

第 4 章

HPLC による分散力型分離剤の保持特性評価

*Evaluation of HPLC retention of halogenated benzenes
on the dispersion force type separation material*

4.1 緒言

第3章において、ジオール基を持つ親水性ポリマー系基材にハロゲン化フェノキシ基を導入した固相抽出剤は、ハロゲン化フェノール類に対し高い親和性を示し、塩素、臭素とヨウ素のようなハロゲン原子で置換されたフェノール類を選択的に捕捉した。これらの化合物は大きな原子分極率を持っており、ハロゲン化合物に対して分散力が強く相互作用したのであろう [1, 2]。これらのハロゲン化フェノキシ基導入固相抽出剤は、酢酸エチル、アセトン、1-プロパノール等の有機溶媒中からもハロゲン化フェノール類を抽出可能であった。ハロゲン化フェノールに対するこれらの固相抽出剤における特徴的な親和性は双極子-誘起双極子相互作用によるものであり、分極可能な溶質を分極率に従って捕捉した。この相互作用は溶質を捕捉するためには非常に弱い力であるため、水素結合のような強い長距離相互作用の補助が必要であった。実際、これらの固相抽出剤は極性基のないハロゲン化ベンゼン類の抽出は不可能であった。これらの結果は、弱い力と種々の力（相互作用）を組み合わせることで新奇な捕捉特性と高い抽出効率を示す固相抽出剤を創出することが可能であり、対象化合物の前処理における精製度を向上させるために有効な技術となることを示した。以上の知見は固相抽出だけでなく、クロマトグラフィーにおける新規固定相の開発にも利用可能であり、これまでにない新奇な分離機構を創出できるものと考えられる。

質量分析計の進歩・普及により、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) 及びガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) は、環境汚染物質や残留農薬の分析のために最も強力な測定・解析手法となっている [3-5]。これらの機器は高い選択性と感度を持っているが、実試料分析においては、測定試料中の過剰な夾雑成分によって「定量分析において対象成分以外のすべての成分による複合的影響」と定義 [6] される『マトリクス効果』が引き起こされ大きな問題となることが多い [7-10]。従って、測定試料はこれらの機器の能力を十分に活用するために、事前に精製されなければならない。しかし、現在、すべての夾雑成分を対象成分から完全に分離可能な前処理手法は確立されていない。この課題は分離系においても同様である。夾雑成分の分離が完全でないならば対象成分に対して選択性の高い分離

機構を用いればよいが、第 1 章において述べたとおり、選択性の非常に乏しい ODS を主とした逆相分配モードに依存しきっているのが現状である。従って、高濃度夾雑成分を含む試料中の微量化学物質を高精度に定量可能とするためには、前処理と分離系を含めた選択的な分析手法の確立が必要である。

第 3 章において調製したハロゲン化フェノキシ基導入固相抽出を HPLC 用固定相として利用することで、有機ハロゲン化合物の選択的な分離が可能となるかもしれない。特に、ポリ塩化ビフェニル、ジクロロジフェニルトリクロロエタン、ヘキサクロロシクロヘキサン等のストックホルム条約 (2001) において残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants: POPs) [11] として制限されている化合物の HPLC 分離を可能とするものと期待される。

本章では、第 3 章において調製したハロゲン化フェノキシ基導入固相抽出のうち、2,4-ジブロモフェノキシ基導入樹脂 (DBP-樹脂) を微細化して HPLC カラムとし、ハロゲン化ベンゼン類の保持に与える双極子相互作用の影響を精査した。

第 3 章で調製したハロゲン化フェノキシ基導入固相抽出剤のうち、DBP 樹脂は *p*-ブロモフェノキシ基導入樹脂 (4BP 樹脂) や 2,4,6-トリブロモフェノキシ基導入樹脂 (TBP 樹脂) よりも単位官能基当りのハロゲン化フェノール類の捕捉量が大きかった。そこで、ODS と比較することによって、DBP 樹脂におけるハロゲン化芳香族化合物の保持特性を評価した。

4.2 実験

4.2.1 試薬

DBP 樹脂の調製・評価に使用した主な試薬は、和光純薬工業から入手した。反応性モノマー及び架橋剤には、グリシジルメタクリレート (GMA) とエチレングリコールジメタクリレート (EGDM) (共に東京化成工業から入手) を用いた。細孔調節剤には酢酸ブチルと 3-メチルブタノールを、重合開始剤には 2,2-アゾビス(イソブチロニトリル) を用いた。懸濁重合の分散媒として、ポリビニルアルコール ($n = 500$) を用いた。HPLC による保持特性評価用の *p*-キシレン、1,4-ジフルオロベンゼン、

1,4-ジクロロベンゼン, 1,4-ジブロモベンゼン, フェノール及び2,4-ジクロロフェノールは東京化成工業から入手し, 他の評価用化合物は和光純薬工業から入手した。

4.2.2 高速液体クロマトグラフィー

調製した DBP 樹脂 (10 μm) は, スラリー充填法により 4.6 mm i.d. \times 150 mm のクロマト間に充填して HPLC 用カラムとした。HPLC システムには, GL サイエンス製の GL-7410 ポンプ, GL-7420 オートサンプラ, GL-7432 カラムオーブン, GL-7452 フォトダイオードアレイ検出器を用いた。DBP 樹脂との比較としてクロマニックテクノロジー製の SunShell C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 2.6 μm) を用いた。移動相にはアセトニトリル/水あるいは/メタノール水を用い, いわゆる逆相分配モードを用いて評価した。

4.2.3 DBP 樹脂の調製と物性

HPLC 固定相の基材となる基材樹脂は, 第 3 章の 3.2.2 に従い, GMA と EGDM との懸濁重合により得た。この基材樹脂の比表面積は約 160 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であった。10 μm に分級した GMA/EGDM 多孔質共重合体 (組成比: 40/60) に, トリフェニルホスフィン存在下, キシレン中 116 $^{\circ}\text{C}$, 8 h で 2,4-ジブロモフェノールを導入した。反応後, 残存エポキシ基を硫酸 (0.01 mol L^{-1}) 存在下で加水分解してジオール型とした。得られた樹脂は過剰のアセトンで洗浄した後, 乾燥した (Fig. 3.1)。

4.3 結果と考察

4.3.1 DBP樹脂とODSにおけるハロゲン化芳香族類の保持選択性の比較

Fig. 4.2 に、アセトニトリル/水及びメタノール/水を移動相として用いた時の有機溶媒比率と DBP 樹脂と ODS の分離係数 α との関係を示す。分離係数 α は、以下の式により求めた。

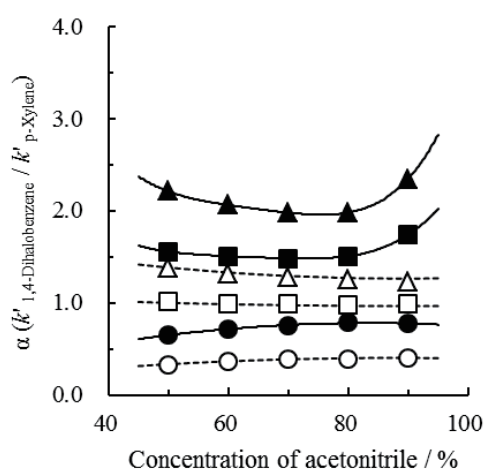
$$\alpha = k_{1,4\text{-dihalogenated benzene}} / k_{p\text{-xylene}} \quad (4.1)$$

ここで、 $k_{1,4\text{-dihalogenated benzene}}$ 及び $k_{p\text{-xylene}}$ はそれぞれの溶質の保持比を表す。

同一の置換基をパラに有する二置換ベンゼンの場合、置換基に基づく双極子は逆ベクトルとなるため分子内で相殺され、分子全体の双極子モーメントは 0 D となる。これを溶質として用いることで、溶質の誘起双極子に基づく分離特性に関する知見がより明確に得られると考え、1,4-ジハロゲン化ベンゼンを選定した。また、これらハロゲン化溶質の対照にはハロゲン基の同じく疎水性官能基であり、また立体性に大きな差が無いメチル基を有する *p*-キシレンを選定した。

50%アセトニトリル/水及び70%メタノール/水の時の1,4-ジクロロベンゼンと*p*-キシレンのクロマトグラムを Fig. 4.3 に示す。*p*-キシレンを基準とした ODS における1,4-ジクロロベンゼンの分離係数 α は、評価した有機溶媒比率の範囲でほぼ一定で、ハロゲン化ベンゼン類の相互分離は不可能であった。有機溶媒比率に伴い、1,4-ジフルオロベンゼンの分離係数 α は僅かに増加したが、1,4-ジブロモベンゼンの分離係数 α は減少した。一方、DBP-樹脂の分離係数 α は、すべてのハロゲン化ベンゼン類で ODS よりも大きかった。1,4-ジブロモベンゼンの分離係数 α の曲線は有機溶媒比率 70 ~ 80%で極小値を示したが、1,4-ジフルオロベンゼンでは極大値を示した。これらの曲線の傾きは、1,4-ジフルオロベンゼン < 1,4-ジクロロベンゼン < 1,4-ジブロモベンゼンの順で大きくなった。

a) acetonitrile-water



b) methanol-water

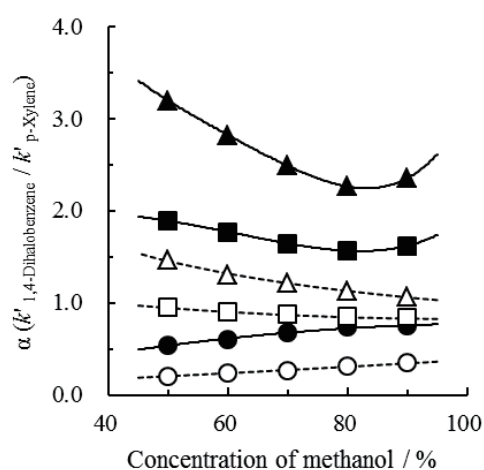


Fig. 4.2 Separation factor (α) between 1,4-dihalobenzenes and *p*-xylene in reversed phase HPLC using DBP-resin (closed symbols) and ODS (open symbols)
 Solutes: 1,4-difluorobenzene (circles), 1,4-dichlorobenzene (squares) and 1,4-dibromobenzene (triangles). Conditions: column, DBP-resin, 150 mm \times 4.6 mm i.d. and ODS, 150 mm \times 4.6 mm i.d.; mobile phase: acetonitrile-water (left figure) and methanol-water (right figure); flow rate, 1.0 mL min⁻¹; column temperature: 40°C.

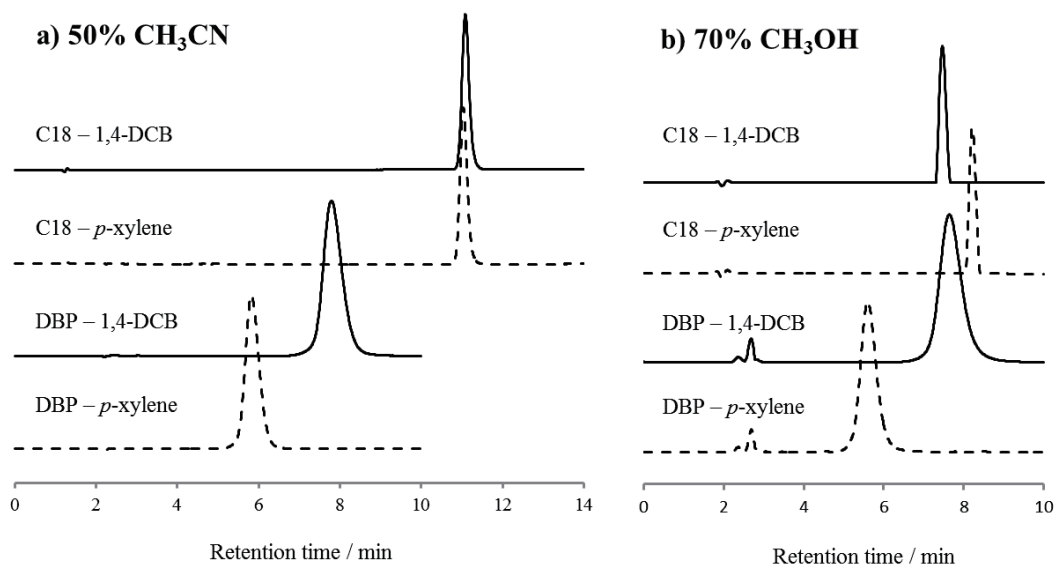


Fig. 4.3 Chromatograms of 1,4-dichlorobenzene in reversed phase HPLC on the DBP-resin (lower) and ODS (upper)

Solutes: *p*-xylene (broken lines) and 1,4-dichlorobenzene (solid lines). Conditions: column, DBP-resin and ODS; mobile phase: 50% acetonitrile-water (left figure) and 70% methanol-water (right figure); flow rate: 1.0 mL min⁻¹; column temperature, 40°C; detector, UV at 225 nm for 1,4-dichlorobenzene and at 210 nm for *p*-xylene.

逆相モードにおける保持挙動は、溶質の疎水性に依存する。1,4-ジクロロベンゼンと*p*-キシレンの $\text{Log } P_{ow}$ 値はそれぞれ、3.44 と 3.15 である [12]。ODS におけるこれらの溶出順序とは逆転しており、何らかの 2 次効果相互作用がこれらの分離に関与していると推定される。逆相モードでは、ハロゲン化ベンゼンは主に固定相表面の有機溶媒和層への分配 [13] によって ODS 及び DBP 樹脂に保持される。主相相互作用である分配力は有機修飾剤比率の増加で減少する。一方、弱い第二相互作用とは、例えば π - π 相互作用、CH/ π 水素結合、分散力等である。弱い相互作用である π - π 相互作用及び CH/ π 水素結合は広義では分散力に分類される。分散力は、最接した距離で発現する。分散力の親和性が官能基への吸着/脱離速度の差によって説明可能であろう。官能基と溶質間の吸着速度は、溶質の溶媒和に大きく影響を受ける。Hildebrand と Scott は、溶解性に関するいくつかのパラメータ (溶解パラメータ δ) を提示し、それらの溶解パラメータは現在でも HPLC の成書に引用されている [14]。近い溶解パラメータ δ を持つ溶媒は、高い混和性を持っている。例えば、クロロベンゼン、アセトニトリル、メタノール及び水の溶解パラメータ δ は、それぞれ 9.6, 11.8, 12.9 及び 21 である。移動相中の有機修飾剤比率が高いとき、ハロゲン化ベンゼン類は有機修飾剤と強く溶媒和しているため、固定相に保持されるのが難しくなる。従って、分配による保持は有機修飾剤比率が高い条件下では低減されるため、脱離速度が溶質の保持を決定する。Hansen は Hildebrand のパラメータを改善して、蒸発の全エネルギーに基づく新しい溶解パラメータを導入した [15]。彼の理論において、2 つの化合物間の親和性は、4.2 式で表される溶解パラメータ距離 R_a に逆比例している。

$$R_a = (4(\delta_{D2} - \delta_{D1})^2 + (\delta_{P2} - \delta_{P1})^2 + (\delta_{H2} - \delta_{H1})^2)^{0.5} \quad (4.2)$$

ここで、 δ_D は分散溶解パラメータ、 δ_P は極性溶解パラメータ、 δ_H が水素結合パラメータである。オクタデセン (ODS 固定相に対応)、1-ブロモ-4-エトキシベンゼン (DBP 樹脂の官能基に対応)、*p*-キシレン及び 1,4-ジクロロベンゼンの各溶解パラメータ、並びに 4.2 式から計算される R_a 値を Table 4.1 に示す。DBP 樹脂での *p*-キシレンよりも高いジクロロベンゼンに対する親和性によって、Fig 4.1 における有機修飾剤比率 80%以上での 1,4-ジクロロベンゼンと *p*-キシレン間の分離係数 α の増加を説明

可能である。一方、ODSでRa値が逆の傾向を示したが、それらの間の分離係数 α の減少は、保持指数が小さすぎるため確認することはできなかった。分散力は、官能基上のハロゲン基に基づき発現していると考えられる。フッ素、塩素と臭素の原子の分散性を表している原子分極率の値は、それぞれ0.557, 2.18及び $3.05 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ である [11]。高濃度有機修飾剤条件下では、DBP樹脂におけるハロゲン化ベンゼン類の保持は原子分極率の順序に伴いより大きくなっている。従って、この固定相におけるハロゲン化ベンゼン類の保持において分散力が大きく貢献していると考えられる。

4.3.2 DBP樹脂とPBBシリカにおけるハロゲン化芳香族類の保持選択性の比較

Tanaka とその共同研究者らは、重元素による分散性を分離に活用するため、ハロゲン化芳香族を固定した数種のシリカ系固定相を開発した [12, 16, 17]。これらの固定相は、フラーレン異性体、ハロゲン化物、重水素化合物の分離に利用された。その中でも、3-(ペンタブロモベンジルオキシ)-プロピル基結合シリカ (PBB-シリカ) がハロゲン化ベンゼン類に高い特異性を示すことが報告された。この研究において、DBP樹脂のジハロゲン化ベンゼン類と*p*-キシレンの保持指数から計算された分離係数 α はTanaka [12] らにより報告されたPBBシリカよりも大きかった (Table 4.2)。第3章において、我々はハロゲン化フェノールに対するDBP樹脂の親和性が双極子-誘起双極子相互作用により説明可能であり、その親和性は対象溶質の分極率に依存すると結論した。そして、DBP樹脂のハロゲン化フェノールに対する選択性は、ハロゲン置換基の数に依存した。これらの結果から、DBP樹脂はPBBシリカよりも大きな双極子モーメントを持つことが明らかとなった。

しかしながら、DBP樹脂における*p*-キシレンとトルエンの分離は、ODS及びPBBシリカよりも悪かった。この結果から、DBP樹脂における固定相-溶質間の疎水効果の寄与は、ODS及びPBBシリカよりも低いと推定された。

Table 4.1 Dispersion solubility parameter, polar solubility parameter, hydrogen bonding parameter and solubility parameter distance (Ra)

	Hansen solubility parameter *			Ra *	
	δ_D	δ_P	δ_H	octadecane (ODS)	bromoethoxy benzene (DBP)
octadecane	16.4	0	0		
1-bromo-4- ethoxybenzene	19.5	7.7	5.3		
<i>p</i> -xylene	17.6	1	3.1	4.0	8.0
1,4-dichlorobenzene	19.7	5.6	2.7	9.1	3.4

Units: $(\text{J cm}^{-3})^{0.5}$

Table 4.2 Retention and separation factors for halogenated aromatics on the DBP-resin, ODS and PBB-silica

solutes	Log P ^{*1}	DBP-resin			ODS			PBB-silica ^{*1}			Br-POP-silica ^{*1}		
		k	α_{tol}	α_{xyI}	k	α_{tol}	α_{xyI}	k	α_{tol}	α_{xyI}	k	α_{tol}	α_{xyI}
benzene	2.13	0.92			1.6			1.22			0.6		
toluene	2.73	1.15			2.78			2.16			0.93		
fluorobenzene	2.27	0.93	0.81		1.48	0.53		1.16	0.54		0.59	0.63	
chlorobenzene	2.84	1.42	1.23		2.65	0.95		2.29	1.06		0.97	1.04	
bromobenzene	2.99	1.73	1.50		3.11	1.12		2.99	1.38		1.18	1.27	
iodobenzene	3.25	2.23	1.94		3.96	1.42		4.38	2.03		1.56	1.68	
<i>o</i> -xylene	3.12	1.5	1.30			0		3.9	1.81		1.37	1.47	
1,2-difluorobenzene	2.37	0.93		0.62				1.16		0.30	0.67		0.49
1,2-dichlorobenzene	3.43	2.05		1.37				4.19		1.07	1.55		1.13
1,2-dibromobenzene	3.64	2.94		1.96				6.77		1.74	2.12		1.55
<i>m</i> -xylene	3.20	1.41	1.23					3.68	1.70		1.4	1.51	
1,3-difluorobenzene	2.21	0.95		0.67				1.16		0.32	0.61		0.26
1,3-dichlorobenzene	3.53	2.29		1.62				4.63		1.26	1.7		0.71
1,3-dibromobenzene	3.75	3.42		2.43				7.77		2.11	2.46		1.03
<i>p</i> -xylene	3.15	1.68	1.23		4.95	1.78		3.86	1.79		1.37	1.47	
1,4-difluorobenzene	2.13	1.13		0.67	1.33		0.27	1.08		0.28	0.57		0.25
1,4-dichlorobenzene	3.44	2.76		1.64	4.33		0.87	4.44		1.15	1.58		0.69
1,4-dibromobenzene	3.76	4.17		2.48	5.98		1.21	7.67		1.99	2.32		1.01
1,4-diiodobenzene	4.11 ^{*3}	7.05		4.2	9.46		1.91	— ^{*2}			— ^{*2}		

Mobile phase: methanol/water = 70/30. *1: Ref 13. *2: no data. *3: Chemspider

4.4 結 言

双極子モーメント相互作用を明確に発現する固定相として、第 3 章で調製した DBP 樹脂におけるハロゲン化ベンゼン類に対する保持特性を HPLC により精査した。HPLC 用 DBP 固定相は、ODS シリカや PBB シリカよりも強くハロゲン化ベンゼン類を保持した。このことから、DBP 固定相が、双極子-誘起双極子モーメントによりハロゲン化ベンゼン類に対して選択性を発現することが明らかとなった。クロマトグラフ的な保持・分離においては、強い分子間相互作用だけでなく、弱い相互作用(例えば、分散力)にも依存することが明白となった。

引用文献

- [1] J.G. Speight, “*Lange’s Handbook of Chemistry, 16th ed.*”, McGRAW-HILL, New York, USA, 2004.
- [2] D.R. Lide, “*CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st ed.*”, CRC Press, Florida, USA, 2000.
- [3] A.K. Malik, C. Blasco, Y. Picó: *J. Chromatogr. A*, **1217**, 4018 (2010).
- [4] G. Martínez-Domínguez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich: *Talanta*, **118**, 277 (2014).
- [5] Y. Pico, G. Font, J.C. Molto, J. Manes: *J. Chromatogr. A*, **882**, 153 (2000).
- [6] IUPAC GOLD BOOK (<http://goldbook.iupac.org/M03759.html>).
- [7] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane: *Talanta*, **115**, 104 (2013).
- [8] S. Kittlaus, J. Schimanke, G. Kempe, K. Speer: *J. Chromatogr. A*, **1218**, 8399 (2012).
- [9] A. Ćirić, H. Prosen, M. Jelikić-Stankov, P. Đurđević: *Talanta*, **99**, 780 (2012).
- [10] J. Hajšlová, J. Zrostlíková: *J. Chromatogr. A*, **1000**, 181 (2003).
- [11] Persistent Organic Pollutants, the United Nations Environment Programme, (<http://www.chem.unep.ch/pops>).
- [12] M. Turowski, T. Morimoto, K. Kimata, H. Monde, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **911**, 177 (2001).
- [13] C. Horvath, W. Melander and I. Molnar: *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).

- [14] J.J. Kirkland: “*Modern Practice of Liquid Chromatography*”, Wiley-Interscience, USA, 1971.
- [15] C.M. Hansen: “*Hansen solubility parameters – A user’s handbook, 2nd ed.*”, CRC Press, New York, USA, 2007.
- [16] M. Turowski, N. Yamakawa, J. Meller, K. Kimata, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, E.R. Thornton: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13836 (2003).
- [17] K. Kimata, T. Hirose, K. Moriuchi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka: *Anal. Chem.*, **67**, 2556 (1995).

