

オンライン化学種変換分離分析法の開発

—分離選択性発現の新しいアプローチ—

日大生産工 ○澁川 雅美 日大生産工 齊藤 和憲
日大生産工 西垣 敦子

1. まえがき

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。

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)として高速液体クロマトグラフィー(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が、原理的に酸塩基反応など反応速度の大きな反応に限られるという欠点がある。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的としている。

本講演では、これまでに開発を行なった多孔質グラファイトカーボン(PGC)の酸化還元機能または電気化学セルを用いたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC、および電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム酸化還元化学種変換分離について紹介する。これらの方法は、あらかじめ化学種変換を行なった後に化学種の分離を行なう通常のオンカラムあるいはオンライン誘導体化とは概念を全く異にするものであり、このような着想に基づいた研究例はこれまでに報告されていない。

2. オンライン酸化還元化学種変換 HPLC 2.1 PGC 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¹⁾。

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

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。しかし、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。もし、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と、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である。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。

一方、演者らはPGC逆相系カラム充填剤が酸化還元機能を有しており、しかもその反応速度は非常に高いことを見出し、これを利用したオンカラム酸化還元化学種変換HPLCを開発した^{2,3)}。さらに最近、分離場内の特定の位置で分析対象成分の化学種を変換し、変換前後の化学種の移動する距離を制御する方法でもSCE法と全く同じ分離効果が得られることを示した⁴⁾。この場合の分析対象化合物の保持係数は次式で与えられる。

$$k = \frac{k_A L_1 + k_B L_2}{L_1 + L_2} \quad (2)$$

ここで L_1 と L_2 はそれぞれ化学種変換を行なう前と後の分離場(カラム)の長さである。

そこで、Fig. 1に示したように、2つの分離場の間に酸化還元化学種変換ユニットを

Development of Separation and Determination Methods Incorporated with On-Line Derivatization

— A New Approach to Enhancement of Separation Selectivity —

Masami SHIBUKAWA, Kazunori SAITOH and Atsuko NISHIGAKI

配置して実験を行なった。Fig. 2は、2本のODSカラムの間に長さ10 mmのPGCカラム（BTR carbon BL-01）を置いたシステムによるCo-EDTA錯体の分離例を示したものである。ここでPGCカラムはあらかじめH₂O₂により処理し、酸化機能を持たせてある。試料溶液中のCoは2価としてEDTAと反応しているの、Coは前段のカラムでは2価錯体として、また後段のカラムでは3価錯体として移動しており、多量に共存する他金属成分から完全に分離されていることがわかる。

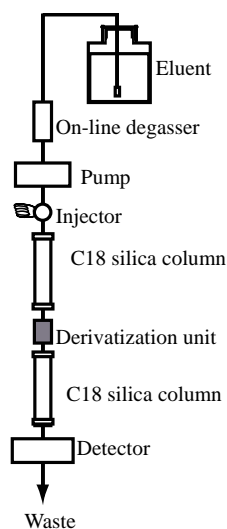


Fig. 1 Schematic diagram of on-line redox derivatization HPLC

このオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを銅合金中の微量コバルトの定量に応用した。銅合金標準物質 C7701 を酸に溶解した後、過剰の EDTA を加え pH 調整した試料溶液を Fig.2 と同一の HPLC システムに供して得たクロマトグラムを Fig. 3 に、また得られた定量値を認証値と比較して Table 1 に示す。本法により得られた値は認証値とよく一致していることがわかる。

このほか、2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol をキレート試薬として用いて、このオンライン酸化還元 HPLC システムを Fe(II)/Fe(III) 酸化還元対に適用し、Fe の選択的分離ならびに水試料中の Fe の酸化状態別分析に成功している⁵⁾。

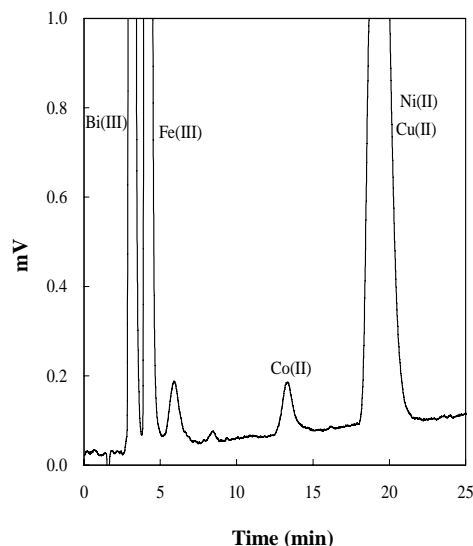


Fig.2 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Concentrations of metal ions injected: 50 ppb for Co(II); 50 ppm for Bi(III), Fe(III), Cu(II) and Ni(II). Conditions: mobile phase, 0.1 M acetate buffer solution (pH = 5); flow rate, 0.6 mL min⁻¹; column temperature, 25°C

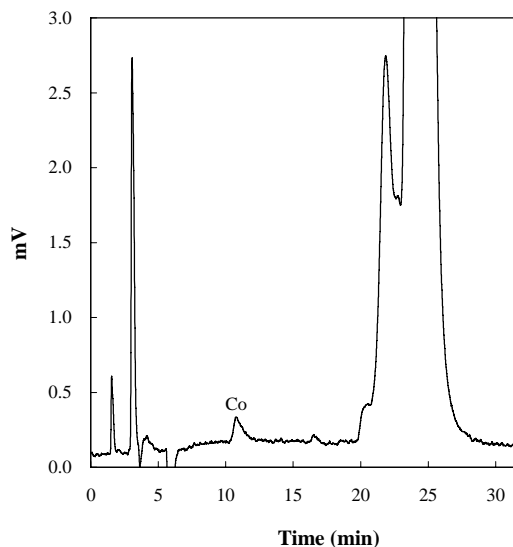


Fig. 3 Separation of cobalt in C7701 reference sample using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Mobile phase: 0.1 M acetate buffer solution (pH = 5) and 0.1 mM EDTA. For other experimental conditions, see Fig. 2.

Table 1. Quantification Results of the Reference Copper Alloy Sample C7701 for Cobalt

determined value [$\mu\text{g/g}$]	recommended value [$\mu\text{g/g}$]
$436 \pm 6.1^{\text{a}}$ ($n = 3$)	$423 \pm 14^{\text{b}}$

^{a)} Values are mean \pm SD.

^{b)} Mean of six reported by five different laboratories.

2. 2 電解セルによる酸化還元化学種変換

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。この目的に使用する電解セルは、電解効率が高く、耐圧性に優れているという条件を満たす必要がある。種々検討した結果、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）を使用することとした。作用電極への印加電位はポテンシオスタットにより制御した。

PGC カラムの代わりに化学種変換ユニットとして電解セルを配し、Co(II)および Co(III)を含む数種の金属の EDTA 錯体を試料としたときに得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示す。セルに -0.6V 印加した場合には、Co(III)錯体が Co(II)錯体に還元されて他金属錯体から分離されているのに対して、+0.3V 印加すると Co(II)錯体が酸化されて完全に分離されていることがわかる。同様のシステムを用いて多量の銅を含む試料溶液中のコバルトを分離した例を Fig. 5 に示した。

このように複数の酸化状態をとる金属を対象とするとき、オンライン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りうる。

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。

PorterらはPGCの導電性を利用し、これを充填した特殊なカラムを作製して、外部から電位を印加することにより表面の電位を変化させて溶質の保持特性を制御する電気化学クロマトグラフィー(electrochemically modulated liquid chromatography, EMLC)を開発した^{6,7)}。EMLCは、電気化学と分離化学が融合したユニークな分析法で、いわば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いえるものである。しかし、それでは新しい分離選択性の獲得は原理的に期待できない。むしろ EMLC をオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC として利用できれば、酸化還元反応を SCE として HPLC に組み込むことが可能にな

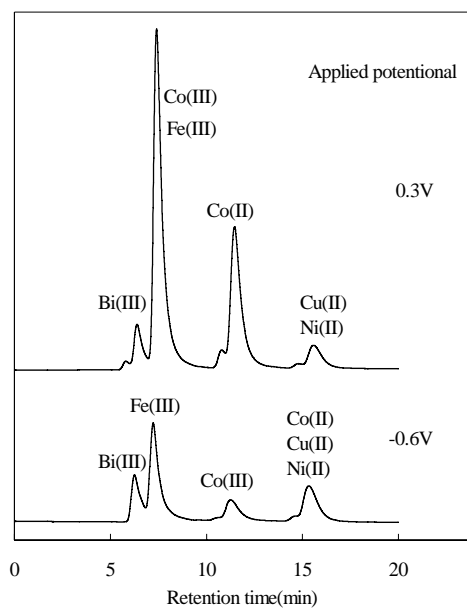


Fig. 4 Chromatograms of metal-EDTA complexes obtained by the on-line redox derivatization HPLC system equipped with an electrolytic cell

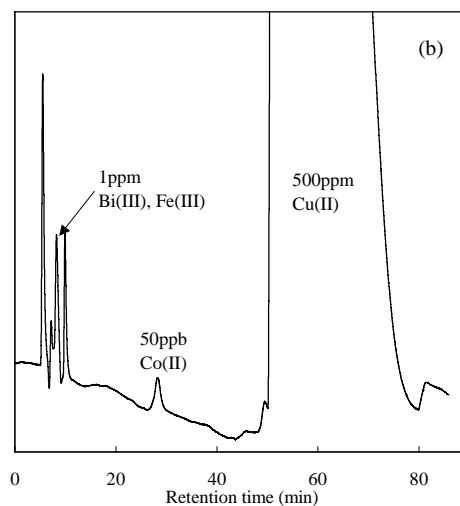


Fig.5 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions

ると期待される。

一方、これまでの演者ら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。これに対して、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レゾルシノールとカテコール、およびドーパとチロシンをモデル化合物として選び、EMLC 装置を用いてオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC

の可能性を検討した。用いた移動相は 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)を含む 20%(v/v)アセトニトリル-水混合溶媒である。

4種のモデル化合物についての保持時間の印加電位(E_{app})依存性をFig. 6に示す。レゾルシノールとカテコールは印加電位が+200 mV以下、またドーパとチロシンは0 mV以下の範囲では保持時間がそれぞれほぼ等しいが、それ以上の電位を印加すると保持時間に大きな差が生じることがわかる。溶出した化合物の紫外可視スペクトルを調べたところ、カテコールとドーパは正の電位を印加すると他の化学種に変換していることがわかった。すなわちこれらの化合物はそれぞれ対応する電位で酸化されたと考えられる。このことは、EMLC装置を用いてオンカラム酸化還元化学種変換HPLCを行なうことができ、酸化還元性物質の分離選択性を高めることができることを示している。Fig. 7は+300 mVの電位を印加したときの各化合物のクロマトグラムを示したものであるが、良好に分離できることがわかる。

しかし、スペクトルから判断すると、カラムから最終的に溶出した化合物は完全に酸化されており、カラム内を部分的に平衡混合物として移動したかどうかは明らかでない。すなわち、EMLCが酸化還元反応をSCEとしてHPLCに導入することができるかどうかは、いまだに明らかでない。これを明らかにするにはサイクリックボルタンメトリーなどにより、酸化還元反応の可逆性と速度に関する知見を得る必要がある。

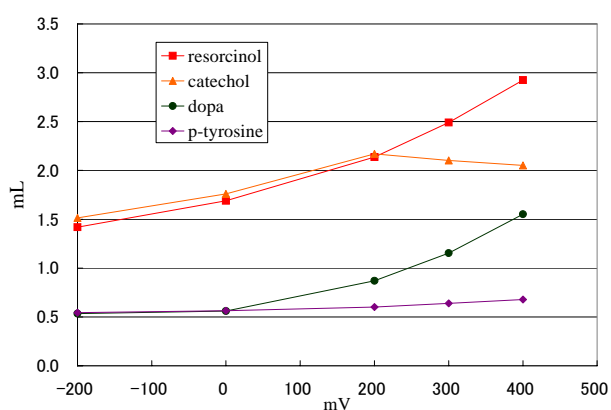


Fig. 6 Dependence of retention volumes of resorcinol, catechol, dopa and p-tyrosine on applied potential

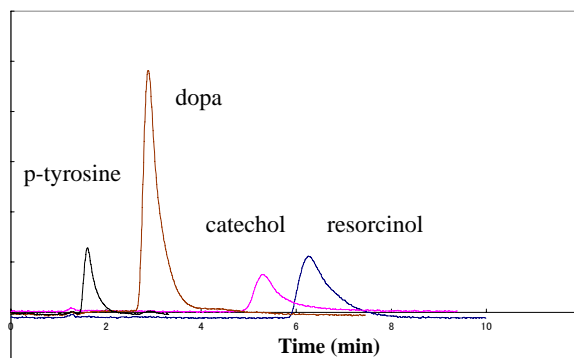


Fig. 7 Chromatograms of resorcinol, catechol, dopa and p-tyrosine obtained at E_{app} of +300 mV.

4. おわりに

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。酸化還元反応は通常反応速度が小さいが、高速化を目指して、触媒の利用のほか、高温高压下でのオンカラムならびにオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを設計し、構築する計画である。

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、本研究によ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と考えられる。また、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ものであり、社会的にも大きな貢献が期待できる。

5. 参考文献

- 1) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 102-109.
- 2) M. Shibukawa, A. Unno, Y. Oyashiki, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 397-400.
- 3) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2775-2783.
- 4) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, in press.
- 5) 安田卓也, 齊藤和憲, 中嶋秀, 渋川雅美, 第 66 回分析化学討論会講演要旨集, p. 226.
- 6) R. S. Deinhammer, E. Y. Ting, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 237-246.
- 7) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, *126*, 1841-1849.