

電気化学検出器を用いる高速液体クロマトグラフィー により河川水中のフェノール類の定量

村上 和雄*, 掛本 道子**, 荒川 正一***, 丸田 恵美子****

(平成10年9月30日受理)

Determination of Phenols in River Water by High Performance Liquid Chromatography

Kazuo MURAKAMI, Michiko KAKEMOTO,
Shouichi ARAKAWA and Emiko MARUTA

(Received on September 30, 1998)

1. はじめに

河川水中には生物にとって、生存をしていく上で重要な影響を受ける化学物質が溶け込んでいることが多い。最近問題になっている外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）といわれる化学物質がその例であろう。従来、化学物質の人間や生物に対する安全基準はその化学物質に発ガン性があるかないかで設定されてきた。しかし、最近出版され、注目されている「奪われし未来」¹⁾には、従来の千分の一から百万分の一の濃度でも重大な影響を受ける例がたくさん述べられており、外因性内分泌攪乱物質に対して一般の人々も強く関心を持つようになっている。現在までに、内分泌攪乱物質であるといわれる化学物質は67²⁾種類あり、今後研究が進むにつれてその数は増加していくであろう。67種類のうちに多数フェノール化合物が含まれており、環境中のフェノール化合物を測定する方法を確立することはきわめて重要である。

フェノール樹脂は一般に数種類のフェノールを原料につくられており、環境へ放出される可能性がある。

そこで、著者らは、フェノール樹脂の原料となる5種類のフェノール類の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析法を確立し、ついでフェノール樹脂を製造する工場周辺の河川水中のフェノールの定量に応用

した。

フェノールの検出^{3), 4)}には電気化学検出器を用いたが、この検出器は電気化学的に活性なもののみに対応する選択性を有し、フェノール類に対しては絶対量で 10^{-10} gから 10^{-12} gオーダーまで測定できる高い感度を示す。さらに、河川水中のフェノールの濃縮・回収には、最近よく使われるようになった固相抽出法を使用した。

2. 実験

2.1 試薬

フェノール：和光純薬製特級，m-クレゾール：東京化成工業製特級，3,5-キシレノール，レゾルシノール，2,6-ビス（ヒドロキシメチル）-p-クレゾール，酢酸，無水酢酸ナトリウム，：いずれも和光製特級，アセトニトリル：和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用。その他本実験に用いた試薬はすべて特級である。

2.2 装置

HPLC：Shodex製高速液体クロマトグラフィシステム（ポンプ：DS-4型，デガッサー：KT-17型，デター処理装置：SICインスルメンツ製クロマトコーダー21，電気化学検出器：BAS製LC-4C型電気化学検出器，固相抽出装置：ウォーターズ製 Sep-Pak コンセントレーター。

2.3 試薬の調製及び前処理

(1) 標準溶液：5種のフェノール類のそれぞれ0.100gを精秤し，10mlメスフラスコに移動相で溶解した。さらに測定濃度に応じて混合し，移動相で希釈した。

(2) 移動相：pH4.5の0.1M酢酸緩衝液とアセトニト

* 環境情報学科環境有機化学研究室

** 中央大学理工学部

*** 環境情報学科地球環境学研究室

**** 東邦大学理学部

リルを1:1の割合に混合して調製した。

(3) 固相抽出法による濃縮

バリアン製のボンデルートカートリッジは濃縮操作前に、メタノール10ml、蒸留水10mlでコンディショニングを行った。その後、河水水200mlをカートリッジに通過させて濃縮した。その後、1mlのメタノールに溶出させHPLCに注入した。

2.4 高速液体クロマトグラフの測定条件

分析カラム: Chemcosorb 5-ODS-H 4.6mm φ×150mm
 移動相: 0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) - アセトニトリル (1:1)

流量: 0.5ml/min

電気化学検出器の電極: グラシーカーボン電極,
 設定電位: 1.0 (VsA g/A g C1).

3. 結果及び考察

3.1 HPLCの測定条件の検討

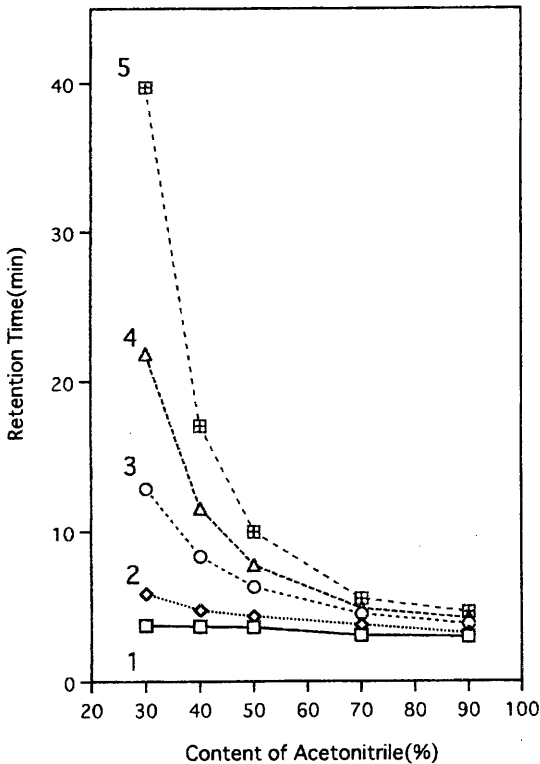


Fig.1 Influence of Acetonitrile Content in Mobile Phase on Retention times of Five Phenols
 1. 2,6-bis(hydroxymethyl)-p-Cresol: HC
 2. Resorcinol: RS 3. Phenol: PH
 4. m-Cresol: CR 5. Xylenol: XL

3.1.1 分離への影響

0.1Mの酢酸緩衝液 (pH4.5) - アセトニトリルの系、流量0.5ml/minで、アセトニトリル含量を変えたときの保持時間の影響を検討した。図1はアセトニトリル含量と保持時間の関係である。溶出は2, 6-ビス (ヒドロキシ)-p-クレゾール (以後HCと略す)、レゾルシノール (RS)、フェノール (PH)、m-クレゾール (CR)、キシレノール (XL) の順であった。保持時間はアセトニトリル含量とともに小さくなり、50%の時に5種のフェノールが15分以内に溶出した。さらにアセトニトリルの量が増加するとすべてのピークの保持時間が小さくなり、90%ではすべてのピークが重なってしまった。緩衝液-アセトニトリル比1:1のときが分析時間として適切で、5種の物質のピークの分離もよかった。

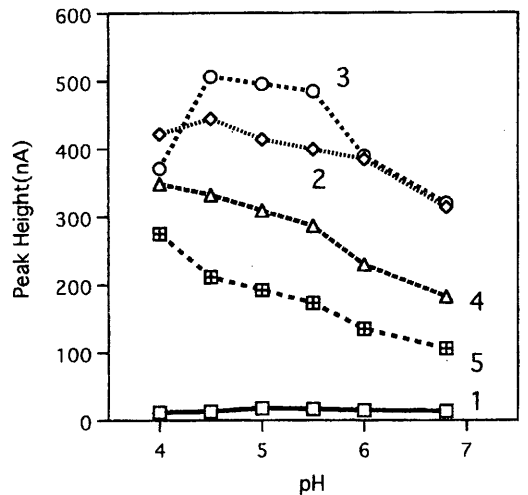


Fig.2 Effect of pH on Peak Heights of Five Phenols
 1. HC 2. RS 3. PH 4. CR 5. XL
 Each Compound: 2×10^{-7} g

次に、緩衝液のpH (4.0~6.8) の保持時間への影響を検討した。この領域のpH変化では、5物質の保持時間はまったく変わらずpHの影響はなかった。また、pHのピーク高さへの影響を図2に示した。

5種のフェノールともpH4.0~4.5で最も高いピークが認められた。pHはシャープで形のよいピークを示す4.5とした。流量は移動相の排液を少なくするために小さくし、しかも安定したクロマトグラムが得られる0.5ml/minとした。

次に、緩衝液濃度の溶出挙動への影響を検討した。緩衝液濃度を0.025から0.2mol/lまで変化させて、5種の物質の保持時間とピークの高さへの影響を調べた。この範囲では、緩衝液濃度の影響はまったく見られなかったので緩衝液濃度は0.1mol/lとした。

3.1.2 電気化学検出器の設定電位

電気化学検出器は物質が電気化学的に酸化されるときに生じる電解電流を測定して物質量を求める選択的で、高感度な検出器としてよく知られている。5種のフェノールに対する検出器の設定電位とピーク高さの関係を検討した。図2はその関係を示すハイドロダイナミックボルタモグラムである。縦軸は1.0Vのときの各ピーク高さで示した。設定電位0.5V以上でピークが現れ、電位の

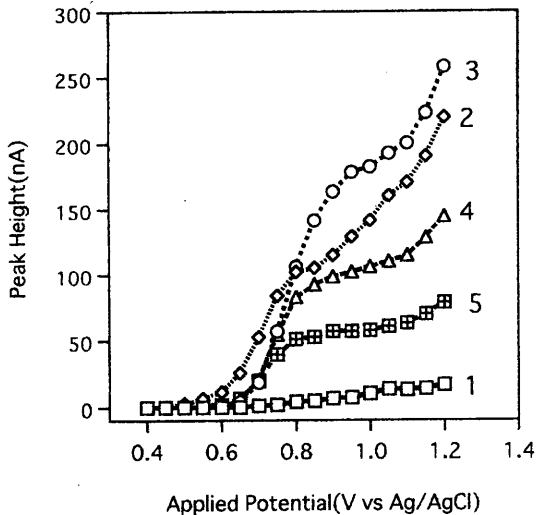


Fig.3 Hydrodynamic Voltammograms of Five Phenols

1. HC 2.RS 3.PH 4.CR 5.XL
Each Compound: 2×10^{-7} g

増大とともに各ピーク高さは大きくなった。5種のピークがほぼ一定の高さを示し、検出器が安定して使用できる1.0Vを設定電位とした。

3.2 クロマトグラム

3.2と3.3の結果より、HPLCの測定条件は、移動相0.1mol/lリン酸緩衝液 (pH4.5) - アセトニトリル (1:1)、流量0.5ml/min、電気化学検出器の設定電位1.0 (VvsAg/AgCl)とした。この条件で測定した5種のフェノールの代表的なクロマトグラムを図4に示した。

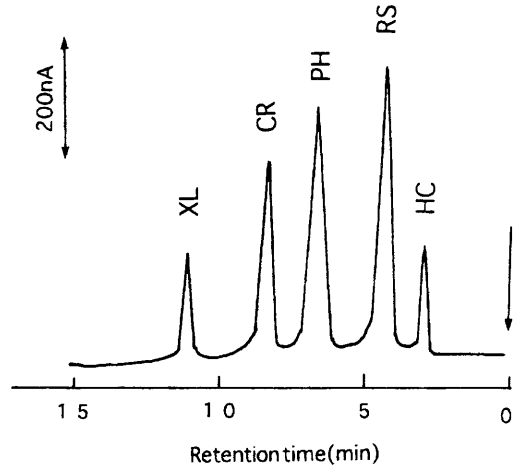


Fig.4 Typical Chromatogram of Five Phenols

Column: Chemcosorb 5- ODS-H, Mobile Phase: 0.1mol/l Phosphate Buffer Soln.(pH4.5)- Acetonitrile(1:1), Flow Rate: 0.5ml/min, Applied potential: 1.0(VvsAg/AgCl)
HC: 2×10^{-6} g, RS, PH, CR, XL: 1×10^{-7} g.

3.3 応答の直線性と最小検出量

5種のフェノールの検量線は 1×10^{-7} から 1×10^{-10} gの範囲で良好な直線性を示した。また、S/N=3の場合の最小検出量はHC500pg, RS, PH, CR, XLは50pgであった。

3.4 固相抽出の検討

従来、試料からの抽出は普通、溶媒抽出で行われてきたが、抽出時に排出する有機溶媒が大量に排出することから最近では固相抽出法がよく用いられている。本研究では、固相抽出と溶媒抽出の二つの方法を比較検討を試みた。

回収試験は5種のフェノール濃度を5, 0, 0.5, 0.05 ppbに調製した溶液で行った。固相抽出では、フェノール類を効率よく吸着するカートリッジタイプのボンドエルトを使用した。コンディショニングは標準的な方法のメタノール10ml、蒸留水10mlでカートリッジを洗浄した。その後、3種のフェノール溶液200mlを10ml/minの流量でカートリッジに通過させて吸着させた。その後1mlのメタノールに溶出した。

表1には、各フェノールの回収率を示した。6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾールの回収率が他のフェノールに比べると若干低い、満足いく結果と考えられる。

Table 1 Recovery Test of Five Phenols by Solid Phase Extraction

Concn.of Five Phenols (ppb)	Recoveries(%)				
	HC	RS	PH	CR	XL
5.0	75	92	85	80	83
0.5	75	90	83	78	80
0.05	70	85	80	75	80

溶媒抽出では、3つの濃度の5種フェノール溶液200 mlを酢酸エチルで、30mlで2回、20mlで1回、振とうして抽出した。その後、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固後、1 mlのアセトニトリルに溶解し、HPLCに注入した。この場合の回収率は各濃度で75%から90%とほぼ固相抽出法の結果と同じであった。このデータはエバポレーターのフラスコの温度が30°Cのときの回収率であるが、35°Cにすると極端に回収率は低下した。これは、溶媒とともにフェノール類が蒸発してしまうためと考えられる。溶媒抽出の場合、振とう操作、ロータリーエバポレーターによる濃縮操作など時間を要し、また試料マトリックスが複雑な系では、さらに精製操作が必要になる。

以上の結果より、固相抽出法は濃縮精製が同時にしかも短時間で行え、有機溶媒の使用量も少ないので非常に良い方法である。本研究では、固相抽出法を採用した。

3.5 河川水中のフェノール類測定への応用

フェノール樹脂を生産する工場脇を流れる河川水を採

取し、前述の固相抽出法により濃縮精製した。試料採取点は工場前と工場の上流、下流500mの3地点である。図5は河川水を固相抽出した後のクロマトグラムを示した。表2には、3地点の測定地を示した。測定結果は、工場からの距離とは関係なくほぼ同じような結果を示した。

Table 2 Determination of Phenols in River Water

測定点	HC	RS	PH	CR	XL
上流500m地点	13.0	-	1.0	0.5	-
工場前	11.0	-	0.9	2.5	-
下流500m地点	11.4	-	0.8	0.6	-

(ppb)

4. まとめ

本分析法はHPLCで分離後、フェノール類のような電気化学的に活性な物質のみに応答する選択的で、高感度な電気化学検出器を使用し、さらに前処理時間を大幅に短縮できる固相抽出法を採用しており、環境中のフェノール類の測定には極めて有効な方法と考える。

本研究は平成8年度共同研究推進費（平成8年から平成10年）により行ったものである。

文 献

- 1) Colborn T., Dumanoski D., Myers JP., "Our Stolen Future." Dutton, New York 1996.
- 2) 環境情報センター, ホームページ www.eic.org/glreport09.html.
- 3) J. Ruana, I. Urbe J. Chromtogr., A655, 217 (1993).
- 4) A. Hagen, J. Mattusch, G. Werner Fresen. J Anal. Chem. 339, 26(1991).

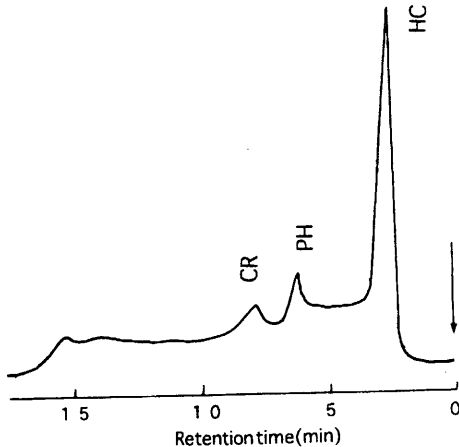


Fig.5 Chromatogram of Phenols in River Water

Summary

The determination of phenols was studied by high performance liquid Chromatography with electrochemical detector. The reversed-phase LC separation of five phenols {2,6-Bis(hydroxymethyl)-p-cresol(HC), Resosinol(RS), Phenol(PH), m-Cresol(CR) and Xylenol(XL)} was attained with 0.1M phosphate buffer solution (pH4.5)-acetonitrile(1:1). The relationship between phenol concentration and electrochemical response showed a good straight line in the range of 1×10^{-7} to 1×10^{-10} g. The lower detection limit of HC and four other phenols were 500pg and 50pg respectively.

A created determination was applied to the analysis of phenols in river water. Solid phase extraction was used for the pretreatment of river water and the time of pretreatment was shortened drastically.

This method was successfully applied for the determination of the five phenols in the river water.