

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19097

研究課題名(和文)超低温下でも液相固定相を有する新規超低温液体クロマトグラフィー用カラムの開発

研究課題名(英文)Development of liquid state stationary phase for ultralow-temperature HPLC

研究代表者

北川 慎也 (Kitagawa, Shinya)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50335080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：超低温場の分離分析手法である超低温HPLCの分離性能改善のために、保持挙動の解明・新規固定相の開発を行った。種々の直鎖アルキル鎖修飾固定相を用いて検討を行ったところ、超低温HPLCにおける保持挙動はHPLCよりもGCに近いことが分かった。別途、分岐オクタンの保持が超低温HPLCでは特異的に小さくなることを見出したことから、分岐鎖アルカンを用いる新規固定相を開発した。この固定相では、GCではなくHPLCに近い保持挙動を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は物質の物理的・化学的性質を支配する重要な因子である。そのため、これまで高温から極低温までの幅広い温度範囲での、様々な物性値の測定方法が開発されてきた。分離分析に関しては、超低温下でのガスクロマトグラフィー(GC)分離が報告されているが、分析可能な化学種は永久気体などに限られている。我々は、汎用性の高い超低温場での分離分析手法として超低温HPLCの開発を行っている。今回の研究成果は、超低温HPLCの実用化における課題である分離性能改善を実現するための重要な一歩である。

研究成果の概要(英文)：Retention behavior in ultralow-temperature HPLC (ULTHPLC) was investigated to improve the separation efficiency and development of novel stationary phase was performed. The detailed study with stationary phases of various linear alkanes revealed that the retention behavior in ULTHPLC is similar to that in GC. It was found that the retention of branched octanes were significantly smaller than the linear alkanes in ULTHPLC. The stationary phases modified with the branched alkanes, newly developed, successfully demonstrated the retention behavior similar to that in general HPLC.

研究分野：分析化学

キーワード：HPLC 超低温 固定相

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 温度は物質の物理的・化学的性質を支配する重要な因子である。そのため、これまで高温から極低温までの幅広い温度範囲での、様々な物性値の測定方法が開発されてきた。分離分析に関しては、超低温下でのガスクロマトグラフィー (GC) 分離が報告されているが (*Anal. Chem.*, **1970**, 42, 7-11)、超低温 GC で分析可能な化学種は限られている。超低温場での分離分析が汎用的に行うことができるようになれば、

- 超低温下での不安定化学種の網羅的分析
- 超低温下で特異的に働く相互作用を利用した選択的分離
- 分子振動抑制条件による微細分子構造認識に基づく分離
- 超低温下での種々の相互作用の評価

などが可能になる。これは化学における超低温場の積極的利用を推進し、新たなフロンティアの創成につながるものである。

(2) 申請者は、超低温場で汎用的に利用できる超低温液体クロマトグラフィー (超低温 HPLC) の開発を進めてきた。これまでに図 1 に示す様に世界最低温である -196 での HPLC 分離、および保持のコントロールに成功している (*Anal. Chem.*, **2016**, 88, 6852-6858; *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1503, 32-37)。しかしながら、超低温 HPLC の分離性能は、通常の HPLC と比較して不十分であるという課題がある。

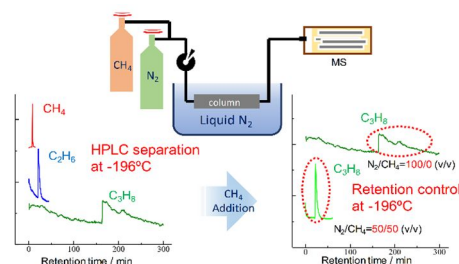


図 1 超低温 HPLC の概略

### 2. 研究の目的

(1) 超低温 HPLC の発展・汎用化のためには、分離性能の向上が必須である。そこで、本研究では、分離性能向上を図るうえで基礎となる、超低温下での保持挙動 (試料 - 固定相間相互作用) の解明と、超低温 HPLC に適した新規固定相の開発を試みた。また、併せて超低温 HPLC の今後の発展に必要な知見である、液化ガス移動相利用時の保持挙動を、低温 HPLC にモディファイア添加を行うことで調査を行った。さらに、超低温 HPLC の実用化を目指して装置の改善を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 超低温 HPLC 装置はほぼ既報 (*Anal. Chem.*, **2016**, 88, 6852-6858; *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1503, 32-37) の通りである。検出器には質量分析計 (MS) または、水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。分離カラムとして、Kromasil 100-5C1(TMS)カラム、Kromasil 100-5C4(C4)カラム、Kromasil 100-5C8(C8)カラム、Kromasil 100-5C18(C18)カラム (dp. 5 μm, i.d. 1.0 mm × 150 mm, Chemco) を用いた。移動相には液化 N<sub>2</sub>、または、液化メタンを用いた。保持挙動の比較対象として、超低温 HPLC に加えて、常温下での通常の HPLC、および、50 での GC 分析を行った。

(2) 充填剤表面には、C4、C8、C18 の官能基のほかにエンドキャッピング処理のために導入された TMS 基も存在する。元素分析装置により各種充填剤の炭素含有率 (%C) および水素含有率 (%H) を求め、それら値から TMS 基と C4 ~ C18 の充填剤表面の官能基密度の算出を行った。

(3) 新たに分岐鎖アルキル基修飾シリカゲルを、5 μm シリカゲル粒子にシランカップリング剤としてクロロ(ジメチル)テキシルシラン、ジメチルイソプロピルクロロシランを修飾し調整した。調整した新規固定相の保持挙動を、超低温 HPLC、50 GC、常温 HPLC の三条件で測定を行い、比較を行った。

### 4. 研究成果

(1) 超低温 HPLC におけるアルキル鎖長の異なるカラムでの保持挙動の比較を行った。TMS、C4、C8、C18 カラムを用いて超低温 HPLC 分離、常温 50°C GC 分離、常温 HPLC 分離を行った。横軸に充填剤の炭素率(%), 縦軸に試料の保持比  $k'$  を取った結果を図 2 に示す。常温 HPLC 分離ではカラム内の充填剤の炭素率(%)と試料の保持比の間に高い相関性 ( $R^2=0.9923$ ) が得られた。一方、

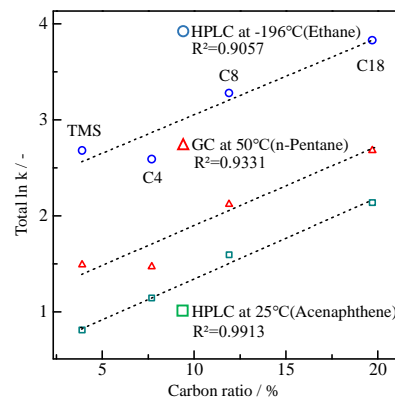


図 2 カーボン率と保持の関係

超低温 HPLC 分離、常温 50°C GC 分離では常温 HPLC 分離と比較して相関性 ( $R^2 = 0.9057$ ,  $R^2 = 0.9331$ ) が低下した。また、超低温 HPLC における TMS カラムを用いた時の保持比は  $\ln k = 2.68$  であり、C4 カラムを用いたときの試料の保持比は  $\ln k = 2.59$  とほとんど同等の値となった。また、常温 50°C GC では、TMS カラムを用いた時の保持比は  $\ln k = 1.49$  であり、C4 カラムを用いたときの試料の保持比は  $\ln k = 1.47$  とほとんど同等の値となった。このことから、超低温 HPLC と常温 50°C GC の保持挙動が類似していることが分かった。

(2) さらに詳細な解析を行うために、図 2 に示した試料成分の保持を、直鎖官能基 (C4, C8, C18) とエンドキャッピングのための TMS 基に分けて評価を行った。直鎖官能基一つ当たりの保持を算出し、超低温 HPLC、常温 50°C GC、常温 HPLC との比較を行った結果を図 3 に示した。超低温 HPLC および 50°C GC では、常温 HPLC 分離と比較して、C4 カラムの保持比が大きく低下した。この挙動の詳細については十分に解明できておらず、さらなる解明が必要である。注目すべき点として、図 3 に示すように、エンドキャッピング TMS 基の影響を除去した条件においても、常温 50°C GC と超低温 HPLC の試料成分の保持挙動は、類似しており、超低温 HPLC は GC に近い保持挙動であることが示唆された。

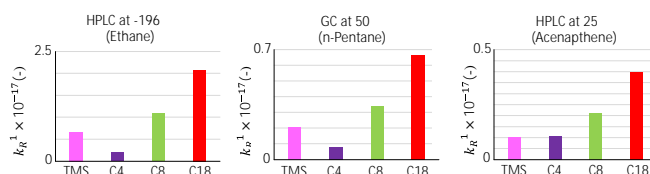


図 3 一官能基当たりの保持

(3) 図 3 に示した結果を、さらに詳細に検討した。固定相官能基に含まれる炭素原子一つに対する保持を算出し比較を行った。常温 HPLC では TMS カラムを除く C4、C8、C18 カラムで固定相官能基炭素一つ当たりの保持比がほぼ等しくなった。すなわち、C4-C18 カラムにおいて、すべての炭素原子が等しく保持に寄与していることが示された。一方、超低温 HPLC および 50°C GC では C8, C18 での炭素一つ当たりの保持が等しくなった。これは超低温 HPLC においても C8, C18 ではすべての炭素が等しく保持に寄与していることを示している。C8, C18 官能基は超低温下で凝集し、その表面のみが保持に寄与している可能性も考えられたが、図 4 に示す結果からは、すべての炭素が保持に利用 (試料成分と相互作用可能) されていることが示唆された。すなわち、超低温 HPLC に適した新規固定相をデザインする際には、凝固固定相表面ではなく、固定相全体での保持を考えることが必要であることが明確となった。

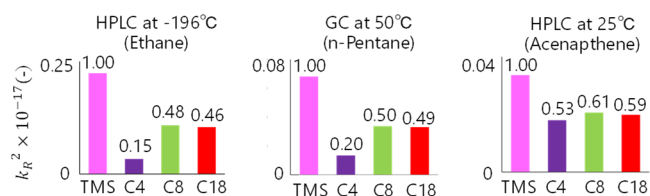


図 4 炭素一つ当たりの保持

(4) 上記の超低温 HPLC に関する検討では各種アルキル鎖固定相とエタンの相互作用を調査している。アルキル鎖と保持の関係を効率よく調べるには、各種アルカンの超低温 HPLC での保持を調べることが有効である。図 5 に、液化メタンを移動相とする超低温 HPLC による、直鎖アルカン (C5-C8) と分岐鎖アルカン (C8) の、C18 カラムでの保持挙動を示した。また、比較対象として常温 GC による保持も併せて示した。図 5 に示すように、GC では分岐オクタンは直鎖ヘプタンと直鎖オクタンの間の保持が得られている。この挙動は一般的に GC で観測される結果である。一方、超低温 HPLC では武器オクタンは直鎖ペンタンと直鎖ヘプタンの間に溶出されている。すなわち、超低温 HPLC では常温 50°C GC と比較して、分岐オクタンの保持が著しく低下していることが判る。この挙動の詳細についてはさらなる検討が必要であるが、分岐アルカンの方が直鎖アルカンに比べて、液化ガス移動相内での安定性が向上している、すなわち溶媒和が促進されるのではないかと推定している。

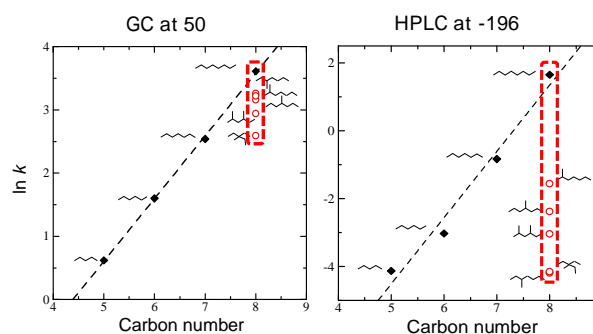


図 5 超低温 HPLC・常温 GC での分岐アルカンの保持

(5) 超低温 HPLC の課題の一つとして、超低温下では試料成分の保持が著しく増大し、それに伴い分離性能も低下するということがあげられる。すなわち、超低温 HPLC の発展には、超低温下での保持の増大が抑制できる新規固定相の開発が重要である。ここで我々は分岐鎖アルカンの

(5) 超低温 HPLC の課題の一つとして、超低温下では試料成分の保持が著しく増大し、それに伴い分離性能も低下するということがあげられる。すなわち、超低温 HPLC の発展には、超低温下での保持の増大が抑制できる新規固定相の開発が重要である。ここで我々は分岐鎖アルカンの



C18 固定相との相互作用が著しく小さいことに着目し、分岐アルキル鎖を修飾した固定相の開発を行った。すなわち、シリカゲル粒子に、図 6 に示す二種類の分岐アルキル基シラン化剤を修飾した固定相の開発を行った。元素分析により炭素率 (C%) を求め、調製した充填剤の官能基修飾密度を測定したところ、それぞれ 1.6、及び、2.2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  であった。

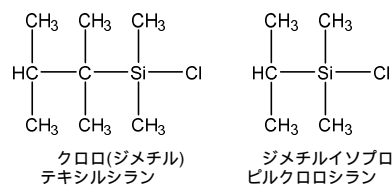


図 6 分岐アルキル基型修飾剤

(6) 調製したジメチルテキシルシラン固定相を用いた超低温 HPLC でのエタンの保持比  $k$  は 4.4 であり、常温 50 °C での  $n$ -ペンタンの保持比は 7.8 であった。また、ジメチルイソプロピルシランカラムでは、超低温 HPLC  $k = 8.1$ 、常温 50 °C  $k = 9.2$  であった。 $k_{\text{HPLC@-196}}/k_{\text{GC@50}}$  を算出すると、ジメチルテキシルシランカラム・ジメチルイソプロピルシラン固定相でそれぞれ、0.6 および 0.9 であった。直鎖アルカン固定相 (TMS, C4, C8, C18) の  $k_{\text{HPLC@-196}}/k_{\text{GC@50}}$  は 3.1 ~ 3.2 であり、分岐鎖アルカン固定相の利用は、超低温 HPLC での保持増大を抑制に有効であることが示された。

(7) さらに詳細な解析として、図 4 と同様に分岐アルカン固定相の炭素一つ当たりの保持比を算出した。市販の直鎖アルカンカラム (図 4 のデータと同一) の結果と合わせて比較を行った結果を図 7 に示した。

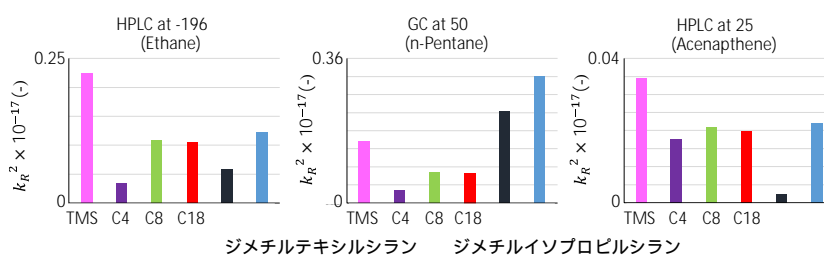


図 7 直鎖および分岐アルキル基の炭素一つ当たりの保持の違い

超低温 HPLC と常温 HPLC では、炭素一つ当たり保持比が C8, C18, ジメチルイソプロピル基ではほぼ同一の値となっている。一方、ジメチルテキシル基では、C18 等と比較して明らかに小さな保持が得られている。一方、常温 50 °C での保持は、明らかに C18 等よりも大きい。すなわち、直鎖状アルキル鎖修飾固定相の場合は、超低温 HPLC の保持挙動は常温 50 °C に類似していたが、分岐アルキル鎖修飾固定相の場合は、常温 HPLC に類似した挙動が得られることが判った。

(8) 上述の通り、通常の直鎖 C18 固定相を用いた際には、超低温 HPLC における保持挙動は、HPLC よりも GC に類似することが明らかとなった。さらに詳細なデータを得るために、液化ガスを移動相として用いる HPLC の保持挙動に関する検討を行った。液化二酸化炭素を移動相として用いる -30°C での低温 HPLC において、移動相にモディファイアとしてメタノール/アセトニトリルを添加した際の低分子有機化合物 (キサントン、多環芳香族類、アルキルベンゼン類) の保持挙動から、液化二酸化炭素を移動相に用いる低温 HPLC においては、 $\pi$  電子や極性官能基が分析対象物の保持に大きく寄与していることが明らかになった。

(9) 超低温 HPLC では図 1 に示す様に、ポンプ圧を利用した送液を行っているがこの方法では、送液の自由度が低いという問題がある。そこで通常の HPLC と同様にポンプ送液の可能性について検討を行った。超臨界流体クロマトグラフィーで用いられる二酸化炭素用ポンプを用いて、エタン、および、プロパンの送液を行ったところ、プロパンでは送液が可能であったが、エタンでは送液に問題が生じることがあった。原因を検討したところ、エタンでは送液時の液化が不十分であることが推定された。また、上述の超低温 HPLC の研究においては、分析可能対象物は酸化しうる化合物のみである。これを改善するために、低温下での固相抽出を利用した溶液試料注入法の検討を行った。この方法では、超低温下での凝固を防ぐため固相抽出時に試料溶媒の除去を行う。利用可能な溶媒の検討を行ったところ、アルコール系溶媒は除去効率が低く、アセトニトリル等の溶媒を利用することが望ましいことを明らかにすることができた。

#### 4. 総括

(1) 超低温 HPLC および低温 HPLC を用いて、超低温 HPLC の発展には不可欠である、液化ガスを移動相として用いる HPLC の保持特性について、十分な知見を得ることに成功した。特に超低温 HPLC においても、固定相官能基全体が試料の保持に寄与していることが示唆されたことは、今後の固定相デザインを行う上で重要な知見である。また、新たに開発した分岐アルキル基修飾固定相は、超低温 HPLC の重要な問題点である保持の増大を抑制に有効であった。さらに、保持挙動が HPLC に類似したことより、分岐アルキル基を用いることで、HPLC に特徴的な「固定相の移動相による溶媒和」が起きている可能性が示唆された。これは超低温 HPLC においても、親水性相互作用クロマトグラフィーと同様に、溶媒和相 (広義での液相) を固定相として利用できることを意味しており、本研究課題である「超低温下でも液相である固定相」開発において、極

めて重要な一歩を踏み出すことができたといえる。

(2) また超低温 HPLC の発展に不可欠なポンプ・試料注入システムの開発においても、重要な成果を得ることができた。ポンプシステムにおいては、今後適切なプレクーリングシステムを併用することで、これまで困難であった液化ガスのポンプ送液が可能となると考えられる。また、低温下固相抽出に基づく溶液試料注入法開発においても、適切な溶媒選択と溶媒除去課程の最適化により、これまで取り扱うことができなかった不揮発性試料の分析が可能になると思われる。

(3) 超低温場を積極的に利用した新たな化学領域の開拓には、超低温場での分析手法の開発が不可欠である。今回の研究成果を基礎として、装置開発と固定相開発を一層推進することで、汎用的な分析手法としての超低温 HPLC を確立できるであろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 MOTONO Tomohiro, KANAYAMA Takayuki, KITAGAWA Shinya, IIGUNI Yoshinori, OHTANI Hajime	4. 巻 41
2. 論文標題 Ultralow-Temperature HPLC Using Low-Molecular-Weight Hydrocarbons as Mobile Phases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2020.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 MATSUO Kohei, OTSUBO Mina, MOTONO Tomohiro, KITAGAWA Shinya, IIGUNI Yoshinori, OHTANI Hajime	4. 巻 42
2. 論文標題 Effect of Organic Modifier on the Retention of Low-Molecular-Weight Organic Compounds in Low-Temperature HPLC Using a Liquid CO <sub>2</sub> Mobile Phase and an Octadecyl Stationary Phase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2020.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 服部将大, 岩瀬弘樹, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温, 低温HPLCのための固相抽出に基づく液体試料注入システムの開発
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温 HPLC における逆相固定相の表面修飾化学種が保持挙動へ与える影響
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾康平, 大坪美菜, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 液化CO <sub>2</sub> を移動相に用いる低温HPLC: 低分子有機化合物の保持へのモディファイアの影響
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川慎也, 金山隆幸, 大谷 肇
2. 発表標題 種々のアルキル鎖の固定相を用いた超低温 HPLCの保持挙動の解明と分岐アルキル鎖修飾固定相の開発
3. 学会等名 第28回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾康平, 大坪美菜, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLCにおける低分子有機化合物の保持へのモディファイアの影響
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 逆相固定相のアルキル鎖長および修飾密度が超低温 HPLC の保持挙動へ与える影響
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾康平, 大坪美菜, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 液化CO2移動相を用いる低温HPLCにおけるモディファイア添加時のアルキルベンゼン類の保持の異常挙動
3. 学会等名 第38回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温液体クロマトグラフィーにおける逆相固定相のアルキル鎖長および修飾密度が保持挙動へ与える影響
3. 学会等名 第38回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温HPLCにおける逆相固定相のアルキル鎖の表面状態が保持挙動へ与える影響
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Matsuo, M. Otsubo, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Unusual alkyl chain selectivity in low-temperature HPLC using liquid CO2 containing organic modifier as a mobile phase
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019 Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温 HPLC における保持の検討 - 逆相固定相の表面修飾化学種の影響 -
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Kitagawa, T. Motono, H. Ohtani
2. 発表標題 HPLC at ultralow-temperatures
3. 学会等名 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬弘樹, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 液化ガス移動相を用いた超低温液体クロマトグラフィーのための固相抽出に基づく溶液試料導入法の開発
3. 学会等名 第37回分析化学中部夏期セミナー(中部支部・近畿支部 合同夏期セミナー)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬弘樹, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温液体クロマトグラフィーのため の固相抽出に基づく溶液試料導入法の開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金山隆幸, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 超低温HPLCにおける固定相のアルキル鎖長と修飾密度が保持挙動へ与える影響
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第18回高山フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾康平, 大坪美菜, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 液化二酸化炭素を移動相に用いる低温液体クロマトグラフィーにおける分離挙動へのモディファイアの影響
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第18回高山フォーラム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

超低温液体クロマトグラフィーに関する研究 <a href="http://cec.ach.nitech.ac.jp/researches/kitagawa_files/kitagawa_UltraLowTempHPLC.html">http://cec.ach.nitech.ac.jp/researches/kitagawa_files/kitagawa_UltraLowTempHPLC.html</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------