

## [ 話 題 ]

# 作用場流動分画法 (Field-Flow Fractionation) の環境試料への適用

塩谷 岳樹、桑本 融\*

### はじめに

我々を取り巻く環境、特に天然水中には種々のコロイド粒子が複合して多量に存在している。これらのコロイドは、水中の溶存微量元素の主たる吸着担体として働くだけでなく、天然有機化合物や人工の有害物質の除去や移動に大きな影響を与えている。とくに金属水酸化物や粘土に由来するコロイドに対して、これまで数多くの吸着実験が精細に実施され、その結果、コロイドへの各種化合物の吸着機構に関する研究は大きく進展した。しかし、天然水中に存在するコロイドの分析はあまり行われておらず、これまでの研究のほとんどがフィルターの孔径の相異を利用したコロイドの粒径分画と分離にとどまっている。そのため、天然水中で生成して循環するコロイドの内、どのような様態のものが実際の吸着担体の役割りを担っているのか、また、その化学成分組成は何か、といった疑問には未だ答えを見いだせないでいる。

最近、Beckettら[1, 2]、Murphyら[3]は作用場流動分画法 (Field-Flow Fractionation, FFF) による環境試料中のコロイド分析を試みている。FFF法によると、分子量が大きいコロイドでも十分に相互分離ができるのでコロイドの粒径分布のみならず、粒径ごとにその化学元素組成比が正確に求まることになる。現在のところ、FFF法によるこうした詳しいコロイド分析を行なっているのは、Beckettを中心とするグループである。以下に、この方法の原理と実際について紹介する。

### FFF法の原理

1966年、Giddings[4]は従来のクロマトグラフィーやゲル濾過法で分離が不可能であった分子量数百万の巨大分子やその会合体、例えば、細胞、蛋白質、無機コロイドなどを分離する目的で、FFF法の原理を提唱し、その後、実働する装置を開発した。

FFF法による分離の原理は、分析試料と分離場との相互作用の差を利用する点で、クロマトグラフィーと同様である。しかし、FFF法では、クロマトグラフィーの様に固定相は存在せず、移動相中の試料の分離には、カラム流路に対して垂直に働く各種作用場 (重力場、磁場、電場、横断流場、熱勾配場など) との相互作用を利用する。そのため、溶離液にはコロイドを保持している母液をそのまま用いることができる。この原理から解かるように、FFF法は pH に敏感な化合物や壊れやすい物質などの分離に有利であり、現在では医化学や生化学の分野で広く応用されている[5-7]。

FFF法の分離カラム (図1-A) は、厚さ70~250 $\mu$ m、幅数cmの中空状の薄層である。通例、これをChannelと呼び、作用場はこれに垂直な方向に働く。サイズ分離をする目的では、作用場として重力場 (遠心力) を用いることになるが、こうしたFFF法をSedimentation FFFと呼ぶ。遠心力の作用によって、試料中の重いコロイドはChannelの下層に移り、軽いものは、比較的中央層に移る。一方、図1に示すようにChannel内には溶離液が流れていて、流線が放物線状の定常的な層流が形成されている。即ち、Channelの中

\*京都大学理学部化学教室

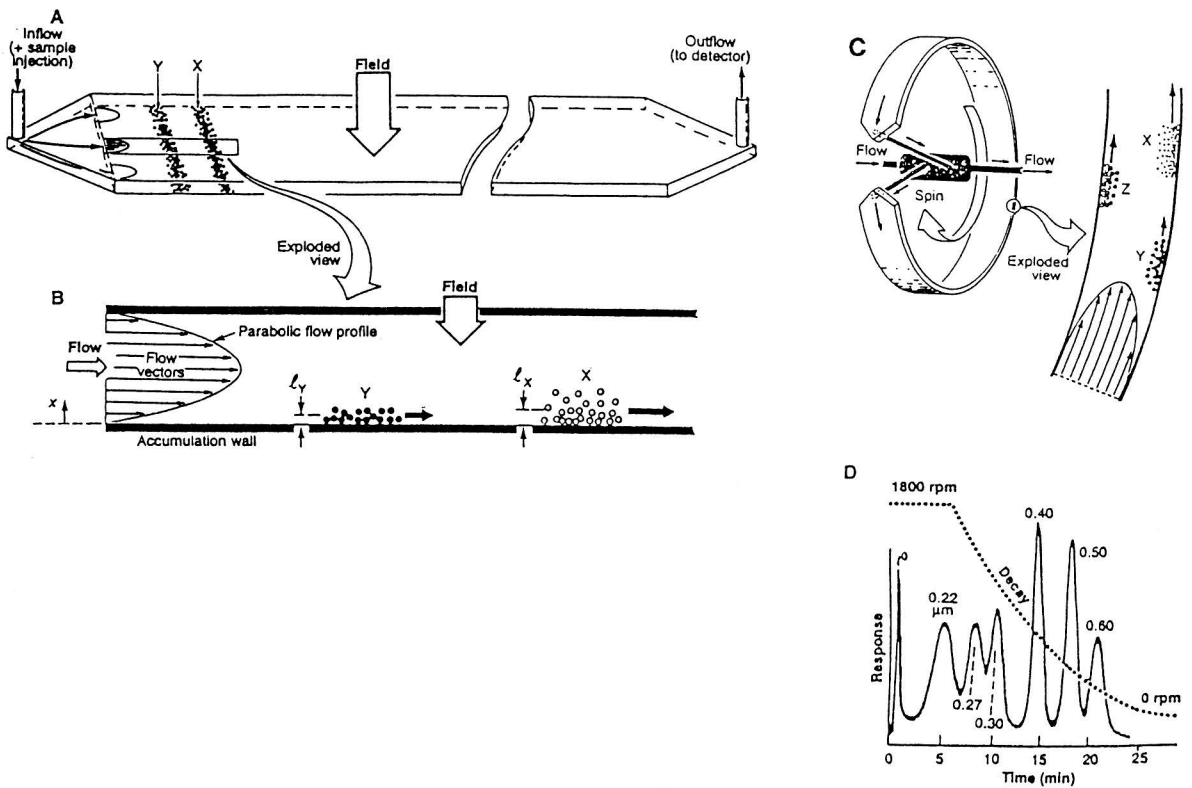


図 1 Sedimentation FFFの原理と実際

(A) FFFのChannel (B)Channelの拡大図とコロイドX,Yの分離 (C)作用場の方向(D)典型的なフラクトグラム、回転数(点線)をプログラムにより減衰させている。(論文6より一部改訂)

中央層では溶離液の流速が速く、コロイドの溶出も速いが、Channelの下層では、コロイドの溶出は遅くなる。言い換えれば、軽い物質は速く、重い物質は遅く溶離され、両者の分離が達成される[6]。

分離は、コロイド粒子の半径 ( $d$ ) と、溶離液と試料の密度差 ( $\Delta \rho$ ) に依存するため、粒子半径による分離が可能となる。但し、試料中に極端に密度の違う物質が存在すると分離が不可能になる場合がある。図1-Cのように遠心力を受けてChannelの下層に位置するコロイドと、遠心力を受けないで上層に分布する物質(例えば質量の小さいイオンなど)は、共に同じ流速で溶離されるので、両者の分離は困難となる[6]。この問題を避けるために、とくに環境試料ではコロイド粒子のみを捕集する前処理が必要である。

### 試料の調整

天然水を試料とする時には、通例、コロイド粒子のみを捕集する目的と感度の増大をはかる目的で、前濃縮を行なう。Beckettは、(1) on-channelでの濃縮、(2)分子量分画フィルターでの捕捉と濃縮、(3)遠心分離機での濃縮、(4)凝析による濃縮を試みている。濃縮したコロイド試料は、少量の溶離液に分散させた後、FFF法により分離する。上掲の濃縮法は、いずれを用いても、精度よく再現するので、どの操作法も環境試料中のコロイドの実際のサイズ分布を忠実に反映するものと考えられる[1]。但し、遠心分離法は小さいコロイドに適用できない欠点がある。また凝析法は、操作後、凝集してサイズが変化するコロイドには適用できない。TOCを多く含む試料水にこの傾向があることが分かっている。しかし、この点を除けば、凝析法は最も

簡便な方法である。

### 検出器

検出には、HPLC用の示差屈折計などを用いる。同一粒径のコロイドについて質量濃度を求めようと思うと、Evaporative Mass Detectorが必要となる。しかし、波長254nmの光吸収を用いて、吸光度を溶離時間に対して記録することにより描かれたフラクトグラム（クロマトグラムに対応する）は、Evaporative Mass Detectorから得られるフラクトグラムと多くの場合一致する（図2）。そのため、相対濃度を求めるならば、UV254nm検出法を用いるほうが簡便さにおいて有利である[1]。UV254nm検出法で検知する光量の増減は、コロイドの光吸収によるものではなく、光散乱によるものである。

その他に、Murphyらは、ICP-Massに溶出液を直接導入し、コロイドの成分を求める研究を試みている[3]。

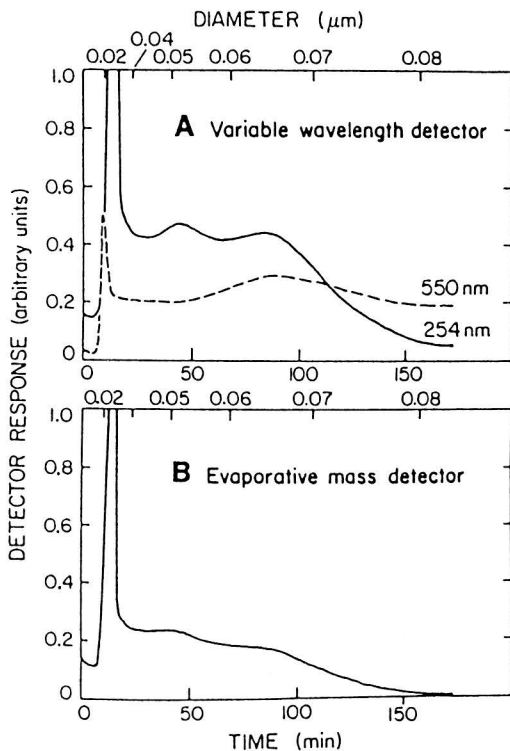


図2 Evaporative mass detectorとUVの比較  
UV254nmはEvaporative mass detectorと良い相関を示している（論文1より引用）。

### 環境試料の分析

Murphyらは、FFF法を適用して河川水中のコロイド分析を行なっている[3]。その結果を要約すると次のようになる。(1) 0.05から0.5 μmまでの大きさであるコロイド粒子は、粒径に対して連続的に分布すること。(2) 粒子状化合物を取り除くために多用されるフィルターの孔径(0.2~0.4 μm)より小さい、0.1 μmの大きさのコロイドが多いこと（図3b）。(3) コロイド粒子の化学組成は、そのサイズによって変化する（図4）。また、コロイドのSi/Al比は粒径の増大と共に大きくなるのに対し、Mg/Al比は逆に小さくなる。これが、粘土鉱物の種類がそのサイズによって異なるものなのか、あるいは河川水中で何らかの化学反応が起きたことによるものなのかは定かではない。

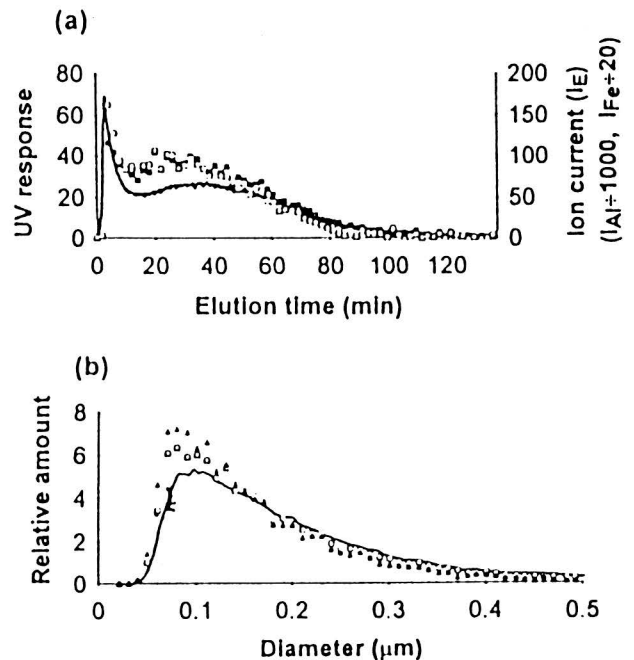


図3 Darling川で採水した試料のSedimentation FFF

(a) フラクトグラム (b) 粒径分布

実線はU.V.254nmの応答、

記号はICP-Massを用いたイオン電流の応答、H, BはAl, GはFeを表す

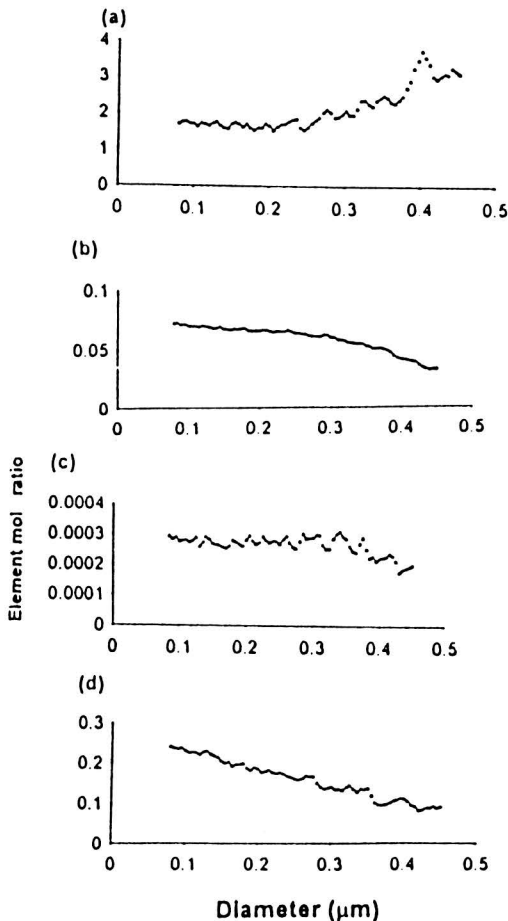


図4 Darling川で採水した試料中のコロイドの元素組成比

(a) Si:Al (b) Mg:Al (c) Rb:Al (d) Fe:Al

また Beckett らは、河川水中のコロイドに燐などの栄養塩を吸着させて、その吸着機構を検討している[2]。いずれも $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$ といった、比較的大きいコロイドの分析は可能になったが、さらに小さい粒径のコロイドの分析も今後、可能になるだろう。

FFF法は、こうした用い方以外にも様々な適用されている。重力場に変わる作用場として、電場、横断流場、熱勾配場などを用いて、磷酸鉄などのコロイド粒径分布[8]、アルブミン、グロブミンなどの生体物質の分離[9]、有機溶媒中でのポリマーの粒径分布[10]などに用いられている。FFF法の理論から求めたコロイドの粒径は、信頼性の高いもの

であると言われているが、この粒径を基礎にすると、現在我々が扱っているフィルターや標準試料などに記載された孔径や粒度は実際のサイズよりも大きいことが、一般的な傾向として認められる。

FFF法は、例えば、検出器としてTOC測定装置を用いることにより湖水中のバクテリアなどの総量を、サイズ別に分けることを可能にするであろう。また、珪酸とアルミニウムの可溶性縮合体のように、pHに敏感でしかも分子量が小さいものから大きなものまで連続的に変化するような複合系[11]の解析でも、FFFは有効な分離手段である。

#### 参考文献

- [1] R. Beckett, G. Nicholson, B. T. Hart, M. E. Hansen and J. C. Giddings, *Water Res.*, **22**, 1533 (1988)
- [2] R. Beckett, D.M. Hotchin and B.T.Hart, *J.Chromatogr.*, **517**, 435 (1990)
- [3] D. M. Murphy, J. R. Garbario, H. E. Taylor, B.T.Hart and R. Beckett, *J. Chromatogr.*, **642**, 459 (1993)
- [4] J.C.Giddings, *Sep. Sci.*, **1**, 123 (1966)
- [5] 波多野博行, *化学*, **36**, 488 (1981)
- [6] J.C.Giddings, *Science*, **260**, 1456 (1993)
- [7] 星野忠夫, *分離科学ハンドブック* (妹尾学他編), 共立出版 pp. 145-147 (1993)
- [8] E.Dalas, P. Koutsoukos and G. Karaiskakis, *Colloid Polym. Sci.*, **26**, 155 (1990)
- [9] J. C. Giddings, M. A. Benicasa, M. K. Liu and P. Li, *J. Liquid Chromatogr.*, **15**, 1729 (1992)
- [10] J.J.Kirkland and C. H. Diliks Jr., *Anal. Chem.*, **64**, 2836 (1992)
- [11] 塩谷岳樹, 桑本融, 杉山雅人, 堀智孝 第42回分析化学会年会講演要旨集 p.447 (1992)