

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655065

研究課題名(和文)不安定化学種の網羅的分析のための超低温液体クロマトグラフィーの開発

研究課題名(英文)Development of low temperature liquid chromatography for comprehensive analysis of unstable compounds

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)・准教授

研究者番号：50335080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：不安定化学種の包括的な解析を実現することを目的とし、極低温により不安定化学種を安定化させるHPLC分離分析手法の開発を行った。新たに開発した装置を用い、主として液化二酸化炭素を移動相とするODSカラムを用いた条件での分離挙動を-35～-5℃で調べたところ、-15℃付近で試料の保持・分離性能の双方が特異的に変化することが。すなわち、-15℃付近で固定相の状態変化が起こっている可能性が高いことが示唆された。低温条件下での不安定化学種の試みとして、電気化学反応によりオンラインで生成させたキノンラジカルの分析を試みた。電気化学反応に併せてクロマトグラムの変化を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：A chromatograph using liquid gas as a mobile phase was developed to achieve comprehensive analysis of unstable compounds in low temperature. The basic chromatographic behavior was studied mainly using a conventional ODS column with a mobile phase of liquid carbon dioxide at the temperature ranged from -35 to -5 °C. The investigation revealed that both retention and separation efficiency behaviors varied specifically around -15°C. That is, this result indicated that the possibility of phase transition of the stationary phase around this temperature. The analyses of quinone radical, which was generated by online electrochemical reaction, was also performed as a trial to analyze unstable species under low temperature and the variation in chromatogram was observed together with the electrochemical reaction.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：液体クロマトグラフィー 低温 液化二酸化炭素 相転移

### 1. 研究開始当初の背景

現在、生体系の網羅的分析(オミクス)が精力的に進められている。生体内の物質動態を全て解明することで、生命現象に関する理解が飛躍的に向上することは確実である。しかしながら、生体内に含まれる化合物の中には不安定な化学種も多数存在する。不安定化学種はその反応性の高さから、生化学的に極めて重要な役割を担っていることが多い。しかし、その不安定さのため分析対象とすることは非常に困難である。生体内に含まれる不安定化学種を安定化させる有効な方法は、極低温の利用である。すなわち、生体組織・細胞を瞬時に凍結し、化学反応の進行を停止、または、遅延させる方法が有効である。

凍結組織に含まれる不安定化学種の分析は、低温条件を保ちながら行う必要がある。一般的に、不安定化学種の分析に用いられる方法は、核磁気共鳴法(NMR)、電子スピン共鳴法(ESR)、赤外線分光法(IR)などの分光学的方法である。これらの方法は低温条件下でも利用が可能であるが、生体内に含まれる多数の不安定化合物を、網羅的に解析する手法としては適当ではない。網羅的解析を行うには、現在のオミクス解析と同様に分離分析-質量分析の利用が有効であろう。

不安定化学種に対する分離分析の例としては、極低温条件下でのガスクロマトグラフィー(GC)分離の報告がある。しかし、揮発性の低い試料成分を低温 GC で分離することは困難であり、低揮発性化合物の分析を行うことが出来る分離手法の開発が必要とされる。一般的に、低揮発性成分の分離分析には、液体を移動相とする高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられる。すなわち、極低温下でも利用可能である「超低温液体クロマトグラフィーの開発」を開発することができれば、不安定化学種の網羅的解析が可能になると期待できる。しかし、現在の生体分析で用いられる移動相の多くは、低温下では固化し使用することができない。従って、極低温下で HPLC 分離を行う際には、新たなアプローチが必要である。また、現在用いられている移動相は、仮に凝固しないとしても、温度低下に伴う粘性率の増大や拡散係数の低下が起こり、クロマトグラフィー分離を行う場合に、送液圧力の上昇や分離性能の低下といった不利な点が多い。

### 2. 研究の目的

通常の液体が低温条件下では分離に著しく不利に働くことに対して、二酸化炭素やアルゴン、窒素などは、適切な温度・圧力条件では、適度な拡散係数と低い粘性率を有する低温液体や低温超臨界流体となる。すなわち、液化ガスは超低温液体クロマトグラフィーの移動相に適していると考えられる。本研究では、低温液化ガス移動相として用いる「超低温液体クロマトグラフィー」を構築し、不安定化学種の網羅的解析を実現することを

最終的な目的としている。今回の申請では、その第一段階として、(a)低温流体を移動相として用いることができるクロマトグラフ(装置)の開発、(b)低温液化ガスを移動相として用いる低温液体クロマトグラフィーの分離特性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

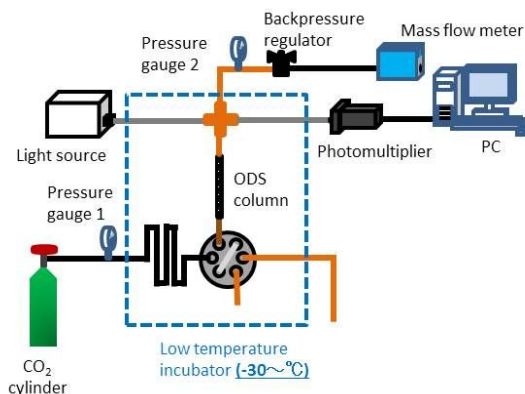
本研究の開発目標である「液化ガスを移動相として用いる超低温 HPLC」と関連性のある装置としては超臨界クロマトグラフ(SFC)が挙げられる。SFC では超臨界もしくは亜臨界状態の二酸化炭素(もしくはこれにメタノール等の溶媒が添加された流体)が移動相として用いられる(低温条件として 0 程度が最低温度)。しかし、この装置は、超低温 HPLC として利用することができないため、本研究ではまず始めに、装置のプロトタイプ構築を行った。

次いで構築した装置を用いて、「液化ガスを移動相として用いる HPLC」の低温条件下での分離挙動についての研究を行った。

### 4. 研究成果

#### 4.1 装置構築

SFC では送液のためにプランジャーポンプが用いられているが、超低温下では正常・安定的に動作することが保証できない。そこで、可動部の多いプランジャーポンプを用いず、ガスシリンダーの圧力を送液のためのエネルギーとして用いる HPLC の構築を行った。また、挙動の確認のためには、比較的高温で液化が可能である二酸化炭素を移動相として用いた。



**Fig. 1** Apparatus for low-temperature chromatography using liquid gas as a mobile phase

構築した装置の概略を Fig.1 に示した。構築した装置は、炭酸ガスポンプ、インジェクター、カラム、検出器、圧力計、背圧レギュレーター(ニードルバルブ)、流量計、低温恒温槽からなる。ニードルバルブにより系内の圧力を制御し、二酸化炭素を安定的に液化させた。なお、低温下での検出を可能にするため、検出には光ファイバー分光器を用い、吸光度測定を行った。

液化二酸化炭素を移動相として用いる上で、二酸化炭素の液化を実際に確認する必要がある。最初に、気体として供給されている二酸化炭素が、連続的かつ安定的に液化が行われていることを確認するために、 $-15^{\circ}\text{C}$  の恒温槽内に顕微鏡観察システムを設置し、カラム（中空キャピラリー）内の流れを観測できるシステムを構築した。液化の確認を目視で行うため、観測部の直前に加熱部を設け液体の気化による気泡発生による確認を試みた。パルスの加熱を行うことで、 $-15^{\circ}\text{C}$ 、約 6 MPa の条件下において、気泡の発生が確認され、二酸化炭素が液化ガスとして供給されていることを確認することができた。

また、温度 $-15^{\circ}\text{C}$  の条件下で、粒子径  $5\ \mu\text{m}$  充填カラム（カラム長 150 mm）を用いた際に、圧力差 0.6 MPa で  $1\ \text{mm/s}$  の線流速を得ることができた。液化二酸化炭素の粘性は、 $130\ \text{mPa}\cdot\text{s}$  ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 6 MPa)であり、これは水 ( $1002\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ , 0.1 MPa)やアセトニトリル ( $350\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ , 0.1 MPa)と比較して小さいためである。すなわち、低温液化ガスは、低背圧で送液が可能であり、超低温 HPLC の移動相として相応しい特性を有していることが確認された。

次いで、HPLC 分離において重要な因子である流速制御について検討を行った。Fig.1 に示した装置では、入口圧と出口圧の差圧 ( $\Delta P$ ) で流速制御を行う。 $\Delta P$  と流速の関係を調べたところ、十分な直線性が得られた。すなわち、カラム入口圧を一定とし、カラム出口圧を制御することで圧力差に比例した線流速を得ることが可能であるということが確認できた。

#### 4.2 分離挙動に関する基礎検討

液化ガスを移動相として用いる低温 HPLC のプロトタイプ構築に成功したため、本装置を用いて、低温 HPLC の基本的な分離挙動について検討を行った。

HPLC で汎用される ODS カラム (C18 カラム) を用いてアルキルベンゼン類 (エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ブチルベンゼン、

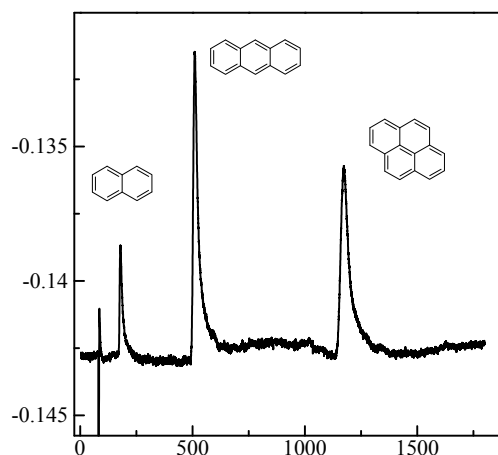


Fig. 2 Typical separation of PAHs with liquid  $\text{CO}_2$  as mobile phase at  $-15^{\circ}\text{C}$

ペンチルベンゼン) と多環芳香族炭化水素 (PAHs, ナフタレン、アントラセン、ピレン) をプローブ試料とし、その分離特性の評価を行った。Fig.2 に示す様に、液化炭酸ガスを移動相に用いる低温 HPLC おいて PAHs は問題なく分離することができた。また、アルキルベンゼン類も、多環芳香族炭化水素類と同様に液化二酸化炭素を移動相とする HPLC で分離を行うことができた。

保持挙動を確認するため、アルキルベンゼン類はアルキル鎖の炭素数を、多環系芳香族炭化水素は二重結合数をそれぞれ保持比の対数に対してプロットしたところ、それぞれ直線関係が得られた。このことから ODS カラムと移動相に液化二酸化炭素を用いた場合には逆相 HPLC として分離が行われていることが確認された。

一方、カラムに未修飾シリカゲルカラムを用いてキノン類 (ベンゾキノ、ナフトキノ、アントラキノ) の分離を行ったところ、アントラキノ、ナフトキノ、ベンゾキノの順に溶出した。すなわちこの系では順相条件で分離が行われることがわかった。

ODS の場合についてさらに詳しく分離挙動を調べるために  $-35^{\circ}\text{C}$  ~  $-5^{\circ}\text{C}$  の範囲で温度を変化させ測定を行った。温度の逆数に対して保持比の対数をプロットする van 't Hoff プロットを作成した。その結果を Fig. 3 に示す。

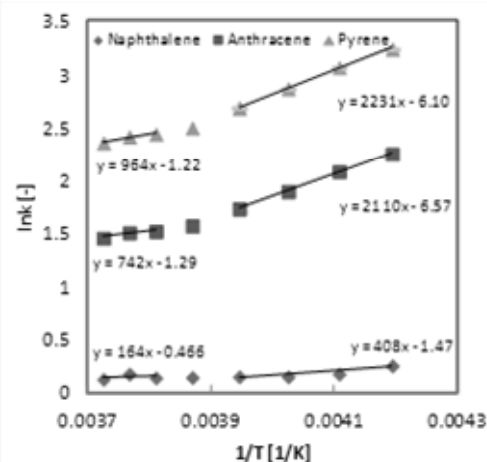


Fig. 3 Effect of temperature ( $1/T$ ) on retention factors of PAHs ( $\ln k$ )

Fig. 3 より温度低下に伴い保持比が増加していくことがわかった。これは一般的な HPLC でも観測される通常分離挙動である。しかし、興味深いことに通常は  $\ln k$  と  $1/T$  の関係は直線関係であるが、Fig. 3 に示す様に、 $-15^{\circ}\text{C}$  付近 ( $1/T = 0.038$ ) で直線性が失われることが明らかになった。この非線形性は、 $-15^{\circ}\text{C}$  付近で分離挙動の変化が起きていることを示している。クロマトグラフィーでは固定相の状態が変化した際に、Fig. 3 に示すような挙動が観測されることが知られている。従って、低温条件下である  $-15^{\circ}\text{C}$  において、固定相の状態変化 (相転移) が起きているこ

とが示唆された。

クロマトグラフィー分離においては、温度は保持だけではなく分離性能にも影響を与えることが知られている。従って、温度が液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC の分離性能に対して与える影響について調査を行った。

PAHs を試料として、種々の温度において、分離性能の指標である理論段数を算出して、評価を行った。得られた結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 では、温度が低下することにより、全ての試料成分の分離性能が増加していることが示されている。通常の HPLC では、温度が低下すると、移動相-固定相間での試料成分の物質移動速度が低下するため、分離性能が低下することが知られている。事実、ODS カラムを用いて、移動相としてメタノールを用いた場合、温度低下に伴い理論段数が低下することが報告されている (T. Kimura et al, *Chromatographia* (2013) 76 921-927)。すなわち、Fig. 4 に示されている、温度を下げることに伴い、逆に分離性能は向上するという現象は、移動相として液化二酸化炭素を用いた場合に観測される特異的な現象である可能性がある。また、Fig. 4 を詳細に観測すると、-15℃以下で急激に理論段数の向上が見られることがわかる。

Fig. 3 に示すように、-15℃付近では、固定相の状態変化が生じている可能性が高い。Fig. 4 に示された特異的な理論段数の向上は、相転移現象と関連している可能性がある。詳細については現在検討中であるが、温度低下により分離性能が向上するという現象は、通常のクロマトグラフィー分離の理論からはずれた挙動であるものの、超低温 HPLC の開発において有利な挙動であると言える。

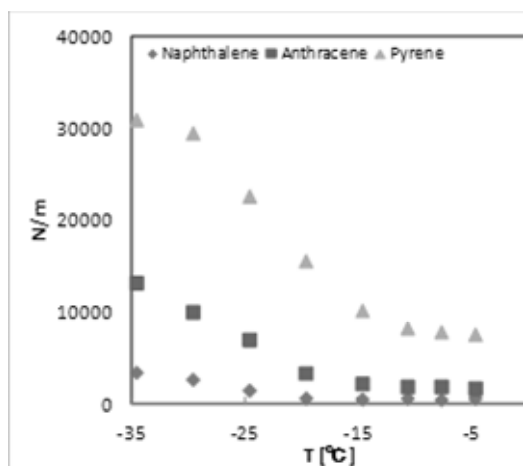


Fig. 4 Effect of temperature (T) on separation efficiencies for PAHs

#### 4.3 不安定化学種・より低温での HPLC 分離への試み

低温条件下での不安定化学種の試みとして、電気化学反応によりオンラインで生成させたキノラジカルの分析を試みた。

Fig. 1 に示す実験装置の試料注入部にキノラジカルを発生させるための電気化学ユニットを組み込み実験を行った。予備実験として、常温条件下でアセトニトリル中のキノンを酸化させたところ、赤色のキノラジカルが生成していることを確認することができた。同様の方法により、オンライン生成させたキノラジカルの分析を行ったところ、電気化学反応に併せてクロマトグラムの変化を確認することができた。しかしながら、その結果は不安定であり、十分な再現性が得られたとは言えない。ラジカル種の安定的な測定を行うためには、分離カラムの最適化やより低温条件の利用など、更なる条件検討が必要であることが明らかになった。

また、本提案の装置は最終的には-100℃以下での HPLC 分離を行うことを目的としている。今回用いた液化二酸化炭素は、-40℃程度以下で凝固するため、移動相として用いることが困難になる。そこで、より低温下での分離を目指して、新たな移動相について検討を行った。

温度条件として、液体窒素温度(-196℃)を選択し、この条件下で送液可能である液化ガスについて検討を行った。種々の気体について検討を行ったところ、窒素/メタン混合気体の液体窒素温度での液化・送液に成功した。実際に分離に適用した際の安定性など、種々検討する必要があるが、窒素/メタン混合液化ガスは、混合比により溶出挙動をコントロールすることができる可能性が高く、これまでにない低温下での HPLC 分離を実現するための移動相として有望であると考えられる。

以上、超低温 HPLC による不安定化学種の網羅的分析を実現するため、分析装置のプロトタイプの開発、液化ガスを移動相として用いた際の分離挙動の解明、液体窒素温度領域での分離を実現するための基礎検討を行い、一定の成果を得ることに成功した。今後は、実際に超低温下での不安定化学種の分析を目指して研究を進めていく予定である。

#### 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0件)

[学会発表](計8件)

不安定化学種分析のための低温液化ガスを移動相に用いる HPLC 装置構築の基礎検討、本野智大、北川慎也、大谷 肇、「分析中部・ゆめ 21」若手交流会 第 12 回高山フォーラム (2012.11.16-17, 高山) 不安定化学種分析を指向した低温液化ガスを移動相に用いる低温クロマトグラフィーの開発、北川慎也、本野智大、大谷 肇、第 73 回分析化学討論会 (2013.5.18-19, 函館)

Development of ultra-low-temperature HPLC using liquid gas as a mobile phase for analysis of unstable chemical species, S. Kitagawa, T. Motono, H. Ohtani, ASIANALYSIS XII (2013.8.22-24, Hakata)

液化二酸化炭素を移動相に用いる低温 HPLC の開発とその不安定化学種分析への適用, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇, 第 32 回分析化学中部夏期セミナー (2013.8.30-31, 羽咋)

Development of low-temperature HPLC for unstable chemical species using liquid carbon dioxide as a mobile phase, T. Motono, S. Kitagawa, H. Ohtani, RSC Tokyo International Conference 2013 (2013.9.5-6, Chiba)

液化ガスを移動相に用いる低温液体クロマトグラフィーの開発とその不安定化学種分析への適用, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇, 日本分析化学会第 62 年会 (2013.9.10-12, 東大阪)

液化二酸化炭素を移動相として用いる低温液体クロマトグラフィーの開発, 北川慎也, 本野智大, 大谷 肇, 第 24 回クロマトグラフィー科学会議 (2013.11.11-13, 東京)

液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC の分離挙動に関する基礎検討, 本野智大, 北川慎也, 大谷 肇, 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム (2014.6.4-6, 名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 慎也 (KITAGAWA, Shinya)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50335080

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

大谷 肇 (OHTANI, Hajime)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：50176921