

液化ガスを移動相として用いる
超低温液体クロマトグラフィーの開発

Development of ultralow-temperature high performance liquid chromatography
using liquefied gas as mobile phase

2018

本野 智大

Development of ultralow-temperature high performance liquid chromatography using liquefied gas as mobile phase

High performance liquid chromatography (HPLC) is one of analytical methods most widely used in various research fields, such as biochemistry, pharmacy, and environmental science. HPLC separations with various separation modes are performed at approximately ambient temperatures in general. On the other hand, HPLC separations at both high and low temperature ranges have been investigated because temperature is an important parameter for controlling chromatographic behavior. Focused on HPLC at low-temperatures, there are some reports for the analysis of thermally labile compounds, preparative separation of unstable synthetic and natural compounds, the enantiomer separations for selectivity enhancement, and the separation with water-ice stationary phase (or ice chromatography). In these low-temperature HPLC, the separation above -65°C was demonstrated using mainly organic solvents or its mixture with water have been used as non-freezing mobile phase.

In this study, HPLC at further lower-temperature such as liquid nitrogen temperature, or ultralow-temperature HPLC, has been developed because the separation at cryogenic condition has potentials for analyses of thermally labile compounds, enhancements in selectivity of isomers and isotopomers, and as a tool to investigate various interactions at ultralow-temperature. However, the mobile phases used in general HPLC, such as water, methanol, acetonitrile, hexane and dichloromethane, freeze at the ultralow-temperature such as -196°C . Therefore, we employed a liquefied gas as the mobile phase for ultralow-temperature HPLC because of its sufficiently low freezing (melting) point.

In chapter 1, the history of chromatographic techniques is briefly described at first. Then, the general effect of temperature on chromatographic behavior is explained, and previous studies of high and low temperature HPLC are reviewed. After describing the advantages and problems in HPLC at ultralow-temperature, the objectives of this study are stated.

In chapter 2, prior to development of ultralow-temperature HPLC, low-temperature HPLC using a liquefied gas as the mobile phase was developed. Carbon dioxide is employed because it liquefied at relatively higher temperature than the other gases. Using the developed low temperature HPLC, chromatographic behavior of low-molecular compounds was investigated at low temperatures ranged from -35 to

-5°C . The combination of liquid carbon dioxide mobile phase with octadecyl-silica and bare silica-gel columns provided reversed and normal phase mode separation, respectively. In both the cases, nonlinear relation between the temperature and the retention factors of the analytes (van't Hoff plots) was found at approximately -15°C . In contrast to general trends in HPLC, the decrease in temperature resulted in the enhancement of the separation efficiency with both the columns.

In chapter 3, the effect of column temperature (-30 to -5°C), inlet pressure (5.3 or 6.3 MPa), and flow rate (1 or 2 mm/s) on chromatographic behavior in low-temperature HPLC using a pure liquid carbon dioxide with three packed columns (fully porous, small nonporous, and core-shell particles) and a monolithic column (fully porous) were evaluated. The retention factors of the analytes were affected by neither inlet pressure nor flow rate. Although the separation efficiency depended on the column temperature, the obvious relationship between temperature and separation efficiency was not founded in contrast to our previous research. In addition, the liquid carbon dioxide used as the mobile phase was found to solidify in the column at low temperatures, and its behavior was also affected by both the chromatographic conditions and the column structures. Although the typical relationship between solidification and chromatographic behavior was not observed clearly, the porosity variation, or heterogeneity of the column structure, for the core-shell column was smaller than the other columns. The highest separation efficiency in the core-shell column might be related with this homogeneity of the column structure.

In chapter 4, ultralow-temperature HPLC using liquefied nitrogen-base mobile phase was developed and its chromatographic behavior of low-molecular compounds was investigated. HPLC separation of low molecular weight alkanes at -196°C was achieved by using liquefied nitrogen or its mixture with methane as the mobile phase. On the other hand, the analytes were not eluted in GC separation at -196°C using helium gas mobile phase due to strong adsorption. Moreover, the retention in HPLC at ultralow-temperature could be controlled by the column temperature and the mobile phase composition. When *n*- and *iso*-alkane were separated, the selectivity toward isomers in HPLC at -196°C differed from that in GC at room temperature. Retention of alkene was significantly enhanced compared with that of alkane in HPLC at -196°C .

In chapter 5, the retention mechanism in HPLC at -196°C was investigated. The combination retention model of adsorption exchange and pseudo partition modes for ultralow-temperature HPLC is proposed to describe the relationship between the mobile phase composition and the retention of analytes. The experimental results agreed with the proposed equation, which suggests adsorption exchange and pseudo

partition modes dominated the analyte retention in the low and high additive concentration region, respectively. The difference in retention behavior between bare-silica and ODS column was also investigated. Propylene was eluted in ODS column with the mobile phase containing either ethane or ethylene, whereas it was not eluted with the bare-silica column.

In chapter 6, ultralow-temperature HPLC using liquefied low-hydrocarbons as the mobile phase is investigated for effectively reducing the strong interaction between the analytes and the stationary phase at cryogenic condition. A pure liquefied methane mobile phase successfully reduced the retention of analytes, and a pure liquefied ethane mobile phase demonstrated further reducing of the analyte retention. With pure liquefied ethane mobile phase, alkanes of relatively high boiling point (*n*-hexane, *n*-heptane, and *n*-octane) and compounds containing relatively polar functional groups (chloride) were successfully eluted and separated. The analysis of linear, branched and ringed alkanes (C6 to C8) revealed the selectivity of linear alkanes to branched and ringed ones was significantly large at ultralow-temperature.

In chapter 7, the entire study of this work was summarized. In addition, unsolved problems and future prospects concerned with this study were described.

目次

第一章 序論	9
1. 1. 液体クロマトグラフィーの背景.....	9
1. 2. 液体クロマトグラフィーにおける温度	10
1. 2. 1. HPLC 分離への温度の影響.....	10
1. 2. 2. 高温・低温条件の HPLC	11
1. 3. 超低温下におけるクロマトグラフィー	12
1. 3. 1. 超低温下における利点	12
1. 3. 2. 超低温下のクロマトグラフィーにおける問題	13
1. 4. 本研究の目的と論文の構成.....	13
参考文献.....	14
第二章 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.....	17
2. 1. 緒言	17
2. 2. 実験	17
2. 2. 1. 低温 HPLC のための装置.....	17
2. 2. 2. 熱量測定.....	18
2. 2. 3. 試薬.....	18
2. 3. 結果と考察.....	18
2. 3. 1. 低温クロマトグラフィーシステムの開発	18
2. 3. 2. 保持への温度の影響.....	20
2. 3. 3. ODS カラムの選択性に対する温度の効果	24
2. 3. 4. 理論段数への温度の影響.....	25
2. 4. 結論	26
参考文献.....	27
第三章 液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC における分離効率へのカラム構造の影響.....	28

3. 1. 緒言	28
3. 2. 実験	28
3. 2. 1. 装置	28
3. 2. 2. 試薬	29
3. 3. 結果と考察	29
3. 3. 1. 保持に及ぼす粒子タイプの影響	29
3. 3. 2. 分離効率に及ぼす粒子タイプと分析条件の影響	31
3. 3. 3. カラム中の CO ₂ 挙動の評価	34
3. 3. 4. モノリスカラムとの比較	37
3. 4. 結論	39
参考文献	40
第四章 超低温 HPLC の開発	41
4. 1. 緒言	41
4. 2. 実験	41
4. 2. 1. 超低温液体クロマトグラフ	41
4. 2. 2. GC 測定	42
4. 2. 3. 試薬	42
4. 3. 結果と考察	43
4. 3. 1. 超低温条件における HPLC と GC	43
4. 3. 2. 分析物の保持への温度の影響	46
4. 3. 3. 移動相へのメタンの添加による保持の制御	50
4. 3. 4. -196°C の HPLC における構造異性体の分離挙動	51
4. 3. 5. アルケンの選択的保持	52
4. 4. 結論	53
参考文献	54
第五章 超低温 HPLC における保持機構	55
5. 1. 緒言	55

5. 2. 実験.....	55
5. 2. 1. -196°C における装置と HPLC 手順.....	55
5. 2. 2. 試薬.....	56
5. 3. 結果と考察.....	56
5. 3. 1. 保持比と移動相組成の関係	56
5. 3. 2. 保持への移動相組成の影響	59
5. 3. 3. 保持に対する固定相の種類の効果.....	60
5. 3. 4. アルケンの保持制御	63
5. 4. 結論	64
参考文献.....	64
第六章 液化低級アルカンを移動相として用いる超低温 HPLC による低分子化合物の 分離	65
6. 1. 緒言	65
6. 2. 実験.....	65
6. 2. 1. 装置.....	65
6. 2. 2. 試薬.....	66
6. 3. 結果と考察.....	67
6. 3. 1. 液化低級炭化水素移動相を用いた溶出力の向上.....	67
6. 3. 2. モノリスカラムによる保持の低減.....	70
6. 3. 3. 高沸点アルカンの溶出	72
6. 3. 4. ベンゼン環構造をもつ化合物の溶出	73
6. 3. 4. 超低温条件下における構造認識	74
6. 4. 結論	76
参考文献.....	77
第七章 総括と今後の展望.....	78
7. 1. 総括	78
7. 2. 今後の展望.....	80

参考文献.....	81
共同研究者一覧.....	82
謝辞	83
本論文に関連する原著論文	84

第一章 序論

1. 1. 液体クロマトグラフィーの背景

クロマトグラフィーは、各成分の二相間の相互作用の違いを利用して成分ごとに分離する技術であり、1903 年に Tswett が沈降炭酸カルシウムを充填したカラムに石油エーテルを流し、植物色素を分離したことが始まりとされている[1, 2]。つまり、初のクロマトグラフィーは液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography: LC) であった。LC は創始以降、現在に至るまで様々な分離モードの開発により普及・発展してきた[3-5]。1930 年代には、植物色素の分離手段としてクロマトグラフィーの威力が確認され、吸着型のカラムを用いたクロマトグラフィーが分離法として普及していった。また、1935 年にはイオン交換体が調製され、これを担体として用いるイオン交換クロマトグラフィー (Ion-exchange chromatography: IC) の研究が始まり、核分裂生成物の一斉分離やタンパク質の加水分解物中のアミノ酸の分離が行われた。1941 年には、Martin 及び Synge が、シリカゲル表面に担持された液体固定相とこれと混じり合わない液体の移動相との間に溶質の分配平衡が成り立ち、混合試料中の成分は、二液相の分配平衡の相違によってカラム中の移動速度に差を生じると考え、分配平衡を基礎とするクロマトグラフィーを創始した。1959 年には、新たに分子サイズによる立体排除モードのクロマトグラフィーが考案され、水相で膨潤する架橋デキストランゲルを用いて低分子物質をふるい分けるゲル濾過クロマトグラフィー (Gel filtration chromatography: GFC) が創始された。1967 年には、Horvath らが、現在の高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography: HPLC) の原型となる「fast liquid chromatography」の設計に関する論文を発表した。その後、カラム担体やポンプの改良により、HPLC はより高速・高分解能を達成するように発展を続けている。

このように LC は吸着や分配、イオン交換、サイズ排除といった様々な分離モードの開発によって普及・発展し、多くの研究・工業の分野で利用されてきた。現在汎用的に利用される HPLC では、カラム温度のほとんどが室温付近の条件で分離を行うのが一般的である。一方で、現在、HPLC と並んで汎用的に利用されることが多いガスクロマトグラフィー (Gas chromatography: GC) や超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography: SFC) では、温度グラジエントとしてカラム温度条件を分離のために活用するのが一般的である。LC においても合成高分子の分離のために昇温インタラクションクロマトグラフィー (Temperature gradient interaction chromatography: TGIC) として臨界吸着点付近で温度グラジエントを行うことがある[6]。また、温度応答性高分子を固定相に修飾したカラムとともに降温グラジエントを用いた HPLC 分離も報告されている[7-9]。このように、クロマトグラフィー技術において温度は重要なパラメータの一つであるため、高温や低温条件を利用した LC に関する研究も行われている。

1. 2. 液体クロマトグラフィーにおける温度

1. 2. 1. HPLC 分離への温度の影響

クロマトグラフィーにおいて温度は、保持や分離性能に影響を及ぼす重要なパラメータの一つである。クロマトグラフィーにおける保持比(k)と温度の関係は(1-1)式 (van't Hoff 式) によって与えられることが知られている[10]。

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \Phi \quad (1-1)$$

ここで、 ΔH^0 、 ΔS^0 、 R 、 Φ は、それぞれ二相間の標準移動エタングルピー変化、二相間の標準エントロピー変化、気体定数、相比である。一般的に ΔH^0 は負の値となるため、温度の上昇 ($1/T$ の減少) に伴い保持比は減少し、温度の低下 ($1/T$ の増加) に伴い保持比は増加する。

また、保持比が k_1 、 k_2 ($k_1 < k_2$) となる試料成分 1、2 の選択係数 (α) は以下の(1-2)式で与えられる。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1-2)$$

(1-1)式と(1-2)式より、温度と選択係数の間の関係は(1-3)式となる。

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta H_2^0 - \Delta H_1^0}{RT} + \frac{\Delta S_2^0 - \Delta S_1^0}{R} = -\frac{\Delta \Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^0}{R} \quad (1-3)$$

ここで、 ΔH_1^0 、 ΔH_2^0 と ΔS_1^0 、 ΔS_2^0 は試料成分 1、2 の標準移動エタングルピー変化と標準エントロピー変化を示し、 $\Delta \Delta H^0 = \Delta H_2^0 - \Delta H_1^0$ 、 $\Delta \Delta S^0 = \Delta S_2^0 - \Delta S_1^0$ である。 $\Delta H_1^0 > \Delta H_2^0$ である場合に、 $\Delta \Delta H^0$ は負の値となるため、温度の低下により α は増加する。つまり、低温下において、より選択係数が大きくなる。

一方で、クロマトグラフィーにおける分離性能を表す指標である理論段高 (H) は(1-4)式 (van Deemter 式) によって与えられることが知られている。

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1-4)$$

ここで、 u は流速で A 、 B 、 C はそれぞれ渦巻状拡散、カラム軸方向の拡散、移動相—固定相間の物質移動に伴う試料ゾーンの広がりの影響を示す項であり、分離条件によって決定する。Figure 1-1 に示すように、一般的に理論段高と流速の関係は A 項、 B 項、 C 項の影響を受け、低流速域では B 項の寄与が、高流速域では C 項の寄与がそれぞれ大きくなる。ここで、粒子充填型カラムを用いた際の A 項、 B 項、 C 項と各分析条件との関係を(1-5)、(1-6)、(1-7)式に示す[10]。

$$A = 2\lambda d_p \quad (1-5)$$

$$B = 2D_m r_m + 2D_s k r_s \quad (1-6)$$

$$C = \frac{A^2 \omega^2}{2} \frac{d_p^2}{D_m} + \frac{k}{(k+1)^2} \frac{d_f^2}{D_s} \quad (1-7)$$

ここで、 λ と d_p は曲がりくねり係数と充填剤粒子径を、 D_m と D_s 、 r_m と r_s は移動相と固定相における拡散係数、カラム軸方向で拡散が阻害される度合いを、 A と ω 、 d_f は係数と流路の種類によって変わる係数、固定相の厚さをそれぞれ示す。(1-6)、(1-7)式より、 B 項と C 項には拡散係数が含まれており、拡散係数は(1-8)式 (アインシュタイン・ストークス式)に示すように温度の影響を受けるため、 B 項と C 項は温度の影響を受ける。

$$D = kBT = \frac{kT}{6\pi\mu a} \quad (1-8)$$

ここで、 k と B 、 μ 、 a は、それぞれボルツマン定数と移動度、粘性、分子半径を示す。 B 項においては、温度の低下に伴って拡散係数が減少することで B 項が小さくなるため、低温条件下において低流速域での理論段高は小さくなる (分離性能が良くなる)。一方で、 C 項においては、温度の上昇に伴って拡散係数が増加することで C 項が小さくなるため、高温条件下において高流速域での理論段高は小さくなる (分離性能が良くなる)。HPLC においては、一般的に C 項領域での分離を行うのが一般的であるため、高温条件下で高い分離性を示す。

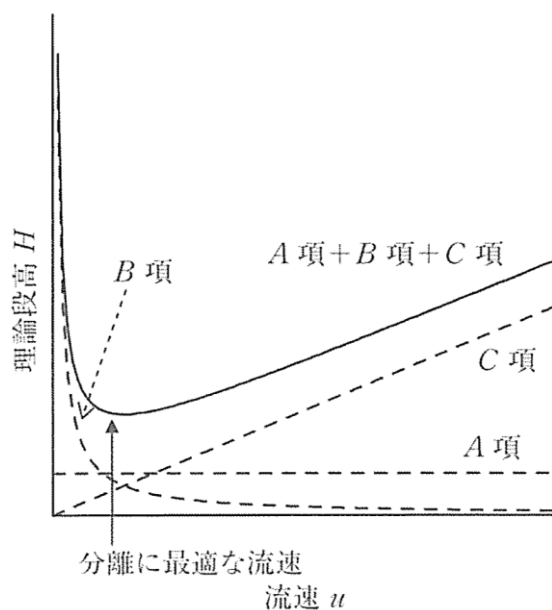


Figure 1-1 van Deemter 式による流速と理論段高の関係[10]

1. 2. 2. 高温・低温条件の HPLC

高温と低温条件における HPLC に関する研究もいくつか報告されている [11-28]。RP-HPLC において、環境負荷の低い移動相としておよそ 100 から 200°C の高温水の使用

が報告されている[11-13]。水は高温条件下においては、極性が低下し、常温において用いられる水-有機溶媒系の移動相の代わりとして利用することが可能であり、従来の逆相-HPLC と比べて特定の化合物に対しては短時間での分析が可能であり、さらに高温下で物質移動が促進されることによる分離効率の向上が確認されている。また、高温条件下における IC を用いた溶媒効果に関する研究[14, 15]や多孔性グラファイトカーボンカラムを用いた HPLC による糖鎖の構造異性体分析[16]も報告されている。

一方で、低温下での HPLC は熱的に不安定な分子の分析 [17-19]や、不安定な合成・天然化合物の分取分離[20, 21]のために用いられる。また、低温下における HPLC はエナンチオマー分離にも応用され、低温条件による選択性の向上が報告されている[22, 23]。低温下における HPLC の他の応用例として、およそ -12 から -15°C の低温下で氷を固定相として用いた HPLC (アイスクロマトグラフィー) という手法も報告されている[24-26]。 0 から -65°C の温度範囲の低温 HPLC においては、多くの報告で有機溶媒を移動相として用いている。一方で、低温下における HPLC における他の移動相の利用として、二酸化炭素とその有機溶媒との混合物がある[27, 28]。一般的に温度の低下に伴い移動相の粘性は上昇し、拡散係数も低下してしまうが、液化二酸化炭素は低い粘性・高い拡散係数を有するため、クロマトグラフィー分離において有利に働く。

1. 3. 超低温下におけるクロマトグラフィー

1. 3. 1. 超低温下における利点

超低温下でクロマトグラフィー分離を行うと、以下に示すような利点がある。

- (1) 選択係数 (α) には(1-3)式に示すように温度依存性があるため、超低温下でクロマトグラフィー分離を行うことで、室温付近では van't Hoff 式におけるエンタルピーの差が小さく分離が困難な分析対象物の分離を実現できる可能性がある。
- (2) van Deemter 式における B 項が支配的となる低流速領域において、カラム軸方向の拡散が抑制されるため、分離性能の向上が期待できる。
- (3) 超低温下においてラジカルのような不安定な化学種が安定化するため、超低温下のクロマトグラフィーによって、従来のクロマトグラフィー技術では分析が困難である様々な系に存在する反応性が高く不安定な化学種の網羅的分析が達成できる可能性がある。
- (4) 超低温下において、分子振動が抑制されるため、分子形状認識に基づいた分離を向上させる可能性がある。
- (5) 超低温下におけるクロマトグラフィーは、超低温環境中の物質間相互作用の評価手法として利用が期待できる。

しかし、現段階において超低温下におけるクロマトグラフィーに関する研究はそれらを実現するためには十分とは言えない。

1. 3. 2. 超低温下のクロマトグラフィーにおける問題

ガスクロマトグラフィーの場合には超低温下 (液体窒素温度(-196°C)) における分離 (極低温 GC) が報告されている[29-32]。極低温 GC による水素分子の同位体や核スピン異性体の分離が報告されており、超低温下におけるクロマトグラフィーには常温では困難な分離を達成する能力がある。しかし、大部分の化合物は -196°C において蒸気圧がほぼ 0 となり、気体状態で存在することはできないため、極低温 GC における分析対象はいくつかの化合物のみに限られる。加えて、気体状態で存在することができる化合物であっても、超低温下において固定相に対して強く吸着してしまうため、それらの化合物の分離 (溶出) は阻害されてしまう。

一方で、一般的に分析対象が移動相に対して溶解性を有するとき、HPLC にはカラムの出口へ分析物を輸送する能力がある。さらに、HPLC においては分析物と固定相との間の相互作用を移動相の組成によって制御することが可能である。そのため、超低温下における分析手法としての制限は GC よりも HPLC の方が少ない。しかし、1. 2. 2. 節で述べたような水やメタノール、アセトニトリル、ヘキサン、ジクロロメタンといった溶媒は、 -196°C のような超低温条件では凝固してしまうため、移動相として用いられる一般的な溶媒では超低温下で HPLC 分離を行うことはできない。

1. 4. 本研究の目的と論文の構成

本研究では低い融点をもつ「液化ガス」に着目した。すなわち、超低温下において十分に低い凝固点 (融点) を有する窒素やメタンを移動相として利用することで、「超低温 HPLC」が実現可能であると考えた。また、液化ガスは常温常圧条件で簡単に気化させることができるため、溶媒を除去する必要がある質量分析計 (Mass spectrometer: MS) や蒸発光散乱検出器 (Evaporative light scattering detector: ELSD)、コロナ荷電粒子検出器 (Corona charged aerosol detector: Corona CAD) との接続が容易であるという利点がある。

本研究では、超低温条件下においても分離・分析可能な「超低温 HPLC」の開発を目的としている。そのために、HPLC の移動相として液化ガスを用いることで超低温 HPLC システムの構築を行うとともに、超低温 HPLC における保持挙動の解明と分析可能な分子種の拡大を試みた。

本論文は以下に示すように構成される。

第一章：これまでのクロマトグラフィー技術の発展・クロマトグラフィー技術における温度の重要性について説明した。その上で本研究の目的と構成について示した。

第二章：超低温 HPLC の開発に先駆けて、まず液化ガスを移動相として用いる低温 HPLC システムの開発と、低温 HPLC における低分子化合物の分離挙動について説明した。比較的高い温度で液化して利用することができる液化二酸化炭素を移動相として用いることで、液化ガスを移動相として用いる低温 HPLC システム ($-35\sim-5^{\circ}\text{C}$) の構築を行った。こ

の構築した低温 HPLC システムにより試料成分の分離を確認した。また、低温 HPLC における温度と分離性能の関係を求めたところ、特定の条件において一般的な HPLC とは正反対の傾向となる温度低下による分離性能の向上が見出された。

第三章：液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC における保持と分離性能へのカラム構造の影響について説明した。全多孔性粒子、非多孔性粒子、コアシェル型粒子を充填したカラムとモノリス構造型のカラムを用いて、様々な流速、圧力、温度条件での保持、分離性能を調査したところ、条件に依存してカラム空隙率の変動が起こり、分離性能に影響を及ぼすことが分かった。また、検討したカラムの中では、コアシェルカラムを用いた際に最もカラム空隙率の変動が少なく、分離性能が最も高くなった。

第四章： -196°C という超低温条件下における HPLC の開発とその分離挙動について説明した。移動相として液化窒素や窒素とメタンの混合液化ガスを用いることで、これまで報告されている中で最も低い温度である -196°C という条件で HPLC 分離を達成した。同条件で移動相のみヘリウムを用いた超低温ガスクロマトグラフィーで同じ試料成分の測定を行うと、固定相への保持が大きく溶出しなかったため、超低温条件下では GC よりも HPLC の方が応用の可能性が高いことがわかった。また、温度と移動相中のメタン濃度の保持への影響を調査し、それらのパラメータにより保持の制御が可能であることを示した。

第五章：超低温下における HPLC に保持機構について説明した。移動相組成と保持比の関係から、二つの保持機構が働いていることを見出し、「吸着交換」と「疑似分配」の両方による保持機構を提案し、そのモデルに基づいて理論式を構築した。実際の実験結果に対してモデル式を適合させ、適合曲線より得られた値から提案した保持機構の妥当性を示した。

第六章：液化低級炭化水素を用いる超低温 HPLC による様々な分子種の分離について説明した。超低温 HPLC において、固定相への強い吸着によって試料成分の保持が大きくなり、多くの分子種が溶出しないことが問題であった。そこで、溶出力の高い液化低級炭化水素（メタン、エタン）を、それらが液化可能な $-180\sim-174^{\circ}\text{C}$ の温度条件で用いることで、超低温 HPLC でこれまで分離することができなかった極性化合物や高沸点化合物の分離を達成し、分離可能な分子種の拡大を試みた。

第七章では、これらの内容を総括するとともに、本研究における問題点を明確にし、今後の展望について述べた。

参考文献

- [1] 松下 至 クロマトグラフィーの創始者 *M. S. ツウェットの生涯と業績*、恒星社厚生閣; 2002.
- [2] 松下 至 *ぶんせき*; 2003, 11, 682-683.
- [3] 原 昭二; 柘植 新; 大谷 肇; 平田 幸夫 *季刊化学総説 クロマトグラフィーの新展*

- 開、日本化学会編; **1990**, No. 9, 1–7, 108, 130.
- [4] 波多野 博行; 花井 俊彦 実験 高速液体クロマトグラフィー、化学同人; **1977**, 1–5.
- [5] 岡澤 敦司 生物工学 **2015**, 93, 345–348.
- [6] 香川 信之 合成高分子クロマトグラフィー、大谷 肇; 寶崎 達也 編、オーム社; **2013**, 201–209.
- [7] Kanazawa, K.; Sunamoto, T.; Matsushima, Y. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5961–5966.
- [8] Ayano, E.; Kanazawa, H. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 738–749.
- [9] Ayano, E.; Okada, Y.; Sakamoto, C.; Kanazawa, H.; Kikuchi, A.; Okano, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1119, 51–57.
- [10] 北川 慎也; 津田 孝雄 機器分析化学、津田 孝雄; 廣川 健 編著、朝倉書店; **2004**, 42–46.
- [11] Smith, R. M.; Burgess, R. J. *J. Chromatogr. A* **1997**, 785, 49–55.
- [12] Fields, S. M.; Ye, C. Q.; Zhang, D. D.; Branch, R. B.; Zhang, J. X.; Okafo, N. *J. Chromatogr. A* **2001**, 913, 197–204.
- [13] Droux, S.; Felix, G. *Chirality* **2011**, 23, E105–E109.
- [14] Shibukawa, M.; Shimasaki, T.; Saito, S.; Yarita, T. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8025–8032.
- [15] Shibukawa, M.; Morinaga, R.; Saito, S. *Bunseki Kagaku* **2016**, 65, 615–624.
- [16] Zhou, S.; Huang, Y.; Dong, X.; Peng, W.; Veillon, L.; Kitagawa, D. A. S.; Aquino, A. J. A.; Mechref, Y. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 6590–6597.
- [17] Henderson, D. E.; O’Conner, D. J. In *Advanced in Chromatography*; Giddings, J. C., Grushka, E., Cazes, J., Brown, P. R., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1984**; Vol. 23, pp 65–95.
- [18] Henderson, D. E.; O’Conner, D. J.; Kirby, J. F.; Sears, C. P., III *J. Chromatogr. Sci.* **1985**, 23, 477–483.
- [19] Beyer, J.; Becker, H.; Martin, R. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, 9, 2433–2441.
- [20] Kaufmann, M. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **1997**, 699, 347–369.
- [21] Sajewicz, M.; Wojtal, L.; Staszek, D.; Hajnos, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, 33, 936–947.
- [22] Pirkle, W. H.; Burke, J. A. *J. Chromatogr.* **1991**, 557, 173–185.
- [23] Sabia, R.; Ciogli, A.; Pierini, M.; Gasparrini, F.; Villani, C. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1363, 144–149.
- [24] Tasaki, Y.; Okada, T. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4155–4160.
- [25] Tasaki, Y.; Okada, T. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1189, 72–76.
- [26] Takahashi, S.; Harada, M.; Okada, T. *Anal. Methods* **2016**, 8, 105–110.
- [27] Pirkle, W. H.; Brice, L. J.; Terfloth, G. J. *J. Chromatogr. A* **1996**, 753, 109–119.

- [28] Wolf, C.; Pirkle, W. H. *J. Chromatogr. A* **1977**, *785*, 173–178.
- [29] Akhtar, S.; Smith, H. A. *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 261–272.
- [30] Genty, C.; Schott, R. *Anal. Chem.* **1970**, *42*(1), 7–11.
- [31] Dericbourg, J. *J. Chromatogr.* **1976**, *123*, 405–410.
- [232] Ishida, Y.; Taki, H.; Oyama, H.; Kitagawa, K.; Matsumoto, K. *Fuel* **2006**, *85*, 2041–2045.

第二章 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

2. 1. 緒言

第一章で述べたように、超低温下における HPLC には、選択係数の向上や不安定な分析対象の安定化、分子振動抑制による分子形状認識に基づいた分離の向上、超低温環境における分子間相互作用の評価手法としての利用といった様々な利点がある。しかし、液体窒素温度 (-196°C) のような超低温条件では、移動相溶媒の凝固により、分析を行うことができなくなってしまう。そこで、低凝固点 (融点) を有する液化ガスを移動相として用いることで、超低温 HPLC が実現可能であると考えた。

第二章では、「液化ガスを移動相として用いる超低温 HPLC システム」の開発に向けた第一段階として、比較的簡易な条件で液化することができる二酸化炭素を移動相として用いることで、液化ガスを移動相として用いる HPLC システムを開発した。二酸化炭素は SFC の移動相として用いられることが知られている[1-7]。しかし、一般的に SFC 分離では、超臨界状態の二酸化炭素を用いるため、SFC の分離は 35°C 以上の温度条件で行われる。近年では、臨界点以下の温度条件で、液体もしくは亜臨界二酸化炭素と極性モディファイヤー (メタノールやエタノール、水など) の混合物を移動相として用いるクロマトグラフィーが注目されている[8-11]。また、低温下 ($>-47.5^{\circ}\text{C}$) で液化二酸化炭素移動相を用いたエナンチオマー分離も報告されている[12, 13]。しかし、純粋な液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC の基礎的な分離挙動は十分に研究されていない。そこで、液化二酸化炭素移動相を用いる HPLC における -35 から -5°C の低温における低分子化合物の分離挙動に関する研究を行った。

2. 2. 実験

2. 2. 1. 低温 HPLC のための装置

Figure 2-1 に示すように、本研究で用いた装置は CO_2 ガスボンベ、自動ロータリーバルブインジェクター (Valve Unite FCV-20AH₂, Shimadzu)、分離カラム (Chemcobond 5-ODS-H 1.0×150 mm と Chemcobond 5-Si 1.0×150 mm, Chemco)、背圧レギュレーター (KPB1L0A422P2000, Swagelok)、二つの圧力計 (KDM30, Asone)、ガス流量計 (Mass Flow Sensor Model 3810DS II, Kofloc Kyoto)、バンドパスフィルタ (254.66 ± 4.68 nm, VPF-25C-10-12-25370, Sigma Koki) を備えた UV 光源 (high-power UV-Vis fiber light source L1029, Hamamatsu Photonics)、光ファイバー (CUV-CCE, Ocean Optics)、光電子増倍管 (H5783-06, Hamamatsu Photonics) から構成される。低温恒温槽は冷凍庫 (38 L JF-NU40B-S, Haier) とスターリング冷却機 (SC-UB04, Twinbird)、温度コントローラー (TC-1N, Asone) から構成される。

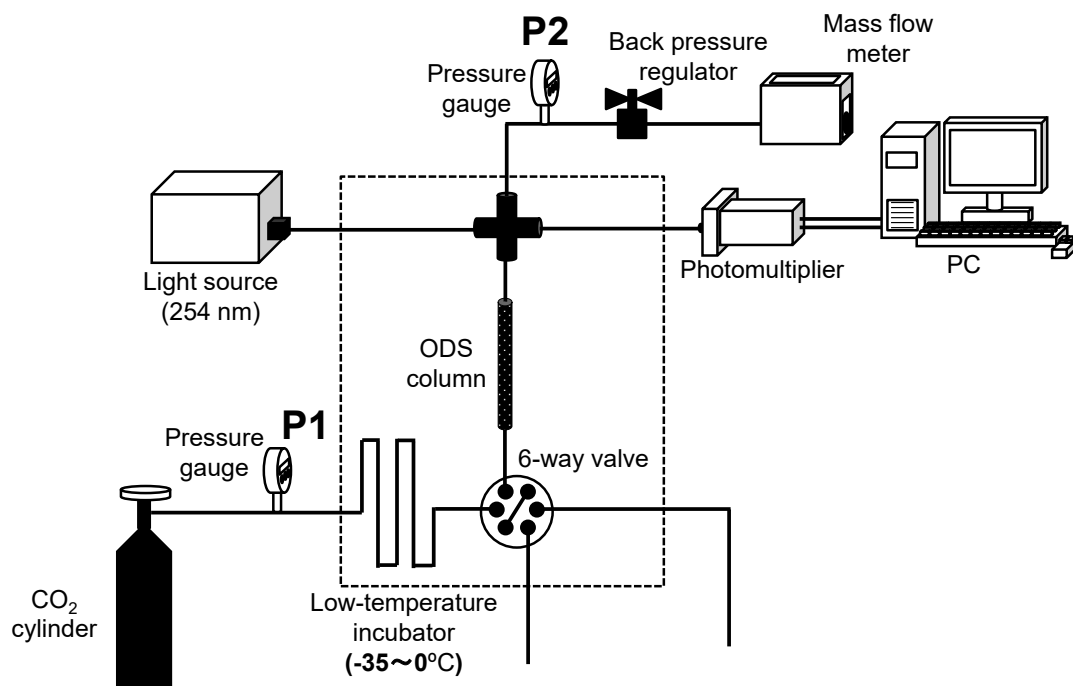


Figure 2-1 液化 CO₂ 移動相を用いる低温 HPLC の装置概略図

2. 2. 2. 熱量測定

冷却ユニットを備えた DSC-8230L (Rigaku) 熱量計を用いて示差走査熱量測定(DSC)を行った。乾燥したオクタデシルシラン(ODS)粒子(3.9 mg)を試料として供して、空気雰囲気中で 20 から -50°C の範囲で測定を行った。

2. 2. 3. 試薬

試料溶媒 (アセトニトリル、ヘキサン) と分析試料 (ナフタレン、アントラセン、ピレン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ブチルベンゼン、ペンチルベンゼン、ナフトキノン、アントラキノン) は和光純薬工業より購入した。ODS と未修飾シリカカラムを使用する場合に、試料溶媒としてアセトニトリルとヘキサンをそれぞれ用いた。

2. 3. 結果と考察

2. 3. 1. 低温クロマトグラフィーシステムの開発

本システムでは、事前冷却管と試料導入部、カラム、検出セルを低温恒温槽内で冷却した。気体状態の CO₂ を事前冷却管で液化させ、液化 CO₂ をポンプの充填圧を利用してカラムに送液した。i.d. 0.130 mm のサンプルループを備えた自動ロータリーバルブを用いて、500 ms の注入時間で試料溶液をカラムに導入した。CO₂ が液体状態となる低温・高圧条件で検出を行った。気体状態の CO₂ の流量 (V_{vol}) は室温・大気圧条件下で流量計を用いて測定を行った。

背圧レギュレーターを用いてカラムの出口側の圧力 (P_2) を調節することで、入口と出口の間の圧力の差 ($\Delta P = P_1 - P_2$) を制御し、流速を制御した。Figure 2-2A に示すように、 -35 と -10°C における圧力差 (ΔP , P_1 は 5.3 MPa) と t_0 ベース流速 (u_{t0}) の関係进行评估した。いずれの温度においても、 $r^2 = 0.999$ と 0.998 という直線関係が得られ、圧力差による流速制御が可能であった。また、直線関係が得られたことから、出口側の圧力低下による液化 CO_2 の膨張は起こっていないと考えられる。さらに、液化 CO_2 の低粘性 ($124\text{ }\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$, -10°C , 5.3 MPa [14]) により、約 0.5 MPa という比較的低い圧力で 0.1 cm/s という線流速が得られた。温度の低下により液化 CO_2 の粘性は増加するため、 -10°C における $\Delta P - u_{t0}$ の関係の傾き ($0.18\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$) は -35°C における傾き ($0.13\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$) よりも大きくなった。Figure 2-2B に示すように、カラム温度と傾きの値 ($u_{t0}/\Delta P$) の関係も評価したところ、 $u_{t0}/\Delta P$ は温度の増加とともに直線的に増加した。

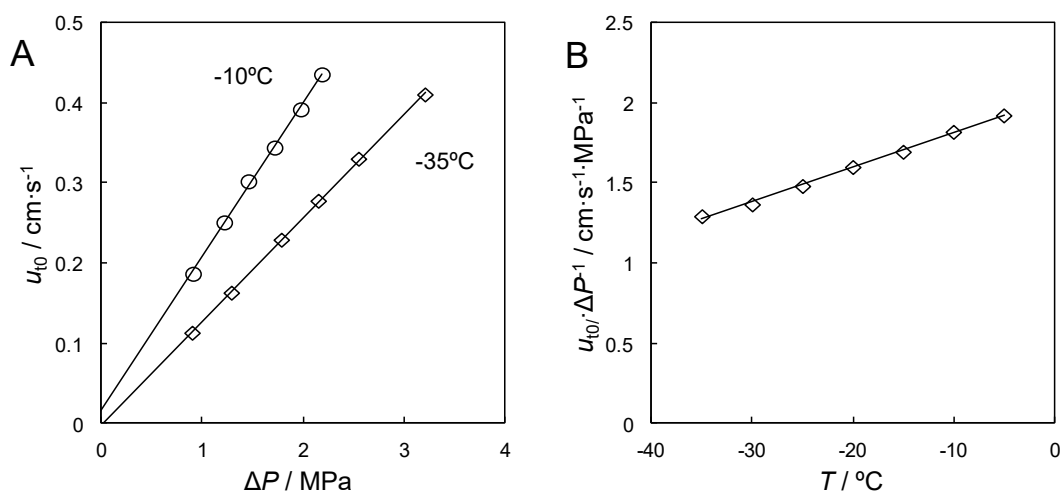


Figure 2-2 (A) -35°C (\diamond) と -10°C (\circ) における圧力差 (ΔP) の流速 (u_{t0}) への影響、(B) 傾きとカラム温度の関係

入口圧 : 5.3 MPa 、カラム : ODS (d.p. $5\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ mm}$)

t_0 ベースの流速 (u_{t0} , cm/s , 「カラム長/ t_0 」により計算) と流量 (V_{vol} , cm^3/s , 流量計により測定) の比から V_{vol}/u_{t0} (cm^2) を得ることができ、この値は液化 CO_2 の密度と関連した値となる (高い密度では大きな V_{vol}/u_{t0})。Figure 2-3 に示すように、温度の低下により V_{vol}/u_{t0} はわずかに増加した (-35°C の値が -5°C の 1.08 倍)。一方で、 -35°C での CO_2 の密度 (1110 kg/m^3) は -5°C での密度 (975 kg/m^3) の 1.14 倍となる[14]。そのため、この温度範囲においてはカラムへ供給される CO_2 は液体状態を保持していると考えられる。

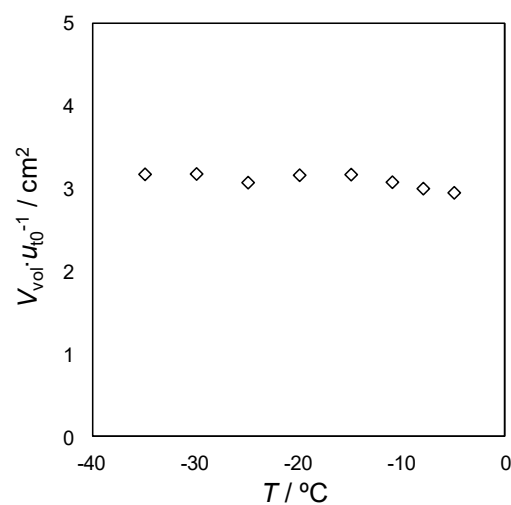


Figure 2-3 温度と t_0 ベース流速(u_{t0})に対する体積流量(V_{vol})の関係
 カラム : ODS (d.p. 5 μm , i.d. 0.1 \times 15 cm)

2. 3. 2. 保持への温度の影響

Figure 2-4 に、ODS カラムと液化 CO_2 移動相を用いた低温 HPLC による多環芳香族炭化水素 (PAHs) のクロマトグラムを示す。PAHs の保持挙動より、ODS 固定相と液化 CO_2 の組み合わせでは、逆相モードによる保持となることが分かった。Figure 2-4 に示すように、温度の低下に伴って保持は増加した（例えば、 -15 、 -25 、 -35°C におけるアントラセンの保持比はそれぞれ 4.8、6.7、9.6）。この挙動は一般的な HPLC における挙動と同様であった。

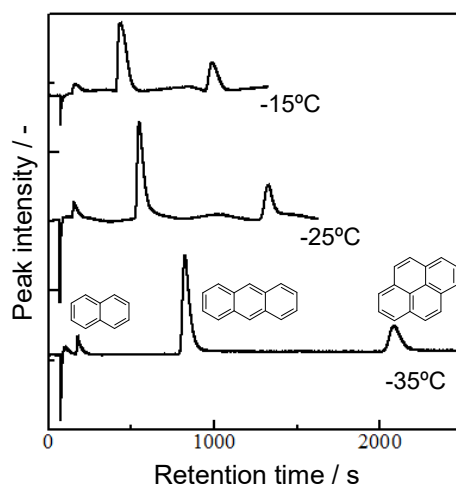


Figure 2-4 -35 、 -25 、 -15°C における液化 CO_2 移動相を用いる低温 HPLC によるナフタレン、アントラセン、ピレンの分離
 流速：2 mm/s、カラム：ODS (d.p. 5 μm , i.d. 0.1 \times 15 cm)

保持比と温度の関係の評価をさらに行った。第一章で述べたように、クロマトグラフィーにおける保持比 (k) は(1-1)式 (van't Hoff 式) によって与えられることが知られている。**Figure 2-5A** に -35 から -5°C の温度範囲における PAHs の van't Hoff プロットを示す。全体的な挙動としては、保持比は温度の低下 ($1/T$ の増加) により増加したが、高温と低温の各範囲における保持比と温度の関係は異なっていた。すなわち、 -15°C 以下の温度 ($1/T$ 値で 0.00395 – 0.00420) の傾きは、 -15°C 以上の温度 ($1/T$ 値で 0.00373 – 0.00380) の傾きよりも大きくなった。**Figure 2-5B** に示すように、アルキルベンゼン類の分析においても、類似の挙動が観測された。また、**Figure 2-5** に示される保持比の再現性 (%RSD ($n=3$)) が<3%) は高かった。一般的に、van't Hoff プロットにおける非線形の関係は固定相の相転移を示唆する。しかし、Kimura らの報告によると、移動相としてメタノールを用いた際の 0 から -40°C の温度範囲の van't Hoff プロットでは固定相の相転移は観測されていない [15]。

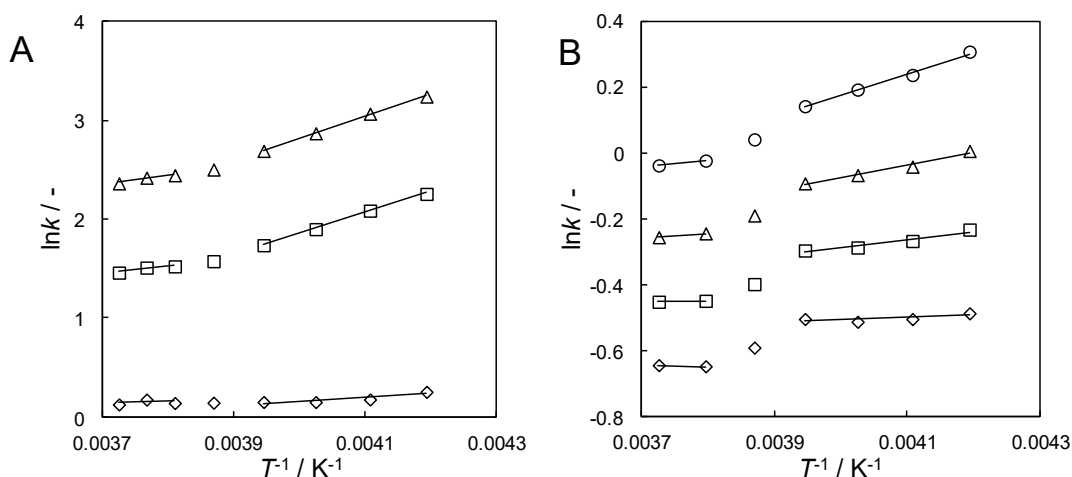


Figure 2-5 温度と保持比の関係 (A) PAH : ナフタレン (\diamond)、アントラセン (\square)、ピレン (\triangle)、(B) アルキルベンゼン類 : エチルベンゼン (\diamond)、プロピルベンゼン (\square)、ブチルベンゼン (\triangle)、ペンチルベンゼン (\circ)
その他の条件は Figure 2-4 と共通

Cole と Dorsey は DSC 測定を用いることで 27 から 36°C で ODS 固定相の相転移を観測した[16]。本研究においても低温の空気雰囲気下で乾燥した ODS 粒子の DSC 測定を行ったが、20 から -50°C の温度範囲において相転移は観測できなかった。また、Hansen らは 39 から 52°C の温度範囲での ODS 固定相の相転移に関する研究を行った[17]。Hansen の研究において、相転移は乾燥した ODS 粒子には観測されず、メタノールと共存する ODS において観測された。Hansen らは、相転移は ODS の空間格子からのメタノールの放出に由来するものであると結論付けた。本研究においても、ODS 鎖に対する CO_2 の溶媒和・脱溶媒和による相転移の可能性が考えられた。

そこで、未修飾シリカカラムと CO_2 移動相を用いて、キノン類の分離挙動に関する評価を行った。Figure 2-6 に示すように、この分離ではシリカゲル固定相へのナフトキノンの保持がアントラキノンの保持よりも大きくなり、順相モードによる保持が観測された。さらに、Figure 2-4 と 2-5 に示した逆相モードと同様に、温度の低下により保持が増加した。Figure 2-7 に、-30 から -5°C の温度範囲におけるキノン類の van't Hoff プロットを示す。van't Hoff プロットは両化合物において非線形の関係となり、傾きの変化が約 -10 から -15°C ($1/T$ で 0.00380 - 0.00388) で観測された。ODS と未修飾シリカカラムを用いた両方の分離モードにおいて、ほぼ同じ温度で傾きの変化が観測された。そのため、Figure 2-5 と 2-7 の両方で観測された非線形の関係は、Hansen らが報告したような移動相の ODS 固定相への溶媒和・脱溶媒和に由来する現象ではなく、液化 CO_2 移動相の状態変化に由来するものであると考えられる。

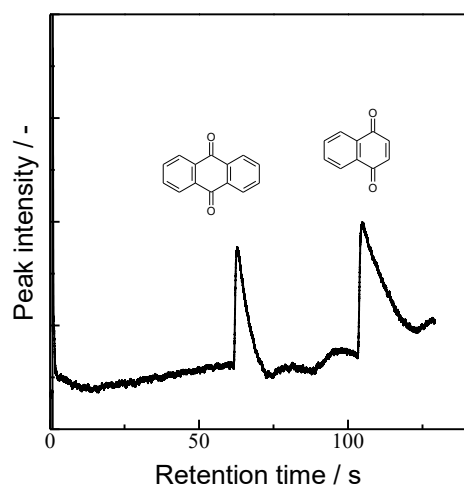


Figure 2-6 -35°C における液化 CO_2 移動相を用いる低温 HPLC によるナフトキノンとアントラキノンの分離

カラム：未修飾シリカ (d.p. $5\ \mu\text{m}$, i.d. $0.1 \times 15\ \text{cm}$)、その他の条件は Figure 2-4 と共通

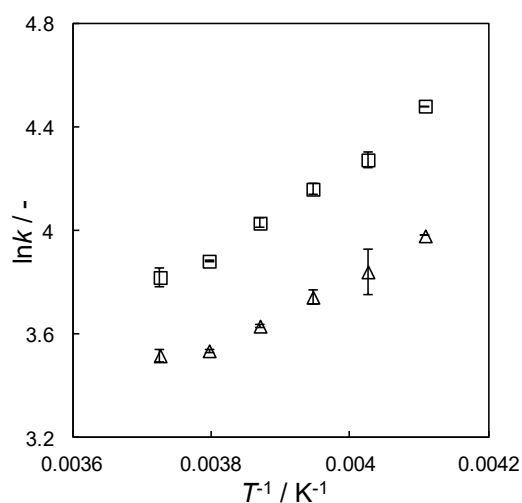


Figure 2-7 温度とキノン類の保持比の関係

キノン類：ナフトキノン (□)、アントラキノン (△)、その他の条件は Figure 2-4 と共通

van't Hoff プロットの非線形の関係が CO_2 の状態変化に由来する現象であるのかを確認するために、液化 CO_2 の性質への温度の影響を評価した。Figure 2-8 に示すように、粘性と密度は温度の低下に伴って増加したが、変化は連続的（わずかに曲線的な関係）であり、約 -15°C において大きな変化は観測されなかった[14]。モディファイヤーを使用しない純

粋な CO₂を用いる SFC において、分析物の保持比は移動相の密度に依存する[8]。Figure 2-8 に示すように、4–6 MPa の液化 CO₂ においては–35°C の密度は 0°C のおよそ 1.2 倍であった。一方で、–35°C のメタノールの密度は 0°C の約 1.04 倍であった[16]。液化 CO₂ は有機溶媒と比較して密度変化が大きいため、その密度変化が非線形な van't Hoff プロットの原因の一つとなっていると考えられる。

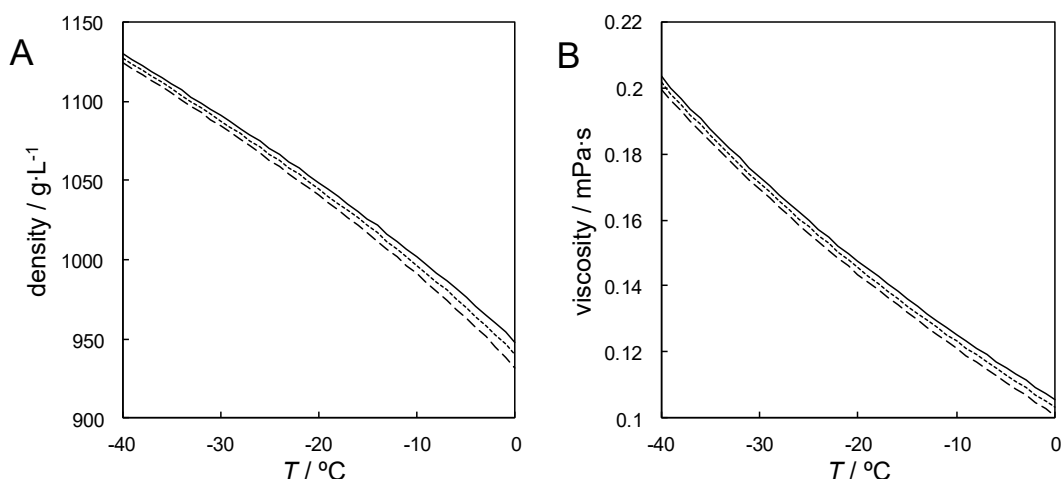


Figure 2-8 液化 CO₂ の(A)密度、(B)粘性への温度の影響
実線、点線、破線はそれぞれ 6、5、4 MPa の圧力条件

2. 3. 3. ODS カラムの選択性に対する温度の効果

ODS カラムにおける保持挙動をさらに評価するために、 ΔH^0 と分析物の構造的性質の関係を評価した。高温と低温の両方の領域において、(1-1)式を用いて Figure 2-5 の傾きから ΔH^0 の値を計算した（一連の ΔH^0 の値は各試料成分より計算）。Figure 2-9A と B に、 ΔH^0 と構造的性質（PAHs の二重結合数とアルキルベンゼン類のアルキル鎖長）の関係を示す。Figure 2-9 に示したエラーバーは、Figure 2-5 の傾きの SD 値から計算した。各温度の領域で、いずれの化合物群においてもほぼ線形の関係が得られた。Figure 2-9A の低温（○）と高温（◇）領域の傾きの値はそれぞれ -5340 ± 240 と -2240 ± 820 J/mol であった。また、Figure 2-9B においてこれらの値はそれぞれ -1560 ± 110 と -744 ± 410 J/mol であった。いずれの化合物群においても、低温領域の傾きは高温領域の傾きよりも二倍程度大きくなったため、低温領域において炭化水素類に対する ODS 固定相の選択性が向上していることが分かった。

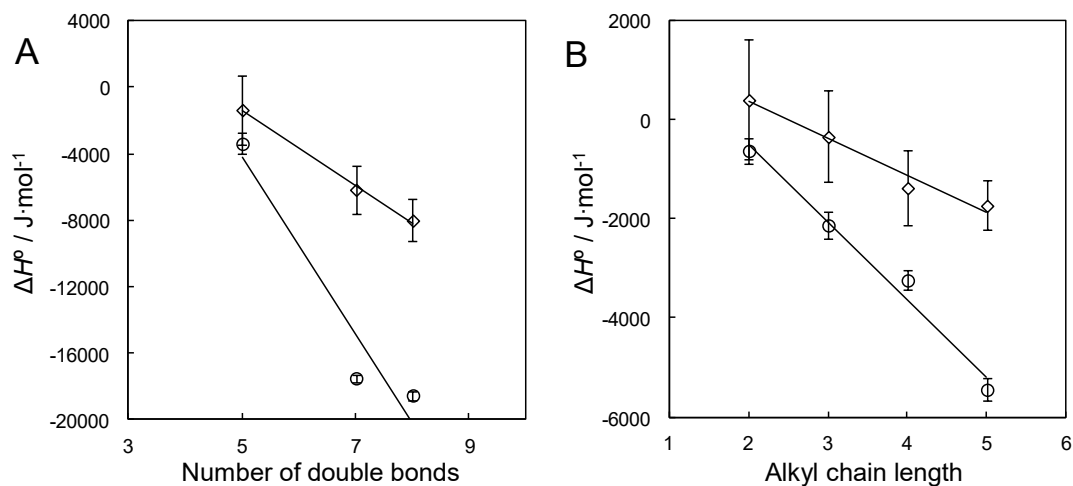


Figure 2-9 ΔH° と分析物の構造的性質の関係 (A) PAHs の二重結合数、(B) アルキルベンゼン類のアルキル鎖の炭素数
 ΔH° の計算の温度範囲：-11 から -5°C (◇)、-35 から -20°C (○)、エラーバーは標準偏差 ($n = 3$) を示す、その他の条件は Figure 2-4 と共通

2. 3. 4. 理論段数への温度の影響

固定相として ODS カラムを、試料成分として PAHs を用いた際の温度と分離効率の関係を評価した。一般的に温度の低下により分離効率は低下する。実際に、0 から -30°C の低温領域で ODS 固定相とメタノール移動相を用いた場合に、温度の低下による分離効率の低下が報告されている[13]。しかし、本研究においては、Figure 2-10A に示すように、低温条件で、より高いカラム効率が得られた。ナフタレン、アントラセン、ピレンの -35°C における理論段数はそれぞれ -5°C の 5.9、7.8、4.1 倍に増加した。また、Figure 2-10A から分かるように、理論段数と温度の関係は、Figure 2-5A と同様に 2 つの領域で変化しており、低温領域 (-35 から -15°C) の傾きが高温領域 (-15 から -5°C) の傾きよりも大きくなった。

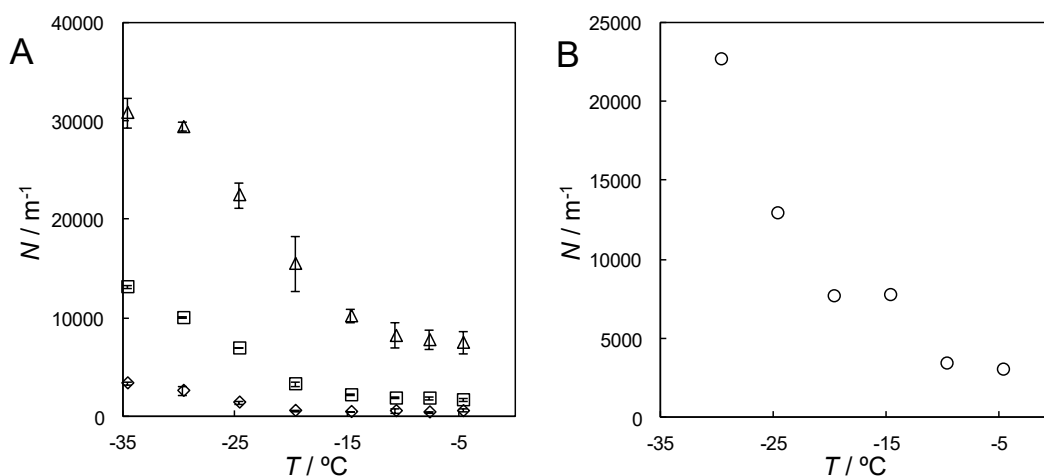


Figure 2-10 温度とカラム効率の関係 (A) ODS カラム、(B) 未修飾シリカカラム

試料成分: ナフタレン (\diamond)、アントラセン (\square)、ピレン (\triangle)、ナフトキノン (\circ)、
その他の条件は Figure 2-4 と共通

未修飾シリカカラムを用いた場合の、ナフトキノンの温度と分離効率の関係についても同様に検討した。Figure 2-10B に示すように、温度の減少により分離効率は向上し、 -30°C の理論段数は -5°C の 4.8 倍となった。さらに、Figure 2-10A と同様に低温域での分離効率 (-30 から -20°C) は高温域 (-15 から -5°C) よりも温度依存性が大きくなった。両カラムにおける挙動から、分離効率への温度の影響は固定相の種類には依存しないことがわかった。

2.4. 結論

第二章では、液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLC の開発とその分離挙動について記した。液化二酸化炭素移動相と ODS カラムとの組み合わせでは逆相モードでの分離に、未修飾シリカカラムとの組み合わせでは順相モードでの分離になることがわかった。両分離モードで、van't Hoff プロットにおいて非線形の関係が得られ、約 -15°C で ΔH° が変化した。また、両分離モードで、一般的な HPLC の傾向に反して低温下において高い分離効率を示した。この温度の低下に伴う分離効率の向上は、超低温下で HPLC 分離を行う上で大きな利点となることが期待できる。

両カラムにおいて、温度と保持、温度と分離効率の両方の関係で、挙動の変化が約 -15°C で観測された。これらの挙動の変化は、約 -15°C でカラム内に存在する液化二酸化炭素の状態変化に由来する現象である可能性が考えられる。また、この研究では van't Hoff プロットの式中の相比 ((1-1) 式中の $\ln \Phi$) が一定であるという仮定の下に考察を行っているが、

この仮定に対する証拠はなく、相比の変化が保持と分離効率の両方に影響を及ぼす可能性も考えられる。この現象に対する詳細な検討は第三章で述べる。

参考文献

- [1] Fields, S. M.; Lee, M. L. *J. Chromatogr. A* **1985**, *349*, 305–316.
- [2] Abbott, E.; Veenstra, T. D.; Issaq, H. J. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1223–1230.
- [3] Li, F.; Hsieh, Y. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1231–1237.
- [4] Bamba, T. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1274–1278.
- [5] Xiang, Y.; Dunetz, J. R.; Lovdahl, M. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1293*, 150–158.
- [6] Chennuru, N. L.; Choppari, T.; Duvvuri, S.; Dubey, K. P. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 3004–3010.
- [7] Biba, M.; Regalado, E. L.; Wu, N.; Welch, C. J. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1363*, 250–256.
- [8] Lesellier, E. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1238–1251.
- [9] Mangelings, D.; Vander Heyden, Y. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1252–1273.
- [10] Layton, C.; Ma, S.; Wu, L.; Lee, H.; Fandrick, K.; Fandrick, D.; Senanyake, C.; Yee, N.; Grinberg, N.; Clark, J. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 3941–3948.
- [11] Taguchi, K.; Fukusaki, E.; Bamba, T. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1362*, 270–277.
- [12] Pirkle, W. H.; Brice, J. L.; Terfloeth, G. J. *J. Chromatogr. A* **1996**, *753*, 109–119.
- [13] Wolf, C.; Pirkle, W. H. *J. Chromatogr. A* **1997**, *785*, 173–178.
- [14] Ohmori, T. EOS-SCx ver.0.2w.
- [15] Kimura, T.; Ohta, H.; Wada, K.; Jinno, K.; Ueta, I.; Saito, Y. *Chromatographia* **2013**, *76*, 921–927.
- [16] Cole, L. A.; Dorsey, J. G. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1317–1323.
- [17] Hansen, S. J.; Callis, J. B. *J. Chromatogr. Sci.* **1983**, *21*, 560–563.

第三章 液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC における分離効率への カラム構造の影響

3. 1. 緒言

第二章で述べたように液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC の基礎的な分離挙動に関する調査を行うと、一般的な HPLC 挙動に反して、温度の低下により分離効率が向上するという挙動が観測された。また、約 -15°C において保持と分離効率双方の挙動が変化する現象が観測された。しかし、それらの現象の詳細な原因に関しては明らかではない [1]。また、第二章では van't Hoff 式の相比を一定と仮定した上で考察を行っており、相比の変化が保持や分離効率の双方の挙動に影響を及ぼす可能性が考えられる。相比に変化を及ぼす現象として、カラム内での「二酸化炭素の凝集」が考えられる。第二章で用いたカラムは ODS 修飾と未修飾の一般的な多孔性シリカ粒子の充填型のカラムである。一方で、カラム技術の向上により、高性能な分離が達成可能な、微小粒子充填型[2, 3]やコアシェル粒子充填型[3, 4]、モノリス構造型[5-10]といった HPLC 用のカラムが開発されている。カラム構造が異なる場合には、二酸化炭素の凝集挙動に違いが生じることが予想される。そのため、第三章では、さまざまな分離条件下での液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLC における分離挙動に対してカラム構造の及ぼす影響を評価した。

3. 2. 実験

3. 2. 1. 装置

本章で用いる装置は、先の章とほぼ同様の構成となっている[1]。装置は CO_2 ガスボンベ、自動ロータリーバルブインジェクター(Valve Unite FCV-20AH₂, Shimadzu)、背圧レギュレーター(KPB1L0A422P2000, Swagelok)、二つの圧力計(KDM30, Asona)、ガス流量計(Mass Flow Sensor Model 3810DS II, Kofloc Kyoto)、バンドパスフィルタ(254.66 ± 4.68 nm, VPF-25C-10-12-25370, Sigma Koki)を備えた UV 光源(high-power UV-Vis fiber light source L1029, Hamamatsu Photonics)、光ファイバー(CUV-CCE, Ocean Optics)、光電子増倍管(H5783-06, Hamamatsu Photonics)、内部でヒーター加熱を行うことで温度制御が可能な低温恒温槽(38 L JF-NU40B-S, Haier)から構成される。この装置では、入り口側の圧力を CO_2 ボンベに取り付けたレギュレーターを用いて制御した。背圧レギュレーターで入口と出口の圧力の差 ($\Delta P = P_{\text{in}} - P_{\text{out}}$) を調整することで流速 (v_0) を制御した。 t_0 ベースの流速 ($v_0 = (\text{カラム長}) / (\text{溶媒ピークの溶出時間})$) を流速として用いた。平均圧力 ($P_{\text{av}} = (P_{\text{in}} + P_{\text{out}}) / 2$) をカラム内の CO_2 の特性評価のために用いた。5 μm d.p.の全多孔性 ODS 粒子 (Chemcobond 5-ODS-H, 0.10×15 cm, Chemco)、2 μm d.p.の小さな非多孔性 ODS 粒子 (Presto FF-C18, 0.10×3 cm, Imtakt)、5 μm d.p.のコアシェル ODS 粒子 (Kinetex 5u C18, 0.21×15 cm, Phenomenex) を充填カラムの検討のために使用した。また、ODS シ

リカモノリスカラム (MonoBis low pressure type 11 nm, 0.10 × 15 cm, Kyoto Monotech) も検討に用いた。

3.2.2. 試薬

移動相として用いる二酸化炭素（純度：> 99.995%）を大陽日酸より購入した。すべての試料成分と、試料溶媒として用いたアセトニトリルは和光純薬より購入した。各成分の試料濃度は 1 mM とした。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 保持に及ぼす粒子タイプの影響

充填(fully porous; FP)、微小非多孔(small nonporous; SNP)、コアシェル(core-shell; CS)の三種類の充填カラムを用いて分離挙動への温度の影響を評価した。 $P_n = 5.3$ MPa、 $v_{t0} = 2$ mm/s の条件下で、FP と CS カラムを用いた際の $-30 \sim -5^\circ\text{C}$ の各温度におけるクロマトグラムを Figure 3-1 に示す。両カラムにおいて温度の低下により、試料成分の保持が増加した。一方で、SNP カラムにおいては、 CO_2 移動相を送液すると、頻繁にカラムの閉塞が起こった (CO_2 が凝固した)。この閉塞は、他のカラム (d.p. 5 μm) と比較して SNP カラム (d.p. 2 μm) 内の流路が狭いことが原因であると考えられる。そのため、SNP カラムの分離挙動の評価は以降の項では行わなかった。

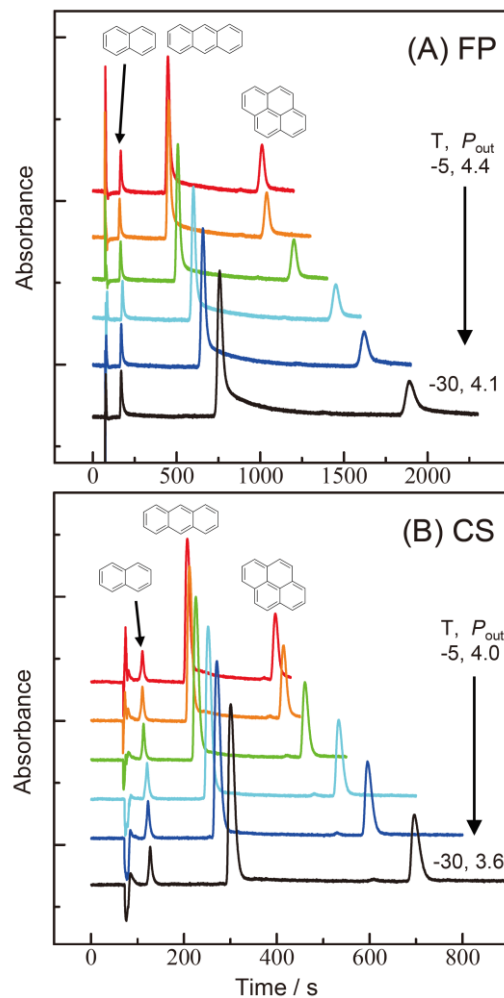


Figure 3-1 様々な温度におけるクロマトグラム

カラム : (A) FP、(B)CS、温度 : -5 、 -10 、 -15 、 -20 、 -25 、 -30°C 、 v_{t0} : 2 mm/s 、 P_{in} : (A) 4.4 から 4.0 MPa 、(B) 4.1 から 3.6 MPa 、試料成分 : ナフタレン、アントラセン、ピレン

温度が低下すると、液化 CO_2 の粘性が増加 (-5 から -30°C で 0.11 から $0.17\text{ mPa}\cdot\text{s}$ [11]) するため、Figure 3-1 に示すように P_{out} を減少 (ΔP を増加) させることで流速の制御を行った。FP と CS カラムにおける四条件下 ($v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{in} = 5.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2\text{ mm/s}$ と $P_{in} = 5.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2\text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3\text{ MPa}$) におけるカラム温度と保持比の関係 (van't Hoff プロット) を Figure 3-2 に示す。全ての条件において、それぞれの化合物の保持比は温度の低下により増加し、van't Hoff プロットの傾きが約 -15°C ($1/T = 0.0039$) で変化した。van't Hoff プロットの傾きが約 -15°C で変化するという挙動は、第二章での結果と一致している[1]。Figure 3-2 に示すように、分析条件の違いは保持比に影響を及ぼさなかった。検討した実験条件においては、液化 CO_2 の密度は

ほぼ一定であるため[11]、超臨界 CO₂ 移動相を用いた SFC[12]とは異なり、圧力の保持比への影響は無視することができる。

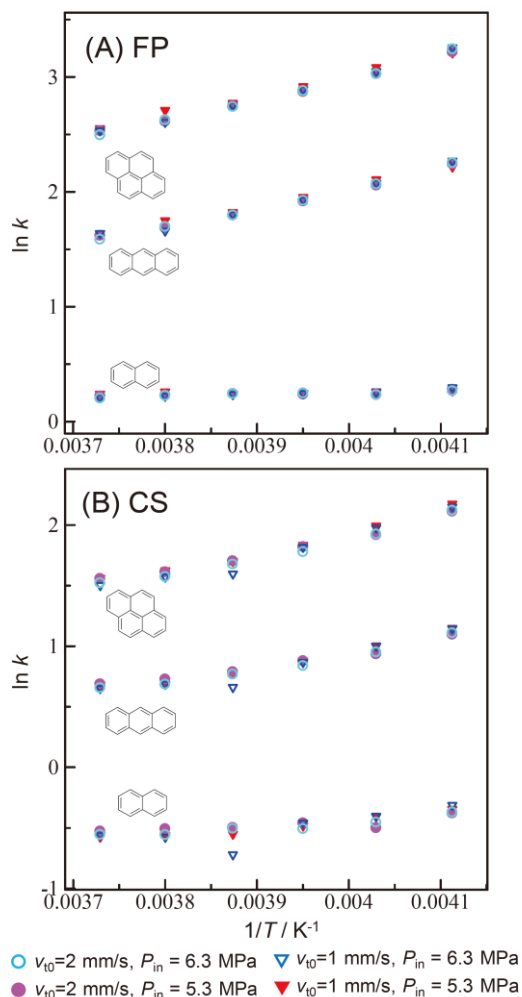


Figure 3-2 検討した四条件における温度とナフタレン、アントラセン、ピレンの保持比の関係

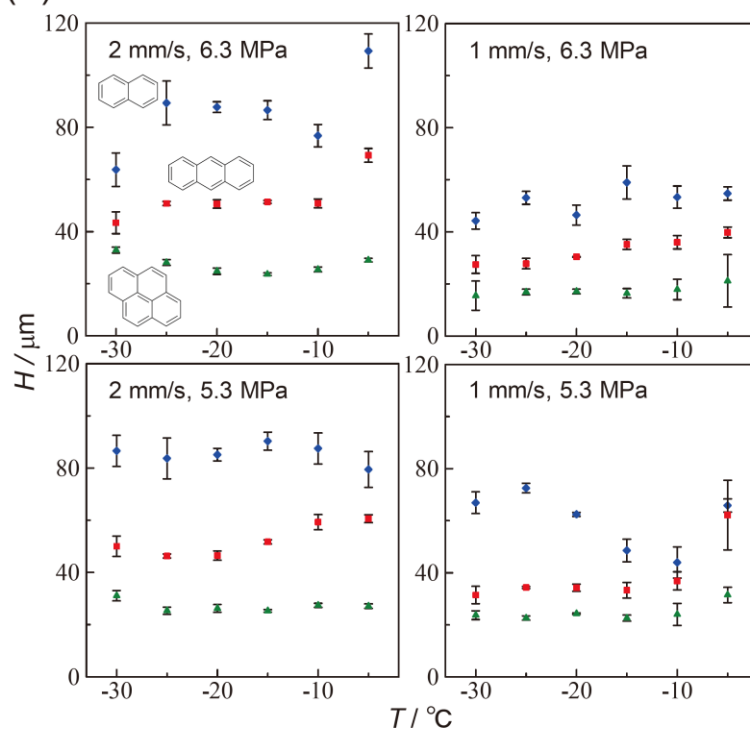
(A) FP カラム、(B) CS カラム

3. 3. 2. 分離効率に及ぼす粒子タイプと分析条件の影響

分離効率への温度の影響を前項と同じ四分析条件 ($v_{t0} = 1$ mm/s と $P_{in} = 5.3$ MPa、 $v_{t0} = 2$ mm/s と $P_{in} = 5.3$ MPa、 $v_{t0} = 1$ mm/s と $P_{in} = 6.3$ MPa、 $v_{t0} = 2$ mm/s と $P_{in} = 6.3$ MPa) で評価した。ここで、分離効率は $H = L / (5.545 \times (t_R / W_{1/2})^2)$ (L 、 t_R 、 $W_{1/2}$ はそれぞれカラム長さ、溶出時間、ピーク半値幅) で計算される理論段高さ (H) を用いて評価した。Figure 3-3 に示すように、分離効率は若干温度の影響を受けたが、FP と CS 双方のカラム

において温度とカラム効率の間の特徴的な関係は観測されなかった。原因は不明ではあるが、温度の減少によって分離効率の向上が観測された第二章の結果とは異なる挙動を示した。また、全体的に $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ の時の分離効率は $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ の時よりも良くなる傾向が見られた。この現象は、 $H = A + B/u + Cu$ 式の C 項が、本研究の条件では分離効率に対して支配的であることを示唆した。さらに、分離効率への P_m の明らかな影響は観測されなかった。しかし、両方のカラムにおいて（CS カラムにおいて顕著に）、良い分離効率が $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ と $P_m = 6.3 \text{ MPa}$ の条件で得られた。例えば、 -30°C で CS カラムを用いた際のナフタレン、アントラセン、ピレンの理論段高はそれぞれ 21、18、12 μm であり、それは他の流速・圧力条件の約 30 – 40、25 – 50、50 – 70%の値であった。

(A) FP



(B) CS

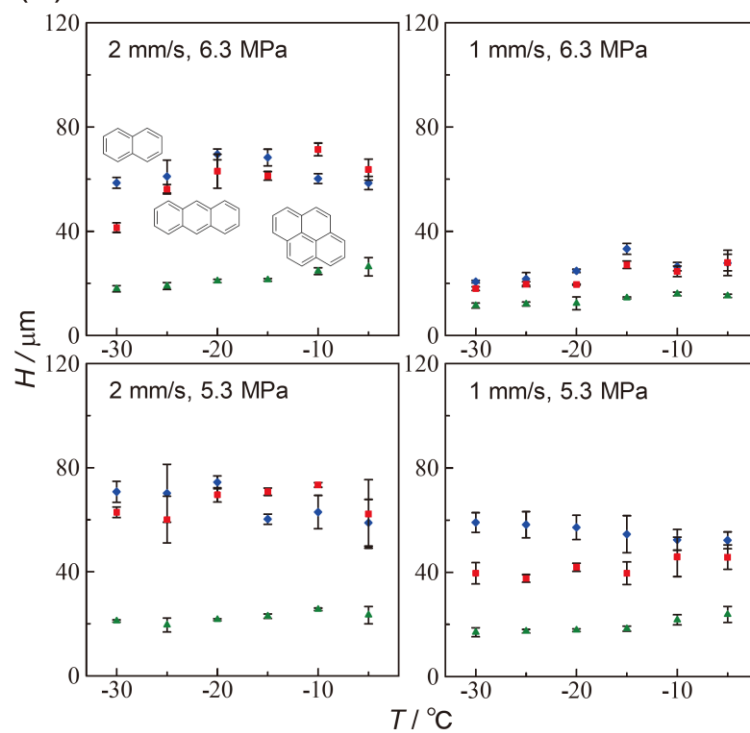


Figure 3-3 四条件下における温度のカラム効率への影響 (A) FP、(B) CS カラム
エラーバーは標準偏差 ($n=3$)

Figure 3-1 に示すように、ピークのテーリング（非対称のプロファイル）が FP と CS の両カラムにおいて観測された。FP カラム（ $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ 、 $P_{in} = 5.3 \text{ MPa}$ ）を用いた際のナフタレン、アントラセン、ピレンのテーリング係数(T)は、 -5 と -30°C で 3.0/10.1/2.0 と 3.3/6.6/3.3 であった。 $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ 、 $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ 、 -30°C の条件において、FP と CS カラムにおける T 値はそれぞれ 2.1/1.4/1.4 と 1.4/1.7/2.1 であった。そのため、入口圧と流速、温度がピーク幅（分離効率）とピークプロファイルの両方に影響を及ぼすことがわかった。

3. 3. 3. カラム中の CO_2 挙動の評価

3. 3. 1. 節で述べたように、液化 CO_2 移動相の凝固による SNP カラムの閉塞が観測された。そこで、カラム内の CO_2 の挙動を評価するために、次の式を用いて各カラムの多孔度 (ϕ)（空隙率）を推定した。

$$v_{t0} = \frac{Q_L}{A_0 \phi} \quad (3-1)$$

$$Q_L = Q_G \frac{\rho_G}{\rho_L} \quad (3-2)$$

ここで、 A_0 と Q_L はカラム空隙の断面積とカラム内における液体状態の体積流量であり、 Q_G 、 ρ_G 、 ρ_L はカラム出口で測定された気体状態の CO_2 の流量、大気圧条件下における気体状態と P_{av} における液体状態の CO_2 の密度である。

FP と CS の両カラムの各温度でのカラム多孔度を四分析条件（ $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 5.3 \text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 5.3 \text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ ）において測定した。Figure 3-4 に示すように、両カラムにおいてカラム多孔度の温度依存性は顕著には見られなかった。FP カラムにおける多孔度は、CS カラムとは対照的に P_{in} と v_{t0} の両方に依存性を示した。この結果は、CS カラムと比較して FP カラムでは CO_2 が凝固しやすいことを示唆した。FP カラムにおいて、 $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ での多孔度は $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ よりも明らかに小さく、低流速が CO_2 移動相の凝固の原因であると考えられる。カラム内での CO_2 の凝固はカラム構造の不均一化を引き起こす。しかし、Figure 3-3 に示すように、分離効率は $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ よりも $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ の方が良い結果となった。さらに、凝固が起こると移動相と固定相の体積比に変化が生じることが予想されるが、Figure 3-2 に示すように CO_2 の凝固は保持に影響を及ぼさなかった。

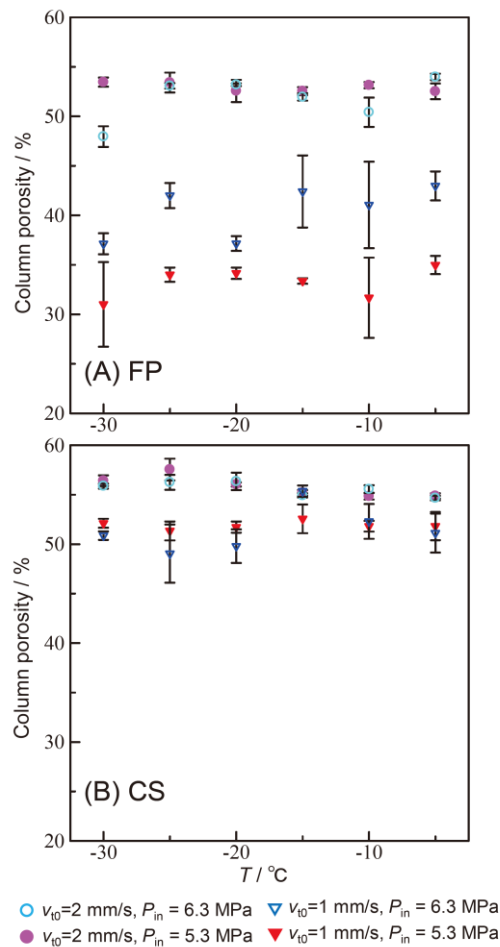


Figure 3-4 四条件下における温度とカラム多孔度の関係 (A) FP、(B) CS カラム
エラーバーは標準偏差 ($n=3$)

分析中の体積流量の変化を Figure 3-5 に示す。両方のカラムにおいて、 -5°C での流量は $P_{in}=6.3$ MPa で不安定であり、流量が閉塞により減少し、閉塞の解消により増加していることが示唆された。一般的には低温条件下において凝固は起こりやすくなるが、流量は -5°C よりも -30°C の方が安定であった。一方で、一般的に高圧条件において凝固は起こりやすくなるため、 $P_{in}=6.3$ MPa では $P_{in}=5.3$ MPa と比較して流量が不安定となった。Figure 3-5 に示す流量の変動は、カラム内で CO_2 の閉塞と閉塞の開放が繰り返し起こっていることを示唆した。カラム内で起こる複雑な CO_2 の凝固挙動と、閉塞挙動と分離効率の関係を理解するにはさらなる研究が必要である。

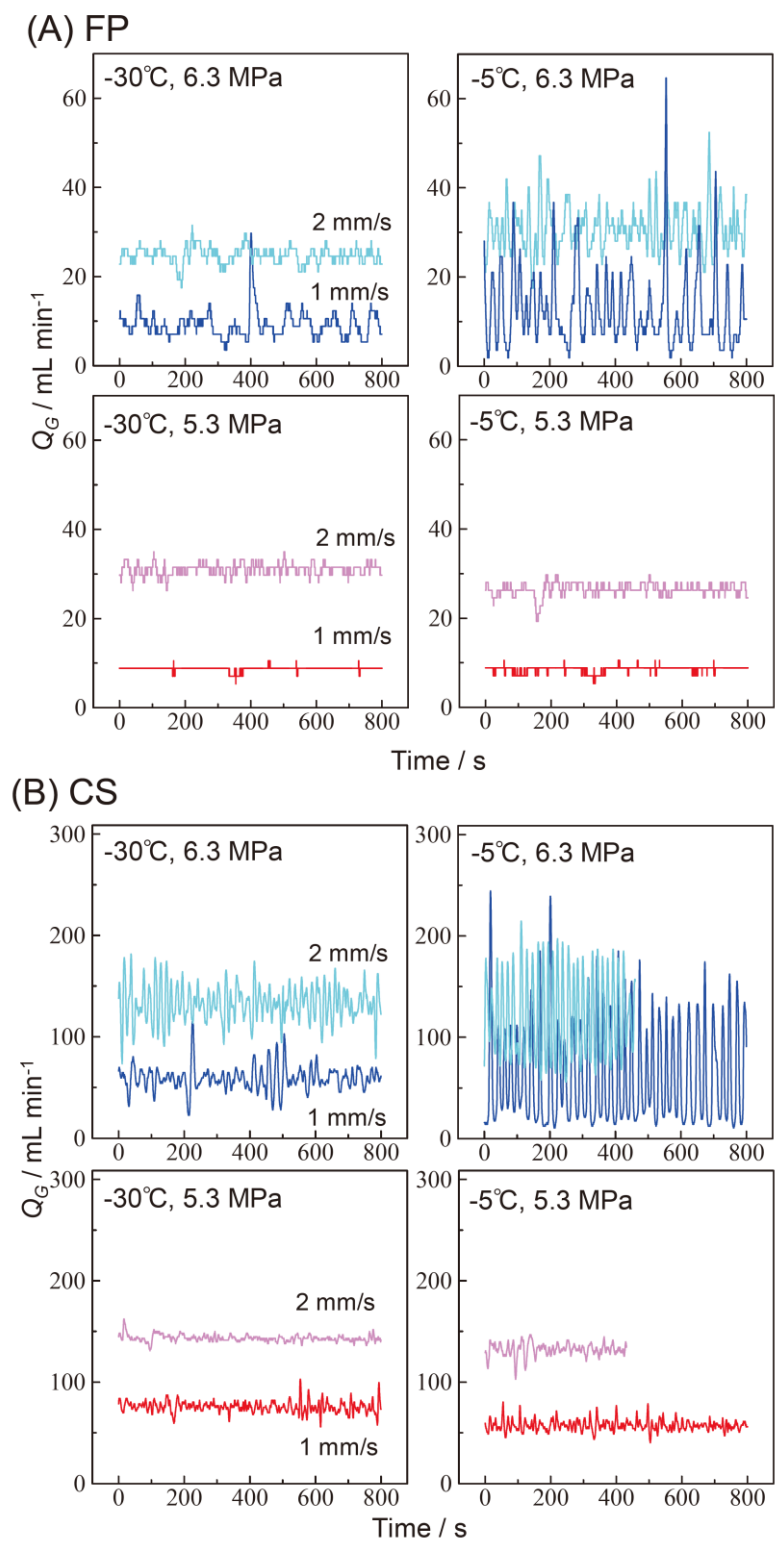


Figure 3-5 様々な条件下における -5 と -30°C での流量変化 (A) FP、(B) CS カラム

3.3.4. モノリスカラムとの比較

この節では、低温 HPLC におけるモノリスカラムの分離挙動の検討を行う。FP、CS とモノリスカラムにおけるナフタレン、アントラセン、ピレンの分離効率を -30°C における四分析条件下 ($v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 5.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 5.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 6.3\text{ MPa}$ 、 $v_{t0} = 2\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 6.3\text{ MPa}$) で比較した。Figure 3-6 に示すように、全てのカラムで、分離効率は圧力と流速条件の影響を受けた。全体的な傾向として、全てのカラムにおいて、 $v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 6.3\text{ MPa}$ の条件で比較的高い分離効率を得られた。本研究において、最も高い分離性能は $v_{t0} = 1\text{ mm/s}$ と $P_{\text{in}} = 6.3\text{ MPa}$ の条件における CS カラムで得られた。

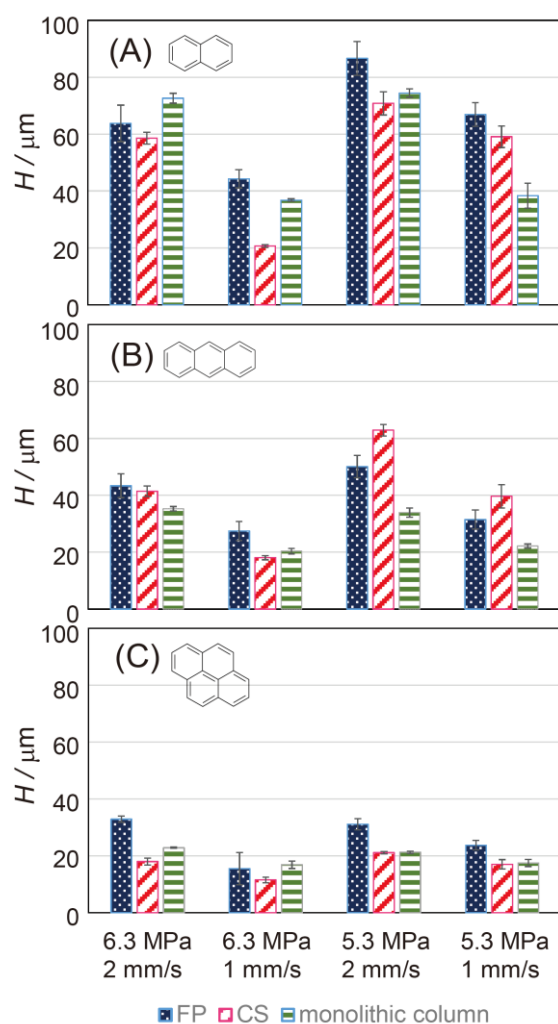


Figure 3-6 FP、CS とモノリスカラムにおける分離効率の比較 (A) ナフタレン、(B) アントラセン、(C) ピレン
エラーバーは標準偏差 ($n = 3$)

$v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ 、 $P_{in} = 5.3 \text{ MPa}$ 、 -30°C の条件で、モノリスカラムにおけるナフタレン、アントラセン、ピレンのテーリング係数は 1.3、1.2、1.4 であった。 $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ 、 $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ 、 -30°C の条件におけるテーリング係数は 1.3/1.2/1.3 (ナフタレン/アントラセン/ピレン) であった。FP と CS カラムの結果と対照的に、モノリスカラムを用いた場合には、入口圧と流速はピークプロファイルに大きな影響を及ぼさないことがわかった。

各圧力・流速条件における各カラムの多孔度を Figure 3-7A に示す。モノリスカラムの多孔度は分離条件に依存して変化した。CS カラムの多孔度が三つのカラムの中では最も安定であったため、液化 CO_2 移動相を用いた低温 HPLC においては多孔度の安定性が分離効率に影響する可能性が考えられる。モノリスカラムのスルーポアは、充填カラム内の充填剤の粒子間の空間よりも大きいため、モノリスカラムでは流路の閉塞の可能性は減少することが予想された。しかし、Figure 3-7B に示すように、モノリスカラムにおける流量は $v_{t0} = 2 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ の条件下で大きく変動した。さらに、 $v_{t0} = 1 \text{ mm/s}$ と $P_{in} = 6.3 \text{ MPa}$ の条件は若干不安定であるのに対して、 $P_{in} = 5.3 \text{ MPa}$ の 2 つ条件では流量は比較的安定した。つまり、本研究で用いた他のカラムと同様に、モノリスカラムを用いた場合にも、 CO_2 は 5.3 MPa の条件と比較して 6.3 MPa の条件の方が凝固しやすいことがわかった。

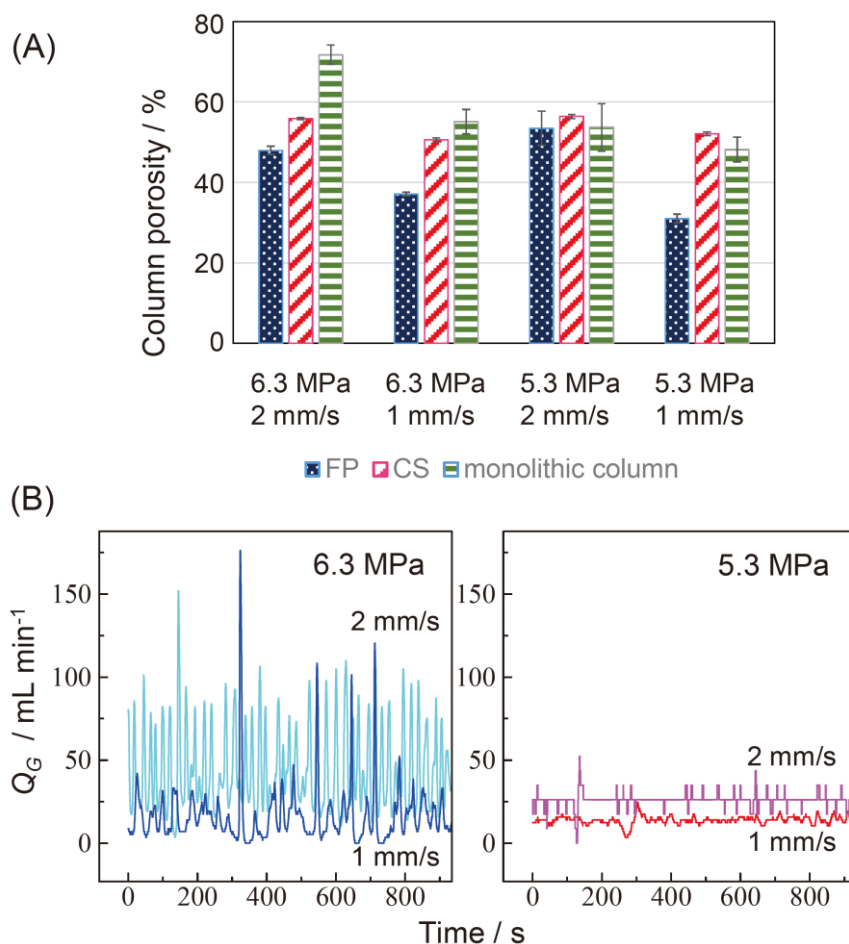


Figure 3-7 様々な条件下におけるモノリスカラムの多孔度 (A) FP と CS カラムとの多孔度の比較、(B) モノリスカラムの流量変化
エラーバーは標準偏差 ($n = 3$)

3. 4. 結論

第三章では、純液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLC におけるカラム構造と分離条件（流速、入口圧、温度）に対する分離挙動の関係を評価した。この検討において、流速が 1 mm/s、入口圧が 6.3 MPa、温度が -30°C の条件で CS カラムを用いた時に、ピレンにおいて理論段高 $12\text{ }\mu\text{m}$ ($85,000\text{ N/m}$) という最も高い分離効率が得られた。カラム温度は分離効率に影響を及ぼしたが、温度と分離効率の間に明確な関係性は観測されなかった。

カラム多孔度の検討から、分離条件（特に流速に）とカラム構造の両方が要因となって CO_2 がカラム内で凝固していることが示唆された。しかし、凝固挙動は複雑であるため、より詳細に現象を解明するにはさらなる研究が必要である。また、 CO_2 の連続的な凝固と

融解により、カラム構造が不均一となっている可能性が考えられる。CO₂ の凝固とピーク形状の関係のさらなる評価もまた液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLC の進展には必要である。液化二酸化炭素移動相への有機モディファイヤーの添加は CO₂ の凝固の抑制に効果的であり、分離効率の向上が期待できる。そのため、本研究室では今後も液化 CO₂ をベースとした移動相を用いる低温 HPLC に関する研究を継続して行っていく予定である。

参考文献

- [1] Motono, T.; Nagai, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 2381-2386.
- [2] Nguyen, D. T.; Guillarme, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1836-1848.
- [3] Feketea, S.; Oláh, E.; Feketea, J. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 57-71.
- [4] Kamour, R.; Ammar, A.; El-Attug, M.; Almog, T. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 961-965.
- [5] Ali, I.; Gaitonde, V. D.; Aboul-Enein, H. Y. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 432-442.
- [6] Ongkudon, C. M.; Kansil, T.; Wong, C. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 455-464.
- [7] Svec, F.; Lv, Y. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 250-273.
- [8] Nishimura, H.; Hirano, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *Chromatography* **2014**, *35*, 87-93.
- [9] Kubo, T.; Murakami, Y.; Naito, T.; Otsuka, K. *Chromatography* **2015**, *36*, 105-113.
- [10] Ito, H.; Matsugi, M.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *Chromatography* **2016**, *37*, 73-78.
- [11] Ohmori, T., EOS-SCx ver.0.2w.
<http://hp.vector.co.jp/authors/VA030090/eos-scxe.html> (accessed on December 5, 2016).
- [12] Fields, S. M.; Lee, M. L. *J. Chromatogr.* **1985**, *349*, 305-316.

第四章 超低温 HPLC の開発

4. 1. 緒言

第二章と第三章では、液化二酸化炭素移動相を用いる低温 HPLC の開発とその分離挙動への分析条件やカラム構造の影響について述べた[1, 2]。液化二酸化炭素ベースの移動相を用いた類似の研究は他の研究者によっても報告されている[3, 4]。しかし、 -196°C のような超低温下では二酸化炭素は凝固してしまうため、移動相として利用することはできない。

第四章では、Figure 4-1 に示すような相図となる液化窒素（臨界点： -147°C 、3.40 MPa；三重点： -210°C 、0.0125 MPa）をベースとした移動相を用いることで、 -196°C における HPLC 分離を試みた。また、分析物の保持の制御のために、カラム温度と窒素移動相へのメタンの添加量に対する保持の関係を評価した。また、 -196°C においてアルケン類の分離と構造異性体の分離を試みた。

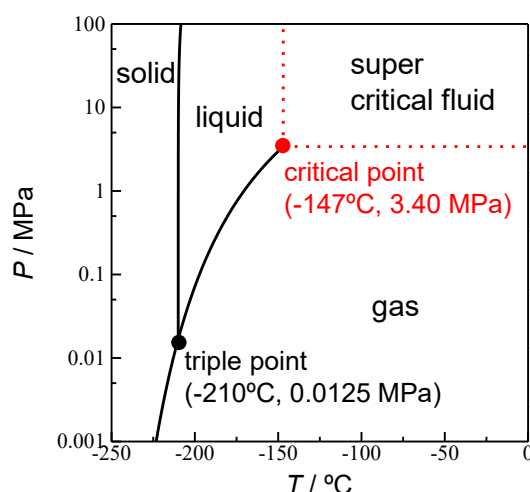


Figure 4-1 窒素の相図

4. 2. 実験

4. 2. 1. 超低温液体クロマトグラフ

Figure 4-2 に示すように、本研究で用いた装置は、ガスボンベ(N_2 、 CH_4)と二つのソレノイドバルブ(VX210AGA, SMC)、 $0.5\ \mu\text{L}$ のサンプルループのインジェクター(Model 7520, RHEODYNE)、研究室製のヒーターを取り付けた分離カラム(Chemcobond 5-Si $1.0 \times 150\ \text{mm}$, Chemco)、電子イオン化源を備えた四重極型質量分析計(MS)(GC-MS QP 5050, Shimadzu)、背圧ジェネレーターと質量分析計へのスプリットインジェクションのためのキャピラリーチューブ(i.d. $30\ \mu\text{m} \times 4\ \text{cm}$, i.d. $30\ \mu\text{m} \times 40\ \text{cm}$)、ガス流量計(Mass Flow Sensor Model 3810DS, Kofloc Kyoto)から構成される。

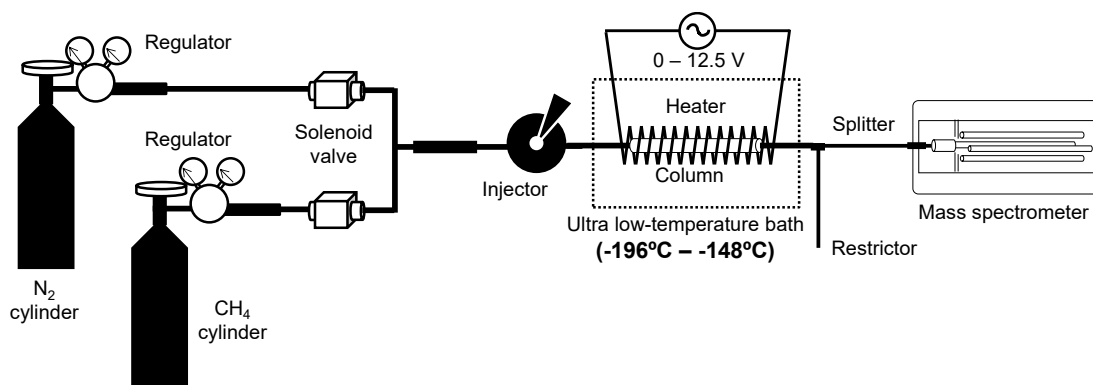


Figure 4-2 窒素とメタンの混合移動相を用いる超低温 HPLC の装置概略図

外装に K 熱電対を取り付けたカラムを液体窒素へ浸漬を行うことにより冷却し、ヒーターへの 0 ~ 12.5 V の電圧印加により加熱することで $-196 \sim -148^{\circ}\text{C}$ に制御した。また、移動相の N_2 と CH_4 の混合比率を二つのソレノイドバルブの開閉時間により制御した。本研究においては、個別に言及した場合を除いて、カラムへの移動相の供給は 1.0 MPa の定圧モードにより行った。出口に取り付けた抵抗管により、入口圧を 0.5 MPa とした場合を除いては、カラム出口側の圧力を 0.7 MPa 以上に維持したため、移動相はカラム内で液体状態であった。また、スプリットインジェクション用のキャピラリーチューブを介して、MS のイオン源へとカラムより溶出した成分の一部を導入した。

試料成分は約 0.5 MPa でバルブインジェクターにより気体状態で注入された。本研究では、固定相に保持しない理想的なボイド(t_0)マーカーを見つけることができなかったため、超低温 HPLC において最も小さい保持を示したアルゴンを経験的にボイドマーカーとして用いた。

4. 2. 2. GC 測定

超低温 HPLC との比較のために、同一のシステムを用いて超低温 GC 及び室温条件での GC 測定を行った。超低温 GC では、移動相として He を用いて超低温 HPLC と同様の測定を行った。また、室温条件での GC では、液体窒素による冷却及びヒーターによる加熱を行わずに測定を行った。

4. 2. 3. 試薬

窒素(>99.99995%)とメタン(>99.999%)、ヘリウム(standard grade)、アルゴン(standard grade)は大陽日酸より購入した。標準エタン(99.5%)、プロパン(99.5%)、エチレン(99.5%)、プロピレン(99.5%)は GL サイエンスより、*n*-ブタン(>98.0%)、*iso*-ブタン(>98.0%)は住友精化より、重水素化メタン、 CD_4 (>99.5%)は Cambridge Isotope Laboratories より購入した。 CD_4 を除く本研究で用いた試料成分の物理的性質を Table 4-1 に一覧で示す。

Table 4-1. 試料成分の物理的性質

	m.p.	b.p.	Triple point		Critical point	
	[°C]	[°C]	[°C]	[MPa]	[°C]	[MPa]
N ₂	-210	-196	-210	0.0125	-145	3.40
Ar	-189	-186	-189	0.689	-122	4.86
CH ₄	-183	-163	-182	0.0117	-83	4.60
C ₂ H ₆	-183	-89	-183	1.13×10 ⁻⁶	32	4.87
C ₃ H ₈	-188	-42	-188	1.72×10 ⁻¹⁰	97	4.25
<i>n</i> -C ₄ H ₁₀	-138	-1	-138	6.74×10 ⁻⁷	152	3.80
<i>iso</i> -C ₄ H ₁₀	-160	-12	-159	1.21×10 ⁻⁸	135	3.63
C ₂ H ₄	-169	-104	-169	1.22×10 ⁻⁴	9	5.04
C ₃ H ₆	-185	-47	-185	7.44×10 ⁻¹⁰	91	4.56

4. 3. 結果と考察

4. 3. 1. 超低温条件における HPLC と GC

Figure 4-3 に未修飾シリカ粒子充填カラムと液化窒素移動相（Figure 4-1 に示すように -196°C、1.0 MPa で窒素は液体状態）を用いた際の -196°C の HPLC による低分子アルカンの分離結果を示す。検出に用いた MS は、感度の向上のために selected ion monitoring (SIM) モードで測定を行った。モニタリングのために用いた m/z 値を各クロマトグラムに示した（例： t_0 マーカーとして用いた Ar は $m/z=40$ ）。

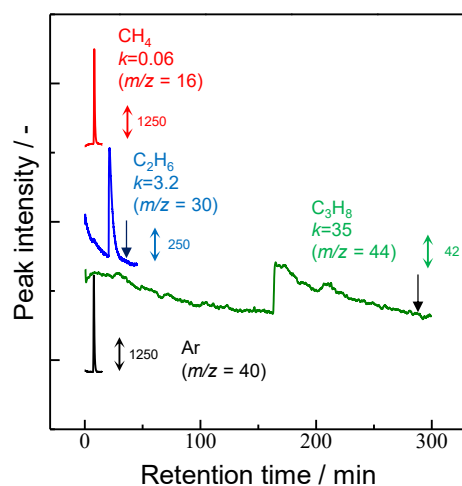


Figure 4-3 未修飾シリカカラムを用いた超低温 HPLC によるアルカンの分離
 移動相：液化窒素、温度： -196°C 、MS 条件：メタン、エタン、アルゴン、プロパンをモニタリングするために m/z 16、30、40、44 の SIM モード、エタンとプロパンの溶出時間（ピーク末端）は矢印にて表記、移動相は 1.0 MPa の定圧でカラムに供給、その他の条件は本文中に記載

本研究では、溶出時間を以下のように定義した。分析物を異なる量で注入し、同条件で分析を行った。ピークの頂点の位置が注入量に依存しなければ、一般的な HPLC と同様にその値を溶出時間とした（例：Figure 4-3 のアルゴンとメタン）。一方で、Figure 4-4 に示すように、ピークの頂点の位置が注入量に依存し、ピークの末端の溶出時間がほぼ一定である場合には、ピークの末端を溶出時間とした。この場合にはピークの溶出時間を図中に矢印で記した（例：Figure 4-3 のエタンとプロパン）。

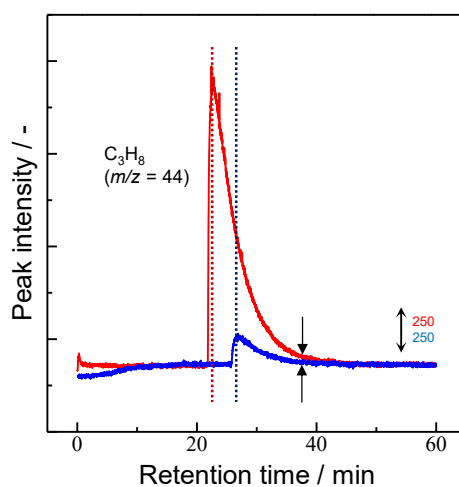


Figure 4-4 試料注入量のプロパンの溶出への影響

Figure 4-3 に示すように、プロパンにおいてはブローディングが観測されたものの、三成分（メタン、エタン、プロパン）は -196°C でカラムから異なる溶出時間で溶出した。すなわち、 -196°C の条件における HPLC 分離を達成した。これは我々が知る限りでは、これまで報告されている中で最も低い温度での HPLC 分離である。炭素数の増加に伴い保持比(k)は増加し、メタン、エタン、プロパンの保持比はそれぞれ 0.06、3.2、35 となった。Figure 4-5 に示すように、アルカンの炭素数と保持比の間において、 $r^2 = 0.978$ という直線関係が得られ、 -196°C の HPLC におけるメチレン選択性は一般的な HPLC と類似した挙動を示すことが分かった。

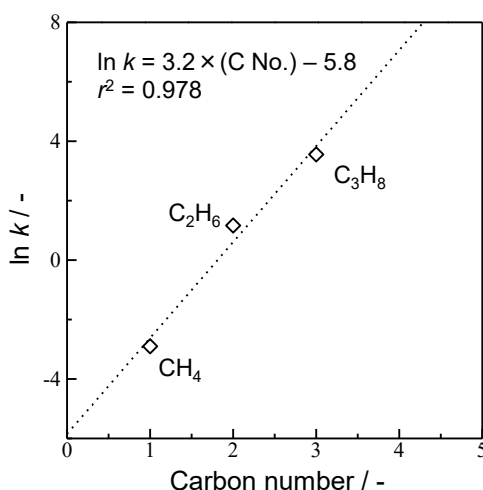


Figure 4-5 -196°C で純液化窒素移動相を用いる HPLC におけるアルカン中の炭素数と保持比(k)の関係

-196°C の条件でも、気体状態となるヘリウムを移動相として用いて GC 分離を行った。Figure 4-6 は -196°C の条件における GC 測定の結果であり、図中にはクロマトグラムと分離中にモニタリングしたカラム温度を示す。カラム温度が -196°C の状態では、カラムに注入された試料成分は 120 min 以上測定を続けても溶出しなかった。一方で、液体窒素槽の液体窒素が蒸発した後にカラム温度が上昇すると、カラムより全ての試料成分の溶出が確認された。そのため、 -196°C では固定相への試料成分の吸着が非常に強く、GC 分離が阻害されてしまうことが確認できた。Figure 4-3 と 4-6 は、 -196°C において、GC では分析可能な分子種は非常に限定されるが、HPLC では GC よりも分析可能な分子種が多いことを示した。

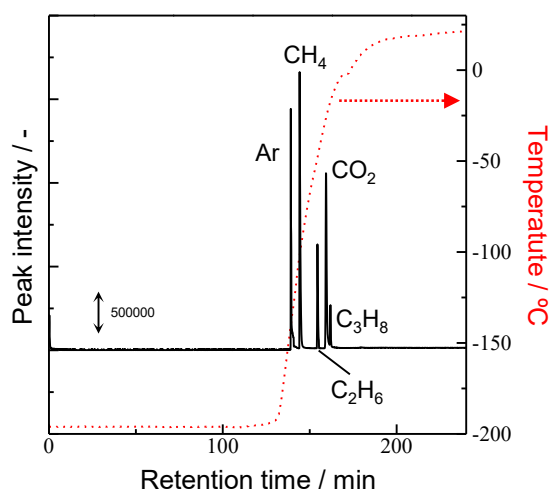


Figure 4-6 未修飾シリカカラムを用いた超低温 GC によるアルカンの分離
 移動相：ヘリウムガス、温度： -196 から 21.6°C に昇温（図中の点線）、MS 条件：
 m/z 15 – 100 を scan モードで測定し、 m/z 16、30、40、44 を抽出
 その他の条件は Figure 4-3 と同様

4. 3. 2. 分析物の保持への温度の影響

Figure 4-3 に示したように、 -196°C の条件でアルカン類の HPLC 分離を達成した。しかし、プロパンの溶出時間は非常に長く、ピーク形状はブロードであった。ここで GC のように温度による保持の制御を検討するために、超低温条件下の HPLC における分析物の保持への温度の影響を評価した。入口圧 1.0 MPa の定圧条件で液化窒素移動相を用いた際の各温度におけるエタンとメタンのクロマトグラムを Figure 4-7A と B にそれぞれ示す。いずれの試料成分の測定の場合においても、温度の上昇に伴ってボイドマーカとして用いたアルゴンの溶出時間が減少した。移動相を定圧モードで送液しているため、温度の上昇により液化窒素の粘性が減少し、流速が増加したためである。 -166°C におけるエタンの保持比($k = 1.9$)は -196°C における保持比($k = 3.1$)よりも小さくなった。カラム温度の上昇による保持の減少は通常の HPLC と共通した挙動である。しかし、Figure 4-7A に示すように、 -161°C ではエタンは 60 min 以内に溶出しなかった。さらに、エタンは -165°C の HPLC においても溶出しなかった。メタンの場合(Figure 4-7B)には、 -196 、 -168 、 -153°C の時のメタンの保持比はそれぞれ 0.06 、 0.07 、 2.0 となった。一般的なクロマトグラフィーの挙動に反して、温度の上昇に伴ってメタンの保持比は増加した。また、メタンの保持比は -153°C で急激に増加した。

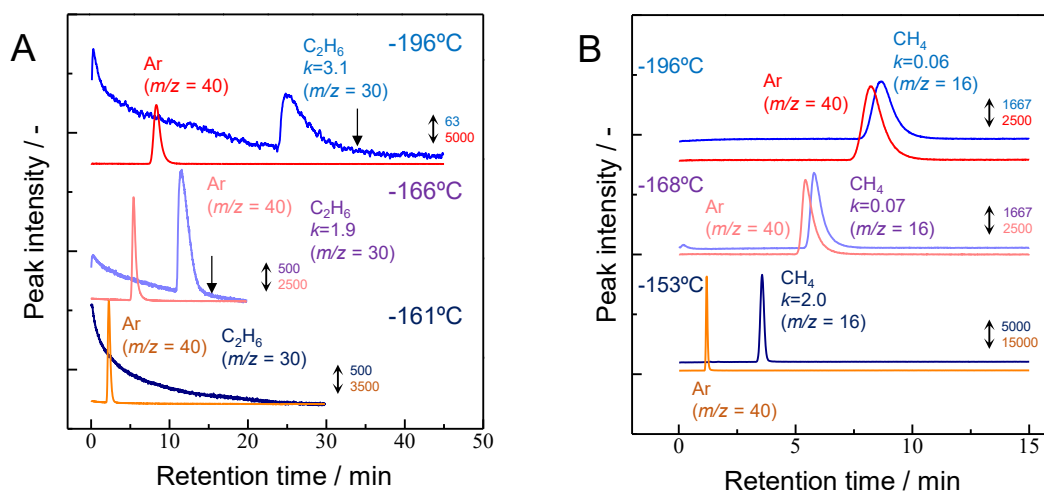


Figure 4-7 温度の分離への影響 (A)エタン、(B)メタン

検出：(A) m/z 30、40 で SIM モード、(B) m/z 16、40 で SIM モード

その他の条件は Figure 4-3 と同様

エタンとメタンの $\ln k$ と $1/T$ の関係(van't Hoff plot)を Figure 4-8A と B にそれぞれ示す。Figure 4-8A に示すように、エタンの保持比は温度の増加 ($1/T$ の減少) に伴い減少した。低温域($1/T$ で 0.0104 ~ 0.0130、 T で $-196 \sim -177^\circ\text{C}$)においては直線関係が得られ、van't Hoff 式と一致した。しかし、高温域($1/T$ で 0.00936 ~ 0.0104、 T で $-177 \sim -166^\circ\text{C}$)においては、温度の上昇による保持の減少は抑制された。さらに -165°C 以上($1/T < 0.00926$)の温度条件ではエタンは溶出しなかった(そのため Figure 4-8A にデータはプロットされていない)。メタンの場合(Figure 4-8B)には、典型的な HPLC の挙動に反して、温度の増加に伴って保持比が増加した。実験項でも述べたように t_0 マーカーとして用いたアルゴンは超低温でわずかに保持を示す。メタンよりもアルゴンの保持の方が温度応答性を示すとき、Figure 4-8B に示すような温度の上昇による保持の増加が予想される。メタンの保持への温度の影響を明らかにするには、正確な t_0 マーカーの探索を含むさらなる研究が必要である。

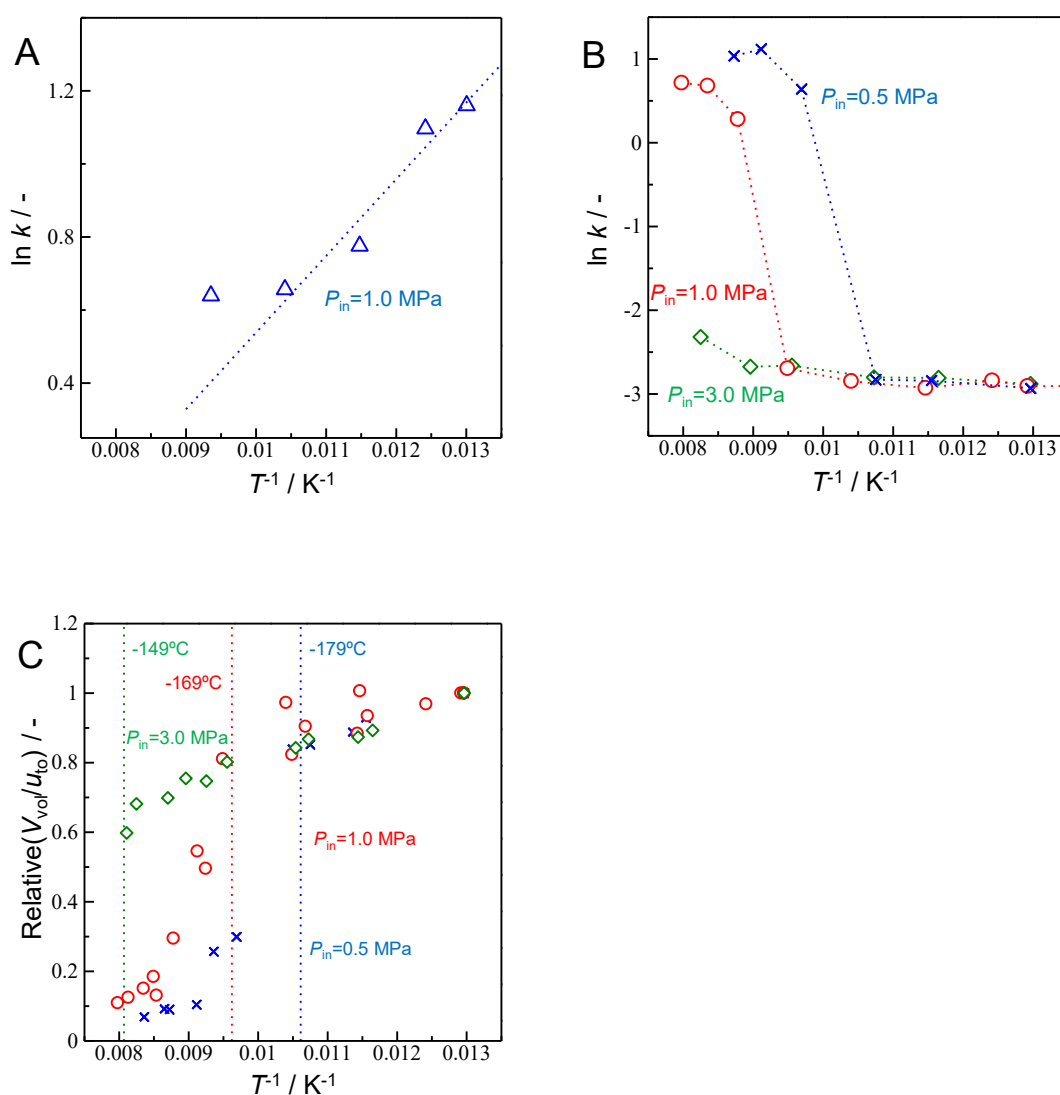


Figure 4-8 温度の(A, B) エタン、メタンの保持比(van't Hoff plot)、(C) V_{vol}/u_{t0} の相対値への影響

カラム入口圧 : (A) 1.0 MPa、(B, C) 0.5(×)、1.0(○)、3.0(◇) MPa

(C)中の点線は各入口圧における沸点の理論値、その他の条件は Figure 4-3 と同様

移動相の供給圧を 1.0 MPa としたとき (Figure 4-7 と 4-8A、Figure 4-8B 中の○のプロット)、メタンの保持比が $-159^{\circ}C$ ($1/T$ が 0.00878) で急激に増加した。0.5 MPa の圧力では (Figure 4-8B 中の×のプロット)、急激な変化は $-170^{\circ}C$ ($1/T$ が 0.00969) で観測された。一方、3.0 MPa の圧力では (Figure 4-8B 中の◇のプロット)、急激な変化は観測されなかった。

0.5 MPa、1.0 MPa、3.0 MPa の時の窒素の沸点はそれぞれ -179 、 -169 、 $-149^{\circ}C$ とする[5]。Figure 4-9 に示すように沸点において窒素の密度は劇的に変化する。ここで、実験的に密度の変化を確認するために、温度($1/T$)と V_{vol}/u_{t0} 値 (u_{t0} と V_{vol} はそれぞれ t_0 ベー

スの流速(mm/s)と標準状態における体積流量(mm³/s) の関係进行评估した。この数値はカラム空隙が一定であると仮定したときに窒素流体の密度に比例する。我々の装置では、スプリット比はカラムの出口側の圧力に依存してしまうため、密度変化の評価には V_{vol}/u_{t0} の相対値 (-196°C の時の V_{vol}/u_{t0} を 1 とした) を用いた。

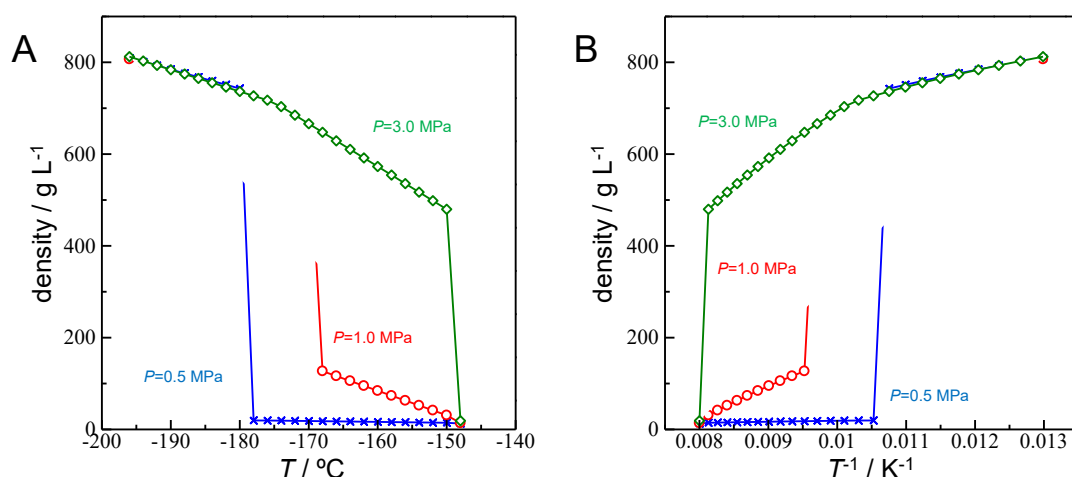


Figure 4-9 各圧力における窒素の密度と温度の関係(A) 密度 vs. T , (B) 密度 vs. $1/T$

Figure 4-8C に示した V_{vol}/u_{t0} の相対値と $1/T$ の関係は、密度と $1/T$ の関係 (Figure 4-9) と、特に急激に変化する温度においては、概ね一致した。0.5 MPa(○)と 1.0 MPa(×)の場合には、 V_{vol}/u_{t0} の相対値において観測された急激な変化は相転移点 (Figure 4-8C 中の点線で示した各圧力における沸点) と一致した。また、3.0 MPa(◇)の場合には、劇的な変化は $-196 \sim -150^{\circ}\text{C}$ の温度範囲では観測されず、この挙動は Figure 4-8B と対応している。Figure 4-8B で急激な保持の変化が起こった温度は、Figure 4-8C とほとんど同じであったため、窒素の気化が高温域での保持の急激な増加を引き起こしたと考えられる。

Figure 4-6 に示すように、移動相としてヘリウムを用いた超低温 GC の場合にはメタンは溶出しない。さらに、Figure 4-7B の下段のクロマトグラムに示す -156°C で気体状態の窒素移動相を用いた GC 測定でメタンは溶出したが、 -156°C でヘリウム移動相を用いた GC 測定ではメタンは溶出しなかった。窒素は -196°C の GC において保持 (吸着) されるため、アルカンの保持は固定相への窒素分子の吸着により抑制される。また、窒素の吸着も温度の影響を受ける。一方で、超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)において、移動相の密度が分析対象の保持に影響を及ぼすことがよく知られている。すなわち、高密度の CO_2 移動相によって保持は減少する[6]。Figure 4-8C と Figure 4-9 から明らかに分かるように窒素の密度は温度によって変化し、密度の減少が移動相の溶出力を減少させている可能性も考えられる。そのため、Figure 4-3 と 4-6、4-8 に示すような保持比の劇的な増加は、固

定相への窒素の吸着と相転移による移動相の密度（溶出力）の双方の減少により起きると考えられる。4.3.1. 節でも述べたように、超低温下で分析物を溶出するために移動相は液体状態である必要があることが分かった。

4.3.3. 移動相へのメタンの添加による保持の制御

4.3.2. 節でも述べたように、超低温 HPLC において温度コントロールによる保持の制御には移動相の気化という制限がある。 -196°C の HPLC における保持の制御のために、他の方法を検討した。前述の通り、移動相分子の固定相への吸着が分析物の保持を抑制すると考えられる。Figure 4-3 に示すように、メタンは窒素よりもわずかに強くシリカゲル固定相に保持されるため、窒素移動相にメタン添加の添加を行うことで試料成分の保持の減少が期待できる。

-196°C で純粋な窒素と、 N_2 と CH_4 の 50/50 (v/v)混合物を移動相として用いた HPLC におけるプロパンのクロマトグラムを Figure 4-10A に示す。プロパンの保持は移動相へのメタンの添加により減少した。すなわち、メタン添加によりプロパンの吸着を抑制することに成功した。Figure 4-10B に低級アルカンの保持比と移動相中のメタンの割合の関係を示す。Figure 4-10B に示すように、保持比は N_2/CH_4 移動相中のメタン濃度の増加に伴い減少した。 -196°C では、凝固のため移動相中のメタンの上限量は 68%(v/v)であった。一般的な HPLC では、保持比と移動相組成の関係は $\ln k = S\phi + \ln k_0$ (ϕ と S は体積分率と、 $\ln k$ と体積分率の間の傾き) により与えられる。Figure 4-10B に示すように、関係はわずかに曲がってはいるが、一般的な HPLC と同様に -196°C の HPLC における保持比を移動相組成によって制御することができた。

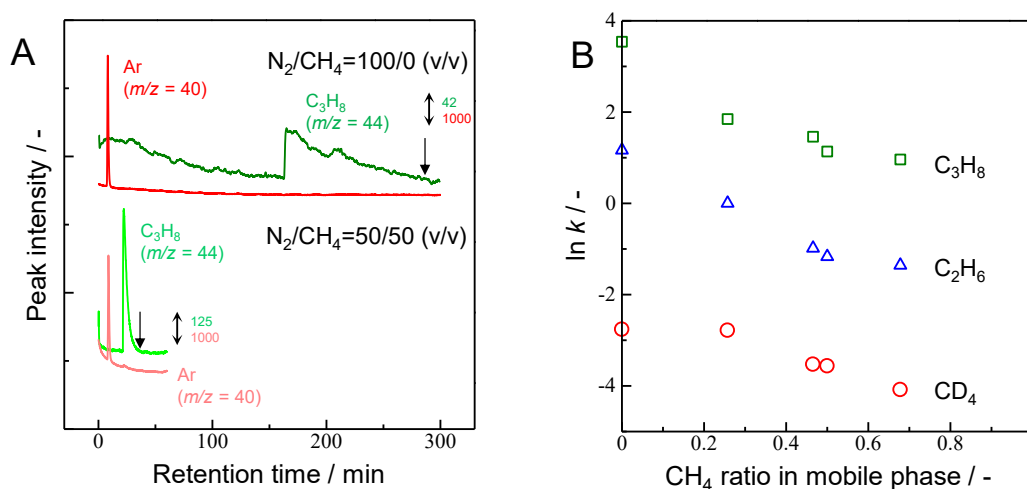


Figure 4-10 移動相中のメタン濃度の保持への影響(A) 純窒素移動相と混合ガス移動相を用いた際のプロパンのクロマトグラム、(B) 移動相中のメタンの比率と重水素化メタン(○)、エタン(△)、プロパン(□)の保持比の関係

MS 条件：重水素化メタン、エタン、プロパンを m/z 20 と 40、30 と 40、40 と 44 の SIM モード、その他の条件は Figure 4-3 と同様

4. 3. 4. -196°C の HPLC における構造異性体の分離挙動

構造異性体は GC と HPLC の両手法で分離されており、選択性は分離条件に依存する[7-10]。一般的な GC 分離において、アルカンの異性体は *iso*-アルカンが先に溶出し、その後 *n*-アルカンが溶出する[7]。さらに *n*-アルカンの保持の温度依存性(van't Hoff plot の ΔH°) は *iso*-アルカンの保持の温度依存性よりも大きくなる。そのため、GC における溶出順は温度の減少によっては逆転しない。一方で、室温や室温付近の HPLC では多環芳香族炭化水素の構造異性体の溶出順は温度により変化することがある[8]。そのため、HPLC においてアルカン異性体の溶出順を温度の減少により反転する可能性がある。超低温 HPLC における異性体への選択性の評価のために、試料成分としてブタンの異性体 (*n*-ブタン、*iso*-ブタン) を用いて測定を行った。

Figure 4-11A に $N_2/CH_4 = 50/50$ (v/v)の混合ガスを移動相として用いた際の室温条件 (GC 条件) での *n*-、*iso*-ブタンのクロマトグラムを示す。Figure 4-11A に示すように、室温での GC 条件における溶出順は初めに *iso*-ブタンが、そのあとに *n*-ブタンが溶出し、上述した典型的な溶出順となった[7]。一方、 -196°C の超低温 HPLC 条件においては、Figure 4-11B に示すように、*n*-ブタン、*iso*-ブタンの順に溶出し、室温の GC 条件での測定から順溶出順は逆転した。室温での逆相と順相 HPLC においては、*iso*-ブチルベンゼンは *n*-ブチルベンゼンより先に溶出する[9, 10]。そのため、Figure 4-11B に示したような *n*-、*iso*-異性体への選択性は超低温 HPLC 特有の選択性である可能性がある。

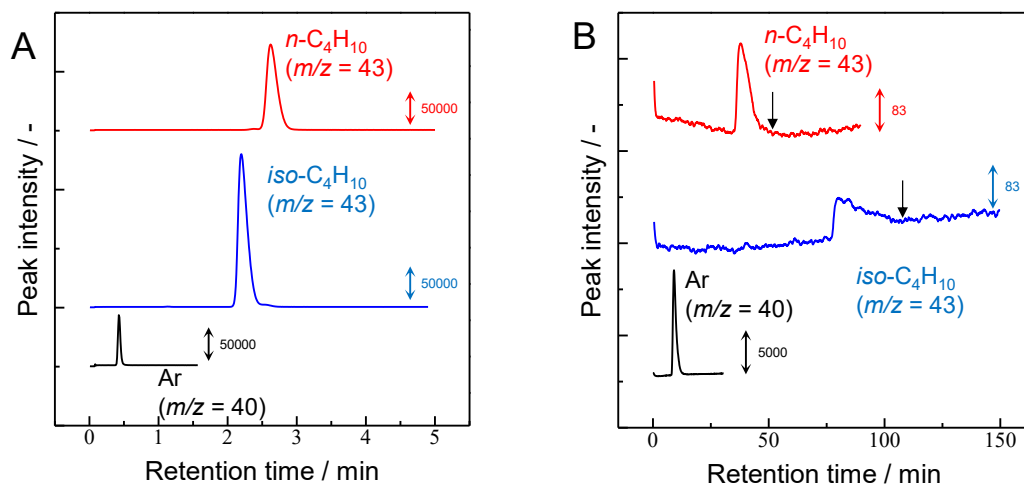


Figure 4-11 *n*-ブタンと *iso*-ブタンのクロマトグラム(A)室温条件の GC、(B)-196°C 条件の HPLC

移動相：N₂/CH₄ = 50/50 (v/v)、MS 条件：*m/z* 40、43、57、58 の SIM モード、その他の条件は Figure 4-3 と同様

4. 3. 5. アルケンの選択的保持

固定相への試料成分の吸着は、双極子—双極子や静電、双極子—誘起双極子相互作用といった複数の相互作用の合算の結果となる。各相互作用には温度依存性があるが、温度依存性の大きさには各相互作用に違いがある。これまでの研究では、アルカンを試料成分として使用した。ここで我々は、アルケンの持つ π 電子が固定相に対してさらなる相互作用をもたらすと予測し、超低温 HPLC におけるアルケンの測定を試みた。

Figure 4-12A に室温で N₂/CH₄ = 50/50 (v/v)の混合ガスを移動相として用いてエタン、プロパン、エチレン、プロピレンの混合物を GC 分離した際のクロマトグラムを示す。Figure 4-12A に示すように、エタン、エチレン、プロパン、プロピレンの順に溶出した。この溶出順は極性固定相を用いた GC と一般的な HPLC の溶出順と同様であった[11-12]。すなわち、アルケンはアルカンと比較して、固定相のシリカの双極子と π 電子との間の付加的な相互作用により強い保持を示した。Figure 4-12B に示すように、-196°C の HPLC においては、アルkanは 25 min 以内に溶出したが、Figure 4-12A とは対照的にエチレンとプロピレンは 120 min 測定を続けても溶出せず、アルケンの溶出にはカラム温度を上昇させる必要があった。この結果は、シリカ固定相とアルkan分子の間の相互作用と比較して、アルケンの π 電子による相互作用が超低温により強められたことを示唆した。この現象は、シラノール基の双極子により局在状態となった π 電子の電荷が、超低温条件により局在状態の緩和を抑制されることで起こっていると考えられる。

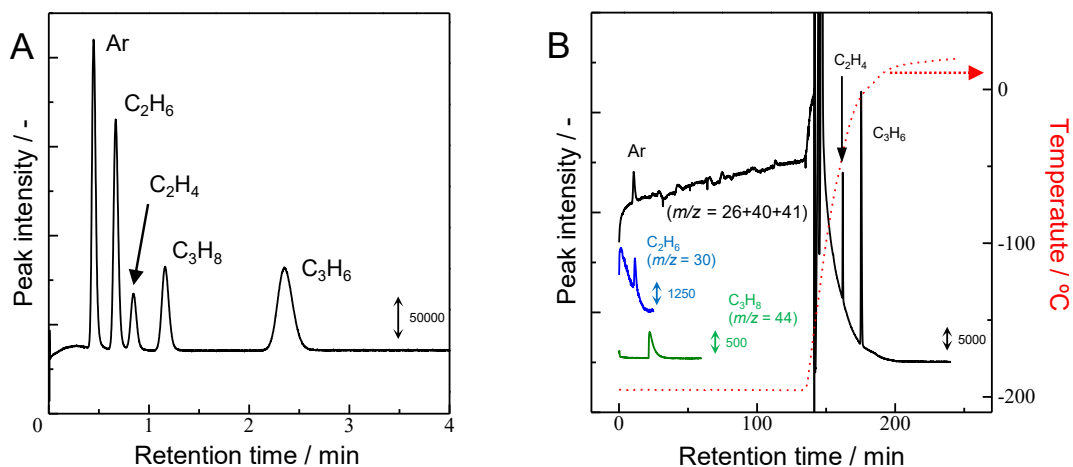


Figure 4-12 アルカンとアルケンのクロマトグラム(A)室温条件の GC、(B)超低温条件の HPLC

(B)の温度は -196°C から 20°C に変化 (点線)、移動相: $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v)、MS 条件: m/z 26、30、40、41、44 の SIM モード、その他の条件は Figure 4-3 と同様

4. 4. 結論

第四章では、移動相として液化ガスを用いる超低温 HPLC の開発について述べた。 -196°C の条件において、ヘリウムガス移動相を用いた GC 分離を試みると分析物は溶出しなかったが、液化窒素移動相を用いた HPLC 分離においては低分子アルカンの分離に成功した。超低温下における保持は、室温条件下での保持よりも強くなった。超低温下における分析物の保持は温度によって制御することは可能であったが、温度による保持制御は移動相の沸点以下の温度に限られた。一方、HPLC で一般的に利用される保持の制御法のように、窒素移動相へのメタンの添加を行うことで -196°C における保持を制御することができた。しかし、実際の利用を考えると、 -196°C における HPLC の保持時間は非常に長い。さらに、比較的保持が高い成分において、ピークの非対称性が観測された。超低温 HPLC の応用のためには、保持制御に関するさらなる研究が必要である。この研究で示したように、 -196°C における HPLC の保持の制御のためには、液化窒素移動相へのモディファイヤーの使用は有効である。しかし、液化窒素に可溶な化合物は限られている。例えば、エタンの添加はメタンよりも強い分析物の保持抑制を予測できるが、液化窒素へのエタンの溶解性は非常に低く、 -196°C ではカラム内で凝固し閉塞してしまう。第五章では、カラム閉塞を防ぎつつ分析物の保持の制御を試みるために、窒素とメタンの混合物へのエタンやエチレンの添加を試みた。さらに、固定相の選択も HPLC における分離挙動の制御のために重要である。そのため、 -196°C の HPLC における保持への固定相の影響についても

述べる。これら一連の研究は超低温 HPLC のさらなる発展や応用のために必要である。

ブタンの構造異性体を測定すると、常温の GC と超低温 HPLC における構造異性体への選択性が変化した。しかし、この選択性の変化に関する詳細なメカニズムは現在も十分に説明できていない。さらに、アルカンの保持と比較してアルケンの保持は超低温下で急激に強められた。この現象は π 電子とシリカ固定相の間の相互作用が超低温下で強められたことを示唆する。その他の相互作用も超低温下で強められることが予想されるため、適切な移動相と固定相の選択を行い、各相互作用を効果的に制御する技術の開発が必要である。

参考文献

- [1] Motono, T.; Nagai, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 2381-2386.
- [2] Otsubo, M.; Motono, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *Chromatography* **2017**, *38*, 31-37.
- [3] Pirkle, W. H.; Brice, J. L.; Terfloeth, G. J. *J. Chromatogr. A* **1996**, *753*, 109-119.
- [4] Wolf, C.; Pirkle, W. H. *J. Chromatogr. A* **1997**, *785*, 173-178.
- [5] Friedman, A. S.; White, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3931-3932.
- [6] Hutz, A.; Schmitz, F. P.; Leyendecker, D. *J. Supercrit. Fluids* **1990**, *3*, 1-7.
- [7] Pompe, M.; Davis, J. M.; Samuel, C. D. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 399-409.
- [8] Sander, L. C.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1749-1754.
- [9] Smith, R. M. *J. Chromatogr.* **1981**, *209*, 1-6.
- [10] Kriz, J.; Vodicka, L.; Puncocharova, J.; Kuras, M. *J. Chromatogr.* **1981**, *219*, 53-60.
- [11] Mooney, S. A.; Di Sanzo, F. P.; Lowther, C. J. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1982**, *5*, 684-685.
- [12] Plattner, R. D.; Payne-Wahl, K. *Lipids* **1979**, *14*, 152-153.

第五章 超低温 HPLC における保持機構

5. 1. 緒言

第四章において、超低温条件下でも凝固しない移動相として液化窒素ベースの流体を用いた超低温 HPLC の開発について述べた[1]。超低温 HPLC において、一般的な HPLC のように液化窒素移動相にメタンの添加を行うことにより、分析物の溶出を促進することができ、低分子アルカンの保持の制御が可能であった。しかし、保持の詳細なメカニズムを明確に理解するには至らなかった。さらに、アルケンが超低温下で固定相に強く保持し、メタンの添加を行っても超低温下で未修飾シリカカラムから溶出させることができなかった。超低温 HPLC の応用を考えた場合には、 π 電子化合物を含む様々な化学種の分離が可能となることが望ましい。

第五章では、超低温 HPLC において効果的な保持制御のための知見を得るために、超低温 HPLC における保持機構の解明を試みた。初めに -196°C の HPLC における保持モデルを提案した。その後、提案した保持モデルを基に保持挙動への移動相組成と固定相の種類の影響について議論した。最後にアルケン (π 電子化合物) の保持の制御を試みた。

5. 2. 実験

5. 2. 1. -196°C における装置と HPLC 手順

第五章で用いる装置は Figure 5-1 に示すように、先の第四章で述べた装置と基本的な構成は同様で、二つのガスボンベと六方切替バルブ(FCV-20AH₆, Shimadzu)、0.5 μL のサンプルループを備えたインジェクター(Model 7520, RHEODYNE)、分離カラム(Chemcobond 5-Si 1.0 \times 150 mm と Chemcobond 5-ODS-H 1.0 \times 150 mm, Chemco)、電子イオン化源を備えた質量分析計(MS)(GC-MS QP 5050, Shimadzu)、背圧ジェネレーターと質量分析計へのスプリットインジェクションのためのキャピラリーチューブ(i.d. 30 μm \times 4 cm, i.d. 30 μm \times 40 cm)から構成される[1]。第四章の装置で用いていたソレノイドバルブは耐圧性が低く(最大使用圧力が 1 MPa)、入口圧の制限が大きかったため、より高圧条件下で使用可能な高圧流路切替バルブ(最大使用圧力が 39.2 MPa)に変更した。また、第五章では分析温度をすべて液体窒素温度である -196°C の定温条件としたため、温度制御のためのヒーターを使用しなかった。MS は選択的イオンモニタリング(selected ion monitoring; SIM)モードを使用して検出を行い、モニタリングのための m/z 値はそれぞれのクロマトグラムに示した。

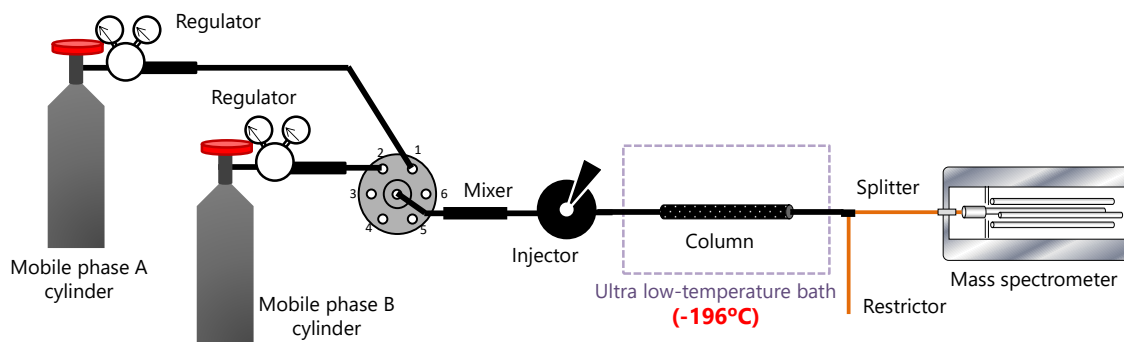


Figure 5-1 移動相 A と B の混合物を用いる超低温 HPLC の装置概略図

カラムは液体窒素に浸漬することにより冷却した。 N_2 と CH_4 、 N_2 と Ar 、 $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v) と C_2H_6 、 $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v) と C_2H_4 の移動相の組成（混合比率）は六方切替バルブを用いて制御した。1.0 MPa の定圧モードでカラムへ移動相を送液した。このとき、カラムの出口側の圧力はカラム出口側に取り付けた抵抗管により 0.7 MPa 以上となるため、移動相はカラム内で液体状態を保持した。すべての分析物はインジェクターより約 0.5 MPa の気体状態で注入された。この章においても、第四章と同様にアルゴンをボイドマーカースとして用いた[1]。ただし、移動相にアルゴンを添加する場合は、酸素をボイドマーカースとして用いた。

それぞれの試料成分の溶出時間は第四章と同様に定義した[1]。ピークの頂点の時間が注入量の影響を受けない場合は、この値を溶出時間とした。ピークの頂点の時間が注入量の増加によって減少する場合は、注入量で変動しないピークの末端を溶出時間とした。このときのピークの溶出時間を図中に矢印で示した。

5. 2. 2. 試薬

窒素(>99.99995%)とメタン(>99.999%)、アルゴン(standard grade)、窒素とメタンの混合ガス(50/50 (v/v))、エタン(>99.7%)、エチレン(>99.9%)は大陽日酸より購入した。標準エタン(99.5%)、プロパン(99.5%)、プロピレン(99.5%)は GL サイエンスより購入した。本章で用いた試料成分の物理的性質は先の章の Table 4-1 に示した。

5. 3. 結果と考察

5. 3. 1. 保持比と移動相組成の関係

第四章において、 -196°C の HPLC における低級アルカンの保持を N_2/CH_4 移動相の組成比により制御したところ、 $\ln k$ と移動相中のメタン濃度の間にわずかに曲線的な関係が得られた[1]。本章においては、未修飾シリカカラムを用いた超低温 HPLC における N_2 移動相中のメタン濃度の保持への詳細な影響を評価した。エタンの $\ln k$ とメタン分率(ϕ_{CH_4})の間

の関係を Figure 5-2A(△)に示した。保持比とメタン分率の関係は、低メタン分率条件 ($\phi_{\text{CH}_4} < 0.15$) における曲線領域と高メタン分率条件 ($\phi_{\text{CH}_4} > 0.15$) における直線領域という二つの領域に分かれた。この挙動は -196°C の HPLC において、二つの機構により試料成分が保持されることを示唆した。類似の挙動が N_2 と Ar (Figure 5-2A(○))、 $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v) と C_2H_6 (Figure 5-2B(□))を混合した移動相を用いた系でも観測された。

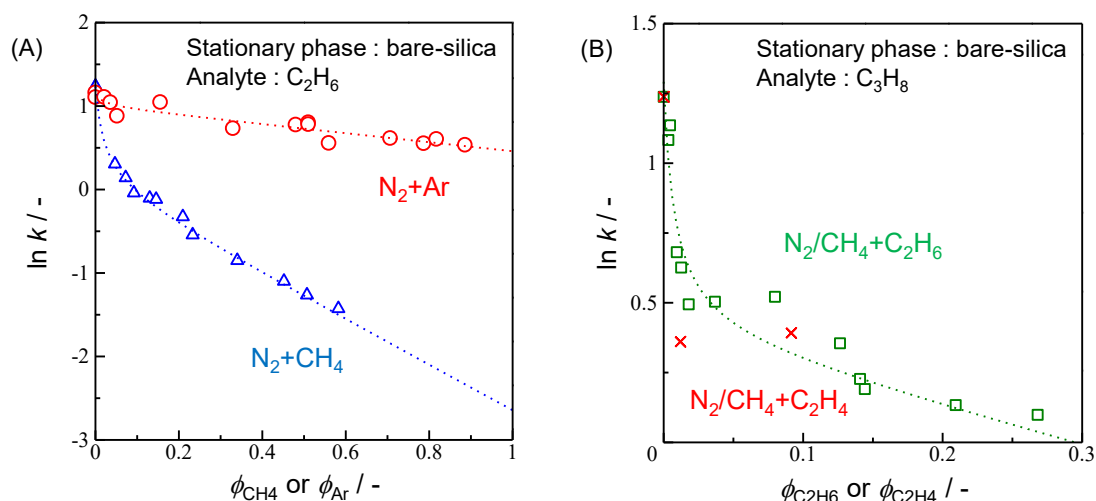


Figure 5-2 移動相組成の保持への影響 (A) N_2 移動相へのメタン (△) とアルゴン (○) 添加に対するエタンの保持比の変化、(B) N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)へのエタン (□) とエチレン (×) 添加に対するプロパンの保持比の変化
点線は(6)式より得られた適合曲線を表す。その他の条件は本文中に示す。

-196°C の HPLC における保持機構の一つとして固体固定相への分析物の吸着が考えられる。超低温下では移動相分子も固定相に吸着するため、分析物と移動相分子の間の吸着交換が HPLC 分離過程の間に起こることが予想される。ここで、移動相として混合物を用いた場合に、保持は試料成分のそれぞれの移動相分子との吸着交換の合計として得られるという仮定をした。吸着交換モデルにおいて、A と B の混合移動相を用いた際の保持比は次のように与えられる。

$$\ln k = \ln \left(\frac{\Gamma_A}{\Gamma_0} k_A + \frac{\Gamma_B}{\Gamma_0} k_B \right) \quad (5-1)$$

(5-1)式中の k_A と k_B は純粋な移動相 A と B との吸着交換による保持比、 Γ_A/Γ_0 と Γ_B/Γ_0 は移動相分子 A と B の固定相表面の被覆率($\Gamma_0 = \Gamma_A + \Gamma_B$)を表す。ここで、A に対する B の固定相への吸着定数(K)を次のように仮定した。

$$K = \frac{\Gamma_B[A]}{\Gamma_A[B]} = \frac{\Gamma_B \phi_A}{\Gamma_A \phi_B} \quad (5-2)$$

(5-2)式中の ϕ_A と ϕ_B は移動相中のAとBの割合($\phi_A + \phi_B = 1$)を表す。そのため、移動相Bの被覆率(Γ_B/Γ_0)は以下のように与えられる。

$$\frac{\Gamma_B}{\Gamma_0} = \frac{K\phi_B}{1 + (K-1)\phi_B} \quad (5-3)$$

したがって吸着交換による保持比は次のように与えられる。

$$\ln k = \ln \frac{(1 - \phi_B)k_A + K\phi_B k_B}{1 + (K-1)\phi_B} \quad (5-4)$$

式(5-4)より得られる ϕ_B と $\ln k$ の間の関係を Figure 5-3 (点線) に示す。 ϕ_B 値の増加により、 $\ln k$ は急激に減少し、 ϕ_B 値が高くなるとほぼ一定となる。

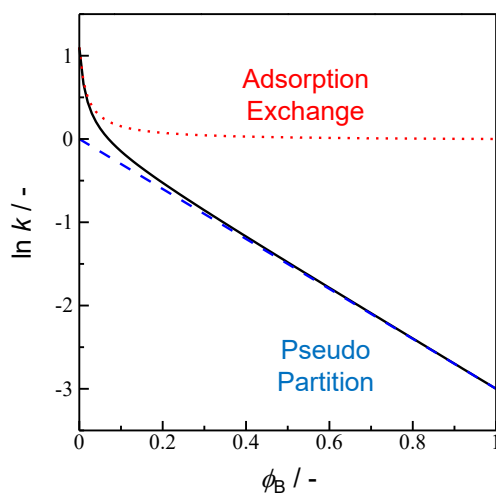


Figure 5-3 (5-4)、(5-5)、(5-6)式により得られる曲線、直線の例 ($k_A^* = 3$ 、 $k_B^* = 1$ 、 $K = 100$ 、 $S = 3.0$)

点線、破線、実線はそれぞれ吸着交換、疑似分配、それらの組み合わせによる保持を示す。

一方で、Figure 5-2 に示すように、 ϕ_B 値が高い範囲では、 ϕ_B と $\ln k$ は直線関係となる。この関係は分配（逆相）HPLC においてよく観測され、次のような式で与えられる。

$$\ln k = \ln k_0 - S\phi_B \quad (5-5)$$

(5-5)式中の k_0 と S は移動相Bが0%（移動相Aが100%）の時の k と定数である（典型的な例を Figure 5-3 中の破線で表す）。 -196°C における「液—液分配」に関しては、詳細は不明確ではあるが（特に未修飾シリカカラムについては）、高い ϕ_B 値の領域における挙動は分配モデルにより説明することができた。そのため、この(5-5)式を -196°C における「疑似分配」モデルとして利用した。両モデルの組み合わせることで、 -196°C のHPLCにお

ける保持比への移動相組成の影響を説明するために次の式を提案した。

$$\begin{aligned}\ln k &= \ln \frac{(1-\phi_B)k_A + K\phi_B k_B}{1+(K-1)\phi_B} + \ln k_{A,100\%} - S\phi_B \\ &= \ln \frac{(1-\phi_B)k_A^* + K\phi_B k_B^*}{1+(K-1)\phi_B} - S\phi_B\end{aligned}\quad (5-6)$$

(5-6)式中の k_A^* と k_B^* は移動相 A が 100%の条件下における疑似分配による保持($k_{A,100\%}$)を含む値となる。(5-6)式はエタンの $\ln k$ と ϕ_{CH_4} の関係 (Figure 5-2A(Δ)) にカーブフィッティングを行った。Figure 5-2A に示すように、フィッティング曲線は実験結果と一致した。カーブフィッティングにより得られた(5-6)式中の k_A^* と k_B^* 、 K 、 S の値を Table 5-1 にまとめた。(5-6)式により見積もられた値に関しては 5.3.2. と 5.3.3. 節で議論する。

Table 5-1 Figure 5-2 と 5-5、5-6 におけるフィッティング曲線より得られた値

#	移動相		固定相	試料成分	k_A^*	k_B^*	K	S	
	A	B							
1	N ₂	CH ₄	Silica	C ₂ H ₆	3.4	1.1	86	2.7	Fig. 5-2A, Δ
2	N ₂	Ar	Silica	C ₂ H ₆	3.1	2.7	47	0.53	Fig. 5-2A, \bigcirc
3	N ₂ /CH ₄	C ₂ H ₆	Silica	C ₃ H ₈	3.6	1.5	201	1.2	Fig. 5-2B, \square
4	N ₂	CH ₄	ODS	C ₂ H ₆	26	7.6	31	3.3	Fig. 5-5B, \diamond
5	N ₂ /CH ₄	C ₂ H ₆	ODS	C ₃ H ₈	18	2.7	155	2.9	Fig. 5-6, \blacklozenge

5.3.2. 保持への移動相組成の影響

N₂ 移動相への他の化学種の添加による保持への影響をさらに評価した。アルゴン添加のエタンの保持への影響を Figure 5-2A(\bigcirc)に示した。メタンを添加した場合と同様にアルゴンの添加により $\ln k$ 値は減少した。しかし、メタンを添加した場合よりも、アルゴンの添加による保持の減少は小さくなった。アルゴン添加による実験結果もよく(5-6)式と一致し、フィッティング曲線より k_A^* 、 k_B^* 、 K 、 S の値を得ることができた (Table 5-1)。

エタンとエチレンの移動相への添加により保持への影響も評価した。−196°C における純粋な液体窒素へのエタンとエチレンの溶解性は低く、それぞれ 1.46×10^{-2} と 4.41×10^{-3} である[2]。そこで、溶解性を改善するために、N₂ と CH₄ の混合物(50/50, v/v)にエタンとエチレンを添加した。エタンとエチレンを移動相に添加した際の $\ln k$ 値への影響を Figure 5-2B (\square 、 \times) に示した。エタンの添加によりプロパンの保持は大きく減少し、測定結果は(5-6)式と一致した ((5-6)式より得られた値は Table 5-1 に示す)。一方で、エチレンを添加した場合には、カラムの閉塞が頻繁に観測されたため、 k 値は 2 つの濃度条件における測定のみとなり、(5-6)式のカーブフィッティングを適用することができなかった。Figure

5-2B に示すように、測定した範囲内ではエチレンの添加による k の減少効果は、エタンを添加した場合とほぼ同程度であった。

ここで、適合曲線より得られたパラメータについての議論を行う。初めに N_2/CH_4 と N_2/Ar 移動相を用いた際の S 値 (Table 5-1 の#1 と#2) に注目すると、 N_2/Ar 移動相における S 値 ($S = 0.53$) は N_2/CH_4 移動相における S 値 ($S = 2.7$) よりも小さくなった。この結果はアルゴンの溶媒強度がメタンよりも小さいことを示した。実際に Figure 5-4 に示すように、アルカンの液化アルゴンへの溶解性は液化メタンへの溶解性よりも小さい[2-4]。

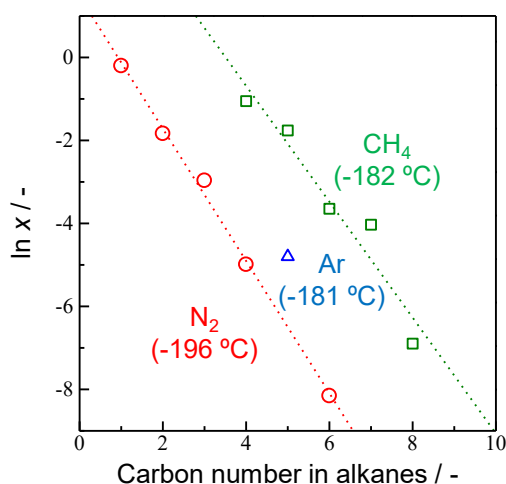


Figure 5-4 液化ガスに対する直鎖アルカンの溶解性と構成炭素数の間の関係
溶解性をモル分率(x)として表す、液化ガス：窒素 (○)、アルゴン (△)、メタン (□) [2-4]

一方で、 N_2/CH_4 、 N_2/Ar 、 $(N_2/CH_4)/C_2H_6$ 混合移動相における K 値はそれぞれ 86、47、201 となった (Table 4-1 中の#1、#2、#3)。未修飾シリカ固定相への吸着性 (保持) の順序はアルゴン < メタン < エタンであり [1]、 K 値の順序と吸着性の順序が同じであった。そのため、固定相への高い吸着性を持つ分子を移動相へ添加することにより、 K 値が大きくなることがわかった。また、 N_2/CH_4 移動相を用いた際の K 値から $\phi_{CH_4}=0.095$ で Γ_{CH_4}/Γ_0 値が 0.9 となることを考慮すると、 $(N_2/CH_4)/C_2H_6$ 混合移動相の場合には、 $\phi_{C_2H_6}=0$ のとき (N_2/CH_4 (50/50, v/v) 移動相のとき) 固定相表面にほぼ CH_4 のみが吸着した状態となる。そのため、 $(N_2/CH_4)/C_2H_6$ 混合移動相における K 値はメタンに対するエタンの吸着交換定数として考えることができる。

5. 3. 3. 保持に対する固定相の種類の効果

固定相は HPLC における保持に影響を及ぼすため、 $-196^\circ C$ での ODS カラムにおける保持挙動の評価も行った。 $-196^\circ C$ で液化窒素移動相を用いた HPLC において、未修飾シ

リカと ODS カラムを用いた際のエタンのクロマトグラムを Figure 5-5A に示す。ODS カラムにおけるエタンの保持($k = 28$)は未修飾シリカカラムにおけるエタンの保持($k = 3.2$)よりも大きくなった。この結果より、 -196°C においてエタンが未修飾シリカ表面上よりも C18 鎖上に強く吸着することがわかった。

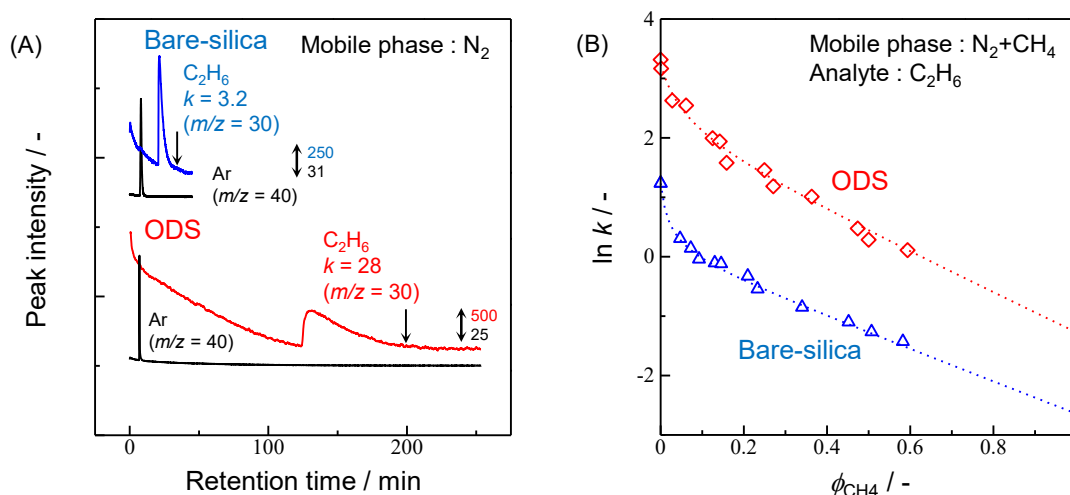


Figure 5-5 -196°C の HPLC における固定相の保持への影響 (A) N_2 移動相を用いた未修飾シリカと ODS カラムにおけるエタンのクロマトグラム、(B) 未修飾シリカ (Δ) と ODS (\diamond) 固定相における N_2 移動相へのメタン添加に対するエタンの保持比の変化

点線は(6)式により得られた適合曲線を示す、その他の条件は Figure 5-2 と同様

未修飾シリカと ODS カラムの両カラムにおけるエタンの $\ln k$ 値と ϕ_{CH_4} の関係を Figure 5-5B に示す (未修飾シリカカラムのデータは Figure 5-2A と同様のデータ)。すべての ϕ_{CH_4} 値で、ODS カラムにおけるエタンの保持は未修飾シリカカラムよりも大きくなった。Figure 5-5B に示すように、未修飾シリカカラムを用いた場合と同様に、ODS カラムを用いた場合にもメタンの添加により k 値は減少し、 $\ln k - \phi_{\text{CH}_4}$ の挙動も(5-6)式によりカーブフィッティングすることができた。そのため、分析物は未修飾シリカと ODS の両カラムにおいて同じ保持機構により保持されることが分かった。

ODS カラムを用いた場合についても、 N_2/CH_4 (50/50, v/v) 移動相にエタン、またはエチレンを添加した際のプロパンの保持挙動の調査を行った。Figure 5-6 (\blacklozenge) に示すように、Figure 5-2B に示した未修飾シリカカラムを用いた際の挙動と同様に、エタンの添加により ODS カラムにおけるプロパンの保持は減少した。また、ODS カラムを用いた場合には、エチレン添加 (Figure 5-6 (+)) で得られる保持の抑制効果がエタンを添加した場合よりも小さくなった。この挙動は、Figure 5-2B に示す未修飾シリカカラムを用いた際の挙動とは異なっていた。エタン・エチレン添加による未修飾シリカと ODS カラムの間の保持挙動の

違いは、これらの固定相間でのアルカン—アルケンの選択性の違いに起因すると考えられる。

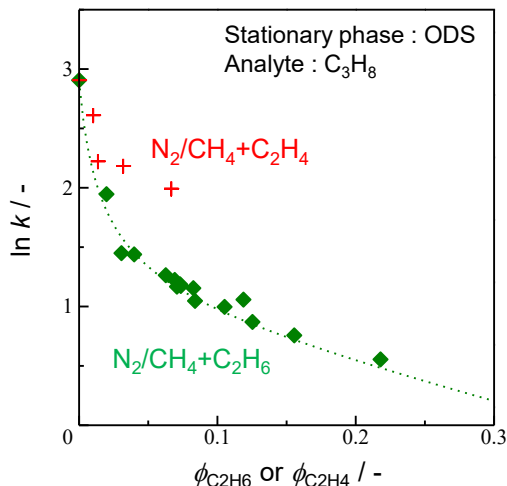


Figure 5-6 N₂/CH₄移動相(50/50, v/v)へのエタン (◆) とエチレン (+) 添加に対するプロパンの保持比の変化

点線は(5-6)式により得られた適合曲線を示す、その他の条件は **Figure 5-2** と同様

ここで、未修飾シリカと ODS カラムにおいて得られたフィッティング曲線のパラメータについて議論する。Table 5-1 に示すように、ODS カラムにおいて N₂/CH₄ 移動相を用いて得られた K 値 (Table 5-1 の#4) は未修飾シリカカラムにおいて得られた値 (Table 5-1 の#1) よりも小さくなった。同じ挙動が(N₂/CH₄)/C₂H₆ 移動相においても観測された (Table 5-1 の#3 と#5)。これらの結果は ODS 固定相におけるアルカン (メタンとエタン) の吸着性が未修飾シリカ固定相と比較して小さいことを示唆する。しかし、Figure 5-5 に示すように、ODS カラムにおけるエタンの保持は未修飾シリカカラムよりも大きい。HPLC における保持比は、一般的に平衡定数と相比の両方に比例する。そのため、見積もられた K 値と測定された k 値の間の大小関係の違いは、ODS と未修飾シリカカラムの間に相比の違い (吸着点の数(Γ_0)) が存在することを示唆した。すなわち、ODS 固定相における Γ_0 の値が未修飾シリカ固定相よりも大きい可能性がある。

メタンを添加したときの S 値は、未修飾シリカカラムを用いた場合よりも ODS カラムを用いた場合の方が大きくなった (Table 5-1 の#1 と#4)。移動相組成が異なるが、同じ挙動がエタンを添加したときにも観測された (Table 5-1 の#3 と#5)。未修飾シリカカラムよりも ODS カラムを用いた方が移動相へのメタンもしくはエタンの添加によって保持は効果的に減少することが分かった。

5. 3. 4. アルケンの保持制御

第五章において、 -196°C で N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)を用いた条件では、アルケン（エチレンとプロピレン）は未修飾シリカ固定相に強く吸着しカラムから溶出しなかった。超低温 HPLC のさらなる応用開発のためには様々な化学種の保持の制御が可能となる必要がある。そこで、 -196°C でプロピレンが溶出する HPLC 条件についての検討を行った。

5. 3. 2. 節で述べたように、高い吸着性の化学種の移動相への添加は効果的な保持の減少を引き起こす。そのため、まず未修飾シリカカラムを用いた超低温 HPLC において、 N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)にエタンとエチレンの添加を行った。しかし、Figure 5-7A に示すように、移動相にエタンを 20%添加してもプロピレンはカラムから溶出しなかった。未修飾シリカカラムに対してエチレンはより強く吸着するが、エチレンを 10%含む移動相を用いてもプロピレンはカラムから溶出しなかった（Figure 5-7A の下段のクロマトグラム）。いずれの移動相条件の場合でも、移動相にさらにエタン、エチレンの添加を行うと、カラムが閉塞し測定できなかった。

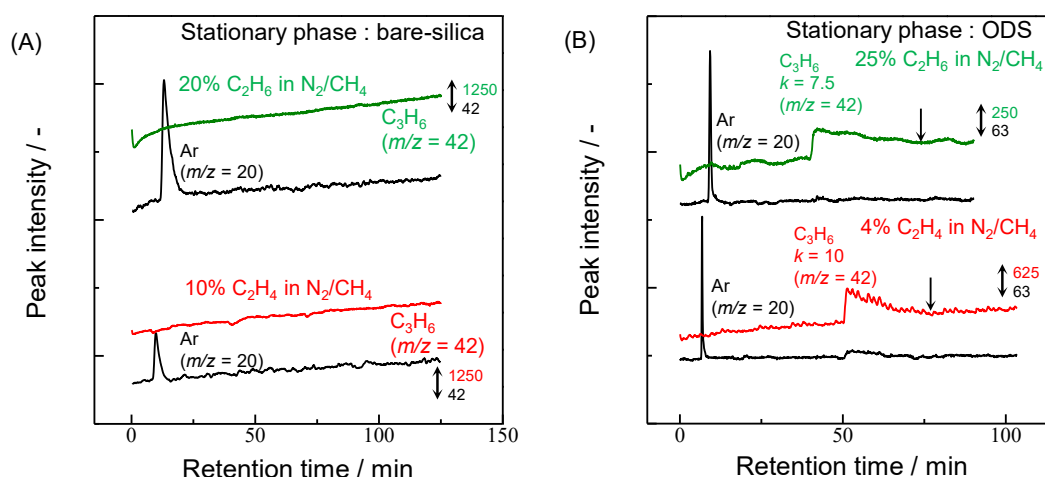


Figure 5-7 -196°C の HPLC におけるプロピレンのクロマトグラム (A) 20%エタンもしくは 10%エチレンを含む N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)と未修飾シリカカラムを用いた条件、(B) 25%エタンもしくは 4%エチレンを含む N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)と ODS カラムを用いた条件

MS 条件： m/z 20、40 の SIM モード、その他の条件は Figure 5-2 と同様

ODS 固定相は未修飾シリカ固定相と比較して異なるアルカン—アルケン選択性を示した。5. 3. 3. 節で述べたように ODS 固定相に対するアルケンの吸着性はアルカンよりも小さくなる。しかし、未修飾シリカカラムと同様に ODS カラムにおいても、 N_2/CH_4 移動相(50/50, v/v)を用いた条件ではプロピレンは溶出しなかった。一方で、Figure 5-7B の上段のクロマトグラムに示すように、25%のエタンを含む移動相を用いたとき、プロピレンをカラムから

溶出させることができた。さらに、Figure 5-7B の下段のクロマトグラムに示すように、4%のエチレンを含む移動相を用いた場合にも、プロピレンをカラムから溶出させることができた。すなわち、ODS 固定相とエタン、またはエチレンを含む移動相を用いることでプロピレンの保持の制御（溶出）を達成した。25%のエタンと 4%のエチレンを添加した際のプロピレンの保持比はそれぞれ 7.5 と 10 であった。上述したようにエタンの ODS 固定相への相互作用はエチレンよりも強いにも関わらず、プロピレンに対するエチレンの溶出力はエタンよりも強い。そのため、通常の HPLC と同様に、分析対象と類似した化学的性質の化合物を移動相に添加することが k 値の減少に効果的な方法であることが分かった。

5. 4. 結論

第五章では、保持比と移動相組成の関係を表すために、吸着交換と疑似分配モードからなる超低温 HPLC の保持モデルを提案した。提案した保持モデルより得られた式は様々な移動相組成や固定相で得られた実験結果とよく一致した。吸着交換による保持は固定相への高い吸着性の分子の添加により効果的に減少した。また、疑似分配による保持は分析物が高い溶解性を示す移動相を用いることで効果的に減少した。未修飾シリカと ODS カラムにおける保持はモデル式に従い、同一の保持機構により保持されることがわかった。しかし、一般的に -196°C の条件では分配に必要な液相は凝固してしまうため、超低温下における保持、特に「疑似分配」による保持を理解するためには、さらなる研究が必要である。

第四章では、プロピレンは固定相への強い吸着により -196°C の HPLC において溶出させることができなかった。第五章では、ODS カラムとエタンもしくはエチレンを添加した移動相を用いることでプロピレンを溶出させることができた。これらの結果は従来の HPLC と同様に、固定相と移動相の適切な組み合わせが様々な性質をもつ分析物の保持の制御に効果的であることを示した。

参考文献

- [1] Motono, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6852–6858.
- [2] Szczepaniec-Cieciak, E.; Kurdziel, M. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1989**, *89*, 2695–2703.
- [3] Preston, G. T.; Funk, E. W.; Prausnitz, J. M. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 2345–2351.
- [4] Szczepaniec-Cieciak, E.; Dabrowska, B.; Lagan, J. M.; Wojtaszek, Z. *Cryogenics* **1978**, *18*, 591–599.

第六章 液化低級アルカンを移動相として用いる超低温 HPLC による低分子化合物の分離

6. 1. 緒言

第四章と第五章では、液化窒素ベースの移動相を用いた超低温 HPLC の開発[1]や、保持モデルの提案から超低温下における HPLC の保持挙動[2]について論じた。提案したモデルでは、超低温 HPLC における保持は、固定相表面での分析物と移動相分子との間の「吸着交換」と、見かけ上分配モードのような挙動を示す「疑似分配」の二つの組み合わせによって表現された。また、ODS カラムと共にエタンまたはエチレンを移動相に添加した移動相を用いることで、 π 電子化合物であるプロピレンをカラムより溶出させることができた。しかし、その保持は大きく、テーリングしたピーク形状であった。

超低温 HPLC の応用開発を考えた場合に、多くの化合物を適切な保持で分離（溶出）できることが望ましい。超低温 HPLC では、ほとんどの化合物の保持は大きく、溶出できないことが問題である。そこで、第六章では、これまでの検討から液化窒素よりも溶出力が高いことが分かっている液化低級炭化水素（メタン、エタン）を移動相として用いることで、保持の低減を試みた。また、充填カラムと比較して移動相に対する固定相の体積比の小さいモノリス構造型のカラムを用いることによる保持の低減も合わせて試みた。それにより、 π 電子化合物を適切な保持で溶出させ、さらにこれまで分離に成功していない極性化合物や比較的沸点の高いアルカン類、ベンゼン環構造をもつ化合物の分離を試みた。

6. 2. 実験

6. 2. 1. 装置

この章で用いる装置は Figure 6-1 に示すように、第四章と第五章で述べた装置と基本的には同様であり、二つのガスボンベと六方切替バルブ(FCV-20AH₆, Shimadzu)、0.5 μ L のサンプルループのインジェクター(Model 7520, RHEODYNE)、ヒーターを備えた分離カラム(Chemcobond 5-ODS-H 1.0 \times 150 mm, Chemco と MonoCap C18 Fast-flow 0.2 \times 150 mm, GL Science Inc.)、電子イオン化源を備えた質量分析計(MS)(GC-MS QP 5050, Shimadzu)、背圧ジェネレーターと質量分析計へのスプリットインジェクションのためのキャピラリーチューブ(i.d. 30 μ m \times 4 cm, i.d. 30 μ m \times 40 cm)から構成される[1, 2]。第六章では温度の制御を行うため、第五章の装置構成に加えてヒーターをカラムに取り付けている。MS は選択的イオンモニタリング(selected ion monitoring; SIM)モードを使用し、モニタリングのための m/z 値はそれぞれのクロマトグラムに示した。

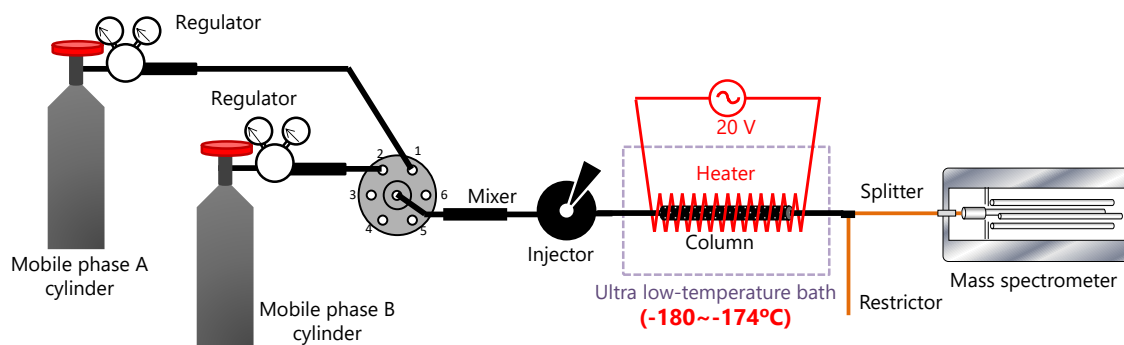


Figure 6-1 本章で用いた移動相混合、カラム温度制御が可能な超低温 HPLC の装置概略図

カラムを液体窒素に浸漬することにより冷却し、カラム温度をヒーターへの約 20 V の電圧印加により $-180 \sim -174^{\circ}\text{C}$ に制御した。 $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v) と C_2H_6 、 $\text{N}_2/\text{CH}_4 = 50/50$ (v/v) と C_2H_4 の移動相の組成 (混合比率) は六方切替バルブにより制御した。1.0 から 2.0 MPa の定圧モード (使用圧力は図の脚注に記載) をカラムへの移動相供給のために使用し、このときのカラムの出口側の圧力は、カラム出口側に取り付けられた抵抗管により 0.7 MPa 以上となるため、移動相はカラム内で液体状態を保持した。すべての試料成分をインジェクターより、充填カラムでは約 0.5 MPa、モノリスカラムでは約 0.1 MPa の気体状態で注入した。この章においても、第四章、第五章と同様にアルゴンをボイドマーカとして用いた[1, 2]。

それぞれの試料成分の溶出時間は第四章、第五章と同様に定義した[1, 2]。ピークの頂点の時間が注入量により影響を受けない場合は、この値を溶出時間として用いた。ピークの頂点の時間が注入量の増加に伴い減少する場合は、注入量で変動しないピークの末端を溶出時間として用いた。このときのピークの溶出時間は図中に矢印で示した。

本研究で使用したモノリスカラムは内径が充填カラムより細く、同一流速を得るのに必要な流量が少ない。そのため、充填カラムでは MS の真空度を確保するためにカラム出口で溶出物の一部のみを MS に導入していたが、モノリスカラムでは全量を MS へと導入した。

また、超低温 HPLC との比較のために、同一のシステムを用いて室温条件での GC 測定を行った。室温条件で移動相として He を用いて、温度と移動相以外は超低温 HPLC と同様に測定を行った。

6. 2. 2. 試薬

メタン(>99.999%)、窒素とメタンの混合ガス(50/50 (v/v))、エタン(>99.7%)、エチレン(>99.9%)は太陽日酸より購入した。標準プロパン(99.5%)、プロピレン(99.5%)は GL サイエ

ンスより、クロロメタンは住友精化より購入した。ジクロロメタン、*n*-ヘキサン、シクロヘキサン、*n*-ヘプタン、*n*-オクタン、*iso*-オクタン（2,2,4-トリメチルペンタン）、ベンゼン、トルエンは和光純薬より購入した。本章で用いた試料成分の物性値を Table 6-1 に示した。常温常圧で液体状態の化合物は湯浴により気化させることで分析に供した。

Table 6-1 実験で用いた化合物の物性値

化合物名	組成式	分子量	融点 [°C]	沸点 [°C]
窒素	N ₂	28	-210	-196
アルゴン	Ar	40	-189.4	-185.9
メタン	CH ₄	16	-182.5	-161.6
エタン	C ₂ H ₆	30	-183	-89
エチレン	C ₂ H ₄	28	-169.2	-104
プロパン	C ₃ H ₈	44	-187.6	-42.1
プロピレン	C ₃ H ₆	42	-185.2	-47.6
<i>n</i> -ヘキサン	C ₆ H ₁₄	86	-95	69
シクロヘキサン	C ₆ H ₁₂	84	6.5	81.4
<i>n</i> -ヘプタン	C ₇ H ₁₆	100	-91	98
<i>n</i> -オクタン	C ₈ H ₁₈	114	-60	125
<i>iso</i> -オクタン	C ₈ H ₁₈	114	-107	99
<i>n</i> -デカン	C ₁₀ H ₂₂	128	-29.7	174.2
ベンゼン	C ₆ H ₆	78	5.5	80.1
トルエン	C ₇ H ₈	92	-95.0	110.6
クロロメタン	CH ₃ Cl	50.5	-97.7	-24.2
ジクロロメタン	CH ₂ Cl ₂	85	-96.7	40

6. 3. 結果と考察

6. 3. 1. 液化低級炭化水素移動相を用いた溶出力の向上

第五章において、-196°C で ODS 粒子充填カラムと 25%のエタンもしくは 4%のエチレンを添加した液化 N₂/CH₄（50/50, v/v）移動相を用いることによりアルケン類であるプロピレンの溶出を達成したが、その保持は大きく、ピークの非対称性も著しかった。そこで、溶出力の改善のために純粋な液化 CH₄ 移動相を用いて同様の測定を行った。Figure 6-2A に示すように、CH₄（m.p. = -182.5°C）を液体状態で利用できる-177°C で純粋な液化 CH₄ 移動相を用いることにより、プロピレンの溶出に成功した。-196°C では三成分を混合した移動相を用いなければ溶出されることができなかったプロピレンを-177°C で純粋な液化 CH₄ 移動相を用いることで溶出させることができた。このときのプロピレンの保持

比(k)は 1.3 であり、 -196°C で三成分を混合した移動相を用いた場合 (Figure. 5-7B) と比較しても小さくなった。また、第五章で、より高い溶出力を示した液化 C_2H_6 を移動相として用いて同様の測定を行った結果を Figure 6-2B に示す。液化 C_2H_6 移動相を用いることでさらに保持を減少させることができ、保持比は 0.0043 となった。

クロマトグラフィーにおける保持は温度の上昇に伴い減少するため、第五章の -196°C での分離との比較において、Figure 6-2A と B の分離においては移動相のみの影響より、保持が減少している可能性も考えられる。そこで、同様の温度域で先の章で用いていた液化 $\text{N}_2/\text{CH}_4/\text{C}_2\text{H}_4$ 移動相 (液化 $\text{N}_2/\text{CH}_4/\text{C}_2\text{H}_6$ 移動相よりも溶出力が高い) を用いてアルケン類の測定を行った。このときの保持比と移動相中の C_2H_4 の関係を Figure 6-2C に示す。第五章で述べたようにエチレンの液化 N_2/CH_4 (50/50, v/v) への溶解性は低く、 -196°C では 4% しか移動相に添加することができなかったが、 $-177\sim-176^{\circ}\text{C}$ に温度を上昇させることで最大で 47% まで移動相にエチレンを添加することができた。Figure 6-2C に示すように、測定した C_2H_4 の濃度域においては直線関係が観測されたため、固定相表面のほぼ全てに C_2H_4 が吸着した状態となっており、測定した濃度の範囲内では疑似分配による保持の変化が支配的となっていることが予想される。直線関係から、 $-177\sim-176^{\circ}\text{C}$ におけるエチレンを 4% 添加した際の保持は外挿により、少なく見積もっても $k = 4.2$ となることが分かる。そのため、液化 N_2/CH_4 (50/50, v/v) にエチレンを 4% 添加した移動相を用いた際の保持と比較して、液化 CH_4 移動相を用いた際の保持($k = 1.3$)は 0.31 倍に、液化 C_2H_6 移動相を用いた際の保持($k = 0.0043$)は 0.0010 倍になった。すなわち、液化低級炭化水素を移動相として利用することで溶出力が向上することがわかった。

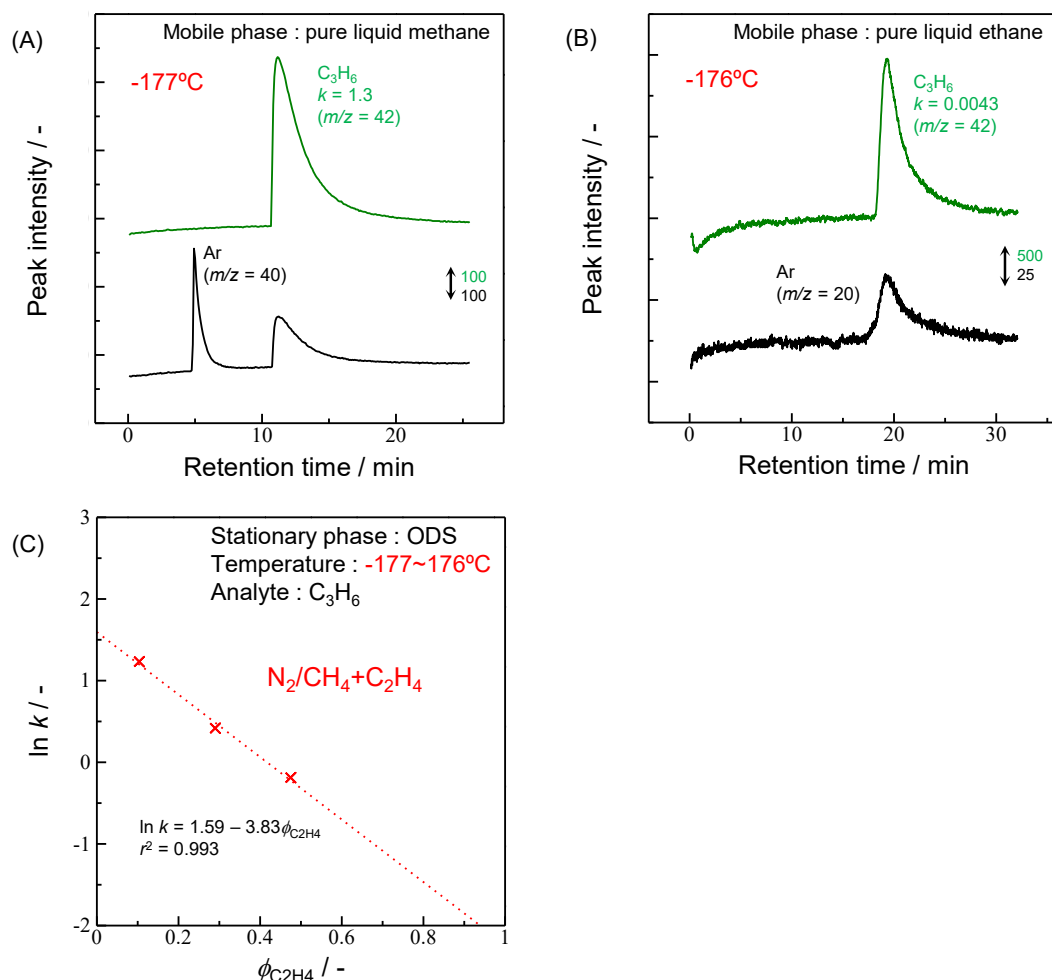


Figure 6-2 -177°C で ODS 充填カラムを用いたプロピレンの分離 (A) 純液化 CH_4 移動相を用いた際のクロマトグラム、(B) 液化純 C_2H_6 移動相を用いた際のクロマトグラム、(C) エチレンを N_2/CH_4 (50/50, v/v) に添加した移動相用いた際のエチレン比率とプロピレンの保持の関係

移動相は 1.0 MPa で供給、その他の条件は本文に記載

液化 CH_4 移動相を用いることで、 π 電子をもった化合物（アルケン類）の保持を減少させることに成功した。そこで、分析可能な分子種の拡大を図るために、新たに分子構造として双極子を持つ極性化合物（クロロメタン）の溶出・分離を試みた。液化 CH_4 移動相と ODS 充填カラムを用いた際のクロロメタンの溶出結果を Figure 6-3A に示す。先の章と同様に、Figure 6-3A には、クロマトグラムと同時に分析中のカラム温度を点線で示している。Figure 6-3A に示すように、ODS 粒子充填カラムと液化 CH_4 移動相を用いた条件においてもクロロメタンと固定相との間の相互作用が強く、 -176°C の条件では試料成分は溶出しなかった（温度が上昇した後（約 -70°C ）に試料成分の溶出を確認）。また、より高い溶出力をもつ液化 C_2H_6 移動相を用いた結果を Figure 6-3B に示す。Figure 6-3B に示すように、

液化 CH_4 移動相を用いた場合と同様に、液化 C_2H_6 移動相を用いた条件においてもクロロメタンを溶出させることはできなかった。

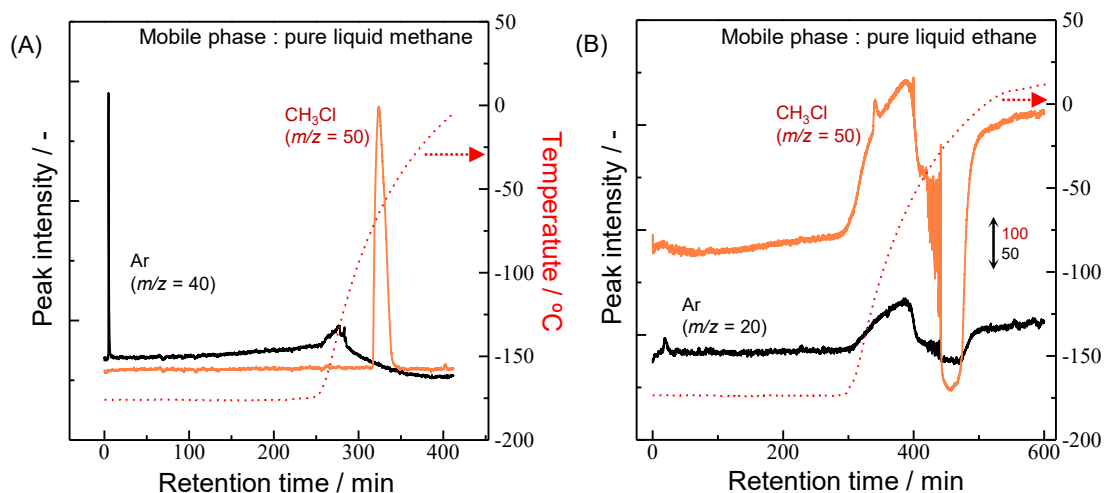


Figure 6-3 ODS 充填カラムを用いた超低温 HPLC によるクロロメタンの分離

(A) 液化 CH_4 移動相、(B) 液化 C_2H_6 移動相

圧力：1.0 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

6.3.2. モノリスカラムによる保持の低減

液化 CH_4 、 C_2H_6 移動相を用いることで効果的に溶出力を向上させることができたが、極性化合物の溶出を達成するためにはさらなる保持の低減が必要となる。保持は一般的に以下の式により与えられる。

$$k = K \frac{V_s}{V_m} \quad (6-1)$$

ここで、 K 、 V_s 、 V_m はそれぞれ移動相と固定相の間の試料成分の平衡定数、固定相体積、移動相体積である。移動相条件の検討では、平衡定数(K)を変動させることで保持を変化させた。一方で、相比 (V_s/V_m) の減少も保持の減少には有効な方法である。モノリス構造のカラムは一般的に粒子充填型のカラムと比較して V_s/V_m 値は小さくなる。そこで、これまで用いていた ODS 粒子充填カラムから ODS モノリスカラムを固定相として用いることで保持の減少を試みた。Figure 6-4A の上段に ODS モノリスカラムと液化 CH_4 移動相を用いた際のプロパンの分離結果を示す。モノリスカラムを用いた場合にも、これまでの粒子充填型のカラムと同様に分離を行うことができた。また、モノリスカラムを用いた際の保持比($k = 0.18$)は、Figure 6-4B の上段に示した ODS 充填カラムと液化 CH_4 移動相を用いた

際の保持比($k = 0.48$)と比較して、保持を 0.38 倍に減少させることができた。

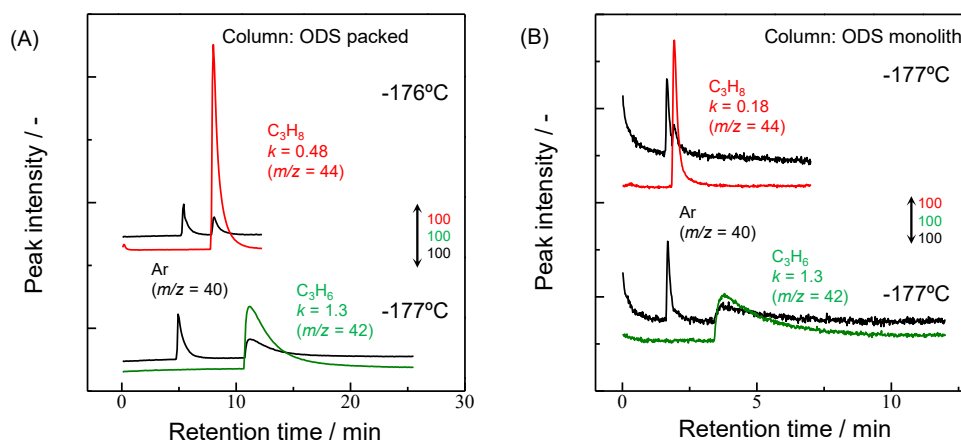


Figure 6-4 液化 CH_4 移動相を用いた超低温 HPLC によるプロパンとプロピレンの分離 (A) ODS 充填カラム、(B) ODS モノリスカラム

圧力 : (A) 1.0 MPa、(B) 2.0 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

一方で、Figure 6-4A と B の下段に示したクロマトグラムから分かるように、試料として π 電子をもつプロピレンを用いた場合には ODS モノリスカラムにおける保持比($k = 1.3$)は ODS 充填カラムにおける保持比($k = 1.3$)と同程度であった。アルカン類の保持が減少する一方で、アルケンの保持が変化しないのは、ODS モノリスと ODS 充填カラムの間の ODS 修飾率の違いを反映したものと考えられる。ODS モノリスカラムにおける修飾率が低く、残存シラノール基が多く存在するため、残存シラノールと強い相互作用を示す π 電子をもつ化合物に対する選択性が高くなったと考えられる。

ODS モノリスカラムを用いて ODS 充填カラムでは溶出しなかったクロロメタンの溶出を試みた。Figure 6-5A に示すように、モノリスカラムと液化 CH_4 移動相を用いることで、クロロメタンの溶出を達成することができた。そのため、 CH_3Cl の保持は残存シラノール基との相互作用によるものではないことが示唆された。ただし、その保持($k = 50$)は非常に大きかった。そこで、Figure 6-5B の上段のクロマトグラムに示すように、液化 C_2H_6 移動相を用いて同様の測定を行うと、クロロメタンの保持を $k = 4.7$ まで減少させることができた。また、液化 CH_4 移動相を用いた条件ではジクロロメタンはカラムから溶出しなかったが、Figure 6-5B の上段のクロマトグラムに示すように、液化 C_2H_6 移動相を用いることでジクロロメタンをカラムより溶出させることができた。

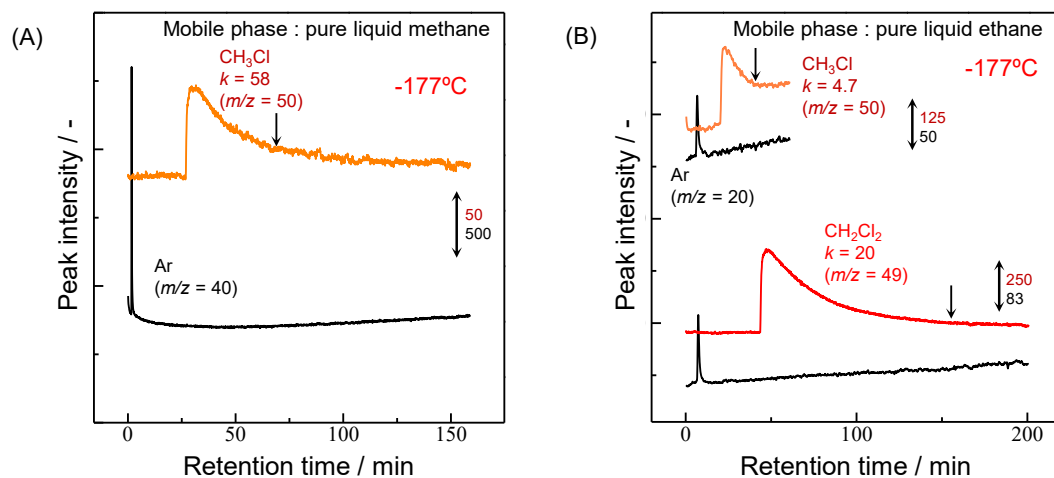


Figure 6-5 ODS モノリスカラムを用いた超低温 HPLC による極性化合物（クロロメタン、ジクロロメタン）の分離 (A) 液化 CH₄ 移動相、(B) 液化 C₂H₆ 移動相 圧力：(A) 2.0 MPa、(B) 1.5 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

6. 3. 3. 高沸点アルカンの溶出

これまで用いてきた試料は室温で気体状態の低沸点化合物を試料として分離に供していた。一般的な HPLC では室温で液体や固体状態の高沸点化合物を対象試料とする。そこで、超低温 HPLC においても高沸点化合物を取り扱うことを目指した。そこで、試料として室温で液体状態である直鎖アルカン (n -ヘキサン、 n -ヘプタン、 n -オクタン、 n -デカン) を用いた。Figure 6-6A に示すように、ODS モノリスカラムと液化 C₂H₆ 移動相を用いることで、 n -ヘキサン、 n -ヘプタン、 n -オクタンを溶出することに成功した。これにより、超低温 HPLC においても、常温常圧で液体状態である試料も取り扱うことが可能であることが分かった。しかし、Figure 6-6B に示すように、 n -デカンに関しては保持が大きく溶出させることはできなかった。

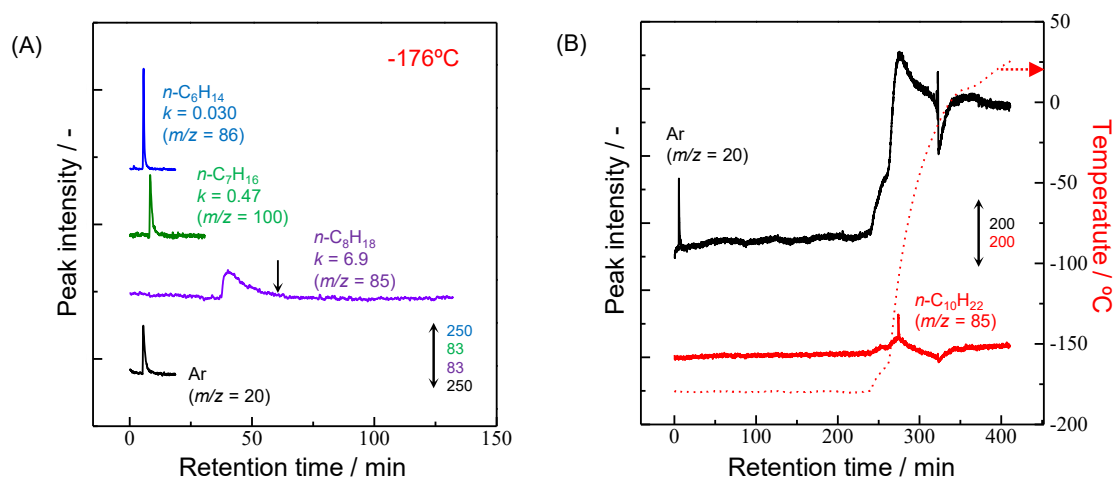


Figure 6-6 ODS モノリスカラムと液化 C_2H_6 移動相を用いた超低温 HPLC による高沸点アルカン類の溶出 (A) n -ヘキサン、 n -ヘプタン、 n -オクタン、(B) n -デカン

圧力： 1.5 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

6. 3. 4. ベンゼン環構造をもつ化合物の溶出

多くの化合物に含まれる基本構造の一つにベンゼン環構造がある。ベンゼン環を含む化合物分析可能となることは超低温 HPLC の応用範囲を広げることにつながる。そこで、まず最も基本的な構造である置換基を含まないベンゼンを試料として用いて分離を試みた。Figure 6-7A に示すように、ベンゼンの溶出を達成することができた。これにより、超低温 HPLC においてもベンゼン環構造を含む化合物を分析対象とすることができる可能性があることがわかった。しかし、ベンゼンの水素の一つをメチル基に置換した構造であるトルエンを試料として用いた場合には、Figure 6-7B に示すように、 -180°C では保持が大きく溶出させることができなかった。ただし、昇温中（約 -140°C ）に溶出していることからさらに温度や移動相の条件を検討することにより、溶出させることが可能であると考えられる。

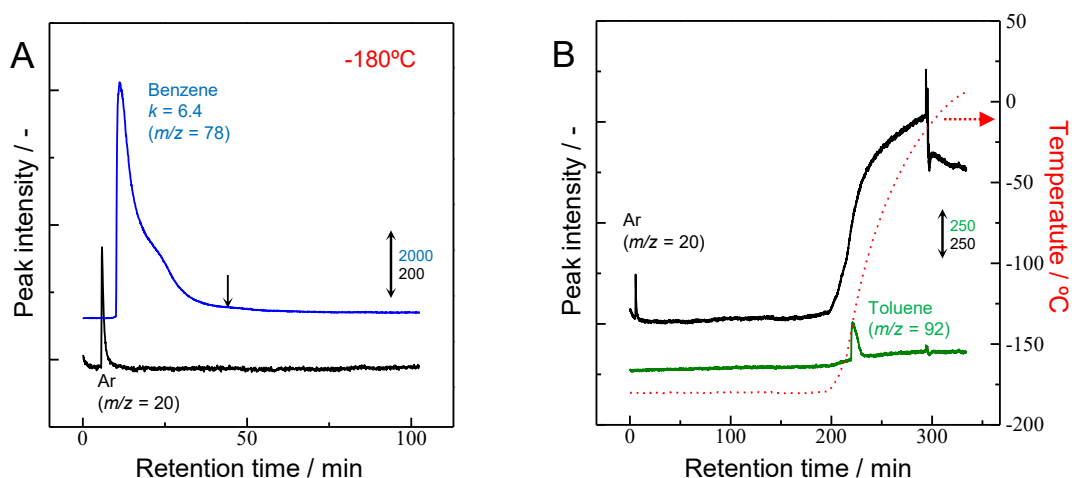


Figure 6-7 ODS モノリスカラムと液化 C_2H_6 移動相を用いた超低温 HPLC によるベンゼン環化合物の溶出 (A) ベンゼン、(B) トルエン
 圧力：1.5 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

6.3.4. 超低温条件下における構造認識

超低温下においては、化合物中の分子振動が抑制されるため、超低温 HPLC による分離を行うことで、通常の温度条件の HPLC と比較して、より構造情報に基づいて分離を行うことが可能となることが予想できる。

そこで、*n*-オクタンと *iso*-オクタンを試料として用いて、直鎖構造と分岐構造の保持を比較した。室温でヘリウムを移動相として用いた GC 測定による *n*-オクタンと *iso*-オクタンの分離を Figure 6-8A に示す。Figure 6-8A に示すように、室温条件では、 t_0 マーカーであるアルゴンが溶出し、その後 *iso*-オクタン、*n*-オクタンが溶出した。一方で、Figure 6-8A に示すように、超低温 HPLC 条件では *iso*-オクタンがアルゴンと共溶出し、その後比較的大きな保持($k = 6.9$)で *n*-オクタンが溶出した。

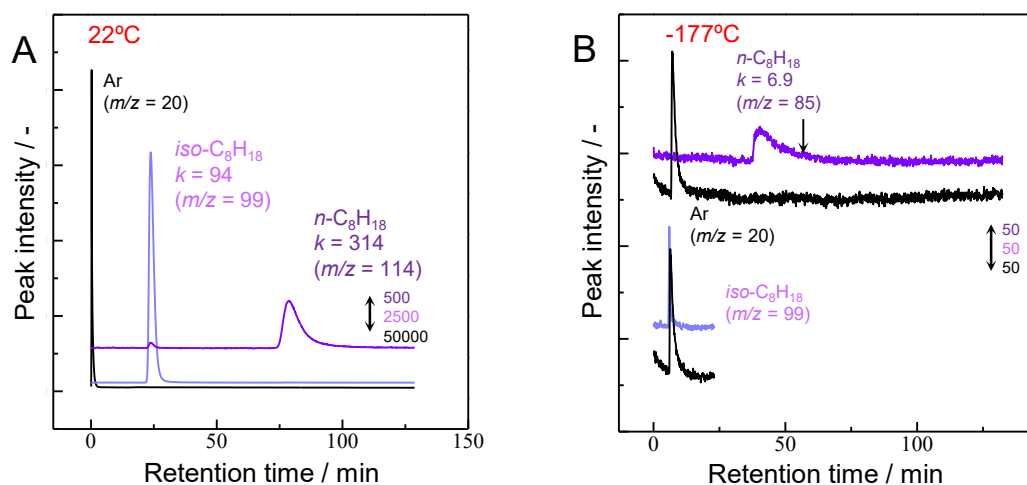


Figure 6-8 ODS モノリスカラムを用いた超低温 HPLC による *n*-オクタンと *iso*-オクタンの分離 (A) 温度: 22°C、移動相: He、(B) 温度: -177°C、移動相: C₂H₆ 圧力: 1.5 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

次に、*n*-ヘキサンとシクロヘキサンを試料として用いて直鎖構造と環状構造の保持を比較した。室温でヘリウムを移動相として用いた GC 測定による *n*-ヘキサンとシクロヘキサンの分離を Figure 6-9A に示す。Figure 6-9A に示すように、室温条件では、*n*-ヘキサンが先に溶出し、その後シクロヘキサンが溶出した。一方で、Figure 6-9B に示すように、超低温 HPLC 条件では、シクロヘキサンが先に溶出し、*n*-ヘキサンがその後に溶出した。すなわち、室温条件下と超低温条件で溶出順の逆転が起こった。

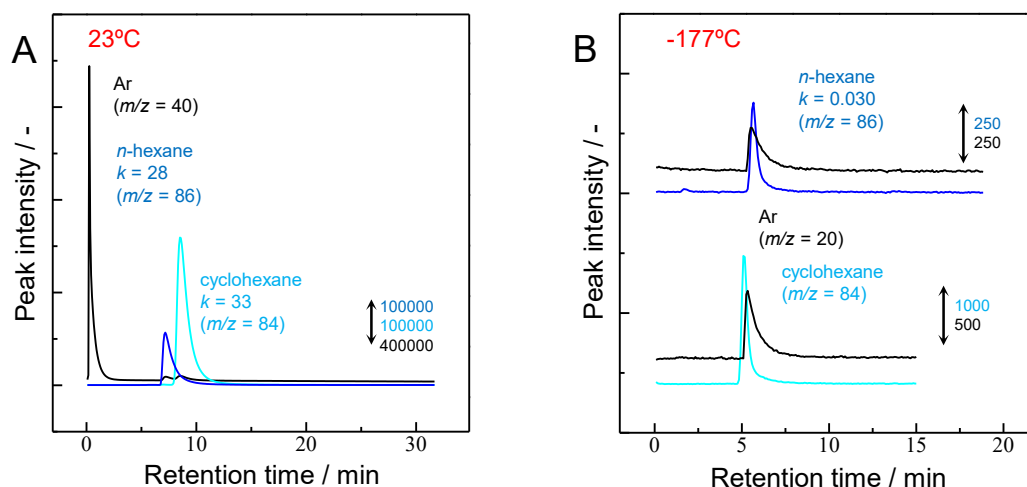


Figure 6-9 ODS モノリスカラムを用いた超低温 HPLC による *n*-ヘキサンとシクロヘキサンの分離 (A) 温度：23°C、移動相：He、(B) 温度：-177°C、移動相：C₂H₆
 圧力：1.5 MPa、その他の条件は Figure 6-2 と共通

Figure 6-8 と 6-9 の挙動より、より立体的にかさ高い構造となっている化合物の保持が減少することが分かった。一方で、第四章で述べたように未修飾シリカカラムと N₂/CH₄ (50/50, v/v) 移動相を用いたブタンの異性体 (*n*、*iso*ブタン) 分離では *n*-ブタンが先に溶出し、そのあとに *iso*ブタンが溶出した[1]。超低温 HPLC において、移動相や固定相、温度の条件の違いにより、構造認識の選択性に違いが生じることが分かった。しかし、条件により選択性に違いが生じる詳細な原因については、今後さらに検討を進めていく必要がある。

6. 4. 結論

第六章では、試料成分の固定相への保持が大きくカラムより溶出しないという問題の解決のために、溶出力の高い液化低級炭化水素移動相と移動相体積に対する固定相体積の比が小さいモノリス構造型のカラムの使用を提案した。液化低級炭化水素移動相を用いることで、第五章で示した N₂/CH₄/C₂H₄ の混合移動相を用いた場合よりも高い溶出力を実現することができた。また、充填カラムよりも相比が小さいモノリス構造型のカラムを用いることで、極性化合物であるクロロメタンとジクロロメタンの溶出に成功した。さらに、ベンゼン、比較的沸点の高いアルカン (*n*-ヘキサン、ヘプタン、オクタン) の溶出を達成することができた。しかし、ベンゼンに対して水素をメチル基に置換したトルエンやオクタンよ

りも炭素数の多い直鎖アルカン、その他の極性溶媒（メタノール、エタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランなど）は溶出させることができなかった。そのため、より高い溶出力が期待できる移動相（ C_2H_4 や C_3H_8 など）を移動相として用いることで、溶出できる試料成分の範囲が広がることが期待できる。また、超低温下においては固定相との強い相互作用が起こってしまうため、超低温 HPLC のカラムの開発も試料適用範囲の拡大には効果的なアプローチであると考えられる。

参考文献

- [1] Motono, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6852–6858.
- [2] Motono, T.; Kitagawa, S.; Ohtani, H. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1503*, 32–37.

第七章 総括と今後の展望

7.1. 総括

クロマトグラフィー技術において温度は重要なパラメータであり、その使用温度域を拡張することはクロマトグラフィーのさらなる可能性を広げることにつながる。本研究では、未だ研究が行われていない超低温域での HPLC 手法の開発に取り組んだ。超低温域の HPLC における課題として移動相の凝固が挙げられるが、本研究では移動相として液化ガスを選択することによりその解決を試みた。本論文は、超低温下における HPLC の開発のために、液化ガスの利用の検討や液化ガスを移動相として用いた際の分離挙動に関する一連の研究をまとめたものである。第二章では、超低温 HPLC の開発に先駆けて、比較的簡易な条件で利用可能で、移動相としても利用実績もある液化二酸化炭素を移動相として用いることで、液化ガス移動相を用いる HPLC システムの開発と、純液化二酸化炭素を移動相として用いた際の基礎的な分離挙動の調査を行った。第三章では、さらにカラム基盤構造や各分析条件（温度、圧力、流速）が分離効率に及ぼす影響について検討を行った。第四章では、液体窒素温度（ -196°C ）で分析可能な HPLC システムを液化窒素ベースの移動相を用いることで開発し、さらに温度や移動相へのメタンの添加濃度の保持への影響について調査した。第五章では、超低温下における HPLC の保持比と移動相組成に関するモデル式を提案し、その保持挙動の解明を試みた。第六章では、超低温 HPLC の応用開発を指向して、利用可能な試料適用範囲を拡張するために、液化低級炭化水素を移動相として用いることによる溶出力の向上を試みた。以下に各章で得られた結果について述べる。

第二章では、超低温 HPLC の開発に先駆けて、まず液化ガスを移動相として用いる低温 HPLC システムの開発と、低温 HPLC における低分子化合物の分離挙動について調査した。比較的高い温度で液化して利用することができる液化二酸化炭素を移動相として用いることで、液化ガスを移動相として用いる低温 HPLC システム（ $-35\sim-5^{\circ}\text{C}$ ）の構築を行った。この構築した低温 HPLC システムにより試料成分の分離を確認した。また、純液化二酸化炭素を移動相として用いる HPLC における分離挙動は報告がなされていないため、基礎的な分離挙動の調査を行った。低温 HPLC における温度と分離性能の関係を求めたところ、特定の条件において一般的な HPLC とは正反対の傾向となる温度低下による分離性能の向上が起こることを見出した。また、保持比と分離効率の両方のパラメータにおいて、約 -15°C で温度に対する挙動に変化が生じることが分かった。

第三章では、液化二酸化炭素を移動相として用いる低温 HPLC における保持と分離性能へのカラム構造と分析条件（温度、圧力、流速）の影響について調査した。全多孔性粒子、非多孔性粒子、コアシェル型粒子を充填したカラムとモノリス構造型のカラムを用いて、様々な流速、圧力、温度条件での保持、分離性能を調査したところ、条件に依存してカラム空隙率の変動が起こり、分離性能に影響を及ぼすことが分かった。また、検討したカラムの中では、コアシェルカラムを用いた際に最もカラム空隙率の変動が少なく、分離性能が最も高くなった。

第四章では、 -196°C という超低温条件下における HPLC の開発とその基礎的な分離挙動について調査した。移動相として液化窒素や窒素とメタンの混合液化ガスを用いることで、これまで報告されている中で最も低い温度である -196°C という条件で HPLC 分離を達成した。同条件で移動相のみヘリウムを用いた超低温ガスクロマトグラフィーで同じ試料成分の測定を行うと、固定相への保持が大きく溶出しなかったため、超低温条件下では GC よりも HPLC の方が応用の可能性が高いことがわかった。また、温度と移動相中のメタン濃度の保持への影響を調査した。一般的な GC のように温度による保持の制御を試みたところ、移動相の沸点以上の条件で移動相が気化した場合に、急激に保持の増加が起こり、分離を行うには温度条件は沸点未満である必要があることが分かった。一方で、一般的な HPLC のように移動相組成 (N_2/CH_4 移動相のメタンの濃度) による保持の制御を試みたところ、保持の制御が十分に可能であることがわかった。さらに、 π 電子化合物や構造異性体の分離について検討した。試料としてアルケン類 (エチレン、プロピレン) を用いると、アルカン類を用いた場合と比較して固定相に対して強い保持を示したため、超低温下において π 電子による保持が選択的に強められていることが分かった。試料として *n*-と *iso*-ブタンを用いると、室温での GC と -196°C の HPLC 測定の間で構造異性体溶出順の逆転が起こることがわかった。

第五章では、保持モデルを提案し 超低温下における HPLC の保持機構の解明を試みた。移動相組成と保持比の関係から、二つの保持機構が働いていることを見出し、「吸着交換」と「疑似分配」の両方による保持機構を提案し、そのモデルに基づいて保持比と移動相組成の間の理論式を構築した。実際の N_2/CH_4 、 N_2/Ar 、 $(\text{N}_2/\text{CH}_4)/\text{C}_2\text{H}_6$ の移動相と未修飾シリカと ODS 固定相を用いた各条件における実験結果に対してモデル式を適合させることができ、さらに適合曲線より得られたパラメータから提案した保持機構の妥当性を示すことができた。また、 N_2/CH_4 の混合物に 25% の C_2H_6 もしくは 4% の C_2H_4 を添加した移動相と ODS カラムを用いた条件において、固定相に対して強い吸着性を示した π 電子化合物であるプロピレンを溶出させることに成功した。

第六章では、液化低級炭化水素を用いることで超低温 HPLC による様々な分子種の分離を試みた。超低温 HPLC において、固定相への強い吸着によって試料成分の保持が大きくなり、多くの分子種が溶出しないことが問題であった。そこで、溶出力の高い液化低級炭化水素 (メタン、エタン) を、それらが液化可能な -180°C 程度の温度条件で用いることで、超低温 HPLC における保持を大幅に減少させることに成功した。さらに、充填型のカラムに比べて移動相に対する固定相の体積比が小さいモノリス構造型のカラムを用いることで、さらなる保持の低減を実現し、これまで分離することができなかった極性化合物や高沸点化合物、ベンゼン環構造をもつ化合物の分離を達成し、分離可能な分子種の拡大を達成した。さらに、*n*-ヘキサンとシクロヘキサン、*n*-オクタンと *iso*-オクタンの保持比に大きな差が生じることがわかり、超低温 HPLC において構造認識能が向上し、化合物の構造に対する選択性が高くなることが分かった。

以上のように本研究では、超低温下における HPLC 手法の確立とその応用研究を見据え、液化ガスを用いることによって超低温 HPLC の開発を行った。また、超低温 HPLC の汎用性を高めるためにも重要な保持の制御法や保持機構に関する新たな知見を示した。

7.2. 今後の展望

本研究により、液化ガスを用いる低温・超低温 HPLC に関する基礎的な技術確立し、分離挙動に関する新たな知見を得ることができた。今後はこれをさらに発展させ、より応用的な利用法に関する開発が望まれる。以下に低温 HPLC・超低温 HPLC におけるそれぞれの今後の展望を示す。

低温 HPLC に関しては、第二章と第三章で述べたように液化二酸化炭素を移動相として用いた装置の開発に成功し、さらにこれまで報告されていない純液化二酸化炭素移動相を用いた際の分離挙動を明らかにした。その際にカラム内での移動相の凝固が分離効率に影響を及ぼすことが示唆された。カラム内で二酸化炭素の凝固が起こることで、カラム構造に不均一性が生じ、分離効率の悪化につながっていることが考えられる。そのため、移動相に有機溶媒をモディファイヤーとして添加することで、凝集を抑制し、分離効率の悪化も抑制することが可能となることが期待できる。また、モディファイヤーの添加により、移動相の溶解性が上がり分析可能な分析種が拡大するため、今後の応用研究の対象拡大も期待できる。

超低温 HPLC に関しては、第四章と第五章で述べたように液化窒素ベースの移動相を用いることで、これまで報告されている中で最も低い HPLC 分離温度である -196°C という温度で分離を行うことに成功し、さらにその保持機構も明らかにすることができた。また、第六章で述べたように液化低級炭化水素を移動相として用いることで、超低温 HPLC おいて問題となっていた強力な保持を抑制することに成功し、これまで溶出させることができなかった比較的高沸点のアルカンや極性化合物の分離を達成し、試料適用範囲を拡張した。現状では、まだ溶出することができない化学種が多く存在するため、現在の実験系からさらに保持を減少する必要がある。しかし、これまでの検討より多くの移動相条件を検討しており、移動相条件による保持の減少にも限界が見えてきている。一方で、第五章でも述べたように移動相に加えて固定相も超低温 HPLC の保持の制御において重要な要因の一つとなっている。そのため、今後は超低温 HPLC に適した固定相やカラムの探索や開発が必要となると考えられる。

次に超低温 HPLC で起こる問題として、試料導入や検出が挙げられる。現在の装置では、室温下で気体状態成分のみの試料注入を行っているが、一般的に HPLC で取り扱う試料は溶液状態である。しかし、超低温条件下で溶液状態の試料の注入を行うと、サンプルループ内で溶液が凝固し、試料注入を行うことはできない。そこで、溶液中の試料成分を固相に抽出し、超低温下で液化ガスを用いて溶出させ、試料導入を行う方法を考えた。この方

法により、気化しない高沸点成分の分析も可能となることが期待できる。一方で、検出部においても気化した成分を電子イオン化によりイオン化した成分の検出を行っているため、高沸点成分の対象試料としたときに、イオン化部まで試料成分が到達しない可能性も考えられる。そのため、検出部も超低温下の液化ガス中で検出可能なシステムへと変更する必要がある。一般的な HPLC の検出法として紫外線吸収を用いるのが選択肢の一つとして挙げられる。現在のシステムにおいて、紫外線吸収を示すベンゼン環構造を有する化合物の分離（溶出）も可能となっているため、超低温下で UV 検出器を用いたシステム開発を行うことで、高沸点成分の検出にも対応可能であることが期待できる。

また、序論でも触れたように超低温下における HPLC が可能となると、「不安定な化学種の網羅的分析」や「分子振動の抑制による分子形状認識に基づいた分離の向上」、「超低温環境中における相互作用評価手法としての利用」の実現が期待できる。第六章で述べたように超低温 HPLC では炭化水素類の構造情報の違いを反映して保持に大きな違いが生じた。そのため、「分子振動の抑制による分子形状認識に基づいた分離の向上」への利用が期待できる。一般的に糖鎖は結合点が多く、高度に分岐し多数の異性体構造を取るため、通常条件の HPLC では分離することはできない。また、多孔性グラファイトカラムと高温を用いた特殊な分離条件を用いた場合にも完全に分離することは困難であることが報告されている[1]。超低温 HPLC には構造的な違いに対する選択性が高く働くことが期待できるため、複雑な糖鎖の構造異性体の網羅的分析のための効果的な分析手法となることが期待できる。

参考文献

- [1] Zhou, S.; Huang, Y.; Dong, X.; Peng, W.; Veillon, L.; Kitagawa, D. A. S.; Aquino, A. J. A.; Mechref, Y. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6590-6597.

共同研究者一覧

(五十音順)

岩瀬 弘樹

大谷 肇

大坪 美奈

北川 慎也

永井 貴士

謝辞

本研究に際し、終始丁寧かつ有益なご助言及びご鞭撻を賜りました、名古屋工業大学大学院工学研究科 北川慎也准教授に謹んで感謝いたします。

ご多忙の中、学位審査をしていただきました、名古屋工業大学大学院工学研究科 大谷肇教授、高田主岳教授、東京薬科大学の梅村知也教授には有益なご助言とご指導を頂きました。ここに感謝の意を捧げます。

本研究を行うにあたり、様々なご助力、ご助言を頂きました名古屋工業大学大学院工学研究科 飯國良規先生、大谷・北川研究室の皆様に感謝いたします。

研究室に配属された当初、右も左もわからなかった私に丁寧に指導し、研究者としての基礎を作ってくださった平野友彦博士、小林歩様、梅田英臣様には心よりお礼申し上げます。また、私の研究を共に支えてくれた、永井貴士様、大坪美菜様、岩瀬弘樹様にも心より感謝申し上げます。

最後に博士後期課程への進学に理解を示し、応援してくださった両親に感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

本論文に関連する原著論文

第 2 章

“Chromatographic behavior of small organic compounds in low-temperature high-performance liquid chromatography using liquid carbon dioxide as the mobile phase”, T. Moton, T. Nagai, S. Kitagawa, and H. Ohtani, *J. Sep. Sci.*, **2015**, *38*, 2381 – 2386.

第 3 章

“Effect of Column Structure on Separation Efficiency in Low-Temperature HPLC Using Pure Liquid Carbon Dioxide as the Mobile phase”, M. Otsubo, T. Moton, S. Kitagawa, and H. Ohtani, *Chromatography*, **2017**, *38*, 31 – 37.

第 4 章

“High Performance Liquid Chromatography at -196°C”, T. Moton, S. Kitagawa, and H. Ohtani, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 6852 – 6858.

第 5 章

“Retention in high-performance liquid chromatography at -196°C”, T. Moton, S. Kitagawa, and H. Ohtani, *J. Chromatogr. A*, **2017**, *1503*, 32 – 37.

第 6 章

“Separation of low molecular compounds in ultralow-temperature HPLC using liquefied low-hydrocarbons as mobile phase”, T. Moton, S. Kitagawa, and H. Ohtani (投稿準備中).