

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750089

研究課題名(和文) 高速液体クロマトグラフィーのためのキャリブレーションフリーな検出法の開発

研究課題名(英文) The calibration free detector for high performance liquid ography

研究代表者

大平 慎一 (Ohira, Shin-Ichi)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：60547826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：様々な分野で広く用いられている高速液体クロマトグラフィーのための、キャリブレーションフリーな検出法を開発した。有機化合物をすべて酸化して二酸化炭素と変換し、捕集・濃縮した後、電荷検出器により定量する手法を検討した。モデル化合物の定量的な酸化を実現し、電荷検出器において得られるシグナルと理論値が一致する条件を見つけた上、高い検出感度を得ることができた。

さらに、有機溶媒フリーな分離のため、インラインで緩衝溶液を調製する手法について検討した。電気透析法による共役酸塩基対の導入により、任意のpHや濃度で緩衝溶液を調製することが可能となった。さらに、フィードバック制御により、高い精度が得られた。

研究成果の概要(英文)：The calibration free detector for high performance liquid chromatography has been studied. The procedure for the detection, oxidation, collection and detection has been optimized. The quantitative oxidation was achieved. Furthermore, the results of developed detector was well agreed with the theoretical values.

The eluent with no organic solvent was also studied. The pH gradient method was selected for the purpose. The pH gradient was achieved by electro dialytic pH generator. The generator was well optimized with feed back control.

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：キャリブレーションフリー クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

最近、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) において固定相樹脂の粒径を小さくして、溶離液の流量を大きくすることで、分離分析の迅速化、高度化が進んでいる。また、高分解能な質量分析計による精密な質量電荷比の検出との組み合わせにより未知物質の定性分析も実現されている。一方で、定量分析においては従来の紫外線吸収法や示差屈折法に加え、タンデム型質量分析計 (MS/MS) のように質量電荷比による分離とアルゴンビームによる壊変を組み合わせた選択性の高い方法やコロナ荷電化粒子検出器 (CoronaCAD) のようにあらゆる物質に対して高感度な検出法が用いられるようになってきた。しかし、いずれの検出器でも定量のためには、測定対象物質の標準溶液によるキャリブレーションが不可欠である。そのため、標準物質の純度や安定性が測定精度に大きく影響する上、新規な物質では、標準物質の入手そのものが不可能な場合もある。ガスクロマトグラフィーにおける水素炎イオン化検出器 (FID) は、構造の似た化合物では炭素数に応じた応答を示す。そのため、質量分析計と並列に接続した GC-MS/FID により1つの有機化合物によるキャリブレーションで多成分を同時に定性・定量する手法がある。この FID を液体クロマトグラフィーの検出器とした報告もあるが、溶離液を気化する必要があるため、物質の気化効率により GC-FID のときのような利点が得にくく、再現性にも問題がある。このように、多くの成分を同時に定量できるクロマトグラフィーにおいてキャリブレーションのプロセスは、律速段階である。

2. 研究の目的

本研究では、カラムから溶出してきた測定対象である有機化合物の二酸化炭素への変換およびガス成分の定量的な捕集、イオンの電荷量による絶対量検出により高速液体クロマトグラフィーのためのキャリブレーションフリーな検出法の開発を目的とした。また、合わせて溶離液に有機化合物が含まれていると今回開発する手法において不都合であるため、溶離液の pH グラジエントを緩衝溶液のインラインジェネレータにより生成する手法について検討した。

3. 研究の方法

溶離液中有機化合物の高効率酸化法の検討

本研究では、カラムから溶出してきた有機化合物を酸化して CO_2 とし、この CO_2 を定量的に捕集し、キャリブレーションフリーな電荷検出器によって検出することで、試料中の有機化合物を測定する手法を検討した。そのためのフロー図を図1に示す。

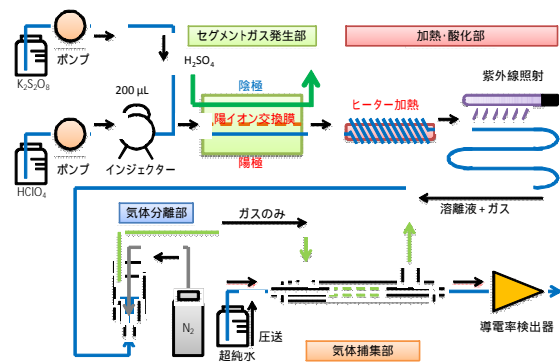


図1 酸化 気化 捕集 検出システム

本研究では、各部の最適化を行った。また、酸化部の前に電解によるガス発生部を設けることで、溶液の流れの中に酸素ガスセグメントを生成することで、ピークの広がりを抑制した。酸化部については、紫外線酸化法と湿式酸化法、気体分離部には、膜透過法やシリンドリカルバブラー法、捕集部には、気液直接接触型、アニュラー型や平面型のガス拡散スクラバーを比較検討した。また、検出部については、電荷検出器や捕集の必要が無い新規な CO_2 ガスセンサーについても検討した。

電荷検出器

溶存イオンをその電荷に応じた電流シグナルによって絶対分析可能な電荷検出器を以下のように平面膜型で構成し、電流や流量について最適化した。

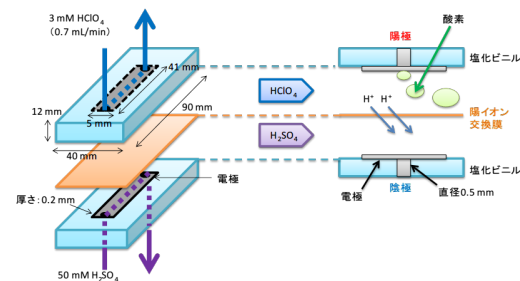


図2 平面膜型電荷検出器

インライン緩衝溶液ジェネレータ

本法では、有機溶媒を含む溶離液を使用できないため、有機溶媒フリーでも分離能を向上できるインライン緩衝溶液ジェネレータを開発した。電気透析法により、緩衝溶液を構成する共役酸塩基を純水に電流量に応じて添加していくことで、任意の pH・濃度の緩衝溶液をインラインで生成した。生成デバイスの構造を図3に示す。5つの液層に3つの電極を配し、陽極とグラウンド間の電圧や電流値によって導入する KOH の量を、グラウンドと陰極間の電圧や電流値によって導入するリン酸量を制御できる。また、生成する緩衝溶液と電極が直接触れないため、水の電解で生じるガスが生成溶液に混入しない構造となっている。また、生成した溶液の pH をより厳密に制御するため、PID によるフィード

バック制御を行った。

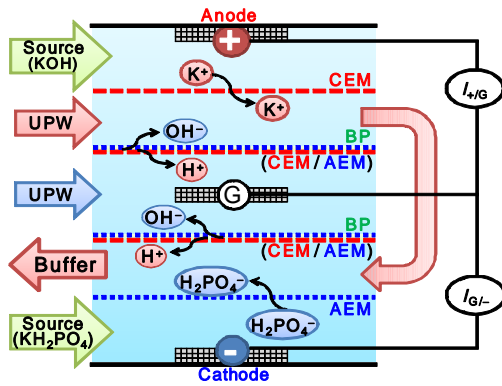
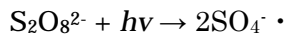


図3 インライン緩衝溶液ジェネレータ

4. 研究成果

溶離液中有機化合物の高効率酸化法検討種々の酸化法を検討した結果、酸化法としてペロキシ二硫酸と紫外線照射を組み合わせた方法が最も効率的で有り、モデル化合物として用いたフタル酸水素カリウムを定量的に酸化分解可能であることがわかった。この反応は、以下の反応式に基づく。



生成した二酸化炭素を効率的に気相へ追い出すデバイスについては、以下の図に示すようなシリンドリカルな構造が最も適していた。

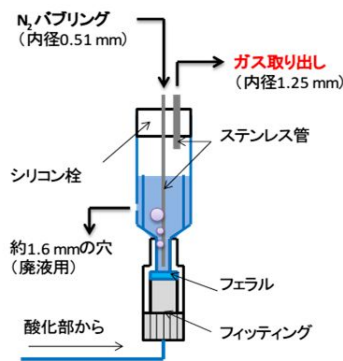


図4 シリンドリカル気液セパレータ

これらの最適化された条件下で、直鎖カルボン酸に対する応答をフローインジェクション法で得ると、図5のようになった。

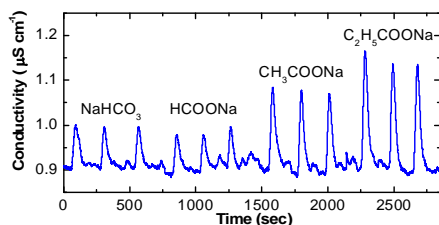


図5 FIAによる応答特性

基準として加えた炭酸イオンと、炭素数1~3の化合物において、炭素数に応じた応答が得られている。

電荷検出器の特性

図5は、アニュラー型ガス拡散型スクラバーによってアルカリ溶液中に捕集し導電率検出器で検出したものであった。本研究課題では、電荷検出器による絶対分析を目指している。そこで、電荷検出器の膜材料、デバイス構造について最適化し、炭酸イオンに対する応答特性を評価した。(図6)

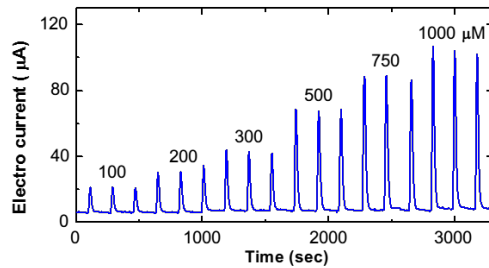


図6 電荷検出器の応答特性

本研究で目的としている炭酸イオンについて、印加電圧などの条件を最適化したところ、~600 µMの範囲でクーロン量と実測値が一致を示したことから、絶対分析が可能であることが示唆された。また、検出限界も0.1 µMと高い感度を示した。現在、ガス捕集部についてさらなる検討を進めている。

一方、捕集部と検出部を一体化できるCO₂ガスセンサーに関する検討も合わせて進めている。

インライン緩衝溶液ジェネレータ

図3に示す緩衝溶液ジェネレータでは、原料溶液として、KOHやKH₂PO₄溶液を用いることで、リン酸緩衝溶液を調整することができた。pKaが広範囲にわたっているリン酸では、広いpH範囲にわたる緩衝溶液を調整できるメリットがある。以下に詳細をまとめる。

本法では、陽極/グラウンド間、グラウンド/陰極間にかかる電流によって導入するイオンの量を制御できる。実際に印加電流と得られた電流の関係を調べたところ、KOHについては、印加電流からもとめられる理論値通りの生成量が見られた。一方、リン酸イオンの導入量は、理論値よりも低かった。しかし、印加電流に応じて、導入されるリン酸イオンの量が、リニアに変化したため、本法では、この条件で緩衝溶液生成のテストを実施した。その結果を図7に示す。図7左では、グラウンド/陰極間の電流値を一定に保ち、陽極/グラウンド間の電流値を変化させたときのpH変化を示している。陽極/グラウンド間の電流値を大きくしていくと、導入されるKOHの量が増加するため、得られる溶液のpHは大きくなっている。このとき、解離定数間では、pHの値が急激に増加するpHジャンプが見られている。一方、導入されたK⁺やリン酸イオンの濃度をイオンクロマトグラフで測定したところ、K⁺イオンについては、陽極/グラウンド間の電流値に比例して増加した。

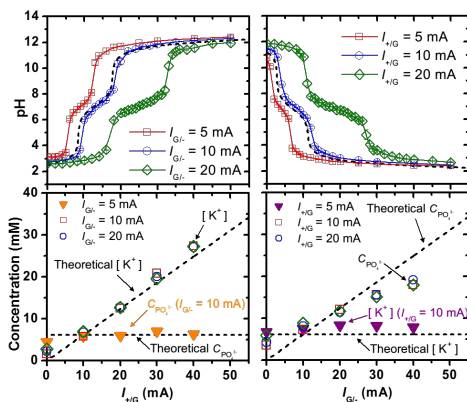


図7 印加電流と溶液 pH の関係

一方、グラウンド/陰極間の電流は、一定に保っていたため、リン酸濃度は一定であった。次に、陽極/グラウンド間の電流値を一定に保ち、グラウンド/陰極間の電流値を大きくしていったところ、pH は電流値の増加に伴って減少した。これは、導入するリン酸イオンの濃度が増加していったためである。このように、いずれの場合でも、印加電流値によって、pH および導入されるイオンの量が変化したことから、任意の pH や濃度の緩衝溶液をインラインで調整できることがわかった。

そこで、任意の pH の緩衝溶液を得るべく、電流値による pH の調整を試みたが、一定の pH を得るために定電流を印加しても長時間安定した値を得ることはできなかった。特に、先ほど、pH ジャンプが見られた pH 域では、わずかな電流値の変化が大きな pH の変化を生むため、厳密な制御は不可能であった。そこで、得られた溶液の pH 値を KOH の導入量、すなわち、陽極/グラウンド間の印加電流値にフィードバックする手法を検討した。応答の遅い pH シグナルによる PID 制御には、困難を要したが、pH 電極の応答速度の向上および PID 値の調整によって、高い精度で pH を制御することが可能であった。

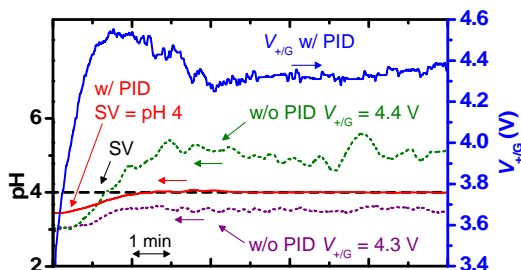


図8 フィードバックによる pH の制御

図8 に生成溶液の pH を 4.00 に調整した際の pH 応答と PID 制御に係る制御信号の推移を示している。設定値を pH 4.00 に上げた際に、PID の制御信号はいったん大きくなり、pH 値が設定値に近づくと小さくなっていき、以後、わずかに印加電圧を変えながら pH 値を一定値に保っていることがわかる。このフィードバック制御によって、得られる pH 溶液の精度は、pH 4.00 において、 $\text{pH } 4.006 \pm 0.017$ で

あった。他の pH における応答も同様に高い精度を誇っている。図9に、pH を段階的に設定したときの溶液の pH 変化を示している。pH 4 ~ 7 は、リン酸の酸解離定数の間の値であり、わずかな印加電流の変化によって大きな pH 変化を生じる領域であった。しかしながら、フィードバック制御によって設定通りの値を精度良く得ることに成功した。

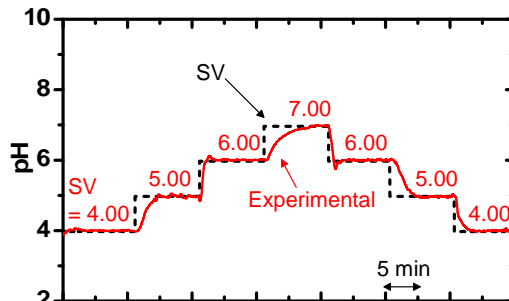


図9 pH のステップ応答

さらに、現在は、本法によりリニアな pH グラジエントを形成し、クロマトグラフィーの溶離液として利用することを検討している。

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 2 件)

大平慎一, 森秀太, 戸田敬

“フィードバック電気透析による溶離液 pH の自在制御”

第 74 回分析化学討論会, G2003, 日本大学工学部, 福島, 2014 年 5 月 25 日.

森秀太, 大平慎一, 戸田敬

“フィードバック制御によるインライン pH 緩衝溶液の生成とグラジエント分析への応用”

第 30 回イオンクロマトグラフィー講演会, 豊田中央研究所, 2013 年 11 月 28 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 溶液イオン濃度の調整装置および溶液イオン濃度の調整方法、並びに pH 緩衝液の製造方法

発明者: 大平慎一・戸田敬

権利者: 国立大学法人 熊本大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-110351

出願年月日: 2014 年 5 月 28 日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大平 慎一 (Ohira, Shin-Ichi)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：60547826