

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

洪川雅美（応用分子化学科）

1. 緒言

HPLC は優れた分離分析法として広く認識され、多くの分野で利用されている。しかし、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、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く、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3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

昨年度までに、酸化還元触媒として機能する多孔質グラファイトカーボン(PGC)¹⁾をカラム充填剤として用いることにより、酸化還元性物質について選択的なオンライン化学種変換 HPLC システムを構築できることを明らかにした。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がより操作性の高い選択的分離システムとなりうる可能性を示した。本年度は電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC システムの構築を目指し、モデル化合物として金属-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 錯体を用いて電解セル内での電解酸化還元条件を詳細に検討するとともに、金属試料中の微量コバルトの高選択的分離定量を試みた。

【実験】2つのオクタデシルシリカ(ODS)カラム(1.5mm id×150mm；資生堂製 Capcell Pak C18 UG120)の間に電解セル(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。溶離液としては pH5 に調整した 0.1M 酢酸緩衝溶液を用いた。なお、溶離液は窒素ガスを通気し、さらにデガッサーで脱気した。試料は各種金属イオンの EDTA 錯体を用い、それぞれ溶離液に溶解して試料溶液を調製した。また、ODS カラムはトリメチルスチアリルアンモニウムクロリドを含む溶離液を一定量流して処理し、陰イオン交換性を持たせた。錯体の検出は UV 検出器を用い 230nm の波長で行った。

【結果と考察】Co(II)錯体および Co(III)錯体を試料とし、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、酸化および還元効率に及ぼす印加電位および流量の影響についての予備的検討を行った。まず、Co(II)錯体を試料として電解酸化条件について検討した。流量 0.10ml/min において電位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 0.1V 以上では Co(II)錯体のピークは消滅し、Co(III)錯体のピークは最大となった。次に、酸化効率に及ぼす移動相流量の影響について検討した。印加電位 0.1V においては Co(II)錯体が酸化されて生じた Co(III)錯体のピーク面積は、移動相流量 0.02-0.10ml/min の範囲内で変化せず、ほぼ一定の値を示した。これらの結果から、電位が 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がわかった。次に Co(III)-EDTA 錯体を試料として、還元効率に及ぼす電解セルの印加電位および移動相流量の影響について検討した。電位 -0.5V で Co(III)錯体のピークは減少しはじめ、Co(II)錯体のピークが生じた。これは Co(III)錯体の一部が Co(II)錯体に還元されたためと考えられる。さらに -0.6V 以下では、Co(III)錯体が完全に還元され Co(II)錯体のピークのみが得られた。次に還元効率に及ぼす流量の影響について検討した。印加電位 -0.6V において Co(III)錯体が還元されて生じた Co(II)錯体のピーク面積は、移動相流量 0.02-0.10ml/min 範囲内では変化せずほぼ一定の値を示した。これらの結果から、Co(III)錯体は、流量 0.10ml/min 以下で、かつ印加電位 -0.6V 以下の条件下で Co(II)錯体に完全に還元できることがわかった。

以上の電解条件に基づき、電解セルを2本の ODS カラムの間に設置したシステムを構築して得られた Co(II)-EDTA および Co(III)-EDTA 錯体の分離例を図1に示す。この図は、電解セルを化学種変換ユニットとして組み込んだ酸化還元化学種変換 HPLC において印加電位を制御することにより、Co(II)および Co(III)錯

体をそれぞれ同じ電荷を持つ金属錯体から選択的に分離できることを示している。このシステムによる Co(II)錯体の定量について検討したところ、電位を 0.3V 印加した系について得られた検量線は 10ppb-10ppm の濃度範囲において良好な直線性を示した。また、ベースラインノイズの標準偏差の 10 倍で表した定量限界は 0.86ppb であった。

次に、多量の Fe(III)を含む金属イオン試料中の微量 Co(II)の分離を検討した。図2は、100ppm の Fe(III)、200ppb の Cu(II)及び Ni(II)混合物中の 10ppb の Co(II)の分離を試みたクロマトグラムである。このような条件下においても、Co 錯体は単一のピークとして分離されている。これは、Fe(III)が Co(II)の一万倍の濃度で共存する条件下で、10ppb の Co(II)を分離定量することが可能であることを示している。

以上の結果から電解セルを利用することにより、これまで試みられてこなかった反応速度の小さい酸化還元反応を化学種変換反応として HPLC 内に組み込み、目的物質の保持を制御できることが可能になった。これにより、選択性の高い HPLC システムを構築できることが明らかになった。

3. オンライン固相抽出—電気伝導度検出 HPLC 及び LC/MS による環境水中の陽イオン界面活性剤の分析

陽イオン界面活性剤は、ヘア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、ごく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。本研究では、陽イオン界面活性剤の高感度な分離定量法の確立を目的とし、分離カラムとして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²⁾及び LC/MS システムの検討を行ってきた。その結果、昨年度までに、従来の電気伝導度検出または間接吸光度検出 HPLC について報告されている値より 1 桁以上低い検出限界 (0.03-0.04 M) を与える高感度な電気伝導度検出 HPLC システムを構築した。また、LC/MS システムでは 20 μ l 注入において 0.03-0.06 nM という極めて低い検出限界が得られた。

実際の河川水中の陽イオン界面活性剤を定量するためには、その濃縮とともに共存する無機イオンならびに陰イオン界面活性剤の分離が必要である。本年度は、これらのシステムを実際の河川水に適用するために、試料の前処理として Empore disk による陽イオン界面活性剤の濃縮と陰イオン界面活性剤の除去について検討した。また、電気伝導度検出 HPLC システムに新たにオンライン固相抽出システムを導入した、オンライン固相抽出—電気伝導度検出 HPLC システムを構築し、本システム及び LC/MS により、河川水中の陽イオン界面活性剤の分離定量を試みた。

【実験】Empore disk は、ポリスチレン樹脂である SBD-XD と陰イオン交換樹脂である ANION-SR を重ねて使用した。Empore disk からの試料の溶出液には、4 mM 4,4'-ジピリジル / 8 mM HCl / 70%アセトニトリルを使用した。分離カラムは、ポリビニルアルコールゲルである Shodex Asahipak GH-310-HQ (4.6 mm ϕ \times 150 mm, 6 μ m; 昭和電工製) を用いた。またオンライン固相抽出には、分離カラムと同じ基材で粒径の異なるカラム (4.6 mm ϕ \times 10 mm, 9 μ m) を使用した。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 ZMD) を用いて行った。電気伝導度検出にはサプレッサー (Dionex CMMS-II) を用い、溶離液には 0.4 mM 4,4'-ジピリジル / 0.8 mM HCl / 27%アセトニトリルを使用した。一方、LC/MS による界面活性剤の溶離には、揮発性イオンペア試薬であるジ-n-ブチルアンモニウムを 1 mM 含む 0.26 M 酢酸 / 29.2% アセト

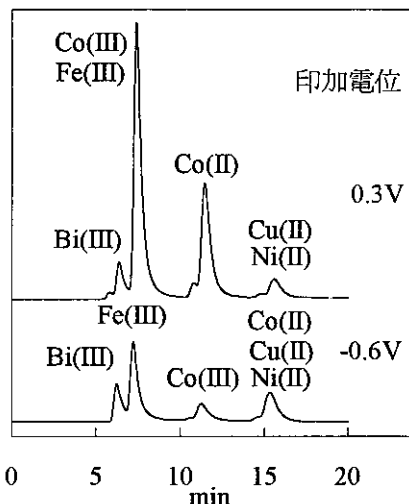


図1 電解セルを組みこんだオンライン酸化還元化学種変換HPLCシステムにおける金属EDTA錯体のクロマトグラム

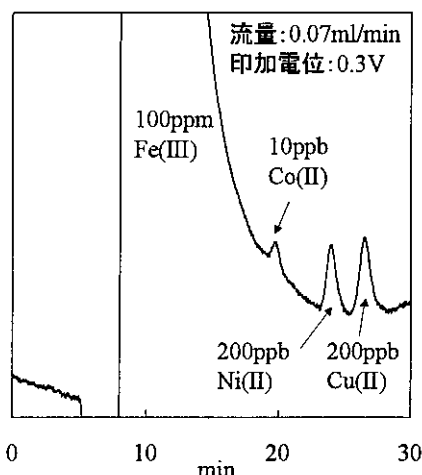


図2 多量のFe(III)-EDTA錯体を含む金属EDTA錯体のクロマトグラム

ニトリルを使用した。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 0.25 ml/min とした。陽イオン界面活性剤のモデル化合物としては、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)、トリメチルステアリルアンモニウムイオン (TMSA) を用いた。

河川水の採水は、船橋市を流れる海老川にて行った。ステンレス製容器で採水した後、ガラス容器に移し、容器壁面への陽イオン界面活性剤の吸着を抑制するために、塩酸及び 4,4'-ジピリジルをそれぞれ 0.1 M, 8 mM となるように添加した。まず浮遊物や沈殿物を除去するために、桐山ろ紙 (No.4) により試料水のろ過を行い、その後共存する陰イオン界面活性剤や無機イオンの除去及び陽イオン界面活性剤の濃縮のために、Empore disk (3M) による前処理を行った後、オンライン固相抽出-電気伝導度検出 HPLC 及び LC/MS システムに導入し分析を行った。

【結果と考察】 Empore disk による試料の前処理における溶出液としては、種々検討の結果、4 mM 4,4'-ジピリジル / 8 mM HCl / 70 %アセトニトリルが優れた溶出力を持つことが分かった。陽イオン界面活性剤の標準試料に、陰イオン界面活性剤であるドデシルベンゼンスルホン酸 (DBS) を 100 倍の濃度で加えたときの disk の捕集効率を求めた結果、ANION-SR のみでは DBS を除去することができず、ベースラインが乱れて良好なクロマトグラムを得ることができなかった。また SDB-XD のみでは DBS を除去することはできたものの、陽イオン界面活性剤の捕集効率は 72~79 %と低かった。そこで、ANION-SR と SDB-XD の両 disk を重ねて使用したところ、DBS の影響を受けることなく 3 種の陽イオン界面活性剤に対して 95~97 %の良好な回収率が得られた。

オンライン固相抽出 HPLC は、試料溶液を 0.5~5 ml/min で通液し、固相抽出カラムに陽イオン界面活性剤の捕集を行った後、溶離液により分離カラムに溶出した。このオンライン濃縮分離システムを用いることにより、サブ ppb レベルの陽イオン界面活性剤を定量が可能となった。オンライン固相抽出-電気伝導度検出 HPLC により得られた海老川の水のクロマトグラムを図 3 (a) に示す。また、重ね打ち法による同定を行うため、CTMA と TMSA をそれぞれ 1 nM 及び 5 nM 添加した際に得られたクロマトグラムを図 3 (b) に示す。この結果から、ピーク高さが大きくなった二つのピークがそれぞれ CTMA, TMSA であると推定した。標準添加法による定量的結果、CTMA, TMSA はそれぞれ 2.4 nM (0.8 ppb), 7.1 nM (2.5 ppb) と求められた。また、回収率はそれぞれ 93 %, 95 %であった。

次に、LC/MS により得られた同河川水のシングルイオンモニタリングでのクロマトグラムを図 4 に示す。試料は、Empore disk により 20 倍濃縮したものを 20 µl 注入し、CTMA, TMSA それぞれの分子イオン (M^+) に対応するイオンでモニターしたところ、非常に良好なクロマトグラムが得られた。絶対検量線法による定量的結果、CTMA, TMSA はそれぞれ 1.5 nM (0.5 ppb), 4.2 nM (1.5 ppb) と求められた。以上の結果は、本研究で構築したオンライン固相抽出-電気伝導度検出 HPLC 及び LC/MS システムを用いて、1 nM レベルの環境水

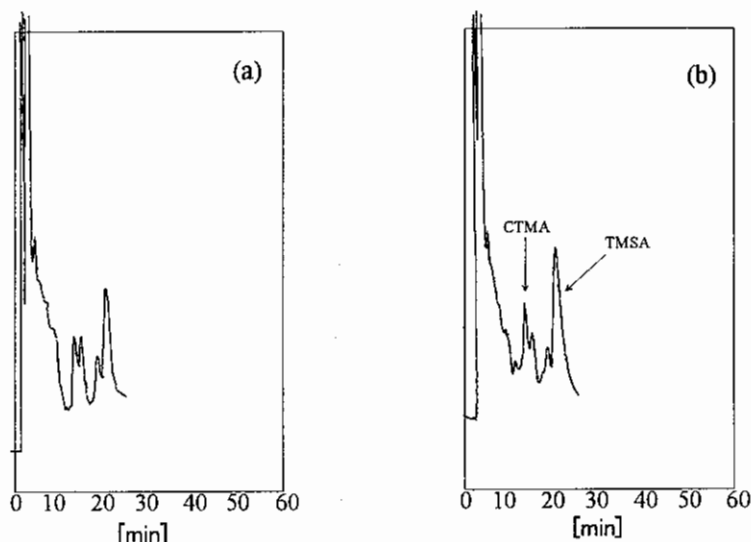


図 3 電気伝導度検出による河川水サンプルのクロマトグラム (a) 添加なし (b) CTMA 1 nM 及び TMSA 5 nM を添加

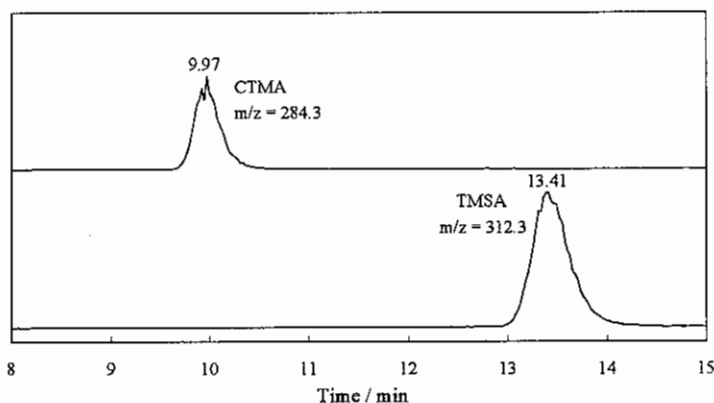


図 4 シングルイオンMS検出による河川水サンプルのクロマトグラム

中の陽イオン界面活性剤の微量分析が可能であることを示している。

4. 高選択的水性二相抽出法の開発

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^{3,4)}。本年度は、昨年度までの無機陰イオンとの錯形成反応を利用した金属イオンの水性二相抽出機構に関する研究成果⁴⁾に基づき、マスクング法を用いた高選択的水性二相抽出法の開発を目的として研究を行なった。

【実験】50%(w/w)PEG4000(平均分子量 3000)水溶液と 20%(w/w)硫酸ナトリウム水溶液を所定の割合で混合して二相系を形成した。これに試料金属イオン{Mn(II), Zn(II), Cd(II), Fe(III), Ni(II), Co(II), Cu(II), Li(I)}, チオシアン酸イオンおよび数種の無機または有機錯形成剤{チオ硫酸ナトリウム, 酒石酸ナトリウム, グルコン酸ナトリウム, クエン酸}を一定量添加し, 振とう, 遠心分離を行なった後, 上相, 下相ともに 2g 採取し水で希釈して 25ml にした。ついで, 原子吸光法によりそれぞれの溶液中の金属イオン濃度を測定した。

【結果および考察】チオシアン酸イオンは多くの金属イオンと中性または陰イオン錯体を形成し, PEG に富む相に抽出する能力をもつが, 選択性に乏しく, 特定のイオンの完全分離は難しい。⁴⁾そこで親水性の大きな多価の陰イオン錯体を形成すると考えられるチオ硫酸イオンならびにカルボン酸系キレート試薬をマスクング剤として用い抽出実験を行った結果, 図5に示すようにチオ硫酸イオンは Cu(II)を, 酒石酸イオン, グルコン酸イオンおよびクエン酸イオンは Fe(III)の分配比を大きく低下させた。特に Cu(II)に対してのチオ硫酸イオンおよび Fe(III)に対してのグルコン酸イオンの効果は大きく, それぞれマスクング剤として使用できることがわかった。一方これに対して, チオ硫酸イオンを添加すると Zn(II)の分配比がより大きくなるという極めて興味深い現象が観察された。これらの結果は, 錯形成剤を組み合わせるにより, 特異的な分離選択性を持つ水性二相抽出系を構築できることを示唆している。

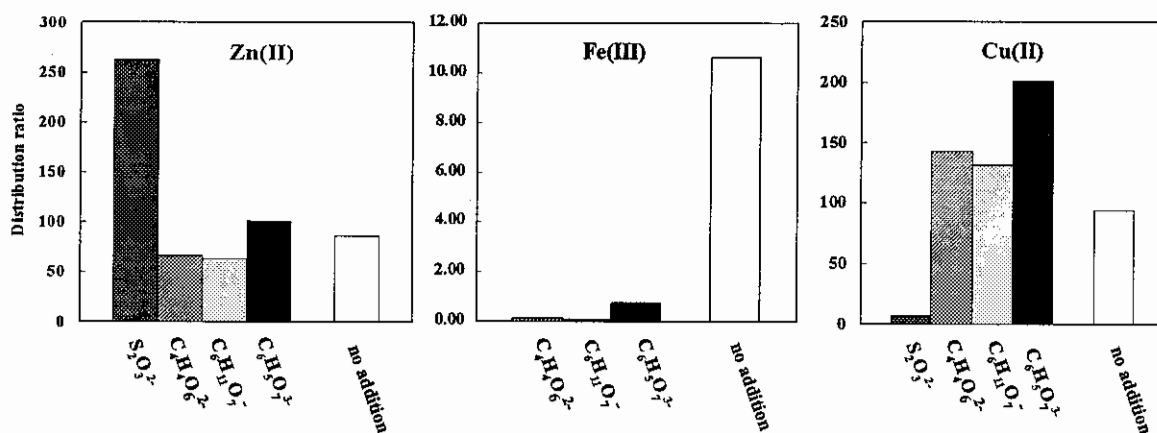


図5 チオ硫酸イオン及びカルボン酸系キレート試薬による金属イオンの分配係数の変化

【参考文献】

1. M. Shibukawa, A. Unno, Y. Oyashiki, T. Miura, A. Nagoya, and K. Oguma, "Redox reaction catalysed by a porous graphite carbon packing and its application to selectivity enhancement of high-performance liquid chromatographic separation of metal complexes", *Anal. Commun.*, 34(1997) 397-400.
2. M. Shibukawa, R. Eto, A. Kira, F. Miura, K. Oguma, H. Tatsumoto, H. Ogura, and A. Uchiumi, "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.
3. M. Shibukawa, K. Matsuura, Y. Shinozuka, S. Mizuno, and 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.
4. M. Shibukawa, N. Nakayama, T. Hayashi, D. Shibuya, Y. Endo, and 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.