Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

逆相分配クロマトグラフィー分離&固相抽出の実習

-簡単で楽しい実験を通して基礎を学習-

CONTENTS

Ⅰ イントロダクション

Ⅱ Sep-Pak® クールエイドキットに含まれるもの

Ⅲ 実験に必要な試薬、器具

Ⅳ 実験プロトコール

Ⅴ 考察

Ⅵ 固相抽出ビギナーズガイド

Ⅶ オーダーインフォメーション

イントロダクション

Sep-Pak クールエイドキットは粉末グレープジュース中の青色と赤色の食用色素を逆相固相抽出で分画することにより逆相分配クロマトグラフィー分離の基礎と固相抽出の使用方法を学習するためのキットです。

キットには粉末ジュースと実験に使用する逆相固相カートリッジが含まれています。色素の分離結果は各自、目で見て確認できます。高価な分析装置は必要ありません。

メタノール、精製水、メスシリンダー、試験管など化学系実験室にある試薬と器具があれば直ぐに実験することができます。使用する溶離液はメタノールと精製水を使用して各自が調製します。同じ方法で調製したはずなのに隣の人と異なる結果がでたり、きれいに青と赤の色素が分かれる人もいれば、色が混ざっている人も…　何故このような違いが起こるのでしょうか？

ジュースには以下の成分が含まれています。
ーリン酸カルシウム
ークエン酸
ービタミンC
ー赤色食用色素 #40
ー青色食用色素 #1
ー香料

色素の構造を図1に示します。分析化学系の実習生は予め化合物の構造や化学的特性を調べて逆相固相から溶出する順番を推定し、実験結果と照らし合わせて考察することができます。

溶媒調製などの準備を入れて1～2時間で、実験から考察まで楽しく学んでいただけます。

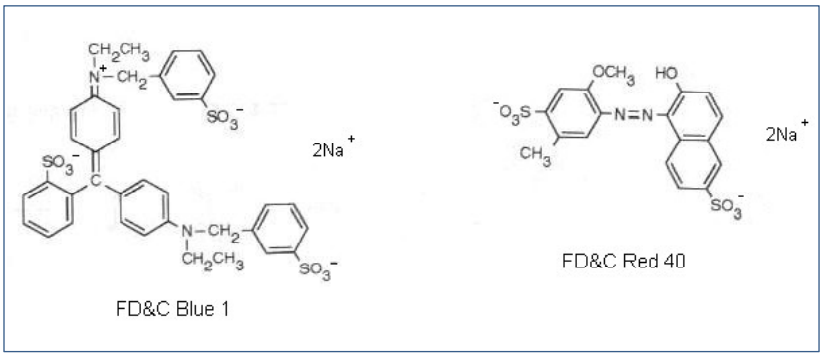


図1．キットに含まれる色素の構造

キットに含まれるもの

粉末グレープジュース1袋
逆相固相抽出カートリッジ各2
ーSep-Pak PLUS LIGHT C18 (130mg充てん)
ーSep-Pak PLUS LONG C18 (820mg充てん)

実験に必要な試薬、器具（キットには含まれていません）

ーメタノール
ー精製水
ーメスシリンダー
ー溶媒容器（ビーカー、フラスコ等）
ー廃液入れ
ー1-10mLシリンジ
ー試験管立て
ー試験管（4本）
ーキムワイプ

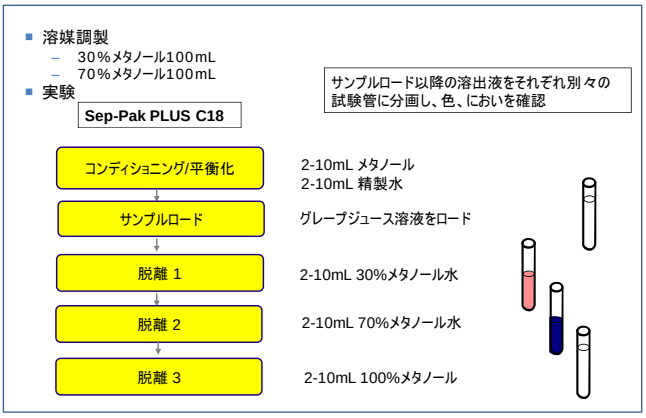


図2．実験プロトコール例

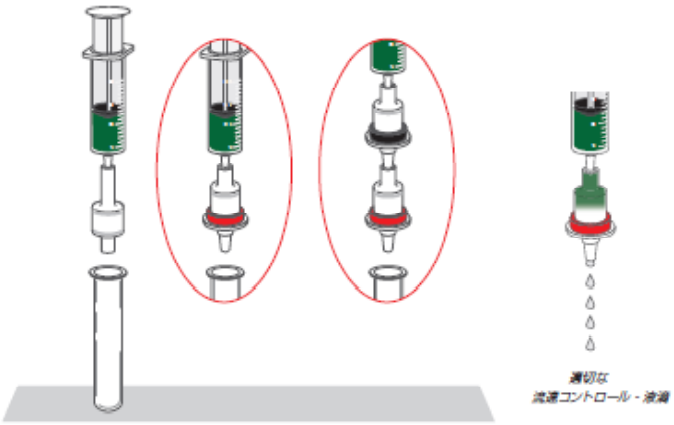


図3．シリンジによる加圧送液の例

実習プロトコール

図2に実験プロトコール例を示しますが、必ずこの方法で行わなければならないということではありません。メタノール混合比を変更したり、メタノールの代わりにアセトニトリルやイソプロパノールを使うことも出来ます。溶媒の極性により脱離強度が変わることを実験で確認することもできます。

決まった方法どおりに行って成功することが実習の目的ではありません。失敗することにより、その原因と対策を考察することが理解の早道になることもあります。

まずはじめにサンプルを用意します。キットに含まれている粉末ジュースを水で溶解してください。

次に30%メタノール水溶液と70%メタノール水溶液を調製します。

調製容量は実験で使用する容量から決定しますが、ここではわかりやすく各100mL調製する例を示します。使用する器具はメスシリンダーと溶媒容器だけです。

調製方法にはいくつかあります。メタノールと精製水を別々に秤量し、ビーカー等の容器で攪拌混合する方法や、メスシリンダーの中で混合する方法などです。厳密には調製方法によってメタノールの混合比が変わります。何故でしょうか？ヒントは水とメタノールの分子サイズの違いにあります。また、どのように変わるのでしょうか？

実習の方法はひとつではありません、いくつかの方法を試しながら結果の違いを考察してください。ポイントはいつ誰が調製しても間違いなく同じ混合比になることです。

以上の準備が整えば、後は図2のプロトコール通り固相抽出を行います。固相カートリッジへの送液は図3のようにシリンジで行います。固相カートリッジの性能を最大限に発揮させるためには、図右のように一滴一滴独立に液滴が落ちる程度の流速（約2mL/min以下）で行ってください。特に保持が弱い成分の場合は流速が速すぎると固相への保持が十分に得られずバンドが広がることがあります。試しに色々な速度で送液を行い色素バンドの広がりを見てみるのも良いでしょう。十分な保持が得られる成分は更に速い流速で送液をしても問題がないこともあります。脱離ステップにおいてはゆっくりと送液することにより、少ない溶媒で脱離されます。

実習目的を色素を固相カートリッジで分画し、目で見て確認する定性試験とした場合はサンプルロードを含め全ての容量をシリンジの目盛で実施しても大丈夫です。

もちろん、厳密な定量が目的の場合はサンプルロードの容量とそれぞれの画分の容量を正確に測定する必要があります。

実験プロトコール（続き）

サンプルロード容量のキャパシティはサンプル調製濃度と使用する固相のキャパシティから決まります。実際にどこまでロードできるか試すのも実習の目的のひとつです。固相カートリッジから色素が溶出しない範囲でできるだけ多くサンプルロードすることで、色の濃い色素画分が得られます。または、同じサンプル量をロードする場合は充填量の少ない固相カートリッジの方が、色素を脱離するために必要な溶媒容量が少なくてすむため、より濃い色素画分が得られます。

固相カートリッジに保持した成分を脱離するために必要な溶媒の容量は使用する固相のホールドアップ容量（またはボイドボリューム、充填剤間の間隙容量と充填剤細孔容量を足したもの。固相に全く保持しない成分はこの容量で溶出する）および保持の強さと、溶媒の脱離強度により変わります。表1に図1のプロトコールにおけるキットに含まれる固相カートリッジ他の溶媒使用容量ガイドラインを示します。

逆相固相カートリッジは必ずメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒でコンディショニングし、続けて水で平衡化してからサンプルをロードします。これは充填剤細孔内に溶媒を浸透させ（水は乾いた逆相固相細孔へは浸透しません）、続けて水と置き換える操作です。この操作を怠ったり、その後サンプルをロードするまでに固相が乾燥してしまったりすると十分な保持が得られないことがあります。これについても、余裕があれば実際に試してみると良いでしょう。

表1．固相カートリッジで使用する溶媒容量ガイドライン

固相カートリッジ	充填量	ホールドアップ容量	使用溶媒容量
Sep-Pak PLUS LIGHT C18	130mg	0.3mL	2mL
Sep-Pak PLUS C18	360mg	0.7mL	5mL
Sep-Pak PLUS LONG C18	820mg	1.6mL	10mL

固相カートリッジをコンディショニング、平衡化する際の溶出液はまとめて廃液容器へ捨ててかまいません。続くサンプルロードステップからそれぞれのステップにおける溶出液を別々の試験管に取り分けます。図1のプロトコールでは4本の試験管が必要となります。

使用する溶媒を間違えないように、メタノール混合比を30％、70％、100％と上げてそれぞれの色素がどこへ溶出するかを確認します。

溶出位置だけではなく、それぞれの色素が混ざり合わなくきれいに分画されたか、それとも一部混入しているかなど、またそれぞれのステップで色素がどのように固相の中を移動していくかなども観察します。嗅覚に自身のある方は、香成分がどこに溶出しているかもかぎ分けてください。しかしこれはかなり難しいかもしれません。

以上で実験は終了ですが、実習は終わりではありません。得られた結果をまとめ、考察いたしましょう。

考察

実験が終了後、結果をまとめてみましょう。表2、図4に結果をまとめた例を示します。何人かで同じ実験を行った場合は、それぞれの画分に何が溶出したかを聞き、その人数を記録することにより、結果のばらつきを見ることもできます。実験者により異なる結果が出た場合は、それぞれのステップにおいてどのような相違があったかを確認しましょう。

図1のプロトコールで結果の相違を引き起こす可能性がある操作の例を以下にしめします。

－溶媒調製
－固相のコンディショニングと平衡化
－サンプルロード流速
－脱離溶媒容量
－脱離流速

表2．実験結果例（それぞれの成分が溶出した実験者数、全7名）

2013/7/25 PM Sep-Pak PLUS C18 (360mg)			
	赤	青	香気
ロード 1mL	0	0	0
30%メタノール 5mL	7	1	0
70%メタノール 5mL	0	7	1
100%メタノール 5mL	0	0	3

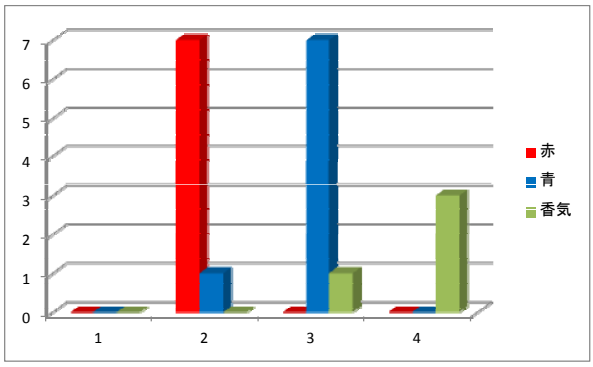


図4．実験結果例（縦軸：人数、 横軸：画分番号）

上記の実験結果の例では、サンプルロード時の素通り画分（グラフの1）に色素が溶出している人はいませんでした。固相のコンディショニングと平衡化がきちんと実施されていることがわかります。

30％メタノール画分で全ての人で赤色素が溶出しています。ここへ青色素が溶出している人が1人いました。実験終了後のディスカッションで、サンプルロードの流速が速すぎて色素のバンドが広かったことが原因ではないかと考察されました。70％メタノール画分では全ての人で青色素が溶出しています。ここへまだ赤が続けて溶出した人はいませんでした。

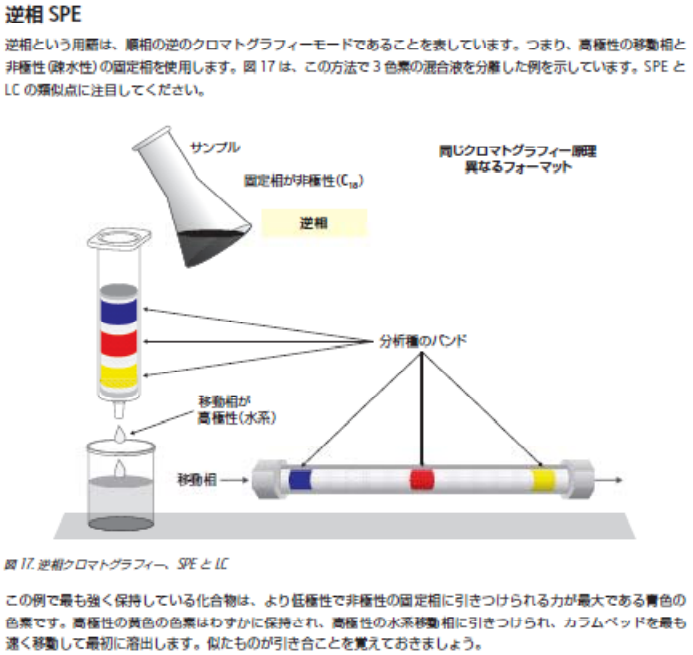
香気成分の検出（においによる嗅ぎわけ）はやはり難しかったようです。サンプル濃度を濃くするか、またはサンプルロード量を増やすことでもっとわかり易くなるかもしれません。

このように簡単な実験でいろいろなことを学習することができます。

固相抽出ビギナーズガイド

固相抽出(SPE)の基本の全てと、過去30年間にこのテクノロジーに携わった世界中の科学者から得られた成功のテクニックを紹介する、ガイドブックの日本語版が完成いたしました。

世界最初の固相抽出製品 Sep-Pakカートリッジが1978年に発売されてから現在までウォーターズが蓄積したSPE技術の集大成をお届けいたします。本書を通してSPEが持つ力をラボで自由自在に活用してください。



逆相 SPE

逆相という用語は、順相の逆のクロマトグラフィーモードであることを表しています。つまり、高極性の移動相と非極性(疎水性)の固定相を使用します。図 17 は、この方法で 3 色素の混合液を分離した例を示しています。SPE と LC の類似点に注目してください。

図 17. 逆相クロマトグラフィー、SPE と LC

この例で最も強く保持している化合物は、より低極性で非極性の固定相に引きつけられる力が最大である青色の色素です。高極性の黄色の色素はわずかに保持され、高極性の水系移動相に引きつけられ、カラムベッドを最も速く移動して最初に溶出します。似たものが引き合ことを覚えておきましょう。

全208ページ、図表満載！
固相抽出の基礎と実践をわかりやすく解説

オーダーインフォメーション

キットに含まれる固相抽出カートリッジは1人の実験者が簡単な検討を行うためのものです。複数名で実験を行う場合や、様々な条件を試したい場合は、追加の固相抽出カートリッジをご購入されることをお勧めいたします。ここに本実習に適した固相抽出カートリッジ他のオーダーインフォメーションを記載します。

商品番号	品名	定価
WAT023501	Sep-Pak PLUS LIGHT C18	¥30,000
WAT020515	Sep-Pak PLUS C18	¥30,000
WAT023635	Sep-Pak PLUS LONG C18	¥30,000
WAT088253	Sep-Pakクールエイドキット [逆相分配クロマトグラフィー分離&固相抽出実習キット]	¥2,600
JLC715003405	固相抽出ビギナーズガイド [**Beginner's Guide to SPE**]	¥10,000

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters および The Science of What's possibleは Waters Corporation の登録商標です。
Sep-Pak はWaters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年9月 MKT13171 09B PDF