

ノ ー ト

C₁₈ 修飾シリカ固定相を用いる高速液体クロマトグラフィーにおけるアルミニウム-*o,o'*-ジヒドロキシアゾベンゼン陽イオン性錯体の保持挙動倉 澤 隆^{*1,*4}, 四ツ柳隆夫^{*1,*5}, 金子恵美子^{®*2}, 斎藤 伸吾^{*2},
星 座^{*3}, 赤塚 邦彦^{*3}Retention behavior of cationic aluminium chelate with *o,o'*-dihydroxyazobenzene
in HPLC using the C₁₈-bonded silica stationary phaseTakashi KURASAWA^{*1,*4}, Takao YOTSUYANAGI^{*1,*5}, Emiko KANEKO, Shingo SAITO^{*2},
Suwaru HOSHI and Kunihiko AKATSUKA^{*3}^{*1} Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai 980-8579^{*2,*3} Department of Applied and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology, Kitami-shi, Hokkaido 090-8507^{*4} Current address: The Nomura Securities Co. Ltd., 2-2-2, Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8130^{*5} Current address: Miyagi National College of Technology, Natori-shi, Miyagi 981-1239

(Received 12 April 2002, Accepted 2 July 2002)

The retention behavior of cationic aluminium chelate with *o,o'*-dihydroxyazobenzene (DHAB or H₂L), [AIL]⁺, in high-performance liquid chromatography (HPLC) was investigated using the C₁₈-bonded silica stationary phase. In this study, it was found that when the pH of the mobile phase was 5.5, a significant tailing of the aluminium chelate was observed, whereas when the pH was 2, a marked improvement of the elution was attained. These results were interpreted in terms of a silanol masking effect: when an acidic mobile phase is employed, protonation of the silanol groups on the surface is maintained, while eliminating the strong interaction between the cationic chelate and the stationary phase. The addition of sodium chloride in the eluent can also be used to eliminate peak tailing of the cationic chelate. Based on these results, the underlying immobilization mechanism of the aluminium chelate on the C₁₈-bonded silica thin layer is explained by an electrostatic interaction between the cationic aluminium chelate and deprotonated silanol groups on the solid surface. The example in this study should provide valuable information to improve the separation quality of cationic solutes in HPLC.

Keywords : aluminium chelate; *o,o'*-dihydroxyazobenzene; HPLC; C₁₈-bonded silica; silanol effect.

1 緒 言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、高い感度と分離能を持つ分離分析法として様々な分野で繁用され、実用上の研究の進展とともに、保持及び分離機構に関しても数多くの報告がなされている¹⁾²⁾。なかでも C₁₈ 化学修飾型 (ODS) シリカ固定相は、製造の容易さ、性能及び比較的

^{*1} 東北大学大学院工学研究科: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉^{*2} 北見工業大学工学部: 090-8507 北海道北見市公園町 165^{*3} 北見工業大学大学院工学研究科: 同上^{*4} 現在 野村證券株式会社: 100-8130 東京都千代田区大手町 2-2-2^{*5} 宮城工業高等専門学校: 981-1239 宮城県名取市愛島字野田山 48

低コスト等の利点によって、逆相分配 HPLC において最も広範に使用されている。しかし、ODS カラムは、シラノール基の影響によってテイリングを生じる場合があること、移動相 pH 範囲がおおむね 3~8 に限定され、またこの pH 範囲内であっても、リン酸等特定の緩衝溶液成分によって基盤シリカが多量に溶出され分離の劣化を招くこと³⁾等、幾つかの問題点が知られている。この分野に関しても多くの研究がなされ、HPLC におけるシラノール効果に焦点を当てた総説も多数にのぼる^{4)~8)}。

一般に陽イオン性有機物質の HPLC 分析に際しては、完全にエンドキャッピングを施した ODS カラム、もしくは酸性溶離液の使用により残存シラノール基の解離を抑制してテイリングを回避する手法が採られる。更に電解質を溶離液修飾剤として用い、シラノールの負電荷サイトを遮へいすることによって、芳香族アミン⁹⁾¹⁰⁾及びアルカロイド¹¹⁾の分離を向上させた事例が報告されている。金属錯体と固定相シラノールの相互作用については、三浦が陽イオン性錯体の溶離に対する各種の塩及びイオン性界面活性剤の効果を明らかにし¹²⁾¹³⁾、Wirth らは、ルテニウム-ビピリジルの陽イオン性錯体が酸性溶離液によってシャープなピークを与えることを報告している¹⁴⁾。

本研究では、アルミニウム(III)と *o,o'*-ジヒドロキシアゾベンゼン (DHAB 又は H_2L と略記)との 1:1 錯体, $[AIL]^+$ を対象として、溶離液 pH 及びナトリウムイオンの効果の観点から ODS 固定相への保持挙動の解明を行い、有用な知見を得た。アルミニウム-DHAB 錯体については、渡辺らによって抽出/蛍光光度定量に関する研究が報告されている¹⁵⁾。また、DHAB は本来非選択的な配位子であるが、微量金属イオンのプレカラム誘導体化-イオン対分配モード吸光検出 HPLC に関する著者らの一連の研究の中で、このモードに適したアゾ色素類の一つであることが明らかとなり、コバルト(III)、バナジウム(V)、アルミニウム(III)、鉄(III)の各錯体が良好に分離されてシャープなピークを与える¹⁶⁾¹⁷⁾。特に、微量アルミニウムの HPLC 定量に際して 1:2 錯体が有用な実用分析法を与え¹⁸⁾¹⁹⁾、更に 1:1 錯体が ODS 薄層プレートに特異的に固定されることが見いだされて、感度と選択性に優れたアルミニウムの薄層クロマトグラフィー (TLC)/目視蛍光定量を可能としている²⁰⁾²¹⁾。したがって、本研究は、これらの方法の基盤となる分離機構を理解するうえでも重要な意義を持つ。

2 実験

2.1 装置と試薬

HPLC 装置は、日本分光製 PU-980 型ポンプユニット、UV-970 型吸光検出器、CO-966 型カラムオープン及び Rheodyne7125 ループインジェクターを使用した。カラム

は主として Merck 製 Lichrospher RP-18 (125 mm × 4 mm, 粒径 5 μ m) を用いた。また、エンドキャップを施したカラムとして、関東化学製 MightySil RP-18 (150 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μ m) を使用した。

DHAB 溶液は、同仁化学研究所製を既報¹⁸⁾と同様に非イオン性界面活性剤 PONPE-20 を含む微アルカリ性水溶液に溶解して、 1×10^{-3} mol dm⁻³ の溶液を調製した。金属イオン溶液は、塩化物を硝酸酸性で溶解し、EDTA 滴定で標定して用いた。pH 5.5 緩衝溶液は、0.1 mol dm⁻³ 2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES, 同仁化学研究所)-水酸化ナトリウム (関東化学, ultrapure) を、pH 7.8 緩衝溶液は、0.1 mol dm⁻³ トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Merck)-塩酸 (関東化学, ultrapure) を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2.2 操作

1×10^{-4} mol dm⁻³ 金属イオン溶液 0.25 cm³ に DHAB 溶液 1.0 cm³, 次いで pH 5.5 の MES 緩衝溶液 1.5 cm³ を加え、70℃ 水浴中で 20 分間加熱して錯形成反応を完結させた後、水で全量を 25 cm³ とした。そのうち 0.1 cm³ を HPLC カラムへ注入した。なお、定量的な錯形成反応のために、すべての実験において試料溶液の pH は 5.5 とした。

主な HPLC 条件は、 1×10^{-4} mol dm⁻³ EDTA 溶液と所定の pH 緩衝溶液を含む 55 wt% メタノール-水を溶離液として用い、流量は 0.8 cm³ min⁻¹, カラム温度は 25℃ とした。検出は、 $[AIL]^+$ の吸収極大波長 480 nm における吸光度を用いた。

3 結果と考察

3.1 アルミニウム-DHAB 錯体の組成とスペクトル特性

DHAB は多くの金属イオンと反応して 500 nm 付近に吸収極大波長をもつ錯体を形成する¹⁸⁾。アルミニウム(III)とは pH 5.5 において 1:1 錯体, $[AIL]^+$ を、pH 8 においては 1:2 錯体, $[AIL_2]^+$ を形成する²¹⁾。TLC においては、多種類の金属-DHAB 錯体の中で、 $[AIL]^+$ は前述のとおり ODS プレート上で各種有機溶媒によって全く展開されず、スポット地点に残る特異性を有する。また、この錯体は溶媒抽出においてはスカムとして液液界面に析出することから、疎水性と同時に有機溶媒への難溶性を呈する配位不飽和錯体であることが判明している²⁰⁾。

3.2 HPLC における保持挙動

Fig. 1 に $[AIL]^+$ のクロマトグラムに対する溶離液 pH の影響を示す。溶液系で 1:1 錯体が卓越する pH 5.5 を溶離液 pH として用いると、この錯体は強く保持され、極

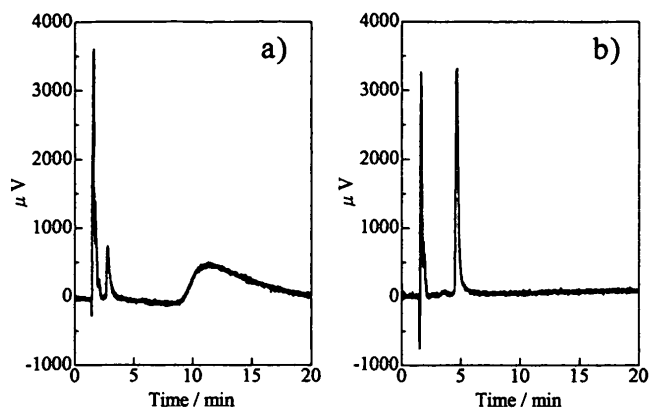


Fig. 1 Typical chromatogram of Al-DHAB 1 : 1 chelates

Sample: $[\text{Al}^{3+}] = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{DHAB}] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 5.5 (MES-NaOH); Mobile phase: 55 wt% methanol-water, EDTA $10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$, a) pH 2.0, b) pH 5.5; HPLC conditions: detection wavelength 480 nm, flow rate $0.8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, column temperature 25°C ; Column: Lichrospher RP-18

めてブロードなピークとして溶出される (Fig. 1, a). なお, エンドキャップを施したカラムでは, 若干ピーク形状は改善されるものの同様のテイリングが見られた. この強い保持は, TLC において $[\text{AIL}]^+$ が特異的に固定される結果と一致する. 一方, 溶離液 pH を 2~3 に低下させると, ピーク形状は顕著に改善される (Fig. 1, b). Fig. 2 に, $[\text{AIL}]^+$ 及び $[\text{CoL}_2]^-$ についてキャパシティブクター (k') の溶離液 pH 依存性を示す. 対比のために用いたコバルト 1 : 2 錯体は, 既報の HPLC においてシャープなピークを与えることが知られている陰イオン性錯体の一つであり^{16)~19)22)23)}, 本実験に用いた溶離液 pH 範囲 (2~7.8)

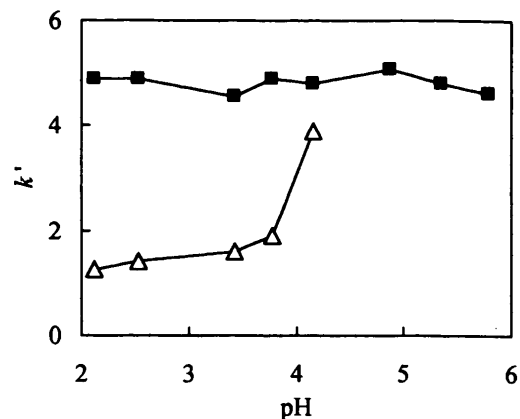


Fig. 2 Effect of pH of mobile phase on the capacity factors

\triangle : $[\text{AIL}]^+$, \blacksquare : $[\text{CoL}_2]^-$; The other conditions are the same as those in Fig. 1.

においてピーク形状の変化は見られない. Fig. 2 において, $[\text{AIL}]^+$ の k' が顕著な pH 依存性を示すのに対して, $[\text{CoL}_2]^-$ はほぼ一定の保持挙動を保つことが分かる. これらの結果は, 化学修飾固定相と溶質との疎水性相互作用に加えて, pH 4 以上では残存シラノール基の解離に伴って静電相互作用による陽イオン性錯体の分配が生じ, 強力に固定相へ保持される現象を示している. また, この機構に基づいて, 前述の TLC プレートへ $[\text{AIL}]^+$ が特異的に固定される結果²⁰⁾²¹⁾を説明できる.

3.3 ナトリウムイオンの影響

Fig. 3 に, 溶離液中への塩化ナトリウムの添加が $[\text{AIL}]^+$ 及び $[\text{CoL}_2]^-$ の k' に及ぼす影響を示す. pH 2 においては, 塩化ナトリウムの添加による変化は見られない.

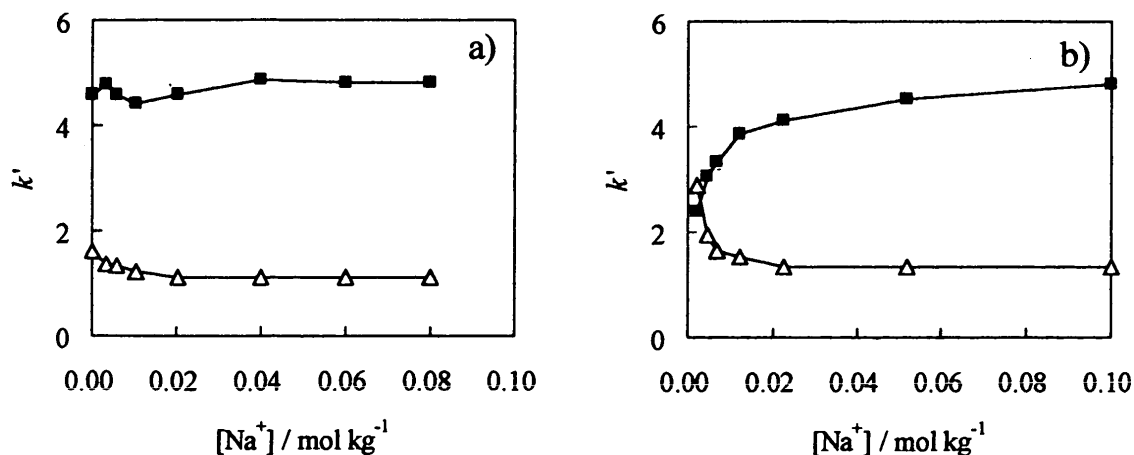


Fig. 3 Effect of sodium ion content in the mobile phase on the capacity factors

Sample: $[\text{M}] = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{DHAB}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 5.5 (MES-NaOH); Mobile phase: 55 wt% methanol-water, a) pH 2.0, b) pH 4.0, sodium ion content (added as NaCl) 0~0.1 mol kg^{-1} ; Column Lichrospher RP-18; \triangle : $[\text{AIL}]^+$, \blacksquare : $[\text{CoL}_2]^-$

しかし、pH 4 においては、塩化ナトリウム添加量の増加に従って $[\text{AIL}]^+$ の k' が顕著に減少し、一方 $[\text{CoL}_2]^-$ の k' は増加することが判明した。すなわち、 $[\text{AIL}]^+$ の場合には、ODS 表面の陽イオン交換能（残存シラノールの負電荷サイトとの静電相互作用）をめぐってナトリウムイオンとの競合が生じ、溶離液中の電解質による陽イオン化学種の保持の減少が引き起こされる。一方、 $[\text{CoL}_2]^-$ の場合には、ナトリウムイオンを親水性対イオンとするイオン対分配¹⁷⁾²⁴⁾に起因すると考えられる顕著な保持の増加が認められた。

本研究で得られた結果は、溶離液中の電解質が陽イオン性錯体及び陰イオン性錯体のいずれにおいても、HPLC 挙動を支配する重要な因子であることを示し、また、pH 及び電解質の効果を用いて残存シラノールの影響を制御するために有用な指針を与えている。

(1999 年 3 月, 日本化学会第 76 春季年会にて一部発表)

文 献

- 1) J. G. Dorsey, W. T. Cooper, J. F. Wheeler, H. G. Barth, J. P. Foley: *Anal. Chem.*, **66**, 500R (1994).
- 2) J. G. Dorsey, W. T. Cooper, B. A. Siles, J. P. Foley, H. G. Barth: *Anal. Chem.*, **70**, 591R (1998).
- 3) H. A. Claessens, M. A. Straten, J. J. Kirkland: *J. Chromatogr. A*, **728**, 259 (1996).
- 4) J. Nawrocki, B. Buszewski: *J. Chromatogr.*, **449**, 1 (1988).
- 5) S. H. Hansen, P. Helboe, M. Thomsen: *J. Chromatogr.*, **544**, 53 (1991).
- 6) H. Engelhardt, H. Löw, W. Götzinger: *J. Chromatogr.*, **544**, 371 (1991).
- 7) G. B. Cox: *J. Chromatogr. A*, **656**, 353 (1993).
- 8) J. Nawrocki: *J. Chromatogr. A*, **779**, 29 (1997).
- 9) E. Papp, Gy. Vigh: *J. Chromatogr.*, **259**, 49 (1983).
- 10) E. Papp, G. Vigh: *J. Chromatogr.*, **282**, 59 (1983).
- 11) W. Nowicky, L. Han, W. Nowicky, V. Gutmann, W. Linert: *Talanta*, **39**, 1437 (1992).
- 12) J. Miura: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **344**, 247 (1992).
- 13) 三浦潤一郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **47**, 807 (1998).
- 14) M. J. Wirth, R. W. P. Fairbank, H. O. Fatunmbi: *Science*, **275**, 44 (1997).
- 15) 渡辺邦洋, 横尾克巳, 青木伊豆男: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 458 (1989).
- 16) H. Hoshino, K. Nakano, T. Yotsuyanagi: *Analyst (London)*, **115**, 133 (1990).
- 17) E. Kaneko, H. Noda, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1996**, 1045.
- 18) E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, N. Gunji, M. Sato, T. Kikuta, M. Yuasa: *Anal. Chem.*, **63**, 2219 (1991).
- 19) E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, R. Watabe, T. Seki: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 3192 (1992).
- 20) H. Mizuguchi, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1997**, 895.
- 21) H. Mizuguchi, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Analyst (Cambridge)*, **125**, 1667 (2000).
- 22) E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1992**, 955.
- 23) 金子恵美子, 星野 仁, 四ツ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 753 (1993).
- 24) H. Wada, S. Nezu, T. Ozawa, G. Nakagawa: *J. Chromatogr.*, **295**, 413 (1984).