

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658114

研究課題名（和文） 有機モノリスチューブを用いた亜臨界流体クロマトグラフィーの開発

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF SUBCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY USING ORGANIC MONOLITH TUBE

研究代表者

安達 修二 (ADACHI SHUJI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90115783

研究成果の概要（和文）：多孔性連続体である有機モノリスを用いた亜臨界流体クロマトグラフィーは、分析時間の短縮や有機溶媒の使用量の低減などが期待されるが、分析条件を合理的に決定するために不可欠な各種溶質の吸着平衡に関する知見は不十分である。そこで、疎水度の異なる数種の溶質のエポキシ樹脂製の有機モノリスチューブに対する吸着平衡を測定するとともに、溶離液組成および温度が溶質の平均滞留時間に及ぼす影響を系統的に検討した。

研究成果の概要（英文）：Chromatography using an organic monolith, which is a porous continuum made of epoxy resin, under subcritical fluid conditions is expected as a promising analytical tool because of shortening of analysis time and reduction in consumption of organic solvent. However, knowledge on the adsorption equilibrium of solute onto the monolith would be insufficient. In this context, adsorption isotherms of solutes of different hydrophobicity onto the monolith were measured by frontal analysis method and the effects of eluent composition (volumetric fraction of acetonitrile in eluent) and temperature on the retention times of the solutes were also examined by pulse response method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：有機モノリス，クロマトグラフィー，亜臨界流体，モーメント解析

1. 研究開始当初の背景

常圧における沸点である 100℃から臨界温度である 374℃の範囲で加圧することにより液体状態を保った水を亜臨界水（または、加圧熱水）は、常温の水に比べて、i) 比誘電率が低く、有機溶媒に近い値を示す、ii) イオン積が大きい、という特徴をもつ。前者の性質から、溶離液として有機溶媒と水の混合物を用いる ODS などの逆相クロマトグラフィーを亜臨界条件で操作することにより、有機溶媒の含有率が低減できる可能性が指摘され、

研究代表者らは比較的耐熱性をもつ市販カラムを用いて、それを検証した。一方、多孔性連続体である有機モノリスを用いたクロマトグラフィーが提案されているが、近年、内径 1 mm の HPLC 用ステンレス管内に有機モノリスをマウントしたもの（有機モノリスチューブ）が開発され、サンプル提供が開始された。

2. 研究の目的

有機モノリスは、材質にも依存するが、比

較的高い耐熱性（～150℃）を有することより、亜臨界流体クロマトグラフィーに適用できると考えられる。亜臨界流体クロマトグラフィーと有機モノリスを用いたクロマトグラフィーはともに、比較的新しい分離法であり、両者を融合した研究はごく最近になって報告例がみられるようになった。有機モノリスを用いた亜臨界流体クロマトグラフィーは、既存のHPLC分析に比べて、①1サンプルあたりの分析時間が短縮できる、②亜臨界流体条件で操作することにより、溶離液中の有機溶媒の含有率を大幅に低減できる、③分析に必要なサンプル量を大幅に低減できる、④分析時間の短縮、カラム部分の大幅な小型化による流量の低減、溶離液中の有機溶媒含有率の低減から、有機溶媒使用量が飛躍的に削減できる、という利点がある。

しかし、多孔性連続体である有機モノリスを用いたクロマトグラフィーにおける溶質の分配や分散に関する系統的な研究は不十分であり、上述した利点の検証や最適操作条件の合理的な決定には至っていない。そこで、疎水度の異なる数種の溶質のエポキシ樹脂製の有機モノリスチューブに対する吸着平衡を測定するとともに、通常分析で汎用されるパルス応答法により、溶離液組成（アセトニトリルと水の混合比）および温度が溶質の平均滞留時間（溶出時間）に及ぼす影響を系統的に検討した。また、前端分析法を用いて、平衡吸着量を測定した。

3. 研究の方法

エポキシ樹脂の有機モノリスチューブ（セミクロカラム T85, 130 mm L×1.0 mm I.D., エマオス京都）をカラムオープン（CTO-30A, 島津製作所）内に設置し、24.0±0.1℃に保持した。HPLC用送液ユニット（LC-20AD, 島津）を用いて、水/アセトニトリル=50/50 (v/v)の移動相に溶解したカフェイン（5.2×10⁻⁴～1.0×10⁻¹ mol/L）、イソバニリン（2.0×10⁻³～1.3×10⁻¹ mol/L）、バニリン（2.0×10⁻³～1.3×10⁻¹ mol/L）、クマリン（6.8×10⁻⁴～1.7×10⁻¹ mol/L）またはメチルパラベン（6.6×10⁻⁴～9.9×10⁻² mol/L）の500 μLを負荷したのち、0.01 mL/minの流量で溶離液を溶出し、UV検出器（SPD-10AVVP, 島津）を用いて、流出液の254 nmでの吸光度を測定した。カラム容量（100 μL）に比べて、負荷した吸着質溶液の量が多いので、応答曲線を前端分析法で解析して、式（1）により平衡吸着量 q を算出した。

$$q = \frac{Qt_e C_0 - Q \int_0^{t_e} C dt - \varepsilon_e V C_0}{(1 - \varepsilon_e) V} \quad (1)$$

ここで、 q は平衡吸着量、 Q は移動相の流量、 t_e は平衡到達時間、 C_0 はサンプルの初期濃度

であり、吸着量は細孔体積を含んだ固定相単位体積あたりの物質量として算出した。また、少量（1 μL）のテトラヒドロフラン、トルエンまたは重量平均分子量が820～213,600のポリスチレンのパルス応答曲線の一次絶対モーメントを算出し、充填剤内の細孔体積（気孔率）を含めた全空隙率を ε_T 、間隙の空隙率 ε_e と気孔率 ε_i の測定を試みた。

次に、特異な挙動を示したバニリンを除く上記の溶質に、さらにテオブロミンとテオフィリンを加えて、パルス応答法によりこれらの溶出挙動に及ぼす溶離液組成および温度の影響を検討した。溶離液として水とアセトニトリルの混合液を使用し、アセトニトリルの含有率を25, 50, 75, 100% (v/v)とした。また、温度は25, 40, 60または80℃とした。なお、規格化した1次絶対モーメント μ_1' は次式で定義され、積分は数値的に行った。

$$\mu_1' = \int_0^{\infty} tC(t)dt / \int_0^{\infty} C(t)dt \quad (2)$$

ここで、 $C(t)$ は溶出時間 t におけるカラム出口での溶質濃度である。

4. 研究成果

逆サイズ排除クロマトグラフィーにより有機モノリスチューブのベッド空隙率を求めるため、溶質の分子量とパルス応答曲線の保持体積（時間）の関係を図示して、トルエンの保持体積から空隙率 ε_T を0.76と算出した。一方、 ε_e を示す明確な変曲点は認められなかったため、 $\varepsilon_e = 0.65$, $\varepsilon_i = 0.11$ と仮定して、以下の解析を行った。カフェインおよびクマリンの吸着等温線は線形でHenry式（2）が適用できた（図1）。

$$q = KC \quad (2)$$

ここで、 K は分配係数であり、カフェインおよびクマリンの K はそれぞれ0.528および1.91と算出された。

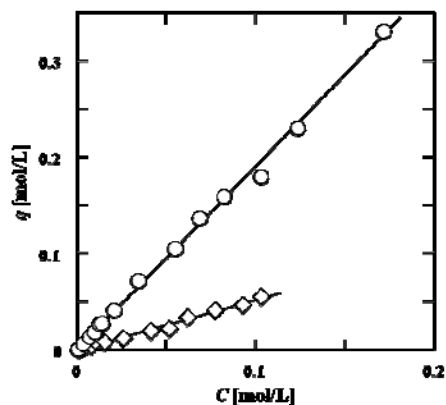


図1. カフェイン（◇）およびクマリン（○）の有機モノリスに対する吸着等温線。

一方、イソバニリン、バニリン、メチルパラベン等の吸着等温線はいずれも非線形性を示した。そこで、代表的な非線形の吸着等温式である Langmuir 式および Freundlich 式の適用の可否を検討したところ、Langmuir 式は適用できず、Freundlich 式では概ね実測値を表現できた。Freundlich 式の成立は、結

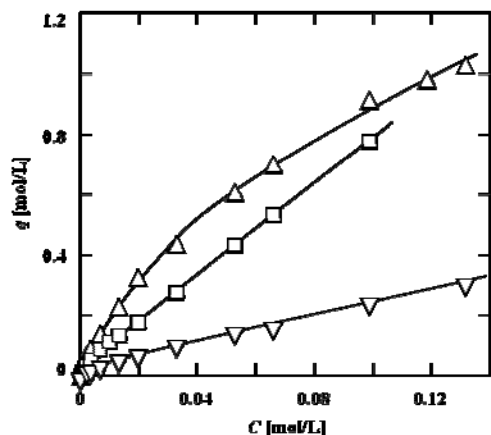


図2. イソバニリン (▽)、バニリン (△) およびメチルパラベン (□) の有機モノリスに対する吸着等温線。合様式の異なる複数の吸着サイトの存在を示唆するので、Langmuir 型の吸着と Henry 型の吸着が同時に起こっていると考え、以下の式 (3) により吸着等温式を推定した。

$$q = \frac{q_{m,1} a_1 C}{1 + a_1 C} + K_2 C \quad (3)$$

ここで、 $q_{m,1}$ は吸着サイトの飽和吸着量、 a_1 は吸着サイトへの吸着係数、 K_2 は分配係数である。式 (3) によるフィッティングでは、いずれの溶質に対しても高精度で吸着量を表現した。使用した溶質のうちバニリンは他の溶質に比べて特異な吸着挙動を示し、固定相である有機モノリスとの強い相互作用を示唆した。この相互作用は有機モノリスを作成するときの分子インプリンティングに起因する可能性が高いと思われる。

平衡吸着量または分配定数を算出するには、カラム全体に対するマクロ孔の空隙率 ϵ_{ext} および固定相のミクロ孔の空隙率 ϵ_{int} を評価する必要がある。マクロ孔の空隙率とミクロ孔の空隙率を測定する方法として逆サイズ排除クロマトグラフィーが提案され、シリカ基材のモノリスを固定相として用いた系に適用されている。しかし、この方法を有機ポリマー基材のカラムに対して適用したところ、特定の分子サイズ以上でのカラム排除が認められず、空隙率を推定できなかった。この理由として、使用した有機ポリマー基材の固定相が比較的広い細孔分布を有する可能性が考えられる。また、窒素ガス吸着法や水銀ポロシメトリーによる空隙率の測定にも限

界があり、本系に適用できる適当な空隙率の測定法が見いだせない。そこで、各流速における 1 次絶対モーメント μ_1' を算出し (図 3)、

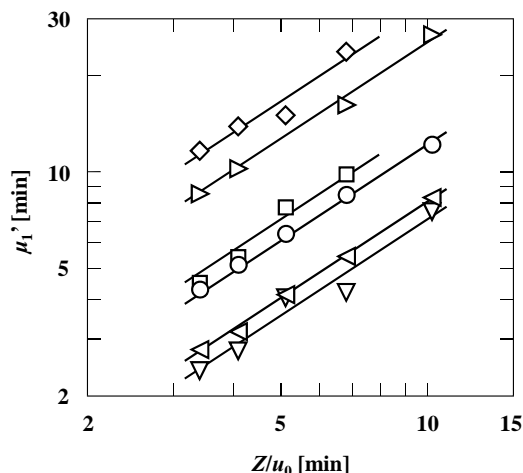


図3. 50% (v/v) アセトニトリルを溶離液としたときの種々の流速におけるメチルパラベン (◇)、テオフィリン (▷)、イソバニリン (□)、クマリン (○)、カフェイン (◁)、テオブロミン (▽) の規格化した一次絶対モーメント (25°C)。

それを空塔流速 Z/u_0 で除した相対平均滞留時間 $\mu_1'/(Z/u_0)$ を、各溶質の有機モノリスに対する吸着性の指標として評価した。

各アセトニトリル濃度において、それぞれの溶質の相対平均滞留時間を絶対温度の逆数に対してプロットすると (図 4)、温度の上昇に伴って、溶質の相対平均滞留時間は低下する傾向が見られた。しかし、75% アセトニトリルを溶媒としたときのカフェインのように van't Hoff プロットが直線とならない例も観察された。

溶質が複数の相互作用によって固定相に保持されるときには、それぞれの相互作用の温度依存性が異なるため、van't Hoff プロットは直線とならない。また、エンタルピー変化 ΔH やエントロピー変化 ΔS の温度依存性が無視小でも相対 ϕ が温度に依存する場合には van't Hoff プロットが直線にならない。しかし、両性イオンを有する固定相を用いた親水性相互作用クロマトグラフィーにおいては、ベンゼンやキシレンなどの芳香族化合物は $\ln k$ の van't Hoff プロットが曲線となるが、これはアセトニトリル濃度が高く保持係数が小さいために測定誤差が大きくなったことに起因すると推測されている。本研究で、van't Hoff の式に従わない原因として、溶質の相対平均滞留時間が短く、有機モノリスに対する親和性が低いと考えられる。そのため、測定の誤差が大きくなり、結果として van't Hoff プロットが直線とならなかったと考えられる。

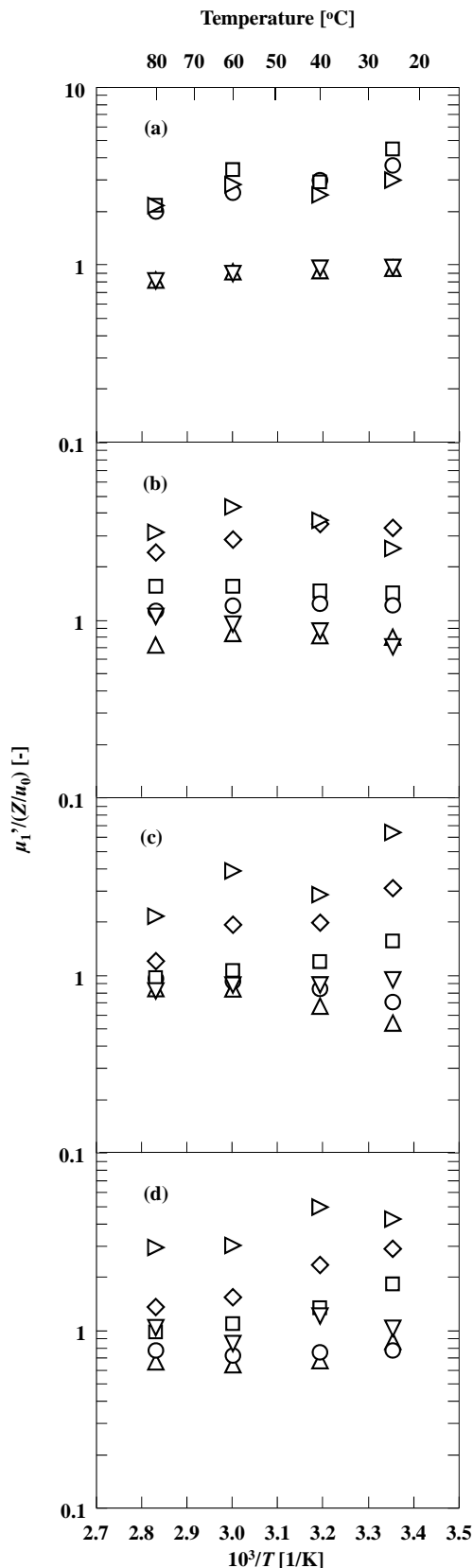


図4. (a) 25% (v/v), (b) 50%, (c) 75% および (d) 100%アセトニトリルを溶離液としたときの各種溶質の相対平均滞留時間 $\mu_1'(Z/u_0)$ の温度依存性.

また、ある濃度のアセトニトリルを溶媒として用いたときの特定温度における相対平均滞留時間は各溶質の疎水性度（オクタノール-水系の分配係数の対数値 $\log P_{ow}$ ）とは正の相関を示さなかった。例えば、テオフィリンはメチルパラベンよりも $\log P_{ow}$ が低いですが、溶媒として 75%以上のアセトニトリルを用いると、テオフィリンはメチルパラベンよりも強く固定相に保持された。また、上述したように、使用した有機ポリマー基材のモノリスに対してバニリンが特異的な吸着挙動を示し、分子インプリントの効果が示唆されており、この点が影響した可能性もある。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 修二 (ADACHI SHUJI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90115783