

# 機能性材料を利用した高選択的分離分析法の開発

渋川雅美（埼玉大学大学院理工学研究科）

## 1 緒言

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、優れた分離分析技術として広く認識され、研究・産業・医療の各分野で利用されている。しかし、近年、分析対象化合物は増加の一途をたどっており、多成分混合物中の極微量成分の分離ならびに正確な定量は必ずしも容易ではない。特に環境試料中の微量汚染物質や生体試料中の生理活性物質の分離定量は困難であることが多く、常に新しい分離選択性をもつ HPLC システムの開発が望まれている。この要求に応えるため、特異的な保持特性を有する固定相の開発や新規分離場の導入などの分離分析手法の開発が精力的になされている。

本研究グループは、酸化還元反応による化学種変換を HPLC 分離場に導入した新しい 2 つの HPLC システムを創案した。一つは、分離と化学種変換を同時に行なうオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムであり、他の一つは化学種変換と分離を切り離れたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムである。前者は、多孔質グラファイトカーボン(PGC)が固定相担体としてだけでなく酸化還元触媒としても機能すること、およびこれを酸化剤または還元剤で処理することによってその酸化還元電位を変化させることを見出したことに基づいて考案した<sup>1)</sup>。一方、後者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。このシステムは、化学種変換ユニットとして PGC を充填したカラム、またはグラファイトを作用電極とした電解セルを用いて構成した<sup>2,3)</sup>。

本年度は、これらの研究成果に基づいて、新たに電気化学的作用場を HPLC 分離場に導入した電気化学クロマトグラフィー(EMLC)を用いる化学種変換分離分析システムを構築し、その分離選択性の評価を行った<sup>4)</sup>。また、分離場あるいは反応場を構成するカラム充填剤として用いた化学結合型逆相系シリカゲルおよび多孔質グラファイトの表面構造について検討した<sup>5,6)</sup>。本年度における研究経過および得られた成果を、主にオンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC について以下に報告する。

## 2 オンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC

Porter らは、液体クロマトグラフィーの分離場であるカラムに電気化学的作用場を導入し、固定相と試料成分の静電的相互作用に基づいてイオン性化合物の保持を制御する EMLC を報告した<sup>7,8)</sup>。EMLC は、電気化学と分離化学を融合したユニークな分析法であり、イオン交換容量可変のイオン交換クロマトグラフィーと考えることができるが、この方法では従来のイオン交換クロマトグラフィーと同様の分離選択性しか得られない。そこで本研究では、EMLC を用いて分析対象化合物の酸化還元反応を PGC 固定相で接触的に高速で引き起こし、印加電位を制御することにより酸化還元反応を二次的平衡<sup>9)</sup>として利用できないかと考え、電気化学的酸化還元化学変換 HPLC を構築し、その生体関連物質の選択的分離への応用を試みた<sup>4)</sup>。

EMLC カラムは BTR Carbon(Biotech Research, 3.5  $\mu\text{m}$ )を実験室で充填して作製した。溶離液は、pH6 に調整した 0.1 M リン酸緩衝溶液 20 % (v/v) アセトニトリル - 水混合溶媒を用い、超音波脱気後、窒素ガスでバブリングしながら 0.4 ml/min で分離カラムへ通液した。EMLC カラムへの印加電位は、北斗電工製 HA-151 ポテンショスタットを用いて制御した。試料化合物には、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、L-3,4-ジヒドロキシベンジルアミン(ドーパ)、L-チロシンのほかカテコールアミン代謝物として L-アドレナリン、ドーパミン、L-ノルアドレナリンを用い、それぞれ溶離液に溶解して試料溶液を調製した。試料注入体積は、20  $\mu\text{l}$  とした。検出には、SI-1/2002 UV-VIS 検出器および SI-2/3017 PDA 検出器を用いた。

印加電位に対するカテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ドーパ、L-チロシンのピーク面積(検出波長 220 nm)および保持係数の依存性を Fig. 1 に示す。L-チロシンを除く化合物は、それぞれの化合物の酸化還元電位にほぼ対応する印加電位で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が変換し、それにとまって保持係数に変化したものと考えられる。このことは、Fig. 2 に示す溶出前後の吸収スペクトルの変化からも確認できる。それぞれの試料化合物の酸化体の同定は、標準物質のスペクトルあるいは文献データと比較することにより行った。L-チロシンは測定した電位範囲内では化学種の変換が生じないため、ピーク面積に変化は見られない。保

持係数はわずかに印加電位依存性を示しているが、これは固定相の表面電位の変化によって溶質の保持特性が変化したためと考えられる。

さらに、ヒドロキノン $E_{app} = 25-125$  mVにおいてヒドロキノンとその酸化体である *p*-ベンゾキノンとの平衡混合物として、またカテコールは、 $E_{app} = 150-200$  mVにおいてカテコールとその酸化体である *o*-ベンゾキノンと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。酸化還元平衡がカラム内のどの位置でも迅速に成立していると仮定できるならば、二次的平衡として機能しているはずであり、その保持係数は(1)式で与えられる。

$$k = \alpha_{Ox} k_{Ox} + \alpha_{Red} k_{Red} \quad (1)$$

ここで、 $k_{Ox}$  と  $k_{red}$  および  $\alpha_{Ox}$  と  $\alpha_{Red}$  はそれぞれ酸化体と還元体の保持係数と化学量論的分率を示している。しかし、もしカラム内の特定の位置で酸化されていたり、電位が不均一でカラムの上部と下部とで酸化還元平衡が異なっていたりするようであれば、 $\alpha$ 値はカラム内で異なる値をとることになり、その場合このようにして求められる $\alpha$ 値は、カラム内で存在していた化合物の平均化学量論的分率に対応する。一方、カラムから溶出した溶質ピークの面積  $A$  は(2)式で与えられる。

$$A = \alpha_{Ox}^E A_{Ox} + \alpha_{Red}^E A_{Red} \quad (2)$$

ここで、 $A_{Ox}$  と  $A_{red}$  および  $\alpha_{Ox}^E$  と  $\alpha_{Red}^E$  はそれぞれ酸化体と還元体のピーク面積と溶出バンド内でのそれぞれの分率を示す。したがって、保持係数から求めた $\alpha$ 値とピーク面積から求めた $\alpha^E$ 値が等しければ、分析対象化合物はカラム内を常に一定の化学量論比を保った平衡混合物として溶出していることを示すことになる。各種印加電位におけるヒドロキノンと *p*-ベンゾキノン、カテコールと *o*-ベンゾキノンの分率をピーク面積および保持係数から算出した結果を Table 1 に示す。両者はそれぞれ互いに良く一致していることがわかる。このことから、ヒドロキノンとカテコールはカラム内をそれぞれの還元体と酸化体の平衡混合物として移動しており、印加電位をコントロールすることにより酸化還元反応を二次的平衡として制御できることが明らかとなった。また、このことは同時に EMLC カラムに電位が均一に印加されているということを示している。

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. 3 に示す。印加電位 0 mV のときには、ドーパと L-チロシン、カテコールとレゾルシノールにほとんど保持の差がないため相互に分離することは困難であったが、+300 mV の電位を印加すると、ドーパ、ヒドロキノン、カテコールの酸化反応を利用して 5 つの化合物をすべて分離できることが

明らかとなった。

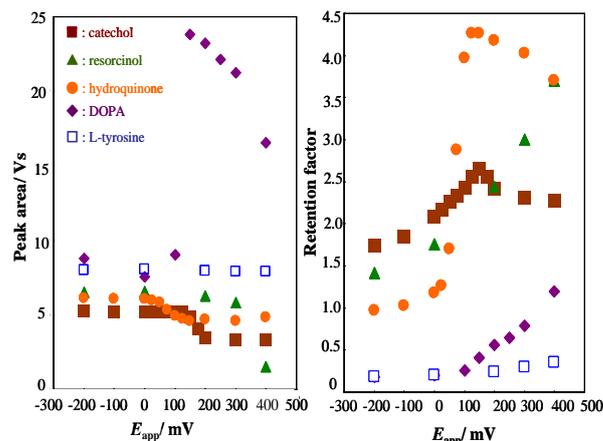


Fig.1 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

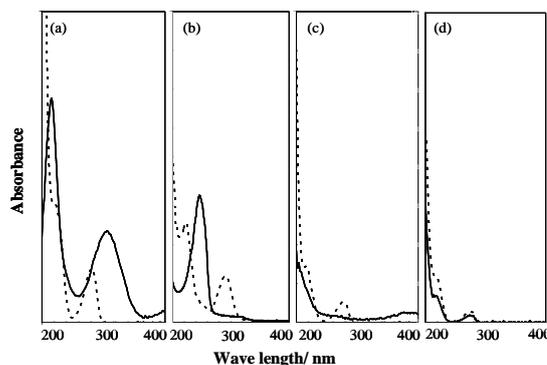


Fig.2 UV spectra obtained for DOPA(a), hydroquinone(b) and catechol(c) at 0 mV(dashed line) and +400 mV(solid line) and resorcinol(d) at +300(dashed line) and +400(solid line).

Table 1 Stoichiometric fractions of hydroquinone and catechol calculated from retention factors and peak areas.

Applied potential, mV	hydroquinone		catechol	
	$\alpha_{Red}$	$\alpha_{Red, E}$	$\alpha_{Red}$	$\alpha_{Red, E}$
25	0.99	0.93		
50	0.79	0.83		
75	0.37	0.46		
100	0.10	0.19		
125	0.02	0.02		
150			0.91	0.83
175			0.44	0.41
200			0.13	0.08

ついで L-アドレナリン、ドーパミン、L-ノルアドレナリンについて印加電位と保持時間およびピーク面積の関係を検討した。L-アドレナリン、L-ノルアドレナリンについて得られた結果

をそれぞれ Fig.4 と Fig.5 に示す。全ての化合物は、それぞれの化合物の酸化還元電位に対応する電位で保持時間とピーク面積に変化が生じた。これは、酸化還元反応により化学種の変換が生じたためであり、このことは溶出前後の吸収スペクトルの変化からも確認された。しかし、カラム内を酸化体と還元体の平衡混合物として移動しているというよりは、むしろ完全に化学種が変換されて溶出していることを示す結果が得られた。しかし、Fig.6 に示すように印加電位を制御することにより L-アドレナリンと L-ノルアドレナリンをカラム内で酸化し、それぞれをアドレノクロム、ノルアドレノクロムに変換して相互分離できることが示された<sup>10, 11)</sup>。

一方、L-アドレナリンの最終酸化体であるアドレノクロムを試料化合物として用い、印加電位に対するアドレノクロムのピーク面積(検出波長 220 nm)および保持係数の依存性について検討した。その結果を Fig. 7 に示す。アドレノクロムは、電位を印加することにより保持係数とピーク面積の両者に変化が生じた。これは、作用電極と溶質間で電子の授受が起こり、酸化還元反応により化学種の変換が生じたためと考えられる。このことは、Fig. 8 に示す溶出後の紫外可視吸収スペクトルの電位依存性からも確認できる。また、アドレノクロムは、 $E_{app} = -200$  mV  $-250$  mV の電位を印加した場合にアドレノクロムとその還元体であるロイコアドレノクロムとの平衡混合物として移動している可能性が示唆された。ピーク面積および保持係数から各種印加電位におけるアドレノクロムとロイコアドレノクロムの化学量論的分率を算出し、Table 2 に示す。なお、保持係数は化学種が変化していない場合も固定相と溶質間との相互作用の変化により電位依存性を示すため Fig. 7 に示した近似曲線を用いて求めた。また、ピーク面積は、 $E_{app} = -350$  mV のときを還元体、 $E_{app} = +200$  mV のときを酸化体と仮定して化学量論的分率を求めた。両者はそれぞれ互いに良く一致していることがわかる。このことから、アドレノクロムはカラム内をそれぞれの酸化体と還元体の平衡混合物として移動しており、印加電位をコントロールすることにより酸化還元反応を SCE として制御できる可能性があることがわかった。

以上のように L-アドレナリン、ドーパミン、L-ノルアドレナリンは、平衡混合物として保持時間を制御することは困難であったが、それぞれの化合物の酸化ピーク電位に対応する電位を印加することにより L-アドレナリンと L-ノルアドレナリンをカラム内で酸化し、相互に分離することができた。これは、本法のオンカラム化学種変換分離法としての有用性を示すものである。

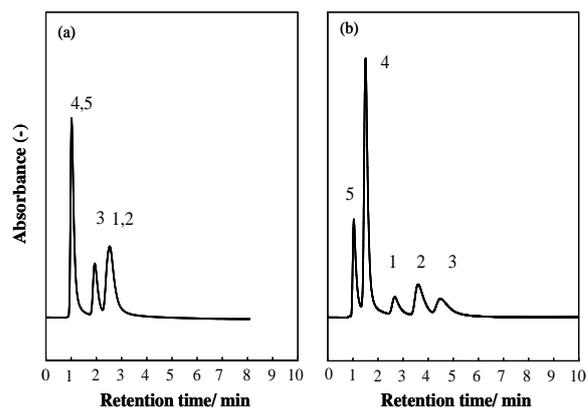


Fig.3 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by EMLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) +300 mV

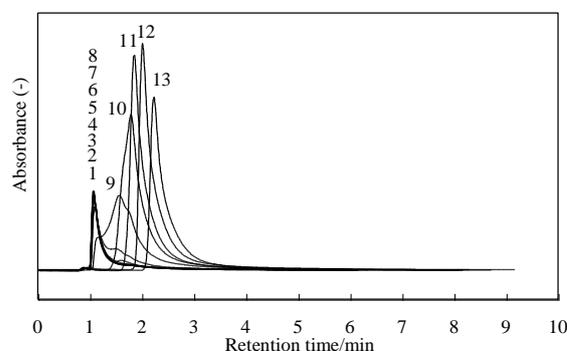


Fig.4 Dependence of chromatographic profile of L-adrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +200(8), +300(9), +400(10).

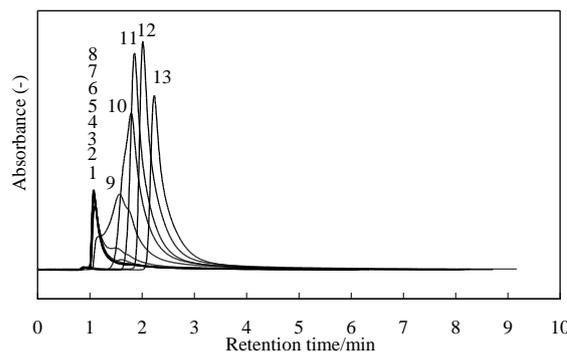


Fig.5 Dependence of chromatographic profile of L-noradrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +125(8), +150(9), +175(10), +200(11), +300(12), +400(13), +400(10).

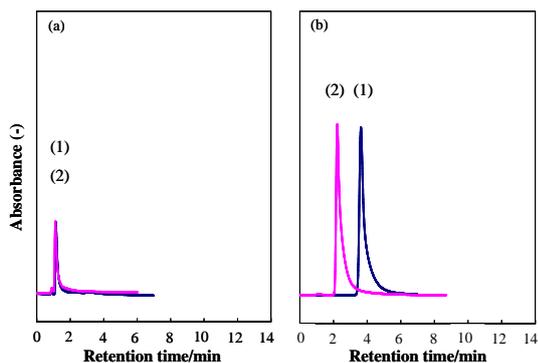


Fig.6 Chromatogram of L-adrenaline (1) and L-noradrenaline (2) obtained by EMLC. Applied potential; (a) -200 mV, (b) +400 mV

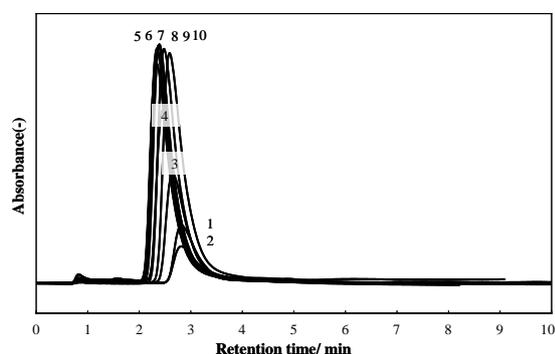


Fig. 7 Dependence of chromatographic profile of adrenochrome on applied potential (mV); -350(1), -300(2), -250(3), -200(4), -150(5), -100(6), -50(7), 0(8), +100(9), +200(10).

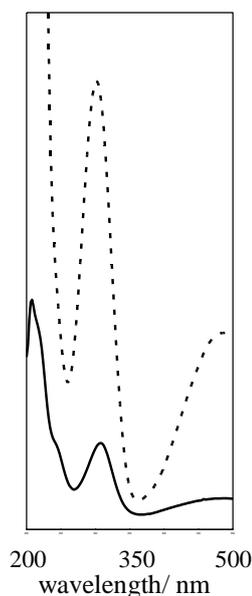


Fig. 8 Absorption spectra of adrenochrome at -350 mV(solid line) and +200 mV(dashed line).

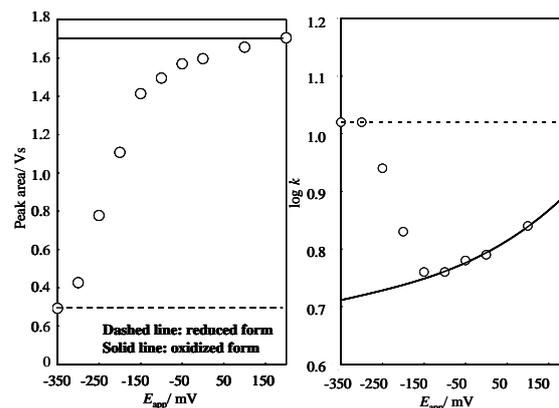


Fig.9 Dependence of peak area and retention factor of adrenochrome on applied potential.

Table 2 Stoichiometric fractions of adrenochrome calculated from retention factor and peak area

Applied potential, mV	$\alpha_{Red}$	$\alpha_{Red}^E$
-200	0.34	0.42
-250	0.73	0.66

### 3 参考文献

- 1) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.*, **75**, 2775 (2003).
- 2) K.Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, **29**, 49 (2006).
- 3) K.Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 951 (2007).
- 4) K. Saitoh, K. Koichi, F. Yabiku, Y. Noda, M. D. Porter, M. Shibukawa, *J. Chromatogr. A*, **1180**, 66, (2008).
- 5) 渋川雅美, 分析化学, **55**, 149 (2006).
- 6) M. Shibukawa, Y. Takazawa, K. Saitoh, *Anal. Chem.*, **79**, 6279 (2007).
- 7) J. A. Harnisch, M. D. Porter, *Analyst*, **126**, 1841 (2001).
- 8) L. M. Ponton, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **76**, 5823 (2004).
- 9) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.*, **59**, 102 (1987).
- 10) 小市孔大, 齊藤和憲, 日秋俊彦, M. D. Porter, 渋川雅美, 日本分析化学会第 56 年会講演要旨集, p. 252 (2007).
- 11) 小市孔大, 齊藤和憲, 日秋俊彦, 渋川雅美, M. D. Porter, *Separation Sciences 2007*, p. 48 (2007).