

光加熱型カラムオーブンをを用いた高温高圧水クロマトグラフィーにおける保持機構

日大生産工 (院) ○山本 美奈子

日大生産工 朝本 紘充、齊藤 和憲、中釜 達朗

1. 緒言

高温高圧水を移動相とした液体クロマトグラフィー (pressurized hot water liquid chromatography, PHW-LC) は環境に優しい分離法として興味深く、近年さかんに研究も行われている。PHW-LC では温度や圧力を制御することによって水の誘電率¹⁾を変化させ、移動相の溶出力を制御できる。従来は加熱装置としてガスクロマトグラフ用オーブンを代用することが多く、装置が大型化するとともに高速昇温や高温加熱が困難である。本研究室ではハロゲンランプを用いてカラム上流で移動相を加熱する小型オーブンを試作し、純水を用いた LC システムに適用できることを確認した。本研究では加熱部に分離カラムを内蔵し、加熱温度を保持したまま分離が行える光加熱小型カラムオーブンを試作した。試作したカラムオーブンを備えた HPLC システムを構築し、純水を移動相とした LC としての性能を評価するとともに、生体関連物質の保持機構についての検討を行った。生体関連物質としては、核酸関連物質であるアデノシン、チミン、チミジン等をモデル試料として用いた。これは、これらのモデル試料の分子パラメータが明らかにされている¹⁾ということ、また、全て水溶性の試料であるということから選択した。

2. 実験

2.1. 光加熱型カラムオーブンの試作と評価

加熱用光源としてハロゲンスポットヒーター (インフリッジ工業製 HSH-7) を用い、円柱状のアルミ筒 (直径 67×48 mm、高さ 82 mm) と組み合わせて光加熱オーブンを試作した。まず、筒胴体内面にステンレス製キャピラリー (内外径 0.25×0.47 mm、長さ 10 m) をコイル状に設置した。一方、アルミ蓋に小穴を開け、光源のランプとコイル状のステンレス製キャ

ピラリーを固定し、筒胴体内面に設置した。また、アルミ筒胴体下部に分離カラムを通す小穴を開け、分離カラムを挿入して固定した。この構造ではランプから放射された光によってキャピラリー内の移動相が均一かつ効率よく加熱されると考えた。同時に筒内部キャピラリー近傍に熱電対を設置し、デジタルパネルメータとランプ用電源を連動させることにより、加熱部の温度制御を行った。HPLC 用ポンプ (島津製 LC-10AD)、インジェクター (レオダイン製 4715、注入量 0.5 μ L)、試作した光加熱オーブン、分離カラム (ハミルトン製 PRP-1、内径 4.1 mm、長さ 50 mm) (Fig.1) および HPLC 用 UV-VIS 検出器 (島津製 SPD-10Avp) をこの順序で接続して HPLC システムを構築した。圧力保持と安定した検出を達成するために、カラムと検出器はステンレス製キャピラリー (内径 0.25 mm、長さ 5 m) で接続した。移動相には超純水を用

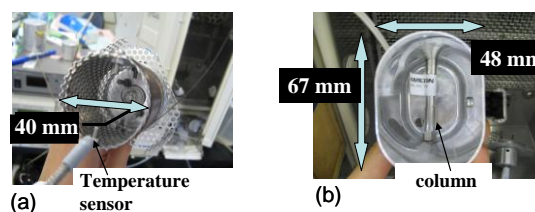


Fig.1 Compact optical-heating column oven
(a) Halogen lamp house (b) Column holder

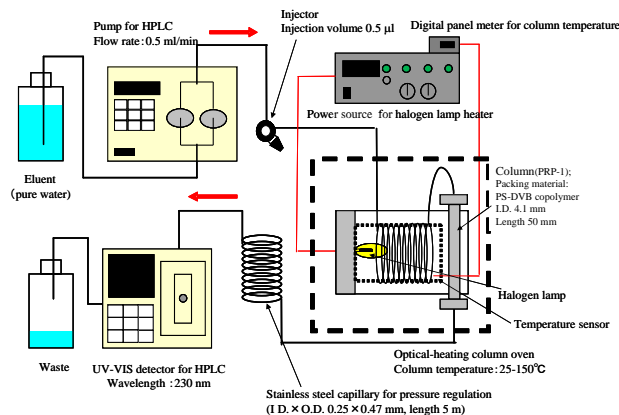


Fig.2 Schematic diagram of HPLC system with
an optical-heating column oven

Retention mechanism in pressurized hot water liquid chromatography

by using a optical-heating column oven

Minako YAMAMOTO, Hiromichi ASAMOTO, Kazunori SAITOH and Tatsuro NAKAGAMA

いた。

また、試作したカラムオーブンを備えた HPLC システム (概略図を Fig.2 に示す) を構築し、純水を移動相とした LC としての性能を評価した。モデル試料としてアデノシン、チミン、チミジンの3種核酸関連物質の1 mM 水溶液を用いた。加熱部温度を25°Cから約10°C刻みで150°Cまで変化させ、恒温条件にて LC 測定を行い、保持時間から保持係数を算出し、その性能を評価した。

2.2. 生体関連物質の保持機構の検討

試作した光加熱型カラムオーブンを備えた LC システムを用いて生体関連物質の保持機構の検討を行った。移動相流量は0.5 mL/min とし、試料注入量は0.5 μ L とした。検出波長は230 nm とし、加熱部温度を25°Cから約10°C刻みで変化させ、恒温条件にて LC 測定を行った。得られた保持時間より保持係数を算出し、QSPR モデルで用いられる分子パラメータ²⁾との相関係数により、保持機構の検討を行った。

3. 結果および考察

3.1. 光加熱型カラムオーブンの試作と評価

保持時間の再現性は良好であり、例えば100°Cにおいて、チミンは相対標準偏差として0.01および0.16% (n=3) であった。また、固定相に保持されない物質として亜硝酸ナトリウムを用いたときの保持時間からモデル試料の保持係数(k)を算出し、その自然対数と加熱部温度の逆数(1/T(K))との間に良好な直線関係($r > 0.987$)を認めた(Fig.3)。以上の結果より、本研究で試作した HPLC システムは再現性、温度制御性とも良好であると判断した。

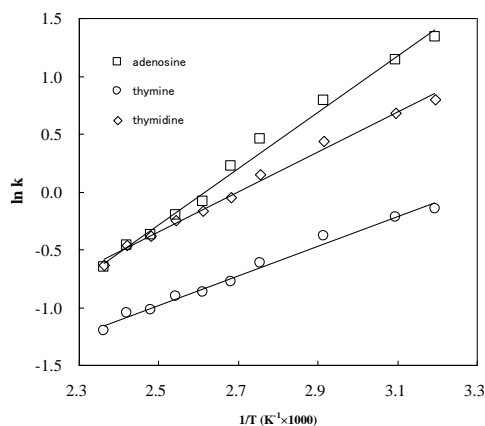


Fig.3 Van't Hoff plots

3.2. 生体関連物質の保持機構の検討

光加熱型カラムオーブンを備えた LC システムによる生体関連物質 (アデノシン、チミン、チミジン) の保持機構に関する検討も行った。その結果、カラム温度25°C~150°C間で van't Hoff プロットに良好な直線関係があることを確認した。さらに、これら化合物についての物理化学的パラメータ (logP 値、水溶性、分極率、)、幾何学的パラメータ (極性表面積、分子表面積など)、電子的パラメータ (双極子モーメント) あるいは熱力学的パラメータ (水和エネルギーなど)²⁾と本実験で得られた保持係数(lnk)との相関を検討したところ、分極率(α)と極性表面積 (PSA)との間に高い正の相関があった(Fig.4)。また、カラム温度100°C付近でパラメータとの相関が変化していることが確認できた。

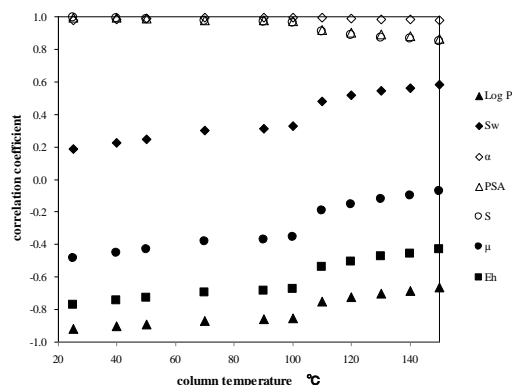


Fig.4 Correlation coefficients of molecular parameters and lnk at several temperatures
Condition: column:PRP-1 column;
flow rate:0.5 mL/min;mobile phase:100% pure
water;detection:UV(230 nm);heating unit temperature:25-150°C

4. 結言

光照射による PHW-LC 用小型カラムオーブンを開発し、その性能を評価した。また、生体関連物質の保持機構に関する検討を行った。化合物のパラメータと実験で得られた保持係数との相関を検討したところ、100°C前後で保持に起因する相互作用が変化していることが示唆された。今後、高温高圧水の LC 用移動相としての特性を検討していく。

【参考文献】

- 1) D.P.Fernandez, A.R.H.Goodwin, E.W.Lemmon, J.M.H.Levelt Sengers, R.C.Williams, *J.Phys.Chem. Ref.Data*, Vol.26, No.4, 1125-1166 (1997).
- 2) J.Zheng, Y. Polyakova and K. H. Row, *Chromatographia*, 64, 129-137 (2006).