

マイクロコンピュータ制御HPLCに関する研究

Studies on HPLC by Micro Computer Control

高 橋 浩*・城 野 博 州**・高 井 信 治*

Hiroshi TAKAHASHI, Hirokuni SHIRONO and Nobuharu TAKAI

1. は じ め に

マイクロコンピュータによる自動制御は、開発されてからの期間がきわめて短いにもかかわらず小型なこと、安価にできることの他に広い応用性が期待されているために、急速に進歩しつつある分野である。

一方高速液体クロマトグラフィー (HPLC) もきわめて短期間に急速に発達した分離分析技術であり初期における従来から行われてきた液体クロマトグラフィーを高速化するというもののみならず、より精密な分離精度と高感度化が要求されるようになってきた。

しかし、今後より一層の高性能化を要求するならば、従来から行われてきた加工精度を高度化するというもの他に、種々のきめ細かい制御が必要となってくる。

そこで今まであまり多くの応用例が知られていない流量を任意に変化させた時の影響について研究を行った。

HPLCでは、一般に最初の方のピークは、きわめてシャープになるにもかかわらず多成分を分離する場合では、後の方に溶出してくるピークは、次方にカラム内での拡散の影響で幅が広くなる傾向になり、さらに長時間を要

する場合もある。

このような事柄を解決する目的で従来から溶離液組成を変えて溶出するグラジェント法が行われてきたが、現在の所再現性のよい方法が見当たらず、定量分析には向かないというのが一般的に言われている。

そこで溶離液組成を変えないで、流量のみを変えて、その溶離挙動を調べた結果、きわめて興味ある結果を得ることができた。

2. 実 験

実験に使用した HPLC の装置は、溶離液組成を三成分任意に混合することができ、流量も 0.1~20 ml/min の間で自由に得られるように設計された日立 638 型を用いた。

このうち溶離液プログラマーは、二つの純溶媒、この実験では、水とアセトニトリル (4 : 6) を別々に用意したものの混合割合を一定としたものと、プログラム法と同じ割合にあらかじめ混合したものをを用いて双方を比較した。

流量制御のプログラムは種々の方法を考え、そのつど

Table 2 流量と R_t の関係

(単位; min)

流量 ml/min \ Sample	Benzene	Naphtalene	Biphenyl	Phenanthrene	Fluoranthene	Pyrene	Chrysene	Benz(α) Pyrene
1.0	3.58	4.98	5.92	7.50	9.58	10.51	13.73	21.40
1.5	2.53	3.46	4.21	5.32	6.58	7.32	8.67	15.01
2.0	1.70	2.56	3.02	3.81	4.84	5.66	7.45	11.20
2.5	1.48	2.13	2.82	3.51	4.39	4.72	6.13	10.28

Table 1 流量と R_t の関係

(単位; min)

流量 ml/min \ Sample	Benzene	Naphtalene	Biphenyl	Phenanthrene	Fluoranthene	Pyrene	Chrysene	Benz(α) Pyrene
1.0	3.55	4.88	5.84	7.44	9.51	10.49	13.72	21.21
1.5	2.49	3.45	4.18	5.24	6.57	7.32	8.58	14.61
2.0	1.72	2.53	2.98	3.77	4.80	5.56	7.40	11.18
2.5	1.47	2.13	2.66	3.42	4.37	4.69	6.09	10.01

* 東京大学生産技術研究所 第4部

** 東京理科大学

研究速報
新しいプログラムを作り用いた。

また充填剤は日立ゲル 3053 を用い、カラムは $4\phi \times 150$ mm のものを使用した。

3. 結 果

まずマイクロコンピュータのプログラムを用いて電磁弁の制御を行って二液を混合した場合と、あらかじめ溶離液を混合した場合との影響について、種々の流速で測定を行ったその結果を表1～表2に示す。ここで、表1はマイクロコンピュータによって二液混合した場合、表2はあらかじめ二液を混合した場合である。

マイクロコンピュータ制御により溶離液を混合して用いた場合と、あらかじめ混合して用いた場合とでは、この溶媒組成では、きわめて一致した溶離時間の位を得ることができた。

Table 3 流量 1.0 ml/min における N , $HETP$, および K' の値

Sample	N	$HETP$	K'
Benzene	1387	0.108	1.16
Naphthalene	2223	0.067	1.98
Biphenyl	2635	0.057	2.56
Phenanthrene	3246	0.046	3.54
Fluoranthene	5089	0.029	4.80
Pyrene	5979	0.025	5.40
Chrysene	6499	0.023	7.37
Benz(α)Pyrene	10774	0.014	11.93

* $HETP$: Hight equivalent to a theoretical plate

** K' : capacity ratio

Table 4 流量 1.5 ml/min における N , $HETP$, および K' の値

Sample	N	$HETP$	K'
Benzene	2013	0.075	1.10
Naphthalene	1876	0.080	1.88
Biphenyl	2323	0.065	2.51
Phenanthrene	2770	0.054	3.43
Fluoranthene	5070	0.030	4.48
Pyrene	4919	0.031	5.10
Chrysene	6496	0.023	6.23
Benz(α)Pyrene	8275	0.018	11.51

Table 5 流量 2.0 ml/min における N , $HETP$, および K' の値

Sample	N	$HETP$	K'
Benzene	1758	0.085	0.70
Naphthalene	2401	0.063	1.56
Biphenyl	2721	0.055	2.02
Phenanthrene	3123	0.048	2.81
Fluoranthene	5892	0.026	3.84
Pyrene	5991	0.025	4.66
Chrysene	7348	0.020	6.45
Benz(α)Pyrene	13540	0.011	10.20

次に種々の流量における結果を、表3～表6に示す。
いずれの場合も二液はマイクロコンピュータ制御により混合されたものである。

表3～表6の結果から HPLC としてきわめてよい性

Table 6 流量 2.5 ml/min における N , $HETP$, および K' の値

Sample	N	$HETP$	K'
Benzene	1343	0.112	0.85
Naphthalene	2097	0.072	1.66
Biphenyl	3862	0.039	2.53
Phenanthrene	2807	0.053	3.39
Fluoranthene	7384	0.020	4.49
Pyrene	5865	0.026	4.90
Chrysene	6891	0.023	6.66
Benz(α)Pyrene	10646	0.014	11.85

Table 7 流量グラジェント 1.0 ml/min～2.0 ml/min, 20 分間プログラムの時の Rt , N , $HETP$, および K' の値

Sample	Rt (min)	N	$HETP(\mu m)$	K'
Benzene	3.31	1371	109.41	0.84
Naphthalene	4.54	2374	63.18	1.52
Biphenyl	5.41	3062	48.99	2.01
Phenanthrene	6.73	4259	35.22	2.74
Fluoranthene	8.36	7480	20.05	3.64
Pyrene	8.91	7055	21.26	3.95
Chrysene	11.17	10637	14.10	5.21
Benz(α)Pyrene	15.67	15762	9.52	7.72

Table 8 流量グラジェント 1.0 ml/min～3.0 ml/min, 20 分間プログラムの時の Rt , N , $HETP$, および K' の値

Sample	Rt (min)	N	$HETP(\mu m)$	K'
Benzene	3.07	1816	82.60	0.67
Naphthalene	4.01	2939	51.04	1.18
Biphenyl	4.64	3611	41.54	1.52
Phenanthrene	5.61	7565	19.83	2.05
Fluoranthene	6.78	13504	11.11	2.68
Pyrene	7.21	12299	12.20	2.92
Chrysene	8.92	8696	17.25	3.85
Benz(α)Pyrene	12.47	16751	8.96	5.78

Table 9 流量グラジェント 1.0 ml/min～4.0 ml/min, 20 分間プログラムの時の Rt , N , $HETP$, および K' の値

Sample	Rt (min)	N	$HETP(\mu m)$	K'
Benzene	3.01	2994	50.10	0.77
Naphthalene	4.03	4505	33.30	1.37
Biphenyl	4.73	4564	32.87	1.78
Phenanthrene	5.76	5184	28.94	2.39
Fluoranthene	7.07	10201	14.70	3.16
Pyrene	7.50	6942	21.61	3.41
Chrysene	9.26	10584	14.17	4.45
Benz(α)Pyrene	12.32	17817	8.42	6.25

研究速報

Table 10 流量グラジエント 1.0 ml/min~3.0 ml/min, 30 分間プログラムの時の R_t , N , $HETP$, および K' の値

Sample	R_t (min)	N	$HETP(\mu m)$	K'
Benzene	3.68	1671	89.77	0.84
Naphthalene	4.96	3406	44.04	1.48
Biphenyl	5.90	3859	38.87	1.95
Phenanthrene	7.46	4597	32.63	2.73
Fluoranthene	9.59	5387	23.49	3.80
Pyrene	10.22	6685	22.44	4.11
Chrysene	12.97	9952	15.07	5.49
Benz(α) Pyrene	17.80	18747	8.00	7.90

Table 11 流量グラジエント 1.0 ml/min~4.0 ml/min, 15 分間プログラムの時の R_t , N , $HETP$, および K' の値

Sample	R_t (min)	N	$HETP(\mu m)$	K'
Benzene	2.73	2464	60.88	0.66
Naphthalene	3.51	4928	30.44	1.14
Biphenyl	4.03	6496	23.09	1.46
Phenanthrene	4.81	6426	23.34	1.93
Fluoranthene	5.75	10933	13.72	2.51
Pyrene	6.08	7541	19.89	2.71
Chrysene	7.41	12996	11.54	3.52
Benz(α) Pyrene	9.96	17636	8.51	5.07

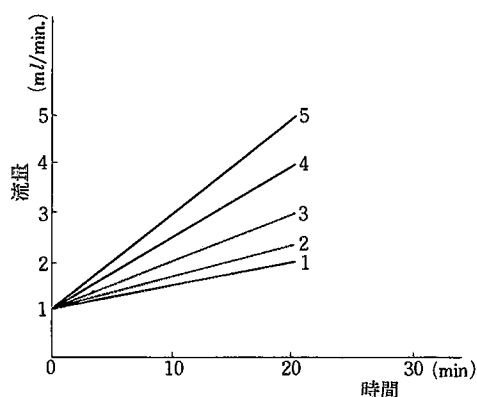


Fig. 1 Program of flow gradient

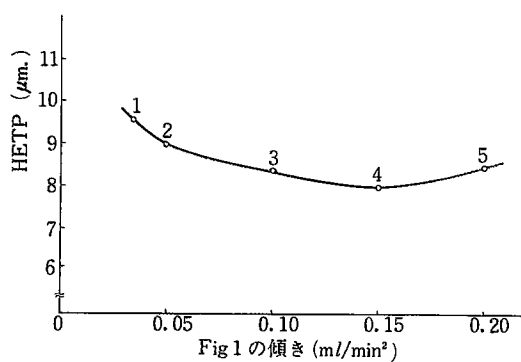


Fig. 2 Effect of flow gradient on $HETP$
Chromatographic conditions for
Benz(α) Pyrene as in Table 7~11

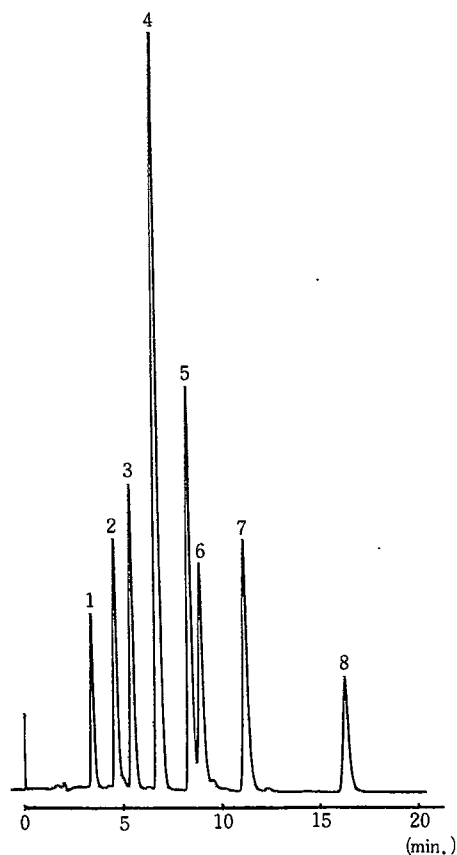


Fig. 3 Separation of polyaromatic hydrocarbons
Peak identification:
1) benzene, 2) naphthalene, 3) biphenyl,
4) phenanthrene, 5) fluoranthene, 6) pyrene,
7) chrysene, 8) benz(α) pyrene
column: Hitachi gel #3053 4.0 ϕ \times 150 mm
eluent: CH_3CN/H_2O (6/4 v/v)
flow rate: 1.0 ml/min
detector: UV-250 nm (0.16 AUFS)

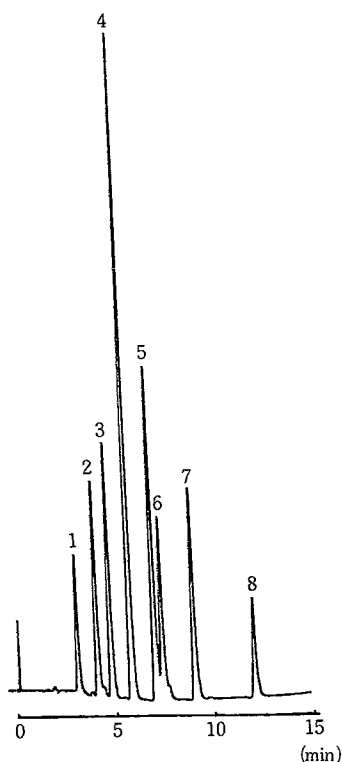


Fig. 4 Separation of polyaromatic hydrocarbons

Peak identification:

- 1) benzene, 2) naphthalene, 3) biphenyl,
4) phenanthrene, 5) fluoranthrene, 6) pyrene,
7) chrysene, 8) benz(a)pyrene

column: Hitachi gel #3053 4.0 ϕ \times 150 mm

eluent: CH₃CN/H₂O(6/4 v/v)

flow rate: 1.0 ml/min \sim 4.0 ml/min(20 min)

detector: UV-250 nm(0.16 AUFS)

能を持っていることが知られた。

次に上記の事柄を基にして、流量グラジェント法による溶離挙動を調べた。

流量グラジェントは、マイクロコンピュータによるプログラムによって行い、グラジェント範囲は、1.0 ml/min \sim 2.0 ml/min, 1.0 ml/min \sim 3.0 ml/min, 1.0 ml/min \sim 4.0 ml/min 以上 20 分間のプログラム、および 1.0 ml/min \sim 3.0 ml/min の 30 分間プログラム、1.0 ml/min \sim 4.0 ml/min の 15 分間プログラムで行った。

この結果、最も顕著な事柄は、一定流量で行った場合も、流量グラジェントを行った場合もこの系では、すべてのピークは正規分布で得られ、リーディングやテールリングの現象はみられなかった。

またピーク間での分離は、完全に行われた。すなわち、一定流量で分離する系で分離できるものはグラジェント流量でも完全に分離することができる。

表 7 \sim 表 11 に流量グラジェントの場合の結果を示す。

次に、流量グラジェントのプログラムを、横軸に時間、縦軸に流量をとった時の値を図 1 に示す。

さらに図 1 の傾きを横軸にとり、縦軸に Benz(a)Pyrene の HETP をとった特性グラフを図 2 に示す。

また図 3 \sim 図 4 で、一定流速で得られたクロマトグラムと、流量グラジェントで得られた結果のクロマトグラムの一例を示す。

以上、流量グラジェント法は、分離を不完全にすることなく溶出時間を早くすることができるので、長時間を要するようなクロマトグラフィーや、またプログラムによっては途中だけ流速を早めたり、前半と後半とを変化させて行うことも可能である。必要な場所のみ完全なクロマトグラムを得る場合や、途中でブロードなピークが含まれるような場合には、有効な手法になると思われる。

(1980 年 10 月 4 日受理)