速 報

ポストカラム誘導体化に電極反応を利用した高速液体クロマトグラフィー

百瀬明子, 内倉和雄[®], 梶沢洋三*

(1982 年 10 月 7 日受理)

従来, ポストカラム 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ではカラム溶出液に反応試薬を添加混合して目的物質を検出可能な誘導体へ導き, 光吸収検出や蛍光検出を行い¹⁾, 電気的な検出法では, いずれも物質が電極上を通過したときの電流や電位の変化あるいは電気伝導度を測定している。又最近誘導体化の手法に光化学反応²⁾, 酵素反応³⁾, あるいは交換反応⁴⁾などが利用され, それぞれの目的に合ったリアクターが開発されている。

本法では, 検出可能な誘導体を得るのにカラム電極をリアクターとして用いる点に特色がある。物質が通過する間に電気化学反応を起こさせ, その反応生成体を検出するものである。従って試薬溶液を加えないので溶出液が希釈されないし, 試薬空試験液による影響がない利点に加えて, 電極電位の設定値による選択性も期待される。グラッシーカーボン粒を充てんしたカラム電極を作製し, Neuroblastoma や Pheochromocytoma との関係が認められ⁵⁾, 診断の指標となるなど臨牀的にも重要と考えられる尿中のホモバニリン酸 (HVA) の検出に適用して実用の可能性を確かめたので報告する。

作製したリアクターを Fig. 1 に示す。市販の HPLC 用三方ジョイントなどの部品を利用した。内径 4 mm, 長さ 12 mm の円筒 (b) に 325 メッシュ付近のグラッシーカーボン粒 (東海電極製造社製) を充てんし, 作用電極とする。電位は, 銀-塩化銀電極 (e) を参照電極としてポテンショスタットにより任意の値に設定し, 白金電極 (f) との間で酸化還元反応などを行う。HPLC には, カラムに日立ゲル # 3011-N, 溶離液に 0.25 M 塩化カリウムを含む 0.5 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) とアセトニトリルの混液 (8:2) を用い, 1.0 ml/min で送液した。今回試料とした HVA はアルカリ性 フェリシアン

Fig. 1 Glassy carbon column electrode (reactor)

a: Glassy carbon rod; b: Working electrode (glassy carbon grain, ca. 325 mesh); c: Filter stopper; d: Saturated potassium chloride; e: Reference electrode (silver/silver chloride); f: Supporting electrode (platinum wire); g: Silicon rubber; h: O-Ring; i: Teflon block

化カリウムにより酸化的に二量体化し発蛍光体になることが知られている⁶⁾。

Fig. 2 に示すクロマトグラム (a) は, 人尿 4 μ l を前処理なしでカラム分離を行い, 溶出液をそのまま +0.25 V (vs. Ag/AgCl) のリアクターに通した後, 蛍光強度を測定したものであり, standard HVA と同じ溶出位置にピークが認められ, 酸化反応の進行しない 0 V あるいは +0.02 V (b) では全く検出されていない。又 HVA 以外のピークは変化していないことからこれらのピークは電極反応によるものではないと考えられる。ピーク高さは HVA (5~120) ng の範囲で原点を通る直線関係を示し, 変動係数は 1.6 % (20 ng, $n=10$) であった。又リアクターを通過したためのバンドの広がりほとんど

Fig. 2 Detection of HVA in urine

Sample volume: 4 μ l; Column: Hitachi #3011-N (250 $\times$ 4 mm i. d.); Column temperature: 45 $^{\circ}$ C; Mobile phase: 0.5 M Borate buffer (pH 10.0) containing 0.25 M potassium chloride-acetonitrile (8:2, v/v); Flow rate: 1 ml/min; Setted oxidation potential on the reactor (vs. silver/silver chloride): (a) Urine at +0.25 V, (b) Urine at +0.02 V or 0 V, (c) Standard HVA at +0.25 V; Fluorescence detector: λ_{ex} 325 nm, λ_{em} 420 nm

* 日本大学理工学部薬学科: 東京都千代田区神田駿河台 1-8

認められない。HVA の HPLC には UV 検出⁷⁾, 電気化学検出⁸⁾, あるいはポストカラム法で蛍光検出⁹⁾ などが報告されている。本法は UV 検出法に比べ高感度で、電気化学検出法とほぼ同じ感度を有している。

現在、引き続きリアクターの耐久性などについて検討中であるが、新しいタイプのポストカラム法として、電気化学反応を受けて光吸収や蛍光を有する物質に導ける物質を対象に広く利用されることが期待される。

文 献

- 1) L. N. Snyder : *J. Chromatogr.*, **125**, 287 (1976).
- 2) P. J. Twitchett, P. L. Williams, A. C. Moffat : *J. Chromatogr.*, **149**, 683 (1978).
- 3) M. S. Gandelman, J. W. Birks : *J. Chromatogr.*, **242**, 21 (1982).
- 4) J. F. Studebaker : *J. Chromatogr.*, **158**, 497 (1979).
- 5) S. J. Solidin : “*Advances in Chromatography*, **20**”, Edited by J. C. Giddings, E. Grushka, J. Cazes, P. R. Brown, p. 139 (1982), (Dekker, New York).
- 6) H. Corrodi, B. Werdinius : *Acta Chem. Scand.*, **19**, 1854 (1965).
- 7) A. Yoshida, M. Yoshioka, T. Tanimura, Z. Tamura : *J. Chromatogr.*, **116**, 240 (1976).
- 8) S. J. Solidin, J. G. Hill : *Clin. Chem.*, **26**, 291 (1980).
- 9) T. G. Rosano : *Clin. Chem.*, **27**, 228 (1981).

☆

New post-column detection system using

electrochemical reaction for high performance liquid chromatography. Akiko MOMOSE, Kazuo UCHIKURA, and Yozo KABASAWA (Department of Pharmacy, College of Science & Technology, Nihon University, 1-8, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo)

A new technique of on-line electrochemical derivatization using glassy carbon column electrode as a reactor is established. Materials eluting from a separation column are converted in the reactor to form fluorescent or intensely UV-absorbing products, the products being monitored by a suitable detector. An example of the use of this technique is the detection of homovanillic acid (HVA) in urine. HVA is applied to the column (Hitachi #3011-N, 250×4 mm i. d.) of HPLC and derivatized to the fluorescent dimer (2, 2-dihydroxy-3, 3-dimethoxybiphenyl-5, 5-diacetic acid) by electrochemical oxidation in the reactor. The intensity of the fluorophore is measured with a spectrofluorometer (λ_{ex} 325 nm, λ_{em} 420 nm) and recorded graphically. Linearity of the relationship between peak height and amount of HVA is obtained between 5 ng and 120 ng. The reproducibility, expressed in terms of coefficient of variation, is 1.6 % (20 ng, $n=10$). As none of the derivatizing reagent need to be added to eluent stream, this technique has a little or no effect on the dilution of eluate, back ground noise based on the derivatizing reagent and peak broadening. This technique will extend to many substances.

(Received Oct. 7, 1982)

Keyword phrases

electrochemical reactor; high performance liquid chromatography; homovanillic acid.