

ノート (若手初論文)

ポータブル小型液体クロマトグラフのための 深紫外発光ダイオードベースの吸光度検出モジュールの開発

小山 魁人¹, 西村 卓馬¹, 石田 晃彦^{*2}, 日比野光恵²,
真栄城正寿², 谷 博文², 渡慶次 学²

近年, サンプリングした現場で即時に分析が可能な小型分析装置の需要が高まっている. 著者らは, 小型・低電力の電気浸透流ポンプとカラム内蔵チップからなる小型 HPLC システムの開発に取り組んできた. 本研究では, 小型 HPLC システム全体のさらなる小型化を目指しながら検出における汎用性を拡張するため, カラム内蔵チップに適用可能で, 汎用性が高い紫外吸光度検出モジュールを構築した. そのために光源及び受光器に深紫外発光ダイオード (ピーク発光波長 255 nm) 及びフォトダイオードを用いるとともに, これらの動作を制御し, 信号を処理するシステムも構築した. さらに, 検出モジュールが市販分光光度計並みの感度を持ち, 良好にクロマトグラム測定ができることを実証した.

1 緒言

液体クロマトグラフィー (HPLC) は, その幅広い汎用性から, 品質管理, 食品分析, 臨床検査, 環境調査, 科学捜査等さまざまな分野において利用されている. 近年, 従来簡易なキットで行われることが多かった現場分析においても多成分を分離して定量するという HPLC の特長を活かした分析ニーズが顕在化している. そのため, 大型かつ大重量で現場分析への適用がほとんど困難であった HPLC 装置の小型化・可搬化を試みた報告や総説が目立ってきている^{1)~5)}.

著者らは, カラムを内蔵したマイクロ流体チップ⁶⁾⁷⁾及び小型・低電力の電気浸透流ポンプからなる小型 HPLC システムの開発に取り組んできた⁸⁾. さらに, この小型 HPLC システムに適用可能で nM レベルの検出感度を持つ高感度な電気化学検出用フローセルを報告している⁹⁾. しかし, 本小型 HPLC システムの応用範囲を拡張するためには, さらなる小型化と汎用性が高い紫外吸光度検出器を装備することが課題になっていた. 小型化を追求することにより HPLC ベースの化学センサデバイスのような分析システムを構築しうる. しかし, 市販の小型重水素光源や分光器では小型化に限界があった. そこで本研究では, 光源及び受光器として発光ダイオード (LED) 及びフォトダイオード (PD) に着目した.

LED は小型, 軽量, 低消費電力, 長寿命などの利点を持つことから LED を利用した光度計がすでに多く報告されている^{10)~13)}. 近年, 多くの有機化合物が吸収を示す深紫外領域 (< 280 nm) で発光する LED が入手可能になり, 紫外吸光度検出器への利用も検討されている^{14)~18)}. Schmid らは, 深紫外 LED (DUV-LED) (255 nm) を HPLC 用吸光度検出器に初めて利用し, PD とともに市販フローセルに適用して芳香族化合物の検出に応用した¹⁴⁾. しかし, DUV-LED は, 光子変換効率が低いために発熱し, 発光強度の低下とノイズの増大とともに感度の低下を引き起こすため, DUV-LED 検出器のためのヒートシンク¹⁵⁾や循環水冷式冷却器¹⁸⁾が提案されている.

本研究では, 汎用性が高い深紫外吸光度検出器を備え, 設置面積が A5 サイズの超小型 HPLC システムを構築することを目的として光源及び受光器にそれぞれ DUV-LED 及び PD を用い, 著者らが開発してきたカラム内蔵チップ (縦 40×横 70×厚さ 5 mm; カラム寸法: 内径 0.8 mm, 長さ 30 mm) に装着可能な小型吸光度検出モジュールを構築した. DUV-LED には, ピーク発光波長が 255 nm の LED を採用した. 255 nm 周辺では不飽和結合や共役系を有する有機化合物が吸収を示し, 芳香族など検出可能な有機化合物の種類が多いため比較的高い汎用性が期待できる. さらに, DUV-LED 及び PD の動作を制御し, 信号を処理して吸光度を出力する電子回路からなるシステムも構築し, HPLC 用検出器としての基本的な性能を評価した.

* E-mail: ishida-a@eng.hokudai.ac.jp

¹ 北海道大学大学院総合化学院総合化学専攻: 060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

² 北海道大学大学院工学研究院応用化学部門: 060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

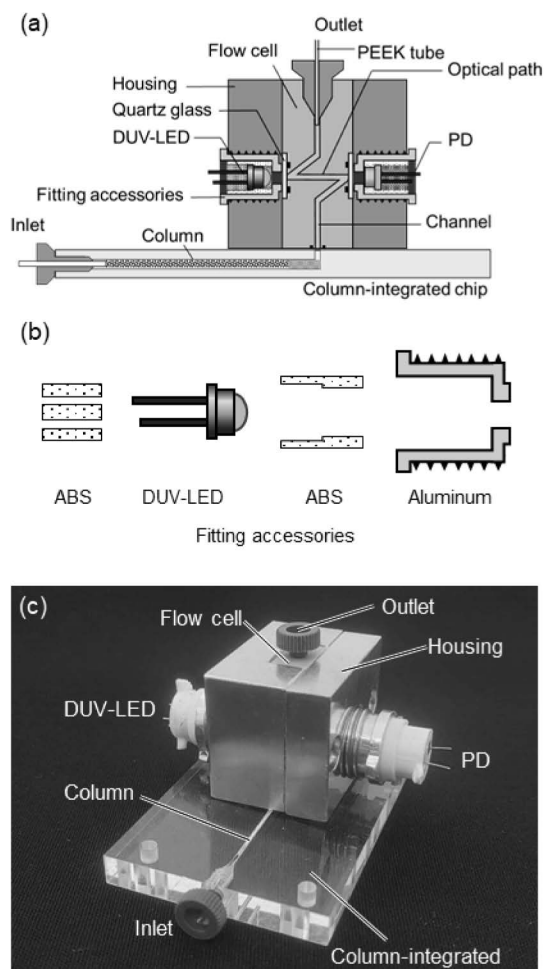


Fig. 1 (a, b) Schematics and (c) photograph of a DUV-absorbance detection module mounted on a chip containing a column

2 実 験

2.1 試 薬

ウラシル, ベンゼン, トルエンは, 富士フィルム和光純薬製特級を用い, アセトニトリルは富士フィルム和光純薬製高速液体クロマトグラフ用を用いた. 測定試料はすべてアセトニトリル/水 (50/50) に溶解して調製した.

2.2 装 置

キャリアー及び移動相の送液にジーエルサイエンス製ポンプ PU-710i を用いた. 吸光度測定と比較用として日立ハイテック製ダブルビーム分光光度計 U-2900 を用いた.

2.3 検出モジュールの作製

2.3.1 フローセル及びハウジングの作製 フローセルは, 光路を含む Z 字型流路を PEEK 樹脂に切削加工し, 検出窓に O リングを介して石英製円板 (仙台石英硝子製作所製, 直径 8 mm, 厚さ 1 mm) を設置することにより作

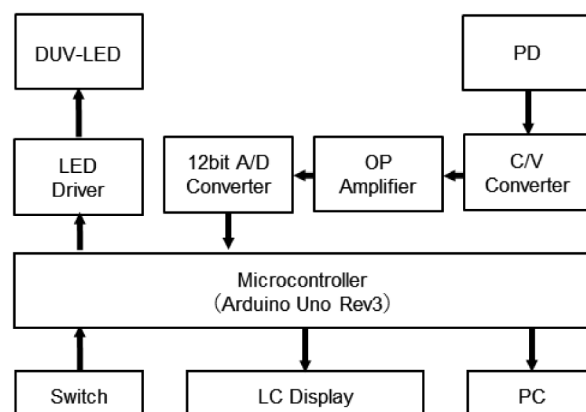


Fig. 2 Schematic diagram for operating LED and PD, and signal processing

製した (Fig. 1a). LED 及び PD のハウジングとして, アルミニウム角材を切削加工した. ハウジングへの LED 及び PD の取り付けのためアルミニウム角材及び 3D プリンター (ABS 樹脂) を用いてフィッティングを作製した (Fig. 1b). フローセルにハウジングをネジで固定したのちフィッティングを用いて DUV-LED (Thorlabs 製 LED255J, ピーク発光波長 255 nm (半値幅 12 nm), ボールレンズ付き, 半値角 7.5°, 順方向電流 110 mA) 及び PD (浜松ホトニクス製 S1336-5BQ, 受光面サイズ 2.4×2.4 mm, 感度波長範囲 190 ~ 1100 nm) を固定した.

2.3.2 動作制御・信号処理システムの構築 LED の点灯制御及び PD 出力の信号処理のためマイクロコントローラーボード (Arduino 製 Arduino Uno Rev3) を含む電子回路を作製した (Fig. 2). LED の点灯・消灯にはトランジスターによるスイッチング回路を用い, NPN トランジスター (UNISONIC TECHNOLOGIES 製 2SC1815L-Y-T92-K, コレクター電流 150 mA) のコレクター側に直流電源 (12 V), 定電流ダイオード (SEMITEC 製 E-183 (ピンチオフ電流 18 mA) 3 本及び E-153 (15 mA) 3 本を並列) 及び DUV-LED を配置し, マイクロコントローラーからトランジスターのベースに電圧 (5 V) を出力し, ベース電流 (1.5 mA) が流れると, コレクター-エミッター間に定電流ダイオードで制御された電流 (99 mA) が流れ, LED が点灯する回路とした. PD が出力する信号は 2 個のオペアンプ (日清紡マイクロデバイス製 NJM2119D, 2 回路集積) で電流・電圧変換したのち非反転増幅した. さらに, 信号を 12 bit アナログ-デジタル (A/D) コンバーター (マイクロチップ・テクノロジー製 MCP-3208-CI/P) を介してマイクロコントローラーに取り込んだ. このほか吸光度の表示のため I2C バス用双方向電圧レベル変換モジュール (秋月電子通商製 AE-PCA9306) を介して 16×2 行 I2C 接続キャラクター液晶ディスプレイモジュール (Xiamen Zettler Electronics 製 ACM1602NI-FLW-FBW-M01) をマイクロコントローラーに

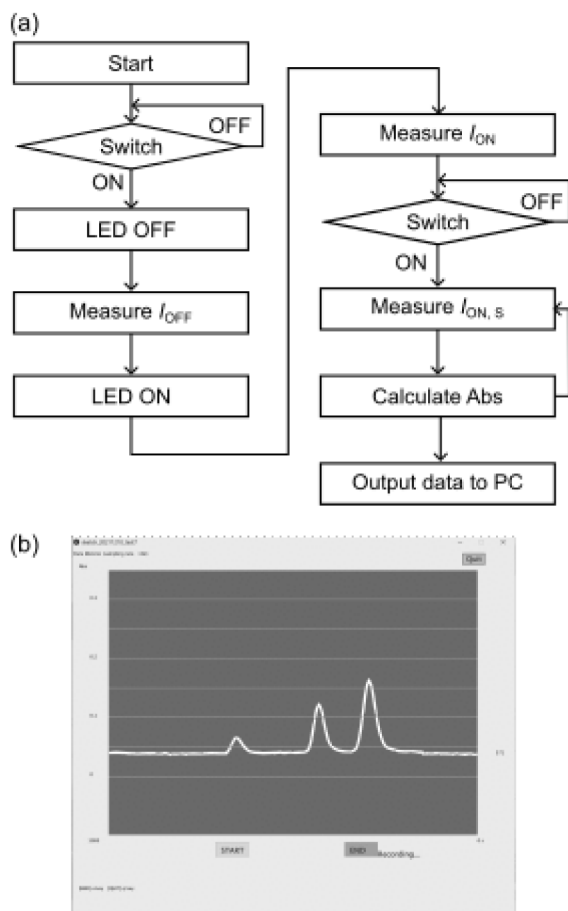


Fig. 3 (a) Flow diagram to obtain absorbance through an LED driver and signal processing (b) screenshot of the Processing application for visualizing and saving data

接続した。また、LEDを適時に点灯制御するためタクトスイッチを接続した。マイクロコントローラーには点灯制御及び信号処理をするためのプログラムを書き込んだ (Fig. 3a)。さらに、マイクロコントローラーが出力するデータ (吸光度) の可視化と記録のためパーソナルコンピュータと接続し、プログラミング言語 Processing の統合開発環境 (<https://processing.org/>) で作成したプログラムを用いた (Fig. 3b)。

2.4 吸光度測定

吸光度検出モジュールの評価のため、HPLCポンプ及びインジェクションバルブ (IDEX HEALTH & CARE 製 V-451) を接続し、各種濃度のウラシル溶液を注入して吸光度を測定した。バルブからセルまでの拡散による希釈の影響が低減されるようチューブ長を 100 mm (内径 0.5 mm) とし、注入体積を 100 μL とした。キャリアはアセトニトリル/水 = 50/50 とし、流量 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ で送液した。吸光度はピーク高さから得た。

検出モジュールとの比較のため市販分光光度計により光

路長 1 cm の石英セルを用いて波長 255 nm で吸光度を測定した。

2.5 クロマトグラム測定

クロマトグラム測定のため HPLC ポンプ, バルコ製 VICI インターナルインジェクター (0.5 μL), ジーエルサイエンス製逆相分離カラム (InertSustain AQ-C18, 粒子径 3 μm , 内径 1.0 mm, 長さ 30 mm), 吸光度検出モジュール (光路長 0.5 mm, 光路長 5 mm, セル容量 0.98 μL) からなる HPLC システムを組み立てた。カラム前後の配管にはいずれも 50 mm 長の PEEK チューブ (内径 0.5 mm) を用いた。これにモデル試料として、ウラシル (134 μM), ベンゼン (48 μM), 及びトルエン (55 μM) を含む溶液を注入した。移動相は、アセトニトリル/水 = 50/50 とし、流量を 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ とした。ピークの帰属は各モデル物質を単独に注入して行った。

3 結果と考察

3.1 フローセルの構築

電子回路を除く検出モジュールは、著者らが開発してきたカラム内蔵チップの上面 (40 \times 70 mm) への装着が可能になるよう寸法を縦 32 \times 横 50 \times 高さ 25 mm とした (Fig. 1 参照)。検出モジュールは、簡素な構成を目指し、LED 及び PD を装着するためのハウジングとフローセルからなる構成とした。ハウジング及びフィッティングの素材には軽量化と放熱の観点からアルミニウムを選択した。ただし、ヒートシンク構造は設けなかった。光路の長さや径の選択は、一般に感度と試料バンドの拡散及び分解能の間のトレードオフになる。本研究では取掛かりとして、光路長を 5 mm とし、光路長については後述するように 0.5 mm とした (光路体積 0.98 μL)。光学系においては LED に備えられたボールレンズを除いてほかのレンズは用いなかった。検出窓は LED または PD のフィッティングで締め付けて押さえる構造とした。その際、LED 及び PD の光軸を確実に合わせるための固定具をフィッティング内に設けた。市販カラムを用いて評価する場合にはフローセルのインレットに 1/16 インチ配管用フィッティングポートを設けた。

検出モジュールは、組み立てが容易であるもののアセトニトリル/水 (50/50) 混合溶媒を HPLC ポンプで 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, 3 時間送液した限りでは漏液は認められなかった。さらに、DUV-LED を 2 時間連続点灯させ、ハウジングの表面温度を測定したところ、温度は点灯後約 30 分まで上昇したのち 34.1 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ (室温 26.4 $^{\circ}\text{C}$) でほぼ一定となり、それ以上の発熱はなかった。

3.2 LED 及び PD の制御・信号処理システムの構築

吸光度の取得のため透過度 0 % 及び 100 % に相当する

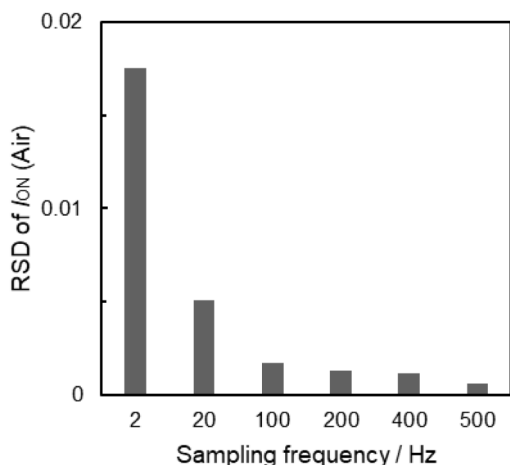


Fig. 4 Relative standard deviations of I_{ON} (Air) at various sampling frequencies

信号はそれぞれLEDが消灯及び点灯時のPD出力信号とした。吸光度を得るために、まず参照溶媒を光路内に導入した状態で、LEDが消灯時の信号強度 I_{OFF} とLEDが点灯時の信号強度 I_{ON} を取得した。次に、LEDを点灯させ、試料を導入したときの信号強度 $I_{ON,S}$ を取得した。これらの信号をマイクロコントローラーで式(1)に従って演算し、吸光度 A を出力した。

$$A = -\log\left(\frac{I_{ON,S} - I_{OFF}}{I_{ON} - I_{OFF}}\right) \quad (1)$$

ここで、 I_{ON} 、 I_{OFF} 、及び $I_{ON,S}$ は、A/Dコンバーターから0.5秒間、所定数サンプリングした信号の平均値とし、吸光度 A はサンプリングの次の0.5秒後に1 Hzで出力した。

3.3 信号のサンプリング数

信号強度のサンプリング数(サンプリング周波数)を検討するため、フローセル(光路径1.0 mm, 光路長5.0 mm)内が空気で満たされた状態で光強度 I_{ON} (Air)を100秒間測定し、その相対標準偏差(RSD)を求めた。Fig. 4に示すように、サンプリング数の増加とともに I_{ON} (Air)のRSDは減少し、1から250(サンプリング周波数0.5から500 Hz)にすることでRSDは約1/20になった。このことはサンプリング数の増加によってノイズが低減されることを示唆している。サンプリング数300(600 Hz)以上ではマイクロコントローラーの処理能力を超え、データの出力が得られなかったことからサンプリング数を250(500 Hz, サンプリング時間0.5秒)とした。

3.4 光路径

光路径を0.5~1.0 mmの範囲で変えてフローセル(光路長を5 mm)を作製し、空フローセル(空気)で透過光強

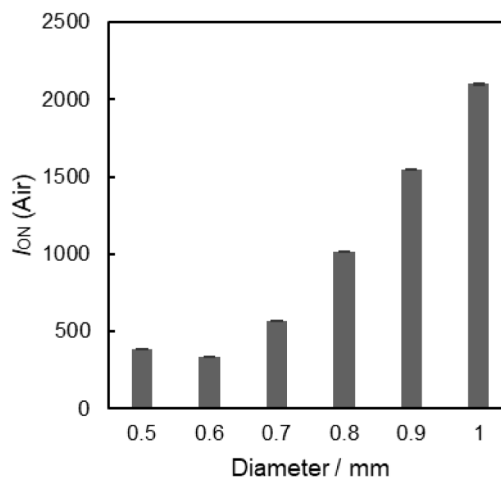


Fig. 5 Light intensities (I_{ON} (Air)) obtained at various light path diameters

Error bars represent the standard deviations

度 I_{ON} を測定した (Fig. 5)。その際、LEDの発光が安定化する時間を考慮してLEDの点灯後60分から15分間の平均値で評価した。 I_{ON} (Air)は光路径の2乗にほぼ比例するように増加したが、各光路径における相対標準偏差は同程度であった。光路径0.5 mmにおいて I_{ON} の測定が可能であり、拡散による希釈効果の低減を考慮して光路径を0.5 mmをとした。

3.5 ベースラインの安定性

ベースラインの安定性を評価するため検出モジュールにアセトニトリル/水(50/50)混合溶媒を流し、吸光度を3時間測定した (Fig. 6a)。また、比較のため分光光度計で移動相の吸光度を15分間測定した。検出モジュールによるベースラインは測定開始後約30分でほぼ一定となり、その後ドリフトは見られなかった。点灯後30分間のベースラインの変動は、DUV-LEDの発光強度の温度依存性によるものと考えた。発光強度は温度の増加によって減少する特性があり¹⁹⁾、LEDのハウジング温度と発光強度は点灯後増加または減少し、ほぼ30分後に一定値に到達したからである (Fig. 6b)。ベースラインノイズとして安定化後の吸光度の標準偏差を求めたところ、0.54 mAU (AU: Absorbance Unit) であり、分光光度計での0.56 mAUとほぼ同定であった。以上から測定はLEDの点灯後30分以降とした。また、本検出モジュールの構成においてLEDの発光は安定しており、ベースラインノイズはほぼ一定であることが示された。

3.6 吸光度測定

HPLCポンプ、インジェクター、検出モジュールからなるフローシステムを組み立て、各種濃度のウラシル溶液を

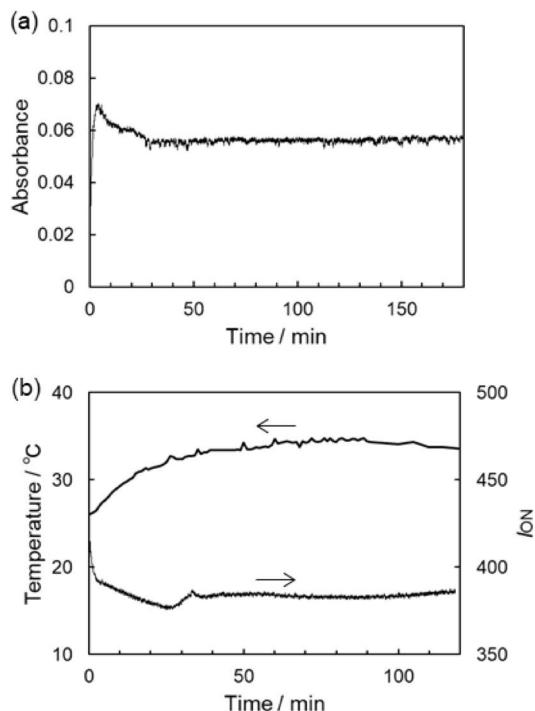


Fig. 6 (a) Baseline output from the proposed detection module. (b) time courses of the housing temperature and the emission intensity of LED

注入して吸光度を測定した (Fig. 7). 吸光度は $0 \sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0 \sim 89 \mu\text{M}$) の範囲で良好な直線性 ($y = 0.0473x + 0.0001$, $R^2 = 0.999$) を示した. 傾きは光路長 5 mm に換算した市販分光光度計のものと同等であった. 若干の差異は, 各光源の波長及びバンド幅 (LED $\pm 5 \text{ nm}$, 分光光度計 $\pm 1 \text{ nm}$) の差異によるものと考えた. 検出モジュール及び分光光度計による検出限界はそれぞれ 287 nM 及び 173 nM ($S/N=3$) とほぼ同等であった. このことから検出モジュールが出力する吸光度の妥当性が示された.

3.7 クロマトグラム測定

検出モジュール及び市販逆相カラムを用いて構築した HPLC システムにおいて, モデル物質としてウラシル, ベンゼン及びトルエンを含む溶液を注入し, クロマトグラムを測定した. カラムは開発中のチップ型カラムの寸法 (内径 0.8 mm, 長さ 30 mm) に近い市販品を選択した. また, 移動相の流量は, 既に開発している電気浸透流ポンプの最大流量 ($20 \mu\text{L min}^{-1}$) とした. 得られたクロマトグラムには, Fig. 8 に示すように 3 種類の物質に由来するピークが観測され, 各ピークの保持時間及びピーク幅の変動係数はそれぞれ 3% 及び 5% 未満と, 再現性は良好だった. ピーク幅は, カラム外拡散を考慮してもいずれもセル容量の 30 倍以上であり, セル容量のピーク形状への影響は小さいと推察した. ピーク高さ及びピーク面積は, 変動係数が 7% 程度であり, 分光光度計を用いて求めたモル吸光係数 [ウ

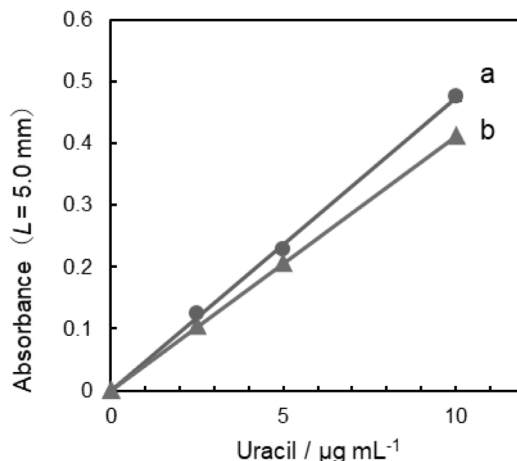


Fig. 7 Standard curves for uracil obtained using (a) the proposed detection module and (b) a commercially available spectrophotometer. Each data point represents the mean \pm SD

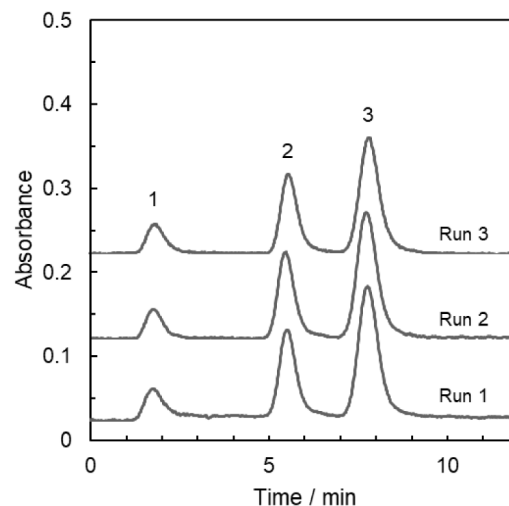


Fig. 8 Chromatogram obtained with the developed detection module

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$. Flow rate: $20 \mu\text{L min}^{-1}$. Peaks: 1, uracil ($134 \mu\text{M}$); 2, benzene ($48 \mu\text{M}$); 3, toluene ($55 \mu\text{M}$)

ラシル $1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ベンゼン $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, トルエン $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (255 nm)] と導入濃度から求めた吸光度に対応していることを確認した. 以上から, 本検出モジュールが小型液体クロマトグラフの検出器として利用可能なことが示された.

4 結 言

本研究では, 著者らが開発してきた小型 HPLC システムのチップ型カラムに装着可能で, DUV-LED を光源とする小型紫外吸光度検出モジュールを作製した. 信号の処理方法及び光路長の検討により, 市販の分光光度計と同等の感

度で、クロマトグラム測定が可能であることを示した。現在、フットプリントがA5サイズ以下のポータブルHPLCシステムを設計中であり、本検出モジュールを組み込むことで実現できる見込みが得られた。本研究では、ピーク発光波長255 nmのLEDを採用したが、本研究の成果はほかの発光波長を持つLEDにも適用可能である。

謝 辞

本研究の一部は、北海道大学ロバスト農林水産工学国際連携研究教育拠点の助成を受けたものです。検出モジュール作製における切削加工は北海道大学工学系技術センター工学系ワークショップで行われました。電子回路設計において金沢工業大学鈴木保任教授に有益な助言をいただいたことに謝意を表します。

(2022年12月9日、第38回イオンクロマトグラフィー討論会において一部発表)

文 献

- 1) K. Lynch, A. Chen, Y. Yang, J. J. Lu, S. Liu : *J. Sep. Sci.*, **40**, 2752 (2017).
- 2) S. Chatzimichail, D. Casey, A. Salehi-Reyhani : *Analyst*, **144**, 6207 (2019).
- 3) S. Lam, L. J. Coates, M. Hemida, V. Gupta, P. R. Haddad, M. Macka, B. Paull : *Anal. Chim. Acta*, **1101**, 199 (2020).
- 4) S. Foster, X. Xie, M. Pham, P. A. Peaden, L. M. Patil, L. T. Tolley, P. B. Farnsworth, H. D. Tolley, M. L. Lee, J. P. Grinias : *J. Sep. Sci.*, **43**, 9 (2020).
- 5) D. Li, H. Chen, S. Ren, Y. Zhang, Y. Yang, H. Chang : *Sens. Actuators B*, **305**, 127484 (2020).
- 6) A. Ishida, T. Yoshikawa, M. Natsume, T. Kamidate : *J. Chromatogr. A*, **1132**, 90 (2006).
- 7) A. Ishida, M. Natsume, T. Kamidate : *J. Chromatogr. A*, **1213**, 209 (2008).
- 8) A. Ishida, M. Fujii, T. Fujimoto, S. Sasaki, I. Yanagisawa, H. Tani, M. Tokeshi : *Anal. Sci.*, **31**, 1163 (2015).
- 9) K. Nishiyama, K. Hoshikawa, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, M. Tokeshi : *Electroanal.*, **31**, 1736 (2019).
- 10) 鈴木保任, 伊藤隆之, 深沢二夫, 川久保進, 岩附正明 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 291 (2005).
- 11) 片野 肇 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **68**, 381 (2019).
- 12) E. V. Kvittingen, L. Kvittingen, B. J. Sjursnes, R. Verley : *J. Chem. Educ.*, **93**, 1814 (2016).
- 13) K. M. G. de Lima : *Microchem. J.*, **103**, 62 (2012).
- 14) S. Schmid, M. Macka, P. C. Hauser : *Analyst*, **133**, 465 (2008).
- 15) Y. Li, P. N. Nesterenko, B. Paull, R. Stanley, M. Macka : *Anal. Chem.*, **88**, 12116 (2016).
- 16) Y. Li, M. Dv ořák, P. N. Nesterenko, N. Nuchtavorn, M. Macka : *Sens. Actuators B*, **255**, 1238 (2018).
- 17) M. Hemida, L. J. Coates, S. Lam, V. Gupta, M. Macka, H. J. Wirth, A. A. Gooley, P. R. Haddad, B. Paull : *Anal. Chem.*, **92**, 13688 (2020).
- 18) S. C. Lam, V. Gupta, P. R. Haddad, B. Paull : *Anal. Chem.*, **91**, 8795 (2019).
- 19) <https://www.thorlabs.co.jp/drawings/e2904718e2b99d90-6D77F72B-D6C8-9651-1016502E2ECD9DCB/LED255J-SpecSheet.pdf> (2022.12.23 accessed).

Development of an Absorbance Detection Module Using a Deep UV Light-Emitting Diode for a Portable Miniaturized Liquid Chromatograph

Kaito KOYAMA¹, Takuma NISHINURA¹, Akihiko ISHIDA^{*2}, Mitsue HIBINO²,
Masatoshi MAEKI², Hirofumi TANI² and Manabu TOKESHI²

* E-mail : ishida-a@eng.hokudai.ac.jp

¹ Biological Chemistry and Engineering Course, Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

² Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

(Received November 29, 2022; Accepted December 28, 2022)

In recent years, there has been increasing demand for miniaturized analytical instruments that allow immediate on-site analysis. We have been developing a portable HPLC system consisting of a column-integrated chip and a compact, low-power electroosmotic flow pump. This study aims to extend the versatility of the portable HPLC system with a further reduction of the overall system size, and thus we constructed a UV absorbance detection module that can be mounted to the column-integrated chip. For this detection module, a UV light-emitting diode (peak wavelength = 255 nm) and photodiode were used as a light source and photodetector, and a system to control their operation and process the signals was also constructed. The developed detection module exhibited excellent performances as an HPLC detector.

Keywords: portable liquid chromatograph; absorbance detector; flow cell; UV-LED.