

教室内実験を志向した教育用可搬型 Green HPLC システムの試作

日大 生産工（院） ○大南 樹生

日大 生産工 齊藤 和憲 伊東 良晴 中釜 達朗

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は液体の移動相をポンプで加圧送液してカラムを通過させ、分析種を固定相および移動相との相互作用（吸着、分配、イオン交換、サイズ排除など）の差を利用して分離検出する一般的な手法である。この手法は大学の授業で理論を学修するが、通常はステンレス製カラムを用いるために分離挙動を直接観察できず、理論と実際の分離挙動が結びつきにくい。また、HPLC では分離挙動を調整するために移動相にメタノールやアセトニトリルなどが添加される。これらの溶媒は医薬品外劇物に指定されており、実験者や環境への悪影響や保存、廃液処理などの煩雑さなどが懸念される。

一方、最近では環境・安全・健康負荷に配慮した HPLC（Green HPLC）に関する研究がヨーロッパを中心に行われており¹⁾、本研究室でも検討している²⁾。Green HPLC は溶媒の保管・管理・処理の簡素化や費用軽減なども期待でき、居室や教室など生活空間でのオンサイト HPLC 実施にも有効であると考えられる。本研究では教室内実験での分離挙動の可視化を志向し、環境調和型溶媒を移動相として用いた教育用可搬型 Green HPLC システムを試作している。本発表では分離部内での溶質移動を可視化するカラムの検討について報告する。

2. 教育用可搬型 HPLC システムの試作

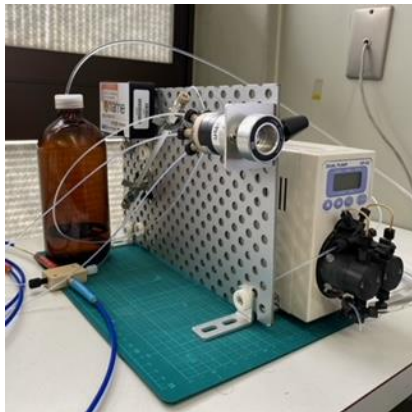


Fig. 1 Portable HPLC system in this study

Fig. 1 に本研究で試作している可搬型 HPLC システムの外観を示す。試作している HPLC システムは、移動相（溶離液）ボトル、送液部、試料導入部、分離観察部（可視化カラム）および検出部から構成される。各ユニットを接続するチューブは試料の移動が見えるように全て透明な PFA チューブを用いている。システムは A4 サイズの範囲に収まる大きさであり、市販の HPLC 装置と比較して小型かつ軽量である。

3. 実験

3-1 湿式充填法による高耐圧性細型透明カラムの作製

本研究で使用するカラムは透明である必要がある。市販のガラスカラムは耐圧性に乏しく、かつ必要とする充填剤量が比較的多いため、耐圧性のある細型ガラスカラムを自作した。充填方法は HPLC で一般的に用いられる湿式充填とした。まず、充填剤であるオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）（球状、粒径 20 μm ）を環境調和型溶媒であるプロピレンカーボネート（PC）に分散させて懸濁液とした。この懸濁液を末端にフィルター付径違いユニオンを取り付けたパイレックス直管（内径 4 mm、長さ 200 mm）に圧力 2.3 MPa（流量 1.0 mL/min）で 30 分間流通させて充填剤をカラム内に充填した。充填後、カラム入口にフィルター付径違いユニオンを装着してカラムとした。作製したカラムを市販の紫外可視吸光度検出器を備えた HPLC 装置に装着し、色素の HPLC 分離挙動を目視で観察した。移動相はエタノールまたはその水溶液を用いた。試料とする色素にはローダミン B（RB）、ローダミン 6G（RG）、フルオレセイン（F）およびウラニン（U）を用いた。検出波長は各色素の最大吸収波長とし、移動相流量 0.50 mL/min にて測定を行った。各色素をそれぞれ 1 mM の移動相溶液とし、カラム導入量を 5 μL として HPLC に供した。

3-2 乾式充填法による中耐圧性太型透明カラムの作製

3-1 で作製したカラムはカラム内での試料ゾ

Preparation of a portable Green HPLC system for education
by classroom experiments

Tatsuki OMINAMI, Kazunori SAITOH, Yoshiharu ITO
and Tatsuro NAKAGAMA

ーンが広がったため、耐圧性は劣るが断面積のより大きい市販のガラス空カラムを用いた検討も行った。このカラムは構造上、湿式充填が困難なために乾式充填で充填剤を充填した。末端にフィルター付径違いユニオンを取り付けた市販のガラス空カラム（内径：10 mm，長さ：150 mm）の上部から 3-1 で使用した充填剤粉末をタッピングしながら充填した。充填後、カラム入口にフィルター付径違いユニオンを装着してカラムとした。エタノール水溶液を 1 時間通液させ、カラム内の空気を完全に除去した後市販の HPLC 装置に接続した。検出波長および移動相流量は 3-1 と同様として試料溶液のカラム導入量を充填剤量増加に合わせて 20 μ L としたが、3-1 と同様の濃度では検出器の検出上限を超えたため、試料濃度を 0.1 mM として測定に供した。

4. 結果および考察

4-1 高耐圧性細型透明カラムにおける色素の保持とカラム内移動の目視確認

作製した細型可視化カラムを用いたときの色素のクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示す。

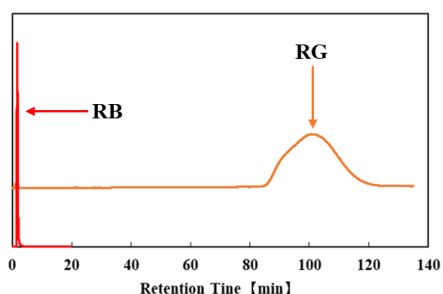


Fig. 2 Chromatograms of RB and RG (mobile phase : ethanol)

移動相にエタノールを用いたとき、RG, F および U の保持を確認した。カラム内での色素移動は赤色色素である RB および RG は確認しやすかったが、黄色色素である F および U は確認しづらかった。カラム内での RG の移動の様子を Fig. 3 に示す。

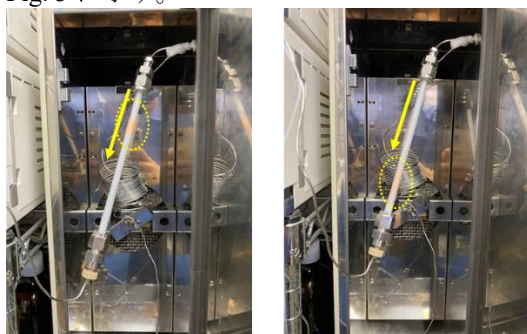


Fig. 3 Positions of RG in a narrower transparent LC column at 20 (left) and 60 (right) min after the injection

この細型カラムは充填剤が比較的少ないため、可視化を目的として色素導入量を多くする

と良好な分離が達成できないことが予想された。

4-2 中耐圧性太型透明カラムにおける色素の保持とカラム内移動の目視確認

作製した太型可視化カラムを用いたときの色素のクロマトグラムの一例を Fig. 4 に、RB のカラム内での移動の様子を Fig. 5 にそれぞれ示す。

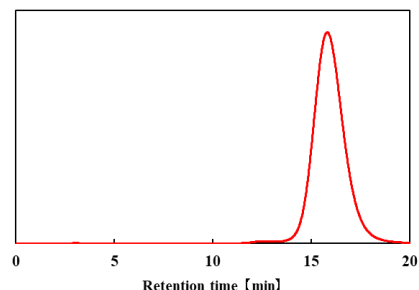


Fig. 4 Chromatogram of RB (mobile phase : water-ethanol mixture (1:1(v/v)))

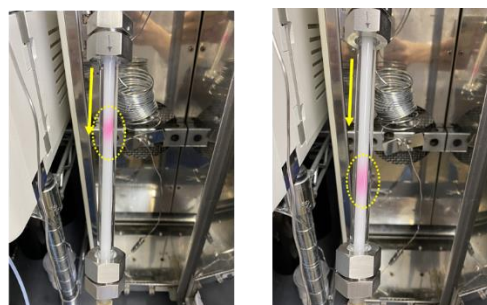


Fig. 5 Positions of RB in a wider transparent LC column at 5 (left) and 10 (right) min after the injection

エタノール水溶液を用いることにより、RB の保持が認められた（保持係数 4.6）。細型カラムの検討時と比較して色素量（物質量は 0.4 倍となっているにもかかわらず、目視での確認がより明瞭だった。これはカラム内での流れ方向の拡散が小さく、かつカラム側面から見たときに色素量が多くなっているためだと考えられる。以上の結果から、本研究では太型可視化カラムを使用することとした。現在、他色の色素の保持挙動と目視でのカラム内移動、および可搬型 HPLC システムの検出部の最適化を検討している。

参考文献

- 1) F.Tache, S.Udrescu, F.Albu, F.Micale and A. Medvedovici, J. Pharm. Biomed. Anal., 75, 230-238 (2013)
- 2) 大南, 齊藤, 山根, 中釜, 日本分析化学会第 70 年会講演要旨集, Y1046 (2021)