

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14657

研究課題名（和文）ナノ気泡の物質分離機能を利用した圧力応答性クロマトグラフィーの開発

研究課題名（英文）Development of pressure-responsive chromatography utilizing specific properties of nano-bubbles

研究代表者

中村 圭介（Nakamura, Keisuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員

研究者番号：30805148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：水中に長時間存在するナノ気泡（ナノメートルから数十ナノメートルサイズの気泡）は、様々な分野で注目されている。本研究では、疎水性表面に囲まれたナノ空間に固定化したナノ気泡を固定相の構成要素の一つとして用いる液体クロマトグラフィーである表面気泡変調液体クロマトグラフィー（Surface-bubble-modulated liquid chromatography, SBMLC）において、気泡の圧力に対する安定性の向上を目的として検討を行った。加えて、選択性と検出感度の高い質量分析計（Mass spectrometer, MS）をSBMLCの検出器として使用可能とすることを目的として研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、表面気泡変調液体クロマトグラフィー（SBMLC）において、充填剤細孔内の気体の安定化を狙って、細孔径の小さな充填剤の開発を行った。また、細孔径の異なる疎水性粒子を用いることで、移動相組成や疎水性粒子の表面化学構造を変化させることなく、分析対象物質の分離選択性を変化させることに成功した。さらに、人体への有害性や環境への残留性が指摘されている有機ヒ素化合物の分析にSBMLCを応用することで、従来法では困難であった、水を移動相としたLCによる有機ヒ素化合物の迅速な分離方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Nanobubble, bubble with sizes ranging from nanometers to several tens of nanometers, which exist in water for a long time have attracted attention in various fields. The objective of this study is to improve the stability of bubbles in the pores of the packing material against pressure, in surface-bubble-modulated liquid chromatography (SBMLC), which is a high-performance liquid chromatography that contains a stationary gas phase in a column packed with a bonded silica. In addition to this, research was conducted with the aim of making it possible to use a mass spectrometer (MS) with high selectivity and detection sensitivity as a detector for SBMLC.

研究分野：分析化学

キーワード：液体クロマトグラフィー ナノバブル 疎水性材料 水/疎水性材料界面

## 1. 研究開始当初の背景

疎水性材料を気体が溶存した水中に置くと、材料表面にナノ気泡が発生し、熱力学による予測に反して、安定に長時間存在する。ナノ気泡は、今世紀初めに新しく発見された新規の研究対象であり、界面化学分野をはじめとして多くの研究者の興味を惹いている。これまで、安定性や表面電荷など、ナノ気泡の基礎物性を明らかにする研究や、発生方法、利用法についての応用研究が多数展開されているが、ナノ気泡自体の分離機能に着目した研究は少ない。ここで、ナノ気泡を分離媒体として用いる分離方法として表面気泡変調液体クロマトグラフィー (surface-bubble-modulated liquid chromatography, SBMLC) がある。これは、水を移動相とした逆相液体クロマトグラフィー (Reversed phase liquid chromatography, RPLC) において、疎水性多孔質粒子の細孔内から液相水が抜け出す現象を利用した方法であり、細孔内からの水の抜け出しは、疎水性細孔内で液相水が気体に相変化することで説明できる。SBMLC は、気相を一つの構成要素とするハイブリッド固定相を分離に利用しており、疎水性粒子と気相自体の他に水/疎水性物質界面がそれぞれ独立に分離場として機能することに加え、気泡の大きさを圧力によって変化させることで、各分離場の大きさを変えることができ、分離選択性の圧力制御が可能となる。

しかし、疎水性細孔内に固定化された気体の分離機能、特に移動相 - ナノ気泡間の分配平衡の圧力に対する応答は明らかになっていない。また、従来の SBMLC では、紫外可視検出器や示差屈折率検出器を用いていたために、選択性と検出感度が低いという問題があった。選択性と検出感度の高い質量分析計 (Mass spectrometer, MS) を SBMLC の検出器として使用可能とすることで、高い選択性と検出感度を有する環境適合型の分離分析法を実現できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、SBMLC を深化させ、圧力によって分離選択性を自在かつ可逆的に変換可能な分離分析法とするとともに、分子をプローブとして用いる解析方法によって、ナノ気泡の分離媒体としての機能を解明することを目的とした。初めに、気泡の圧力安定性が向上を目指して市販品と比較して細孔径の小さな C18 結合型シリカカラムを開発して、その性能を評価した。また、SBMLC と MS を接続した分析法の開発を目指し、農薬を対象としてエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のイオン化効率に対する添加剤濃度依存性を調査するとともに、有機ヒ素化合物を対象として SBMLC-MS を用いた分析法の開発を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) SBMLC

SBMLC の研究については、フロム製のデガッサー (BG-42-02) と高耐圧インジェクター (VH-V340)、センシュー科学製のカラムオープン (SSC-2120)、日本分光製のポンプ (PU-4285) と紫外可視吸光検出器 (UV-2075 Plus)、島津製の示差屈折率検出器 (RID-20A) からなる HPLC システムを使用した。測定データは、エル・エイソフト社製のクロマトデータシステム (CDS Lite ver.5.0) によって解析した。カラム充填剤には、細孔径が 7 および 12 nm の C18 結合型シリカを用いた。カラムの乾燥には日本分光製の超臨界流体クロマトグラフシステム (SFE/C-410) を用いた。カラムをメタノールで満たした後に超臨界二酸化炭素を通液し、減圧開放することでカラム内の充填剤を乾燥させた。この際、カラムの質量測定を行うことで、カラム内のメタノールが完全に除去されたことを確認した。充填剤を乾燥したカラムに純水系の移動相を通液して充填剤細孔内に気相を固定した。カラムに加わる圧力は、長さの異なるキャピラリーピークチューブ (PEEK 製, 65  $\mu\text{m}$  I.D.) をカラム出口と検出器の間に取り付けることで調整した。

### (2) SBMLC-MS/MS

液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) には Waters 製の ACQUITY UPLC-Xevo TQ を用いた。イオン化法には ESI(+) を用いた。脱溶媒温度とイオン化室温度は、それぞれ 650 と 150  $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶媒ガスとコーンガスの流量は、それぞれ 800 L/hour と 50 L/hour に設定した。農薬を用いたイオン化効率の塩濃度依存性の調査では、イオン化電圧は 3 kV とした。カラムには L-column3 C18 (粒子径: 3  $\mu\text{m}$ , カラムサイズ: 150  $\times$  2.1 mm i.d., 化学物質評価研究機構製) を用い、カラム温度は 40  $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入量は 4  $\mu\text{L}$  とした。また、0, 1, 2, 5, または 10 mM の酢酸アンモニウムを添加した純水とメタノールをグラジエント溶離に用いた。有機ヒ素化合物の分析では、イオン化電圧は 2.5 kV とした。カラムには L-column3 C18 (メタルフリーカラム, 粒子径: 5  $\mu\text{m}$ , カラムサイズ: 100  $\times$  2.0 mm i.d.) を用い、カラム温度は 40  $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入量は 4  $\mu\text{L}$  とした。また移動相には、1 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) SBMLC の耐圧性向上に向けた検討

カラム内に固定した気相の安定性は、Washburn の式より算出される細孔圧によって決定する。

$$p = \frac{-2\gamma\cos\theta}{r} \quad (1)$$

ここで、 $p$  は細孔圧（細孔から水が抜け出す圧力）、 $\theta$  は水と疎水性表面との接触角、 $\gamma$  は水の表面張力、 $r$  は疎水性細孔の半径を表している。式(1)より、細孔径が小さいほど、気泡の圧力安定性が向上することがわかる。そこで本研究では、細孔内の気泡の圧力安定性向上を狙い、細孔径が 12 nm 程度で、約 20 MPa の圧力で細孔が水で満たされてしまう市販の C18 結合型シリカ充填剤と比較して、細孔径の小さな C18 結合型シリカ充填剤を開発した。

Figure 1 に開発した充填剤（細孔径：7 nm）と市販の充填剤（細孔径：12 nm）における気泡の圧力安定性を比較した結果を示す。なお、図の横軸はカラムの中心圧力、縦軸は SBMLC カラム中の液相水の体積  $V_L$  とカラム内全空隙体積  $V_0$  の比を示しており、この値が 1 になるとカラム

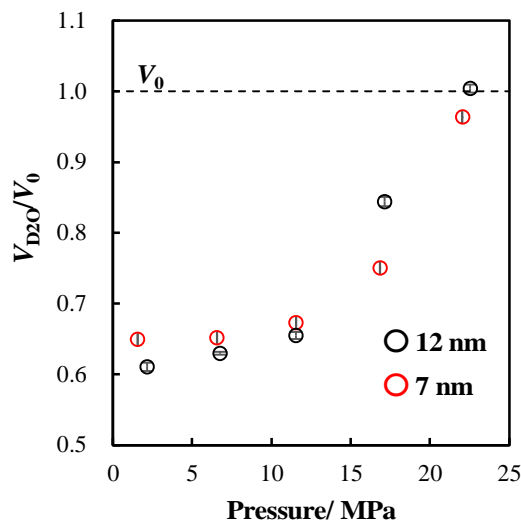


Figure 1. Dependence of the liquid water volume in SBMLC columns with different pore size on pressure. Column: C18 silica column. Pore size: 12 nm (black circle) and 7 nm (red circle). Temperature: 25 °C.

内の気泡が全て液体の水に置き換わったことを表している。Figure 1 より、本研究で開発したカラム充填剤は、市販品と比較して気泡の安定性が向上していること、特に 18 MPa 程度の圧力において、市販品は細孔体積の半分以上が液体の水で占められているのに対して、開発した充填剤では細孔体積の 2/3 程度の大きさの気泡を保持できることが明らかになった。ここで、式(1)と 12 nm の細孔が水に満たされた圧力（23 MPa）から、半径 7 nm の細孔が水に満たされる圧力は約 40 MPa となる。しかし、この予測に反して、開発した充填剤の細孔は、23 MPa で 9 割以上の体積が水で満たされた。これは、充填剤のシリカ基材を合成する際に、細孔径の分布が生じることや、細孔が完全な円筒径ではないことが影響していると考えられる。次に、7 nm と 12 nm の C18 結合型シリカカラムを用いて、有機化合物の保持挙動を調査した。Figure 2 にそれぞれのカラムに 18 MPa の圧力をかけて測定を行った際に得られたクロマトグラムを示す。細孔径が 7 nm のカラムでは、ベンジルアルコール、ベンズニトリル、アセトフェノン、ニトロベンゼン、ベンゼン- $d_6$ 、ベンゼンの順で溶出しているのに対して、12 nm のカラムでは、ベンジルアルコール、ベンズニトリル、ベンゼン- $d_6$ 、ニトロベンゼン、ベンゼン、アセトフェノンの順に溶出しており、溶出順序が異なるとともに、7 nm のカラムと比較してニトロベンゼンとアセトフェノンの保持時間が大幅に大きくなった。これは、細孔径が 12 nm のカラムでは、7 nm カラムと比較して、細孔内に入り込む水の体積、ひいては水/疎水性物質界面の面積が大きくなり、それとともに界面への分配が大きなアセトフェノンやニトロベンゼンの保持が相対的に大きくなったことを反映している。これらの結果は、カラムの細孔径を変化させて細孔内に入り込む水の体積を調整することで、SBMLC の溶質保持選択性を制御できることを示している。

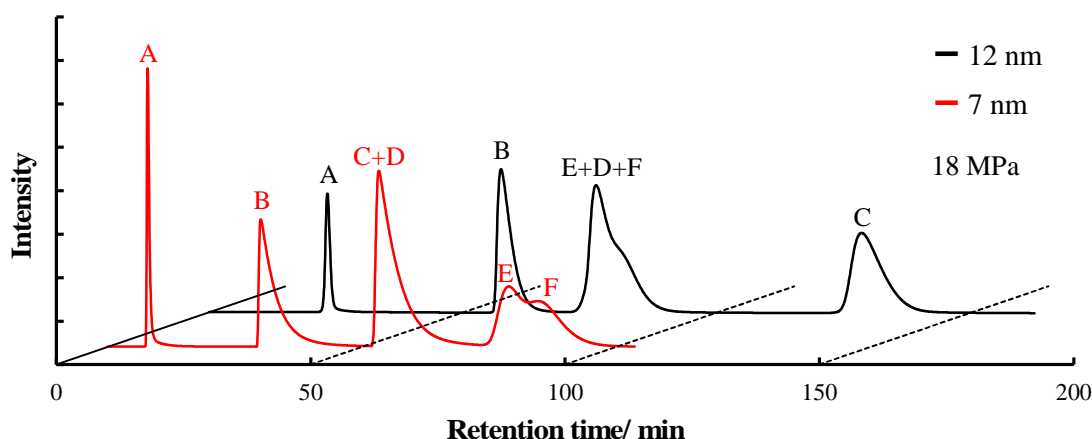


Figure 2. Chromatograms of organic compounds obtained by SBMLC. Column: C18 silica column. Pore size: 7 nm and 12 nm. Pressure: 18 MPa. Temperature: 25 °C. Mobile phase: Pure water. Flow rate: 0.6 mL min<sup>-1</sup>. Detector: UV detector. Compounds: A, Benzyl alcohol; B, Benzonitrile; C, Acetophenone; D, Nitrobenzene; E, Benzene- $d_6$ ; and F, Benzene.

## (2) LC-ESI-MS におけるイオン化効率に対する添加剤濃度依存性の調査

従来の SBMLC では、紫外可視検出器や示差屈折率検出器を用いていたため、実用的な分析を

行うためには選択性や検出感度が低いという問題点があった。そこで、選択性と検出感度の高い質量分析計 (Mass spectrometer, MS) を SBMLC の検出器として検討した。なお、MS のイオン化法には LC/MS において広範に用いられている ESI を用いた。一般に ESI-MS の測定では、移動相中の有機溶媒比率の増大や移動相への揮発性の酸、塩基または塩が添加によって、イオン化効率の向上が達成されている。しかし SBMLC では、50 % 程度の水 / 有機混合溶媒を通液すると、細孔内が濡れて気相が消失することがわかっている。そのため、SBMLC では添加剤濃度によって、MS のイオン化効率を調整することとなる。そこで、農薬の LC-ESI-MS 測定におけるイオン化効率に対する添加剤濃度の依存性を調査した。

Figure 3 に 8 種類の農薬の LC-ESI-MS 測定において、イオン化効率と添加剤である酢酸アンモニウムの濃度の関係を調査した結果を示す。Figure 3 より、多くの農薬が 1 mM の酢酸アンモニウム添加時に最大の感度を示し、添加濃度の増大とともに感度が減少していくことが判明した。これは、塩濃度の増大により、エレクトロスプレーが発生しにくくなることが原因だと考えられる。以上のように、LC-ESI-MS のイオン化効率は移動相に添加する塩濃度に依存することが、明らかとなった。

### ( 3 ) SBMLC を用いた有機ヒ素化合物分析法の開発

LC を用いた有機ヒ素化合物の分析方法には、LC-MS/MS を用いて、分析対象となる化合物に由来する分子イオンを検出する方法と、液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いて、ヒ素を検出する方法が利用されている。LC-MS/MS を用いた方法は、分子イオンを検出するため、対象となるヒ素化合物同士の空間分離が必要ないという利点がある一方で、定量の際には化合物ごとに標準物質が必要となる。次に LC-ICP-MS を使用する場合は、ヒ素が検出対象となるので、定量を行う際に化合物ごとの標準物質は必要ではなくなる。しかし、LC でヒ素化合物の空間分離を行う必要がある。よって理想的には、これら 2 つの方法で、同じ条件 ( 溶離液、カラム、カラム温度等 ) を用いて、それぞれ測定を行うことで、分析の信頼性が向上する。ここで、疎水性の高い有機ヒ素化合物を LC で分析する際には、カラムからの溶離を迅速に行うために、高濃度の有機溶媒を含んだ移動相が用いられる。しかし、ICP-MS の測定において、LC-MS/MS で用いられるような有機溶媒が多量に含まれる移動相を導入すると、プラズマが不安定になり、イオン化効率の低下や煤の発生によるインターフェースの目詰まりが生じるため、特別なインターフェースが必要となる。そこで本研究では、LC-ICP-MS においてインターフェースを交換することなく、LC-MS/MS と同条件での分析が可能となるような有機ヒ素化合物の分析法の開発を目的とした。本研究では、疎水性の高い有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸と、疎水性の低いアルセノベタインをモデル化合物として用いた。

Figure 4 に C18 シリカカラムを用いた RPLC と SBMLC におけるアルセノベタインとジフェニルアルシン酸の保持挙動を比較した結果を示す。なお、これらの実験においては、同じ RPLC カラムを用いており、条件として異なるのは、カラム内の気相の有無だけである。RPLC では、2 つの化合物は分離されているが、DPAA の保持時間が 40 分以上となっており、分析時間が非常に長くなっている。これに対して、SBMLC で分析を行った場合、アルセノベタインとジフェニルアルシン酸の分離を保ったまま 2 分以下で分析を完了することができた。これは、ジフェニルアルシン酸が水 / 疎水性物質界面へ大きく分配する化合物であり、SBMLC では界面の面積が大幅に減少したため、保持時間が大幅に短縮されたためである。このように、SBMLC-MS が有機ヒ素化合物の迅速な分析法になりうることを示された。

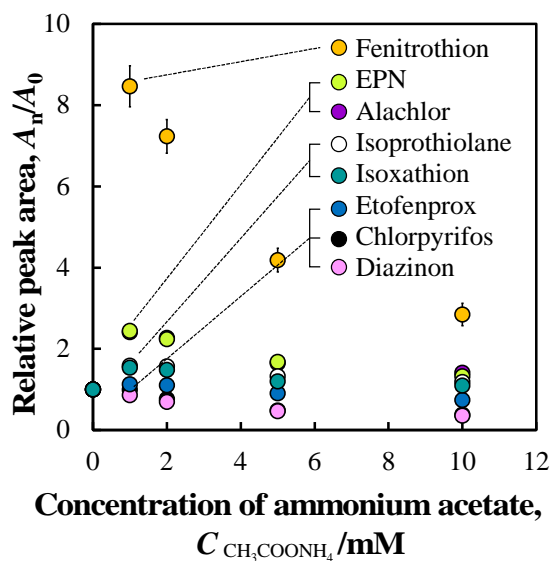


Figure 3. Effects of concentration of ammonium acetate in the mobile phase on the observed peak area of target pesticides obtained on LC/MS/MS measurement. Error bars represent the standard deviation ( $n = 8$ ).

LC-ESI-MS のイオン化効率は移動相に添加する塩濃度に依存することが、明らかとなった。

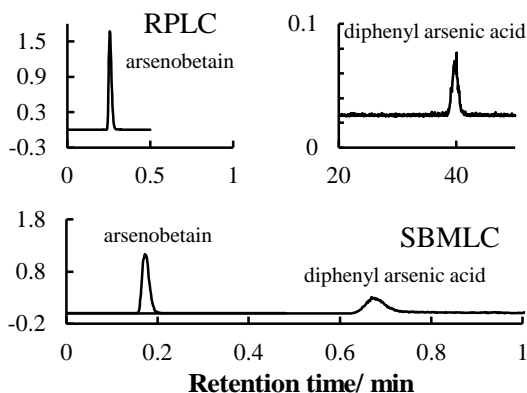


Figure 4. Chromatograms of diphenyl arsenic acid and arsenobetaine obtained by SBMLC and RPLC. Column: L-column3 C18. Temperature: 40 °C. Mobile phase: 1 mM ammonium acetate aqueous solution. Flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------