

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 - カテコールアミンの酸化還元反応と保持挙動 -

日大生産工 (院) ○小市 孔大
日大生産工 齊藤 和憲・日秋 俊彦
埼玉大院理工 澁川 雅美
アリゾナ州立大 Marc D. Porter

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のひとつとして認識されている。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。このような背景から、常に新しい分離選択性を有するシステムの構築が求められている。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。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¹⁻³⁾。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選択性しか得られず、新たな分離選択性の獲得は期待できない。

一方、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^{4,5)}。

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の化学平衡(SCE)⁶⁻⁸⁾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する。

2. 実験方法

2.1 オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC

BTR Carbon(Biotech Research, 3.5 μm)を実験室で充填して EMLC カラムを作製した。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 μl 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。

On-Column Electrochemical Redox Derivatization for Enhancement of Separation Selectivity of Liquid Chromatography: Redox Reactions and Retention Behavior of Catecholamine

Kohta KOICHI, Kazunori SAITOH, Toshihiko HIAKI, Masami SHIBUKAWA and Marc D. PORTER

3. 結果および考察

3.1 オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC を用いた有機化合物の選択的分離

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。

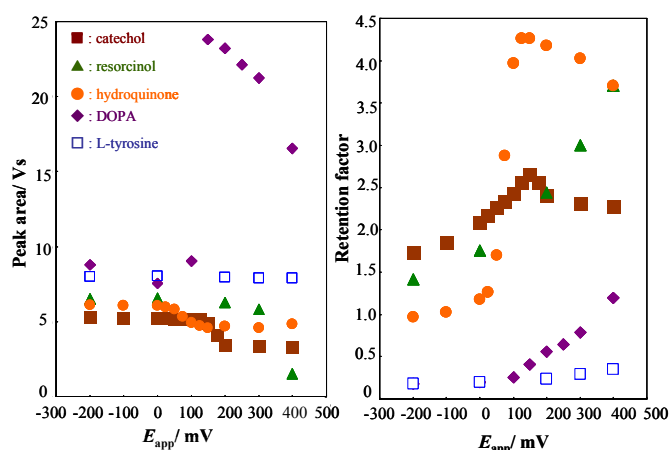


Fig.1 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

L-チロシンを除く化合物は、それぞれの化合物の Redox 電位に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の変換が生じ、それにともない保持係数が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

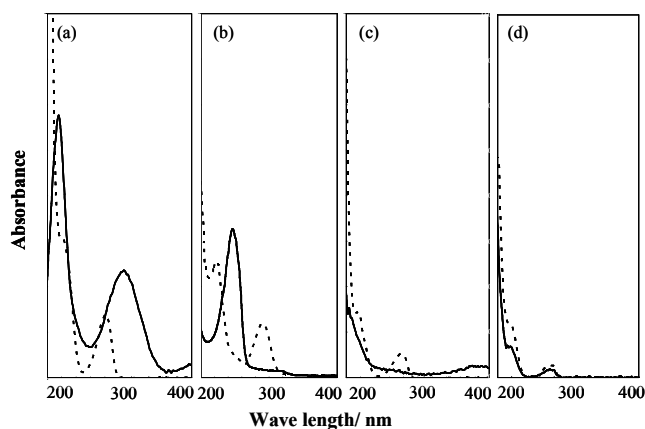


Fig.2 UV spectra obtained for DOPA(a), hydroquinone(b) and catechol(c) at 0 mV(dashed line) and +400 mV(solid line) and resorcinol(d) at +300(dashed line) and +400(solid line).

きる。L-チロシンについては、測定した電位範囲内では化学種の変換が生じなかったためピーク面積および保持係数も変化を示さなかったものと考えられる。

さらに、ヒドロキノンは、 $E_{app} = 25 - 125$ 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、SCE 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 α_{Ox} と α_{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るようであれば、 α 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 α 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バンド内での分率 α^E は、ピーク面積を用いて(2)式に基づいて求めることができる。

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

したがって、保持係数から求めた α 値とピーク面積から求めた α^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、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。

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

Applied potential, mV	hydroquinone		catechol	
	α_{Red}	α_{Red}^E	α_{Red}	α_{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

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。

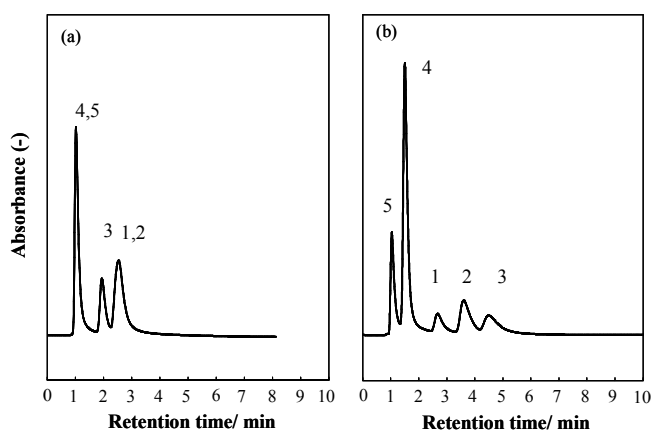


Fig.3 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by EMLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) +300 mV

3.2 オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC を用いたカテコールアミンの選択的分離

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依存性を検討した。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。

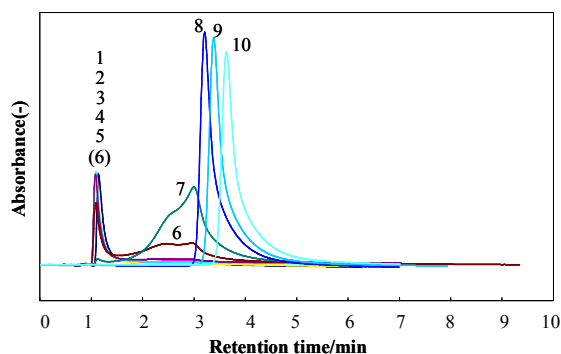


Fig.4 Dependence of chromatographic profile of L-adrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +200(8), +300(9), +400(10).

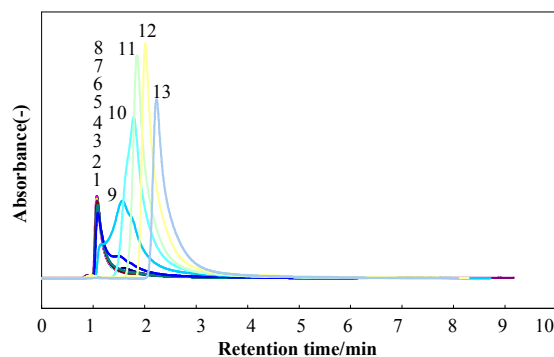


Fig.5 Dependence of chromatographic profile of L-noradrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +125(8), +150(9), +175(10), +200(11), +300(12), +400(13), +400(10).

全ての化合物は、それぞれの化合物のRedox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、作用電極と溶質との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.6に示した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。これは、カテコールアミンの酸化還元反応を SCE として制御できていないことを示している。しかし、Fig.7 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、相互分離できることが示され、オンカラム酸化還元化学種変換法が分離選択性を高める有用な手法であることが確認された。

4. 結言

本研究は、EMLC を用いて分析対象化合物の酸化還元反応を SCE として利用する、オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築することを目的として行った。

可逆的な酸化還元反応性を示すヒドロキノンやカテコールでは、印加電位を制御することによりそれぞれ *p*-ベンゾキノンおよび *o*-ベンゾキノンとの平衡混合物としてカラム内を移動させることに成功し、選択的に分離できることを示した。

また、カテコールアミンの選択的分離を試みたところ、カテコールアミンの酸化還元反応を SCE として制御できないことが明らかになった。しかし、この手法により分析対象化合物に固有の電位をカラムに印加することにより、化学種を変換することで L-アドレナリンと L-ノルアドレナリンを相互に分離することに成功した。

演者らの開発したオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムは、分析対象化合物として社会的ニーズの高まっている生体化合物および酸化状態によって大きく毒性の異なる金属化学種のスペシエーション分析などにも非常に有力な手法となりうるものであり、社会的にも大きく貢献できると期待される。

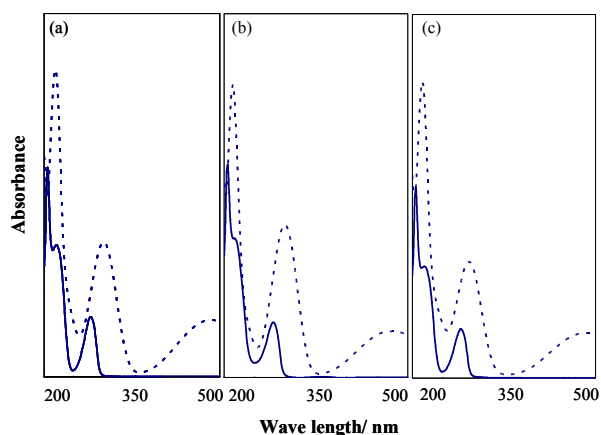


Fig.6 UV spectra obtained for L-adrenaline(a), dopamine(b) and L-noradrenaline(c) at -200 mV(solid line) and +400 mV(dashed line).

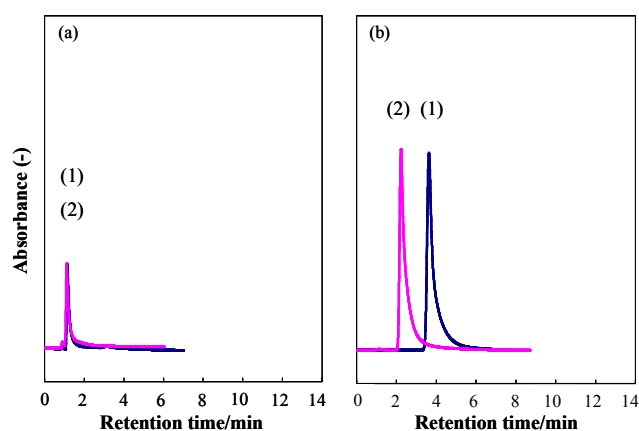


Fig.7 Chromatogram of L-adrenaline (1) and L-noradrenaline (2) obtained by EMLC. Applied potential; (a) -200 mV, (b) +400 mV

5. 参考文献

- 1) J. A. Harnisch, M. D. Porter, *Analyst*, 126 (2001) 1841.
- 2) L. M. Ponton, M. D. Porter, *J. Chromatogr. A*, 1059 (2004) 103
- 3) L. M. Ponton, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5823.
- 4) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2775.
- 5) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 49.
- 6) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 102.
- 7) N. Tanaka, K. Hosoya, *Nature*, 341 (1989) 727.
- 8) R. Kuroda, T. Wada, Y. Kokubo, K. Oguma, *Talanta*, 40 (1993) 237.