

オンライン化学種変換分離分析法の開発と分離選択性および効率の検討

埼玉大院理工 ○渋谷 雅美
日大生産工 齊藤 和憲

1. 当初の課題の意義, 目的およびその概要

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、優れた分離分析技術として広く認識され、研究・産業・医療の各分野で利用されている。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。特に環境試料中の微量汚染物質や生体試料中の生理活性物質の分離定量は困難であることが多く、常に新しい分離選択性をもつ HPLC システムの開発が望まれている。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。

本研究グループは、平成 12~16 年度ハイテクリサーチセンター整備事業において「機能有機物質を用いる高選択的分離分析システムの開発とその環境汚染物質分析への応用」をテーマとして研究を行い、酸化還元反応による化学種変換を利用した新しい HPLC 法を開発した。この方法は、酸化還元反応による化学種変換を HPLC 分離場に導入したもので、2つのシステムを創案している。一つは、分離と化学種変換を同時に行なうオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムであり、他の一つは化学種変換と分離を切り離れたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムである。前者は、多孔質グラファイトカーボン(PGC)が固定相担体としてだけでなく酸化還元触媒としても機能すること、およびこれを酸化剤または還元剤で処理することによってその酸化還元電位を変化させることを見出したことに基づいて考案した¹⁾。一方、後者は分離場内の特定の位置で化学種を酸化還元反応によって変換し、変換前後の化学種の移動する距離を制御することにより選択的な分離を行うものである。このシステムは、化学種変換ユニットとして PGC を充填したカラム、またはグラファイトを作用電極とした電解セルを用いて構成した。

本研究では、これらの研究成果に基づいて、新たに電気化学的作用場を HPLC 分離場に導入した電気化学クロマトグラフィー(EMLC)を用いる化学種変換分離分析システムを構築したほか、開

発したそれぞれのオンライン化学種変換 HPLC 法の有用性を実試料に適用して分離選択性ならびに分離効率の面から評価した^{2,3)}。また、本研究で分離場あるいは反応場を構成するカラム充填剤として用いた化学結合型逆相系シリカゲルおよび多孔質グラファイトの表面構造について検討した^{4,5)}。

2. 研究成果

a. 平成 19 年度における研究成果

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 EMLC を報告した^{6,7)}。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が、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の分離選択性しか得られない。そこで本研究では、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⁸⁾として利用できないかと考え、電気化学的酸化還元化学変換 HPLC を構築し⁹⁾、その生体関連物質の選択的分離への応用を試みた。

【実験】

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

Development of Separation methods with On-Line Derivatization and Evaluation of Their Separation Selectivity and Efficiency

Masami SHIBUKAWA and Kazunori SAITOH

いた。

【結果と考察】

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。L-チロシンを除く化合物は、それぞれの化合物の酸化還元電位にほぼ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が変換し、それにもなつて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きる。それぞれの試料化合物の酸化体の同定は、標準物質のスペクトルあるいは文献データと比較することにより行った。L-チロシンは測定した電位範囲内では化学種の変換が生じないため、ピーク面積に変化は見られない。保持係数はわずかに印加電位依存性を示しているが、これは固定相の表面電位の変化によって溶質の保持特性が変化したためと考えられる。

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、二次的平衡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たりするようであれば、 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ピークの面積 A は(2)式で与えられる。

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

ここで、 A_{Ox} と A_{Red} および α_{Ox}^E と α_{Red}^E はそれぞれ酸化体と還元体のピーク面積と溶出バンド内でのそれぞれの分率を示す。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た結果を 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

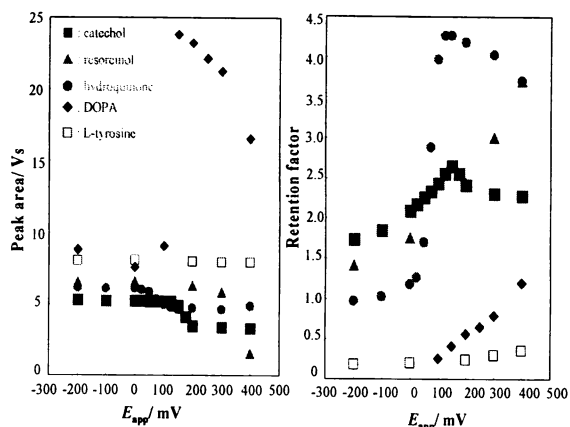


Fig.1 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

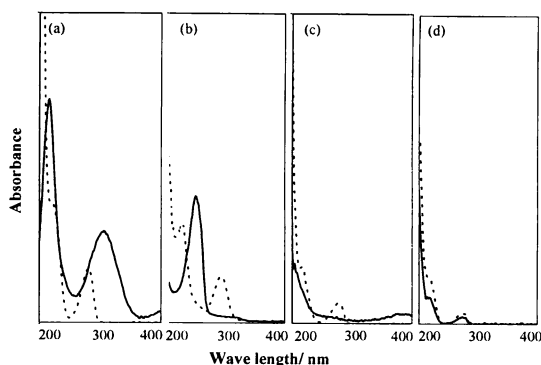


Fig.2 UV spectra obtained for DOPA(a), hydroquinone(b) and catechol(c) at 0 mV (dashed line) and +400 mV (solid line) and resorcinol(d) at +300 (dashed line) and +400 (solid line).

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

Applied potential, mV	hydroquinone		catechol	
	α_{Red}	$\alpha_{Red, E}$	α_{Red}	$\alpha_{Red, E}$
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

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還元体と酸化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二次的平衡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。

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

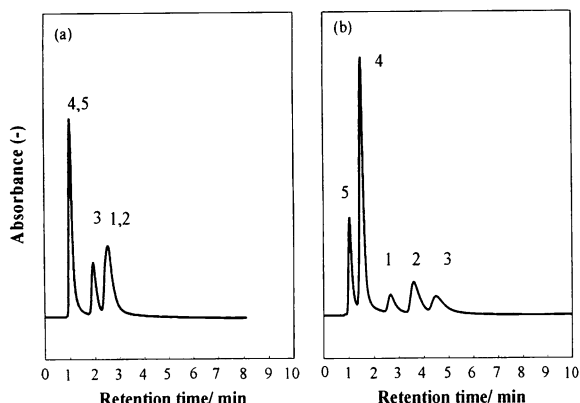


Fig.3 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by EMLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) +300 mV

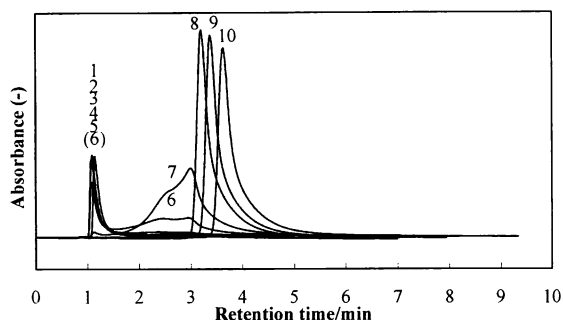


Fig.4 Dependence of chromatographic profile of L-adrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +200(8), +300(9), +400(10).

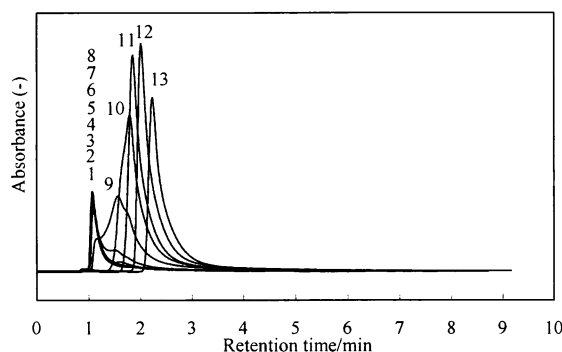


Fig.5 Dependence of chromatographic profile of L-noradrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +125(8), +150(9), +175(10), +200(11), +300(12), +400(13), +400(10).

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。

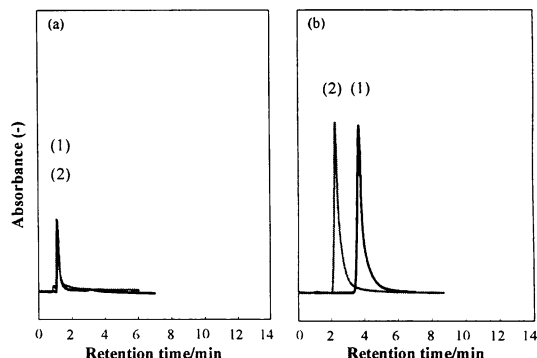


Fig.6 Chromatogram of L-adrenaline (1) and L-noradrenaline (2) obtained by EMLC. Applied potential; (a) -200 mV, (b) +400 mV

ついで 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関係を検討した。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。全ての化合物は、それぞれの化合物の酸化還元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、酸化還元反応により化学種の変換が生じたためであり、このことは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二次的の化学平衡として制御できていないことを示している。しかし、Fig.6 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、本法が電気化学活性な生体関連物質の分離に有用であることが確認された¹⁰⁾。

b. 継続 3 年間に総括した研究成果

本研究では、平成 12~16 年度における研究により創案したオンカラムおよびオンライン酸化還元化学種変換 HPLC 法の有用性を実試料への適用によって評価したほか、EMLC を新しい電気化学的オンカラム化学種変換 HPLC として用いる方法の開発と基礎検討を行った。その結果、化学種変換ユニットとして PGC を充填したミニカラム、またはグラファイトを作用電極とした電解セルを用いたオンライン化学種変換システムにより、鉄鋼中や銅合金の微量コバルトを選択的に分離できることを明らかにした^{2,3)}。また、環境試料中の酸化数の異なる鉄イオンの定量¹¹⁾および食塩中に添加されている微量フェロシアン化物イオンの定量¹²⁾に適用できることを示した。さらに米国ユタ大学 M. D. Porter 教授との共同研究により開発したオンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC は電気化学的に酸化還元反応を二次的の化学平衡として制御し、精密な分離を

達成できることを明らかにした。

以上の成果はいずれも新しい発想に基づいて達成された過去に例のないものである。本研究の目的は新しい分離選択性を有する分離分析法の創出とその評価であり、ほぼ達成することができたと考えている。

3. 問題点および今後の展望

酸化還元化学種変換 HPLC は、酸化還元性物質に対して選択性を有する新しい分離分析法である。したがって、その代謝過程で酸化還元反応を示す多くの生体関連物質の分析への適用は、本法の有用性を示す上でも、またその分析の重要性を考えてみても極めて大きな意義があると考えられる。しかし、上述したように、生体関連物質の酸化還元反応機構は複雑で明らかにされていない部分が多い。むしろ、酸化還元反応機構を明らかにする目的で、この方法を利用することができるものと期待され、さらにその結果に基づいて分離の最適化を図る必要があると考えられる。

また、金属化学種の酸化還元機構の解析や環境試料中の酸化状態別分析すなわちスペシエーションへの適用も期待される本法の応用分野である。金属元素はその酸化状態によって毒性が大きく異なるので、環境中の金属分析においては酸化状態別に定量することが要求されるが、酸化還元化学種変換 HPLC は、原理的にこの要求に応える能力を持つ方法である。今後は各種の環境試料、特に表層水および土壌を対象として研究を進める予定である。また、酸化還元化学種変換 HPLC による金属化学種の酸化還元機構の解析に関しては、特に超微量成分を対象としたときにその威力を発揮すると期待され、数 10-100 個の原子が対象になる超アクチノイド元素の研究を日本原子力研究開発機構先端基礎研究センターと共同で計画している。

酸化還元化学種変換 HPLC を汎用性の高いものにする上での大きな課題の一つは、化学種変換反応の高速化である。これを達成するためには、高温下での酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築することが求められる。平行して進めている超高温水クロマトグラフィーの研究で得られた成果¹³⁻¹⁵⁾を融合することによって、さらに高効率・高速の分析システムに発展させることを目論んでいる。

4. 社会および学協会等への貢献度

近年、キャピラリーゾーン電気泳動に代表される各種の分離法は急速な発展を遂げ、分離効率は著しく向上したが、多数のまた大量の共存成分から目的の成分のみを取り出すには、その成分に特異的な選択性を持つ分離システムを必要とする。これは、複雑な組成を持つ試料を対象とするときや、目的成分が微量であり、かつ類似する成分が

大量に共存する場合に特に重要である。特に、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新しい道が開かれると期待される。さらにまた、酸化状態によって毒性が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、学術のみならず社会的にも大きな貢献が期待できる。酸化還元化学種変換 HPLC 技術に関しては、すでに「高速液体クロマトグラフィーシステム」として特許を出願中である。

5. 参考文献

- 1) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.*, **75**, 2775 (2003).
- 2) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, **29**, 49 (2006).
- 3) K. Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 951 (2007).
- 4) 渋川雅美, *分析化学*, **55**, 149 (2006).
- 5) M. Shibukawa, Y. Takazawa, K. Saitoh, *Anal. Chem.*, **79**, 6279 (2007).
- 6) J. A. Harnisch, M. D. Porter, *Analyst*, **126**, 1841 (2001).
- 7) L. M. Ponton, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **76**, 5823 (2004).
- 8) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.*, **59**, 102 (1987).
- 9) K. Saitoh, K. Koichi, F. Yabiku, Y. Noda, M. D. Porter, M. Shibukawa, *J. Chromatogr. A*, submitted.
- 10) 小市孔大, 齊藤和憲, 日秋俊彦, M. D. Porter, 渋川雅美, 日本分析化学会第 56 年会講演要旨集, p. 252 (2007).
- 11) 安田卓也, 屋比久史子, 齊藤和憲, 中島秀, 渋川雅美, 第 67 回分析化学討論会講演要旨集, p. 12 (2006).
- 12) 添田直希, 屋比久史子, 齊藤和憲, 渋川雅美, 第 67 回分析化学討論会講演要旨集, p. 200 (2006).
- 13) T. Yarita, R. Nakajima, M. Shibukawa, *Anal. Sci.*, **19**, 269 (2003).
- 14) 中島良司, 鎗田孝, 渋川雅美, *分析化学*, **52**, 305 (2003).
- 15) T. Yarita, R. Nakajima, K. Shimada, S. Kinugasa, M. Shibukawa, *Anal. Sci.*, **21**, 1001 (2005).