

教室内実験を志向した液体クロマトグラフィーシステム におけるカラム性能の向上

日大生産工（院） ○坂井 幸弘，高麗 翔太
日大生産工 中釜 達朗，伊東 良晴

1. はじめに

逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は水溶性化学物質の分離分析法として汎用されている。この手法は大学の機器分析関連の科目で理論を学修する。しかし、分離部であるHPLCカラムは通常、ステンレス製のため分離挙動を直接見ることができず、理論と実際の分離挙動を結び付けにくい。

本研究室では教室での実験－講義一体型授業での使用を志向した教育用環境調和型HPLCシステムを開発している。昨年度の本会において、開発したシステムを用いて移動相流量や組成比、あるいは充填剤粒径が保持および分離に与える影響などを可視化した例を報告した¹⁾。しかしながら、使用したガラスカラムの分離能（理論段数）は一般的に使用されているHPLC用カラムより低い。カラムの分離能（理論段数）が向上すれば、より多くの物質の分離が可能となり、より現実的な状況が可視化できる。

HPLCにおける空カラムへの充填剤の充填方法は乾式充填法と湿式充填法に大別される。乾式充填法は乾燥した充填剤を空カラムに充填した後、移動相を通液させる方法である。一方、湿式充填法は充填剤を溶媒に分散した後、カラムに高压充填する方法であり、乾式充填法より密に充填できるために分離能（理論段数）が比較的高いと言われている。これまで本システムで使用していたカラムはその構造上、湿式充填が困難であり、昨年度の報告¹⁾も乾式充填で調製したカラムを使用した内容であった。

本発表では使用するガラスカラムを変更して湿式充填により新たに分離カラムを調製し、保持および分離特性を検討したので報告する。

2. 実験装置

図1に本研究で使用したHPLCシステムの外観²⁾を示す。

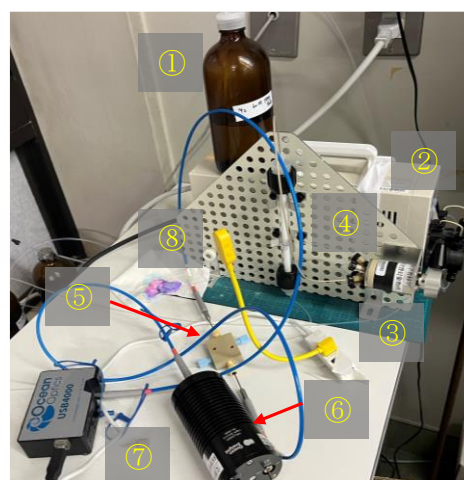


図1 本研究で使用した HPLC システム
①移動相ボトル，②HPLC ポンプ，③サンプルインジェクター，④ガラスカラム，⑤吸光度検出セル，⑥光源，⑦CCD 分光器，⑧USB カメラ

このシステムは、移動相ボトル、送液部、試料導入部、分離観察部（ガラスカラム）および吸光度検出部から構成される。先行研究¹⁾では各部を透明なパーフルオロアルコキシアルカン（PFA）チューブで接続し、試料である色素溶液の移動を目視で確認できるようにした。しかしながら、LC測定できる色素濃度では目視確認が困難であった。さらに、PFAチューブが比較的軟らかい素材であることから経年による接続不良が起きやすく、流路内でのデッドスペースがしやすい。そこで、本研究においてはインジェクターから下流の流路はHPLC装置で汎用されているポリエーテルエーテルケ

Improvement of Column Performance in a Liquid Chromatographic System
for Classroom Experiments

Yukihiro SAKAI, Shota KOMA, Yoshiharu ITO and Taturo NAKAGAMA

トン (PEEK) チューブに変更した。システム全体はA4サイズ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 カラムの調製

まず、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS, 粒径 $10\mu\text{m}$) のスラリー溶液を調製した。スラリー溶媒にはジブロモメタン・2-プロパノール混合溶液 (1:1, v/v) を用いた。続いて、ガラスカラムを以下のように調製した。まず、空カラム (EYELA製, 長さ150 mm, 内径5 mm) 2本をユニオンで接続して図2のように鉛直に固定した。固定後、上部キャップを空けてスラリー溶媒を少量入れ、続いてスラリーを流し込んだ。上部カラムまで満たした後、キャップを占めてHPLC用ポンプと接続し、加圧溶媒 (2-プロパノール) を一定圧力で流通させた。溶媒がカラム内を流通すると充填剤が下部から蓄積していく (図2) ので、充填剤が上部カラムまで到達するまでスラリー溶媒の導入と加圧を繰り返した。到達後、中央部のユニオンを外して充填剤が充填された下部カラムをキャップし、カラムとしてHPLCシステム (図1) に接続した。

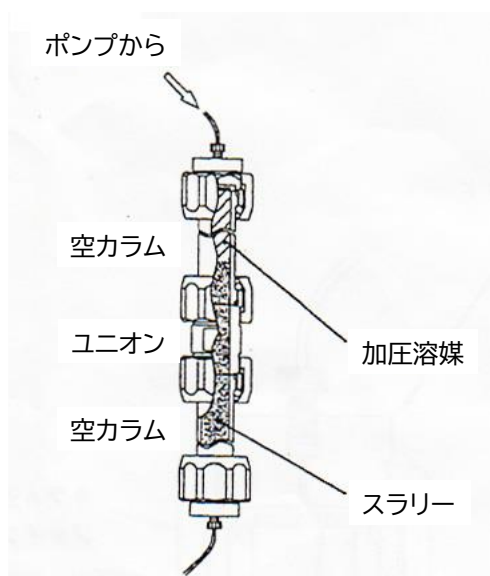


図2 湿式充填における加圧時の様子 (EYELA 取扱説明書より。一部説明を追加。)

3-2 HPLC 条件

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) に臭化テトラブチルア

ンモニウム (TBAB) を添加して 6 mM とした溶液を使用した。検出波長は 580 nm, インジェクターからの試料導入量は 20 μL とした。モデル試料 (色素) には先行研究¹⁾と同様, Indigo Carmine (IC), Acid Green 9 (AG9) および Rhodamine B (RB) を用いた。それぞれ移動相に溶解させて 1 mM とし, HPLC 測定に供した。

4. 結果および考察

図3に3種類の色素がカラム内を通過する様子, 図4に得られたクロマトグラムをそれぞれ示す。ICとAG9の分離は改善の余地があるが, RBに関しては完全に分離した。発表では, 乾式充填カラムとの比較などについても説明する予定である。

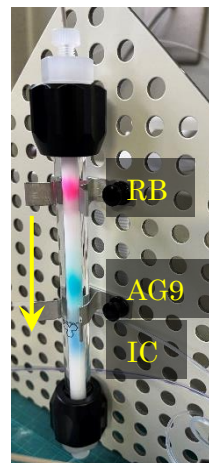


図3 ガラスカラムを通過する色素

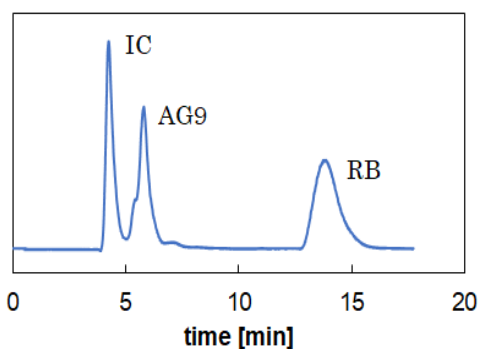


図4 3種色素のクロマトグラム

参考文献

- 1) 高麗, 伊東, 中签 : 日本大学生産工学部第56回学術講演会講演概要, pp.574-575 (2023)