

1 緒言

近年の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。この要求に応えるためには、常に新しい選択性を有する分離分析法の開発を進める必要がある。HPLCは優れた分離分析法として広く認識され、多くの研究・産業分野で利用されているが、分離選択性を大きく向上させる新規 HPLC システムの開発が望まれている。本研究は、種々の機能性有機物質を分離材料として用い、分析対象物質に特異的な化学反応を接触的に高速で行なう化学種変換システムを複数の分離場(カラム)を持つ HPLC に導入して、多次元分離による高選択性の獲得を目的とするオンラインおよびオンカラム化学種変換 HPLC の開発を進めている。本年度における研究経過および成果を以下に報告する。

2 オンライン酸化還元化学種変換 HPLC

分析対象化合物に特異的な化学反応を利用する誘導体化法は、分離選択性を向上させる効果的な方法のひとつである。特に、化学反応を二次的平衡(SCE)としてHPLCに導入する方法は、分析対象物質の保持を微細に制御することが可能で大きな成果を挙げている。本研究は、分析対象物質に特異的な化学反応を接触的に高速で行なうオンライン化学種変換システムを複数の分離場(カラム)を持つ HPLC に導入して、多次元分離による高選択性の獲得を目指した。

2.1 多孔質グラファイトカーボンカラムによる酸化還元化学種変換

SCE法は、目的成分を複数の化学種の平衡混合物としてカラム内を移動させる方法である。その保持係数 k は、個々の化学種の保持係数とそれぞれの分率 α で与えられ、2つの化学種AとBが平衡にある場合には次式のように表される。

$$k = \alpha_A k_A + \alpha_B k_B \quad (1)$$

したがって、SCE法を用いれば、化学平衡を制御することによって α を変化させ、分析対象

成分の保持時間を任意の値に設定することができる。ここで、移動相-固定相間の物質移動に比べて化学反応速度が小さい場合、ピークが幅広くなったり、分裂したりすることがあるため、化学反応をSCEとして利用するにはその溶液内反応速度が大きくなってはならない。このため、これまで有効に用いられてきた化学反応は、酸塩基反応といくつかの高速錯形成反応だけであった。

研究者らは、これまでに化学種変換ユニットとして多孔質グラファイトカーボン(PGC)を用い、銅合金中の微量 Co の定量に適用して、その分離選択性の高さを実証した¹⁾。この方法の適用の拡大を目的とし、シアン化物イオンを配位子とした Fe 錯体を用い、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC における化学種変換および HPLC 分離の条件の検討を行った。Fe^{II}(CN)₆⁴⁻と Fe^{III}(CN)₆³⁻を含む7種類の金属シアン化物錯体を試料とし、PGC カラムを組み込んだフローシステムによる測定を行った。PGC カラムを除いたフローシステムにおけるピーク面積と比較したところ、Fe^{II}(CN)₆⁴⁻と Fe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積にのみ変化が見られた。すなわち PGC カラムを還元処理すると、Fe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積が Fe^{II}(CN)₆⁴⁻と等しくなり、スペクトルから Fe^{III}(CN)₆³⁻が PGC によって Fe^{II}(CN)₆⁴⁻に還元されたことを確認した。一方、酸化処理を行った PGC カラムを用いた場合には、Fe^{II}(CN)₆⁴⁻が Fe^{III}(CN)₆³⁻に酸化されることがわかった。他の金属シアン化物錯体では、酸化および還元処理された PGC カラムを通過しても変化は見られなかった。このことより、PGC カラムを酸化および還元処理することにより Fe^{II}(CN)₆⁴⁻および Fe^{III}(CN)₆³⁻を選択的に酸化および還元できることを明らかにした。そこで、PGC カラムを2本の分離カラムの間に組み込んだオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築し、金属シアン化物錯体の測定を行った。酸化処理をした PGC を組み込んだシステムで得られたクロマトグラムを Fig.1 に示す。化学種変換ユニットを除いたシステムでは4分に溶出した Fe(CN)₆⁴⁻がオンライン化学種変換 HPLC システムでは7分に溶出した。これは前段のカラムでは Fe(CN)₆⁴⁻として、後段のカラムでは Fe(CN)₆³⁻として移動したためである。これに

より $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ をシステムピークから分離することができた。また、Fig.2 は還元処理をした PGC カラムを化学種変換ユニットとして組み込んだシステムにより得られたクロマトグラムである。化学種変換ユニットを除いたシステムと比較すると $\text{Co}(\text{III})$ と $\text{Fe}(\text{III})$ の溶出順が逆転した。これは、前段のカラムでは $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ として移動したが、後段のカラムでは保持の小さい $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ として移動し $\text{Co}(\text{III})$ より早く溶出したためである。これらのことから、酸化もしくは還元処理した PGC カラムを用いるオンライン酸化還元化学種変換 HPLC によりヘキサシアノ鉄酸イオンの溶出位置を変化させ、選択的に分離することが可能であることを明らかにした。

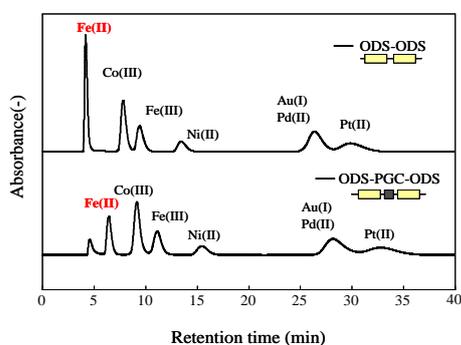


Fig.1 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(oxidized)-ODS system.

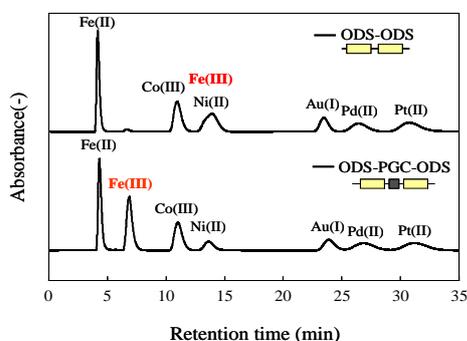


Fig.2 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(reduced)-ODS system.

2.2 オンライン酸化還元化学種変換 HPLC による Co-edta の電解酸化反応の解析

酸化還元化学種変換ユニットとして電解セルを用いれば印加電位を変えることによって化学種変換反応を制御することができ、操作がより簡便になると考えられる。本研究では、これまでにクーロメトリック検出器として市販されている ESA 製 Coulochem II のガードセル（作用電極：グラファイト，参照電極：Pd）を使用し，作用電極への印加電位をポテンシ

ョスタットにより制御するオンライン電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC によりステンレス鋼中の微量コバルトの分離に成功した²⁾。この研究の過程で、 $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を電解酸化した際に、 $\text{Co}(\text{III})$ edta 錯体の他にピークが検出されることが明らかになった。これは酸化ユニットとして PGC カラムを用いた際には見られない現象である。

分離カラムの前段に電解セルを設置したシステムにより $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体の電解酸化について検討した。Fig.3 に $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を試料として用いたときの各印加電位におけるクロマトグラムを示す。電位を 0.1V 印加すると、 $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体がすべて酸化され、 $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の鋭いピークが観測された。この酸化挙動は酸化ユニットとして過酸化水素で酸化処理した PGC カラムで見られたものと同じである¹⁾。しかし、Fig.3 に示すように、 $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を電解酸化した場合には、 $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体のピークのほかに、それより僅かに速い溶出位置に小さなピーク(ピーク X)が生じている。過マンガン酸イオンによる $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体の酸化反応では、 $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ が迅速に生じ、その後閉環反応が徐々に進行して 538 nm に最大吸収を持つ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ を生成することが Doi らによって報告されている³⁾。ピーク X と $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の VIS スペクトルを Fig.4 に示す。ピーク X の極大吸収波長は 550 nm であり、 $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ のそれと一致していた。これらの結果は、ピーク X が $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ であり、 $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ から $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ への閉環反応はセル内で完全に進行しないことを示している。

これまでサイクリックボルタンメトリーを用いて Co -edta 錯体の酸化還元挙動に関する

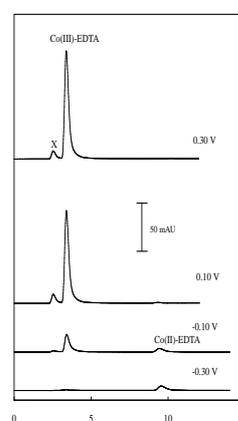


Fig.3 Variation of chromatograms obtained for an injection of $\text{Co}(\text{II})$ -edta with potential applied to the electrolytic flow cell.

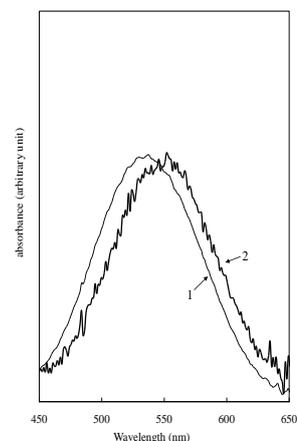


Fig. 4 VIS spectra obtained for the peak X and that for $\text{Co}(\text{III})$ -edta. 1 = $\text{Co}(\text{III})$ -edta, 2 = peak X

研究が数多くなされているが、 $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ の存在を明確に示したものはない。これはオンライン酸化還元化学種変換 HPLC が分離だけでなく電気化学反応の生成物の同定や反応機構の解析にも有効な手法となりうることを示唆している。

3 電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム化学種変換

電導性固定相を作用電極として用いるオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築できれば、仮に変換効率が 100%でなくても、分析対象化合物を平衡混合物として分離することができる。印加する電位によって酸化還元平衡を制御できるという利点もある。

一方、これまでの研究により明らかになったように、異なる酸化状態をとり得る金属を対象とするとき酸化還元化学種変換 HPLC は極めて選択性の高い分離分析法となる。これらの酸化還元化学種変換 HPLC は、金属ばかりではなく酸化還元反応によって化学種変換できる有機化合物の選択的分離にも有用な手法と期待される。そこで、それぞれ類似した構造を持つヒドロキノン、レゾルシノールおよびカテコール、ならびにドーパとチロシンをモデル化合物として選び、オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC の可能性を検討した。カラムには Porter らによって考案された EMLC カラムを用いた。このカラムは電導性をもつ PGC を充填した特殊なカラムで、外部から固定相の電位を制御することができる^{4,5)}。印加電位に対する各モデル化合物のピーク面積および保持係数の関係を Fig.5 に示す。チロシンを除く化合物は、それぞれ特定の電位を印加した際にピーク面積および保持係数に変化が生じた。これは、それぞれ対応する印加電位で化学種の変換が生じ、それにともない

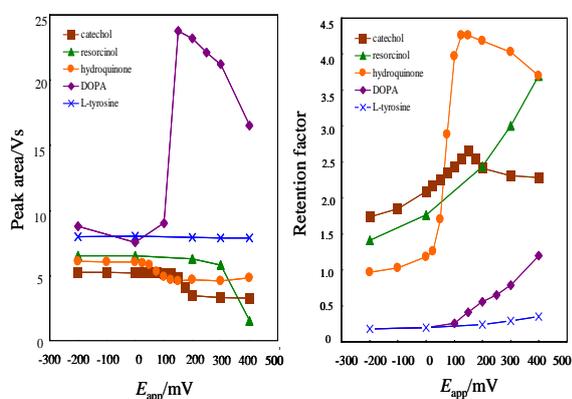


Fig.5 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

保持係数が変化したためと考えられる。さらに、可逆的な酸化還元反応を示す化合物として知られるヒドロキノンとカテコールについては、25-125 mV および 150-200 mV において濃度分率をピーク面積および保持係数から算出した値が互いに良く一致したことから、これらのその酸化体である *p*-または *o*-ベンゾキノン両者の平衡混合物としてカラム内を移動していることが明らかとなった。

本システムを用いて 5 種化合物の混合試料の分離を行ったクロマトグラムを Fig.6 に示す。印加電位 0 mV では、ドーパとチロシン、カテコールとレゾルシノールに相互分離することができないのに対して、+300 mV の電位を印加すると、ドーパ、カテコールおよびヒドロキノンは酸化反応により化学種が変換して相互分離できることを明らかにした。

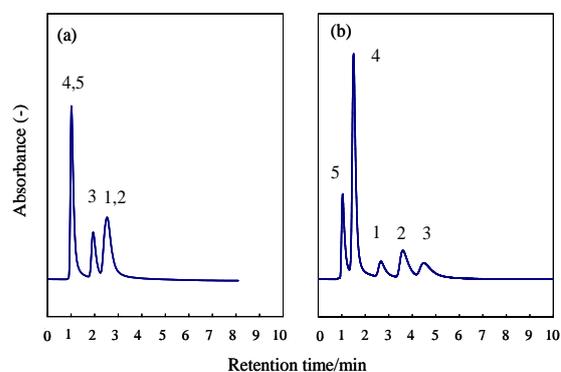


Fig.6 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by the on-column electrochemical derivatization HPLC. Applied potential: (a) 0 mV, (b) 300 mV

4 PGC の酸化還元反応機構

PGC の示す酸化還元作用は、その表面にごく微量存在する官能基に基因する可能性が高いと考えられているが、XPS 測定の結果からは PGC 表面には炭素以外の元素は確認されておらず、現時点ではそれらの官能基が特定されていない。すなわち PGC 表面に吸着した酸化還元剤が反応を引き起こしている可能性も否定できない。そこで PGC 上における酸化還元反応機構解明の第一段階として、PGC カラムへの還元剤吸着の評価と、吸着量と酸化還元反応効率の関連について検討した。試料としては Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , NaNO_2 , NaNO_3 , KI , および KIO_3 の 6 種の塩を選択し、各陰イオンの定量は間接吸光検出イオンクロマトグラフィーを用いて行った。PGC カラムに Na_2SO_3 溶液を注入したところ、 SO_3^{2-} のピークに加えて SO_4^{2-} のピークを検出し、PGC カラム内で酸化反応が起こっていることを確認した。また、カラム通過前後のイオン総量を比

較したところ、 IO_3^- 、 I^- 、 NO_2^- 、および SO_4^{2-} は変化がほとんど見られなかったのに対し、 SO_3^{2-} と NO_3^- では、注入物質量に対して溶出物質量が減少しており、イオンの一部はカラム内に吸着している可能性が示唆された (Fig. 7)。

次に、予め Na_2SO_3 溶液を通液して、還元処理を行った PGC カラムについて SO_3^{2-} および NO_3^- の吸着量を求めた。その結果、還元処理を施さなかった PGC カラムに比べ NO_3^- の吸着量は著しく減少したが、 SO_3^{2-} は還元処理を施したカラムにも強く吸着した。この時の SO_3^{2-} は PGC カラム内で酸化され、 SO_4^{2-} として溶出していたが、 SO_3^{2-} の吸着量と SO_4^{2-} への酸化率の間に相関関係はみられなかった。また PGC カラム内での NO_3^- の酸化還元反応も観測されなかった。

以上の実験結果より、PGC カラム上での酸化還元反応は、PGC 自体によるものである可能性が高いと考えられる。また、 SO_3^{2-} と NO_3^- の PGC への吸着は互いに異なる機構であることが示唆された。

次に溶離液の pH が PGC の酸化還元反応性に与える影響について考察した。 $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$ 溶液と、これに LiClO_4 を添加した溶液を通液した場合の PGC カラムの酸化還元性を調べたところ、 LiClO_4 を添加した溶液では Co(II)-edta に対して酸化性を示した。一方、 H_2O_2 のみの溶液で処理した PGC に Co(II) および Co(III)-edta を注入すると、どちらも Co(II)-edta に近いスペクトルを示し、PGC が還元性を示すことが分かった。事前に酸化処理を施した PGC カラムに、溶離液として pH 3 または pH 11 に調整した $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ LiClO}_4$ 水溶液を用い、試料として Co(II) および Co(III)-edta 錯体を注入した。溶出ピークの紫外吸収スペクトルから Co の酸化状態を評価したところ、pH11 の条件では Co(II)-edta がカラム内で酸化され Co(III)-edta として溶出しており、このときの PGC カラムが酸化性であることが明らかとなった。一方 pH3 の溶離液を用いた場合では、 Co(II) および Co(III)-edta のスペクトルは pH 11 でのスペクトルと比較すると、どちらも吸光度が減少した。ここで、 Co(II) と Co(III) の間の酸化還元反応には水素イオンが関与していないことを考慮すると、今回の現象は酸化 PGC カラムが酸性の溶離液を通液することによってやや還元性に変化したことを示唆している。二次元グラファイト構造をとる炭素原子だけでは、溶離液の pH や電解質の有無によって PGC の酸化還元性が変化することを説明できない。これらの結果は、水素イオンを授受できる官能基が PGC 表面に

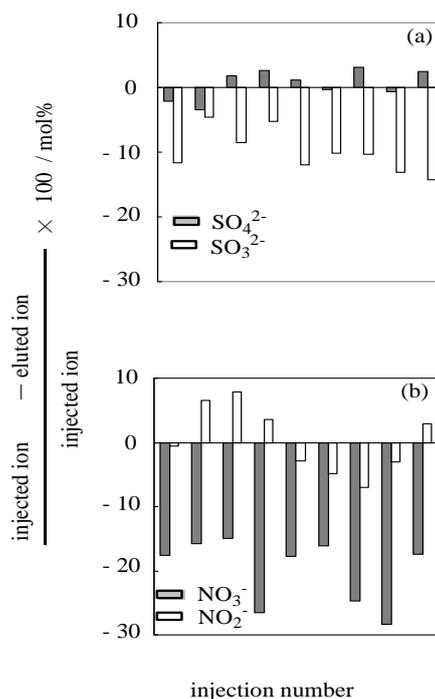


Fig. 7 Adsorption of inorganic anions on a PGC column (a) sulphonate and sulphate ions, (b) nitrite and nitrate ions. Eluent; $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ potassium hydrogen phthalate (pH 8.5)/methanol (90 / 10 (v/v)) containing 0.01% triethanolamine. Sample concentration; $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

存在し、この官能基が酸化還元反応を引き起こしているのではないかと考えられる。

5 結言

オンラインおよびオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC は、酸化還元電位の差や酸化還元反応速度の差に基づく HPLC 分離を可能にし、新しい分離選択性を生み出すことが期待される。生体中で重要な働きをする化合物の多くは酸化還元反応性を有しており、酸化還元化学種変換 HPLC が実用化されれば、これらの化合物の選択的分離定量を容易にするほか、酸化状態によって毒性が大きく異なる金属化学種のスペシエーションにも有力な方法となりうる。

6 参考文献

- 1) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 49-56.
- 2) K. Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, in press.
- 3) K. Doi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, 55, 1431-1436.
- 4) R. S. Deinhammer, E. Y. Ting, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 237-246.
- 5) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, 126, 1841-1849.