

オンラインおよびオンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC の開発

日大生産工 澁川 雅美 日大生産工 齊藤 和憲
日大生産工(PD) ○高橋 さつき

1 まえがき

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。本研究グループは、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するオンラインおよびオンカラム化学種変換 HPLC の開発を進めている。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 HPLC システムについて紹介し、実際の分離例を報告する。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プレカラム誘導体化法や、特異的な検出を目的とするポストカラム誘導体化法とは概念を全く異にするものである。また、PGC のもつ接触的酸化還元作用の発現機構について検討した結果についても、併せて報告する。

2 オンライン酸化還元化学種変換 HPLC

2.1 PGC カラムを用いたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC による Fe(II)および Fe(III)シアン化物錯体の選択的分離

オンライン酸化還元化学種変換 HPLC は 2 つの分離カラムとその中間に配置した酸化または還元を行う化学種変換ユニットから構成されている^{1,2)}。この方法は変換前後で化合物の移動速度が変化するため選択的分離が可能である。これまでに化学種変換ユニットとして PGC を用い、銅合金中の微量 Co の定量に適用してその分離選択性の高さを実証した¹⁾。この方法の適用の拡大を目的とし、シアン化物イオンを配位子とした Fe 錯体を用い、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC における化学種変換および HPLC 分離の条件の検討を行った。

Fe^{II}(CN)₆⁴⁻と Fe^{III}(CN)₆³⁻を含む 7 種類の金属シアン化物錯体を試料とし、PGC カラムを組み込

んだフローシステムに注入し、ピーク面積を測定した。PGCカラムを除いたフローシステムにおけるピーク面積と比較したところ、Fe^{II}(CN)₆⁴⁻とFe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積にのみ変化が見られた。ピーク面積が変化したということは化学種が変わったことを意味する。すなわちPGCカラムを通過する際にFe^{III}(CN)₆³⁻の一部が還元されFe^{II}(CN)₆⁴⁻に、またFe^{II}(CN)₆⁴⁻の一部が酸化されFe^{III}(CN)₆³⁻に変換したと考えられる。そこでPGCカラムを還元処理して同様の測定を行ったところ、Fe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積がFe^{II}(CN)₆⁴⁻と等しくなった。これらのピークのスペクトルを調べた結果、Fe^{III}(CN)₆³⁻がPGCによってFe^{II}(CN)₆⁴⁻に還元されたことが確認された。

ついでPGCカラムの酸化処理を行い、これを用いた際の各金属シアン化物錯体のピーク面積の変化を調べた。Fe^{II}(CN)₆⁴⁻のピーク面積がFe^{III}(CN)₆³⁻と等しくなり、これらのピークのスペクトルからFe^{II}(CN)₆⁴⁻がPGCカラムを通過することでFe^{III}(CN)₆³⁻に酸化されたことがわかった。一方、他の金属シアン化物錯体は酸化および還元処理されたPGCカラムを通過しても変化は見られなかった。このことより、PGCカラムを酸化および還元処理することによりFe^{II}(CN)₆⁴⁻およびFe^{III}(CN)₆³⁻を選択的に酸化および還元できることを明らかにした。

そこで、PGCカラムを2本の分離カラムの中間に組み込んだオンライン酸化還元化学種変換HPLCシステムを構築し、金属シアン化物錯体の測定を行った。また各測定において、比較のために化学種変換ユニットを除いたシステムでも同様の測定を行った。酸化処理をしたPGCを組み込んだシステムで得られたクロマトグラムをFig.1に示す。化学種変換ユニットを除いたシステムでは4分に溶出したFe(CN)₆⁴⁻がオンライン化学種変換HPLCシステムでは7分に溶出した。これは前段のカラムではFe(CN)₆⁴⁻として、後段のカラムではFe(CN)₆³⁻として移動

Development of On-Line and On-Column Electrochemical Redox Derivatization HPLC

Masami SHIBUKAWA, Kazunori SAITOH and Satsuki TAKAHASHI

したためである。これにより $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ をシステムピークから分離することができた。また, Fig.3 は還元処理をした PGC カラムを化学種変換ユニットとして組み込んだシステムにより得られたクロマトグラムである。化学種変換ユニットを除いたシステムと比較すると $\text{Co}(\text{III})$ と $\text{Fe}(\text{III})$ の溶出順が逆転した。これは, 前段のカラムでは $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ として移動したが, 後段のカラムでは保持の小さい $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ として移動し $\text{Co}(\text{III})$ より早く溶出したためである。これらのことから, 酸化もしくは還元処理した PGC カラムを用いるオンライン酸化還元化学種変換 HPLC によりヘキサシアノ鉄酸イオンの溶出位置を変化させ, 選択的に分離することが可能であることを明らかにした。

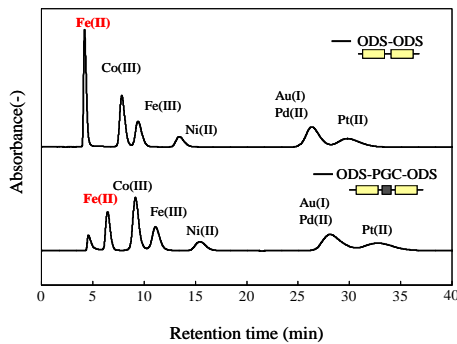


Fig.1 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(oxidized)-ODS system.

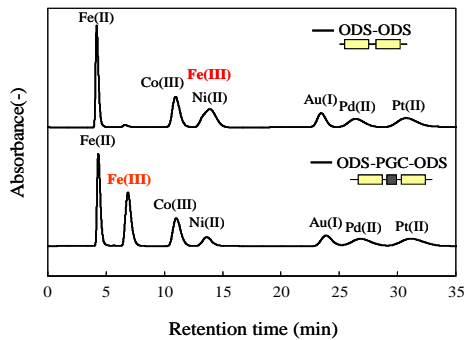


Fig.2 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(reduced)-ODS system.

2.2 オンライン酸化還元化学種変換HPLCによるCo-edtaの電解酸化反応の解析

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用いて電気化学的に酸化還元化学種変換を行うことも可能である。このオンライン電気化学的酸化還元化学種変換HPLCによりステンレス鋼中の微量コバルトの分離に成功した²⁾。一方, この研究の過程で, $\text{Co}(\text{II})$ -edta錯体を電解酸化した際に, $\text{Co}(\text{III})$ -

edta錯体の他にピークが検出されることが明らかになった。これは酸化ユニットとして PGC カラムを用いた際には見られない現象である。

分離カラムの前段に電解セルを設置したシステムにより $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体の電解酸化について検討した。Fig.3 に $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を試料として用いたときの各印加電位におけるクロマトグラムを示す。電位を 0.1V 印加すると, $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体がすべて酸化され, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の鋭いピークが観測された。この酸化挙動は酸化ユニットとして過酸化水素で酸化処理した PGC カラムで見られたものと同じである¹⁾。しかし, Fig.3 に示すように, $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を電解酸化すると, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体のピークのほかに, それより僅かに速い溶出位置に小さなピーク(ピーク X)が生じている。ピーク X について得られた VIS スペクトルと $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体のスペクトルを Fig.4 に示す。ピーク X のスペクトルは可視領域では 550 nm に最大吸収を示すが, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の最大吸収波長は 538 nm である。Doi は, 過マンガン酸イオンを用いて $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を酸化すると, 550 nm に最大吸収を持つ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ が迅速に生じ, その後閉環反応が徐々に進行して 538 nm に最大吸収を持つ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ を生成することを報告した³⁾。Fig. 4 に示すように, ピーク X の最大吸収波長は $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ のそれと一致している。これらの結果は, ピーク X が $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ であり, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ から $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ への閉環反応はセル内で完全に進行しないことが明らかになった。これまでサイクリックボルタンメトリーを用いて Co -edta 錯体の酸化還元挙動に関する研究が数多くなされているが, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ の存在を明確

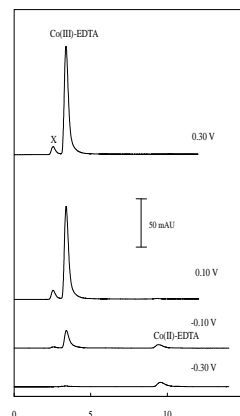


Fig. 3 Variation of chromatograms obtained for an injection of $\text{Co}(\text{II})$ -edta with potential applied to the electrolytic flow cell.

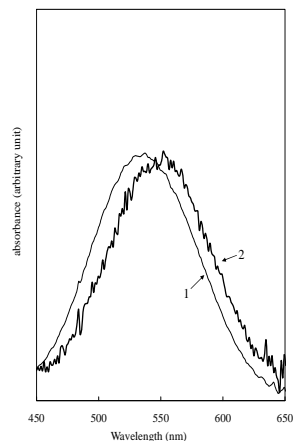


Fig. 4 VIS spectra obtained for the peak X and that for $\text{Co}(\text{III})$ -edta. 1 = $\text{Co}(\text{III})$ -edta, 2 = peak X

に示したものはない。

これらの結果はオンライン酸化還元化学種変換 HPLC が分離だけでなく電気化学反応の生成物の同定や反応機構の解析にも有効な手法となりうることを示唆している。

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 HPLC

電導性固定相を作用電極として用いてオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムの構築を試みた。本システムは変換効率が 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。また、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。そこで、それぞれ類似した構造を持つヒドロキノン、レゾルシノールおよびカテコール、ならびにドーパとチロシンをモデル化合物として選び、オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC の可能性を検討した。また、カラムは Porter らによって考案された EMLC カラムを用いた。このカラムは電導性をもつ PGC を充填した特殊なカラムで、外部から固定相の電位を制御することができる^{4,5)}。

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.5 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、それに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とカテコールについては、25-125 mV および 150-200 mV においてこれらのその酸化体である *p*-または *o*-ベンゾキノン両者の

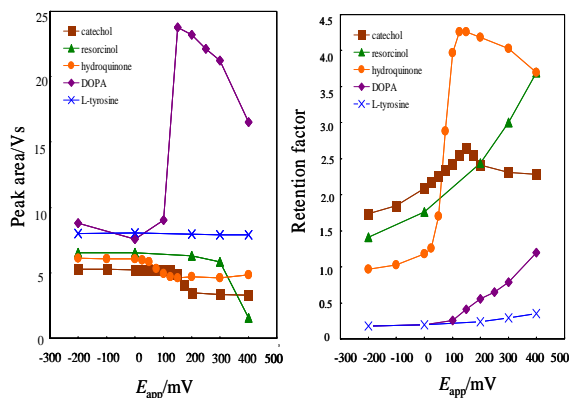


Fig.5 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

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。これは、各印加電位におけるヒドロキノンとカテコール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。

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.6 に示す。印加電位 0 mV では、ドーパとチロシン、カテコールとレゾルシノールに相互分離することができないのに対して、+300 mV の電位を印加すると、ドーパ、カテコールおよびヒドロキノンは酸化反応により化学種が変換して相互分離できることを明らかにした。

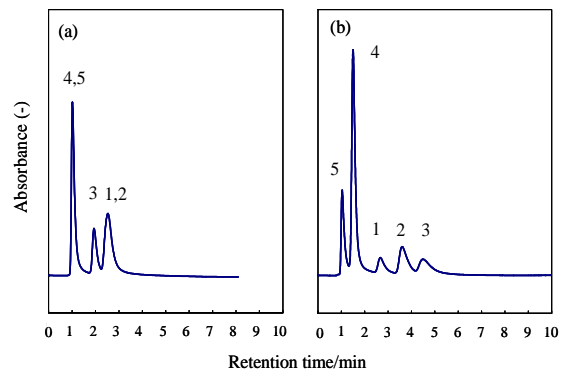


Fig.6 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by the on-column electrochemical derivatization HPLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) 300 mV

4 PGC の酸化還元反応機構

PGC の示す酸化還元作用は、その表面にごく微量存在する官能基に基因する可能性が高いと考えられているが、XPS 測定の結果からは PGC 表面には炭素以外の元素は確認されておらず、現時点ではそれらの官能基が特定されていない。また PGC は多孔質であり、かつイオン交換性を有することから、酸化剤や還元剤を吸着保持し、これらが酸化または還元反応を引き起こしている可能性も否定できない。今後、酸化還元化学種変換 HPLC の適用の拡大を図るためにも、PGC 上での酸化還元反応を系統的に評価し、その反応機構について知見を得ることが必要である。

そこで PGC 上における酸化還元反応機構解明の第一段階として、PGC カラムへの還元剤吸着の評価と、吸着量と酸化還元反応効率の関連について検討した。試料としては Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , NaNO_2 , NaNO_3 , KI , および KIO_3 の6種の塩を選択し、各陰イオンの定量は間接吸光検出イオンクロマトグラフィーを用いて行った。

PGC カラムに Na_2SO_3 溶液を注入したところ、 SO_3^{2-} のピークに加えて SO_4^{2-} のピークを検出し、

PGC カラム内での酸化反応が起こっていることを確認した。また、カラム通過前後のイオン総量を比較したところ、 IO_3^- 、 I^- 、 NO_2^- 、および SO_4^{2-} は PGC カラム前後でのイオン量の変化はほとんど見られなかったのに対し、 SO_3^{2-} と NO_3^- では、注入物質量に対して溶出物質量が減少しており、イオンの一部はカラム内に吸着している可能性が示唆された (Fig. 7)。

次に、予め Na_2SO_3 溶液を通液して、還元処理を行った PGC カラムについて SO_3^{2-} および NO_3^- の吸着量を求めた。その結果、還元処理を施さなかった PGC カラムに比べ NO_3^- の吸着量は著しく減少したが、 SO_3^{2-} は還元処理を施したカラムにも強く吸着した。この時の SO_3^{2-} は PGC カラム内で酸化され、 SO_4^{2-} として溶出していたが、 SO_3^{2-} の吸着量と SO_4^{2-} への酸化率の間に相関関係はみられなかった。また PGC カラム内での NO_3^- の酸化還元反応も観測されなかった。

以上の実験結果より、PGC カラム上での酸化還元反応は、吸着した酸化剤や還元剤が引き起こすのではなく、PGC 自体が反応に関与している可能性が高いと考えられる。また、 SO_3^{2-} と NO_3^- の PGC への吸着は互いに異なる機構であることが示唆される。

次に溶離液の pH が PGC の酸化還元反応性に与える影響について考察した。 $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ H_2O_2 溶液と、これに LiClO_4 を添加した溶液を通液した場合の PGC カラムの酸化還元性を調べたところ、 LiClO_4 を添加した溶液では Co(II)-edta に対して酸化性を示した。一方、 H_2O_2 のみの溶液で処理した PGC に Co(II) および Co(III)-edta を注入すると、どちらも Co(II)-edta に近いスペクトルを示し、PGC が還元性を示すことが分かった。

事前に酸化処理を施した PGC カラムに、溶離液として pH 3 または pH 11 に調整した 0.1 mol dm^{-3} LiClO_4 水溶液を用い、試料として Co(II) および Co(III)-edta 錯体を注入した。溶出ピークの紫外吸収スペクトルから Co の酸化状態を評価したところ、pH11 の条件では Co(II)-edta がカラム内で酸化され Co(III)-edta として溶出しており、このときの PGC カラムが酸化性であることが明らかとなった。一方 pH3 の溶離液を用いた場合では、 Co(II) および Co(III)-edta のスペクトルは pH 11 でのスペクトルと比較すると、どちらも吸光度が減少した。ここで、 Co(II) と Co(III) の間の酸化還元反応には水素イオンが関与していないことを考慮すると、今回の現象は酸化 PGC カラムが酸性の溶離液を通液することによってやや還元性に変化したことを示唆している。

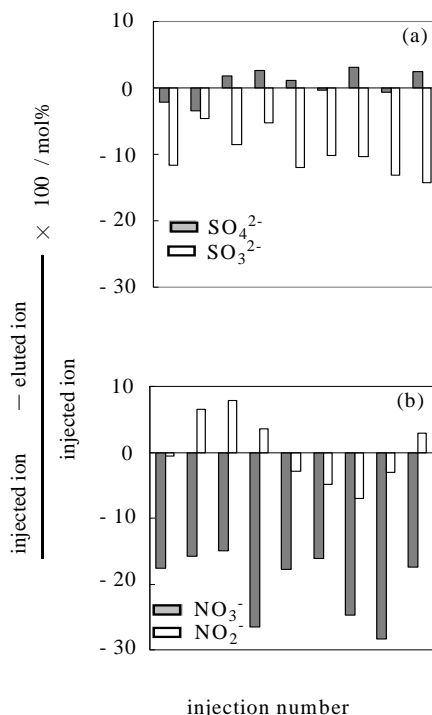


Fig. 7 Adsorption of inorganic anions on a PGC column (a) sulphonate and sulphate ions, (b) nitrite and nitrate ions. Eluent; $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ potassium hydrogen phthalate (pH 8.5)/methanol (90 / 10 (v/v)) containing 0.01% triethanolamine. Sample concentration; $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

XPS 測定の結果では、PGC 表面には炭素以外の元素は確認されていない。しかし、二次元グラフアイト構造をとる炭素原子だけでは、溶離液の pH や電解質の有無によって PGC の酸化還元性が変化することを説明できない。これらの結果は、水素イオンを授受できる官能基が PGC 表面に存在し、この官能基が酸化還元反応を引き起こしていることによるのではないかと考えられる。酸化還元性を有すること、水素イオンの授受を行うこと、および PGC の生成過程を考慮し、条件を満たす官能基を持つモデル化合物としてヒドロキノノン-ベンゾキノン系が想定される。

5 参考文献

- 1) K.Saitoh, N.Yamada, E Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J.Sep.Sci*, **2006**, 29, 49-56.
- 2) K. Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, in press.
- 3) K. Doi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, 55, 1431-1436.
- 4) R. S. Deinhammer, E. Y. Ting, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 237-246.
- 5) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, 126, 1841-1849.