

報 文

8-アミノ-2-[(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)メチル]-6-メトキシキノリン-
N,N,N',N'-四酢酸を用いる閉殻希土類金属イオンのプレカラム誘導体化
蛍光検出逆相分配高速液体クロマトグラフィー齋藤 伸吾*, 許 文喆*, 星野 仁^{®*}, 四ツ柳隆夫^{*,**}Fluorescence determination of closed-shell rare earth metal ions
by reversed-phase HPLC with precolumn derivatization using
8-amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-
methoxyquinoline-*N,N,N',N'*-tetraacetateShingo SAITO, Wen-zhe XU, Hitoshi HOSHINO* and Takao YOTSUYANAGI^{*,**}

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8579

^{**}Present address: Miyagi National College of Technology, 48, Nodayama, Shiote Medeshima, Natori-shi, Miyagi 981-1239

(Received 25 August 2000, Accepted 25 October 2000)

A sensitive and selective determination of closed-shell rare earth metal ions (La^{3+} , Lu^{3+} , and Y^{3+}) has been demonstrated using a pre-column chelating reagent {8-amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-*N,N,N',N'*-tetraacetate (Quin2)}, in reversed-phase HPLC. Although the resolution is still unsatisfactory in this HPLC system, rare-earth metal chelates with this octadentate aromatic polyaminocarboxylate can be detected. This result suggests that these chelates are unexpectedly inert for the dissociation process during elution. The order of elution is quite different from that of the conventional ion-exchange mode separation. Middle-lanthanide ion-Quin2 chelates were most rapidly eluted, followed by the heavy ones; the light ones were the most strongly retained. Since ligand-centered fluorescence was observed for only La^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , and Gd^{3+} -Quin2 chelates, and other rare earth metal ion chelates were sufficiently quenched through a paramagnetic deactivation process, these four metal ions were selectively detected by fluorimetric detection ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$). The detection limits of La^{3+} , Lu^{3+} , and Y^{3+} were 2.2, 4.0, and 1.9 ppb, respectively, on a 3σ basis. No interference from each 10-fold excess of other rare-earth metal ions was observed. The success of this HPLC system for rare-earth ions is derived from the combined properties of the Quin2 chelates in terms of inertness, chromatographic retention and fluorescence detection.

Keywords : rare earth metal; reversed-phase HPLC; fluorescence detection; Quin2; metal chelate.

1 緒 言

溶離液中に配位子を添加しない方式のプレカラム誘導体

* 東北大学大学院工学研究科応用化学専攻: 980-8579 宮城県
仙台市青葉区荒巻字青葉

^{**} 現在所属; 宮城工業高等専門学校: 981-1239 宮城県名取市
愛島塩手字野田山 48

化高速液体クロマトグラフィーの一つとして、速度論的識別モード高速液体クロマトグラフィー (KD モード HPLC) が開発されている。KD モードでは、プレカラム誘導体化後、注入された錯体はカラム内で配位子と分離される。このとき、錯体近傍に配位子は存在しなくなるため、錯体解離反応の強い推進力を生じる。そのため、試料注入から検

出部までのタイムスケールで解離活性な錯体は分解され、解離不活性な錯体だけが検出されることになる。KDモードの特異性発現はこの現象に起因する。すなわち、意図的に錯体の分解を起こすことにより、共存イオンの妨害を排除し、特定の金属イオンをその速度論的特性に従って分離検出するシステムが実現できる。また、溶離液中に配位子が存在しないため、配位子由来のバックグラウンドノイズが除去され高感度検出が達成される。KDモードを導入することにより、高感度・高選択性が求められる実試料の測定に適用しうる多くのシステムが開発されてきた^{1)~4)}。

本論文では、上記のシステム設計指針に基づき、希土類金属イオンのプレカラム誘導体化法の開発を試みた。一方、従来、希土類金属イオンに対して本プレカラム法の適用は困難と考えられてきた。希土類金属イオンの配位水交換速度定数が非常に大きい ($k_{ex} = 0.6 \sim 8.0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$)⁵⁾ ことから、これらの金属イオンが多くの場合、解離反応活性錯体を形成すると思われてきたからである。希土類金属イオンのプレカラム HPLC 法の報告は既にあるが⁶⁾、合成した錯体の溶出挙動を述べただけのもので極めて不十分であり、超微量分析法確立のための基礎データは得られていない。

本論文では、金属錯体間の解離反応速度の差による選択性は見いだされなかったものの、プレカラム誘導体化法によって希土類金属イオン-8座芳香族ポリアミノカルボン酸錯体を蛍光検出して、閉殻希土類イオンの選択的定量法の開発に成功した。更にまた、本システムにおいては、錯体の溶出順がそれらの安定度定数序列に従わないという、従来見られなかった興味深い溶出挙動を報告する。この一見異常な挙動は錯体自身の有する疎水性に基づく、独特な分離機構によるものと考察した。

8座芳香族ポリアミノカルボン酸としては、8-アミノ-2-[(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)メチル]-6-メトキシキノリン-*N,N,N',N'*-四酢酸 (Quin2, Fig. 1) を選択した。Quin2 は生体内カルシウムプローブとして開発された⁷⁾が、ランタノイド (Ln) イオンのエネルギー移動発光試薬としても優れた機能を有することが報告されている⁸⁾⁹⁾。また、Quin2 錯体はキャピラリー電気泳動法に適用され、優れた金属ラベル化試薬としても機能することが知られている¹⁰⁾。本研究では、以下の理由により Quin2 が優れた閉殻希土類金属イオン検出試薬になり得ると考え、プレカラム誘導体化 HPLC 法に適用した。① カルシウムイオンと希土類金属イオンのイオン半径が近いこと (イオン半径は Ca^{2+} : 1.14 Å, 希土類金属 (III): 0.87~1.16 Å¹¹⁾)、② 希土類金属イオンは 9~12 配位と多座配位であること (Quin2 は 8 座配位)、③ 希土類金属イオンと比較的大きな錯形成平衡定数を有すること ($\log K_{ML} \sim 14.69$)¹²⁾、また錯形成反応が速いことから、プレカラム誘導体化が簡便

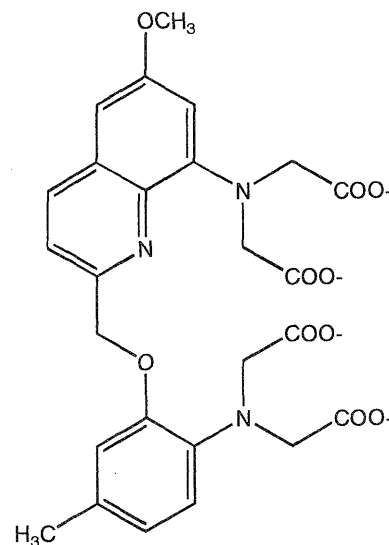


Fig. 1 Chemical structure of Quin2

であること、④ 配位子由来の蛍光強度が非常に大きいこと、⑤ 閉殻希土類 (La^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+}) は配位子由来の蛍光を発するが、その他の希土類イオンは、錯形成により配位子蛍光を常磁性消光するので高い選択性を期待できる。その結果、Ln-Quin2 錯体は HPLC 分離に適用しうる解離反応不活性を示すことを見だし、希土類金属イオンに対するプレカラム誘導体化 HPLC システムを確立し、それらの ppb レベル検出を可能とした。

2 実験

2.1 試薬

Quin2 溶液: 同仁化学研究所製 Quin2 を蒸留水に溶解し、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液としたものを保存溶液とし、分解を避けるため冷暗所に保存した。

希土類金属 (III) 溶液: Tm (III) 溶液は和光純薬製酸化ツリウム (Tm_2O_3 , 99.9%) を高純度塩酸に溶解し調製した。その他の希土類金属イオン溶液は同社製希土類 (III) 塩化物を高純度塩酸に溶解し、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 2 となるように調製した。それらの力価はキシレノールオレンジを指示薬とするキレート滴定法で決定した。

pH 緩衝溶液: Merck 製のトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタンを蒸留水に溶解し、高純度塩酸を用いて中和し、pH 7.5, 濃度 0.1 mol dm^{-3} とした。

イオン対形成剤: 東京化成製臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBABr) の所定量を溶離液に溶解した。

2.2 装置

蛍光検出器として島津製作所製 RF-550 型高速液体クロマトグラフ用分光検出器を用いた。光源は 150 W キセノンランプ、セルは 12 μl 角型石英フローセル、バンド幅は

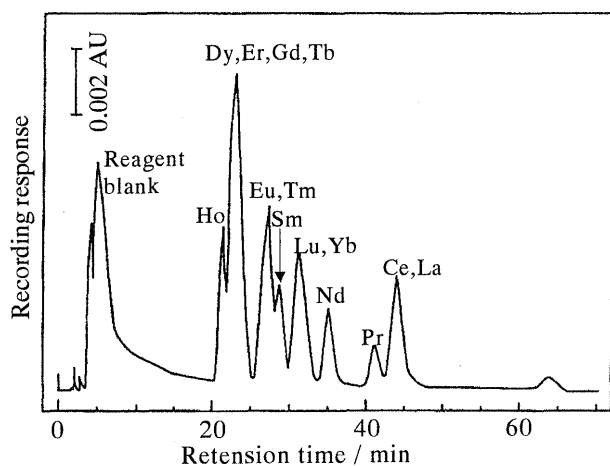


Fig. 2 Chromatogram of Ln^{3+} -Quin2 chelates with absorbance detection ($\lambda = 245 \text{ nm}$)

Flow rate: 1.0 ml/min; Column: LiChrosorbRP-18 (250 mm- ϕ 4); Sample: $C_{\text{Quin2}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Ln}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$; Mobile phase: $C_{\text{MeOH}} = 7.0 \text{ wt\%}$, $C_{\text{Tris-HCl}} = 0.50 \text{ wt\%}$ (pH 7.5, 0.10 mol dm^{-3})

励起, 蛍光側共に 15 nm である. 吸光検出器は同社製 SPD-A10V 型高速液体クロマトグラフ用紫外可視分光光度計検出器を使用した. セル長 10 nm, セル容量 8 μl であり, 光源は重水素ランプ (190~370 nm) を使用した. ポンプは同社製 LC-10AD 高速液体クロマトグラフ用送液ポンプユニットを使用した. カラムは Merck 製 LiChrosorb RP-18 を用いた. 場合により, 長さの異なる 2 種類 (125 mm \times 4 mm ϕ , 250 mm \times 4 mm ϕ) のものを用いた.

2.3 定量条件及び試料調製

溶離液は水-メタノール混合溶媒を使用し, 各金属によりそれぞれ以下のように設定した.

La^{3+} の定量時: メタノール 32 wt%, Tris-HCl 5 wt% (pH 7.5, 0.1 mol dm^{-3}), TBABr $3 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$. Lu^{3+} の定量時: メタノール 9 wt%, Tris-HCl 0.5 wt% (pH 7.5, 0.1 mol dm^{-3}). Y^{3+} の定量時: メタノール 7 wt%, Tris-HCl 0.5 wt% (pH 7.5, 0.1 mol dm^{-3}).

流量は 1 ml/min, 検出波長は励起波長 335 nm, 蛍光波長 500 nm とした.

試料調製は, 25 ml メスフラスコに所定量の Quin2 溶液, 次いで所定濃度の金属溶液, pH 緩衝溶液 Tris-HCl を加えた (最終濃度は Quin2: $1 \sim 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, Tris-HCl: $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). 調製した試料の 100 μl を HPLC に注入した.

3 結果と考察

3.1 溶出挙動

第一に特記すべき点は, プレカラム誘導体化 HPLC に

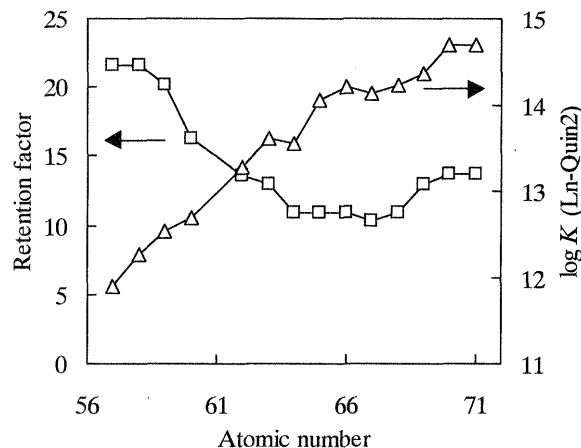


Fig. 3 Relationship between atomic number, capacity factor, and stability constant for Ln^{3+} -Quin2 chelates

において, 希土類金属イオン錯体が検出可能であったことである. 剛性の高いマクロサイクリックポリアミノカルボン酸錯体が, Ln イオンと解離不活性な錯体を形成することは従来から知られている¹³⁾. 一方, 本研究において希土類イオン-Quin2 錯体が検出されたことは, 希土類金属イオンが比較的剛性の低い 8 座非環状ポリアミノカルボン酸と解離不活性錯体を形成しうることを示しており, 錯体化学上の現象としても非常に興味深い.

Ln イオン-Quin2 錯体の吸光検出による溶出挙動を Fig. 2 に示す. Ln イオン間の完全分離には至らないものの, Ln 錯体すべてが検出されることから, これら錯体が解離不活性錯体であると推測した. ここで注目すべきはその異常な溶出順である. Fig. 3 に原子番号と溶出順と安定度定数の関係を示す. Ln イオン-Quin2 錯体の溶出順は, 中希土あたりで折り返しており, 安定度定数との相関はないように見える. 通常の溶離液中に配位子を添加する逆相分配クロマトグラフィーでは, 一般に溶出順は安定度定数序列と一致すると推測される. これは, カラム内で速い錯平衡が成立する場合には, 平衡論的に安定な錯体が, より長い固定相滞在時間を有するというモデルで説明される^{14)~16)}. 一方, 本法ではカラム内での錯平衡が成り立っておらず, 固定相への分配はその錯体自身の持つ固有の疎水性が支配する. ここでいう疎水性を支配する因子とは, 解離不活性なその錯体自身の持つ実効電荷, 大きさ, 溶媒和状態 (配位不飽和中心金属イオンの配位水数を含む) などである. それらのわずかな違いによりランタノイド錯体間で分離されるという事実は非常に興味深い. このように本システムにおける分離の原理は従来のものと全く異なったものと言える. 本研究では, Fig. 1 におけるクロマトグラフィー条件の最適化を行って, Ln イオンの全分離を行うのではなく, 蛍光検出選択性を生かした高感度 HPLC 定量システムを構築することを目指した.

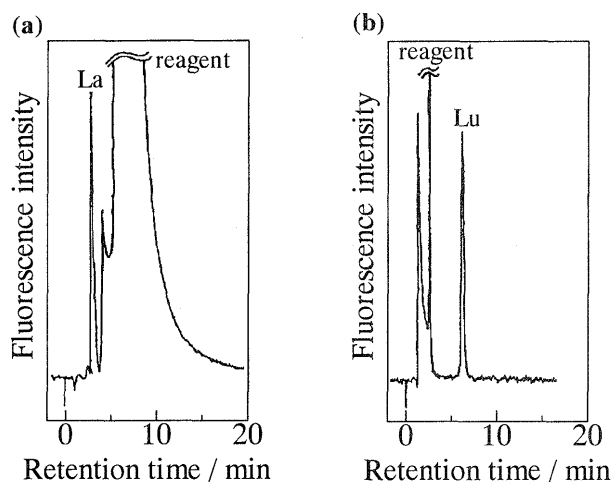


Fig. 4 Typical chromatogram of Ln^{3+} -Quin2 complexes with TBABr (a) and no ion-pair reagent (b) system

(a) Sample: $C_{\text{Quin2}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{La}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$; Mobile phase: $C_{\text{MeOH}} = 32 \text{ wt\%}$, $C_{\text{TBABr}} = 3.0 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$, $C_{\text{Tris-HCl}} = 5.0 \text{ wt\%}$ (pH 7.5, 0.1 mol dm^{-3}).
 (b) Sample: $C_{\text{Quin2}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{La}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$; Mobile phase: $C_{\text{MeOH}} = 9.0 \text{ wt\%}$, $C_{\text{Tris-HCl}} = 0.50 \text{ wt\%}$ (pH 7.5, 0.10 mol dm^{-3}); Fluorescent detection: ex. 335 nm, em. 500 nm

希土類-Quin2 錯体の蛍光スペクトル特性は、予測どおり閉殻希土類だけが配位子由来の蛍光を有していたが、例外として Gd^{3+} 錯体も強度は低いながらも発蛍光性を有していた。よって、 La^{3+} 錯体、 Lu^{3+} 錯体、 Y^{3+} 錯体及び Gd^{3+} 錯体を分離することが必要となる。本システムにおいて、溶離液中に TBABr を添加するイオン対分配モードと添加しないシステムの双方を試みた結果、いずれのシステムにおいても配位子と希土類錯体は良好に分離された (Fig. 4)。TBABr を添加した場合、錯体は試薬よりも先に溶出したが、TBABr を添加しない場合、溶出順は逆となる。イオン対モードではイオン対試薬 TBABr が固定相に吸着され、実際には試薬が動的イオン交換機構で保持されていると推測した。Quin2 (H_4L) は pH 7.5 では 90% 以上が完全に酸解離しており、 L^{4-} となっている。一方、錯体は $[\text{Ln}(\text{III})\text{L}]^-$ であるため、動的イオン交換機構が働いているならば錯体が先に溶出することになる。TBABr を添加しない場合は、疎水性相互作用を推進力とする、試料と固定相間での分配の差異によって分離されていると考察した。この場合は、電荷 -4 の配位子がより親水性が高く、先に溶出する。

錯体が先に溶出するイオン対分配モードのほうが、錯体ピークが鋭くなるため定量には望ましいが、希土類金属間の分離はイオン対試薬を添加しないときのほうが良好であった。 La^{3+} 錯体はイオン対モードでもほかの 3 種の発蛍

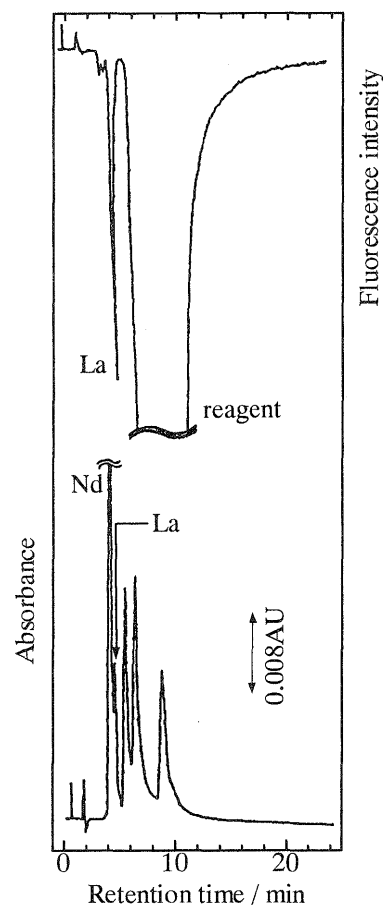


Fig. 5 Typical chromatogram of Ln^{3+} -Quin2 complexes with TBABr system

Sample: $C_{\text{Quin2}} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{La}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $C_{\text{Nd}} = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$; Mobile phase: $C_{\text{MeOH}} = 32 \text{ wt\%}$, $C_{\text{TBABr}} = 3.0 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$, $C_{\text{Tris-HCl}} = 5 \text{ wt\%}$ (pH 7.5, 0.10 mol dm^{-3}); Fluorescent detection: ex. 335 nm, em. 500 nm; Absorbance detection: 245 nm

光性希土類錯体と分離可能であったので、イオン対モードを適用した。イオン対モードでは Lu^{3+} 、 Y^{3+} 及び Gd^{3+} 錯体間の分離は不可能であったが、TBABr を添加しないシステムでは、これら錯体を分離可能であった。このため、このシステムを Lu^{3+} 及び Y^{3+} 錯体の定量に適用した。

3.2 検出限界と妨害

La 錯体の典型的なクロマトグラムを Fig. 5 に示す。5 倍量の Nd を添加しているため、吸光検出では La 錯体とピークが重なってしまう。しかし、蛍光検出では La 錯体のピークのみが検出され、常磁性希土類金属イオンの妨害はほとんどない。

検量線は 3 種の閉殻希土類金属イオンに対し 1×10^{-6} から $5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲で直線となった。検出限界は、 S/N を 3 とし、 La^{3+} : 1.6×10^{-8} (2.2), Lu^{3+} : 2.3×10^{-8} (4.0), Y^{3+} : $2.1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ (1.9 ppb) とそれ

ぞれ高い感度を有している。

目的閉殻希土類金属イオンに対し10倍量のほかの希土類金属イオンを添加して, その妨害を検討した。La³⁺に対してはすべての希土類が妨害を与えなかった。Lu³⁺については, Sm³⁺とYb³⁺は5倍まで許容できたが, その他の10倍量の希土類金属イオンに対し妨害が見られなかった。Y³⁺に対しては, Dy³⁺, Gd³⁺及びTb³⁺が5倍まで許容でき, ほかの希土類金属イオンについては, それらの10倍モル量では影響がなかった。

以上のとおり, このシステムの有する高感度高選択性は①希土類金属イオン-Quin2錯体が解離不活性錯体であるという速度論的特性, ②反磁性イオンが配位子中心の蛍光を消光しないことを利用した分光学的特性, ③オンカラム錯形成モードのようなカラム内平衡を利用せず, 錯体構造そのものに基づく固有の固定相への分配特性の識別, が重畳して機能することによって達成されている。本システムの分離機構は, 陽イオン交換分離系に対してカラム内錯形成を二次効果として用いる従来法¹²⁾¹⁷⁾と決定的に異なる。また, Lnイオン-Quin2錯体が解離不活性化学種であるという興味深い現象を発見し, 現在, 希土類金属イオン-非環状ポリアミノカルボン酸錯体の解離速度特性について研究中である。

文 献

- 1) N. Iki, K. Irie, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Environ.*

Sci. Technol., **31**, 12 (1997).

- 2) M. Sato, H. Yoshimura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1996**, 203.
 3) H. Hoshino, T. Nomura, K. Nakano, T. Yotsuyanagi: *Anal. Chem.*, **68**, 1960 (1996).
 4) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Mikrochim. Acta*, **113**, 137 (1994).
 5) H. Diebler, M. Eigen: *Z. Phys. Chem. (Frankfurt am Main)*, **20**, 229 (1959).
 6) O. Mulero, D. A. Nelson, V. S. Archer, G. Mikines, J. R. Beckett, H. L. Mulean: *Talanta*, **37**, 381 (1990).
 7) R. Y. Tsien: *Biochemistry*, **19**, 2396 (1980).
 8) H. Hoshino, S. Utsumi, T. Yotsuyanagi: *Talanta*, **41**, 93 (1994).
 9) H. Hoshino, T. Saitoh, T. Yotsuyanagi: *Anal. Sci.*, **11**, 175 (1995).
 10) O. V. Krokhin, W. Xu, H. Hoshino, O. A. Shpigun, T. Yatsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1996**, 1095.
 11) R. D. Shannon: *Acta Cryst.*, **A32**, 751 (1968).
 12) A. Yuchi, A. Tanaka, M. Hirai, T. Yasui, H. Wada, G. Nakagawa: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 3377 (1993).
 13) K. Kumar: *J. Alloys Comp.*, **249**, 163 (1997).
 14) G. Nickless: *J. Chromatogr.*, **313**, 129 (1985).
 15) B. R. Willeford, H. Veening: *J. Chromatogr.*, **251**, 61 (1982).
 16) J. H. Knox, R. A. Hartwick: *J. Chromatogr.*, **204**, 3 (1981).
 17) C. H. Knight, R. M. Cassidy, B. M. Recoskie, L. W. Green: *Anal. Chem.*, **56**, 474 (1984).

要 旨

解離不活性化学種だけを検出できるプレカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーを用いて, 閉殻希土類金属イオンの高感度・高選択的蛍光検出法を開発した。プレカラム誘導体化試薬として8-アミノ-2-[(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)メチル]-6-メトキシキノリン-N,N,N',N'-四酢酸(Quin2)を用いた。通常, ランタノイドイオン(Ln³⁺)は解離活性化学種を形成するが, Ln³⁺-Quin2錯体がプレカラム法で検出できたことは, これらの錯体が解離不活性化学種であることを示唆する。また, オンカラム錯形成モードHPLCにおける溶出挙動と異なり, 本システムにおける溶出順は中希土, 重希土, 軽希土類の順であった。また, 錯体の発光挙動は, La³⁺, Lu³⁺, Gd³⁺及びY³⁺だけが配位子由来の蛍光を有していた。これらの現象を利用し, La³⁺, Lu³⁺及びY³⁺の分離検出を行い, それぞれの金属に対しほかのLn³⁺の妨害なくppbレベルの検出限界を達成した。