

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510003

研究課題名（和文）環境中に放出された環境負荷物質の連続濃縮と同時モニタリング

研究課題名（英文）Continuous enrichment and simultaneous monitoring of environmentally harmful substances emitted into environment

研究代表者

北爪 英一（KITAZUME EIICHI）

岩手大学・人文社会科学部・教授

研究者番号：00186248

研究成果の概要（和文）：新しいアイデアに基づく高速向流クロマトグラフ用カラムを試作し、その有用性を検証するとともに環境のオンラインモニタリングに応用した。カラム中に有機相を固定し、メチレンブルーを含む水溶液を水相とし、装置内外を循環させ、河川水試料を連続的に導入することにより、微量の陰イオン界面活性剤モニタリングシステムが完成できた。本システムは密閉系で動作できるので、有機溶媒による健康被害の心配が無く、また多数の試料を短時間で分析できる。

研究成果の概要（英文）：A new dual high-speed counter-current chromatographic system using organic extraction phase and aqueous mobile phase containing methylene blue was applied to the analysis of anionic-type detergents. After selecting appropriate conditions such as flow rate of each mobile phase, sample volume etc, the new system was successfully applied to the analysis of anionic detergent in river water. As all the analytical procedure can be made in a closed system, the method has no health hazard. The present method is safe, precise, and highly sensitive, and can be applied for sequential determination of multiple samples in a short analysis time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：環境計測、向流クロマトグラフ、環境モニタリング、陰イオン界面活性剤

## 1. 研究開始当初の背景

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）はすでに一般的な分析法として、生物活性物質の分析や、環境に影響を与える微量物質の分析、また臨床分析など広範な分野でさかんに用いられているが、分離カラムに固体の固定相を使用しているところから、試料の変性や不可逆的なカラムへの吸着、損失などが生じることがある。また一般にカラムの保持容量

が少ないので、大量の試料の分離や濃縮には必ずしも有利ではなかった。

## 2. 研究の目的

高速向流クロマトグラフは円柱状のドラムに巻き付けられた細いコイル状のチューブを、ドラムごと自転及び公転させ、カラム内に生じる遠心力とアルキメデスのスクリュウ効果を利用して、液体の固定相をカラム

内に留めることができるので、HPLC に比べ、分離あるいは分析目的物質の保持量を格段に大きくできる。1) しかし高速で複雑な運動が必要になるので、ベアリングに異常に負荷がかかること、また回転部のチューブ自体にも強い遠心力がかかるため、市販の装置では回転をあまり上げることができないなどの問題があった。この研究では装置の耐久性を向上させ、また最適なチューブ形状を採用して試作し、安定した連続運転を可能とする。また、環境試料や農薬試料は経時変化を受けやすいので、試料採取後、できるだけ早く分析を行なう必要にせまられる。向流クロマトグラフの移動相、固定相の双方向移動性を利用して、サンプリング場所でオンライン濃縮を行えば、従来の固相抽出法において、サンプリング時間を含めて濃縮と分離に数時間以上かかっていた操作を30分以下に短縮できる可能性がある。国際的にみても、農薬や環境試料の濃縮や分離に高速向流クロマトグラフを利用した例はほとんど無い。特に夾雑物の多く含まれている野菜や食品中の農薬を分析する場合、大量の夾雑物が問題となる。また、国内における食品中の残留農薬に関しては、食品衛生法の規格基準で、農薬ごとに種々の食品中の最大残留許容量があり、平成14年4月には、229農薬134農産物について延べ8700項目の農薬残留基準値が設定されている。そこで広範囲の農薬について残留実態を把握することが、食品の安全性を論じる上で必要になっている。しかし、多くの場合、食品由来成分は分析を大きく妨害する。その上、粉碎した試料からアセトニトリルやアセトンにより溶かし出された抽出物をそのまま分析装置に注入することは、注入部や分析カラムの汚れを引き起こし、これにより装置の分析性能が低下する。したがって何らかの精製操作が必要であり、さまざまな精製方法が提案されているが、すべての農薬や食品に完璧に適用できる方法はない。しかし、労力、コスト、分析の効率化という観点から、多数の農薬を一斉分析できるスクリーニング試験法が求められており、そのための多成分一斉分析法が公的に認められている。2) また、さらに理想の分析法をめざして盛んに研究がなされている。3) しかし、これらの方法は100種以上の農薬を同時に測定できる反面、夾雑物の混入は避けがたいので、誤認や見落としを防ぐため、高度の技術が必要とされる。また、検出器として汎用されるガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)ではピークの重なりで、目的物のイオン強度が影響を受けることも多い。また、そのような夾雑物による装置の汚れも大きな問題である。ミニカラム中の固体相に抽出する固相抽出法では回収率が低いことや固相への不可逆的な吸着な

どの問題も指摘されている。一方、向流クロマトグラフでは液体の固定相を利用できるので、カラムへの不可逆的な吸着は避けることができ、試料の回収率の向上が期待される。また中空のチューブであるカラム内で、それぞれの溶媒を逆向きに流すことが可能なので、そのカラムの途中に新たに設けた試料導入口および排出口を利用することにより、二相間で、特定の分配比を持つ特定物質のみをカラム中の一部分に濃縮し、夾雑物が十分分離した後に濃縮した目的成分のみを取り出すことが可能になる4)。以上のような特徴をもつ分離濃縮法を向流クロマトグラフを利用して実現することを目的とする。

### 3. 研究の方法

河川水などの環境水中に放出されたプラスチック可塑剤や界面活性剤、また食品中の残留農薬などの濃縮やモニタリングに利用できる、高速向流クロマトグラフを試作、研究する。最適な二相溶媒系を択び、環境水や食品を装置内に導入して、二相溶媒に目的物質が分配する様子をモニタリングしながら連続濃縮実験を行い、装置の有効性を評価する。また、カラム内に微生物を固定し、目的物質の濃縮や分解など、単純な二相溶媒系で達成することができない特異的な効果についても探索する。高速向流クロマトグラフのカラムに関しては、現在の市販品では、カラムにかけられる遠心力は最大で約70G程度であるので、強い遠心力に耐えられるベアリング機構を採用する。300G程度の遠心力を与えることのできるカラムを試作し、その性能と実用性を評価する。カラムの形状に関しては、先に出願中の特許に基づき、連続的にモニタリングしながら濃縮できる形状を使用する。

### 4. 研究成果

#### (1) 高速向流クロマトグラフの試作

図1に示す高速向流クロマトグラフを試作、完成させた。本装置はカラムの回転半径を10cmとした時、1500rpmまで回転が可能で、計画した強い遠心力(約250G)を発生させることができたので、当初の目標をほぼ達成できた。

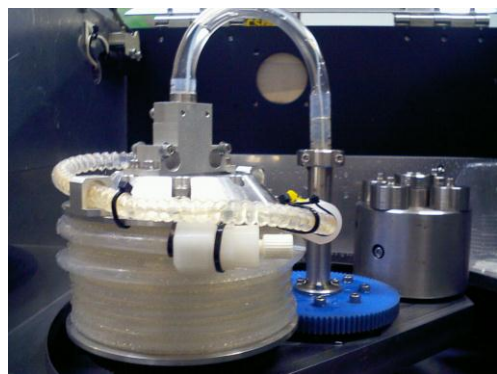


図1. 試作した高速向流クロマトグラフ

(2) 試作した装置のカラム部分の改良

図2に示すように、カラム端A、Dの途中部分2箇所（BおよびC）に液相導入口を新たに形成することにより、従来装置では成しえなかった、向流クロマトグラフ装置の新たな応用法（陰イオン界面活性剤の連続分析モニタリングシステム）を開発することが出来た。

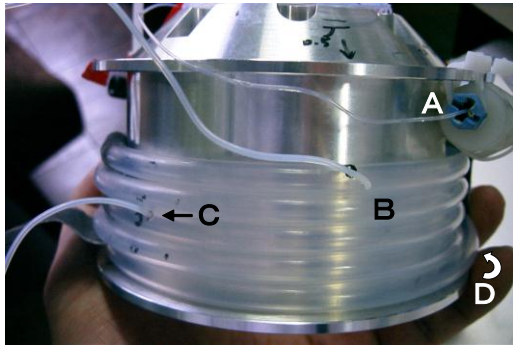


図2. 改良を加えたカラム部分

このような配置でカラムを高速回転させることにより、以下の図3の模式図で示される効果を見出した。

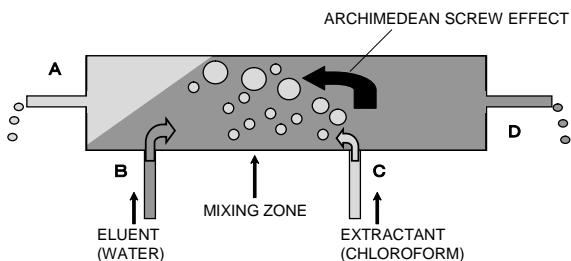


図3. 装置動作中のカラム内部の動き

図において、河川水を含む試料（ELUENT）がBより連続的に導入される。ELUENTは陰イオン界面活性剤と結合する色素（メチレンブルー）を含んでおり、外部ポンプで装置内に供給され、Dより装置外に排出されるが、またポンプに戻ってつねに装置内外を循環している。この流れの中に、定期的に一定量の河川水試料がインジェクターにより導入される。

一方、界面活性剤と結合したメチレンブルー錯体は、導入口Cよりポンプで導入されたEXTRACTANT（クロロホルム）により、連続的に抽出される。また、クロロホルムはコイルが回転する際の「アルキメデスのスクリュー効果」により、ELUENTに対して対向方向（A側）に進む。そこでB-C間で激しいミキシングが起こり、さらに効率よく陰イオン界面活性剤が抽出される。

以上の原理を利用して、開発したモニタリングシステムの全体構成を図4に示す。

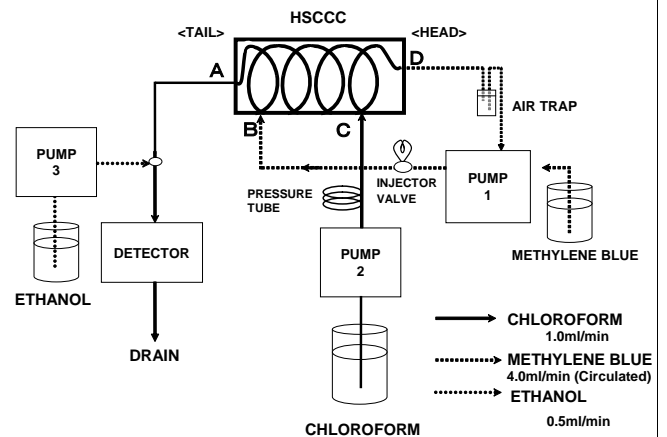


図4. 陰イオン活性剤の連続モニタリングシステム

図4において、メチレンブルー溶液はポンプ1でBより装置（HSCCC）内に入り、Dより排出されるが、エアトラップを介して再びポンプ1にもどって循環している。河川水試料はインジェクターバルブにより、一定量が定期的に系内に導入される。一方、抽出溶媒としてのクロロホルムは、ポンプ2により装置内に導入され、陰イオン活性剤を抽出しつつ、装置内で試料水溶液に対して対向して逆方向に進み、排出口Aより排出される。排出口Aは吸光度検出器（DETECTOR）に接続されており、連続的に吸光度がモニターされる。クロロホルムはその後、ドレインより排出される。なお、流路の洗浄と、検出信号を安定させるために、検出器の直前で微量のエタノールがポンプ3により流路に混入されている。

本システムを用いて、岩手県盛岡市内を流れる北上川から採取した河川水試料を連続的に測定した例を図5に示す。

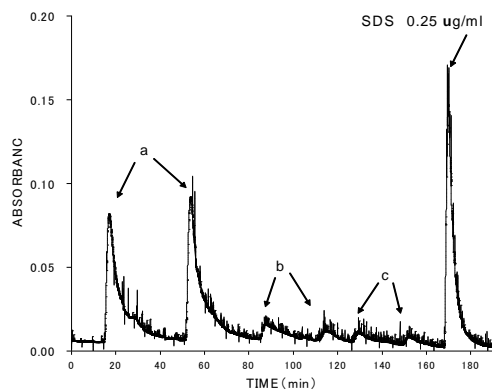


図5. 北上川河川水中に含まれる微量陰イオン界面活性剤の連続分析結果の一例

図5において、それぞれの吸光度ピークは陰イオン界面活性剤の濃度に比例することが確かめられた。図では河川の3ヶ所(地点a、b、c)においてサンプリングされた試料の濃度がモニターされている。なお、b、c地点は生活雑排水がほとんど流れ込まない北上川本流でサンプリングした試料、aは比較的郊外の地点で、ある程度生活雑排水が流れ込んでいる支流との合流点でサンプリングを行った試料である。ピーク高さから、b、c地点に比べて微量ではあるが、明らかに界面活性剤が混入していることが分かった。

なお、図5の最後のピークは代表的な陰イオン界面活性剤である、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)0.25マイクログラム/mlを含む試料10mlの信号である。ピーク高さから概算すると、JISによる環境測定法として、よく用いられるクロロホルムと分液ロートによる陰イオン界面活性剤のバッチ分析法に比べて、本システムでは約10倍の感度の向上が確認された。また、本システムは密閉系ですべての操作が可能なので、クロロホルムなどの溶媒による健康への影響面でも安全性が担保されている。また、連続性、迅速性にも優れ、自動化による連続モニタリングも可能であることから、極めて環境測定に有効なシステムであることが確認できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Eiichi Kitazume, Saki Koikawa, Lu Hui, Syou Sannohe, Yanjun Yang, Yonosuke Maki, Yoichiro Ito, Sequential determination of anionic-type detergents by complexation with methylene blue using dual high speed counter-current chromatography, J. Chromatography A, 査読有, Volume 1236, 2012, 148-151

〔学会発表〕(計5件)

- ① 北爪英一、遠心力を利用した向流クロマトグラフの開発と応用、いわて産学官連携フォーラム〜リエゾン-I マッチングフェア2011〜北東北地域資源フォーラム in 岩手, 2011. 12. 1、(岩手県工業技術センター)
- ② 北爪英一、遠心力を利用した向流クロマトグラフの開発と応用、JSTイノベーションフォーラム東北2010 技術シーズ発表およびポスターセッション、2010. 12. 1、(仙台国際センター)
- ③ 北爪英一、遠心力と二相分配系を利用した向流クロマトグラフによる環境試料の分析とモニタリング、平成22年度化学系学協会東北大会 (日本分析化学会共催「環境と分析化学みちのくセミナー」)招待講演、2010. 9. 26、(岩手大学)
- ④ Eiichi Kitazume, Enrichment and Separation of Inorganic Elements by CCC, Wednesday seminar programme on Brunel Institute for Bioengineering, Advanced Bioprocessing Centre, 2010.8.4, Brunel University, (UK)
- ⑤ Eiichi Kitazume, Syou Sannohe, Yonosuke Maki, Yoichiro Ito, Observation of Two Phase Behavior in HSCCC Column using Small Wireless CCD Camera set on the Rotary Frame, The 6th International Conference on Countercurrent Chromatography, (CCC2010), 2010. 7. 28, University Lyon 1, (France)

〔図書〕(計2件)

- ① Eiichi Kitazume, MARCEL DEKKER, Inorganic Elements: CCC Analysis. "Encyclopedia of Chromatography, Third Edition"(edited by J. Cazes), 2009, 1457-1460
- ② Eiichi Kitazume, MARCEL DEKKER, Metal-Ion Enrichment by CCC. "Encyclopedia of Chromatography, Third Edition"(edited by J. Cazes), 2009, 1206-1211

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：高速向流クロマトグラフ装置およびそれを用いた分析方法

発明者：北爪 英一

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4249080 号

取得年月日：21年1月

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北爪 英一 (KITAZUME EIICHI)

岩手大学・人文社会科学部・教授

研究者番号：00186248

### (2) 研究分担者

牧 陽之助 (MAKI YONOSUKE)

研究者番号：90048520