

## 表面気泡変調液体クロマトグラフィーの開発と

### 水／疎水性物質界面における溶質分子分布計測への応用

#### Development of Surface-bubble-modulated liquid chromatography and its application to the investigation of solute distribution at water/hydrophobic interfaces

理工学研究科物質科学部門 渋川 雅美  
Graduate School of Science and Engineering  
Masami Shibukawa

#### Abstract

A new high-performance liquid chromatographic method termed surface-bubble-modulated liquid chromatography (SBMLC), that has a hybrid separation medium incorporated with surface bubbles fixed in nanopores of a hydrophobic material, is presented. The incorporation of a gas phase at the surface of the hydrophobic material in an aqueous solution leads to the formation of the hybrid separation system consisting of the gas phase, hydrophobic moieties, and the interfacial water on the hydrophobic surface. SBMLC provides a novel technique not only for manipulating the separation selectivity of various compounds by pressure but also for elucidating the mechanism of accumulation or retention of solute compounds in aqueous solutions by a hydrophobic material.

#### 1. はじめに

水溶液試料中の化学物質の分離や濃縮の多くは、アルキル基を表面化学修飾したシリカゲルやポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体樹脂などの疎水性多孔質材料を用いて、いわゆる逆相系で行われることが多い。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は言うに及ばず、試料の前処理に多用される固相抽出においても、その多くが疎水性多孔質材料を充填したカラムを用いて行われている。逆相系における物質分離の機構は、種々のモデルにより説明されてきた。初期においては、非極性の化合物あるいは化合物中の非極性官能基が高極性で高い構造化を有する水から逃れて、疎水性材料表面に吸着すると考える、いわゆる疎水性相互作用に基づく保持機構が Horvath らによって提案された<sup>1,2</sup>。疎水性相互作用は疎水性材料表面および溶質分子の非極性基と水との間の斥力に起因し、極性溶媒がその溶媒と接する溶質の非極性部分との表面積をできるだけ小さくしようとするにより生じるとされる。この理論によれば、移動相中での溶質分子サイズの空孔形成とこの空孔への溶質分子の移動における自由エネルギー変化が溶質保持の駆動力になる<sup>1</sup>。これに対し、1980年代後半以降になって、疎水性材料内部への溶質分子の分配を考えるモデルが Dill や Dorsey らによって展開され、溶質保持の温度依存性や、分子の形状による保持の違いなどをうまく説明できることが示された<sup>3-5</sup>。

一方、最近筆者らは、疎水性表面近傍の水分子は溶質分子との間にバルク水相中とは異なる相

相互作用を示し、分離媒体として機能することを明らかにした<sup>6-8</sup>。上記の吸着および分配モデルのいずれにおいても、疎水性表面に形成する、バルク水とは異なる構造をとる界面水層を分離媒体すなわち固定相としては考慮していない。疎水性吸着モデルでは、疎水性のカラム充填剤表面と溶質分子近傍の水が高い構造性を取り、エントロピーが小さい状態になっていると仮定されることを前提とはしているが、溶質分子が置かれる場として考えているのは、あくまでもバルク水中かあるいは疎水性固体表面のいずれかであり、前者を移動相、後者を固定相ととらえている。これに対して筆者らは、疎水性固体表面にバルク水とは異なる界面水相が存在し、それをイオンや有機分子が識別していることを見出し、界面吸着も含めた界面の溶質保持機能を界面水への分配としてとらえることを提唱した<sup>7</sup>。

このように、異なるモデルが逆相系における分離機構として提案されてきたが、これらは必ずしも対立するものではない。逆相分離系は単一の実験場場で構成されているのではなく、複数の分離媒体を構成要素とした複合的分離場であると考えられるからである。しかし、それぞれの分離場が特定の化合物の分離にどの程度寄与しているのかを定量的に明らかにした研究はこれまで報告されていない。

ところで逆相系分離においては、水溶液中の目的物質の分離や捕集濃縮のために表面積の大きい疎水性多孔質材料を用い、その表面ができるだけ水溶液と接した状態をつくり出して操作を行う。しかし、水溶液をカラムに通液する際に流量を小さくすると、圧力が低下し、水溶液が多孔質材料の細孔内から排除される現象が観測されている<sup>9-12</sup>。これは以下の Washburn の式<sup>13</sup>を用いて説明することができる。

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

ここで  $p$  は毛管圧力、 $r$  は細孔半径、 $\gamma$  は液体の表面張力、 $\theta$  は接触角である。接触角は液体が固体表面を濡らさない(表面からはじかれる)場合は  $90^\circ$  より大きい値となる。式(1)から、疎水性多孔質材料を充填したカラムに  $p$  より小さい圧力で水を送液する条件では、材料表面の細孔から水が排除されることがわかる。

水が抜け出した後の細孔内空間は気体(水蒸気)によって占められていると考えられる。すなわち、細孔内に気相を固定化することによって、疎水性表面と水の間には気相をはさみこんだ微小空間をつくり出すことができる。これによって、カラム内には、気相、疎水性材料自身、そして水/疎水性材料界面が構成要素として働くハイブリッド固定相が形成されることになる。気相は液相に比べて密度が小さいので、水中での活量係数や蒸気圧が著しく大きな化合物を除いては、固定相としての容量は小さい。したがって細孔内に気相を導入することは、RPLC において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を分割し、かつ界面の面積を減少させることを意味する。さらに、気相はその体積を圧力によって容易に変えることができるので、水/疎水性材料界面の面積をカラムに加える圧力によって制御することができる。このことは、圧力によって分離選択性を変換制御できる新たな HPLC (surface-bubble-modulated liquid chromatography (SBMLC)) を生み出すことができるだけでなく、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を直接見積もることができることを意味する<sup>14</sup>。本稿では SBMLC が持つ興味深い分離選択性と、SBMLC を用いて得られる逆相系物質分離機構についての知見を解説する。

## 2. 疎水性多孔質充填剤細孔内への気相の固定化

逆相系分離材料として最も多く用いられているオクタデシル ( $C_{18}$ ) 基を化学修飾したシリカゲルの一つである L-column2 ODS (5  $\mu\text{m}$ ) を選択し、これを充填したステンレスカラム (150  $\times$  4.6 mm I.D.) 内に以下の方法で気相を固定化した。

- (1)揮発性有機溶媒をカラムに通液して、カラム内の空隙を溶媒で満たす。
- (2)カラム両端のプラグを外し、これをガスクロマトグラフィー用オープン内に設置し、70 °C で加熱乾燥する。
- (3)重水の保持体積が一定になるまで、圧力 2 MPa, 流量 0.6 mL min<sup>-1</sup> でカラムに純水を通液する。

有機溶媒としてアセトンおよびジクロロメタンを用いたときの、カラムの乾燥時間による重水の保持体積  $V_{D_2O}$  の変化を図 1 に示す。アセトンを用いた場合は、カラムを 120 min 加熱乾燥することによって  $V_{D_2O}$  が一定値(1.010 mL)に達しているのに対して、ジクロロメタンを用いると 30 min 以下で同じ値となることがわかる。この値はカラム内の全空隙体積  $V_0$ (1.634 mL)より明らかに小さい。これは C<sub>18</sub> シリカ細孔内に気相が再現性良く固定化できていることを示している。そこで、他の数種の市販 C<sub>18</sub> シリカカラムについて同様の操作で気相の固定化を行った。それぞれのカラムについて得られた  $V_{D_2O}$  の値を表 1 に示す。いずれのカラムもほぼ同じ  $V_{D_2O}$  値を示していることがわかる。ここで用いたカラムのサイズはすべて同じであること(150 × 4.6 mm I.D.), および C<sub>18</sub> シリカ充填剤の充填率はカラムによらずほぼ等しいと仮定できることから、この結果は充填剤細孔内空間がほぼ完全に気相で満たされていることを示している。

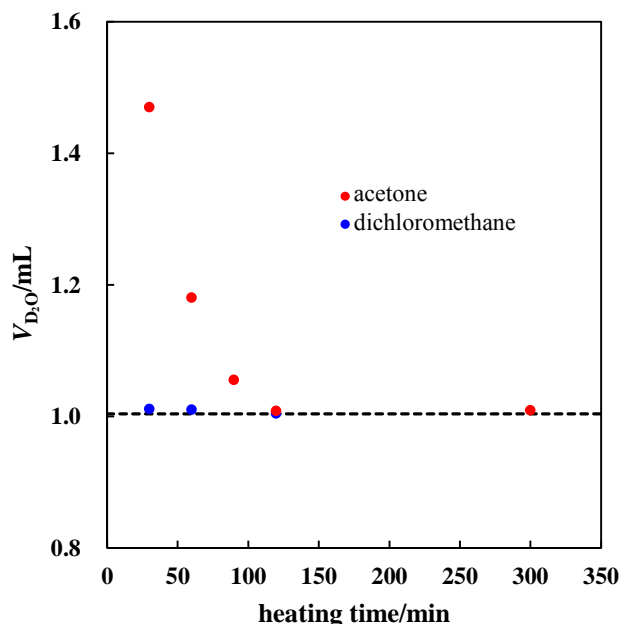


図 1 C<sub>18</sub> シリカカラムにおける重水の保持体積のカラム加熱時間依存性. カラム : L-column2 ODS (150 × 4.6 mm). [文献 14 より一部変更の上引用]

表 1 気相を固定化した C<sub>18</sub> シリカカラム(150 × 4.6 mm)における重水の保持体積  
[文献 14 より一部変更の上引用]

column	temperature/°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

### 3. バルク水／界面水およびバルク水／アルキル結合層間の種々の有機化合物の分配係数

C<sub>18</sub> シリカを充填した SBMLC カラム内では、上述したように水／アルキル結合層界面、アルキル結合層、そして気相がハイブリッド固定相を構成していると考えられる(図 2)。したがって、ハイブリッド固定相の各構成要素が独立の分離場として機能すると仮定すると、SBMLC における化合物の保持体積は以下の式で与えられることになる。

$$V_R^S = V_{BW}^S + D_G V_G + D_{C18} V_{C18} + D_{IW(G)} V_{IW(G)} + D_{IW(C18)} V_{IW(C18)}^S \quad (2)$$

ここで、 $V_{BW}^S$ 、 $V_G$ 、 $V_{C18}$ 、 $V_{IW(G)}$ 、 $V_{IW(C18)}^S$  は、それぞれバルク水相、気相、アルキル結合層、および気相とアルキル結合層表面の界面水の体積であり、 $D_G$ 、 $D_{C18}$ 、 $D_{IW(G)}$ 、 $D_{IW(C18)}$  は、それぞれ気相、アルキル結合層、気相表面の界面水、アルキル結合層表面の界面水とバルク水との間の化合物の分配係数である。上付きの S は SBMLC カラムであることを示す。

一方、カラム内の空隙が完全に水で満たされた通常の逆相 HPLC(RPLC)カラムでは、気相が存在しないので化合物の保持体積は式(3)で与えられる。

$$V_R^R = V_{BW}^R + D_{C18}V_{C18} + D_{IW(C18)}V_{IW(C18)}^R \quad (3)$$

ここで、上付きの R は RPLC カラムであることを示す。式(2)と(3)から、カラム内に気相が固定化されると溶質の保持体積が変化すること、また各固定相の体積があらかじめ見積もられていれば、保持体積の変化を計測することによって疎水界面水への分配係数  $D_{IW(C18)}$  と疎水性材料(アルキル結合層)内部への分配係数  $D_{C18}$  を求めることができる。

$V_{IW(G)}^S$  は  $V_{IW(C18)}^S$  に比べて小さく無視できると仮定できるので、式(2)と(3)から次式が得られる。

$$D_{IW(C18)} = \frac{(V_R^R - V_R^S) + (V_{BW}^R - V_{BW}^S) + D_G V_G}{V_{IW(C18)}^R - V_{IW(C18)}^S} \quad (4)$$

ここで、 $V_{BW}^R$  と  $V_{BW}^S$  は無機イオンをプローブとした溶離電解質効果法によって測定することができる<sup>15</sup>。また、 $V_{IW(C18)}^R$  は  $V_0$  と  $V_{BW}^R$ 、 $V_{IW(C18)}^S$  は気相およびアルキル結合層への分配が無視できる親水性化合物の SBMLC における保持体積  $V_{R,NV}^S$  と  $V_{BW}^S$  とから、それぞれ以下のように求めることができる。

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

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

式(6)において、 $D_{IW(C18),NV}$  は親水性化合物のバルク水／疎水界面水間の分配係数で、次式で示される RPLC における保持体積  $V_{R,NV}^R$  から求めることができる。

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

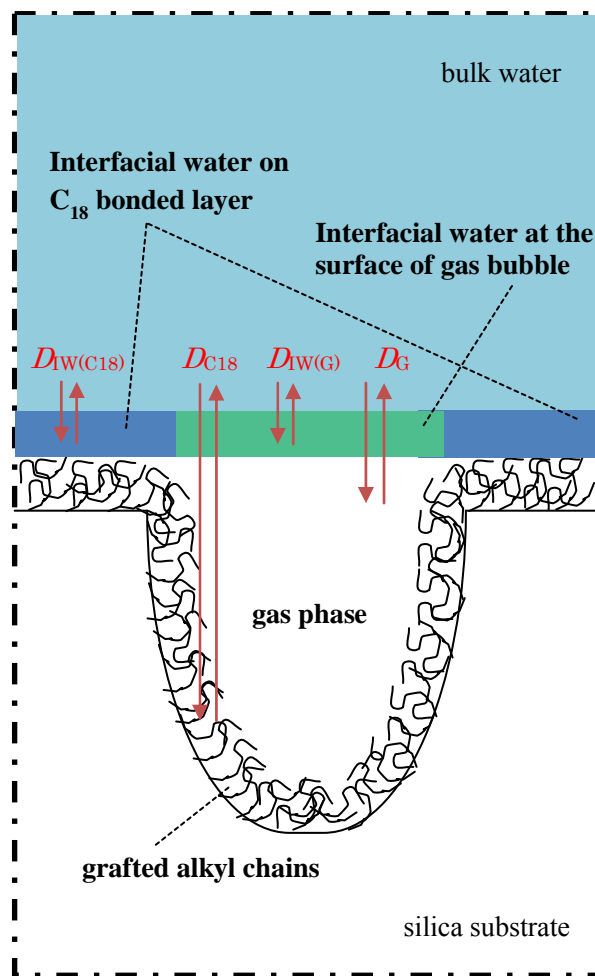


図 2 多孔質アルキル結合型シリカを充填した SBMLC カラムにおけるハイブリッド固定相 [文献 14 より一部変更の上引用]

さらに、バルク水と気相との間の分配係数  $D_G$  はヘンリー定数  $k_H$  で次式のように表される。

$$D_G = \frac{k_H}{RT} \quad (8)$$

ここで、 $R$  と  $T$  はそれぞれ気体定数とカラム温度である。最後に、 $V_G$  は以下の式により求められる。

$$V_G = V_0 - V_{BW}^S - V_{IW(C18)}^S \quad (9)$$

したがって、RPLC および SBMLC における化合物の保持体積を測定することによって、式(4)~(9)により  $D_{IW(C18)}$  を算出することができる。  $D_{IW(C18)}$  が求まれば、  $D_{C18}$  は次式によって算出することができる。

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

アルキル結合層の体積  $V_{C18}$  は、その密度が融点での  $n$ -オクタデカンの密度  $\rho_{C18}$  ( $= 0.7768 \text{ g mL}^{-1}$ )<sup>16</sup> に等しいと仮定して次式により求め、  $D_{C18}$  を算出することにした。

$$V_{C18} = \frac{w_p - w_{silica}}{\rho_{C18}} \quad (11)$$

ここで  $w_p$  と  $w_{silica}$  はそれぞれ  $C_{18}$  シリカカラム充填剤およびシリカ基材の重量である。

上記のようにして求めた RPLC および SBMLC 系における各固定相の体積、 $V_{BW}$ 、 $V_{IW(C18)}$ 、 $V_G$ 、 $V_{C18}$  の値を表 2 に示す。また、種々の有機化合物について得られた分配係数  $D_{IW(C18)}$  と  $D_{C18}$  を表 3 に示す。これらの表から、 $C_{18}$  シリカでは多くの有機化合物について固定相として機能しているのはアルキル結合層ではなく界面水であるが、クロロホルムなどの親水性官能基を持たない化合物はアルキル結合層内部にも多く分配することがわかる。水中に置かれた疎水性材料がその内部に溶質分子を取り込むのか、あるいは水との界面に保持するのかわ、実験によって定量的に明らかにした研究はこれまでに報告がない。これは、両者を物理的に切り離して、その大きさを独立に変化させる方法がなかったためである。SBMLC は、溶質分子の界面への保持と材料内部への分配の寄与の定量的評価を初めて可能にする技術であるといえる。

表 2 RPLC および SBMLC 系における L-column2 ODS カラム(150 × 4.6 mm)内のバルク水、疎水界面水、気相およびアルキル結合層の体積 (mL) [文献 14 より一部変更の上引用]

column	$V_{BW}$	$V_{IW(C18)}$	$V_G$	$V_{C18}$
RPLC	$1.40 \pm 0.02$	$0.29 \pm 0.02$	0	0.368
SBMLC	$0.994 \pm 0.001$	$0.0018 \pm 0.0006$	$0.698 \pm 0.001$	

表 3 L-column2 ODS カラム(150 × 4.6 mm)における有機化合物の  $D_{C18}$  および  $D_{IW(C18)}$  値. [文献 14 より一部変更の上引用]

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

#### 4. SBMLC における分離選択性の圧力制御

多くの多孔質材料は均一な大きさの細孔を持っているわけではなく、細孔径には分布がある。したがって、式(1)からわかるように、カラム内に固定化された気相の体積をカラムに加える圧力によって連続的に変えることができる。図 3 は L-column2 ODS カラム内の気相体積と液相水体積の圧力依存性を示したものである。この図から、カラムに加える圧力が高くなるにしたがって液相水が細孔内に浸入し、それによって気相体積が小さくなっていることがわかる。この充填剤の接触角をパラフィンについて測定されている値(= 111°)<sup>17</sup> に等しいと仮定し、さらに平均細孔半径  $r$  を以下の式によって推定して、式(1)を用いて L-column2 ODS の毛管圧を計算した。

$$r = r_{\text{silica}} - \frac{V_{C18}}{A_s} \quad (12)$$

ここで、 $r_{\text{silica}}$  は製造メーカー(化学物質評価研究機構)により報告されているシリカ基材の平均細孔半径であり<sup>18</sup>,  $A_s$  は窒素吸着法により測定した充填剤の表面積である. その結果, 計算値は 12 MPa となり, 図 3 から求められる細孔内体積の 1/2 の空間を液相水が占めるときの圧力 15 MPa にほぼ一致した. この結果は, 水溶液中での  $C_{18}$  シリカ充填剤細孔内における気相生成現象が, 式(1)によって説明できることを示している.

SBMLC により得られた種々の有機化合物のクロマトグラムを図 4 に示す. 圧力が大きくなるにしたがって界面水の体積, すなわち水/ $C_{18}$  結合層界面の面積が大きくなるので, すべての化合物の保持時間が大きくなるが, 溶出順は圧力によって著しく変化することがわかる. この結果は, 表 3 に示したように  $D_{C_{18}}$  と  $D_{1W(C_{18})}$  の値に相関がほとんどないことによるものであり, SBMLC が圧力によって溶質保持選択性を変換できる新しい分離法であることを示している.

## 5. おわりに

疎水性多孔質材料の細孔内に気体を固定化することによって, 気体を固定相とする液体クロマトグラフィーである気液クロマトグラフィーを開発できるというアイデアは, すでに 1983 年に Giddings によって発表されており<sup>19</sup>, 水溶液中の酸素や窒素あるいは高揮発性有機化合物の分離に有効であることが予測されている. しかし, 気相は密度が低いため, 多くの化合物にとって有効な固定相としては機能しない. 本研究は, カラムへの気体の導入が, 水/疎水性界面と疎水性材料自身の相対的な大きさを変え, それによって分離選択性を劇的に変化させる HPLC を生み出すことを明らかにした. その意味で, 筆者らはこの方法を表面気泡変調液体クロマトグラフィー(SBMLC)と名づけた. SBMLC は圧力による分離選択性の制御ができる新しい分離法としてだけでなく, 水/疎水性界面の溶質保持能を定量的に実験によって評価できる方法として重要である.

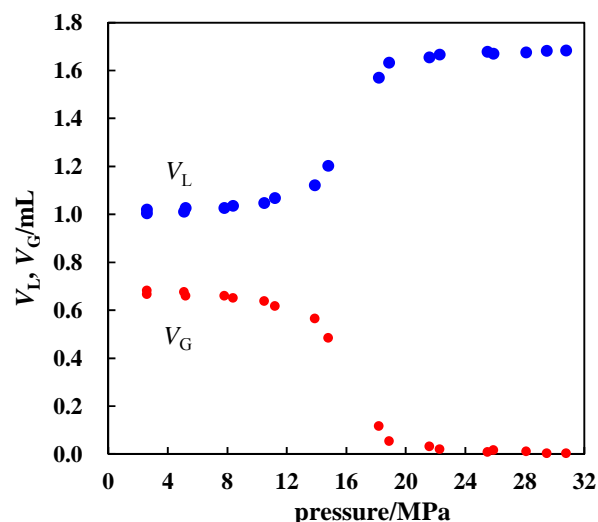


図 3 SBMLC カラムにおける液相水および気相の体積の圧力依存性. カラム: L-column2 ODS (150 × 4.6 mm). 温度: 40 °C. [文献 14 より一部変更の上引用]

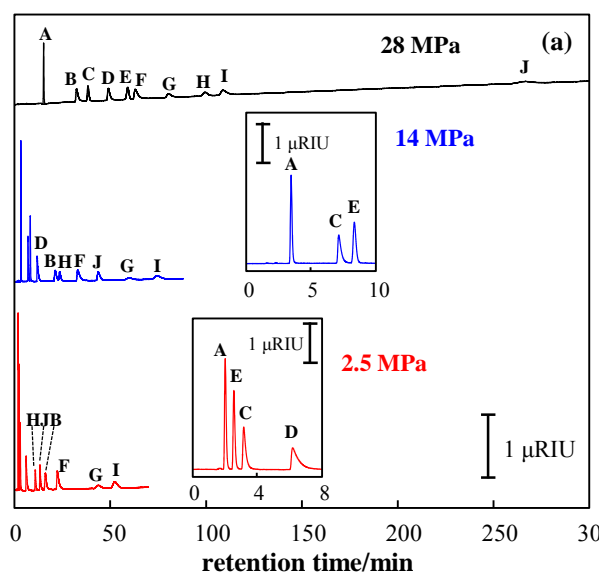


図 4 SBMLC における有機化合物のクロマトグラムの圧力による変化. カラム: L-column2 ODS (150 × 4.6 mm). 移動相: 純水. 温度: 40 °C. 検出器: 示差屈折計. A: 1,4-dioxane, B: dichloromethane, C: 2-butanone, D: 1-nitropropane, E: 1-butanol, F: 1,2-dichloroethane, G: bromoethane, H: diethylether, I: chloroform, J: isopropyl acetate. [文献 14 より一部変更の上引用]

## 6. 謝辞

本研究を中心になって進めた中村圭介博士に謝意を表す。また、本研究は以下の科学研究補助金によって行われたものである: 挑戦的萌芽研究 No. 23655062 (2012~2014 年度), 基盤研究(B)No. 25288062 (2013~2015 年度), 基盤研究(B)No. 16H04161 (2016~2018 年度)。

## 参考文献

- (1) C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **1976**, *125*, 129-156.
- (2) W. Melander, J. Stoveken, C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **1980**, *199*, 35-56.
- (3) K. A. Dill, *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 1980-1988.
- (4) J. G. Dorsey, K. A. Dill, *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 331-346.
- (5) L. A. Cole, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, **1992**, *64*, 1317-1323.
- (6) M. Shibukawa, Y. Takazawa, K. Saitoh, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 6279-6286.
- (7) M. Shibukawa, Y. Kondo, Y. Ogiyama, K. Osuga, S. Saito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 15925-15935.
- (8) 渋川雅美, *ぶんせき*, **2012**, 21-27.
- (9) T. H. Walter, P. Iraneta, M. Capparella, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1075*, 177-183.
- (10) 長江徳和, *分析化学*, **2010**, *59*, 193-205.
- (11) A. Cavazzini, N. Marchetti, L. Pasti, R. Greco, F. Dondi, A. Laganà, A. Ciogli, F. Gasparri, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 19-22.
- (12) B. J. VanMiddlesworth, J. G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 7158-7165.
- (13) E. W. Washburn, *Phys. Rev.*, **1921**, *17*, 273-283.
- (14) K. Nakamura, H. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa, *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 1180-1187.
- (15) M. Shibukawa, N. Ohta, *Chromatographia*, **1988**, *25*, 288-294.
- (16) R. L. David, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th ed., CRC Press, Boca Raton, 2004.
- (17) J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, London, 1992.
- (18) [http://www.cerij.or.jp/service/09\\_chromatography/L-column2\\_ODS\\_01.html](http://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column2_ODS_01.html)
- (19) J. C. Giddings, M. N. Myers, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1983**, *6*, 381-382.