

オンライン電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC による有機化合物の選択的分離

日大生産工(院) ○辻本 洋 日大生産工 齊藤 和憲, 中釜 達朗
埼玉大院理工 渋川 雅美

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は液体の移動相を用い、移動相および固定相との相互作用の差を利用して、試料を成分ごとに分離する方法であり、ライフサイエンスを初めとする幅広い分野で多用されている¹⁾。HPLC が広く多用されている理由は、比較的容易に操作でき、迅速かつ高精度な分析が可能であり、また他の分離分析法よりも広範囲な試料に適用できるためである。一方、近年では科学研究や産業の発展により分析対象物質は増加の一途をたどっており、また多種類かつ多量の共存物質から微量の目的物質の分離・定量が要求されていることから、新たな分離選択性をもつ HPLC システムの開発が常に行われている。分析対象物に特異的な化学反応を利用して、その化学種を変化させる誘導体化法を導入した HPLC システムは、分離選択性を向上させるための効果的な方法の一つであり²⁾、本研究では酸化還元反応を液体クロマトグラフィーの分離場に組み込んだ、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC を開発した³⁻⁵⁾。このシステムは、二つの分離カラムの間に酸化還元化学種変換ユニットを組み込んだものである。目的物質はユニット内で化学種変換されることで、前段の分離カラムでは注入された状態で移動し、後段の分離カラムではその酸化体および還元体として移動するため、それぞれの分離カラムでの移動速度が変化し、選択的分離を可能とする方法である。これまでに、合金中の微量コバルト³⁻⁴⁾や食塩中の微量鉄⁵⁾の分離・定量に成功している。しかし、有機化合物での報告例はない。そこで、本研究では化学

種変換ユニットとしてフロー電解セル、モデル化合物としてベンゼンジオール類および *p*-ベンゾキノンを用い、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC による有機化合物の選択的分離について検討を行った。

2. 実験

本研究で用いた実験装置の概略図を Fig. 1 に示す。フロー電解セルには ESA 製 Model 5010 Analytical cell を使用した。作用電極として多孔質グラファイト電極、参照電極にはパラジウム-水素電極(Pd/H₂)を使用している。分離カラムは化学物質評価研究機構製 L-Column 2 ODS (50 mm×4.6 mm i.d., 粒径 5 μm)を使用した。試料溶液には Fig.2 に示した、*p*-ベンゾキノン(BQ)、ヒドロキノン(HQ)、カテコール(CC)、レゾルシノール(RC)を移動相と同組成の溶液で調製したものを、注入量は 20 μL とした。移動相には 0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 6)/5 %(w/v)アセトニトリルを用い、移動相流量は 0.5 mL/min とした。また、移動相には窒素ガスを通気し溶存酸素を

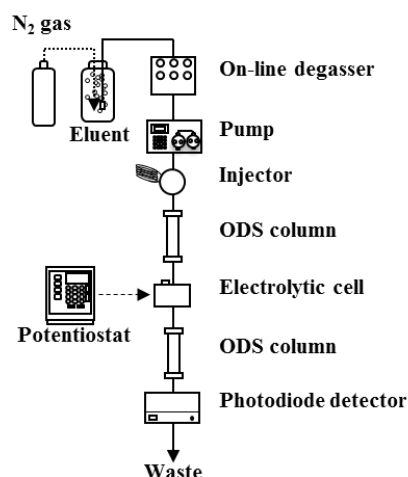


Fig.1 Schematic diagram of the on-line electrochemical redox derivatization HPLC.

Selective Separation of Organic Compound using On-line Electrochemical Redox Derivatization HPLC

Hiroshi TSUJIMOTO, Kazunori SAITOH, Masami SHIBUKAWA and Tatsuro NAKAGAMA

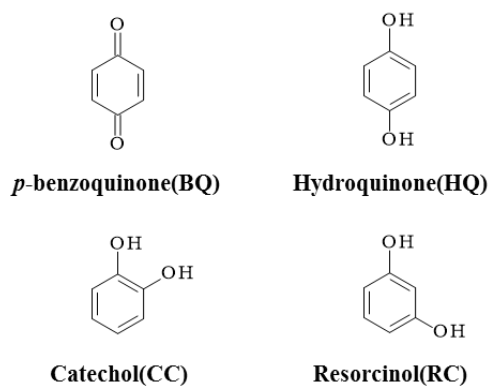


Fig.2 Molecular structures of sample compounds.

除去し、さらにオンラインデガッサーで脱気した。カラム温度は 30 °C に設定し、検出器はフォトダイオードアレイ検出器を用い、221 nm の波長で測定した。

3. 結果および考察

3-1. BQ および HQ の保持挙動の検討

Fig.1 のシステムから前段の分離カラムを取り外したシステムを用い、BQ および HQ の各印加電位における保持挙動について検討した。Fig.3 は試料として BQ を注入した時に得られた、各印加電位におけるクロマトグラムである。+400 mV の電位を印加した状態では BQ のピークしかから見られないが、-140 mV の電位を印加した状態では、BQ のピークが減少し、その還元体である HQ のピークが生じている。さらに、-400 mV の電位を印加した状態では、BQ のピークは消失し HQ のピークのみが見られる。これは、BQ が HQ へ電解還元されたことを示している。一方、HQ も同様に-120 mV の電位を印加することで一部が BQ へ変換され、+400 mV の電位を印加することで BQ へ電解酸化された。よって、BQ と HQ は相互に化学種変換が可能であることが明らかになった。Fig.4 は試料として BQ を注入した際に得られた BQ および HQ のピーク面積と印加電位の関係を示したものである。BQ のピーク面積は-140 mV の電位で減少し初め、-300 mV 以下の電位で最小の値になった。また、HQ のピーク面積は-140 mV の電位で増加し初め、-300 mV 以下の電位で最大のピーク面積となった。これは、-300 mV 以下の電位

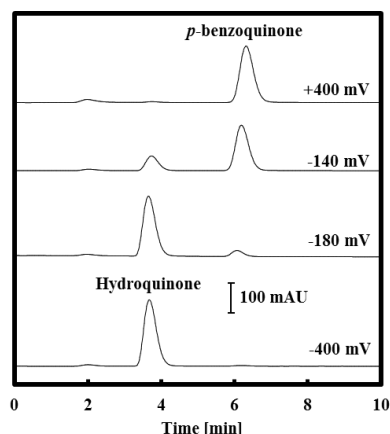


Fig.3 Chromatograms of *p*-benzoquinone obtained by the HPLC system equipped with an electrolytic cell.

Sample: 0.1 mM *p*-benzoquinone
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile

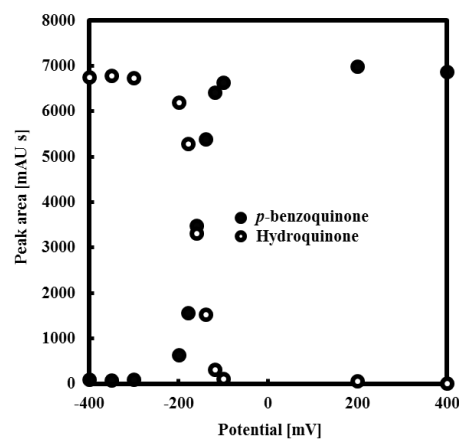


Fig.4 Dependence of peak areas of *p*-benzoquinone and hydroquinone on the applied potential in the HPLC system equipped with electrolytic cell.

Sample: 0.1 mM *p*-benzoquinone
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile

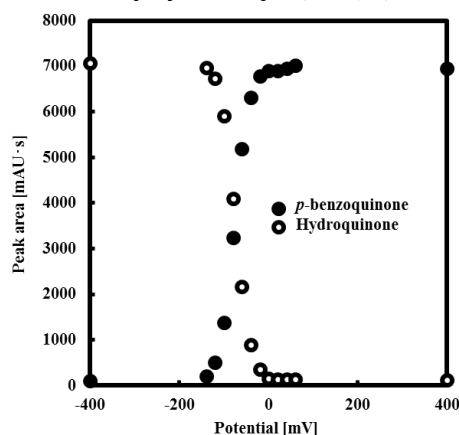


Fig.5 Dependence of peak areas of *p*-benzoquinone and hydroquinone on the applied potential in the HPLC system equipped with electrolytic cell.

Sample: 0.1 mM Hydroquinone
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile

を印加することで BQ を完全に HQ へ電解還元できることを示している。一方、Fig.5 は試料として HQ を注入した際の印加電位とピーク面積の関係を示したものである。HQ のピーク面積

は-120 mV の電位で減少し初め、0 mV 以下の電位で最小の値になった。また BQ のピーク面積は-120 mV の電位で増加し初め、0 mV で最大の値になった。これは、0 mV 以上の電位を印加することで HQ を完全に BQ へ電解還元できることを示している。また、CC においても、所定の電位を印加することで、その酸化体である *o*-ベンゾキノンへ変換し、溶出位置が変化した。一方、RC は BQ と同じ溶出位置であり、また電位を印加することで、複数の化学種に変換された。これは、RC が *m* 位にヒドロキシル基を持つ物質であり、その酸化体は安定に存在することができず、複数の化学種に変換されたと推測される。以上の結果から、分離カラムの前段に電解セルを組み込んだシステムを用いることで、BQ、HQ および CC の溶出位置を制御できることが明らかになった。

3-2.移動相流量および試料濃度がおよぼす変換効率の影響

分離カラムの前段に電解セルを組み込んだシステムを用い、移動相流量および試料濃度がおよぼす変換効率の影響を検討した。Fig.6 は BQ が HQ へ完全に変換される印加電位-400 mV における HQ の補正ピーク面積と移動相流量の関係を示したものである。移動相流量 0.25 mL/min から 1.25 mL/min の範囲内では、流量の変化によりピーク面積は変化せず一定の値を示している。以上の結果から、移動相流量 0.25–1.25 mL/min の範囲では BQ の変換効率に影響をおよぼさないことが明らかになった。次に試料濃度がおよぼす変換効率の影響を検討した。Fig.7 は BQ が HQ へ変換される印加電位-400 mV における HQ の補正ピーク面積と試料濃度の影響を示したものである。0.001 mM–0.1 mM の濃度範囲では、濃度変化によってピーク面積は変化せず一定の値を示している。以上の結果から、0.001 mM–0.1 mM の範囲では、変換効率に影響をおよぼさないことが明らかになった。

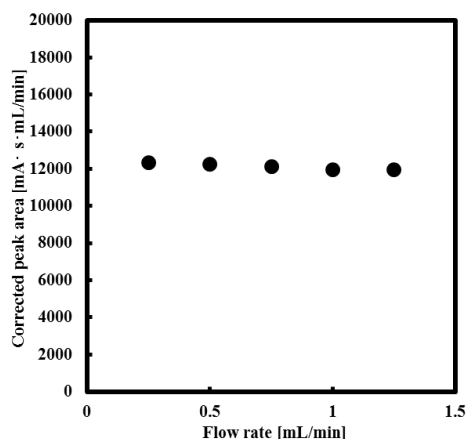


Fig.6 Dependence of corrected peak area of hydroquinone on the flow rate in the HPLC system equipped with electrolytic cell.

Sample: 0.1 mM *p*-benzoquinone
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile
Applied potential: -400 mV

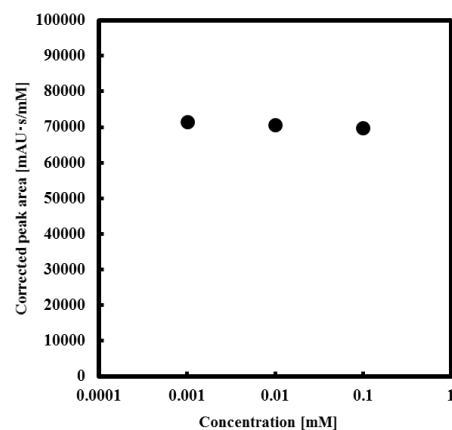


Fig. 7 Dependence of corrected peak area of hydroquinone on the concentration in the HPLC system equipped with electrolytic cell.

Sample: *p*-benzoquinone
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile
Applied potential: -400 mV

3-3.オンライン酸化還元化学種変換 HPLC による微量 BQ の選択的分離

BQ と RC は同じ溶出位置であり、分離カラムだけでは分離することができない。そこで、分離カラムの前段に電解セルを組み込んだシステムを用いることで、BQ を HQ に変換し、RC から分離することが可能となる。しかし、BQ は HQ に変換させることで分離を行うため、HQ が同時に存在している試料では、HQ と溶出が重なってしまい、分離することはできない。そのため、Fig.2 のオンライン酸化還元化学種変換 HPLC を用い RC および HQ が共存している試料での *p*-ベンゾキノンの分離を検討した。まずは、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを用いて、0.5 mM の RC 試料から 0.5 μ M

の BQ の分離を試みた。Fig.8 にそのクロマトグラムを示す。電解セルを組みこんでいないシステムでは、RC と BQ は同じ位置に溶出しており分離されていない。しかし、電解セルを組み込み-400 mV の電位を印加することで、電解セル内で BQ のみが選択的に HQ に変換され、前段と後段の分離カラム内での移動速度が変化し RC から分離された。よって、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC を用いることで、RC が BQ の 1000 倍の濃度で共存する条件でも、0.5 μ M の BQ を選択的に分離できることが明らかになった。以上の結果を踏まえて、オンライン酸化還元化学種 HPLC システムを用い、HQ, CC および RC 混合試料から微量 BQ の分離を試みた。Fig.9 はオンライン酸化還元化学種変換 HPLC による混合試料のクロマトグラムである。前段の分離カラムでは BQ として移動するため、HQ および CC から分離される。中間の電解セルにて、BQ は HQ に変換されるため、後段の分離カラムでは HQ として移動し、移動速度が変化するため、RC からも分離された。よって、オンライン酸化還元化学種 HPLC システムを用いることで、HQ, CC および RC 混合試料から微量 BQ の選択的分離が可能であることが明らかになった。

4. 結言

BQ は-300 mV 以下の電位を印加することで BQ へ変換され、HQ は 0 mV 以上の電位を印加する事で BQ へ変換された。同様に CC も所定の電位を印加することで、酸化体である *o*-ベンゾキノンに変換された。よって、所定の電位を印加する事で BQ, HQ, CC の溶出位置を制御できることを明らかにした。一方、RC は、複数の化学種に変換された。BQ は移動相流量 0.25–1.25 mL/min 試料濃度 1 μ M–0.1 mM の範囲では変換効率に影響をおよぼさないことが示された。オンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムは、電位を制御することにより、HQ, CC および RC 混合試料から微量 BQ を選択的に分離できることを示した。

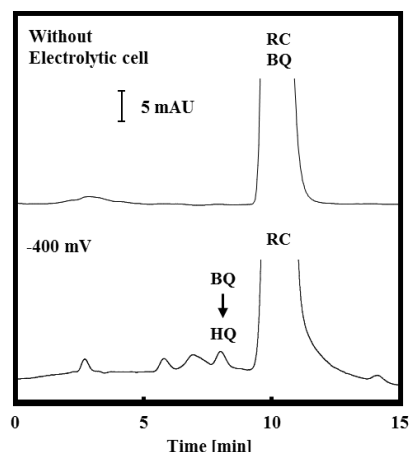


Fig.8 Separation of trace amount of *p*-benzoquinone from large amounts of coexisting resorcinol using the on-line redox derivatization HPLC system.

Sample: 0.5 μ M *p*-benzoquinone, 0.5 mM resorcinol
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile
Applied potential: -400 mV

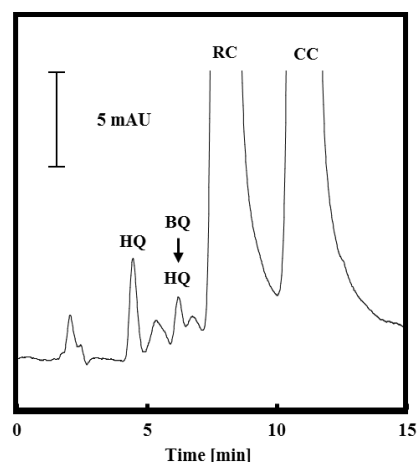


Fig.9 Separation of trace amount of *p*-benzoquinone from large amounts of coexisting resorcinol and catechol using the on-line redox derivatization HPLC system.

Sample: 0.5 μ M *p*-benzoquinone, 0.5 mM hydroquinone
0.5 mM catechol, 0.5 mM resorcinol
Eluent: 100 mM phosphate buffer(pH6.0) / 5 % (w/v) acetonitrile
Applied potential: -400 mV

5. 参考文献

- 1) 日本分析化学会関東支部, *高速液体クロマトグラフィーハンドブック*, 丸善, **2000**.
- 2) K. Blau, J. Hallet, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd ed., Wiley, New York, U.S.A., **1993**.
- 3) K. Saitoh, M. Shibukawa *et al.*, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 49.
- 4) K. Saitoh, M. Shibukawa *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2007**, 80, 951.
- 5) K. Saitoh, M. Shibukawa *et al.*, *Anal. Sci.*, **2013**, 29, 715.