

## p-Nitrophenol 誘導體의 HPLC 에 의한 迅速 分離 定量

李 完 求

국립과학수사연구소

### Rapid Method for Separation and Quantitation of p-Nitrophenol Derivative by HPLC

Wan Koo Lee

*National Institute of Scientific Investigation*

#### Abstract

Various analytical methods for p-Nitrophenol derivatives have been reported as follows. 1) Thin-Layer Chromatography, 2) Gas Chromatography, 3) Cholinesterase Activity Determination, 4) Diazo Method, 5) Nitrophenol Method, 6) Indophenol Method.

But these methods are mainly analyse total quantity of p-Nitrophenol and are not available for the separation and pose some analytical problems associated with extensive clean up procedure.

A rapid and simple method was developed for the separation and quantitation for the p-Nitrophenol and its derivatives by HPLC. Also an experiment was undertaken by the authors for the quantitation of the p-Nitrophenol in the blood of the intoxicated body.

Levels of p-Nitrophenol ranging from approximately 0.10 to 1.69  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for Parathion and 3.44  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for EPN in each sample were measured with the average recovery of  $95.5 \pm 0.52\%$ .

#### 緒 言

p-Nitrophenol 誘導體의 有機磷劑類인 Parathion, EPN, Methyl parathion은 殺蟲效果가 強力하여 오래 전부터 農業用 殺蟲劑로 使用

되고 있다.

이것들은 經口, 經皮, 經氣 등으로 作用하고 溫血動物에 對하여도 猛毒하므로 人畜에 대한 毒性이 커서 自殺 또는 他殺의 目的으로 使用한 例도 많으나 害蟲防除의 目的으로 撒布中 取扱不注意 또는 피부에 塗布함으로써 中毒을

일으켜 死亡한 例도 있다.

이것들이 體內에 吸收되면 酸化물로 된 후 磷酸에스텔과 p-Nitrophenol로 分解되어 磷酸에스텔은 Cholinesterase와 結合되므로 Acetylcholine의 蓄積으로 神經中毒을 일으켜 致死된다고 한다.

이러한 p-Nitrophenol 誘導體들은 TLC, GC 및 Thiourea 誘導體에 依하여 分析하는 方法 以外에 Cholinesterase 活性度 測定으로 有機磷劑 中毒을 判定하는 方法, Diazo 法, Nitrophenol 法, Indophenol 法에 의한 p-Nitrophenol의 測定에 依한 方法등 많은 試驗法이 있으나 이들 대부분은 p-Nitrophenol 誘導體의 分解産物을 測定하는 間接的인 方法이므로 이들 誘導體의 分離定量으로는 不適合한 것이고, 또한 TLC나 GC에 의한 方法등은 試料의 精製등 복잡한 전처리 조작등 많은 문제점을 갖고 있다.

著者等은 HPLC를 利用하여 p-Nitrophenol 및 이들 誘導體에 對하여 邊速하고도 簡便한 分離 定量을 檢討한 結果와 血液中 p-Nitrophenol의 分析法을 確立한후 Parathion의 中毒 死亡者의 血中 p-Nitrophenol 量을 測定한 結果를 이에 보고하는 바이다.

## 實 驗

### 1. 試藥 및 試驗

Parathion (日本 크로마토 工業株式會社製, 標準品 No. 52)

Methyl Parathion ( " )

E.P.N ( " )

p-Nitrophenol (日製特級)

p-Hydroxydiphenyl (日製特級)

Ethyl ether (HLC用)

Petroleum ether ( " )

n-Hexane ( " )

Acetonitril ( " )

Methyl alcohol ( " )

Water ( " )

Hydrochloric acid (特級試藥)

### 2. 裝置 및 測定條件.

Liquid Chromatograph : Waters Associates

Model 6000 A Pump, Model 440 UV detector.

Column :  $\mu$ -Bondapak C<sup>18</sup> (P/N 27324)  
30cm  $\times$  3.9mm ID. Stainless steel,

Guard Column : Bondapak C<sub>18</sub>/corasil.

Mobile Phase : Acetonitril / Water (65:35).

" (60:40)

" (55:45)

Detector : 280nm, 254 nm.

flow rate : 1.0ml / min.

Chart speed : 0.2inch / min.

Attenuation : 0.05 AUFS.

### 3. p-nitrophenol 및 그 誘導體의 分析.

p-nitrophenol 誘導體인 Parathion, Methyl parathion, EPN 등을 0.001% Methanol 溶液으로 하여 Column ;  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (65:35 또는 60:40)의 Liquid Chromatograph에 注入하여 各成分을 分離할 수 있었는바 그 Chromatogram은 <Fig. 1> 과 같다.

### 4. 檢量線의 作成.

p-Nitrophenol 및 Parathion의 標準品을 各各 0.5, 1, 2, 3 및 5ppm 溶液으로 하고 各標準溶液에 p-Nitrophenol (Internal Standard; Int. St.)을 1ppm의 濃도가 되도록 調劑하여 測定條件 2에서 實驗하여 Chromatogram에서 Int. St.의 Peak 높이에 대한 各標準物質의 Peak 높이에 따라 作成한 檢量線은 <Fig. 2>와 같다.

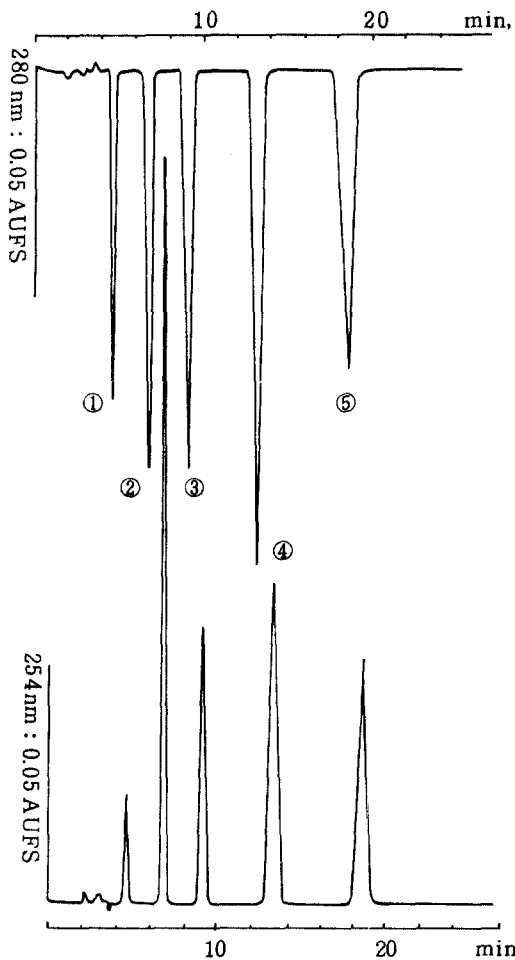


Fig. 1. Chromatogram of p-Nitrophenol Derivatives

- ① p-Nitrophenol ② P-Hydroxydiphenyl
- ③ Methylparathion ④ Parathion
- ⑤ E. P. N

Column:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, Mobile phase : A. N/H<sub>2</sub>O (60 : 40) flow rate: 1 ml/min

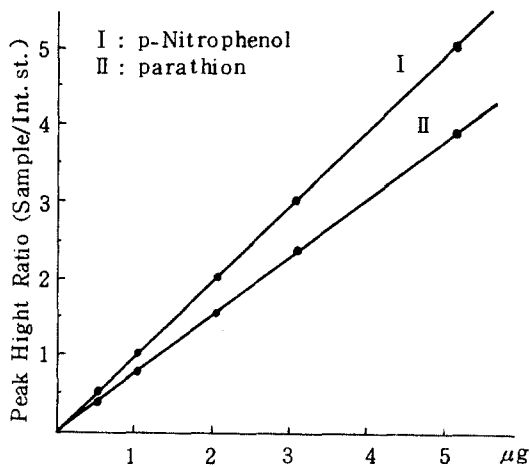


Fig. 2. Calibration curve of p-nitrophenol and Parathion.

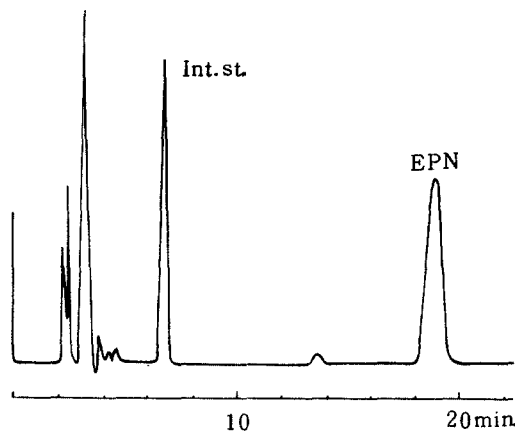


Fig. 3. Chromatogram of sample (E.P.N) with Internal standard.)

Column:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, Mobile phase : A. N/H<sub>2</sub>O (60 : 40), flow Rate : 1 ml/min, Detector : 280nm, attenuation: 0.05 AufS.

### 5. 檢體中 Parathion 및 EPN의 確認

증거물 科搜 3265號('79), 4443號('79), 4641號('79) 등의 위내용물, 尿등을 CH<sub>3</sub>CN 으로 直接油出하고 Int. St. 로 p-Hydroxydiphenyl 을 加하여 測定條件 2 에 따라 實驗한 Chromatogram 에서 Relative Retention Time (R.R.T) 에 의하여 Parathion 및 EPN 을

確認하였는 바 EPN 이 檢出된 證據物에 對하여 實驗한 Chromatogram 은 Fig. 3 과 같다.

### 6. 血液中 p-Nitrophenol 의 含量.

증거물 科搜 4543號('79), 4631號('79), 4844號('79) 등의 血液 · 0.2ml/씩을 추출기에 취하고 C · Hcl 0.2 ml, 물 1 ml 을 加하

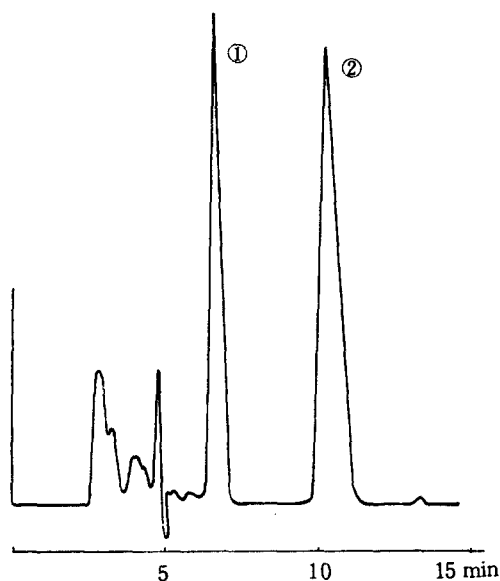


Fig. 4. Chromatogram of p-Nitrophenol in Blood (sample V.) with P-Hydroxydiphenyl  
 Column :  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, Mobile phase, A.N/H<sub>2</sub>O (55 : 45) flow rate : 1ml/min  
 Detector : 280 nm, 0.02 Auf  
 ① P- Nitrophenol ② P-Hydroxydiphenyl

Table I. Amount of p-Nitrophenol in each Sample.

Item Sample No.	Name of Derivative	Amount of p-Ni-trophenol	Route of Intoxica-tion
Sample I (No.3265)	Parathion	0.01 $\mu$ g/ml	Inhalation
II (No.4443)	Parathion	1.13	Oral
III (No.4543)	Parathion	1.69	Oral
IV (No.4641)	EPN	3.44	Oral
V (No.4844)	Parathion	1.19	Oral
VI (No.5085)	Parathion	0.28	Skin
VII (No. 5106)	Parathion	0.90	Oral

코 Petroleum Ether/Ether (4 : 1) 20ml 씩 3 회 抽出 후 40°C 以下에서 減壓 濃縮해서 1ppm p-Hydroxydiphenyl 溶液(Int.St.) 200 l에 溶解시켜 LC에 注入하여 얻은 Chromatogram (圖 4)에서 Int. St의 Peak 높이에 대한 p-

Nitrophenol의 Peak 높이를 求한 후 作成한 檢量線에 의하여 定量한 結果는 表 1 과 같다.

## 結果 및 考察

1. p-Nitrophenol 및 그의 誘導體의 分析法中 T. L. C에 依한 方法으로는 그들의 Rf 價가 類似하였고, 또한 그들의 分解産物인 p-Nitrophenol에 對한 試驗으로는 各成分을 確認하는데 곤란하였으나, HPLC의 Column;  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, Mobile phase ; CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60 : 40 또는 65 : 35)를 flow rate 1.0 ml/min에서는 各成分 分離가 容易하였는데, 이때에 이들 p-Nitrophenol 誘導體는 280 nm 에서 254 nm 보다 強하게 吸收를 일으키므로 254 nm와 254 nm의 UV detector를 同時에 使用함으로써 各成分을 確認할 수도 있었다.

2. Parathion, Methyl Parathion, EPN 은 MeOH/H<sub>2</sub>O의 Mobile phase 에서는 分離가 良好하지 못하였고, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O에서는 CH<sub>3</sub>CN의 容量比가 커지면 Retention time이 짧았으며, 적어질때는 많은 시간을 소비하게 되는바 이들을 分離하는데는 容量比가 가장 適合하였다.

3. 證據物인 胃內容物, 皮膚, 尿에서 TLC에 依하여 確認된 p-Nitrophenol 誘導體는 그 成分을 確認하기 위하여 試料에 3倍 容量의 Acetonitril을 加하여 진탕 후 遠心 分離해서 蛋白質을 제거한 上澄液을 直接 LC에 注入함으로써 Parathion, Methyl parathion 및 EPN을 邊速 簡便하게 分離 確認할 수 있었다.

4. p-Nitrophenol의 分析은 Acetonitril 과 Water를 Mobile Phase로 使用할 때 Acetonitril이 많아질 경우 p-Nitrophenol이 빨리 流出되었으나, 血液에 依한 不純 Peak가 겹쳐 定量이 妨害되었고, 그의 容量比를 55 : 45로 하였을때 가장 適合하였다.

5. 血液中 p-Nitrophenol의 回收率과 再現

성을 試驗하기 위하여 Blank 血液 10 ml 에 p-Nitrophenol 을 各各 5, 10, 20, 30, 50  $\mu\text{g}$  씩 加하여 一晝夜 放置 후 各其 血液 0.2 ml 씩을 抽出器에 취하고 Petroleum Ether/Ether (4:1) 로 抽出하여 無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  로 脫水하고 40  $^{\circ}\text{C}$  以下에서 減壓 濃縮, 乾固시켜 1 ppm p-Nitrophenol 溶液(Int. St.) 200  $\mu\text{l}$  에 溶解시켜 測定條件 2 에서 試驗한 結果는 表 II 와 같고, 그 平均 回收率은  $95.5 \pm 0.52\%$  이었다.

Table II. Recovery of p-Nitrophenol in Prepared Sample.

Adding ( $\mu\text{g/ml}$ )	Found ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)
0.5	0.479	95.8
1	0.963	96.3
2	1.892	94.6
3	2.868	95.6
5	4.760	95.2

Av.  $95.5 \pm 0.52\%$

6. p-Nitrophenol 誘導體에 의해서 中毒 死亡된 者의 血液中 p-Nitrophenol 은 ENP 을 음독한 者의 血液에서 3.44 ppm 으로서 가장 많이 含有되었으며, Parathion 을 頭部등에 塗布하거나, 害蟲의 구제 目的으로 撒布時에 中毒되어 死亡된 者의 血液中에는 0.1~0.28 ppm 이 含有되었다.

이는 EPN 은 Parathion 보다 毒性이 弱하여 많은 量이 體內에 吸收된 結果로 思料되며, 皮膚에 塗布하거나, 撒布時 中毒 致死된 경우는 吸收된 毒物의 量이 적어서 致死時間까지 體內에서 代謝된 結果로 p-Nitrophenol 의 血中 含量이 적은 것으로 思料된다.

## 結 論

1. Parathion, EPN, Methyl parathion 및 p-Nitrophenol 등은  $\mu$ -Bondapak  $\text{C}_{18}$ , Mobil phase  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (65:35) 의 HPLC 에 依해서 迅速 簡便하게 分離 定量되었다.

2. p-Nitrophenol 0.5~5 ppm 을 含有한 血液中 그 回收率은  $95.5 \pm 0.52\%$  이었으며, 血液 0.2 ml 을 取하여 試驗할 때의 測定限界는 0.1 ppm 이었다.

3. p-Nitrophenol 의 含量은 Parathion 中毒 死亡者의 血液에서 0.10~1.69  $\mu\text{g/ml}$  이었으며, EPN 中毒 死亡者의 血液에서는 3.04  $\mu\text{g/ml}$  이었다.

## 參 考 文 獻

- 1) Walker, K. C. and M. Beroza, J. Ass. offic. Agr. Chem., 46, 250 (1963)
- 2) G. F. Ernst and F. Schuring; J. Chromatog, 49.325 (1969)
- 3) S. Sandroni and H. Schitt; J. Chr. 55. 385 (1971)
- 4) Robert A. Vukovich, Anthony J. Triolo, and Julius M. Coon.
- 5) 高木新一: 科學警察研究所 報告, 14(2) 27(1961)
- 6) 高木新一: 科學警察研究所 報告, 14(2) 34 (1961)
- 7) 土井彬堂: 科學警察研究所報告, 25 (2) 38 (1972)
- 8) C. E. Mendoza, D. L. Grant. Analyst, 94, 805 (1969)