

D204

吸着クロマトグラフィーによるポリフェノール分離特性

(山口大) (学)西村公志 (学)阿部光代 (正)吉本則子 (正)山本修一*

【緒言】ポリフェノールのエタノール水系移動相による逆相クロマトグラフィー分離において、ピーク位置、ピーク距離、ピーク幅は移動相組成に強く依存する (Fig.1)。既に、ピーク位置については勾配溶出実験から分配係数を決定することにより推定可能であることを報告した[1]。本研究ではピーク幅について HETP と移動相線速度 (u) の関係 (HETP- u) を様々な移動相組成の関数として表現するモデル式を検討した。

【実験】ポリスチレン - ジビニルベンゼン系吸着樹脂 DIAION HP20SS ($d_p=100\mu\text{m}$) を内径 $d_c=7.5 \sim 11\text{mm}$ のカラムに高さ(長さ) $Z=19 \sim 24\text{cm}$ になるように充填し標準的な HPLC 装置に接続した。カテキン (Mw:290)、エピガロカテキンガレート (EGCG, Mw:458) をモデルポリフェノール試料とし、エタノール水混合溶液移動相を使用し、 $u=2.5 \sim 12.5\text{cm/min}$ 、25°で実験を行った。

等組成移動相溶出曲線を u の関数として測定し、(1)式より HETP を(2)式より分配係数 K を算出した。

$$\text{HETP} = Z/N = Z(\sigma/t_R)^2 = Z(W/t_R)^2/16 \quad (1)$$

$$V_R = F_v t_R = V_o + (V_t - V_o)K \quad (2)$$

溶出曲線の標準偏差 σ は、ガウス分布曲線に最小二乗法近似することにより決定した。

HETP は u の関数として次式で表される。

$$\text{HETP} = A^0 + C^0 u \quad (3)$$

A^0 はカラム充填状態を表す項、 C^0 は粒子内拡散の影響を表す項で(4)式となる。

$$C^0 = d_p^2 [HK/(1+HK)^2]/(30D_s) \quad (4)$$

【結果・考察】Fig.1 に一定流速での等組成溶出曲線を示した。移動相 EtOH 濃度 C_m を低くすると 2 成分ともに溶出液量が増加する(溶出が遅くなる)とともにピーク幅も広くなる。また、この条件では 40%以上では、2 成分を分離することは不可能である。

移動相組成ごとの HETP- u 曲線 (Fig.2) の傾きから(4)式に基づいて D_s を算出した。得られた値から KD_s/D_m を計算し、 K に対してプロットした関係が Fig.3 である (D_m : 分子拡散係数)。実際の分離が達成される $2 < K < 7$ では $KD_s/D_m=0.18$ 程度で一定である。この条件を使用すると目的とする分離度 R_s を得るための移動相速度 u が、 C_m に対して以下の方法で計算できる。

C_m を低くすると 2 成分の分離は良くなるが、 K が大きくなるので多量の溶媒が必要となり、また同じ流速ならば分離時間も長くなる。流速を高くすると分離時間は短縮されるが分離性能は低下する。各 C_m において所定の R_s 値となる流速が存在するので、その値を(1)-(4)式と分配係数の C_m 依存性により決定し、そのときの分離時間と相対溶出液量 V/V_t を計算し、プロットした (Fig.4)。この曲線は等分離度線(isoresolution curve)と呼ばれ、最適分離条件の設定に有用である[2]。

【結言】ポリフェノールのポリマー系逆相クロマトグラフィー分離における HETP および分配係数 K を表現できるモデル式を移動相エタノール濃度の関数として開発できた。

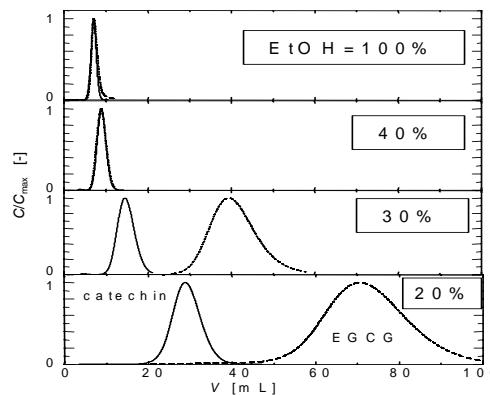


Fig.1 等組成溶出曲線

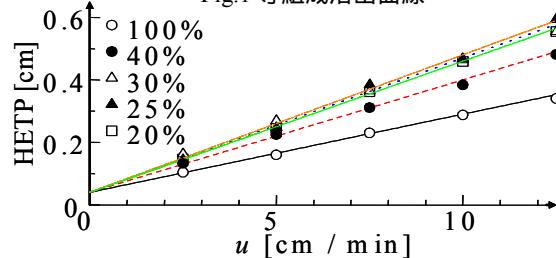
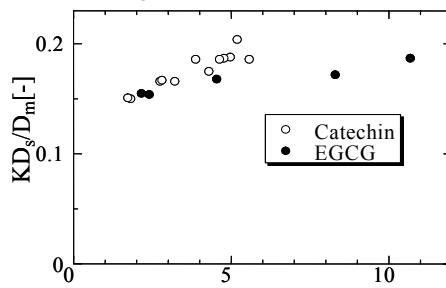
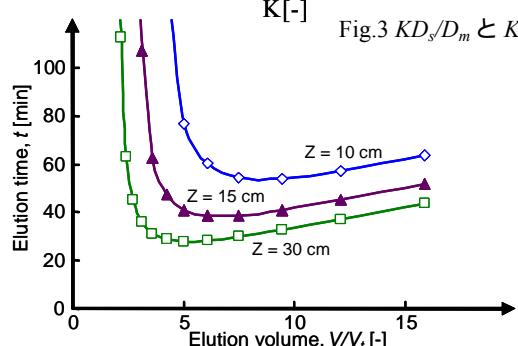
Fig.2 HETP と u の関係Fig.3 KD_s/D_m と K の関係

Fig.4 等分離度曲線

References [1] S. Yamamoto et al., J. Chromatogr A, 1162, 50(2007)
[2] M. Hosono et al., PREP 2009, P-127, Philadelphia, 2009

記号 A_c : カラム断面積 [cm^2]、 d_c : カラム内径 [cm]、 D_m : 分子拡散係数 [cm^2/s]、 d_p : 粒子径 [μm]、 D_s : 有効固定相拡散係数 [cm^2/s]、 F_v : 流量 [mL/min]、 H : 相体積比 = $\varepsilon / (1-\varepsilon)$ [-]、HETP: [cm]、 K : 分配係数 [-]、 M_w : 分子量、 t_R : ピーク保持時間 [s]、 $R_s = (t_{R,2} - t_{R,1}) / ((W_1 + W_2) / 2)$ 分離度、 u : 移動相線速度 ($= F_v / A_c \varepsilon$) [cm/min]、 V_i : カラム体積 [mL]、 V_R : ピーク保持体積 [mL]、 V_o : カラム空隙体積 [mL]、 W : ベースラインピーク幅 [s]、 Z : カラム高さ [cm]、 ε : 空隙率 [-]、 σ : ピーク標準偏差 [s]

*shuichi@yamaguchi-u.ac.jp fax 0836-85-9201