

環境水中のフェノール類の高速液体クロマトグラフィー のための新しい誘導体化前濃縮法

伊藤 純一[®], 広沢 幸弘, 小俣 雅嗣^{*}

(1994 年 6 月 21 日受理)

フェノール類を 4-スルホベンゼンジアゾニウム塩とジアゾカップリングさせ、生成した色素と第四級アンモニウム塩とのイオン会合体を形成させ、このイオン会合体の凝集をメンブランフィルターを装着したラインフィルターにオンラインで前濃縮し HPLC で分析する方法を開発した。この方法により数 $\mu\text{g dm}^{-3}$ レベルのフェノール、*o*-, *m*-クレゾール、*m*-クロロフェノール、*o*-, *m*-エチルフェノール及び 2,3-, 2,5-キシレノールの 8 種のフェノール類が相互に分離され定量できた。色素は膜表面にほとんど体積を持たずに濃縮されるため非常に高い濃縮率が得られ、又オンライン-ミニカラム濃縮法に比べ分離度の高いクロマトグラムが得られた。このイオン会合体試料の 2 cm^3 を濃縮した場合検出限界 ($S/N=3$) は、最も感度の高いフェノールが 40 ng dm^{-3} 、最も感度の低い 2,5-キシレノールが $2\text{ }\mu\text{g dm}^{-3}$ であった。又、本法を用いて 8 種のフェノール類の河川水からの回収分離定量を行った。

1 緒 言

環境中におけるフェノール類は、工場排水ばかりでなく家庭からの下水中¹⁾や喫煙室内の空気からも見いだされている²⁾。これら微量のフェノールの分離分析は環境水の汚濁や大気汚染を知る上で重要である。

排水中のフェノールの定量の公定法としては 4-アミノアンチピリン吸光光度法³⁾⁴⁾が採用されている。この定量法は溶媒抽出を併用することにより高感度で定量できるが、クレゾール等幾つかのフェノール類が同時発色し、それらの含量を測定するものであり、それぞれ発色率、吸光係数が違うことからかなりあいまいな定量法といえる。HPLC によるフェノール類の分離定量には、吸光係数を増大させるための誘導体化が重要である。Kuwata らは大気中のフェノールを *p*-ニトロベンゼンアゾフェノールに誘導体化して HPLC によって高感度分析を行った²⁾⁵⁾。

近年、有色金属キレートと第四級アンモニウム塩とのイオン会合体をメンブランフィルターに捕集し、これを少量の有機溶媒にフィルターごと再溶解し吸光光度法⁶⁾や AAS⁷⁾の試料とする前濃縮法が報告されている。著者らはポリ四フッ化エチレン (PTFE) 製メンブランフィルターを装着したラインフィルターをインジェクシ

ンバルブに取り付けた HPLC を考案し、これにより 2-(5-ブromo-2-ピリジルアゾ)-5(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)アニリン金属キレートイオンとベンジルジメチル(テトラデシル)アンモニウム=クロリド(ゼフィラミン)とのイオン会合体をオンラインで膜濃縮した後分離分析した⁸⁾。

本研究は種々のフェノール類を 4-スルホベンゼンジアゾニウム塩とジアゾカップリングさせて吸光係数を増大させた後、これとゼフィラミンとのイオン会合体を形成させ、このイオン会合体の凝集をオンラインで前述のラインフィルターに濃縮して HPLC で分析する方法について検討した。その結果、8 種のフェノール類について 4-アミノアンチピリン吸光光度法より高感度で分離定量できることが分かった。

2 実 験

2.1 試 薬

4-スルホベンゼンジアゾニウム水溶液は、4-スルホベンゼンアニリン 0.19 g を蒸留水 50 cm^3 で溶解した後氷冷し、塩酸 1 cm^3 を加え次いで 0.2% 亜硝酸ナトリウム水溶液 50 cm^3 を加え調製した。これらの試薬は和光純薬工業製試薬特級を用いた。 $1 \times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$ ゼフィラミン水溶液は、同仁化学研究所製ゼフィラミン 0.404 g を蒸留水 100 cm^3 に溶解して用いた。

移動相溶液は和光純薬工業製 HPLC 用アセトニトリ

* 北見工業大学化学システム工学科: 090 北海道北見市公園町 165

ル 37.5 (v/v)% 及び $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ゼフィラミン, $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を含む水溶液 62.5 (v/v)% を用いた。

フェノール類は, 市販の試薬特級又はそれに準ずるグレードのものを用い, 0.1 g を蒸留水 100 cm^3 に溶解して標準溶液を調製し, 適宜希釈して用いた。

その他の試薬は市販の試薬特級を用いた。

2・2 装置

HPLC はポンプ (CCPD 東ソー製), 吸光検出器 (L-3000 日立製作所製), インジェクター (Rheodyne 7125) で構成した。インジェクター部には前濃縮のために Fig. 1 に示す PTFE 製メンブランフィルター (アドバンテック東洋製, 孔径 $0.5 \mu\text{m}$ を直径 6 mm に切ったもの) を装着したラインソルベントフィルター (ジエールサイエンス製), 又は Nucleosil C-18 (ナーゲル製) を充てんしたミニカラム ($4.6 \text{ i.d.} \times 10 \text{ mm}$, ジエールサイエンス製) を接続し使用した。分析カラムは TSKgel ODS-120 T ($4.6 \text{ i.d.} \times 250 \text{ mm}$, 東ソー製) を用いた。

アゾフェノールのスペクトル測定には島津製作所製 UV-2200 分光光度計を使用した。

2・3 定量操作

フェノール類を $2.5 \mu\text{g}$ 以下を含む溶液 40 cm^3 に pH 10.5 になるように 0.2 mol dm^{-3} 炭酸緩衝液 1 cm^3 , 4-スルホベンゼンジアゾニウム水溶液を 0.5 cm^3 加え 3 分間放置する。これに 1 mol dm^{-3} 酢酸緩衝液 0.25 cm^3 を加え pH 5 とした後, ゼフィラミン水溶液 0.5 cm^3 及び蒸留水を加えて 50 cm^3 とし振り混ぜて 10 分間放置する。この溶液をガスタイトシリンジを用いて 3 cm^3 までの適量を HPLC のインジェクションポートよりラインフィルターに前濃縮する。流路を切り替え溶離液を流量 $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ で溶出し, 分離カラムを経て波長 352 nm で吸光度を測定する。分離カラムの恒温槽は, 35°C に保った。

3 結果及び考察

3・1 誘導体化の予備実験

一価フェノール 19 種類及び多価フェノール 3 種類について検討した。その結果, 数種のフェノール及び多価フェノールは, ジアゾカップリング反応において複数の異性体を生成し, 又イオン会合体も 1:1 会合体以外のものを形成するためと考えられる複数のピークを示すクロマトグラムが観測された。それぞれ再現性があり定性分析には有用と考えられるが, ここでは分離定量が可能

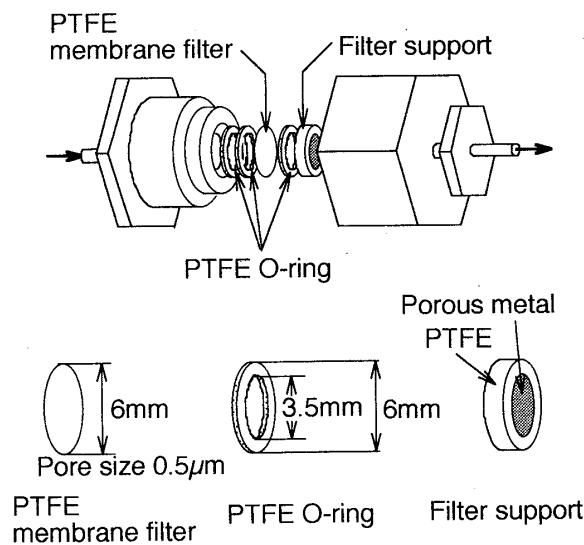


Fig. 1 Linefilter

な単一ピークを示す 8 種類の一価フェノールについて検討した。なお, フェノールは他の検討したフェノール類から離れて最初に溶出するためその定量は妨害されない。

3・2 ジアゾカップリング反応の諸条件の検討

ジアゾニウム塩の添加量がアゾフェノール誘導体の生成に与える影響について HPLC により得られたそれぞれのピーク面積により検討した (Fig. 2)。ここではフェノールに着目してその最大ピークを与えるジアゾニウム塩の濃度, $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ を添加条件とした。

種々のフェノールとジアゾニウム塩とのジアゾカップリング反応は pH によって大きく影響を受けた。pH 条件により生成するアゾフェノールのピーク面積は Fig. 3 に示すようにフェノールとクロロフェノール, クレゾールとエチルフェノール, キシレノールの三つの異なるパターンを示した。又, pH 条件によっては副反応ピークが出現するため, 反応 pH 条件を 10.5 とした。

反応時間を検討した結果, 上記の条件で 3 分間以上でピークは最大となった。

3・3 イオン会合反応の諸条件の検討

イオン会合反応を行う際にも pH の影響を大きく受けた。ジアゾカップリング反応後そのまま pH 10.5 の溶液にゼフィラミンを添加したところ, 一つのフェノールに対し複数のピークが出現した。そこで酢酸緩衝液を加え pH 5 以下で添加したところピークは一つとなった。ゼフィラミン添加量を検討した結果, アゾフェノール

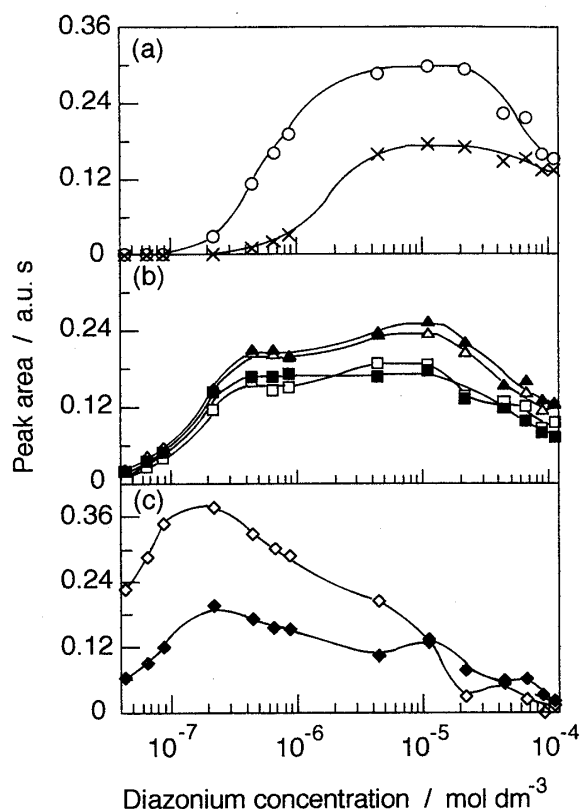


Fig. 2 Effect of diazonium concentration on the diazo-coupling reaction

Diazo-coupling reaction: pH 10.5; Zephiramine: 10^{-4} mol dm^{-3} ; Ion-association reaction: pH 5; Phenols: $30 \mu\text{g dm}^{-3}$; (a) ○: phenol, ×: *m*-chlorophenol; (b) △: *m*-cresol; ▲: *o*-cresol; □: *m*-ethylphenol; ■: *o*-ethylphenol; (c) ◇: 2,5-xyleneol; ◆: 2,3-xyleneol

ルとほぼ等モル濃度から捕集されはじめ, 2×10^{-4} mol dm^{-3} を超えるとそれぞれのピーク面積が減少した。これはゼフィラミンのミセル形成⁹⁾によるイオン会合体の可溶化のためと考えられる。

イオン会合体の凝集を形成させるためゼフィラミン添加後 10 分間以上放置し注入することで最大のピークを与えた。

3・4 HPLC の条件の検討

移動相溶液としてゼフィラミンを含むメタノール-水及びアセトニトリル-水系混合溶液を使用し分離性能を比較した。どちらの混合溶液でも分離はできたが、メタノール-水系混合溶液ではそれぞれのピークはブロードとなったため、移動相の混合溶液にはアセトニトリル-水系混合溶液を用いることとした。8 種類のフェノール

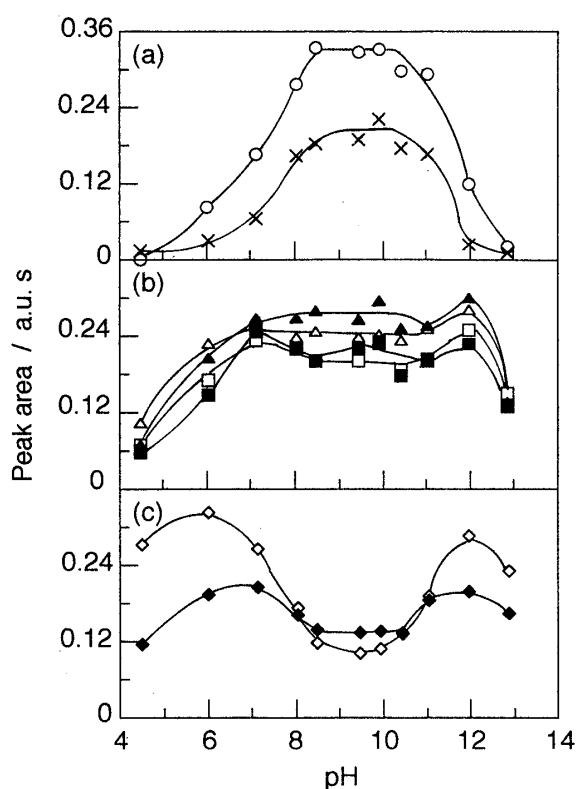


Fig. 3 Effect of pH on the diazo-coupling reaction

Diazonium concentration: 10^{-5} mol dm^{-3} ; Ion-association reaction: pH 5, Zephiramine: 10^{-4} mol dm^{-3} ; Phenols: $30 \mu\text{g dm}^{-3}$; (a) ○: phenol, ×: *m*-chlorophenol; (b) △: *m*-cresol; ▲: *o*-cresol; □: *m*-ethylphenol; ■: *o*-ethylphenol; (c) ◇: 2,5-xyleneol; ◆: 2,3-xyleneol

類のうち最も保持時間が近接している *m*-エチルフェノールと 2,5-キシレノールを分離できるアセトニトリルの濃度は 37.5(v/v)%, pH 条件は 4.6 であった。イオン会合体がカラム中で再解離することを抑制するために移動相溶液にもゼフィラミンを加え, その濃度は 1.6×10^{-4} mol dm^{-3} とした。検出波長は 8 種のアゾフェノールの移動相溶液中の各吸収スペクトル測定の結果から 352 nm とした。

3・5 メンブランフィルター

ラインフィルター内に装着するメンブランフィルターには移動相溶液によって溶解や変質しない PTFE 製を用いた。メンブランフィルターの孔径については, $0.2 \mu\text{m}$ を用いたところ捕集率は若干向上したが数回の分析で目詰まりを起こした。 $0.5 \mu\text{m}$ を用いたところ試料 1 cm^3 としたとき 30 回程度の分析が可能であった。

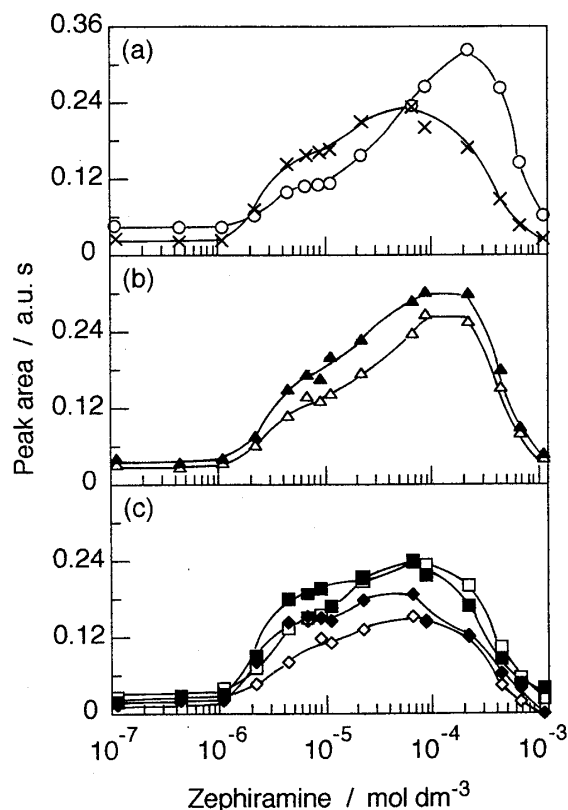


Fig. 4 Effect of Zephiramine concentration on the ion-association reaction

Diazo-coupling reaction: pH 10.5; Diazonium concentration: 10^{-5} mol dm $^{-3}$; Ion-association reaction: pH 5; Phenols: 30 μ g dm $^{-3}$; (a) ○: phenol; ×: *m*-chlorophenol; (b) △: *m*-cresol; ▲: *o*-cresol; (c) □: *m*-ethylphenol; ■: *o*-ethylphenol; ◇: 2,5-xyleneol; ◆: 2,3-xyleneol

3・6 オンライン-ラインフィルター前濃縮法の検討

これまで述べた条件による標準試料のクロマトグラムを Fig. 5(a) に示す. 又, 比較のため Nucleosil C-18 を充てんしたミニカラムによる前濃縮法 (b) 及び 50 倍濃度の標準試料を 20 mm 3 ループインジェクターで注入した場合 (c) も併せて示した. 又, それぞれ 3 回繰り返した結果のピーク高の平均値及びループインジェクターによるピーク高を基準とした回収率を Table 1 に示す. ミニカラム法と比較して本法は保持時間が若干短く, 分離能が優れていた. 又, 捕集率に関しても本法のほうが優れていた. 回収率がラインフィルター濃縮において 100% とならなかった. この原因は, 別の実験で 50 μ g dm $^{-3}$ でジアゾカップリングさせた試料及び, これを更に 1 μ g dm $^{-3}$ まで希釈した試料を用いてイオン会合体がラインフィルターによりほぼ 100% 捕集され

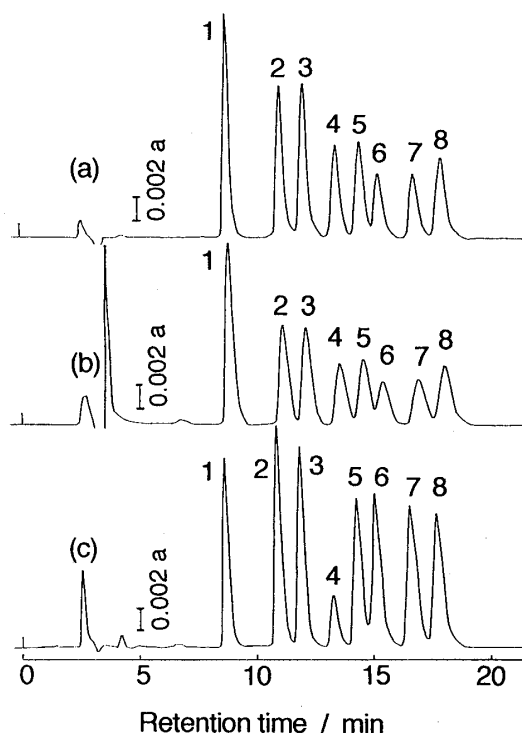


Fig. 5 Chromatograms of phenol mixture

Conditions: column, TSKgel ODS-120T (4.6 i.d. \times 250 mm); eluent, 35.7% acetonitrile/62.5% water; Zephiramine, 1.6×10^{-4} mol dm $^{-3}$; 8×10^{-3} mol dm $^{-3}$ acetate buffer, pH 4.6; flow rate, 1 cm 3 min $^{-1}$; column temperature, 35°C; UV-detector, 352 nm. (a) linefilter: phenols, 30 ng cm $^{-3}$; sample size, 1 cm 3 ; (b) mini-column: phenols, 30 ng cm $^{-3}$; sample size, 1 cm 3 ; (c) loop-injection: phenols, 1.5 μ g cm $^{-3}$; sample size, 20 mm 3 ; peaks: (1) phenol, (2) *m*-cresol, (3) *o*-cresol, (4) *m*-chlorophenol, (5) *m*-ethylphenol, (6) 2,5-xyleneol, (7) 2,3-xyleneol, (8) *o*-ethylphenol

たことからジアゾカップリング反応の際の反応率が濃度により異なるためと考えられる. 濃縮に際してメンブランフィルターではほとんど厚みがなく表面に濃縮され, 濃縮時の拡散・分離が起こらず分離能が高くなったものと考えられる. 更に理論上非常に高い濃縮率が得られることも本法の有利な点である.

3・7 検量線及び感度

標準フェノール混合試料をラインフィルター前濃縮法によって濃縮したクロマトグラムを求め, ピーク面積によって各々のフェノールの検量線を作成した. 又, 各々 40 ng cm $^{-3}$ のフェノールを含む混合試料 2 cm 3 を濃縮定量した場合の相対標準偏差 ($n=4$), 及び 2 cm 3 濃縮

Table 1 Comparison of the pre-column concentration methods with 20 mm³ loop-injection.

	Linefilter concentration [†]		Mini-column concentration [†]		Loop-injection ^{††}
	Peak height/ (Absorbance)	Recovery, %	Peak height/ (Absorbance)	Recovery, %	Peak height/ (Absorbance)
Phenol	0.0189	116.6	0.0161	99.1	0.0162
<i>m</i> -Cresol	0.0128	70.0	0.0088	48.1	0.0183
<i>o</i> -Cresol	0.0130	75.9	0.0087	50.8	0.0171
<i>m</i> -Chlorophenol	0.0081	181.4	0.0055	122.7	0.0045
<i>m</i> -Ethylphenol	0.0085	67.1	0.0059	46.7	0.0126
2,5-Xylenol	0.0057	42.7	0.0040	30.3	0.0133
2,3-Xylenol	0.0056	46.4	0.0042	34.8	0.0120
<i>o</i> -Ethylphenol	0.0068	59.6	0.0052	45.2	0.0114

[†] Phenols, 30 µg dm⁻³; sample size, 1 cm³; concentration factor, ×50. ^{††} Phenols, 1.5 mg dm⁻³; sample size, 20 mm³

Table 2 Detection limit and relative standard deviation of the linefilter concentration

	Detection limit [†] / ng dm ⁻³	RSD ^{††} , %
Phenol	40	5.98
<i>m</i> -Cresol	72	1.69
<i>o</i> -Cresol	220	1.69
<i>m</i> -Chlorophenol	185	2.77
<i>m</i> -Ethylphenol	185	4.60
2,5-Xylenol	2000	9.76
2,3-Xylenol	500	9.97
<i>o</i> -Ethylphenol	250	1.83

[†] S/N=3, ^{††} n=4

時の検出限界 (S/N=3) はそれぞれ Table 2 に示す。フェノールについては、環境水試料の公定法である 4-アミノアンチピリン吸光光度法の溶媒抽出法による高感度化の場合よりもさらにその 10 分の 1 以下の低濃度が検出可能であった。

3・8 環境試料への応用

本法を用いて都市排水の混入がある小河川の水に前述の 8 種類のフェノールを標準添加し定量を行った。この試料を孔径 0.5 µm の PTFE 製メンブランフィルターで濾過した後、2・3 の定量操作を行い直接ラインフィルターへ濃縮したところラインフィルターに取り付けたメンブランフィルターの目詰まりのため濃縮できなかった。そこで公定法³⁾⁴⁾に従い前処理操作の蒸留を行い、併せてその回収実験を行った。その結果この河川水にはフェノール類が含まれていないことが分かった。蒸留法

Table 3 Recovery of phenols from distilled water and river water by JIS-distillation method

Phenols	Recovery, % [†]	
	Distilled water	River water
Phenol	97.1	89.1
<i>m</i> -Cresol	82.4	76.4
<i>o</i> -Cresol	89.2	0.0
<i>m</i> -Chlorophenol	106.8	116.3
<i>m</i> -Ethylphenol	115.4	115.1
2,5-Xylenol	64.6	0.0
2,3-Xylenol	49.3	0.0
<i>o</i> -Ethylphenol	91.2	0.0

[†] Recoveries were calculated from the slopes of the standard addition lines for each of the phenols at 0, 10, 20, 30 µg dm⁻³ in sample water based on those in distilled water, respectively.

の回収率は試料水及び蒸留水に 0, 10, 20, 30 µg dm⁻³ 標準添加し、蒸留して得られた検量線の傾きと同じ濃度の標準試料の検量線の傾きとの比から求め Table 3 に示した。蒸留水からの回収試験では、2,5-キシレノール、2,3-キシレノールの回収率が低く、河川水からの回収試験ではこれらのキシレノールのほか、*o*-クレゾール、*o*-エチルフェノールが全く回収されなかった。この河川水の留出液にフェノール類を添加して定量したところ、いずれも正常値を示したことから、回収率の低下は蒸留の際の他の共存物質の干渉、熱分解、又は揮散が起るためと考えられる。公定法によるフェノール類の蒸留分離法はフェノールについては一応満足すべきものの、他のフェノール類に対しては再検討を要するものと

思われる。

フェノール類をアゾ色素に誘導体化し、更にこれを第四級アンモニウム塩とのイオン会合体とし、オンラインでメンブランフィルターを装着したラインフィルターに濃縮後 HPLC 分析する方法を確立した。公定法のように溶媒抽出を用いることなく $\mu\text{g dm}^{-3}$ 以下のフェノール類を数 cm^3 の濃縮で容易にかつ、分別して定量することができた。又、著者らが開発したオンライン-ラインフィルター濃縮法は、メンブランフィルター表面にほとんど厚みなく濃縮されるため理論上非常に高い濃縮倍率が得られ、又濃縮時の拡散・分離がされないため従来のオンライン-プレカラム固相抽出法に比べ分離効率において有利であった。オンライン-ラインフィルター濃縮法は、フェノール以外の対象にもメンブランフィルター上に濃縮可能な誘導体化法が確立できれば応用できる。

(1994 年 6 月, 第 55 回分析化学討論
会において一部発表)

文 献

- 1) 合田 健編著: “水環境指標”, p. 184 (1979), (思考社).
- 2) K. Kuwata, M. Uebori, Y. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **53**, 1531 (1981).
- 3) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993).
- 4) JIS K 0101, 工業用水試験方法 (1991).
- 5) K. Kuwata, M. Uebori, Y. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **52**, 857 (1980).
- 6) 田口 茂, 糸岡栄幸, 後藤克己: 分析化学, **33**, 453 (1984).
- 7) 伊藤純一, 小俣雅嗣, 藤吉直明, 対馬 仁: 日化, **1993**, 715.
- 8) 伊藤純一, 小俣雅嗣, 川崎 誠: 日本分析化学会第 40 年会講演要旨集, p. 112 (1991).
- 9) J. Itoh, M. Komata: *Mikrochim. Acta*, **106**, 109 (1992).

☆

A new derivatization and preconcentration method for determination of trace phenols in natural water by HPLC. Jun-ichi ITOH, Yukihiro HIROSAWA and Masashi KOMATA (Department of Chemical System Engineering, Kitami Institute of Technology, 165, Koen-cho, Kitami-shi, Hokkaido 090)

A simple and highly effective pre-column on-line concentration method for determination of phenols by HPLC was developed. In the first step, phenols in the sample solution were converted to UV-absorbing derivatives by coupling with 4-sulfobenzenediazonium salt at pH 10.5, and ion-associates of the 4-sulfobenzeneazo derivatives were formed with tetradecyldimethylbenzylammonium-chloride at pH 5.0. The ion-associates were collected on a PTFE membrane filter (6 mm ϕ , 0.5 μm pore size) in a line-filter placed on a 6-way injection valve. The sample size (injection) was up to 3 cm^3 . The separation was carried out with a ODS column (Tosoh, TSKgel ODS-120T, 4.6 i.d. \times 250 mm) (column temperature 35 $^{\circ}\text{C}$) and 37.5% acetonitrile/62.5% 8.0×10^{-3} mol dm^{-3} acetate buffer solution (pH 4.6) containing 1.6×10^{-4} mol dm^{-3} tetradecyldimethylbenzylammonium-chloride as the mobile phase (flow rate, 1.0 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$). A UV detector (352 nm) was used for monitoring. Eight phenols including phenol, *m*-chlorophenol, *o*-, *m*-cresol, *o*-, *m*-ethylphenol, 2,3- and 2,5-xyleneol were successfully separated and determined. Calibration plots for each of the phenols were linear up to 50 ng dm^{-3} . Detection limits ranged between 40 ng dm^{-3} (phenol) and 2 $\mu\text{g dm}^{-3}$ (2,5-xyleneol). The method was used for the determination of phenols in river water.

(Received June 21, 1994)

Keyword phrases

derivatization of phenols; pre-column on-line concentration method for HPLC; polytetrafluoroethylene membrane filter; 4-sulfobenzenediazonium salt; tetradecyldimethylbenzylammonium-chloride.