

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

HPLC は優れた分離分析法であり、非常に多くの分野で利用されている。しかし、各分野におけ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極微量の目的物質を分離定量する要求が強まっている。一方、分離法の多くは二相間分配または吸着に基づくものであり、その過程において有害な有機溶媒を使用するケースが多い。このため近年では、有機溶媒を使用することなく、より安全で環境に負荷を与えない新たな分離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料として用い、環境に優しく特異的選択性を持つ新しい分離法を開発することを目的とするものである。本年度における研究経過および成果を下記の4つの項目について報告する。

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

これまでに、多孔質グラファイトカーボン (PGC) の酸化還元触媒機能を利用した酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築し、金属錯体の新しい選択的分離法としての有用性を示してきた。^{1,2)} 一方昨年度より、グラファイトを作用電極とする電解セルを HPLC に組み込むことにより、酸化還元化学種変換を行うシステムの開発に着手した。これは2つの分離カラムの間に電解セルを設置して化合物を酸化還元反応によって化学種変換し、変換前後の化合物の分離カラム内での移動速度を変化させて選択的分離を目指すものである。これまでの研究で、各種の金属イオン混合物からコバルトを EDTA 錯体として選択的に分離できることが明らかになった。本年度は、金属材料中の微量金属の定量への適用を目指して、伸銅中の微量コバルトの定量について検討した。³⁾

【実験】 電解セルには多電極型電気化学検出器 (ESA 製 Coulochem II) のセルを用いた。溶離液は pH5 に調整した 0.1M 酢酸緩衝溶液を用い、窒素ガスでバブリングしながら通液し

た。試料は、Fe(III)、Co(II)、Cu(II)、Ni(II) のジアミノシクロヘキサン (DCTA) 錯体を用いた。伸銅標準試料はばね用洋白板 (JIS C7701, コバルト含有量 416ppm (吸光光度法)) を用い、その分解は JIS に規定されている方法を参考に行った。また、伸銅の試料溶液には Mn(II) イオンを添加し DCTA をマスキングした。サンプルループ体積は 4 μ l とした。分離カラムには Capcell Pak C18 UG120 (1.5mm i.d. \times 150mm) を用いた。なお分離カラムはトリメチルステアリルアンモニウムクロリド (TMSA) を含む溶液を流して処理したものと処理していないものを用いた。検出は UV 検出器を用い 230nm の波長で測定した。

【結果と考察】 分離カラムの前に電解セルを組み込んだシステムにより Co(II) 錯体の電解酸化条件を検討した。印加電位を高くすることにより Co(II) の他に Co(III) 錯体のピークが現れ、0.1V (Pd 電極対照) 以上で Co(III) 錯体のピーク面積は最大となった。また、一定の電位 0.1V、流量 0.02–0.10ml/min における Co(III) 錯体のピーク面積は一定であった。これらは電位 0.1V 以上かつ流量 0.10ml/min 以下の条件下で Co(II) 錯体を完全に Co(III) 錯体に酸化できることを示している。つぎに、各金属錯体の溶出順を検討した結果、TMSA 処理していない分離カラムでは Co(III) < Cu(II) < Ni(II) \approx Co(II) < Fe(III)、TMSA 処理した分離カラムでは Co(III) < Fe(III) < Cu(II) < Co(II) \approx Ni(II) であった。また Co(III)、Fe(III) 錯体の保持は TMSA 処理にかかわらず変化が見られなかった。これは DCTA のシクロヘキサン環による固定相のオクタデシル基との疎水性相互作用と、錯体の陰電荷と固定相表面に吸着した TMSA との静電的相互作用によるものと考えられる。TMSA 処理していない分離カラムでは疎水性相互作用が主な分離機構として作用するため、-2 の電荷を有する二価錯体群は -1 の電荷を有する Fe(III) 錯体より速く溶出したと考えられる。これに対して TMSA 処理した分離カラムでは静電的相互作用も生じるため、電荷の大きい二価錯体群の保持が大きくなり、また電荷の小さい三価錯体は静電的相互作用の影響が小さいため保持

に変化が見られなかったと推測される。以上の結果から TMSA 処理していない分離カラムの前に 0.3V に設定した電解セルを組み込んだシステムにより伸銅中の微量コバルトの分離を試みた。Co(II)錯体は電解セルで酸化されて Co(III)錯体として移動するため、伸銅中に多量に含まれる Cu や Ni の錯体の前に溶出した。これは Co 錯体のピークは高濃度試料由来のテーリングの影響を受けないことを示している。しかし、Co 錯体の前に大きな NO₃⁻ のピークが現れたほか、Co 錯体の溶出位置に他の共存物質が溶出したため、Co 錯体のピークは完全に分離できなかった。そこで、電解セルを 2 本の分離カラムの間に設置し、前段のカラムには TMSA 処理していないものを、また後段には TMSA 処理したものを用いて実験を行った。Fig.1 にそのクロマトグラムを示す。Co 錯体は前段のカラムでは 2 価錯体として移動して溶出の速い NO₃⁻ と分離し、また後段のカラムでは電解セルにより酸化されて 3 価錯体として移動しているため共存物質、および他の金属から完全に分離された。このシステムを用いて標準添加法により Co の定量を行った。Fig.2 にそのプロットを示す。ピーク高さ、ピーク面積についてともに良好な直線関係が得られ、定量値は 416ppm と保証値と一致した。これらの結果は、電解セルを利用した酸化還元化学種変換 HPLC による特異的な分離選択性を利用することにより、特別な前処理をせず銅中の微量コバルトを定量できることを示すものである。

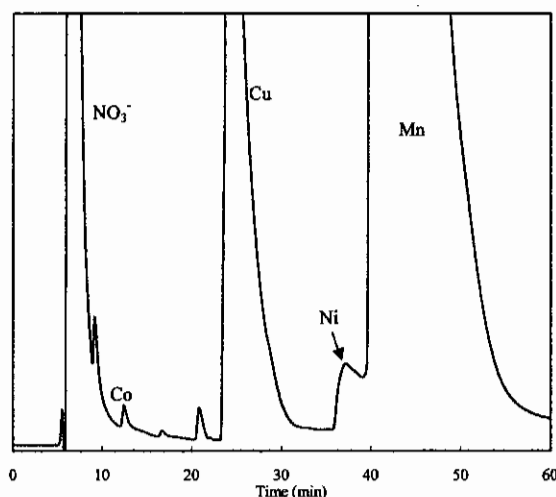


Fig.1 Separation of cobalt from copper alloy

Sample: 938.7mg/ml Copper alloy,
30mM DCTA, 30mM MnSO₄
Flow rate: 0.07ml/min
Applied potential: 0.3V

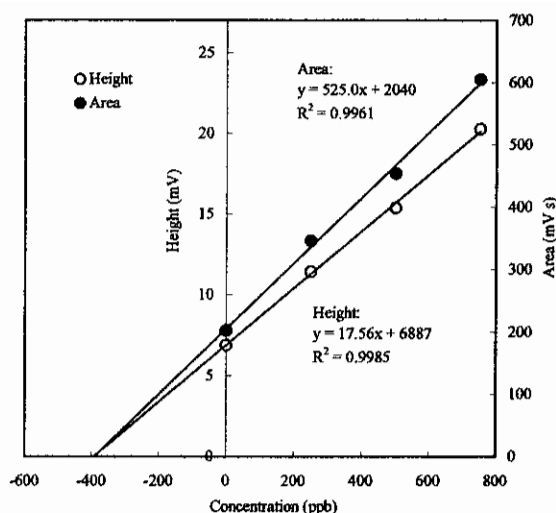


Fig.2 Standard addition plots of cobalt.

3. LC/MS による環境水中の陰イオン及び陽イオン界面活性剤の同時分析

合成界面活性剤の環境水中での挙動を解析するためには総量の測定では不十分で、種別の定量が必要である。陰イオン界面活性剤 (AS) は、洗剤や乳化剤などの主原料として使用され、河川水中に数 10 ppb から数 ppm のレベルで高濃度に存在している。また、陽イオン界面活性剤 (CS) は、リンスの主原料として使用され、河川水中の存在量は AS の数百から数千分の 1 と非常に低濃度であるが、殺菌消毒性があるため水生生物への影響が危惧されている。昨年度までに我々は、環境水中に存在する極微量の CS の分離定量法の確立を目的とし、親水性高分子ゲルカラムを用いた電気伝導度検出 HPLC システム^{4,5)}及び LC/MS システムについて検討を行ってきた。その結果、従来の間接吸光度検出 HPLC について報告されている値より 1 桁以上低い ppb レベルの検出限界を与える高感度な電気伝導度検出 HPLC システムを構築するとともに、移動相成分として使用するアセトニトリルの濃度低減に成功した。また、LC/MS システムでは ppt レベルの非常に低い検出限界が得られた。これらのシステムと、バッチ法及びオンラインでの固相抽出による試料の前濃縮の組み合わせにより、河川水中の CS の簡便かつ迅速な定量法を確立することができた。^{5,6)}

河川水中で CS は、AS とイオンペアを形成して存在していると考えられている。従来の CS の定量法では、その低濃度の検出をいかに可能にするかということと、その数百倍から数千倍以上存在する AS をいかに取り除くか

が大きな問題点となっていた。しかしながら、我々が確立したLC/MSシステムによるCSの分析においては、20000倍の濃度のAS共存下でもまったく問題なくCSの定量が可能であった。その理由としては、当初MSでの選択的な検出によると考えていたが、その後の検討により、カラム内でCSとASが完全に分離されている可能性が示唆された。これまで、その相反するイオンの性質と存在量の違いから、ASとCSの同時定量は試みられていない。そこで本年度は、AS及びCSの同時分離・定量法の開発を目的として、親水性高分子ゲルカラムを用いたLC/MSシステムについて新たに条件検討を行った。また、河川水試料を固相抽出により前処理を行った後、確立したLC/MSに供してASとCSの同時定量を試みた。

【実験】 AS標準試料としては、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)標準溶液(アルキル鎖の炭素数が10から14の同族体の混合物、以下C_n-LAS (n=10~14)と表示)を使用した。また、CS標準試料としては、セチルトリメチルアンモニウムイオン(CTMA)及び、トリメチルステアリルアンモニウムイオン(TMSA)を使用した。分離カラムは、Shodex MSPak GF310 4D (4.6 mm I.D.×150 mm, 6 μm)を用いた。溶離液としては、0.8 mM ジ-n-ブチルアンモニウムイオン(DBAA)を含む、アセトニトリル-水混合溶媒(酢酸にてpH 3に調整)を使用し、アセトニトリル濃度(v/v)36%から44%のグラジエントにより溶出を行った。検出器はWaters ZMDを使用した。イオン化はエレクトロスプレー法により行い、AS及びCSの分子イオンについてそれぞれネガティブ及びポジティブモードでのシングルイオンモニタリング(SIM)により定量を行った。河川水試料の前処理は、GL-Pak PLS-3を用いた固相抽出法により行った。PLS-3からの試料の溶出には、4 mM 4,4'-ジピリジル/8 mM HCl / 75%アセトニトリルを使用した。分析は溶出液をカラムに20 μl注入することにより行った。

【結果と考察】 ASとCSの混合標準溶液のSIMクロマトグラムをFig. 3に示した。使用したMS検出器は、正負イオンの同時モニターが可能である。本研究では、エレクトロスプレー部及び検出器側の電圧を2~4秒ごとに正負反転させるように設定し、1回の試料注入でAS及びCSの同時モニターを試みた。AS及びCSのカラムからの溶出順は、CTMA、TMSA、C10-LAS、C11-LAS、C12-LAS、

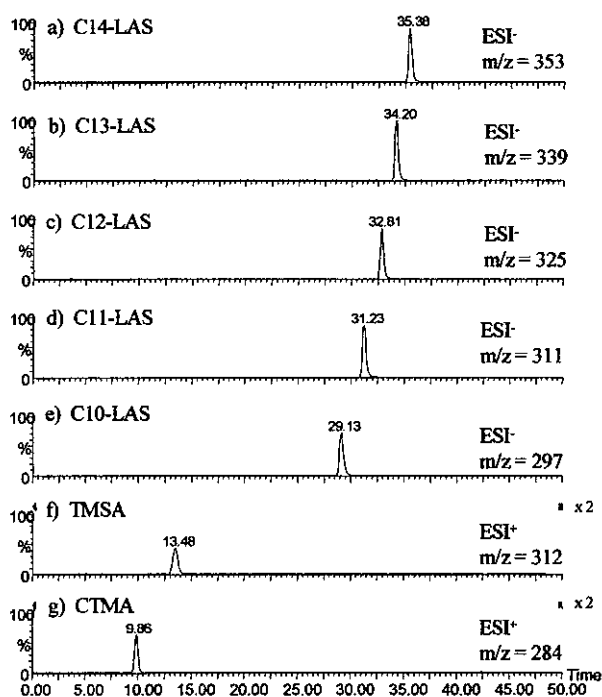


Fig. 3. SIM chromatogram obtained for an injection of a standard solution of AS and CS
AS, 1 ppm; CS, 30 ppb

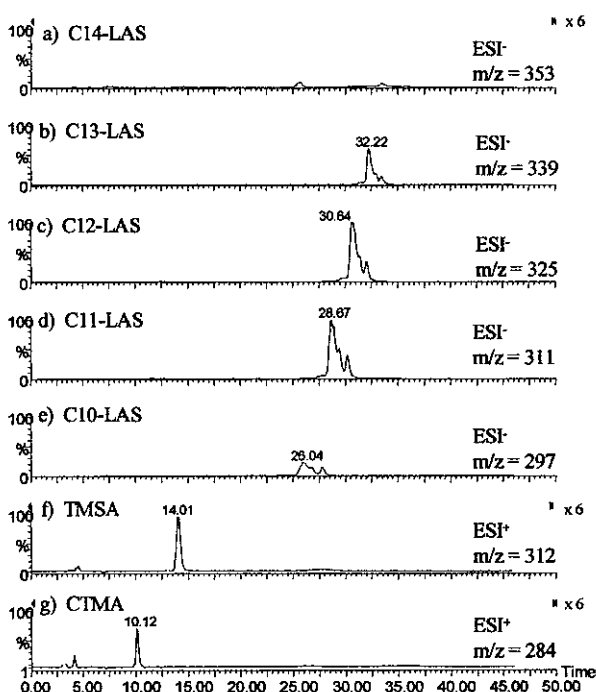


Fig. 4. SIM chromatogram of a river water sample

C13-LAS, C14-LASとなった。これは、親水性高分子ゲルカラムにおけるこれらの界面活性剤の保持が、主に逆相分配モードに基づくものであることを示している。LASの保持時間がCSよりも長くなったのは、フェニル基の存在による疎水性の増大に起因すると考えられる。DBAAを加えない溶離液を使用した場合、

各 LAS の溶出時間は5分程度短くなった。これより、本研究で使用した溶離液中で LAS は、DBAA とイオンペアを形成してカラム内を移動していると考えられる。また、DBAA の存在にかかわらず AS と CS は同時に観測されなかったことより、カラム内で両者はイオン対を形成することなく、完全に分離されることが確認された。AS 及び CS の検量線は、それぞれ 1 ppm 及び 30 ppb までの範囲で良好な直線関係を示した。検出限界は、AS が 0.07~0.18 ppb, CS が 9~13 ppt と見積もられた。

次に、LC/MS により得られた河川水試料の SIM クロマトグラムを Fig. 4 に示す。試料は、海老川(千葉県船橋市)の河川水を PLS-3 により 2 倍濃縮したものを使用した。河川水試料から検出された LAS には、C10~C13 のものが多く含まれていたが (Fig. 4 b-e), これらの保持時間は標準試料 (Fig. 3 b-e) のそれよりもかなり小さく、またそれぞれについて複数のピークが認められた。これは、実際に洗剤などで使用されている LAS が、アルキル鎖へのフェニル基の結合位置の異なる複数の異性体の混合物であることに起因すると考えられる。標準試料として使用した LAS は、すべてアルキル基の 1 位にフェニル基が結合した構造 (1-Ph 型 LAS) であるが、河川水試料から検出された LAS には 1-Ph 型がまったく存在しなかった。これは、工業的合成法における LAS の異性体分布が、2-Ph 型から 6-Ph 型に偏るためである。これらの異性体を区別することなく、C10~C13 の LAS について絶対検量線法による定量を行った結果、0.1~0.4 ppm (回収率 84~91 %) と定量された。また CS については、CTMA と TMSA についてそれぞれ 1 ppb (回収率 96 %), 5 ppb (同 92%) と定量された。これらの結果より、固相抽出による前処理と親水性高分子ゲルカラムを用いた LC/MS システムにより、環境水中の極微量の CS と、その数百倍存在する AS の同時定量が可能であることが明らかになった。

4. 水性二相抽出法の開発とその高速向流クロマトグラフィー分離への展開

2 種類の水溶性高分子または高分子と無機塩の水溶液を用いて構成される水性二相系を用いる抽出法は、有機溶媒を使わない環境に優しい液液抽出法としての利用価値が認識されてきている。一方、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)は強い遠心力とアルキメデスのスクリー効果によって液体をカラム内に固定し、その液体と混和しない他の液体を送

液することにより、二相間での分配平衡を利用して分離を行うシステムであり、液体を固定相として用いるため、溶質の吸着剤への不可逆的な吸着による損失がないという大きな特徴がある。⁹⁾ 本年度は、水性二相系を用いた高速分離を目的として、チオシアン酸イオンを抽出剤として用いたポリエチレングリコール(PEG)- Na_2SO_4 水性二相系を HSCCC に導入し、金属イオンの一斉分離法の開発を目的として検討を行った。^{10,11)}

【実験】 HSCCC 装置には東日本セミコンダクタテクノロジー製 J 型高速向流クロマトグラフを用いた。カラムチューブは内径 2mm, 内容量 60.5ml のテフロンチューブを用いた。水性二相系は PEG 1000, Na_2SO_4 , 水により構成し、その上相(PEG に富む相)を固定相に、下相(Na_2SO_4 に富む相)を移動相とした。試料としては IO_3^- , NO_3^- , I^- , SCN^- , CrO_4^{2-} のカリウム塩および Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} の硫酸塩を用いた。金属イオンは、ポストカラム反応試薬として 4-(2-ピリジルアゾ)レゾルシノール(PAR)を用い、UV/VIS 検出器により 520nm の波長で検出を行なった。

【結果と考察】 水性二相系は高分子を用いるため、高分子溶液相の粘性が高く、カラムの背圧が大きくなるという問題がある。そこでこの問題を低減するために、比較的分子量の小さい PEG1000 を用いることにした。分離度に及ぼすドラムの回転速度の影響を、試料として IO_3^- , NO_3^- , I^- , SCN^- を用いて検討した結果を Fig.5 に示す。ここで固定相の PEG 濃度は 35%(w/w)とした。分析時間短縮のためには流量を大きくしなくてはならないが、安全のため 3.5ml/min に設定した。Fig.5 に示したように回転速度は大きくするほど分離度の向

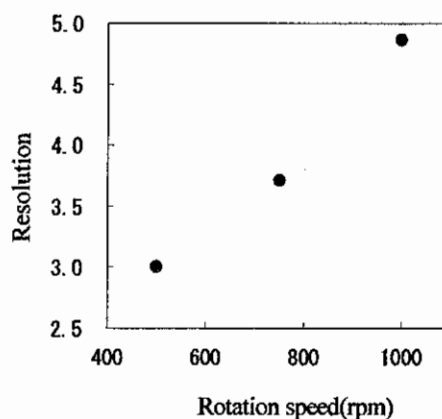


Fig.5 Dependence of resolution on rotation speed
Flow rate:3.5ml/min

上が見られたため、装置上の限界である 1000rpm に設定した。

次に SCN⁻イオンとの錯形成反応を利用した金属の HSCCC 分離を検討した。まず各金属イオンの保持時間と移動相中の SCN⁻濃度との関係を調べた。その結果を Fig.6 に示す。SCN⁻濃度が高くなるに従って Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Cd²⁺の順に固定相へ保持されていくことが明らかになった。一方、Ni²⁺, Mn²⁺, Cr³⁺は SCN⁻濃度を 0.4M にしても全く保持されなかった。CrO₄²⁻は SCN⁻を添加していない系でも比較的大きな保持がみられた。以上の結果に基づいて SCN⁻高濃度側から低濃度側へグラジエントプログラムを設定し、混合金属イオンの一斉分離を行った。Fig.7 は Ni²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺の一斉分離を示したものである。この結果は、水性二相 HSCCC により 5 つの金属イオンが完全に分離できることを示している。¹¹⁾

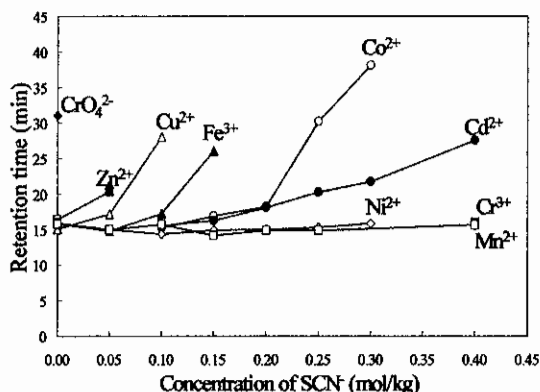


Fig.6 Dependence of retention time of metal ions on concentration of SCN⁻

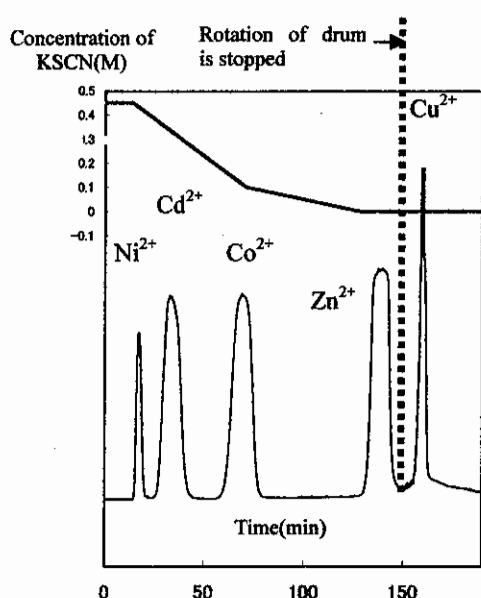


Fig.7 Separation of five metal ions by HSCCC

5. 超高温水クロマトグラフィーの開発とその環境汚染物質分析への応用

水は極性の高い溶媒として知られ、低極性の有機溶媒と組み合わせて液液抽出系を構成したり、逆相液体クロマトグラフィーの移動相成分として用いられる。後者においては、比較的高極性の有機溶媒と混合して極性を調節するのが一般的である。しかし、水は高温高压下では極性が大きく低下し、多くの有機化合物を溶解する能力を持つことが知られている。そこで、環境への負荷の小さい分析技術の構築を目的として、高温高压状態の水(超高温水)を移動相とした逆相 HPLC の開発を目的として研究を行なった。¹²⁻¹⁷⁾

【実験】 カラム充填剤としては、ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体樹脂 (PS-DVB) および C₁₈ シリカを用いた。装置は、デガッサー、ポンプ、インジェクター、カラムオープン、熱交換コイル、圧力調整器から構成し、検出器としては UV 検出器または水素炎イオン化検出器 (FID) を使用した。HPLC と FID の接続は、カラム出口で流出液の一部をスプリットし、溶融シリカキャピラリー管を介して FID に導入することによって行った。

【結果と考察】 フェノール類を試料として、PS-DVB と C₁₈ シリカの超高温水に対する耐久性を比較したところ、C₁₈ シリカでは通水時間とともに保持時間の現象が観測された。通液前後の C₁₈ シリカを元素分析した結果、保持の減少はオクタデシル基の剥離によるものであることがわかった。一方、PS-DVB では保持の変化は見られず、耐久性に優れていることが明らかになった。^{13,14)}

超高温水クロマトグラフィーでは移動相溶媒として水のみを用いるので、紫外部でのバックグラウンド吸収が低く、高感度な検出が可能である。PEG は UV 吸収が弱く通常の HPLC では UV 検出が困難であるが、本法では波長 190 nm での検出が可能であることがわかった。カラム温度が PEG の分離に及ぼす影響を検討したところ、各オリゴマーはカラム温度が高いほど保持が弱くなった。そこで、温度プログラミングを適用した超高温水クロマトグラフィーによる PEG の分析を試みた。¹⁶⁾ その結果を Fig. 8 に示す。各オリゴマーが高い分離度で分離されていることわかる。この方法を、外因性内分泌攪乱物質(環境ホルモン)の一つといわれている河川水中のビスフェノール A の分析に適用し、良好な結果を得た。¹⁷⁾

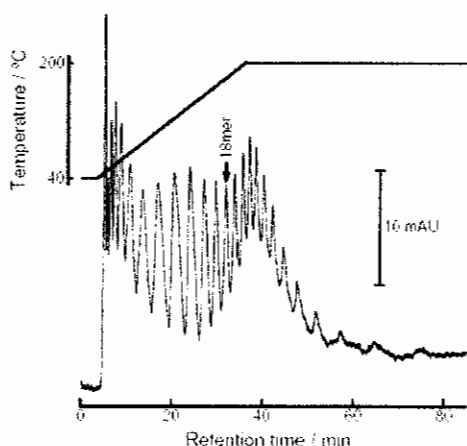


Fig.8 Superheated Water Chromatogram of PEG

6. 参考文献

- 1) M. Shibukawa, A. Unno, Y. Oyashiki, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, "Redox Reaction catalysed by a porous graphite carbon packing and its application to electivity enhancement of high-performance liquid chromatographic separation of metal complexes", *Anal. Commun.*, 34 (1997) 397-400.
- 2) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, "On-Column Redox Derivatization Using Catalytic Activity of Porous Graphitic Carbon Stationary Phase: An Approach to Enhancement of Separation Selectivity of Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, in press.
- 3) 齊藤和憲, 渋川雅美, オンライン酸化還元化学種変換 HPLC による伸銅中の微量コバルトの定量, 日本分析化学会第 51 年会講演要旨集, p.342.
- 4) M. Shibukawa, R. Eto, A. Kira, F. Miura, K. Oguma, H. Tatsumoto, H. Ogura, A. Uchiyumi, "Separation and Determination of Quaternary Ammonium Compounds by High-Performance Liquid Chromatography with a Hydrophilic Polymer Column and Conductometric Detection", *J. Chromatogr., A*, 830 (1999) 321-328.
- 5) 西垣敦子, 小島和茂, 渋川雅美, 電気伝導度検出/HPLC および LC/MS による環境水中の陽イオン界面活性剤の分離定量, Separation Sciences 2002 講演要旨集, p.99-100.
- 6) 西垣敦子, 渋川雅美, LC/MS による環境水中の陽イオン界面活性剤の分離定量, 日本分析化学会第 51 年会講演要旨集, p.317.
- 7) M. Shibukawa, K. Matuura, Y. Shinozuka, S. Mizuno, K. Oguma, "Effects of Phase-Forming Cations and Anions on the Partition of Ionic Solutes in Aqueous Polyethylene Glycol-Inorganic Salt Two-Phase Systems", *Anal. Sci.*, 16 (2000) 1039-1044.
- 8) M. Shibukawa, N. Nakayama, T. Hayashi, D. Shibuya, Y. Endo, S. Kawamura, "Extraction Behaviour of Metal Ions in Aqueous Polyethylene Glycol - Sodium Sulphate Two-Phase Systems in the Presence of Iodide and Thiocyanate Ions", *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 293-300.
- 9) Y. Ito, W. D. Conway, *High-Speed Countercurrent Chromatography*, Wiley, New York, (1996).
- 10) 石井一行, 渋川雅美, 水性二相高速向流クロマトグラフィーによる金属イオンの分離に関する研究, 第 63 回分析化学討論会講演要旨集, p.181.
- 11) 石井一行, 渋川雅美, SCN⁻との錯形成反応を利用した水性二相高速向流クロマトグラフィーによる金属イオンの分離, 第 8 回 LC テクノプラザ講演要旨集, p.124-125.
- 12) Y. Yarita, R. Nakajima, S. Ohtsuka, T. Ihara, A. Takatsu, M. Shibukawa, "Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages by High-Performance Liquid Chromatography-Flame Ionization Detection Using Pure Water as Mobile Phase", *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 387-391.
- 13) Y. Yarita, R. Nakajima, M. Shibukawa, "Superheated Water Chromatography of Phenols Using Poly(styrene-divinylbenzene) Packings as a Stationary Phase", *Anal. Sci.*, 19 (2003) 269-272.
- 14) 鎗田孝, 中島良司, 渋川雅美, 超高温水を移動相とした HPLC システムの開発とフェノール類分析への適用, 第 63 回分析化学討論会講演要旨集, p.25.
- 15) 中島良司, 鎗田孝, 渋川雅美, 超高温水を移動相とした HPLC-FID によるアルコール類の分析, 第 63 回分析化学討論会講演要旨集, p.25.
- 16) 鎗田孝, 中島良司, 島田かより, 衣笠晋一, 渋川雅美, 超高温水を移動相とした高速液体クロマトグラフィーによるポリエチレングリコールの分析, 日本分析化学会第 51 年会講演要旨集, p.154.
- 17) 中島良司, 鎗田孝, 渋川雅美, 超高温水クロマトグラフィーによる河川水中のビスフェノール A の分析, 第 8 回 LC テクノプラザ講演要旨集, p.54.