芳香族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の 逆相液体クロマトグラフ分離におけるカラム温度の効果

鈴木 義仁[®], 谷 和 江, 宮沢 邦子*

(1985 年 2 月 8 日受理)

芳香族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体のメタノール/水移動相における保持挙動を検討した。カラム温度の変化に対しても検討を行い、カラム温度を上昇させることによって、これらの誘導体の分離の選択性を向上させることができた。又、芳香族アルデヒドのオルト体とパラ体の誘導体の溶離特性について、熱力学的パラメーターによる比較を行った。いずれの誘導体もパラ体がオルト体よりも先に溶離するのは、エントロピー効果によるものと考えられる。

1 緒 言

微量の脂肪族カルボニル化合物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC と略記) で分離及び検出を効果的に達成するために、プレカラム誘導体化が行われる¹⁾。誘導体化は使用する検出器や試料の状態などが考慮されて、紫外検出のために 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (2,4-DNPH と略記) 誘導体が²⁾、又蛍光検出器に対してはダンシルヒドラゾン誘導体が広く用いられてきた³⁾。著者らは、これらの誘導体が逆相系カラム (ODS-シリカ) を用いて、メタノール/水や、アセトニトリル/水を移動相とする HPLC における溶離順が脂肪族アルデヒド同族体のこれら両者の誘導体間で逆転するなどの興味ある事象をとらえ熱力学的な考察を行った⁴⁾⁵⁾。ここでの考察を更に発展させるために、種々の官能基を持つ芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体を合成し、逆相系カラムを用いてメタノール/水移動相の組成やカラム温度を変化させて HPLC を行うこととした。本報のように芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体としての HPLC はほとんど行われていない。これは芳香族アルデヒド自体が紫外領域に吸収を持つために、誘導体化操作を行わなくとも検出可能であるからである。しかし、芳香族アルデヒド類は官能基の種類や置換位置によって紫外吸収の極大波長や吸光係数が大きく異なる。そのため波長のみで紫外検出を行う場合には検出感度の変化が大となり、一連のアルデヒド類混合物の一斉分離検出

を行う際には不都合である。このような場合には 2,4-DNPH 誘導体化することによってすべてのアルデヒド類が誘導体化試薬の骨格による紫外吸収を持つ化合物に変換され、ほぼ近似した波長範囲でほぼ同一感度で検出が可能となり、この不都合さは解消される。又、吸収極大付近でのモル吸光係数が増大することによって高感度で検出することも可能となる。

本報は芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH への誘導体化の利点を考慮しながら、上述したような 2,4-DNPH についての分離の向上を図り、かつ著者らの一連の化合物についての分離機構の解明への手掛りを得るために行ったものである。

2 実 験

2.1 装置と試薬

使用した装置は、高速液体クロマトグラフ・トライローター SR11 型 (日本分光)、紫外検出器 UVIDEK 100-IV 型 (日本分光)、データー処理クロマトパック CR-1A (島津) である。又、カラム温度の設定には循環式電子冷熱恒温槽 (東洋製作所) を用いて 0.1°C まで測定した。移動相溶媒の温度制御については、既報と同様にプレヒーティングコイルを恒温槽中に設置して行った。

誘導体化試薬は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (東京化成工業製、特級) を、芳香族アルデヒド類はいずれも市販品 (東京化成工業製) を使用した。移動相溶媒は市販試薬を単蒸留した後、減圧下で脱気し、それぞれ溶媒の体積混合によって調製した。

カラムは逆相系カラムとして市販されている Finepak SIL C₁₈ (日本分光、長さ 25cm、内径 4.6mm) を使用した。

* 山梨大学工学部：400 山梨県甲府市武田 4-3-11

2.2 誘導体合成

本報で用いた誘導体は次の操作によって合成した。すなわち, 芳香族アルデヒドのエタノール溶液に当量よりやや過剰の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの酢酸酸性エタノール溶液を加えてかき混ぜる。結晶析出を容易にするため溶液を加熱した後, 白濁が生じるまで水を加えしばらく放置する。結晶は戸別した後エタノールから再結晶を行う。得られた 2,4-DNPH 誘導体の融点及びモル吸光係数を Table 1 に示す。

Table 1 Physical properties of 2,4-dinitrophenylhydrazones derived from aromatic aldehydes

2,4-DNPH	m. p./°C	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\log \epsilon^{\dagger\dagger}$
Benzaldehyde	242	377	4.48
<i>o</i> -Hydroxybenzaldehyde	255	381	4.44
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	279 d†	391	4.40
<i>o</i> -Nitrobenzaldehyde	252	381	4.46
<i>p</i> -Nitrobenzaldehyde	321 d†	382	4.56
<i>o</i> -Methylbenzaldehyde	194	379	4.50
<i>p</i> -Methylbenzaldehyde	241	357	4.37
<i>o</i> -Chlorobenzaldehyde	211	377	4.42
<i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	269	377	4.50
<i>o</i> -Methoxybenzaldehyde	253	387	4.49
<i>p</i> -Methoxybenzaldehyde	254	389	4.51

† d: decomposition, †† solvent: EtOH

2.3 HPLC

HPLC から熱力学的なパラメーターを求める際には, クロマトグラム上の保持時間の再現性を得るために十分な注意を払う必要がある。このためには, 分析時において移動相が定流量であること, 移動相溶媒組成の変化がないこと, カラム温度が一定であること及び注入試料が少量であること, などの分析条件や操作を一定に保つことが必要である。本報に使用した装置での, これらの注意を行ったうえでの保持時間の再現性は Table 2 のようであった。

又, 各クロマトグラムの測定は各芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体の 0.1~1 mg をテトラヒドロフラン

Table 2 Reproducibility of retention time†

Exptl. No.	Retention time
1	24.70
2	24.40
3	24.85
4	24.40
5	24.55
$\bar{x}$	24.58
	R. S. D. 0.71%

† *p*-Chlorobenzaldehyde-2,4-DNPH; Column: Finepak SIL C₁₈ (10 μm), ϕ 4.6 mm $\times$ 25 cm; Mobile phase: 80% MeOH; Flow rate: 0.5 ml/min; Column temperature: 40°C; Detector: UV absorption at 370 nm; Injection volume: 1 μl

1 ml に溶解し, この中より 1 μl を分取して HPLC を行った。

3 結果と考察

3.1 誘導体の HPLC

芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体は 2 個の芳香環が $-\text{NH}-\text{N}=\text{CH}-$ 結合によって架橋されており, 誘導体骨格のオルト位のニトロ基は $-\text{NH}-$ の水素原子と分子内水素結合を形成していることが NMR 測定で認められている⁶⁾。分子内水素結合についてはこのほかニトロフェノールについての報告がある⁷⁾。このことは, オルト位にニトロ基のある 2-ニトロフェニルヒドラゾン誘導体とパラ位にある 4-ニトロフェニルヒドラゾン誘導体の逆相カラムにおける HPLC で, 2-ニトロフェニルヒドラゾン誘導体の保持が顕著に増大していることから明らかとなった⁶⁾。これは, 溶質保持において 4-ニトロフェニルヒドラゾン誘導体ではパラ位のニトロ基によって移動相溶媒との相互作用が優先するのに対して, 2-ニトロフェニルヒドラゾン誘導体ではオルト位のニトロ基が分子内水素結合を形成するために極性が弱まり固定相との相互作用が増大するためと考えられる。この結果を踏まえ, 今回は芳香族アルデヒドの芳香環に置換基を導入することによって誘導体が固定相と移動相それぞれにどのように相互作用を行うのか, その HPLC 挙動を比較検討した。芳香環への置換基の導入は種々の置換基をオルト位及びパラ位に持つベンズアルデヒドを試料として, これより 2,4-DNPH 誘導体を合成することによって得た。各アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体の保持時間を Table 3 に示す。

Table 3 Retention time on ODS-column

2,4-DNPH	Retention time/min
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	8.12
<i>p</i> -Nitrobenzaldehyde	8.68
<i>o</i> -Nitrobenzaldehyde	10.85
<i>o</i> -Hydroxybenzaldehyde	10.92
Benzaldehyde	13.28
<i>p</i> -Methoxybenzaldehyde	14.95
<i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	16.22
<i>p</i> -Methylbenzaldehyde	17.34
<i>o</i> -Chlorobenzaldehyde	17.45
<i>o</i> -Methoxybenzaldehyde	19.42

Mobile phase: 75% MeOH; Flow rate: 0.8 ml/min; Column temperature: 65°C

Table 3 より 明らかなように, 同じ官能基を置換したオルト体とパラ体ではいずれもパラ体が先に溶離する。特にニトロ基と水酸基の誘導体は, 置換基を持たな

いベンズアルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体よりも先に溶離する。この結果は既報⁹⁾の結果を裏付けるものであり、ニトロ基や硫酸基が移動相メタノールとの相互作用を増加させ、それとともに固定相との疎水性相互作用の減少を伴っているためと解釈される。又、いずれの誘導体もパラ体が先に溶離するのは、この誘導体では置換位置の効果が大きく保持に影響しているものと考えられる。この機構の更に詳細な説明を行うためには分子内での置換基及び置換位置の異なる誘導体を合成して、今後に検討することが必要である。

3.2 移動相溶媒

移動相のメタノール/水組成を変えて種々の芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体の HPLC を行った。亜硝酸ナトリウムのピークを無保持ピークすなわち t_0 として各誘導体の k' を求めた⁸⁾。その結果を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 より移動相のメタノール組成を変えても溶離順序は変わらず、メタノール濃度の減少に伴い k' が増加する傾向はすべての誘導体間でほぼ同様な傾向にあった。従って、メタノール/水の組成を変えても選択性の向上は期待できず、溶離時間のみを調節するのに役立つことが分かった。

Fig. 1 Relationships of capacity factor ($\log k'$) vs. mobile phase composition

--△--: *o*-methoxybenzaldehyde + *o*-chlorobenzaldehyde, --▽--: *p*-chlorobenzaldehyde, --▲--: *p*-methoxybenzaldehyde, --□--: benzaldehyde, --○--: *o*-hydroxybenzaldehyde, --●--: *p*-nitrobenzaldehyde, --○--: *p*-hydroxybenzaldehyde (2,4-DNPH); Column: Finepak SIL C₁₈; Flow rate: 0.8 ml/min, Column temperature: 60°C

3.3 カラム温度

芳香族アルデヒドの 2,4-DNPH 誘導体の 8 種類の混合物を調製し、これを試料としてカラム温度を 40, 45, 50, 55 及び 65°C で HPLC を行った。移動相は 75% メタノール/水、流速 0.8 ml/min でのクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

Fig. 2 Chromatograms at various column temperature

Samples: 2,4-DNPH; Peaks—1: *p*-hydroxybenzaldehyde, 2: *p*-nitrobenzaldehyde, 3: *o*-hydroxybenzaldehyde, 4: benzaldehyde, 5: *p*-methoxybenzaldehyde, 6: *p*-chlorobenzaldehyde, 7: *p*-methylbenzaldehyde, 8: *o*-methoxybenzaldehyde; Column: Finepak SIL C₁₈; Flow rate: 0.8 ml/min

カラム温度の上昇に伴って、ピークの数も6本から8本となり 65°C では混合した誘導体のすべてが分離した。特に *p*-メチルベンズアルデヒド 2,4-DNPH 誘導体と *o*-メトキシベンズアルデヒド 2,4-DNPH 誘導体は 40°C では分離していない。しかし、しだいに分離する様相となり 55°C では完全に、65°C では更に保持の差が大きくなる。*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド 2,4-DNPH 誘導体と *p*-ニトロベンズアルデヒド誘導体についても同様な変化が見られる。

芳香族アルデヒド類の HPLC において、相互分離の向上にカラム温度の効果が明確にされていない。Fig. 2 の結果は芳香族アルデヒドを 2,4-DNPH としたものはあるが、明らかに温度依存性が大きく現れていることを示している。今後このような化合物の分離にカラム温度の選択が極めて重要となると考えられる。

3.4 熱力学的考察

3.3 で記載したようにカラム温度を変えることによ

て, 分離の選択性の変化が生ずることが明らかとなった。そこで, 電子冷熱型精密恒温槽中にカラムを浸してカラム温度を 20, 30, 40, 50 及び 60°C で HPLC を行った。

カラムの絶対温度の逆数 ($1/T$) に対して, クロマトグラム上でのピーク保持容量比 k' の対数を縦軸にとるとファンツホフの関係が示される。得られた結果のいずれもが 20~60°C の範囲で良好な直線関係を示した。直線関係が成り立つことより, $\ln k' = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln V_s/V_m$ が満足されるので, これより標準エンタルピー変化 ΔH° と標準エントロピー変化 ΔS° とを見積もることができる。

標準エンタルピー変化 ΔH° は負の値をとり, 溶質が移動相から固定相へ溶解する際に安定化によって放出するエネルギーを示す。つまり溶質は移動相よりも固定相に保持されることのほうがエネルギー的に安定であると言える。一方標準エントロピー変化 ΔS° の項も負の値をとる。これは溶質が固定相に保持されることによってエントロピーが減少することを示す。従ってエントロピー的には溶質は移動相中に存在するほうが有利と考えられる。得られた値を Table 4 に示す。これらの ΔH° , ΔS° の値から固定相及び移動相での溶質の保持機構を明確にすることは十分ではない。しかし, 両相での溶質の存在の際の安定化の度合いを比較することは可能である。

Table 4 にはカラム保持時間のほぼ等しい脂肪酸アルデヒド 2,4-DNPH 誘導体の値も比較のために記載した。Table 4 より明らかなように, 芳香族アルデヒド 2,4-DNPH 誘導体は脂肪酸アルデヒド 2,4-DNPH 誘導体に比べて ΔH° の絶対値が大きく, 温度による固定相への溶解すなわち保持の変化が大きく現れる。このこ

とは 3.3 で述べたように HPLC におけるカラム温度の選択が重要であることを示唆している。又, オルト体とパラ体では ΔH° の絶対値がいずれもパラ体のほうが大きい値を示している。これは 3.1 で述べた置換位置の効果でパラ位に置換基があるほうが, 固定相との相互作用が増加するためと考えられる。しかし, 固定相に強く保持されることにより溶質の固定相内でのエントロピーは大きく減少する。 $\Delta S^\circ/R + \ln V_s/V_m$ の項はこれを如実に物語っている。従って, 溶質はエンタルピー項とエントロピー項の相互の寄与によって保持されるが, これらの誘導体ではエントロピー項の寄与が大きいと考えられる。

以上, カラム保持への温度の効果について述べた。この効果は重要で溶質によっては分離の選択性の向上を可能にする。

文 献

- 1) J. F. Lawrence, R. W. Frei: "Chemical Derivatization in Liquid Chromatography", (1976), (Elsevier Pub., Amsterdam).
- 2) 鈴木義仁, 丸山昌英: 分化, **28**, 671 (1979).
- 3) K. Blaw, G. King; "Handbook of Derivatives for Chromatography", p. 349 (1978), (Hyden Pub., London).
- 4) 谷 和江, 鈴木義仁: 分化, **32**, 377 (1983).
- 5) 谷 和江, 鈴木義仁: 分化, **34**, 156 (1985).
- 6) 谷 和江, 鈴木義仁: 分化, 投稿中.
- 7) E. Tesařová, V. Pacáková: *Chromatographia*, **17**, 269 (1983).
- 8) K. Jinno; *Chromatographia*, **17**, 367 (1983).

☆

Effect of column temperature in reversed phase liquid chromatographic separation of aromatic monosubstituted aldehydes as 2,4-dinitrophenylhydrazones. Yoshihito SUZUKI, Kazue TANI, and Kuniko MIYAZAWA (Faculty of Engineering, Yamaguchi University, 4-3-11, Takeda, Kofu-shi, Yamaguchi 400)

Effects of mobile phase composition and column temperature on retention behavior were investigated for 2,4-dinitrophenylhydrazones (2,4-DNPH) derived from aromatic monosubstituted aldehydes. The chromatographic separation of these derivatives was attempted by the use of ODS column with binary mixture of methanol and water as a mobile phase. The separation of various 2,4-DNPH's was unsatisfactory at column temperature 40°C with mobile phase composition from 70% to 90% methanol. However, separation selectivity was improved by elevating the column temperature. The plots of $\ln k'$ versus $1/T$ were linear within the temperature range studied. From the linear plots, the values of enthalpy changes ΔH° and $(\Delta S^\circ/R + \ln V_s/V_m)$ were determined. Para

Table 4 Values of enthalpy and entropy changes obtained from the plots of $\ln k'$ vs. $1/T$

2,4-DNPH	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-(\Delta S^\circ/R + \ln V_s/V_m)$
p-Hydroxybenzaldehyde	18.4	6.3
p-Nitrobenzaldehyde	19.0	6.3
p-Chlorobenzaldehyde	20.6	6.3
p-Methylbenzaldehyde	20.1	6.0
Benzaldehyde	18.7	5.8
o-Hydroxybenzaldehyde	16.8	5.2
o-Nitrobenzaldehyde	16.8	5.2
o-Chlorobenzaldehyde	18.6	5.4
o-Methylbenzaldehyde	19.8	5.9
Ethanal	14.0	4.8
Butanal	14.8	4.7

Column: ODS; Mobile phase: 75% MeOH

isomers were found to be eluted faster than ortho isomers. This was attributed to the larger entropic contribution than the enthalpic one.

(Received February 8, 1985)

Keyword phrases

effect of temperature in elution behavior of 2,4-dinitrophenylhydrazones; monosubstituted benzaldehyde; high performance liquid chromatography of elevating column temperature.