高温高圧水クロマトグラフィー用 光照射小型加熱ユニットの試作と評価

日大生産工(院) 〇山本 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 $\mathcal{J} \supset \mathcal{J} \prec -$ (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しを変化させ、 移動相の溶出力を制御できる。これまでの報 告例の多くは加熱装置としてガスクロマト グラフ用オーブンを使用しており、装置が大 型化するとともに消費電力も大きい。そこで、 演者らはハロゲンランプを用いた小型かつ 省電力型光加熱ユニットを試作し、PHW-LC への適用を検討した²⁾。モデル試料としてア デノシン、チミンおよびチミジンを用い、温 度制御性と PHW-LC における保持特性につ いて検討した。測定試料として用いた核酸関 連物質は、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³⁾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。

本研究では保持機構について更なる知見 を得るために、これらモデル試料と分子構造 が類似している化合物について同様の検討 を行ったので報告する。測定試料としては、 核酸関連物質 11 種について検討した。

2. 実験

本研究で用いた実験装置の概略図を Fig. 1 に示す。カラムオーブンは以前の検討と同様、 光照射加熱による小型カラムオーブンを用 いた²⁾。カラム(内径 4.1 mm、長さ 50 mm) には PRP-1(ハミルトン)を用い、モデル試 料にはアデニン、アデノシン、2'-デオキシア デノシン、グアニン、グアノシン、2'-デオキ シグアノシン、チミン、チミジン、シトシン、 シチジンおよび 2'-デオキシシチジンを用い た。モデル試料は超純水に溶解して濃度 1.0 mM に調製し LC 測定に供した。移動相には 超純水を用い、移動相流量は 0.5 mL/min、検 出波長は 230 nm とした。ホールドアップ時 間の測定には亜硝酸ナトリウムを用いた。カ ラム部の加熱温度は 70、90、100、110、120 および 130℃に設定した。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³⁾との相関係数により、 保持機構の検討を行った。

結果および考察

モデル試料ごとに van't Hoff plot を作成し たところ、例えば、チミジンをモデル試料と して用いた場合、測定した温度範囲で van't



Fig. 1 Schematic diagram of PHW-LC system in this study (1)Eluent(pure water); (2)HPLC pump; Flow rate: 0.5 mL/min; (3)Injector: Injection volume 0.5 mL; (4)Halogen lamp; (5) Column(PRP-1): Packing material, PS-DVB copolymer(i.d. 4.1 mm × 50 mm); (6)Temperature sensor; (7)Stainless steel capillary for preheating (i.d. 0.25 mm × 0.d. 0.47 mm, 10 m); (8)Power source for halogen lamp heater; (9)Digital panel meter for column temperature; (10)Photo-irradiation column oven:Column temperature; T=70-130°C; (11)Stainless steel capillary for pressure regulation (i.d. 0.25 mm × 5 m); (12)UV-VIS detector: Wavelength, 230 and 220nm; (13)Waste

Preparation and Evaluation of Compact Heating Unit by Photoirradiation for Pressurized Hot Water Liquid Chromatography

Minako YAMAMOTO, Hiromichi ASAMOTO, Kazunori SAITOH and Tatsuro NAKAGAMA

Hoff plot に良好な直線性が得られた。再現性 についても、例えば、チミジンの保持係数の 相対標準偏差が 90℃で 0.54%、100℃で 0.74% (n=3) であった。

さらに、これら化合物についての物理化学 的パラメータ (log P 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)あるいは電子的パラメータ(双極子 モーメント)³⁾と本実験で得られた保持係数 (ln k)との相関を検討したところ、例えばアミ ノ基、オキソ基およびイミダゾール基をそれ ぞれ有するアデニン、グアニンおよびシトシ ン間での相関(Fig. 2)では分極率、分子表面積 との間に正の相関が得られた。また、比較的 保持の大きいアデニン誘導体間での相関に おいても分極率、分子表面積および極性表面 積との間に正の相関が見られた。いずれの試 料においても分極率と保持との間に正の相 関が見られることから、本系における核酸関 連物質の保持には、固定相-試料分子間の静 電的相互作用の寄与が示唆された。また、こ れらの相関係数とカラム温度との関係を検 討したところ、100℃付近で傾向が変化する ことが認められた。カラム抵抗圧と温度との 相関(Fig. 3)でも 100℃付近で傾きが変わった ことから、水の物性が変化していると推測さ れる。本実験系ではキャピラリーにより移動 相の圧力を保持しているため、例えば加熱部 温度 100℃以上のとき、移動相が一部気化し て混合相となっていることも考えられる。

4. 結言

試作した光照射型加熱ユニットを用い、核 酸関連物質の保持機構について、保持と分子 パラメータとの相関を検討した。いずれの試 料においても分極率との正の相関があるこ とから、本系における保持には固定相--試料 分子間の静電的相互作用の寄与が示唆され た。また、加熱部温度 100℃付近において相 関性やカラム抵抗圧が変化していることに ついては、加熱部温度 100℃以上のとき、移 動相が一部気化して混合相となっているこ とが考えられる。



Fig. 2 Correlation coefficients of molecular parameters and $\ln k$ at several temperatures Conditions: flow rate: 0.5 mL/min; mobile phase: 100% pure water; detection: UV(230 nm); heating unit temperature: 70-130 °C; Sample: adenine, guanine and cytosine



Fig. 3 Relationship between column temperature and pressure

Conditions: column: PRP-1 column; flow rate: 0.5 mL/min; mobile phase: 100% pure water; detection: UV(230nm); heating unit temperature: $40-150^{\circ}C$

参考文献

- 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, 112 5-1166(1997).
- 山本,佐藤,朝本,齊藤,中釜,分析化学, Vol.61, No.8, 731-734(2012).
- J.Zheng. Y. Polyakova and K. H. Row, C -hromatographia, 64, 129-137(2006).