

## プロジェクト 2

# 機能性有機物質を用いる高選択的分離分析システムの開発と その環境汚染物質分析への応用

渋川雅美 (応用分子化学科)

### 1. 緒言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は優れた分離分析法として広く認識され、化学、生物学、薬学、医学の各分野をはじめとする多くの研究・産業分野で利用されている。研究の発展や社会の要請の高まりとともに、分析対象となる物質の種類は増加の一途をたどっており、さらにまた多量かつ多種類の共存物質からナノグラム、ピコグラムといった極めて微量の目的物質を分離定量する要求が日ごとに強まっている。特に環境試料中の微量汚染物質の分離定量は困難であることが多く、分離選択性を大きく向上させよう HPLC 分離システムの開発が望まれている。一方、液液抽出法は優れた濃縮分離・精製法として古くから用いられているが、その多くは有害な有機溶媒を用いる場合が多い。最近の環境問題についての社会的関心の高まりとともに、より安全で環境に負荷を与えない新たな抽出法の創出が求められている。本研究は、種々の機能性有機物質を分離材として用い、特異的選択性を持つ新しい分離場を開発することを目的とするものである。ついで、これらの方法を界面活性剤、重金属イオン、農薬など環境汚染物質の分析に適用し、その実用性を評価する。

### 2. 酸化還元化学種変換液体クロマトグラフィーシステムの開発

HPLC は優れた分離法であるが、多数のまた大量の共存成分から目的の成分のみを単離するには、その成分に特異的な選択性をもつ分離系を必要とする。本研究では固定相担体としてだけでなく、電導性を有するとともに酸化還元触媒としても機能することが明らかになった多孔質グラファイトカーボン (PGC) をカラム充填剤として用いることにより、酸化還元反応によるオンライン誘導体化を HPLC に導入し、酸化還元性物質の高選択的分離システムの構築を行った。また、グラファイトを作用電極とし、外部から電位を印加することにより酸化または還元を行う電気化学的誘導体化システムの開発も試みた。

【実験】 2つのオクタデシルシリカ (ODS) カラム (1.5mmφ×150mm; 資生堂製 Capcell Pak UG120) の中間に PGC カラム (4.6mmφ×10mm; バイオテクリサーチ社製) または電解セル (ESA 製クローケム II ガードセル) を配したシステムを構築した。溶離液は pH5 に調整した 0.1M 酢酸緩衝液を用いた。モデル化合物としては各種金属イオンの EDTA 錯体を用い、それぞれ濃度が 0.1mM となるように溶離液に溶解して試料溶液とした。なお、ODS カラムはステアリルトリメチルアンモニウムイオン溶液を通液して処理し、陰イオン交換性を持たせた。錯体の検出は 230nm に設定した UV 検出器を用いて行った。

【結果と考察】 本 HPLC システムは分離場内の特定の位置で化学種を酸化還元反応によって変換し、変換前後の化学種の移動する距離を制御することにより選択的な分離を行うものである。この場合、HPLC におけるその溶質の保持は、それぞれの化学種として移動した距離で決定されることになる。PGC カラムの酸化還元機能はカラムを酸化剤または還元剤溶液で処理することにより制御することを既に明らかにした。そこで、PGC を酸化処理することによって酸化触媒として機能するようにし、前段のカラムで還元体、後段のカラムで酸化体として溶離するシステムを構築した。このシステムに Fe(III)、Bi(III)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II) の EDTA 錯体の混合物を供したときに得られたクロマトグラムを図 1 に示す。また、比較のために、1本の ODS カラムで得られた金属 EDTA 錯体のクロマトグラムを図 2 に示す。図 1 からわかるように、本システムでは Co 錯体が他の金属錯体から完全に分離されている。一方、通常の HPLC では図 2 に示したように同一の電荷を持つ金属錯体どうしの分離は

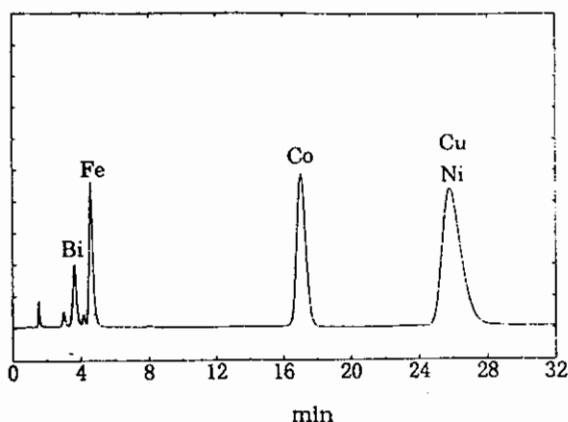


図1 PGC カラムを組み込んだオンライン酸化誘導体化 HPLC システムにおける金属 EDTA 錯体のクロマトグラム

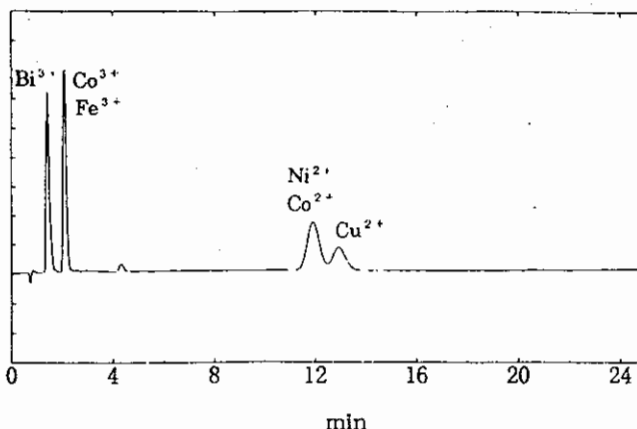


図2 ODS カラムにおける金属 EDTA 錯体のクロマトグラム

極めて難しい。本システムでは、Co 錯体は前段の ODS カラムで2価錯体として、また後段のカラムでは3価錯体として移動しているため、極めて選択的に分離できたのである。PGC は用いる酸化剤または還元剤の濃度や処理時間によってその表面電位を変化させ、酸化還元触媒機能を変えることができる。したがって、分析目的化合物に適合する酸化還元電位に設定して選択的な分離を行うことが可能である。

酸化還元反応を電解セルを用いて電気化学的に行えば、制御がより容易になると考えられる。しかしこの場合、電解は完全に行われなければならない。そこで、Co(II)錯体を対象として、ODS カラムの前段に電解セルを組み込んだシステムを用いて酸化効率に及ぼす印加電圧と流量の効果を検討した。0.1ml/min において電圧を変化させたところ、0.1V (vs. Pd 電極) で Co(II)錯体のピークは減少しはじめ、Co(III)錯体のピークが生じた。さらに 0.5V 以上では Co(II)錯体のピークは消滅し、これ以上の電圧では Co(III)錯体のピーク面積は一定値を示した。一方、0.5V において Co(III)および Co(II)錯体のピーク面積の流量依存性を調べたところ、0.1ml/min 以下の流量では Co(II)錯体は3価に完全に酸化されることがわかった。そこで、電解セルを2本の ODS カラムの中間に組み込み、印加電圧 0.6V、流量 0.1ml/min で、PGC カラムを用いたときと同様に他金属錯体からの Co 錯体の分離を試みた。その結果を図3に示す。電圧を印加しない条件(開回路)では Co 錯体は2つの分離カラムを2価錯体として移動しており、同じ電荷をもつ Ni(II)錯体のピークと完全に重なっている。これに対して、セルに電圧を 0.6V 印加すると、PGC カラムを用いたときと同様に Co 錯体を選択的に分離することができた。上記2つの方法により、これまで試みられてこなかった反応速度が小さい酸化還元反応を HPLC の分離場に組み込むことが可能となり、選択性の高い分離系を構築することに成功した。

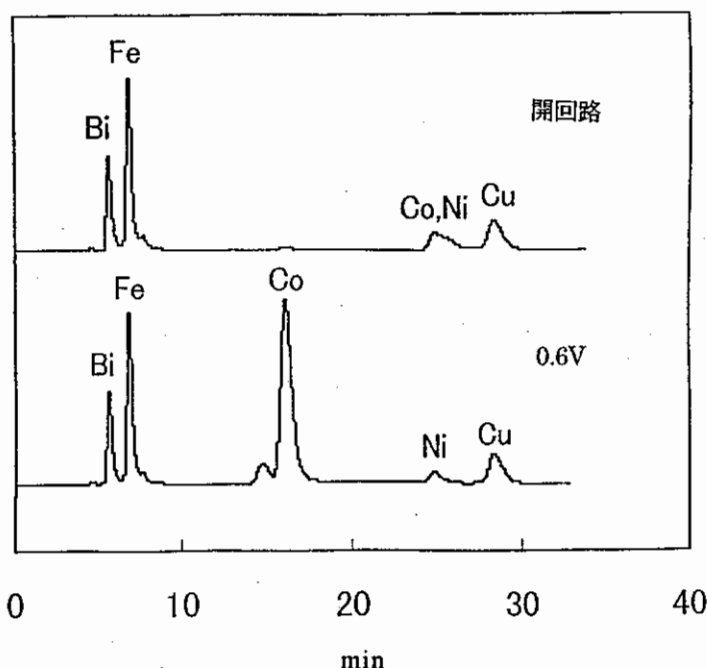


図3 電解セルを組み込んだオンライン酸化誘導体化 HPLC システムにおける金属 EDTA 錯体のクロマトグラム

### 3. 電気伝導度検出 HPLC および LC/MS による陽イオン界面活性剤の分離定量

陽イオン界面活性剤は、ヘアーリンスや衣料用柔軟仕上げ剤等の主成分として日常的に広く使用されている。しかし、陽イオン界面活性剤は殺菌消毒性があるため、微生物分解を受けにくく、水生生物への影響が危惧されている。このため、環境水中の陽イオン界面活性剤の定量は非常に重要であり、極低濃度の陽イオン界面活性剤の迅速な分析法の確立が望まれている。しかし、現在 JIS の参考法とされている溶媒抽出吸光光度法は操作が煩雑で感度が低い上、陽イオン界面活性剤を種別に定量することができない。本研究では、親水性高分子ゲルカラムを用いた HPLC が陽イオン界面活性剤を種別に分離定量する優れた方法になりうると考え、基礎的な検討を行った。

【実験】分離カラムとしてはポリビニルアルコールゲルである Shodex Asahipak GF-310-HQ (4.6mmφ × 150mm; 昭和電工製) を用いた。検出は電気伝導度検出器 (東ソー製 CM-8) または質量分析計 (Waters ZQ) を用いて行った。電気伝導度検出にはサブレッサー (Dionex CMMS-II) を用い、このときの溶離液には 0.4mM 4,4'-ジピリジル/0.8mM HCl/27%アセトニトリルを使用した。流量は 0.6ml/min とした。また、サブレッサーの再生液には 5mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド水溶液を用いた。一方、LC/MS における界面活性剤の溶離は、0.4mM 4,4'-ジピリジル/0.8mM HCl/10%アセトニトリル(A) とアセトニトリル(B)を用いたグラジエント溶離法により行った。ここで、B の混合比を 25% から 35% まで 7 分間で直線的に変化させた。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法により行い、流量は 0.25ml/min に設定した。モデル化合物としては、ドデシルトリメチルアンモニウムイオン(DTMA)、セチルトリメチルアンモニウムイオン(CTMA)、テトラデシルジメチルベンジルアンモニウムイオン(TDDBA)、およびステアリルトリメチルアンモニウムイオン(STMA)を用いた。

【結果と考察】カラム充填剤としてはシリカゲルを基材としたものがカラム効率が高く機械的強度も優れているため、最も広く使用されている。しかし、陽イオン界面活性剤はシリカゲル表面に存在するシラノール基への吸着が非常に強く、これを防ぐためには溶離液に高濃度の酸を添加しなくてはならない。また、シリカゲルに疎水性官能基を導入した充填剤は、疎水性吸着が大きく、クロロホルムなどの有機溶媒を溶離溶媒として用いる必要がある。これらはいずれも環境への問題、および感度の低下など検出器への影響を考えると適当でない。そこで、親水性高分子を基材とするカラム充填剤が水溶液系において陽イオン界面活性剤に対して適度な保持を示すのではないかと考え、種々の充填剤について検討した。その結果、ポリビニルアルコールゲルが最も陽イオン界面活性剤の分離に適していることが明らかになり、これを充填したカラムを使用することとした。

移動相についても種々検討した結果、サブレッサーを用いた電気伝導度検出に適しており、かつ陽イオン界面活性剤に対して強い溶出力をもつ 4,4'-ジピリジル/塩酸溶液を用いることとした。電気伝導度検出 HPLC により得られた陽イオン界面活性剤のクロマトグラムを図 4 に示す。4 種類の陽イオン界面活性剤が完全に分離されていることがわかる。検量線 (ピーク面積 vs. 濃度) は少なくとも試料注入量 50 $\mu$ l において濃度 40 $\mu$ M までは良好な直線関係を示した。また、検出限界はバックグラウンドノイズの標準偏差の 3 倍で表して 30-50nM となり、従来の電気伝導度検出または間接吸光光度検出 HPLC について報告されている値より 1 桁以上低い値を示した。

一方、LC/MS システムでは 20 $\mu$ l 注入において 0.03-0.06nM という極めて低い検出限界が得られた。検量線の直線性も良好で、少なくとも 1nM までの濃度範囲で原点を通る直線となった。この結果は、河川や湖沼ばかりでなく、海水中の極低濃度の陽イオン界面活性剤も定量可能であることを示唆している。

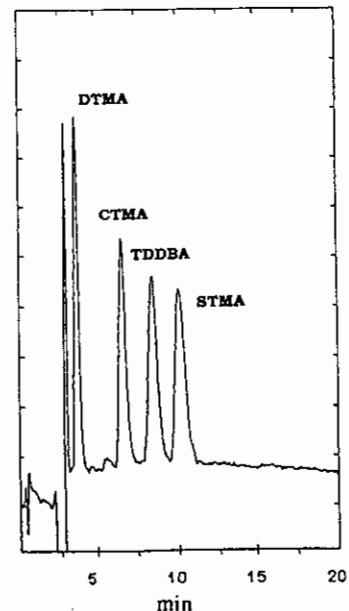


図 4 電気伝導度検出 HPLC における陽イオン界面活性剤のクロマトグラム

#### 4. 高選択的水性二相抽出法の開発

液液抽出法は優れた濃縮分離・精製法として古くから広く用いられている。しかし、その多くは毒性の高い有機溶媒を用いる場合が多い。そこで、有機溶媒を使わない環境にやさしい新しい液液抽出法の開発が望まれている。2種類の水溶性高分子と水、または1種類の水溶性高分子と塩および水とから構成される水性二相系を用いた抽出法は、従来、生体関連物質の生理活性を損なわないことからその分離法として用いられてきた。しかし、近年の環境問題に関する社会的関心の高まりとともに、無機化合物の分離を目的とした研究も行われはじめている。本研究では、無機陰イオンとの錯形成反応を利用した金属イオンの高選択的抽出分離を目的として、ポリエチレングリコール(PEG)/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水性二相抽出系における種々の金属イオンの抽出挙動を系統的に検討した。

【実験】PEG4000（平均分子量3,000）の50%(w/w)水溶液とNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の20%(w/w)水溶液を所定の割合で混合して水性二相系を構成した。これに試料金属イオンとNaCl, KBr, KI, またはKSCNを一定量添加し、希硫酸で水素イオン濃度を調整した。この溶液を恒温槽で25℃に保った後、10分間振とうし、ついで2000rpmで遠心分離を10分間行った。上相および下相をそれぞれ2g分取し、水で25mlに希釈した後、原子吸光法により金属イオン濃度を測定した。

【結果と考察】ヨウ化物イオンおよびチオシアン酸イオン添加系における種々の金属イオンの抽出率と添加陰イオン量との関係を図5と6に示す。いずれもそれぞれ金属イオンによって異なる抽出挙動を示していることがわかる。平衡論的解析の結果、これらの金属イオンの抽出は主に添加陰イオンならびに硫酸イオンとの錯生成定数によって決まることが明らかになった。一方、図5から、ヨウ化物イオン添加系では、Cdが選択的に抽出されていることがわかる。Cuもわずかに抽出されているが、これはヨウ化物イオンによって2価から1価に還元されたためと考えられる。そこで、Cuイオンをアンモニアでマスクングし、Cdを選択的に抽出する系の構築を試みた。その結果、Cuはアンモニアの添加によりPEG相への抽出が抑制されて抽出率が3%以下となり、Cdの選択的抽出が達成された。水性二相系におけるマスクングは従来の有機溶媒を用いる抽出系におけるそれとは根本的に異なっており、系統的な研究が必要である。

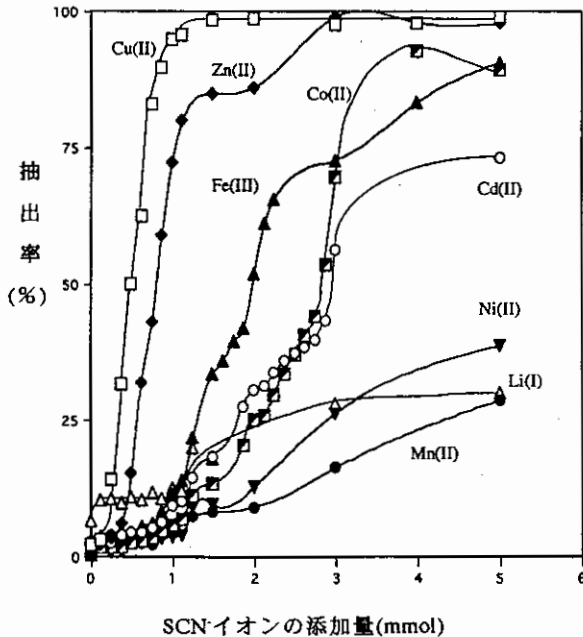


図5 水性二相系におけるチオシアン酸イオンによる金属イオンの抽出  
(水性二相系は50%PEG溶液3.0gと20%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液6.0gを混合して調製した)

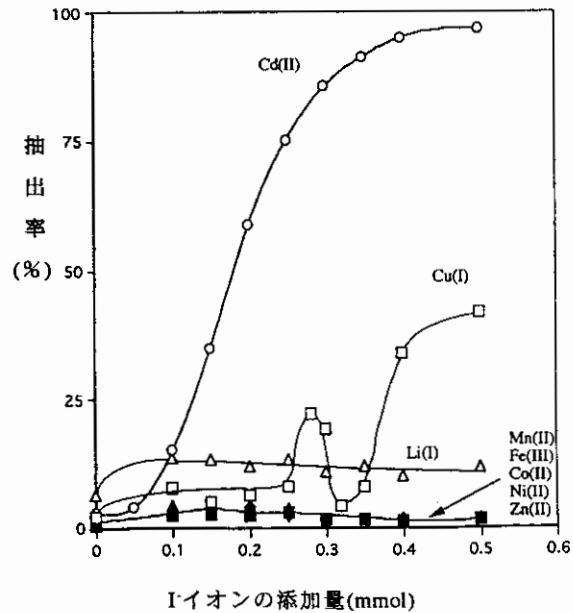


図6 水性二相系におけるヨウ化物イオンによる金属イオンの抽出  
(水性二相系の構成は図5と同様である)