

電気化学クロマトグラフィーを用いたオンカラム酸化還元化学種変換による選択的分離

日大生産工(院) 小市 孔大 アリゾナ州立大 Marc D. Porter

日大生産工 齊藤 和憲 日大生産工 澁川 雅美

【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のとして評価されている。しかし、近年、分析対象となる物質の数は加速度的に増加しており、複雑なマトリクスが共存するサンプル中から極微量の目的物質を正確に分離定量することが要求されている。この要求に応えるべくこれまでに様々な分析手法の開発がなされている。これまでに 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電気化学クロマトグラフィー(EMLC)を報告した^{1,2)}。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。しかし、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な分離しか得られず、新たな分離選択性の獲得は期待できない。

一方で、最近、Shibukawa らは、多孔質グラファイトカーボン(PGC)が、酸化還元作用を示すことを明らかにし、これを利用して一般に反応速度の小さい酸化還元反応を HPLC に導入したシステムを報告した³⁾。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(SCE)⁴⁾として利用するオンカラム酸化還元化学変換 HPLC を構築すること

を目的としている。

【実験方法】

分離カラムは、BTR Carbon(3.5 μm)を実験室で充填した EMLC カラムを使用した。溶離液は、pH6.0 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、窒素ガスでバブリングしながら 0.4 ml/min で通液した。外部電位の印加には、北斗電工製 HA-151 ポテンシオスタットを用いた。試料化合物は、0.1 mM に調製したカテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ドーパ、チロシンを用い、サンプルループ体積は 5 μl とした。検出は、UV 検出器を用いて 220 nm で測定した。

【結果および考察】

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. 1 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、それとともない保持係数が変化したためと考えられる。チロシンについては、EMLC における印加電位では、化学種の変換が生じなかったため保持係数も変化を示さなかったと考えられる。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については、 $E_{\text{app}} = 50, 75, 100$ 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。

On-Column Redox Derivatization Using Electrochemically Modulated Liquid Chromatography: An Approach to Enhancement of Separation Selectivity
Kohta KOICHI, Kazunori SAITOH, Marc D. PORTER and Masami SHIBUKAWA

これは、各印加電位におけるヒドロキノンと *p*-ベンゾキノンの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支持される。さらに、カテコールについてもピーク面積より平衡混合物として溶出していることが示唆されたが、化学種の変換前後で保持係数にほとんど差が生じなかったため解析が困難であった。

そこで、両者について、より詳細な酸化還元挙動の知見を得るために、サイクリックボルタンメトリーを用いて酸化還元挙動を検討した。その結果を Fig. 2 に示す。ヒドロキノンでは、明瞭な酸化還元ピークを観測することができ、3 回連続して得られたボルタモグラムにほとんど変化がみられなかったことから可逆的な酸化還元反応を示すことがわかる。得られたボルタモグラムより酸化還元電位は、0.142 V であり、EMLC においてヒドロキノンが、*p*-ベンゾキノンとの平衡混合物として溶出する際の印加電位と近接した値を示した。カテコールについては、明瞭な酸化還元ピークが観測されたが、酸化ピークに対して還元ピークの強度が小さく、測定を重ねるにつれてピーク電流が減少傾向を示した。このことより、カテコールでは、電位を印加することにより酸化還元反応は進行するが、その反応は可逆的ではないと考えられる。

最後に、本システムを用いて 5 種モデル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。これより、印加電位 0 mV のときには、ドーパとチロシン、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、レゾルシノール、カテコールについては、不可逆的な酸化反応により化学種を変換して、またヒドロキノンについては、*p*-ベンゾキノンとの平衡混合物として保持時間を制御することで分離できることが明らかとなった。

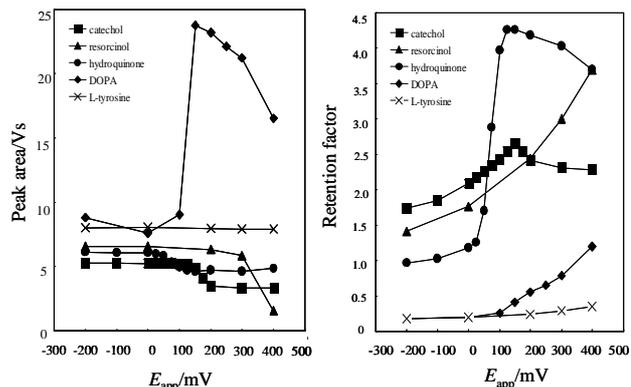


Fig.1 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

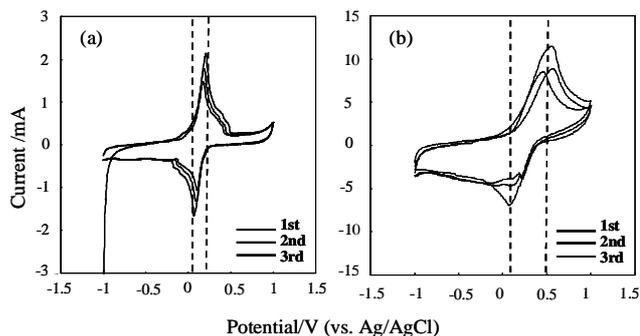


Fig.2 Cyclic voltammogram of hydroquinone(a) and catechol(b). Scan rate; (a) 1 mV/s, (b) 10 mV/s

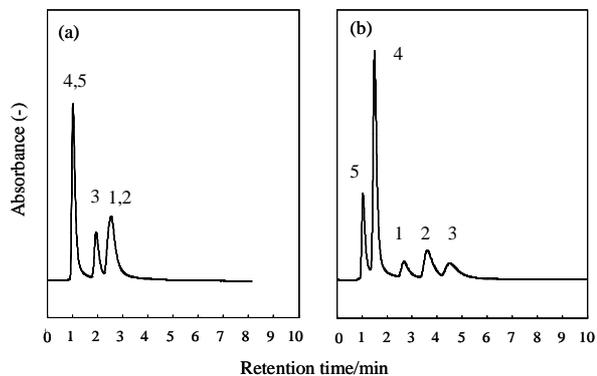


Fig.3 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by EMLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) 300 mV

【参考文献】

- 1) J. A. Harnisch, M. D. Porter, *Analyst*, 126 (2001) 1841
- 2) L. M. Ponton, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5823
- 3) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2775
- 4) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 102