

教室実験を志向した教育用環境調和型液体クロマトグラフィーシステムの高機能化

－分離効率の向上および分離挙動とクロマトグラムの同時観察－

日大生産工（院） ○高麗 翔太, 大南 樹生
日大生産工 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）は化学物質の分離分析や精製手法として汎用されている。この手法は大学の授業にて理論を学修する。しかしながら、HPLCでは通常ステンレス製のカラムを用いるため直接分離挙動を見ることができず、理論と実際の分離挙動が結び付きにくい。また、HPLCでは移動相溶媒の溶出力調整のためにメタノールやアセトニトリルが添加される。しかし、これらの溶媒は医薬品外劇物に指定されており、環境や実験者への悪影響や保存、廃液処理の煩雑さなどが問題となる。

近年では環境・安全に配慮した環境調和型HPLC（Green HPLC）に関する研究が世界的に進められている。本研究では教室での実験－講義一体型授業での使用を志向し、分離挙動を可視化した教育用可搬型Green HPLCシステムを構築している¹⁾。本発表では、このシステムの高機能化として分離効率の向上とカラム内分離挙動とクロマトグラムの同時観察を試みたので報告する。

2. 実験装置

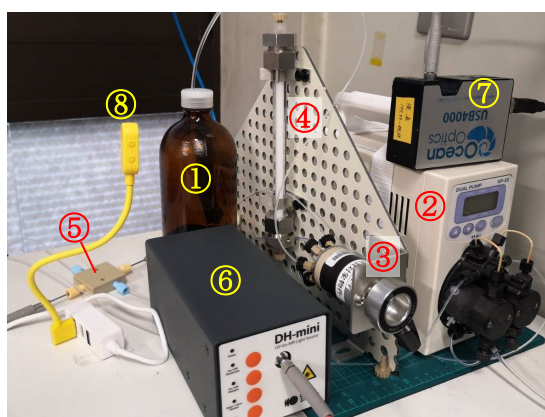


Fig. 1 Portable HPLC system in this study (①Bottle for Mobile Phase, ②HPLC Pump, ③Injector, ④Glass Column, ⑤Detection Cell, ⑥Halogen Lump, ⑦CCD Spectrometer, ⑧Camera)

Fig. 1 に本研究で使用している実験装置の外観を示す。この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透明なPFAチューブを用いている。システム全体は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¹⁾。

3. 実験

3-1 充填剤粒径の変更による分離効率の向上

本研究では分離挙動の可視化のためにガラス製の透明カラムを使用している。先行研究では、ガラスカラム（内径：10 mm、長さ：150 mm）に球状オクタデシルシリル化シリカゲル（ODS、粒径 20 μm ）を乾式充填によって充填したカラムを使用した¹⁾。しかしながら、溶質の分離に改善の余地があった。そこで、分離効率を向上させるために充填剤粒径の変更を検討した。具体的には、ODS 充填剤の粒径を 15 μm 、10 μm と変更したカラムを新たに調製し、分離能を検討した。移動相は先行研究¹⁾と同様、エタノールと水の混合溶液（1 : 1 v/v）に 6 mM の臭化テトラブチルアンモニウム（TBAB）を添加したものを使用した。モデル試料として先行研究¹⁾と同様、Indigo Carmine (IC)、Acid Green 9 (AG9) 及び Rhodamine B (RB)をそれぞれ移動相に溶解させて 1 mM とし、HPLC 測定に供した。試料導入量は 20 μL とした。検出は吸光度とし、検出波長は全色素が検出できる 580 nm とした。

3-2 分離挙動とクロマトグラムの同時観察

粒径10 μm のODSを充填したガラスカラムを用いて分離挙動とクロマトグラムの同時観察を試みた。PCの同一画面上に分離部の映像及びクロマトグラムを配置し、測定中の様子をリアルタイムで撮影した。移動相は3-1と同様のものを使用し、試料は3-1で用いた3種類の色素に加えて Crystal Violet (CV) を用いた。各色素を混合し、

IC, AG9, RBの3種を各1 mM, CVを0.25 mMの混合溶液として測定に供した。検出波長は 580 nm, 移動相流量は 0.50 mL / min, 試料導入量は 20 μ Lとした。3-1と同様の移動相を使用した場合, ICは保持しなかったためホールドアップ試料とした。このとき, 各色素の保持係数 (k) は 1 / 3 (AG9), 1 (CV), 3 (RB)となった。

4. 結果および考察

4-1 充填剤粒径の変更による分離効率の向上

カラムの分離効率の指標としては一般的に理論段数が用いられる。理論段数が高いほど分離効率が良い。一方, 充填剤粒径の分離効率に与える影響として以下のvan deemter式が知られている。HETPは理論段相当高さであり, カラム長さを理論段数で除した値である。 u は移動相の線速度を示している。

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

A項が充填剤によって不規則に起こる渦拡散項, B項は移動相流れ方向に平行な向きへの試料成分の分散項, C項は分配平衡が瞬時に起きないために生じる試料成分の移動の乱れに関する項である²⁾³⁾。Fig. 2に各粒径のカラムを用いたときの移動相流量とRBのHETPとの相関を示す。

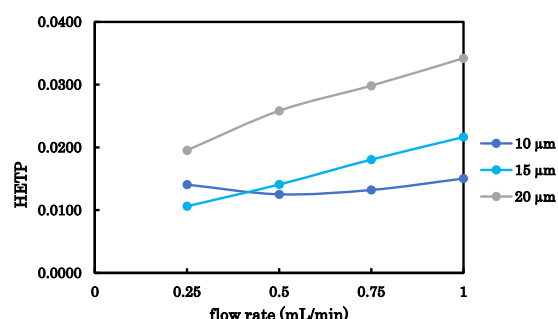


Fig. 2 van deemter plots for RB obtained with different particle sizes of ODS

Fig. 2 より, 充填剤の粒径が小さいほどHETPが減少した。粒径が小さいほどA項の値が小さくなり, HETPが減少していると考えられる。また, 移動相流量が小さいほどHETPが減少した。これは (1) 式のB項とC項の2つが影響しており, C項の影響がより大きいためHETPが減少していると考えられる。以上の結果から, 充填剤の粒径を 20 μ mから10 μ mに変更することにより, 理論段数が約2倍となった。この結果は, クロマトグラム上で同一時間に溶出した物質のピーク幅が約 0.7倍となり, カラム内でもより狭いピーク幅で観察できることを示している。

4-2 分離挙動とクロマトグラムの同時観察

カラムに保持しないICがカラム出口に到達した時間とすべての色素がカラムから溶出した時間におけるカラム内の様子とクロマトグラムを Fig.4 にそれぞれ示す。カラム内の分離効率を向上させたことにより, 色素の分離がより明確になった。理論上はカラム内での色素の間隔 (Fig.4(a)) とクロマトグラムのピーク間隔 (Fig.4(b)) は異なるが, 視覚的にもその違いが確認できる。

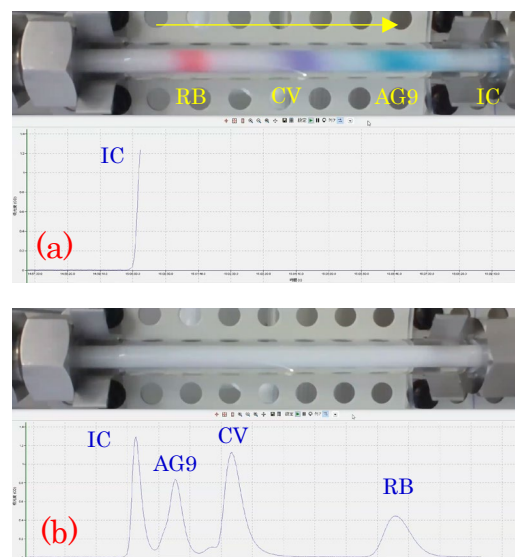


Fig. 4 PC Screens with the video of glass column and monitoring chromatogram when hold-up sample (IC) reached to the column outlet (a) and the measurement was finished (b)

5. 結言

カラム充填剤の粒径を小さくしたことにより分離効率が向上した。カラム内やクロマトグラム上での色素の分離がより明確になり, 現象と理論の一致がより確認しやすくなった。今後は授業内での使用により, 該当内容の理解度向上が期待される。

本研究の一部はJSPS科研費 19K03152の助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) 大南樹生, 齊藤和憲, 伊東良晴, 中釜達朗, 教室内実験を志向した教育用可搬型HPLCシステムの試作, 日本大学生産工学部第54回学術講演会講演概要, 2021, 7-7
- 2) F.Geiss, 原 昭二他訳, 液体クロマトグラフィの最適化, 講談社, 1980, p.21-27
- 3) 本水昌二他, 分析化学 (機器分析編), 東京化学社, 2018, p.104-106