

# 分取の上手な使い方

## その3 分取におけるカラム温度管理について

分取HPLCでは大量の溶媒を使用するため、移動相(溶離液)の温度を均一にするのがポイントです。分析カラムでは一般的に、カラムの温度管理をすることを行いますが、分取カラムでは温調せずに室温で行う場合もあります。

分取カラムであっても保持時間が一定になるのは正確な分取につながるため、繰り返し分取を行う場合は特に分取カラムの温度管理を行うメリットがあると言えます。

今回は、テクニカルノートNo.133、No.134に引き続き『分取の上手な使い方 その3』として、カラム温度管理をする下記のようなポイントについてご紹介いたします。

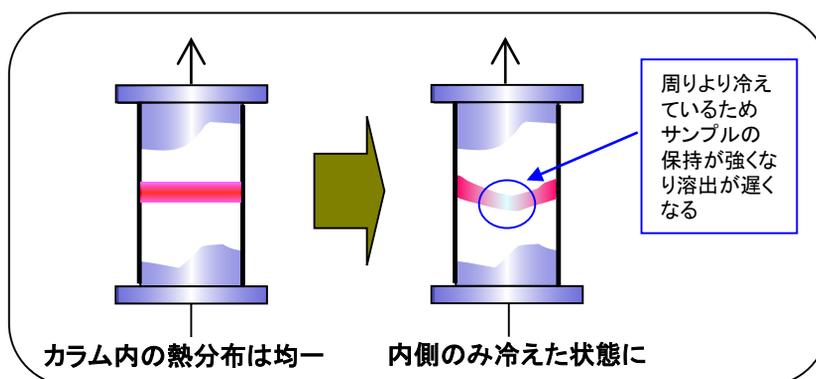
(K. Kanno)

- ポイント1 移動相とカラムの温度をなるべく均一に
- ポイント2 プレヒートミキサー使用のすすめ
- ポイント3 環境温度変動の影響を低減
- ポイント4 加温の処理量アップ効果
- ポイント5 冷却の異性体分離効果

### ポイント1 移動相とカラムの温度をなるべく均一に

分取においてカラムを温調することで室温変化による保持時間変動が抑えられ、安定した分取精製につながります。

内径4.6 mmなどの分析カラムを使用する場合は移動相の温度に注意することは少ないかもしれませんが、一方、分取カラムの場合はカラム内径が大きいカラムの中心部まで温めることができず、下図のようにカラムの外周部と中心部でサンプルの保持が違ってしまいます。この結果、ショルダーピークになったり、さらにひどい場合にはピークが複数に割れてしまうという現象が起こります。そのため、分取HPLCでは移動相温度をカラム温度となるべく均一にすることがポイントです。

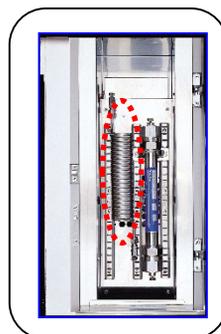


カラム内の温度分布の違い

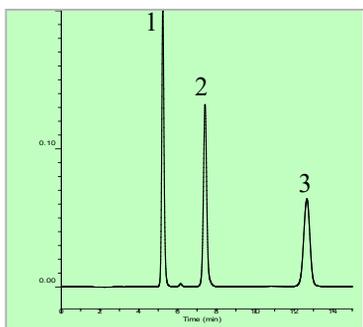
## ポイント2 プレヒートミキサーのすすめ

移動相温度をカラム温度と同程度にするには、プレヒートミキサーを使用するのが効果的です。プレヒートミキサーにはグラジエント時のミキシング効果と移動相温度をカラム温度と均一にする温調効果があります。

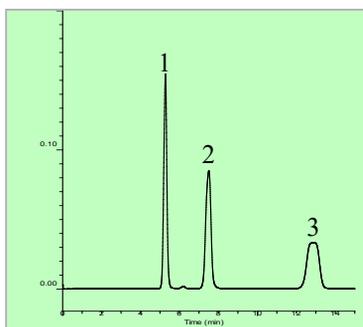
下図にプレヒートミキサーの有無によるクロマトグラムの比較を示しました。プレヒートミキサーがない場合に比べ、プレヒートミキサーがある場合のピークはシャープであることが分かるかと思います。



プレヒートミキサーあり



プレヒートミキサーなし



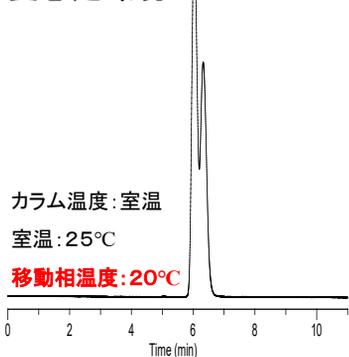
カラム : Inertsil PREP ODS  
(10  $\mu$ m, 250 x 20 mm I.D.)  
移動相 : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 75/25, v/v  
流量 : 15 mL/min  
カラム温度 : 35 °C  
検出器 : UV 254 nm  
サンプル : 1. フタル酸ジメチル  
2. フタル酸ジエチル  
3. フタル酸ジアリル

カラム内の温度分布の違いによる影響

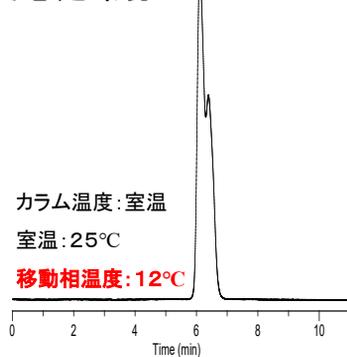
## ポイント3 環境温度変動の影響を低減

カラム温度と移動相温度の差が大きくなるとピーク形状が悪化しやすくなります。実験室の温度は管理されているため一年を通してそれほど大きな変化がないかもしれませんが、しかし、溶媒の温度は保管場所によって大きな変化があります。溶媒の保管場所が室外にある場合、冬場は特に室温と溶媒温度の差が大きくなりやすいです。そのため、室温にて分取している場合においてもプレヒートによる温調管理をすることをおすすめします。

夏想定環境



冬想定環境

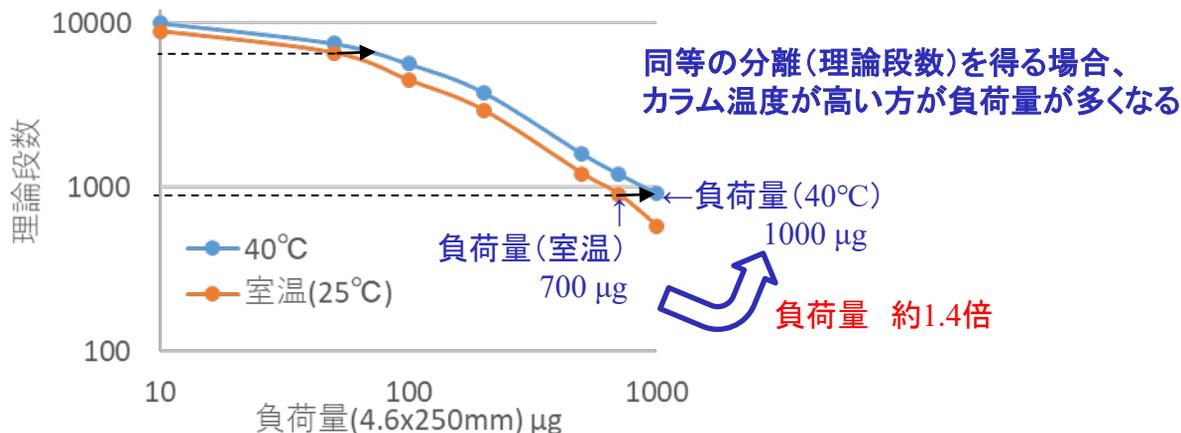


カラム : Inertsil ODS-3  
(5  $\mu$ m, 250 x 20 mm I.D.)  
移動相 : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70/30, v/v  
流量 : 15 mL/min  
カラム温度 : 25 °C (室温相当)  
検出器 : UV 280 nm  
サンプル : *o*, *p*-Cresol (0.05%)  
検出器 : 0.5 mL

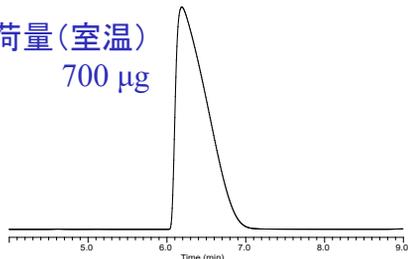
### ポイント4 加温の処理量アップ効果

分取においてカラムへの負荷を増やすと理論段数が低下して徐々に分離が悪くなっていき、負荷量と分離の兼ね合いにより最大処理量が決定されます。下記は分析サイズカラム(内径4.6 mm×長さ250mm)を使用して室温(25°C)条件と加温(40°C)条件でサンプル負荷時の理論段数を比較した結果になります。

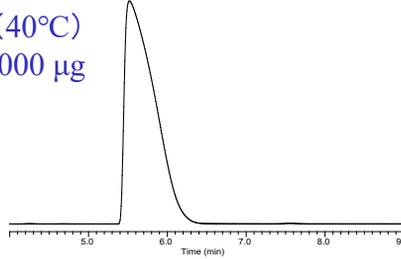
室温条件と同等の分離(理論段数)を加温条件で得る場合、加温条件の負荷量の方が高くなりカラムを加温することは最大処理量を高める効果があります。



負荷量(室温)  
700 μg



負荷量(40°C)  
1000 μg



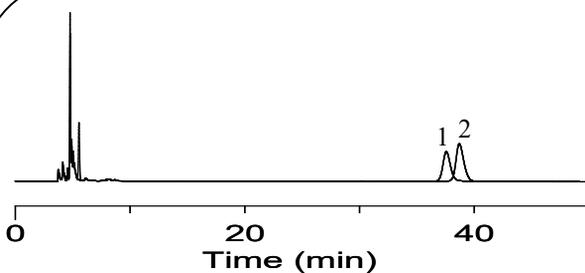
カラム : Inertsil ODS-HL (5 μm, 250 x 4.6 mm I.D.)  
 移動相 : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 40/60, v/v  
 流量 : 1.0 mL/min  
 カラム温度 : 40 °C  
 検出器 : UV 300 nm  
 サンプル : Caffeine (10 mg/mL) 水希釈、注入量でカラムへ負荷

### ポイント5 冷却の異性体分離効果

HPLCによる異性体等のカラム分離では低温の方が分離が良好で、カラムオープン(クール機能)による温度管理をする場合があります。この場合もポイント2で示した温度管理をするのが理想的です。

低温で使用する際は次のような点に注意が必要です。

- ・負荷量の低下(ポイント4参照)
- ・カラム圧力の上昇
- ・保持時間の増加



カラム : Inertsil ODS-P (5 μm, 250 x 4.6 mm I.D.) X2本  
 移動相 : CH<sub>3</sub>CN/2-Propanol/Hexane= 3/2/1, v/v/v  
 流量 : 1.0 mL/min  
 カラム温度 : 15 °C  
 検出器 : UV 210 nm  
 サンプル : 1. OPO (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol)  
 2. OOP (1,2-Dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol)

## コラムオープン

### 【特長】

- ・低温(0℃)～高温(90℃)まで幅広い温調範囲に対応
- ・温調範囲による2機種(冷却機能あり、冷却機能なし)
- ・大きいカラムの収納 内寸:170(W)×80(D)×600(H)mm  
 カラム最大外径8～10mmは最大4本  
 カラム最大外径13～38mmは最大2本
- ・プレヒートミキサー設置による温度管理

機種名	CO903 TypeN	CO903 TypeC
設定温度	0～90℃(1℃ステップ)	
制御範囲	室温+10～90℃	室温-20～90℃
温度制御精密さ	±0.3℃(40℃の場合)	
大きさ	252(W)×420(D)×700(H)mm *H:ゴム足除く	



## PrepAce 分取HPLCシステム構成例

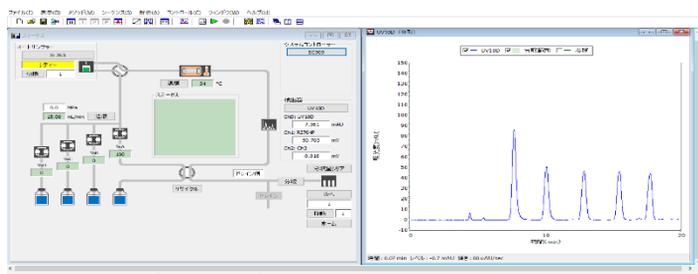
機器の組み合わせにより“リサイクル分取”  
 “オートインジェクター(単検体用、多検体用)”等  
 のシステムにも対応可能な分取HPLCシステム  
 です。



- |               |       |
|---------------|-------|
| ①送液ポンプ        | PU914 |
| ②マニュアルインジェクター | 7725i |
| ③UV検出器        | UV10D |
| ④フラクションコレクター  | FC906 |
| ⑤システムコントローラー  | SC909 |

## PrepAce ソフトウェア

クロマトグラムを確認しながらの手動分取から設定した  
 条件(時間、レベル、スロープの組み合わせ)による  
 全自動分取までニーズに合わせた操作が可能です。



〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F  
 TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることを  
 お薦めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、  
 当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告  
 無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。  
 お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@gl.s.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

[https://www.gl.s.co.jp/technique/app/app\\_search.html](https://www.gl.s.co.jp/technique/app/app_search.html)