

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288062

研究課題名(和文) ナノバブルをプラットフォームとするハイブリッド分離システムの開発

研究課題名(英文) Development of the hybrid separation system containing nano-bubbles as key components

研究代表者

渋川 雅美 (SHIBUKAWA, Masami)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60148088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：疎水性ナノ細孔が水溶液中でナノバブルを安定に保持できることを利用して、気相空間を含む複数の分離場を組み込んだハイブリッド固定相をもつHPLCを開発し、表面気泡変調液体クロマトグラフィー(SBMLC)と名づけた。細孔内への気相の導入により、固定相として機能する水/疎水性材料界面と疎水性材料自身とが分割される。ナノバブルはその体積を圧力によって変えることができるので、水/疎水性材料界面の面積を圧力によって制御することができ、分離選択性を変換することができる。さらにSBMLCにより、これまでに成し得なかった逆相系分離における疎水性材料自身と水/疎水性材料界面の寄与の定量的評価を初めて達成した。

研究成果の概要(英文)：A new chromatographic method termed surface-bubble-modulated liquid chromatography, that has a hybrid separation medium incorporated with surface nanobubbles, was developed. Nanobubbles can be fixed at the interface between water and a hydrophobic material by delivering water into a dry column packed with a nanoporous material. The incorporation of a gas phase leads to the formation of the hybrid separation system consisting of the gas phase, hydrophobic moieties, and the water/hydrophobic interface or the interfacial water. One can change the volume of the gas phase by pressure applied to the column, which in turn alters the area of water/hydrophobic interface, while the amount of the hydrophobic moiety remains constant. Therefore this strategy provides a novel technique not only for manipulating the separation selectivity by pressure but also for elucidating the mechanism of accumulation or retention of solute compounds in aqueous solutions by a hydrophobic material.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノバブル 疎水性ナノ細孔 界面水 ハイブリッド固定相 HPLC 表面気泡変調液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルから数百ナノメートルオーダーの微小空間内に取り込まれた水がバルク水とは異なる物性を示す現象が近年観測されるようになり、多くの研究者の興味を惹いている。しかし、水の置かれる空間と分離機能との関係に着目した研究は少ない。研究代表者は、種々の多孔質粒子内に取り込まれた水が溶質に対してバルク水とは異なる親和性を示すこと、すなわち特異的な分離機能を持つことを明らかにしてきた。Davankovらは4 nmの細孔径を持つポリスチレン樹脂を合成し、これをカラム充填剤として水を移動相とする液体クロマトグラフィーにより種々の無機イオンの高度な分離と濃縮ができることを示した。彼らはこの現象を水和イオン半径の差によるサイズ排除効果に基づくものとして説明したが、研究代表者は、この興味深い分離は疎水性ナノ空間水がバルク水とは異なる構造を持つことに基因すること、すなわち疎水性ナノ細孔水そのものが分離媒体として機能するためであることを明らかにした。

この研究過程で研究代表者は、疎水性ナノ空間において水が気体に相変化し、これが高圧下でも安定に存在することを見出した。またこの現象を利用して、気体を固定相とする新たな液体クロマトグラフィーの創出が可能であることを示した。さらにこの結果は、ナノバブルの生成により、疎水性材料自身と固液界面に加えて、気相が新たな独立の分離場を構成する要素として加わることで、さらにナノバブルの大きさは圧力を用いて自在に変えることができるので、各分離場の大きさをこれによって変えることができ、分離選択性の制御が容易な分離システムを生み出せることを示している。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、ナノバブルを固定相の構成要素として介在させることにより、複数のそれぞれ異なる分離選択性を有する分離場で構成されるハイブリッド固定相をもつ液体クロマトグラフィー(表面気泡変調液体クロマトグラフィー, SBMLC)を構築して、界面水ならびにハイブリッド固定相の構造を圧力と温度によって制御する新規分離選択性を発現する環境適合型分離分析システムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

HPLC装置は、島津製 LC-30AD ポンプ, SIL-30AC オートサンプラー, SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器およびRID-10A 示差屈折率検出器で構成した。カラムは島津製 CTO-30A カラムオープンで温度制御した。カラム充填剤としては、C18 結合型シリカゲルを用いた。カラムをジクロロメタンで満たし、ついでカラムの両端を開放して60 に設定したガスクロマトグラフィー用オーブ

ン内で加熱乾燥し、質量測定により有機溶媒が完全に除去されたことを確認した後、純水を通液して気相を多孔質充填剤内部に固定化した。生成する気相体積は、水で満たしたときのカラム内の水の体積とナノバブル生成後の水の体積を、重水をマーカーとして測定することによって間接的に求めた。

安定なナノバブルの生成が確認された疎水性多孔質充填剤について、所定の温度でカラム内気相体積及び液相水相体積と圧力の関係を調べるとともに、種々の化合物の保持体積の界面水相体積依存性を検討した。バルク水相体積は研究代表者が創案した溶離電解質効果法により、NaCl と NaClO₄ を溶離電解質、および Br⁻, NO₃⁻, I⁻, SCN⁻ をプローブイオンとして測定し、カラム内全水相体積からバルク水相体積を差し引いて界面水相体積を求めた。

4. 研究成果

(1) 疎水性多孔質粒子細孔内への気相(ナノバブル)の固定化

前項で述べた方法により気相を固定化した3種類のC18結合型シリカカラムについて重水の保持体積より測定したカラム内の液相水相体積 V_{D_2O} を Table 1 に示す。 V_{D_2O} 値はカラムおよび温度に依存せず、ほぼ等しい値となっている。ここで使用したカラムのサイズはすべて等しく、また充填剤の充填密度も近似的に等しいと考えられるので、この結果は充填したC18シリカ粒子内の細孔は完全に気相で満たされていることを示している。

Table 1. V_{D_2O} values obtained for C₁₈ bonded silica columns.^a

column	Temp./°C	V_{D_2O} /mL
L-column2 ODS	25	1.013
	40	1.009
	60	1.024
Capcell Pak C18 UG120	60	0.985
Capcell Pak C18 UG80	60	1.015

^acolumn size: 150 × 4.6 mm

(2) ハイブリッド固定相を構成する気相と界面水相の体積の測定

C18 結合型シリカを充填した SBMLC カラム内のハイブリッド固定相の模式図を Fig. 1 に示す。ハイブリッド固定相を構成するアルキル結合層、疎水界面水、および気相は独立に溶質を保持するので、その保持体積 V_R^S は次式で与えられる。

$$V_R^S = V_{BW}^S + D_G V_G + D_{C18} V_{C18} + D_{IW(G)} V_{IW(G)} + D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^S \quad (1)$$

ここで V_{BW}^S , V_G , V_{C18} , $V_{IW(G)}$, $V_{IW(C18)}^S$ は、それぞれバルク水、気相、アルキル結合層、気液界面水および水/アルキル結合層間の

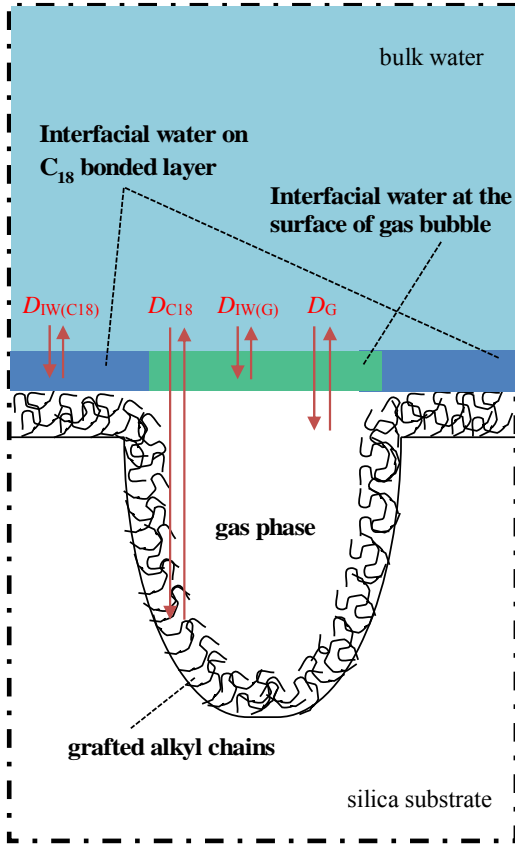


Fig. 1. Schematic illustration of the hybrid separation medium in SBMLC column with porous alkyl bonded silica.

疎水界面水の体積, D_G , D_{C18} , $D_{IW(G)}$, $D_{IW(C18)}$ はそれぞれバルク水相と気相, アルキル結合層, 気液界面水, 疎水界面水との間の分配係数である。式(1)は SBMLC における溶質の保持体積は, バルク水相と各固定相との間の分配係数だけでなく, 各相の体積に依存して変化することを示している。

バルク水相は無機イオンをプローブとして, 以下の式により求めることができる。

$$V_{BW} = \frac{V_A^{YX} V_B^{WZ} - V_A^{WZ} V_B^{YX}}{V_A^{YX} + V_B^{WZ} - V_A^{WZ} - V_B^{YX}} \quad (2)$$

ここで, V_i^{jk} は電解質 jk の水溶液を移動相として測定したときのイオン i の保持体積である。

疎水界面水体積は非揮発性の親水性化合物の保持体積から以下のようにして求めた。SBMLC における非揮発性親水性化合物の保持体積 $V_{R,NV}^S$ は次式で与えられる。

$$V_{R,NV}^S = V_{BW}^S + D_{IW(G)} V_{IW(G)} + D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^S \quad (3)$$

一方, 水で満たされたカラムを用いる RPLC では, その保持体積 $V_{R,NV}^R$ はアルキル結合層への分配が無視できるので以下のように表される。

$$V_{R,NV}^R = V_{BW}^R + D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^R \quad (4)$$

したがって $D_{IW(C18)}$ は次式により求めることができる。

$$D_{IW(C18)} = \frac{V_{R,NV}^R - V_{BW}^R}{V_{IW(C18)}^R} = \frac{V_{R,NV}^R - V_{BW}^R}{V_0 - V_{BW}^R} \quad (5)$$

ここで, V_0 はカラム内の全空隙体積である。SBMLC カラム内での気液界面水体積は無視できるほど小さいと考えられるので, 疎水界面水体積は次式により求めることができる。

$$V_{IW(C18)}^S = \frac{V_{R,NV}^S - V_{BW}^S}{D_{IW(C18)}} \quad (6)$$

L-column ODS2 の RPLC および SBMLC カラムについて得られたバルク水, 疎水界面水, 気相の体積をアルキル結合層体積とともに Table 2 に示す。アルキル結合層体積は, 結合層の密度がオクタデカンの密度と等しいと仮定し, 充填剤の炭素含有量から算出した。Table 2 から, 充填剤細孔内に気相が生成すると, 疎水界面水体積が著しく減少することがわかる。

Table 2. Bulk water volume, interfacial liquid water volume, gas phase volume, and C₁₈ bonded layer volume (mL) determined for an L-column2 ODS column filled with liquid water (RPLC) and the column containing fixed bubbles (SBMLC) at 25 °C.

column	V_{BW}	$V_{IW(C18)}$	V_G	V_{C18}
RPLC	1.40 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0	
SBMLC	0.994 ± 0.001	0.0016 ± 0.0007	0.698 ± 0.001	0.368

(3) 溶質保持における気相, 疎水界面水, アルキル結合層の寄与の評価

水で満たされた RPLC カラムにおける溶質の保持体積は次式で与えられる。

$$V_R^R = V_{BW}^R + D_{C18} V_{C18} + D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^R \quad (7)$$

したがって, 式(1)と(7)から次式が得られる。ここで気液界面水体積 $V_{IW(G)}$ は前述したように無視できると仮定した。

$$D_{IW(C18)} = \frac{(V_R^R - V_{BW}^R) + (V_{BW}^R - V_{BW}^S) + D_G V_G}{V_{IW(C18)}^R - V_{IW(C18)}^S} \quad (8)$$

式(8)を用いてバルク水 / 疎水界面水間の分配係数 $D_{IW(C18)}$ を求めることができる。 D_G は次式によって見積った。

$$D_G = \frac{k_H}{RT} \quad (9)$$

ここで, k_H , R , T はそれぞれヘンリー定数, 気体定数, 絶対温度である。したがって, バルク水 / アルキル結合層間の分配係数 D_{C18} を決定することができる。

$$D_{C18} = \frac{V_R^S - V_{BW}^S - D_G V_G - D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^S}{V_{C18}} \quad (10)$$

得られた D_G , D_{C18} , $D_{IW(C18)}$ の値を Table 3 に示す。また, 得られた分配係数値の妥当性を検証するために, D_{C18} 値と疎水性パラメータである 1-オクタノール / 水間の分配係数 P_{OW} とを比較した。Fig. 2 にその結果を示す。アルコールを除いて両者はよく一致していることがわかる。1-オクタノール相には水がモル分率で 0.275 溶解していることが知られて

いる。これに対してアルキル結合層には水は分配しない。その結果、アルコールについての D_{C18} と P_{OW} に大きな差が生じたと推測される。それ以外の化合物では D_{C18} 値と P_{OW} 値がよく一致していることから、SBMLC により得られた D_{C18} および $D_{IW(C18)}$ 値は妥当であると考えられる。Table 3 から、気相は溶質の保持にはほとんど寄与していないのに対して、疎水界面の寄与は非常に大きいことがわかる。一方、アルキル結合層は親水性官能基を持たない疎水性化合物に対して大きな保持を示す。このように、本研究により、疎水性物質自身とその水との界面の溶質保持への寄与を定量的に初めて評価することに成功した。

Table 3. D_G , D_{C18} , and $D_{IW(C18)}$ values of organic compounds obtained for an L-column2 ODS column at 25 °C.

compound	D_G	D_{C18}	$D_{IW(C18)}$
methanol	0.000018	0.076 ± 0.006	2.8 ± 0.2
ethanol	0.000022	0.16 ± 0.01	7.9 ± 0.5
1-propanol	0.000031	0.46 ± 0.05	29 ± 2
1-butanol	0.000031	1.6 ± 0.2	122 ± 8
benzyl alcohol	0.0000045	1.8 ± 0.5	307 ± 22
acetonitrile	0.00083	0.92 ± 0.01	6.3 ± 0.4
propionitrile	0.0015	2.37 ± 0.04	24 ± 2
acetone	0.0016	1.04 ± 0.03	21 ± 1
2-butanone	0.0023	3.1 ± 0.1	79 ± 5
nitromethane	0.00090	1.23 ± 0.01	6.2 ± 0.4
nitroethane	0.0019	3.63 ± 0.04	24 ± 2
1-nitropropane	0.0034	9.9 ± 0.1	95 ± 6
diethyl ether	0.037	17.1 ± 0.3	193 ± 13
dichloromethane	0.093	28.27 ± 0.07	31 ± 2
chloroform	0.18	93.3 ± 0.2	112 ± 8
bromoethane	0.31	80.7 ± 0.2	75 ± 5
methyl acetate	0.0037	2.94 ± 0.07	42 ± 3
isopropyl acetate	0.011	23 ± 1	610 ± 44

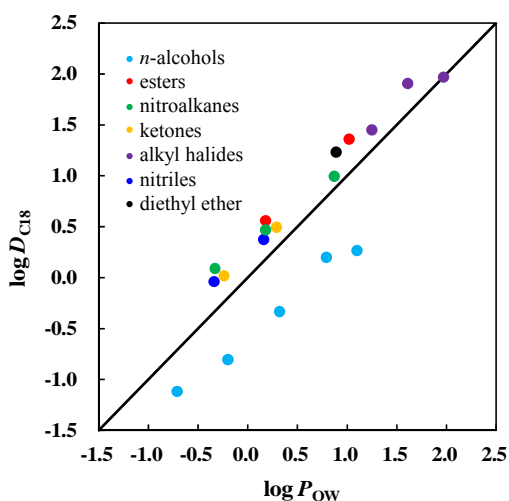


Fig. 2. Values of $\log D_{C18}$ plotted against $\log P_{OW}$.

(4) 圧力による分離選択性の制御

半径 r の円柱形細孔を持つ材料が、濡れない液体を細孔内から押し出す圧力 p は、以下の Washburn の式で与えられる。

$$p = - \frac{2\gamma \cos\theta}{r} \quad (11)$$

ここで γ は界面張力、 θ は接触角である。C18 結合型シリカ充填剤の基材である多孔質シリカは細孔サイズが均一ではなく分布を持っているので、充填剤細孔内の気相体積は圧力によって連続的に変えることができる。

Fig. 3 はカラム内の全液相水体积と気相体積の圧力依存性を示したものである。ここで、カラムに加わる圧力は、カラムと検出器の間に内径 0.1 mm のステンレスチューブを設置し、その長さを変えることによって調整した。Fig. 3 からわかるように、圧力の増大とともに水が細孔内に浸入し、その結果気相体積が減少する。ここで使用した C18 結合型シリカ充填剤の平均細孔径、水のパラフィン上での接触角、および水の界面張力から式(11)により推定した細孔圧 p は 15 MPa であり、Fig. 3 の結果とよく一致している。

水が細孔内に浸入すると、それに伴って疎水界面水量が増大する。Table 3 に示したように、疎水界面水とアルキル結合層は異なる溶質分離選択性を示すので、SBMLC における分離選択性は圧力によって大きく変化すると考えられる。Fig. 4 に種々の有機化合物の混合物についてのクロマトグラムの圧力依存性を示す。圧力の増大に伴って、ベンジルアルコールや酢酸イソプロピルなどの親水性官能基を持つ化合物の保持は著しく大きくなるのに対して、プロモエタンやクロロホルムなどの保持はさほど大きく変化していないことがわかる。その結果、溶出順に大きな変化が生じている。この結果は、SBMLC が圧力を変えるだけで劇的に分離選択性を変換できる優れた特長を持つ分離分析法であることを示している。

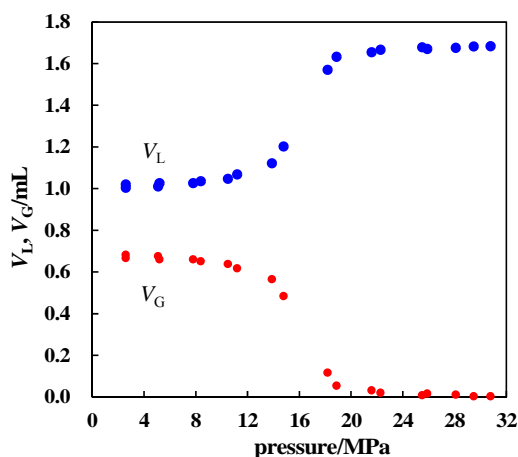


Fig. 3. Dependence of the liquid water volume and the gas phase volume in an SBMLC column on pressure. Column: L-column2 ODS, Temperature: 40 °C.

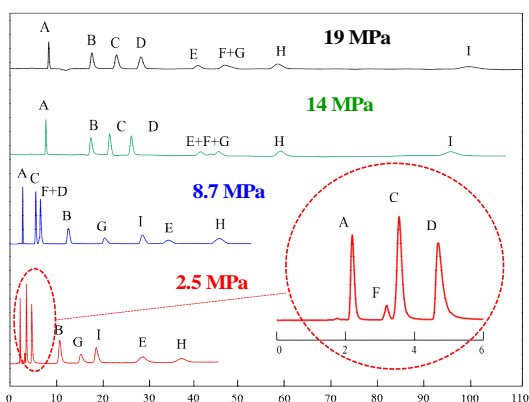


Fig. 4. Variation of the chromatograms of organic compounds obtained by SBMLC with pressure. Column: Capcell Pak C18 UG120, Column temp: 60 °C, Mobile phase: pure water, Flow rate: 0.6 mL min⁻¹, Detector: differential refractive index detector, Compound; A: 1,4-dioxane, B: dichloromethane, C: 1-nitropropane, D: 1-butanol, E: bromoethane, F: benzyl alcohol, G: diethylether, H: chloroform, I: isopropyl acetate.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

M. Shibukawa, K. Koyahara, A. Mishina, K. Saitoh, A. Nishigaki, Determination of trace amounts of aluminum in environmental and biological fluids by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection using 5-sulfoquinoline-8-ol, *Curr. Chromatogr.*, in press, 査読有.

K. Nakamura, H. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa, Surface-bubble-modulated liquid chromatography: a new approach for manipulation of chromatographic retention and investigation of solute distribution at water/hydrophobic interfaces, *Anal. Chem.*, **87**, 1180-1187 (2015), 査読有.

M. Shibukawa, A. Miyake, S. Eda, S. Saito, Determination of the *cis-trans* isomerization barriers of L-alanyl-L-proline in aqueous solutions and at water/hydrophobic interfaces by on-line temperature-jump relaxation HPLC and dynamic on-column reaction HPLC, *Anal. Chem.*, **87**, 9280-9287 (2015), 査読有.

〔学会発表〕(計 17 件)

M. Shibukawa, K. Nakamura, S. Saito (Invited Lecture), Surface-bubble-modulated liquid chromatography: A new strategy for manipulating chromatographic retention by pressure-induced change in the volume of stationary nanobubbles, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015 年 12 月 15 日, Hawaii (USA).

M. Shibukawa, K. Nakamura, H. Nakamura,

S. Saito (Keynote Lecture), Surface bubble modulated liquid chromatography: a new approach for manipulation of chromatographic retention and investigation of solute distribution at water/hydrophobic interfaces, 2014 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry, 2014 年 8 月 24 日, Shenyang (China).

渋川雅美 (依頼講演), 表面ナノ気泡変調液体クロマトグラフィーの創案と開発, 分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月 17 日, 広島大学 (広島県・東広島市).

M. Shibukawa, K. Nakamura, S. Saito, Surface bubble modulated liquid chromatography: a new approach for manipulating chromatographic retention, Pittcon 2015 Conference and Expo (The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy), 2015 年 3 月 12 日, New Orleans (USA).

山下貴大, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 超臨界二酸化炭素を固定相とした HPLC の開発, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 10 日, 九州大学伊都キャンパス (福岡県・福岡市).

三宅彩香, 枝彩花, 齋藤伸吾, 渋川雅美, HPLC による水/疎水性物質界面におけるプロリンジペプチドの *cis-trans* 異性化反応の解析, 日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月 17 日, 広島大学 (広島県・東広島市).

ほか 11 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://sucra-rd.saitama-u.ac.jp/search/home.do>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋川 雅美 (SHIBUKAWA, Masami)
 埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号: 60148088

(2) 研究分担者

齋藤 伸吾 (SAITO SHINGO)
 埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号: 60343018