特に MPB とフェノールの LOD を改善することが望まれると結論づけている。</p> <p>第2章では、PTB 等の濃度感度を向上するために、CZE における試料導入法として、真空吸引と電気的導入を同時に用いる導入法 (ハイブリッド試料導入法, hSIM) を提案した。分析条件を検討したところ、hSIM における最適条件は、水プラグ注入時間: 1 s、試料注入電圧: 4 kV、試料注入時間: 4 s であった。本法により PTPB 等の LOD を求めたところ、MPB の LOD を FASI の場合の約 1/2 にできたが、他の成分の LOD は FASI の場合とほぼ同様であった。今回の分析目的成分に対しては、期待したような感度向上は得られなかったが、電気泳動移動度の異なる分析目的成分の試料導入法としては十分利用できる結果とまとめている。</p> <p>第3章では、海水中の PTPB 等を直接定量するために、泳動液濃度 (20, 40, 50, 60 mM)、人工海水試料中アセトニトリル濃度 (10, 20, 30% v/v)、試料吸引時間 (2-6 s) の影響について検討した。その結果、最適条件は、泳動液濃度 60 mM、アセトニトリル濃度 20% v/v、試料吸引時間 4 s であった。本法による LOD は、65 µg/l (PTPB)、78 µg/l (DPB)、126 µg/l (MPB)、30 µg/l (フェノール) であった。以前確立された方法により、アセトニトリルのみで調製した試料を分析した場合と比較し、PTPB、DPB、MPB の LOD はほぼ 2 倍であったが、フェノールの LOD はほぼ同様であった。次いで、1.0 mg/l の PTPB を含む人工海水試料を調製し、ねじロ試験管に約 7 ml 入れ、屋外 (平均気温 34°C)、室温 (25°C、天井灯有り)、室温 (25°C) の暗所に設置し、光分解実験を行った。設置時間の経過に伴い、試験管を 1 本ずつとり、これら試料中の PTPB 等を本法により定量した。屋外では、PTPB は 15 日後に完全に分解された。PTPB の分解に伴い、フェノールは徐々に増加した。また、MPB は 7 日後に検出され、徐々に減少し、20 日後に消失した。アセトニトリルに溶解した試料の場合には、分解過程で DPB が検出されたが、人工海水試料の場合には検出されなかった。また、室温 (25°C、天井灯有り) の場合には、PTPB は 30 日後に約 40% 分解し、それに伴ってフェノールが徐々に増加した。しかし、MPB 及び DPB は検出されなかった。室温 (25°C) の暗所の場合には、室温 (25°C、天井灯有り) の場合とほぼ同様の結果であったが、PTPB は 30 日後に約 30% 分解した。</p> <p>最後に、結論を述べている。</p> <p>提出された論文について、4名の審査委員により慎重に審査を行った。本論文では幾つかの興味深い結果を得ているが、まだ解明されていない点も残されており、さらに研究を進める必要がある。しかし、本論文は、現在までに報告のない PTPB 及び分解生成物の高感度・高精度同時定量法を確立したものであり、海洋環境におけるこれら化合物の運命とそれらの海洋生物に対する影響を評価する上で、おおいに貢献できるものと考えられる。したがって、審査委員会として本論文は学位論文として認められると判断した。</p> <p>本研究に関する公表論文は下記の2編である。</p> <p>1) N. Kaewchuay, Y. Yakushiji, K. Fukushi, K. Saito, T. Hirokawa, "A novel hybrid mode of sample injection to enhance CZE sensitivity for simultaneous determination of a pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its degradation products", <i>Electrophoresis</i> 2011, 32, 1486-1491.</p> <p>2) N. Kaewchuay, K. Fukushi, A. Tsuboi, H. Okamura, K. Saito, T. Hirokawa, "Simultaneous determination of pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its degradation products in paint-waste samples using capillary zone electrophoresis", <i>Anal. Sci.</i> 2012, 28, 1191-1196.</p>			

((別紙様式 3))

論文内容の要旨

氏 名 Netnapit Kaewchuay

専 攻 Maritime Logistics Sciences

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Simultaneous Determination of Pyridine-Triphenylborane Anti-Fouling Agent and Its

Degradation Products Using Capillary Zone Electrophoresis

(キャピラリーゾーン電気泳動法によるピリジントリフェニルボラン防汚剤

及び分解生成物の同時定量)

指導教員 Prof. Keiichi FUKUSHI

(注) 論文内容の要旨の表紙

In general introduction, the purpose of the present study was described as well as the purpose of anti-fouling agent and the principle of capillary zone electrophoresis (CZE) used in this study throughout. An anti-fouling agent is usually applied to ship hulls to prevent worsening of fuel consumption rates resulting from the buildup of marine organisms, such as barnacles and bivalves, which with time become attached to the surfaces of ship hulls. A commercial organoborane compound, pyridine-triphenylborane (PTPB), is often applied to ship hulls as an anti-fouling agent in some Asian countries because of its proven effectiveness. In order to elucidate its degradation products and their toxicities to marine organisms, development an analytical method for these compounds is important. CZE is now a mature technique for separation-based analysis that implies several advantages, such as high separation efficiency, minimum requirements for sample and reagents, and (much) more rapid analysis, over other separation techniques. A UV-vis absorbance detector is generally used in CZE. However, the concentration sensitivity of CZE-UV is fairly poor because a small inner diameter of the capillary limits the optical path length for detection. Therefore, the purpose of this study is to develop a CZE procedure to enhance the sensitivity for simultaneous determination of PTPB and its degradation products: diphenylborinic acid (DPB), phenylboronic acid (MPB), and phenol.

In Chapter 1, field amplified sample injection (FASI) was developed to enhance the sensitivity for the analytes and applied to the analysis of paint-waste samples. FASI is a popular and simple in-line sample concentration technique. The analytical conditions, such as time of water plug injection, time, and voltage of sample introduction were examined and optimized. Under the optimized conditions (injection

time of the water plug, 2 s; sample injection, 5 kV for 6 s), the peak heights for PTPB and DPB using the FASI were, respectively, 16 and 58 times higher than those obtained using electrokinetic injection (EKI, 5 kV for 6 s). No peaks for MPB and phenol were observed using EKI. The results show that in-line sample concentration was performed for PTPB, DPB, MPB, and phenol using the FASI. The relative standard deviations (RSDs, $n = 4$) for the analytes listed above were in the respective ranges of 6.2 – 14, 5.9 – 10, and 0.49 – 0.62% for the peak area, peak height, and migration time. The limit of detections (LODs, at a S/N of 3) for PTPB, DPB, MPB, and phenol were, respectively, 0.85, 0.88, 44, and $28 \mu\text{g L}^{-1}$. The LODs of PTPB and DPB were *ca.* 30 times lower than those for the vacuum injection procedure, but the LODs of MPB and phenol were similar to those for the vacuum injection. The FASI-CZE procedure was applied to the determination of above analytes in paint wastes obtained from shipyards. The concentrations of PTPB, DPB, MPB, and phenol in the paint-waste samples were 0.076 – 0.53, 0.015 – 0.36, 1.7 – 22, and 1.2 – 13 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

In Chapter 2, a novel hybrid sample injection mode (HSIM) that presents the combination of EKI and vacuum injection was developed to enhance detection sensitivity in CZE. Samples were introduced using both vacuum and electrokinetic injections simultaneously, with a water plug injected into the capillary prior to sample introduction. Using a sample mixture of PTPB, DPB, MPB, and phenol dissolved in acetonitrile (ACN), time of water plug injection, time, and voltage of sample introduction were examined and optimized. Under the optimized conditions (injection time of the water plug, 1 s; sample injection, 4 kV for 4 s), signal intensity (peak height)

was increased up to 30-fold in comparison with only vacuum injection for 4 s. The RSDs ($n = 4$, intra-day) for the above analytes were in the ranges of 1.9–11%, 4.3–9.2%, and 0.34–0.66% for peak area, peak height, and migration time, respectively. The LODs (at a S/N of 3) for PTPB, DPB, MPB, and phenol were, 0.88, 1.0, 21, and 23 $\mu\text{g/L}$, respectively. Using HSIM the LOD for MPB was *ca.* 2 times lower than the LOD for the FASI procedure, while the LODs for PTPB, DPB, and phenol were similar to those for the FASI procedure. The HSIM could be a simple and promising procedure to be useful for enhancing the sensitivity for both low- and high-mobility ions in CZE.

In Chapter 3, a CZE method for simultaneous determination of PTPB, DPB, MPB, and phenol in artificial seawater (ASW) was developed. ASW samples, in which 20% (v/v) ACN was added, were injected directly into the capillary using vacuum injection for 4 s. As the background electrolyte (BGE), 60 mM sodium tetraborate adjusted to pH 9.8 was used. The LODs (at a S/N of 3) for PTPB, DPB, MPB, and phenol were, respectively, 55, 78, 126, and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. The RSDs ($n = 4$) for the analytes listed above were in the respective ranges of 2.7–5.7, 0.68–6.1, and 0.69–1.1% for peak area, peak height, and migration time. Simple photodegradation experiments were conducted to verify the usefulness of the proposed method to elucidate the degradation behavior of PTPB in ASW. PTPB samples dissolved in ASW were put in three different conditions: the open air with exposure to natural sunlight, a room at 25°C (ceiling lights were turned on at daytime and turned off at night), and a dark place at 25°C to examine the effects of the light. The sample solutions were analyzed by the CZE method with the elapse of time. As a result, it was suggested that the degradation of PTPB in ASW was significantly affected by the light intensity. The degradation behaviors in the ASW

samples were compared with former results obtained using PTPB samples prepared in ACN. The degradation behaviors in ASW in the open air were different from those in ACN: DPB was observed in the ACN samples during experiments but was not in the ASW samples; MPB was observed after one day until 51 days in the ACN samples but it was only observed after seven days and then disappeared after 20 days in the ASW samples. PTPB in ASW was degraded more rapidly than in ACN because of hydrolysis. The proposed CZE method is a simple procedure for the simultaneous determination of PTPB, DPB, MPB, and phenol in ASW and useful to elucidate the degradation process of PTPB and its degradation products in ASW. To the best of our knowledge, the present study might be the first attempt to determine PTPB, DPB, MPB, and phenol in ASW simultaneously without any sample extraction procedure.

In conclusion, these studies demonstrate that the proposed FASI, HSIM, and the CZE method without extraction procedure are simple and promising procedures to be useful for simultaneous determination of PTPB, DPB, MPB, and phenol. However, further works are still required to improve the sensitivity to analyze real environmental samples such as seawater. It is also necessary to investigate the effects of different kinds of constituents including organic substances dissolved in seawater.

(氏名 : Netnapit Kaewchuay NO. 1)

緒言では、船底防汚剤の目的、本研究で用いたキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) の原理とともに、本研究の目的を述べている。すなわち、時間の経過とともにフジツボ、二枚貝等の海洋生物が船体表面に付着し、燃料消費率が悪化することを防ぐために、船体には船底防汚剤を含む塗料が使用されている。市販の有機ホウ素系防汚剤であるピリジノトリフェニルボラン (PTPB) は、生物付着防止効果が高いため、アジア諸国では船底防汚剤としてしばしば用いられている。PTPB の分解生成物及びそれらの海洋生物に対する毒性を明らかにするためには、これら成分の分析法を開発することが重要である。CZE は、今や、分離に基づいた分析法として成熟した技術であり、他の分離技術と比較して高い分離効率を有し、試料及び試薬の必要量が少ない等、多くの利点を持つ。しかし、CZE において一般的に用いられる紫外-可視吸光検出器は、キャピラリー内径が光路長となるため濃度感度が低い。本研究の目的は、PTPB 及びその分解生成物であるジフェニルボリン酸 (DPB)、フェニルボロン酸 (MPB)、フェノールの CZE による高感度同時定量法を開発することである。

1 章では、分析目的成分の高感度化のために、電場増幅試料導入法 (FASI) を開発し、塗料片の分析に適用した。FASI は、一般的に用いられているインライン試料濃縮法である。水プラグ導入時間、試料導入時間及び電圧等の分析条件を検討し、最適分析条件を求めた。最適分析条件 (水プラグ導入時間 2 秒、試料導入時間 6 秒、電圧 5 kV) を用いた場合、PTPB 及び DPB のピーク高さは、電気的導入法 (EKI、試料導入時間 6 秒、電圧 5 kV) を用いた場合の 16 及び 58 倍であった。なお、MPB、フェノールは検出されなかった。これらの結果は、FASI により PTPB、DPB、MPB、フェノールのインライン試料濃縮法が達成されたことを示している。上記分析目的成分の相対標準偏差 (RSD, $n=4$) は、6.2–14% (ピーク面積)、5.9–10% (ピーク高さ)、0.49–0.62% (泳動時間) であった。PTPB、DPB、

(氏名 : Netnapit Kaewchuay NO. 2)

MPB、フェノールの検出限界 (LOD, $S/N=3$) は、0.85, 0.88, 44, 28 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。PTPB 及び DPB の LOD は、真空吸引法の場合の LOD と比較し約 30 倍低かったが、MPB 及びフェノールの LOD は真空吸引法の場合とほぼ同様であった。造船所で採取した塗料片中の上記成分を FASI-CZE 法により分析した。その結果、0.076–0.53, 0.076–0.53, 0.076–0.53, 0.076–0.53 $\mu\text{g g}^{-1}$ の PTPB, DPB, MPB, フェノールが検出された。

2 章では、CZE の検出感度を増大するために、EKI と真空吸引法を組み合わせた新規な複合試料導入法を開発した。試料導入前に水プラグを導入し、試料は真空吸引法と電気的導入法を同時に用いて導入した。アセトニトリルを用いて調製した PTPB, DPB, MPB, フェノール混合標準溶液を用い、水プラグ導入時間、試料導入時間及び電圧について検討し、最適分析条件を求めた。最適分析条件 (水プラグ導入時間 1 秒、試料導入時間 4 秒、電圧 4 kV) を用いた場合、分析目的成分の信号強度 (ピーク高さ) を、真空吸引法と比較して 30 倍まで増大できた。上記分析目的成分の RSD は、1.9–11% (ピーク面積)、4.3–9.2% (ピーク高さ)、0.34–0.66% (泳動時間) であった。PTPB, DPB, MPB, フェノールの LOD ($S/N=3$) は、0.88, 1.0, 21, 23 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。HSIM を用いた場合、FASI と比較すると、MPB の LOD は約 1/2 であったが、PTPB, DPB, フェノールの LOD はほぼ同様であった。HSIM 法は CZE において、高い電気泳動移動度を持つ成分及び低い電気泳動移動度を持つ成分両方の感度を改善する有望な方法であると思われる。

3 章では、人工海水 (ASW) 中の PTPB, DPB, MPB, フェノール同時定量法を開発した。20% (v/v) ACN を添加した人工海水試料を調製し、真空吸引法により直接キャピラリーに導入した。泳動液 (BGE) として、pH 9.8 に調整した 60 mM ホウ酸ナトリウム溶液を使用した。PTPB, DPB, MPB, フェノールの LOD ($S/N=3$) は、55, 78, 126, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。上記分析目的成分の RSD は、2.7–5.7% (ピーク面積)、0.68–6.1%

(氏名 : Netnapit Kaewchuay NO. 3)

(ピーク高さ), 0.69–1.1% (泳動時間) であった。人工海水中における PTPB の分解挙動を調べる際の本法の有用性を確かめるために、簡単な光分解実験を行った。光の影響を調べるために、PTPB を添加した人工海水試料を 3 種類の異なる条件下においた：自然の太陽光を受ける屋外、屋内 (25°C, 昼間は天井灯を点灯、夜間は消灯)、暗室 (25°C)。経時的に試料を採取し、本法により分析した。その結果、ASW 中の PTPB の分解において光強度の影響が大きいことが示唆された。ASW 中における PTPB の分解挙動と以前の実験で得られた ACN 中における PTPB の分解挙動を比較した。その結果、屋外においては異なる挙動が観察された：実験期間中、DPB は、ACN 試料では実験期間中検出されたが、ASW 試料では検出されなかった；MPB は、ACN 試料では 1 日経過後から 51 日後まで検出されたが、ASW 試料では 7 日後に検出され、20 日後からは検出されなかった。また、PTPB は加水分解の影響により、人工海水中では ACN 中よりも分解速度が速かった。本法は、ASW 中における PTPB、DPB、MPB、フェノールの同時定量法として簡単であり、ASW 中における PTPB の分解過程及び分解生成物を明らかにするために有用である。我々の知る限り、本研究は、いかなる抽出操作も用いないで、ASW 中の PTPB、DPB、MPB、フェノールを同時定量する初めての試みである。

結論として、これらの研究は、FASI、HSIM、抽出操作を要しない CZE が PTPB、DPB、MPB、フェノールの簡単な同時定量法であることを実証した。しかしながら、海水等の実際の環境水を分析するためには、さらに検出感度を高めるための研究が必要である。また、海水中の溶存有機物等の種々の共存成分の影響についても調べるのが大切である。