

機能性材料を利用した高選択的分離分析法の開発

渋谷雅美 (応用分子化学科)

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。一方、液液抽出法は優れた濃縮分離・精製法として古くから用いられているが、その多くは有害な有機溶媒を用いる場合が多い。最近の環境問題についての社会的関心の高まりとともに、より安全で環境に負荷を与えない新たな抽出法の創出が求められている。本研究は、このような要求に基づいて、種々の機能性有機物質を分離材料として用い、特異的选择性を持つ新しい分離分析法を開発することを目的として行なった。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行った。

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、研究者らはこれまでに多孔質グラファイトカーボン(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つの分離場間に酸化還元化学種変換ユニットを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 H_2O_2 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と反応しているので、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。

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も

成功した⁵⁾。

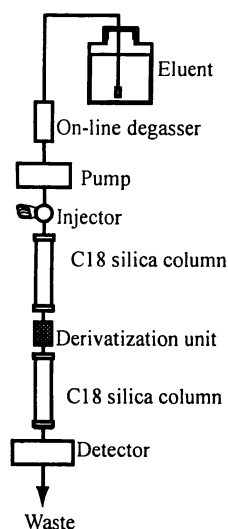


Fig. 1 Schematic diagram of on-line redox derivatization HPLC

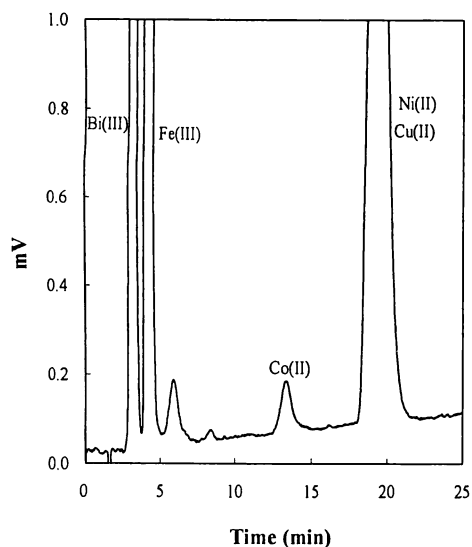


Fig.2 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Concentrations of metal ions injected: 50 ppb for Co(II); 50 ppm for Bi(III), Fe(III), Cu(II) and Ni(II). Conditions: mobile phase, 0.1 M acetate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

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

determined value [μg/g]	recommended value [μg/g]
436 ± 6.1 ^a (n = 3)	423 ± 14 ^b

^{a)} Values are mean ± SD.

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

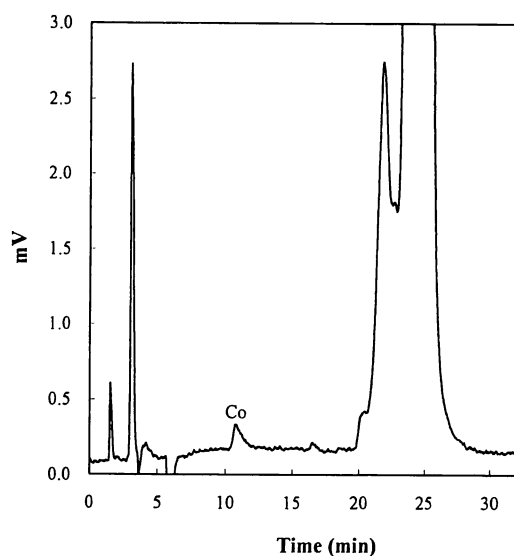


Fig. 3 Separation of cobalt in C7701 reference sample using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Mobile phase: 0.1 M acetate buffer solution (pH = 5) and 0.1 mM EDTA. For other experimental conditions, see Fig. 2.

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ョ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。

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

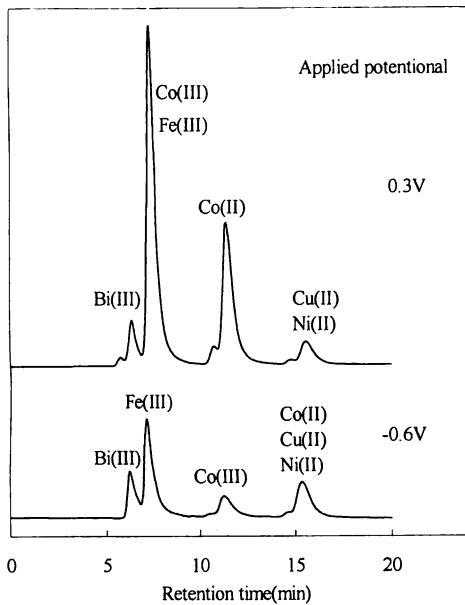


Fig. 4 Chromatograms of metal-EDTA complexes obtained by the on-line redox derivatization HPLC system equipped with an electrolytic cell

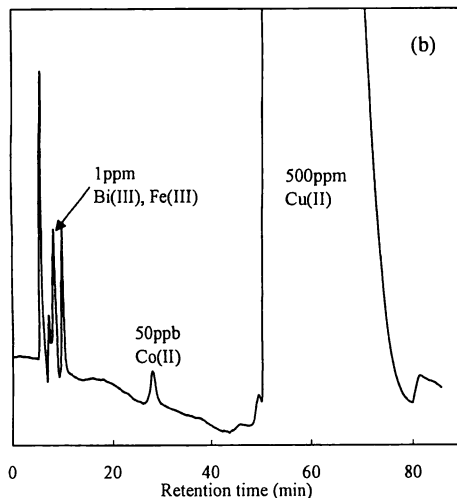


Fig.5 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions

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⁾。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ると期待される。

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ヒドロキノン、レゾルシノール、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0.1M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。

5種のモデル化合物についての保持体積の印加電位(E_{app})依存性をFig. 6に示す。これより、チロシンを除いては印加電位に依存して保持体積が変化していることがわかる。溶出した化合物の紫外可視スペクトルを調べたところ、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ている。特にこのうち、ヒドロキノンは酸化体と還元体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になった。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。

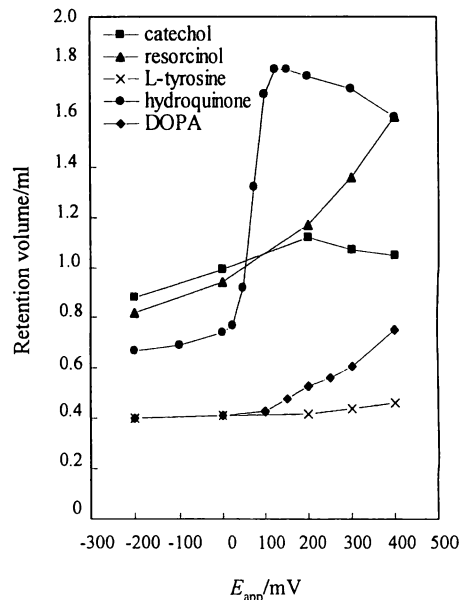


Fig. 6 Dependence of retention volumes of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

4 水性二相抽出法による金属イオンの選択的分離法の開発

2種類の水溶性高分子または高分子と無機塩の水溶液を用いて構成される水性二相系を用いる抽出法は、有機溶媒を使わない環境に優しい

液液抽出法としての利用価値が認識されてきている。特にハロゲン化物イオン及びチオシアン酸イオンを抽出試薬として用いた金属イオンの抽出分離が、いくつかの研究グループによって報告されている。しかし、ごく一部の金属イオンを除いては、高い選択性を持つ抽出系を構築するに至っていない。

液液抽出の分離選択性を高める有効な方法の一つに、マスキング剤の使用がある。しかし、水性二相抽出系は、二相がいずれも水を主体としており、両相の疎水性あるいは親水性に大きな違いがないため、従来の有機溶媒—水系で使用されるマスキング試薬は必ずしも有効であるとは限らない。これまでに著者らは、ポリエチレングリコール(PEG)と Na_2SO_4 から成る水性二相系において、チオシアン酸イオンにより多くの金属イオンがPEGに富む上相に抽出されることを見出した⁷⁾。そこで本研究では、この抽出系に第2の錯形成剤を添加することによりマスキング効果を発現させ、金属イオンの選択的抽出分離系を構築することを目的として検討を行った。

チオ硫酸イオンといくつかのカルボン酸イオンについて、各金属イオンに対するマスキング効果を調べたところ、Cu(II)に対してチオ硫酸イオンがマスキング効果を示すことがわかった。そこで二相系の pH およびマスキング剤の添加量を検討して最適マスキング条件を決定した。Fig.7に、チオシアン酸イオンを2 mmol 添加した系におけるCu(II)の分配比のpHおよびチオ硫酸イオン添加量依存性を示す。チオ硫酸イオンは酸性溶液中では不安定であるので、弱塩基性条件下で実験を行なった。Fig.7からわかるように、いずれのpHにおいても、チオ硫酸イオン添加量が増加するにしたがって分配比が低下した。0.4 mmol 以上添加するとlogDが負の値となり、Cu(II)は Na_2SO_4 に富む下相にとどまることを示している。一方、Zn(II)はこの条件下ではlogDが2.0以上で、チオ硫酸イオンの影響を全く受けず上相に抽出されており、チオ硫酸イオンを0.6 mmol 添加することによって両金属イオンを完全分離できることが明らかになった。液液抽出平衡の解析により、チオ硫酸イオンはCu(II)イオンに2分子配位してマスキング効果を示すことがわかった⁸⁾。

このほかにもグルコン酸イオンが、Fe(III)イオンに対して選択的なマスキング効果を示すことを見出している⁸⁾。

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

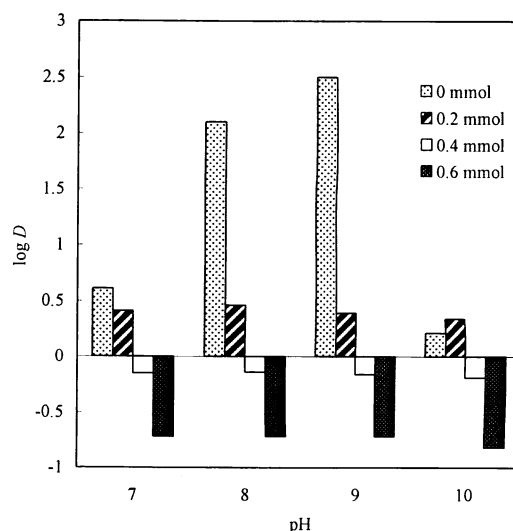


Fig. 7 Masking of Cu(II) with thiosulfate ion

Aqueous biphasic system was formed by mixing 3.0 g of 50 % (w/w) PEG #4000 and 6.0 g of 20 % (w/w) Na_2SO_4 . The amount of KSCN added was 2 mmol. Buffer solutions used were Bis-Tris (pH 7) and $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{NO}_3$ (pH 8, 9, 10)

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。

一方、本研究により初めて、水性二相抽出系における金属イオンの選択的マスキングが可能であることが明らかになった。分離機構を明らかにし、より複雑な混合物に対して選択的抽出系の構築を可能にするには、さらに体系的な研究が必要である。

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.*, **2006**, *29*, 49-56.
- 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) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, *126*, 1841-1849.
- 7) M. Shibukawa, N. Nakayama, T. Hayashi, D. Shibuya, Y. Endo, S. Kawamura, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *427*, 293-300.
- 8) 渋川雅美, 南澤宏明, 齊藤和憲, 塩澤広嗣, 小峰圭介, 清水真吾, 日本大学生産工学部研究報告 A, **2006**, *38*, 45-50.