

逆相クロマトグラフィー用ニトロフェニル基結合型シリカゲル充てん剤の保持特性の検討とダイオキシン異性体分離への適用

木全 一博*, 細 矢 憲, 田中 信男®**,
Elizabeth R. Barnart, Louis R. Alexander,
Donald G. Patterson, Jr. ***

(1993 年 6 月 21 日受理)

ニトロフェニル基結合型シリカゲル充てん剤上の, ニトロ基の結合位置及びスパーサー鎖長と保持特性との関係について検討を行った. 3-(*p*-ニトロフェニルオキシ)プロピル基結合型シリカゲル充てん剤が, 大きな双極子-双極子相互作用に基づいて, 双極子モーメントの大きな溶質に対して選択的保持を与えることを見いだした. この 3-(*p*-ニトロフェニルオキシ)プロピル型充てん剤をクロロダイオキシン標準化合物合成時に混合物として生成する異性体の分離に適用した結果, 22 組の異性体混合物のすべてを単独のカラムで分離することができた.

1 緒 言

近年, 構造の類似した化合物を分離するために, 積極的な固定相-溶質の分子間相互作用を可能とする逆相クロマトグラフィー充てん剤が開発され, C₁₈ 型充てん剤では分離が困難な構造類似化合物相互間の分離が可能となってきた¹⁾²⁾. ポリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (PCDD) 類は, 構造の極めて類似した 75 種の同族体をもつ有機塩素化合物で, 環境科学においてその毒性や催奇形性に強い関心をもたれている.

PCDD の標準化合物の合成においては, その過程における Smiles 転移により, 75 種中, 22 組 (44 種) の異性体対が混合物として得られる^{3)~5)}. 従って環境分析のために個々の異性体の標準品を調製し, 又生物学的効果を検討するためには, 各異性体を分離することが必要である. しかし, これらの異性体は構造が類似し, 分離や同定が極めて困難なものを含む⁶⁾⁷⁾. 一般にダイオ

キシン異性体は, キャピラリーガスクロマトグラフィーと質量分析との組み合わせで分離, 同定されている^{7)~9)}. 分離不可能な異性体混合物の構造解析は, NMR や FT-IR によってなされているが¹⁰⁾, 生成比率が 1:1 に近い場合には構造決定が困難となり, 実際過去において矛盾した構造決定がされた場合もある¹¹⁾.

HPLC によるダイオキシン異性体の分離については, いくつかの報告がある. Nestrick らは, C₁₈ を用いる逆相クロマトグラフィーと, シリカゲルを用いる順相クロマトグラフィーとを組み合わせ, テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) 異性体の分離を試み, 大部分を分離したが, 分離困難な異性体については, それぞれの異性体の構造と分離パターンとを対応させるには至らなかった¹²⁾. 逆相クロマトグラフィーにおいては, ニトロフェニルエチル型充てん剤 (NPE)¹³⁾ による TCDD 異性体混合物の分離が達成され, NPE と対照的な保持特性をもつピレニルエチル型充てん剤 (PYE)¹¹⁾とを併用することにより, すべてのダイオキシン異性体の分離と, その構造決定が報告されている¹³⁾¹⁴⁾. しかし, 標準ダイオキシン合成時に生成するすべての異性体混合物について, 単独で分離を可能とする充てん剤はまだ得られていない. 又 NPE 固定相には, *o*-ニトロフェニルエチル基と *p*-ニトロフェニルエチ

* ナカライテスク(株)研究所: 617 京都府向日市鶏冠井町石橋 17

** 京都工芸繊維大学繊維学部: 606 京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町

*** Centers for Disease Control, Environmental Health Laboratory Sciences: 4770 Buford Highway, NE Atlanta, GA 30341-3724, USA

ル基が、約 3 : 7 の割合で存在しているが¹³⁾、どちらの構造が基質分子の構造の識別に寄与しているのかは明らかではなかった。

本研究では、固定相の構造の最適化によるダイオキシン異性体に対する識別能力の向上について報告する。

2 実 験

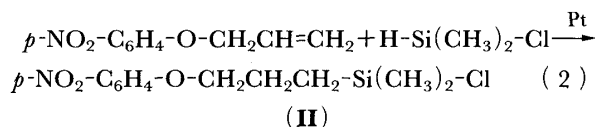
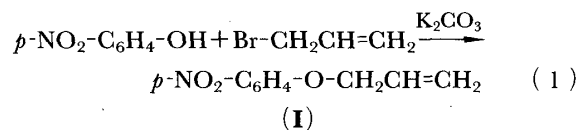
2・1 充てん剤の合成

シリル化剤の合成は、反応スキーム(1)¹⁵⁾、(2)¹⁶⁾に従った。

p-ニトロフェノール 13.9 g (100 mmol)、炭酸カリウム 13.8 g (100 mmol) 及び臭化アリル 12.1 g (100 mmol) をアセトン 250 ml 中で 48 時間還流した。反応後、アセトンを減圧留去し、生成物を 20% の酢酸エチルを含むヘキサンを溶離液とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分取精製した。この *p*-ニトロフェニルアリルエーテル (I) とジメチルクロロシランとをベンゼン中、白金触媒を用いて反応させ、3-(*p*-ニトロフェニルオキシ)プロピルジメチルクロロシラン (II) を得た。これらの化合物の確認は、核磁気共鳴スペクトルで行った。

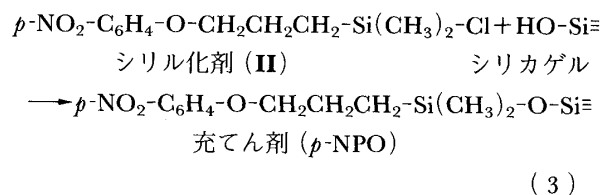
(I) ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.65 (dt, *J*=5.0 Hz, 1.2 Hz, CH₂-O, 2H), 5.37 (ddt, *J*=10.5 Hz (*cis*), 1.5 Hz (geminal), 1.2 Hz, CH₂=, 1H), 5.44 (ddt, *J*=15.8 Hz (*trans*), 1.5 Hz (geminal), 1.2 Hz, CH₂=, 1H), 6.08 (ddt, *J*=15.8 Hz (*trans*), 10.5 Hz (*cis*), 5.0 Hz, CH=, 1H), 6.98 (d, *J*=9.2 Hz, Arom, 2H), 8.01 (d, *J*=9.2 Hz, Arom, 2H)。

(II) ¹H-NMR δ: 0.14 (s, CH₃-Si, 6H), 0.66 (m, CH₂-Si, 2H), 1.84 (m, CH₂, 2H), 4.20 (t, CH₂-O, 2H), 6.94 (d, Arom, 2H), 8.20 (d, Arom, 2H)。



合成したニトロフェニル型シリル化剤のシリカゲルへの結合は、反応スキーム(3)に従って行った。固定相の担体としては、粒子径 5 μm、細孔径 10 nm、表面積約 330 m²/g の全多孔性シリカゲル (Develosil, 野村化学) を使用した。

シリカゲル 2 g に対し、シリル化剤 1.3 g (5.6 mmol)、トルエン 50 ml、ピリジン 0.5 g (6 mmol) の割合で加えて加熱し、6 時間還流した。反応後、メタノール 100 ml で洗浄し、50°C で乾燥した¹⁷⁾。



同様に、*o*-ニトロフェニル型、*m*-ニトロフェニル型充てん剤を合成した。又臭化アリルに代えて 4-ブromo-1-ブテンを用いて反応を行い、4-(*p*-ニトロフェニルオキシ)ブチル型充てん剤を合成した。又ニトロフェニル基とケイ素との間のスペーサーを種々変えて、Table 1 に示す固定相 (No. 1~8) を合成した。この一次シリル化後の充てん剤の元素分析値を Table 1 に示す。これら

Table 1 Elemental analysis of the packing material

No.	Packing material	Carbon content, %	Structure of stationary phase
1	<i>p</i> -NPO	10.40	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
2	<i>p</i> -NPO-P ^{a)}	8.26	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
3	<i>m</i> -NPO	8.93	<i>m</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
4	<i>o</i> -NPO	7.97	<i>o</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
5	<i>p</i> -NBO	10.22	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₄ -Si(CH ₃) ₂ -
6	<i>p</i> -NBz	9.69	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ CH ₂ -O-(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
7	<i>p</i> -NPO-E2	10.74	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₃ -Si(CH ₃) ₂ -
8	<i>p</i> -NPO-t ^{b)}	4.81	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) ₃ -Si(OH) ₂ -
9	PYE	18.45	C ₁₆ H ₉ -CH ₂ CH ₂ -Si(CH ₃) ₂ -
10	C ₁₈	19.17	C ₁₈ H ₃₇ -Si(CH ₃) ₂ -
11	NPE	8.81	NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ CH ₂ -Si(CH ₃) ₂ -

a) packing material with lower surface coverage; b) prepared from trifunctional silane

の充てん剤を標準的な二次シリル化処理して用いた¹⁷⁾.

2.2 試料

PCDD 類は, ジメチルスルホキシド中, 無水炭酸カリウムの存在下, クロロカテコールとクロロニトロベンゼンとの縮合から合成されたものである¹⁰⁾.

2.3 液体クロマトグラフィー装置

液体クロマトグラフィー装置は, LC-9A 型送液ポンプ, SPD-6A 型紫外吸収検出器, C-R5A 型データ処理装置 (島津製作所製), 7125 型ループインジェクター (Rheodyne 製) から構成した.

2.4 カラム

内径 4.6 mm, 長さ 150 mm のステンレススチール管に, 湿式充てん法で充てん剤を詰めてカラムを作製した.

2.5 測定条件

充てん剤の保持特性の評価に使用した移動相は, 水とメタノールを容量比で混合して調製した. クロマトグラフィーは, 水浴中でカラムを 30°C に保温して行った.

3 結果及び考察

3.1 固定相のフェニル基上のニトロ基の置換位置の効果

Table 2 に各充てん剤において得られた *o*-, *m*-, 及び *p*-ジニトロベンゼンの k' 値と相互間の分離係数を示す.

す. これらを用いて充てん剤の保持特性を比較した.

非極性の固定相をもつ C₁₈ と PYE は *o*-ジニトロベンゼンより, *p*-ジニトロベンゼンを長く保持した. 特に, ピレン環が結合した PYE 型充てん剤 (No. 9) においては, *p*-ジニトロベンゼンの非常に大きな k' 値に対して, *o*-ジニトロベンゼンの k' 値 (α , *o*-/*p*-で示した値) は非常に小さく, *p*-ジニトロベンゼンについては電荷移動錯体生成の寄与, 又 *o*-異性体については非平面構造をもつ分子に対する小さな保持が示唆された. これに対して, ニトロフェニル基を結合した充てん剤 (No. 1~8) は, *o*-ジニトロベンゼンを優先的に保持する特性を示した.

しかし, ニトロ基が結合している充てん剤についても, 固定相の構造の差によって異性体の識別能力に差が見られ, 特に *p*-ニトロフェニル基結合型充てん剤 (No. 1, 2, 5, 6, 7, 8) は, *p*-ジニトロ異性体よりニトロ基がベンゼン環の一方に偏って結合している *o*-ジニトロ異性体を長く保持する特性を示した. これは先に報告されているように¹³⁾, 固定相のニトロフェニル基と試料のジニトロベンゼンとの間の双極子-双極子相互作用の大きさを反映していると考えられる.

一方, *m*-ニトロフェニル基や *o*-ニトロフェニル基結合型充てん剤は, ジニトロベンゼンについて 2 個のニトロ基の偏りを識別する能力をほとんど示さなかった.

3.2 固定相のスペーサー長さと反応率の効果

異なるスペーサー長さをもつ充てん剤 *p*-NBO 及び *p*-NPO-E2 は, *p*-NPO と同様に, *o*-ジニトロベンゼンをより長く保持する特性を示したが, 双極子-双極子相

Table 2 Retention of dinitrobenzenes on nitrophenyl bonded silica

No.	Packing material	$k'^{(a)}$			$\alpha^{(b)}$	
		<i>o</i> -DNB ^(c)	<i>m</i> -DNB ^(d)	<i>p</i> -DNB ^(e)	<i>o</i> -/ <i>p</i> -	<i>o</i> -/ <i>m</i> -
1	<i>p</i> -NPO	6.18	5.19	3.60	1.72	1.19
2	<i>p</i> -NPO-P	2.26	2.37	1.84	1.23	0.95
3	<i>m</i> -NPO	2.60	2.96	2.60	1.00	0.88
4	<i>o</i> -NPO	1.85	1.95	1.78	1.04	0.95
5	<i>p</i> -NBO	4.64	4.63	3.52	1.32	1.00
6	<i>p</i> -NBz	3.97	3.59	2.92	1.36	1.11
7	<i>p</i> -NPO-E2	3.37	3.27	2.80	1.21	1.03
8	<i>p</i> -NPO-t	0.24	0.26	0.20	1.21	0.91
9	PYE ^(f)	1.67	11.25	15.82	0.11	0.15
10	C ₁₈	2.21	2.92	2.62	0.84	0.76
11	NPE	4.30	3.79	2.93	1.47	1.13

a) mobile phase: 50% methanol; b) separation factor; c) *o*-dinitrobenzene; d) *m*-dinitrobenzene; e) *p*-dinitrobenzene; f) mobile phase: 80% methanol

相互作用に基づく異性体識別能は、スパーサー長の増加により低下した。又、エーテル結合を2個もつ充てん剤 (*p*-NPO-E2) は、スパーサーにエーテル結合を1個もつ充てん剤 (*p*-NPO, *p*-NBO) よりやや小さな異性体識別能を示したが、これがアルキル鎖長の増加によるものか、エーテル結合の存在によるものかは明らかではない。

3官能性のシリル化剤から合成された *p*-NPO-t は、より低い反応率にもかかわらず、ジニトロベンゼンに対して *p*-NPO-P と同様の *o*-異性体選択性を示し、いわゆるポリメリック系固定相が、シリカゲルに結合されたグルーブ間の距離の小さな部位に基づいて、大きな双極子-双極子相互作用をもたらすことを示している。同様にポリメリックな C₁₈ 固定相がモノメリックな C₁₈ 固定相より大きな平面選択性を示すことはよく知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。高い表面反応率をもつ充てん剤 (*p*-NPO) とわずかに低い表面反応率をもつ充てん剤 (*p*-NPO-P) との比較は、表面反応率の減少によって、識別能が大きく低下することを示し、これも固定されたニトロフェニル基相互間の距離が充てん剤の異性体識別能に大きな影響を与えることを示唆している。

3.3 クロロベンゼン異性体に対する保持特性

ニトロ基以外の置換基、並びに二つ以上の置換基をもつ異性体についての分離特性を検討するために、クロロベンゼン異性体についての保持特性を従来の充てん剤と比較した。Table 3 にその結果を示す。*p*-位にのみニトロ基をもつ充てん剤として *p*-NPO 充てん剤 (この論文

においてこれ以後 NPO と略記) を用いた。

クロロベンゼン類についてもジニトロベンゼンについて得られた結果と同様の結果が得られた。すなわち PYE は C₁₈ と同様に 1,2-異性体より 1,4-異性体に対して大きな保持を示し、電荷移動錯体生成相互作用が有利となるように電子吸引性基が互いに離れて存在している溶質の保持を有利にする傾向を示した。又、NPO と NPE は隣接位に塩素を結合した異性体に対して大きな保持を与えた。すなわちニトロフェニル基結合シリカは、ニトロベンゼンだけでなく、クロロベンゼンについても同様に複数の塩素の結合位置が偏っている化合物をより長く保持する特性を示し、溶質の双極子モーメントに対する認識能を示している。3種のテトラクロロベンゼンについて、NPO 及び NPE は PYE と正反対の溶出順を与えた。NPE は 30% の *o*-ニトロフェニルエチル基と 70% の *p*-ニトロフェニルエチル基を結合した構造をもつが¹³⁾、Table 2 及び 3 の結果は、*p*-ニトロフェニルエチル基結合型固定相が、大きな異性体識別能力をもつことを示唆している。しかし、3-(*p*-ニトロフェニルオキシ)プロピル基結合型充てん剤 (NPO) は、NPE 中で主に分離に寄与する *p*-ニトロフェニルエチル基結合型固定相よりもはるかに合成が容易である。

3.4 ポリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシシキ異性体の分離と分離されたピーク成分の構造推定

Fig. 1 に 1,6-ジクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシシキ (16-DCDD) と 19-DCDD, 1,2,6-トリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシシキ (126-TrCDD) と 129-TrCDD, 1246-/1249-TCDD 異性体混合物のクロマトグラムを示す。

PCDD 異性体の合成反応においては、一般に、分子内の立体的こみあいが小さく、熱力学的により安定な異性体がより多く生成する。例えば 1 位と 9 位に結合した塩素原子とダイオキシシキ骨格の酸素原子を含む立体的反発により、19-DCDD 異性体はより不安定であり、16-DCDD 異性体がより多く生成する。

C₁₈ 固定相は 1 位と 9 位に塩素が混み合って結合し、溶質の疎水性が小さくなっている 19-DCDD や 129-TrCDD より、分子の疎水性表面積の大きな 16-DCDD と 126-TrCDD を長く保持している。ここで立体的に混み合った構造をもつ異性体の生成量は少ない。この結果として、一般的に C₁₈ は生成量の多い異性体に対して長い保持を与える。

PYE は PCDD 類に最も長い保持を与えた。Table 3 の結果は、PYE 固定相が、クロロベンゼンについて芳香環に結合した塩素が互いに離れて存在し、対称性のよ

Table 3 Retention of chlorobenzenes

Chlorobenzene	<i>k'</i>			
	NPO	C ₁₈	PYE	NPE
Benzene	0.38	0.92	0.49	0.25
1	0.57	1.32	0.83	0.40
1,2	0.86	1.86	1.44	0.64
1,3	0.87	2.39	1.59	0.64
1,4	0.77	2.05	1.63	0.56
1,2,3	2.14	3.11	2.99	1.00
1,2,4	1.26	3.64	3.49	0.92
1,3,5	1.34	5.31	3.75	1.00
1,2,3,4	2.12	5.68	8.30	1.53
1,2,3,5	2.09	7.36	9.61	1.48
1,2,4,5	1.95	6.88	9.98	1.43
1,2,3,4,5	3.50	12.29	31.64	2.39
1,2,3,4,5,6	6.43	23.46	132.47	3.96

Mobile phase: 80% methanol

い異性体の保持を長くする傾向を示しているが, 16-DCDD や 126-TrCDD 異性体をより長く保持することは, この傾向と一致している. このように C_{18} 及び PYE は生成量の多い PCDD 異性体を一般的により長く保持する特性を示す.

一方, NPO と NPE は, 塩素がダイオキシン骨格に偏って結合した双極子モーメントの大きな異性体である 19-DCDD や 129-TrCDD 異性体をより長く保持する. 従って, ニトロフェニル基結合型充てん剤は, 生成量のより少ない PCDD 異性体を優先的に保持すると言える. C_{18} 充てん剤で分離されるような疎水性や極性において大きな差をもつ異性体混合物については, 例外なくこの傾向が見られた.

1246-/1249-TCDD 異性体混合物は, C_{18} , PYE では分離されなかったが, NPO と NPE はこれを容易に分離した. これらの異性体が分離されて, それぞれのピークについて構造決定されたことはこれまで報告されていないが, ニトロフェニル基結合型充てん剤は, この構造

決定を可能とする.

第一にこれらの充てん剤は, 双極子モーメントの大きな異性体をより長く保持する特性をもっているので, より大きな双極子モーメントをもつ異性体 1249-TCDD に対して長い保持を与えると期待されること, 第二に, 16-/19-DCDD や 126-/129-TrCDD との構造の類似性を考慮すれば, 相対的な保持の大きさとピーク面積の比較において, 1246-/1249-TCDD は 16-/19-DCDD や 126-/129-TrCDD と同様の傾向を与えると期待されることに基いて, Fig. 1 に示すクロマトグラムにおいて後に溶出するより小さなピークが 1249-TCDD に対応すると考えられる.

以上のようにして保持特性の異なる充てん剤の与える保持時間と予測される異性体の生成比率の考察により, PCDD 異性体混合物のすべての分離されたピークに対して構造決定が可能となった. ここで異性体の生成比(ピークの大きさの比)と溶出順が, 上に記した一般的な傾向に従わない組み合わせが 3 例見られたが, これらはいずれも C_{18} でも PYE でも分離されていないもので, 異性体の間の立体的な差が小さく, 生成比が異性体の相対的安定性の他, 合成反応後の分取クロマトグラフィーにおける分取条件などに依存するものと考えられる. Table 4 にダイオキシン標準品を合成する際に混合物として得られる異性体の分離係数と分離された各ピークについての構造決定の結果を示す.

このように, ダイオキシン標準品を合成する際に混合物として得られる 22 組 44 種の異性体について, C_{18} 型充てん剤は 11 組を, PYE 型充てん剤は 13 組を, NPE は 20 組を分離したが, NPO 型充てん剤は 22 組すべてを分離し, ダイオキシン異性体の分離を単一のカラムで達成できること, 更にこれによって分離された各ピークについて, 各充てん剤の保持機構に基づいて構造の推定が可能であることが示された.

以上, PYE や NPO などの芳香族結合型シリカゲル充てん剤の選択性を検討して, これらの充てん剤が, C_{18} と比較して低い疎水性識別能を示す反面, PYE が電荷移動相互作用及び溶質の立体形状に基づく高い選択性を示すこと, 又 NPO が双極子モーメントの大きな溶質に対して優先的な保持を与えることを示した.

このような保持特性の異なる芳香族結合型充てん剤を, 環境科学で問題とされているポリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン異性体の分離に適用した結果, 従来高分解能ガスクロマトグラフィーでも分離不可能であったポリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンの全異性体の分離が

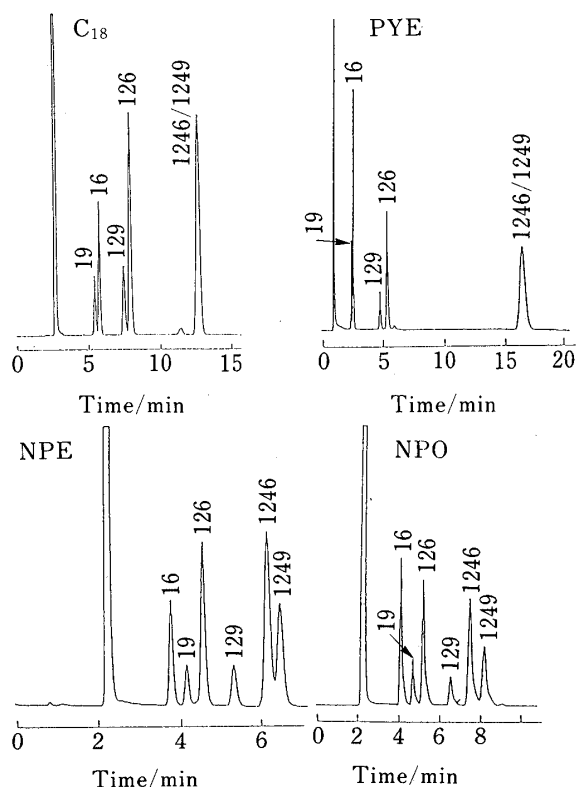


Fig. 1 Separation of 1,6-/1,9-DCDD, 1,2,6-/1,2,9-TrCDD, 1,2,4,6-/1,2,4,9-TCDD

Column and mobile phase: (a) C_{18} , 90% methanol, (b) PYE, methanol, (c) NPE, 90% methanol, (d) NPO, 90% methanol; Flow rate: 1.0 ml/min, 2.0 ml/min for PYE; Detection: UV 254 nm.

Table 4 Separation factor of dioxin mixture

No.	Dioxin mixture	Separation factor ^{a)} (k' of the first peak)			
		C ₁₈ ^{b)}	PYE ^{c)}	NPE ^{d)}	NPO ^{d)}
1	12/14 ^{e)}	1.00(2.60)	1.00(1.72)	0.90(2.73)	0.87(3.40)
2	16/19	1.09(2.25)	1.10(1.57)	0.81(2.64)	0.76(3.22)
3	17/18	1.00(2.85)	1.00(1.74)	0.87(2.82)	0.85(3.49)
4	27/28	1.00(3.23)	1.00(1.76)	0.95(2.96)	0.93(3.66)
5	126/129	1.08(3.49)	1.14(3.87)	0.79(4.25)	0.67(5.31)
6	127/128	1.04(4.16)	1.00(4.08)	0.85(4.52)	0.81(5.62)
7	136/139	1.10(4.67)	1.12(4.68)	0.93(4.89)	0.89(6.11)
8	137/138	1.00(3.46)	1.00(4.87)	1.08(4.84)	1.09(5.96)
9	1236/1239	1.09(6.66)	1.17(17.21)	0.86(7.76)	0.79(10.02)
10	1237/1238	1.00(7.58)	1.04(15.39)	0.90(7.78)	0.88(9.93)
11	1246/1249	1.00(6.60)	1.00(17.55)	0.92(7.63)	0.87(9.88)
12	1247/1248	1.00(7.63)	1.05(15.77)	0.96(7.67)	0.93(9.55)
13	1267/1289	1.05(5.24)	1.20(11.27)	0.68(6.55)	0.57(8.08)
14	1268/1279	1.10(6.74)	1.13(14.40)	0.88(7.62)	0.83(9.55)
15	1368/1379	1.11(8.70)	1.21(17.81)	1.00(8.19)	0.96(9.91)
16	12367/12389	1.07(9.36)	1.13(2.27)	0.83(3.04)	0.75(3.93)
17	12368/12379	1.10(11.72)	1.08(2.80)	0.95(3.24)	0.89(4.11)
18	12467/12489	1.00(9.36)	1.00(2.51)	0.92(3.13)	0.87(4.18)
19	12468/12479	1.00(12.10)	1.00(2.98)	1.04(3.16)	1.07(4.06)
20	123678/123789	1.08(15.66)	1.09(6.01)	0.90(4.43)	0.82(5.75)
21	123679/123689	1.00(16.23)	1.00(7.21)	1.06(4.39)	1.10(5.92)
22	124679/124689	1.00(15.45)	1.04(7.30)	1.00(4.38)	0.97(5.99)

a) calculated by dividing the k' value of the larger peak with that of the smaller peak; b) mobile phase, 90% methanol; flow rate, 1.0 ml/min; c) mobile phase, methanol for No. 1~No. 15; mobile phase for PCDDs, No. 16~No. 22, 50% dichloromethane-50% ethanol; flow rate, 2.0 ml/min; d) mobile phase, 80% methanol for PCDDs, No. 1~No. 15, 90% methanol for PCDDs, No. 16~No. 22; flow rate, 1.0 ml/min; e) position of chlorine substitution

可能となり、又芳香族結合型充てん剤 (PYE, NPO) を用いる逆相クロマトグラフィーにおける保持挙動からポリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン異性体の構造解析が可能となった。

本研究は、文部省科学研究費補助金 (国際学術研究共同研究課題番号 03044089) による補助をもとに行った。

文 献

- 1) N. Tanaka, Y. Tokuda, K. Iwaguchi, M. Araki: *J. Chromatogr.*, **239**, 761 (1982).
- 2) N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki: *J. Chromatogr.*, **549**, 29 (1991).
- 3) A. S. Kende, M. R. DeCamp: *Tetrahedron Lett.*, 2877 (1975).
- 4) A. P. Gray, S. P. Cepa, J. S. Cantrell: *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 2873.
- 5) C. J. Koester, R. A. Hites: *Chemosphere*, **17**, 2355 (1988).
- 6) T. J. Nestrick, L. L. Lamparski, R. H. Stehl: *Anal. Chem.*, **51**, 2873 (1975).
- 7) J. J. Ryan, H. B. S. Conacher, L. G. Panopio, B. B. Y. Lau, J. A. Hardy, Y. Masuda: *J. Chromatogr.*, **541**, 131 (1991).
- 8) K. P. Naikwadi, F. W. Karasek, H. Hatano: *J. Chromatogr.*, **511**, 281 (1990).
- 9) J. R. Donnelly, W. D. Munslow, R. K. Mitchum, G. W. Sovocool: *J. Chromatogr.*, **392**, 51 (1987).
- 10) L. T. Gelbaum, D. G. Patterson, Jr., D. Ashley, D. F. Groce: *Chemosphere*, **17**, 551 (1988).
- 11) J. Grainger, L. T. Gelbaum: *Appl. Spectrosc.*, **41**, 809 (1987).
- 12) T. J. Nestrick, L. L. Lamparski, R. H. Stehl: *Anal. Chem.*, **51**, 2273 (1979).
- 13) K. Kimata, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Araki, D. G. Patterson Jr.: *J. Chromatogr.*, **595**, 77 (1992).
- 14) K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, E. R. Barnhart, L. R. Alexander, S. Sirimanne, P. C. McClure, J. Grainger, D. G. Patterson, Jr.: *Anal. Chem.*, **65**, 2502 (1993).
- 15) C. F. H. Allen, J. W. Gates, Jr.: *Org. Syn. Col.*, **3**, 140 (1955).
- 16) J. F. Harrad, A. H. Chalk: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1776 (1964).
- 17) K. Jinno, S. Shimura, N. Tanaka, K. Kimata, J.

- C. Fetzner, W. R. Biggs: *Chromatographia*, **27**, 285 (1989).
18) S. A. Wise, W. E. May: *Anal. Chem.*, **55**, 1479 (1983).
19) K. Jinno, T. Nagoshi, N. Tanaka, M. Okamoto, J. C. Fetzner, W. R. Biggs: *J. Chromatogr.*, **436**, 1 (1988).



Evaluation of nitrophenyl-bonded silica for reversed-phase liquid chromatography and its application to the separation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin isomers. Kazuhiro KIMATA^{*}, Ken HOSOYA, Nobuo TANAKA^{**}, Elizabeth R. BARNART, Louis R. ALEXANDER and Donald G. PATTERSON, Jr.^{***} (^{*}Nacalai Tesque, 17, Kaide-cho, Muko-shi, Kyoto 617; ^{**}Kyoto Institute of Technology, Department of Polymer Science and Engineering, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606; ^{***}Centers for Disease Control, Environmental Health Laboratory Sciences, 4770, Buford Highway, NE Atlanta, GA 30341-3724, USA)

Several nitrophenylsilylated silicas were prepared, and the chromatographic properties were compared with those of C₁₈ and pyrenylethyl bonded silica (PYE). 3-(*p*-Nitrophenoxy)propylsilylated silica (NPO) and 2-(nitrophenyl)ethyl bonded silica (NPE) showed preferential retention for dinitrobenzenes and chlorobenzenes with substituents positioned as close as possible based on the dipole-dipole interaction. The NPO showed greater selectivity than NPE. In contrast, PYE preferentially retained isomers with more symmetrical substitution. The use of NPO, in combination with the PYE phase, allowed not only the separation of all of the polychlorodibenzo-*p*-dioxin isomer mixtures coproduced during the synthesis, but also a structural assignment for each separated peak.

(Received June 21, 1993)

Keyword phrases

separation of dioxin isomers; dioxin; reversed-phase liquid chromatography; nitrophenyl bonded phase.