

## 4 電極-電気化学検出器を用いた HPLC によるフェノール類の分析

High Performance Liquid Chromatography of Phenols with a Four-Electrode Electrochemical Detector

篠塚 則子\*・栗林 美枝\*\*・松島 美一\*\*・高井 信治\*\*\*

Noriko SHINOZUKA, Mie KURIBAYASHI, Yoshikazu MATSUSHIMA and Nobuharu TAKAI

## 1. 緒 言

フェノールとその誘導体は工業的に広く使用されているが、環境中に排出されると水の悪臭や不味さの原因となるばかりか、その毒性による健康障害が懸念されている。現在日本では水道法により総フェノール量のみが規制されているが、アメリカでは環境保護局 (EPA) により11種のフェノールとその誘導体が規制の対象とされている。環境中のフェノール類の分析法のうち主要な方法は溶媒抽出-ガスクロマトグラフィー (GC)<sup>1)</sup>であるが、抽出効率や分離能の点で十分ではなく、トレース量に対してはGC-質量分析 (MS) 法<sup>2)</sup>を用いる必要があった。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析は、検出器にUV吸収<sup>3)</sup>や電気化学反応<sup>4), 5)</sup>を用いて行われているが、分離能や感度に問題がある。

HPLC と電気化学検出器 (ECD) とを組み合わせて電気化学的に活性な物質を分離検出する手法はすでにカテコールアミン類の分析をはじめ、各分野に応用されている。しかし、複雑なサンプルを分析しようとする場合、カラムでの分離が不十分で、各物質のピークが重なり識別できないこともあった。そこで分離をカラムだけに頼らず、検出器においても選択性を持たせ、分離能を高めるために、複数の電極を用いるマルチ ECD が開発され、神経伝達物質などの分析に応用された<sup>6), 7)</sup>。

本報では GC では同定され難いと報告<sup>1)</sup>のあるフェノール誘導体及び EPA の規制の対象となるフェノール誘導体のマルチ ECD-HPLC を用いた分析方法を検討した。マルチ ECD には4つの電極を直列に並べた4極式クーロメトリーを用いた。

\*東京大学生産技術研究所 第4部

\*\*共立薬科大学

\*\*\*東京医科大学(元東京大学生産技術研究所 第4部 助教授)

## 2. 実 験

## 2.1 装置

HPLC 装置は、送液ポンプ：日立655A-12, 検出器：4電極式 ECD クーロメトリーにおいては、作用電極：ポラスグラッシーカーボン, 参照電極：Ag/AgCl, 補助電極：ステンレススチール, パーソナルコンピューター PC-9801 で構成し、分離カラムは Neopack HPLC 120-5C18, 120-5Ph (4.6x150mm) (西尾工業製) を使用した。ボルタングラム測定には1極式 ECD アンペロメトリー 作用電極：グラッシーカーボン GC-20, 参照電極：Ag/AgCl, 補助電極：ステンレススチールを用いた。

## 2.2 試薬

標準試薬はそれぞれの試薬をメタノールを用いて 1 mg/ml になるように溶解し、適当な濃度に希釈して調製した。試薬はすべて試薬特級品を用い、2-クロロフェノール (2-C), 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DC), 4,6-ジニトロ-2-メチルフェノール (4,6-DN-2-M), 4-ニトロフェノール (4-N), 2,4,6-トリクロロフェノール (2,4,6-TC) は関東化学 (株) 製, 2-メチルフェノール (2-M), 2,4-ジメチルフェノール (2,4-DM), 2-ニトロフェノール (2-N) は東京化成工業 (株) 製, 4-クロロ-3-メチルフェノール (4-C-3-M), 2,5-ジクロロフェノール (2,5-DC), フェノール (PH) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。

## 2.3 移動相の調製

リン酸二水素カリウムは0.05Mと0.1Mに、リン酸ナトリウムは0.05Mにミリポア水を用いて調製した。それらをアスピレーターで脱気し、HPLC用メタノールを用いてメタノール水溶液とした後、超音波により脱気して用い

研究速報

た。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 HPLCの測定条件の検討

##### 3.1.1 溶離液中におけるリン酸濃度の検討

溶離液中のリン酸の濃度を0.05Mと0.1Mにして、バックグラウンド電流と反応電流への影響を比較した。その結果、リン酸濃度が0.1Mの時はバックグラウンド電流が10nAほど低下したが、各物質の反応電流は0.05Mの時と変わらなかった。しかし、バックグラウンド電流は不安定になり、ノイズが増加した。よって溶離液のリン酸濃度は0.05Mとした。

##### 3.1.2 電極反応におけるpHの影響

溶離液のpHを変えて各物質の反応電流の変化を調べた。溶離液中のリン酸二カリウム溶液の割合を増加させ、pHを5.5から7.5まで変化させた。pHが高いほど電極における酸化反応電流は増加し、酸化反応が起りやすくなることが明らかになった。

##### 3.1.3 電極反応における移動相流量の影響

移動相流量を毎分0.3ml, 0.5ml, 1.0mlと変化させ、電極反応への影響を調べた。流速を速くするほど反応電流は減少した。したがって、一般にクーロメトリーでは電解率がほぼ100%であるとされているが、流速が速いと電極での反応が完全には行われていない恐れがある、ということが明らかになった。しかし、その一方で流速を遅くするとピーク幅が広がり、各物質のピークが重なりあってしまう場合もあった。

##### 3.1.4 測定条件

3.1.1から3.1.3までの結果より溶離液はメタノール、0.05Mリン酸二水素カリウムおよび0.05Mリン酸二カリウムの組成比を4:5:1としたpH6.99に調製した溶液を用い、移動相流量を0.9ml/minに設定した。

#### 3.2 ECDの特性 (HDV)

ECDは電気化学的に活性な物質のみを選択的に検出する。フェノールとその誘導体はそれぞれ異なる酸化電位をもつことから、各電極の設定電位を調節することで、選択性をさらに高めることができる。そこで各物質の電極反応を調べるために電極電位を変化させて電流値を測定し、そして電位に対する反応電流をプロットしたHDV(Hydrodynamic Voltammogram)から限界電流を求めた。

検出器には1極式アンペロメトリーを用いた。Fig. 1にそのHDVを示す。

#### 3.3 マルチ電極による分析

検出器に4電極式ECDを用いて12成分の同時測定を行った。Fig. 1からわかるように、高電位にならないと酸化反応が起らない物質もあるため、設定電位を第一電極よりそれぞれ720mV, 750mV, 800mV, 850mVとした。Fig. 2に12種の標準物質を含む溶液の、Fig. 3にそれから2-Mを除いた溶液のクロマトグラムを示す。保持時間の近い2-Mと2-Nに注目すると、2-Mは低電位の第一、第二電極において完全に酸化され、第三、第四電極では反応

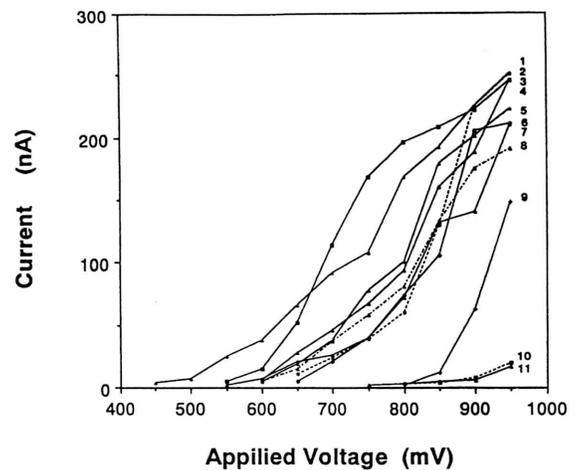


Fig. 1 Voltammograms for the oxidation of phenolic compounds

1: 2,4-dimethylphenol; 2: phenol; 3: 2,4-dichlorophenol; 4: 2,4,6-trichlorophenol; 5: 2-chlorophenol; 6: 2-methylphenol; 7: 2,5-dichlorophenol; 8: 4-chloro-2-methylphenol; 9: 2-nitrophenol; 10: 2,4-dinitrophenol; 11: 4,6-dinitro-2-methylphenol, Flow rate: 0.5ml/min; Potential: vs. Ag/AgCl

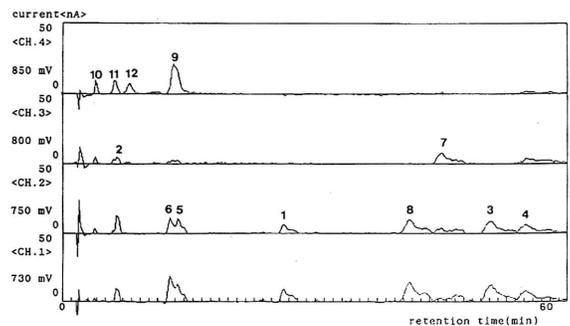


Fig. 2 Chromatograms of phenolic compounds Numbers 1~11 are the same as in Fig. 1; 12: 4-nitrophenol

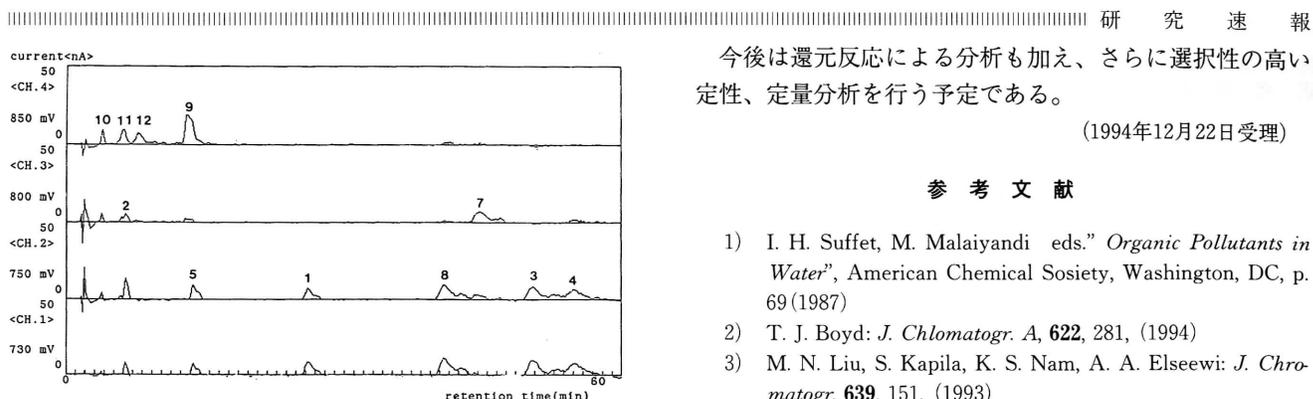


Fig. 3 Chromatograms of phenolic compounds except 2-methylphenol. Numbers 1~11 are the same as in Fig. 1; 12: 4-nitrophenol

を示しておらず、一方2-Nは高電位の第四電極でのみ測定され、両者は分離同定されていることがわかる。また他のHPLC検出器に比べ検出限界が $10^2 \sim 10^5$ 倍上がり、300pg~6ng程度の物質を検出することができ、GC-MSと同等もしくはそれ以上に高感度な分析が可能であることが明らかになった。

- 1) I. H. Suffet, M. Malaiyandi eds. "Organic Pollutants in Water", American Chemical Society, Washington, DC, p. 69 (1987)
- 2) T. J. Boyd: *J. Chromatogr. A*, **622**, 281, (1994)
- 3) M. N. Liu, S. Kapila, K. S. Nam, A. A. Elseewi: *J. Chromatogr.*, **639**, 151, (1993)
- 4) E. C. V. Butler, G. Dal Pont: *J. Chromatogr.*, **609**, 113, (1992)
- 5) J. Ruana, I. Urbe: *J. Chromatogr. A*, **655**, 217, (1993)
- 6) F. Mashige, N. Takai, N. Shinozuka, H. Wada, I. Sakuma, A. Ito, Y. Matsushima, A. Ohkubo: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **22**, 147, (1993)
- 7) F. Mashige, A. Ohkubo, Y. Matsushima, M. Takano, E. Tsuchiya, H. Kanazawa, Y. Nagata, N. Takai, N. Shinozuka, I. Sakuma: *J. Chromatogr. B*, **658**, 63 (1994)