

ノート

マルチ電極電気化学検出器を用いたフェノール類の高速液体クロマトグラフィー

栗林美枝^{*1}, 篠塚則子^{②*2}, 高井信治^{*3}, 松島美一^{*1}, 真重文子^{*4}

(1994年6月21日受理)

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おり、環境中に排出されると毒性が健康被害をもたらし、又水の悪臭やまざさの原因となる。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/GC法¹⁾であるが、抽出効率や分離の点で十分ではなく、こん跡量にたいしてはGC/MS法²⁾を用いる必要があった。HPLC法による分析は検出にUV吸収³⁾や電気化学反応⁴⁾を用いて行われているが、分離や感度に問題がある。

HPLCと電気化学検出器(ECDと略す)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、既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、カラムでの分離だけでは不十分で、各物質のピークが重なり識別できることもあった。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⁵⁾⁶⁾。

本研究ではGCでの分離がされにくくと報告¹⁾のあるフェノール類を中心にHPLC-ECDを用いて分析方法を検討した。ECDには四つの電極を直列に並べクロマトリー検出を用いた。

2 実 験

2・1 装 置

HPLC装置は、送液ポンプ: 日立655A-12, サンプルバイブル: レオダインNo.7125, 検出器: 4極式

ECDクロマトリーにおいては作用電極: ポーラスグラッシャーカーボン, 参照電極: Ag/AgCl, 補助電極: ステンレススチール, 記録計: 4ペンYokokawa LC4200, パーソナルコンピュータPC-9801で構成し、分離カラムはNeopack HPLC 120-5C₁₈(4.6×150mm)(西尾工業製)を使用した。ボルタモグラム測定には1極式ECDアンペロメトリー作用電極: グラッシャーカーボンGC-20を用いた。

2・2 試 薬

標準試薬の調製はそれぞれの試薬をメタノールを用いて1mg/mlになるように溶解し、適当な濃度に希釈して用いた。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), 2,4-ジニトロフェノール(2,4-DN), 4,6-ジニトロ-2-メチルフェノール(4,6-DN-2-M), 2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TC)は関東化学製、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), 2,6-ジニトロ-4-メチルフェノール(2,6-DN-4-M), 2-ニトロフェノール(2-N)は東京化成工業製、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、リン酸水素二カリウムは0.05Mにミリポア水を用いて調製し、HPLC用メタノールを用いてメタノール水溶液とした後、超音波洗浄器により脱気して用いた。

3 結果と考察

3・1 HPLC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変えて、バックグラウンド電流と酸化・還元電流への影響を調べた。その結果、リン酸濃

^{*1} 共立薬科大学: 105 東京都港区芝公園1-5-30^{*2} 東京大学生産技術研究所: 106 東京都港区六本木7-22-1^{*3} 東京医科大学: 160 東京都新宿区新宿6-1-1^{*4} 東京大学医学部: 113 東京都文京区本郷7-3-1

度が高くなるとメタノールとの組成比が 1:1 の溶液の場合、バックグラウンド電流は 10 nA ほど低下したが、各物質の酸化・還元電流には変化が見られなかった。又、メタノール濃度を上げて組成比を 2:1 としたところ、0.1 M リン酸溶液ではリン酸が析出したため溶離液として用いることができなかった。

3・1・2 溶離液におけるメタノール濃度の検討

メタノール水溶液中のメタノールとリン酸溶液との組成比を変えてその影響を調べた。リン酸溶液の濃度は 0.05 M を用いた。その結果、メタノール濃度が高いほど保持時間は短くなり、各物質の保持時間の差も短縮した。しかし、組成比を 3:1 にしたところリン酸が析出した。

3・1・3 電極反応における pH の影響 電極上では pH は高いほど酸化反応が起こりやすくなる。溶離液の pH を変えて各物質の反応の変化を調べた。リン酸水素二カリウム溶液の割合を増加させ、pH 5.5 から pH 7.5 まで上げると電極電流は増加した。

3・1・4 電極反応における移動相流量の影響 移動相流量を毎分 0.3, 0.5, 1.0 ml と変化させ電極反応への影響を調べた。流量を小さくするほど電荷量は増加し、反応性は上昇したが、ピーク幅も広がり、0.3 ml/min では 10 秒以上にわたりピーク幅が広がったものもあった。

3・1・5 測定条件 3・1・1 から 3・1・4 までの結果より溶離液はメタノールと 0.05 M リン酸二水素カリウ

ム、0.05 M リン酸水素二カリウムとの組成比を 9:8:1 の pH 7.04 に調製したものを用い、移動相流量を 0.5 ml/min に設定した。

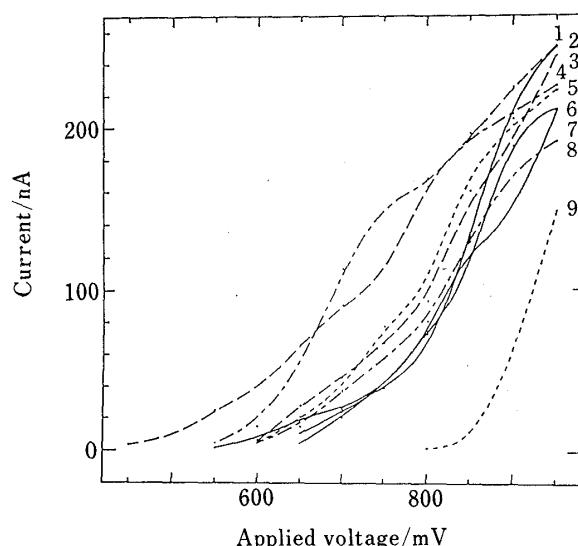


Fig. 1 Voltammograms for the oxidation of phenolic compounds

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

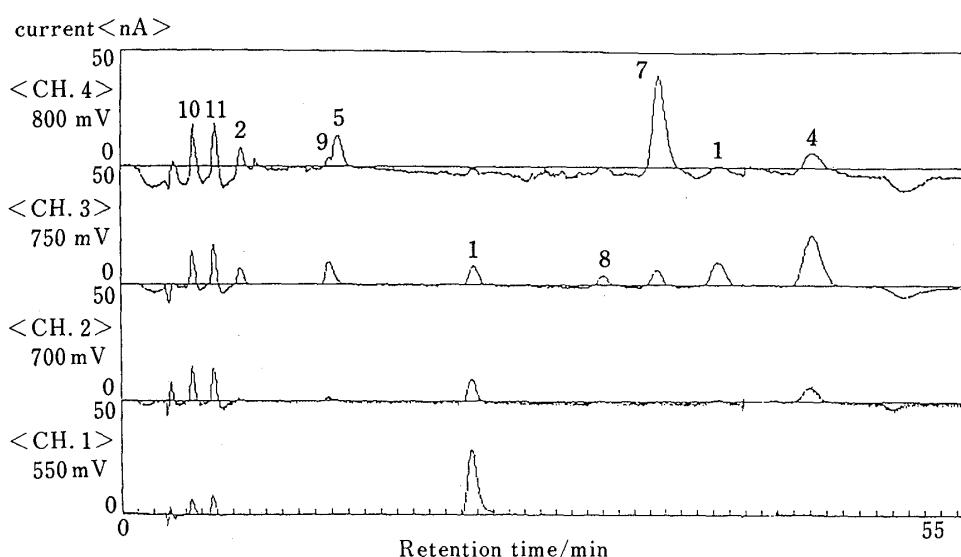


Fig. 2 Chromatograms of phenolic compounds

Numbers 1 ~ 9 are the same as in Fig. 1, 10: 2,4-dinitrophenol, 11: 4,6-dinitro-2-methylphenol

3・2 マルチ ECD の特性 (HDV)

各物質の各電位における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、限界電流を求めた。検出器には 1 電極式アンペロメトリーを用いた。Fig. 1 にボルタモグラムを示す。Fig. 1 より 2,4-M は低電位において酸化反応が起きるが、2-N においては電位を高くしないと酸化反応は生じないことが明らかになった。

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 10 成分の同時測定を行った。設定電位が高いほど感度は良くなるが、バックグラウンド電流が増加し、安定性が低下するので低めに設定し、第一電極よりそれぞれ 600, 650, 700, 750 mV または 550, 700, 750, 800 mV とした。各物質の測定時の注入量は 2-C, 4-C-2-M, 2,4-DC, 2,4-DM, PH は 400 pg, 2,5-DC, 2,4,6-TC は 4 ng, 2,4-DN, 4,6-DN-2-M, 2-N は 40 ng とした。混合溶液の測定のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。これにより、保持時間が近似した 2,4-DN と 4,6-DN-2-M は明確に分離し、2,4-

DC と 2,4-DM は十分に分離した。又、電極電位を 800 mV に上げることにより 400 pg の 2-C と 40 ng の 2-N の検出が可能であることが明らかになった。今後は 2C と 2N の十分な分離条件を検討するとともに各試料の同時定量を行う予定である。

文 献

- 1) "Organic Pollutants in Water", Edited by I. H. Suffet, M. Malaiyandi, p. 69 (1987), (American Chemical Society, Washington, D. C.).
- 2) T. J. Boyd: *J. Chromatogr. A*, **662**, 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) F. Mashige, N. Takai, N. Shinozuka, H. Wada, I. Sakuma, A. Ito, Y. Matsushima, A. Ohkubo: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **22**, 147 (1993).
- 6) F. Mashige, A. Ohkubo, Y. Matsushima, M. Takano, E. Tsuchiya, H. Kanazawa, Y. Nagata, N. Takai, N. Shinozuka, I. Sakuma: *J. Chromatogr. B*, in press.



HPLC of phenolic compounds with a multi-electrode electrochemical detector

Mie KURIBAYASHI^{*1}, Noriko SHINOZUKA^{*2}, Nobuharu TAKAI^{*3}, Yoshikazu MATSUMI^{*1} and Fumiko MASHIGE^{*4} (*¹Kyoritsu College of Pharmacy, 1-5-30, Shibakouen, Minato-ku, Tokyo 105; *²Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106; *³Tokyo Medical College, 6-1-1, Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160; *⁴Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

Reversed-phase liquid chromatography with a multielectrode electrochemical detector was applied to the separation of phenolic compounds, including methylphenols, chlorophenols and nitrophenols. A mobile phase of methanol-0.05 M potassium dihydrogen phosphate-0.05 M dipotassium hydrogenphosphate (9 : 8 : 1, pH 7) was used at a flow rate of 0.5 ml/min.. Four porous glassy carbon electrodes placed in a series were used for coulometric measurements. Selective and sensitive detection resulted. From the hydrodynamic voltammograms of the compounds, the potential of the four electrodes was set at 550, 700, 750 and 800 mV vs. Ag/AgCl, respectively. These analytical conditions enabled the detection of 2,4-dinitro-phenol and 4,6-dinitro-2-methylphenols.

(Received June 21, 1994)

Keyword phrases

HPLC; phenolic compounds for industrial use; multi-electrode electrochemical detector.