

マニュアルリサイクル分取HPLCシステム (流量 20 mL/min まで) のご紹介

LT112
GL Sciences Inc.

今回は手動リサイクルバルブとマニュアルインジェクターを用いた、シンプルなりサイクル分取HPLCシステムをご紹介します。

分取HPLCにおいては、カラムの内径に応じて流量を上げる必要がありますが、流量を上げると配管由来の圧力上昇が起こります。一方でHPLCの流路では、インジェクターから検出器セルまでの配管内でサンプルの自由拡散が起こるため、配管由来のボリュウムをなるべく減らす必要があります。つまり、圧力が高くなり過ぎず、且つサンプルの拡散が起こりにくい配管を、使用するカラムと流量に応じて選択する必要があります（例えば流量 10 mL/min では内径 0.5 mm 程度の配管を使用します）。

また、リサイクル分離では、あたかもカラムを数本連結したような高分離を得るため、1本のカラムに繰り返しサンプルを通過させます。ここでも、カラム出口から再びカラム入り口に入るまでの流路（配管と送液ポンプ）内ではサンプルの拡散が起こります。この部分にも、サンプルの拡散が起こりにくく、且つ送液の安定性や、検出器セルへの背圧を考慮した配管や送液ポンプを選択する必要があります。

今回ご紹介いたしますシステムでは、各種配管の最適化を行い、配管を変えることなく 3 ~ 20 mL/min でのリサイクル分離が行えます。また、特許出願中の技術を採用し、リサイクル流路中から送液ポンプ内ダンパー部のボリュウムを取り除いたことで（PU714R の採用）、一般的な送液ポンプを使用した場合に比べて、リサイクル分離効率の向上を実現しました。

逆相、順相、キラル等のリサイクル分離では、7.6 mm I.D.、10 mm I.D. セミ分取カラムでの効率化が期待できます。また、14 mm I.D.、20 mm I.D. 分取カラムも使用できます。SECのリサイクル分離では、20 mm I.D.、30 mm I.D. 分取カラムが使用できます。

本システムの適用カラム内径、流量の目安は、本資料中 表1、表2 をご参照ください。

(I. Kuroda)

1. マニュアルリサイクル分取HPLC の使用方法

基本的な使用法は、イソクラティック条件下で、ピークが検出器に到達する前にリサイクルバルブとマニュアルインジェクターを切り換えます。マニュアルインジェクターを切り換える理由は、リサイクル流路中からサンプルループ分のデッドボリュウムを低減するためです。その後、リサイクル分離された分取目的ピークが検出器に到達する前にリサイクルバルブを元のポジションに切り換え、Drain で分取を行います。

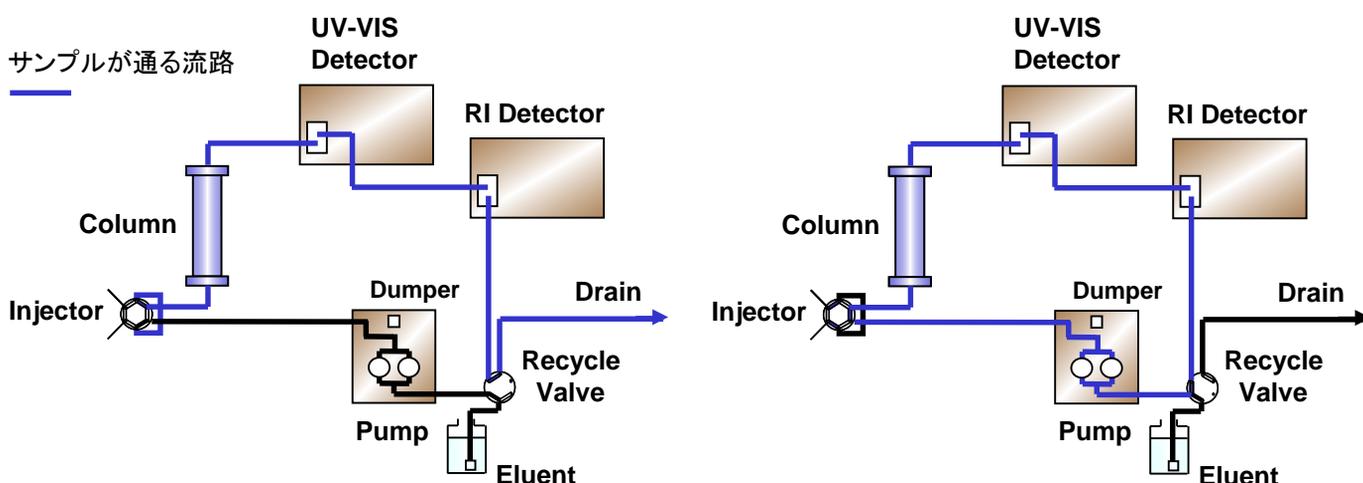


図1 システム流路図 (イソクラティック)

図2 システム流路図 (リサイクル中)

2. 高効率リサイクル分離例

リサイクル分離に適したポンプヘッド部構造を持つPU714Rを送液ポンプに採用することにより、逆相 7.6 mm I.D. カラム、10 mm I.D. カラムでの分離効率が上がります。

Conditions

Column : Inertsil ODS-3 5 μ m 250 \times 7.6 mm I.D.
 Eluent : A) CH₃OH
 B) H₂O
 A/B = 70/30, v/v
 Flow Rate : 2.2 mL/min
 Col. Temp. : Ambient
 Detection : UV 280 nm (UV702, 分取セル 2.4 mm)
 ※ RI704P も UV の後ろに接続した状態
 Injection Vol. : 15 μ L
 Sample : *p*-, *o*-Cresol (5 mg/mL each in Eluent)

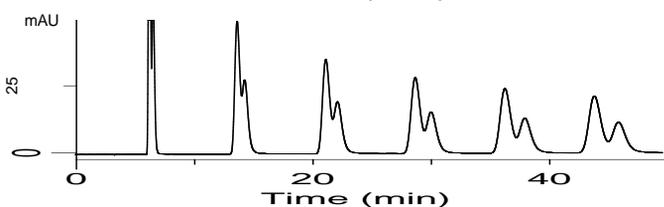
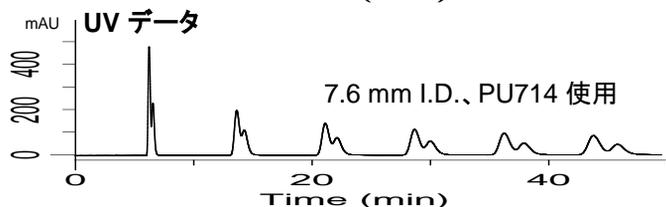
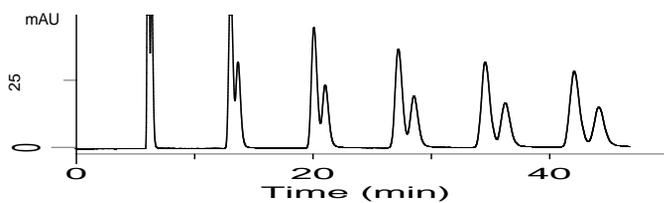
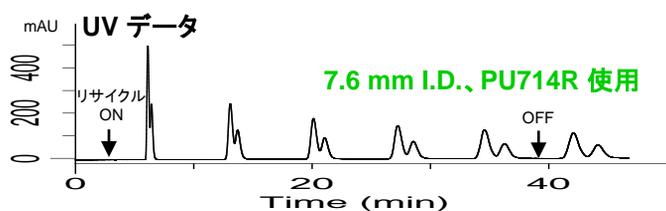


図3 PU714R 使用時と未使用時でのリサイクル分離効率の比較
(7.6 mm I.D. 逆相カラム使用時、右図は縦軸を拡大したクロマトグラム)

Conditions

Column : Inertsil ODS-3 5 μ m 250 \times 10 mm I.D.
 Eluent : A) CH₃OH
 B) H₂O
 A/B = 70/30, v/v
 Flow Rate : 3.8 mL/min
 Col. Temp. : Ambient
 Detection : UV 280 nm (UV702, 分取セル 2.4 mm)
 ※ RI704P も UV の後ろに接続した状態
 Injection Vol. : 25 μ L
 Sample : *p*-, *o*-Cresol (5 mg/mL each in Eluent)

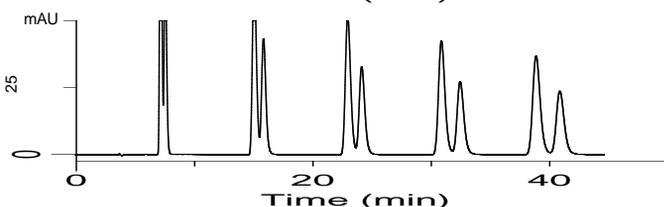
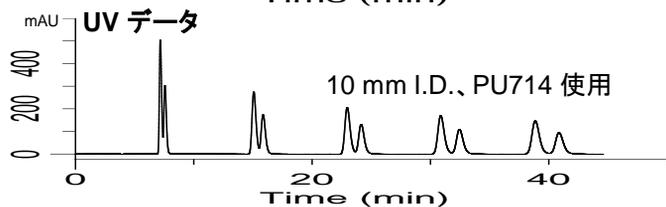
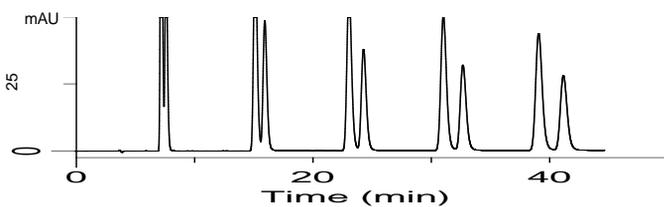
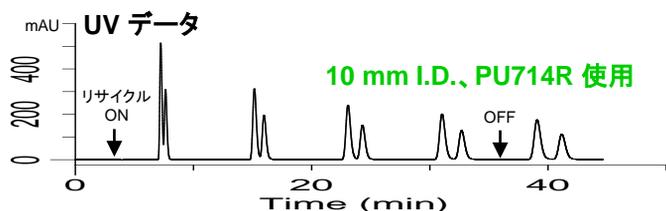


図4 PU714R 使用時と未使用時でのリサイクル分離効率の比較
(10 mm I.D. 逆相カラム使用時、右図は縦軸を拡大したクロマトグラム)

3. 20 mm I.D.、30 mm I.D. カラムでSECリサイクル分離が可能

20 mm I.D. カラムを使用する際は、流量 3.5 ~ 6.0 mL/min 程度、30 mm I.D. カラムを使用する際は、流量 7.0 ~ 12.0 mL/min 程度で分離を行います。下図にありますように、20 mm I.D. カラムを使用し、流量 3.5 mL/min にて十分なリサイクル分離効率が得られています。カラム内径が大きいことと、本サンプルでは十分なリテンションタイムが得られているため、PU714R を使用した効果は僅かに見えます。しかしながら、20 mm I.D. カラムを使用した際も、インクラティック条件下でのピーク溶出時間が短い程、リサイクル時に流路中のデッドボリュームの影響を受けやすくなります。

Conditions

Column : Inertsil Diol 5 μm 250 × 20 mm I.D.
 Eluent : THF
 Flow Rate : 3.5 mL/min
 Col. Temp. : Ambient
 Detection : UV 254 nm (UV702, 分取セル 2.4 mm) RI (RI704P)
 Injection Vol. : 200 μL
 Sample : ポリスチレン MW 19,000 と MW 3,100 (5 mg/mL each in THF)

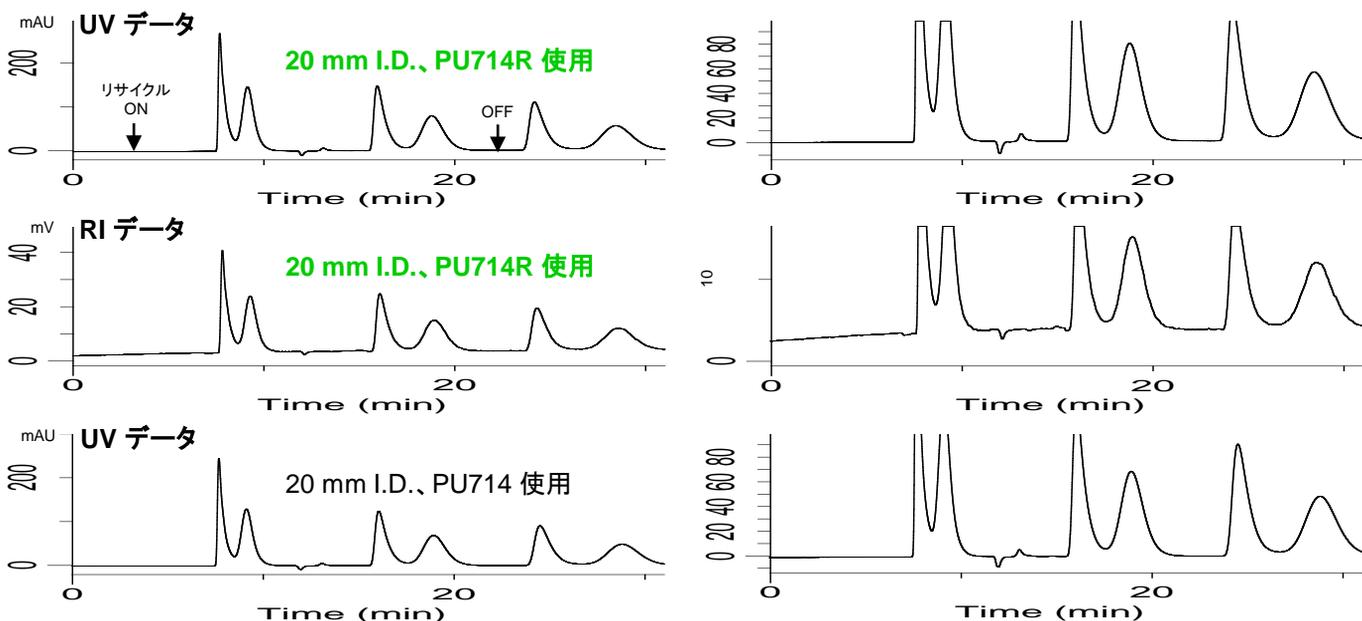


図5 PU714R 使用時と未使用時でのリサイクル分離効率の比較 (20 mm I.D. 逆相カラム使用時、右図は縦軸を拡大したクロマトグラム)

4. 流量 3 ~ 20 mL/min でのリサイクル分取用に

最大流量 20 mL/min でのリサイクル分取が可能です。適用するカラムの最大内径の目安は、下記の表にありますように、逆相、順相、キラルカラム等で 20 mm I.D.、SECカラムで 30 mm I.D. です。

表1 適用カラム内径 (逆相、順相、キラルカラム等)

カラム内径 (mm)	流量の目安 (mL/min)	リサイクル分離	インクラティックグラジエント ^{*1}
7.6	2.7	○ ^{*2}	○ ^{*2}
10	5.0	◎	◎
14	9.0	◎	◎
20	20.0	◎	◎

表2 適用カラム内径 (SEC)

カラム内径 (mm)	流量の目安 (mL/min)	リサイクル分離	インクラティック
20	3.5 ~ 6.0	◎	◎
30	7.0 ~ 12.0	◎	◎

*1 グラジエントでは送液ポンプ 2台と、グラジエントミキサーが必要です。RI 検出器はグラジエント条件下では検出できません。

*2 ○は、配管の低流量域への最適化により、分離効率の向上が可能です。

5. 使用装置

- ・リサイクル用分取ポンプ PU714R Cat. No. 7810-15301
(マニュアルリサイクルバルブ PLC-Rc、レール、カラムホルダー付き)
※ 分取ポンプ PU714 をベースに、リサイクル流路中からダンパー部のボリュームを取り除くための流路改造が施された製品です。ダンパーの機能は維持しています。
- ・RI 検出器 RI704P Cat. No. 6003-70405
- ・UV-VIS 検出器 UV702 (分取セル 2.4 mm 付き) Cat. No. 6001-70201
- ・マニュアルインジェクター 7725i Cat. No. 6020-77000
- ・分取カラム (逆相)
Cat. No. 5020-06802 (Inertsil ODS-3 5 μ m 250 \times 7.6 mm I.D.)
Cat. No. 5020-06812 (Inertsil ODS-3 5 μ m 250 \times 10 mm I.D.)
- ・分取カラム (SEC)
Cat. No. 5020-86566 (Inertsil Diol 5 μ m 250 \times 20 mm I.D.)

右の写真のように、マニュアルリサイクル分取に最低限必要なユニットで組まれた、シンプルなシステムです。装置に向かって右側に、カラムホルダーを取り付けるためのレールを付属しています。

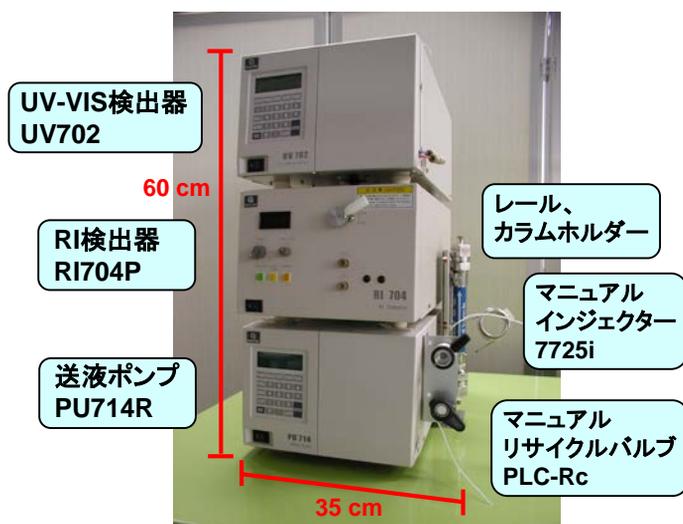


図6 システム写真 (リサイクル中)

