

液体クロマトグラフィ用グラジエント装置の開発

梅	谷	陽	二*
橋	本		勉
馬	場	信	行
鈴	木	慈	雄
杉	本	忠	則

A New Gradient for Liquid Chromatography

Youji UMETANI
 Tsutomu HASHIMOTO
 Nobuyuki BAMBA
 Shigeo SUZUKI
 Tadanori SUGIMOTO

A new device for gradient elution chromatography has been developed. This special accessory for HLC-802 uses a nozzle flapper which works with out-put signals from the converter, controlling the liquid flows from two nozzles at a predetermined rate.

General explanation of the gradient device is given together with some examples of analysis obtained by HLC-802 using vinyl acetate gel and radiation-graft silica gel.

1. ま え が き

液体クロマトグラフィにおいて、異なる性質をもつ多くの成分を含む化合物および混合物を1つのカラムで分離する場合、1つの固定した条件下で全成分を分離するのは困難であるし、また長時間を必要とすることが多い。そこで必要に応じて分離条件を制御し相互に似かよった性質の成分を分離するときは分離条件をゆるやかな変化にし、性質の非常に異なる性質を分離するときには分離条件を急激に変化させる方法が全体として短時間で分離分析を終了することができる。

分離条件の制御の方法としては、1) 温度変化、2) 流速変化、3) 組成変化の3つの方法が考えられるが前2者は、LCにおいてはあまり用いられていない。3)の組成変化はLCにおいて古くから一般に用いられてきた方法であり¹⁾、段階的制御と、濃度勾配制御とがある。前者はいくつかの溶媒槽をマルチポートバルブによ

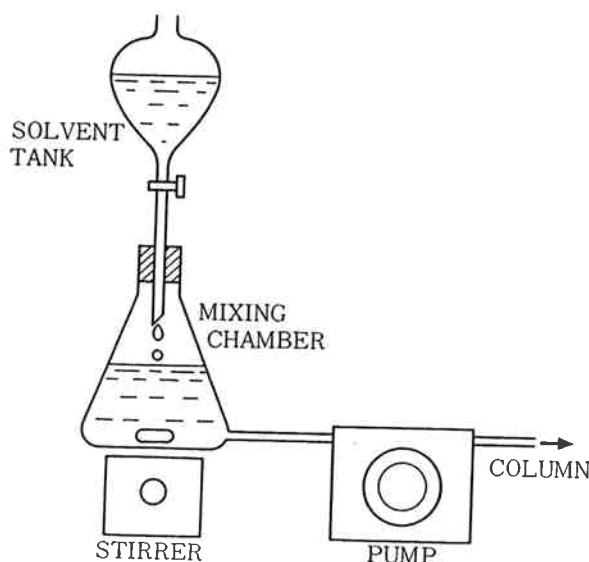


Fig. 1 Principle of gradient device (Closed chamber)

* 東京工業大学 工学部 機械物理教室教授

って切換えて行くものであり、アミノ酸分析計やペプチド合成装置などに用いられてきた方法である²⁾。後者の方式には1) 固定容積混合槽型、2) 連通管型、3) 可変混合型などがあり、これらの方法のうち現在LC用として商品化されているものについて若干の解説を行う。まず1) の固定容積混合槽によるものは Fig. 1 より明

らかなように構造が簡単のためしばしば実験に用いられるが濃度勾配のプログラミングが自由に行えない欠点を有する³⁾。Fig. 2 は複数の連通管を用いたものでアミノ酸分析計に用いられているが準備に手数がかかりかつ溶媒の少量化に適さない欠点を有する⁴⁾。また簡便な方法として Fig. 3 に示す如く2個の三角容器で内部に収

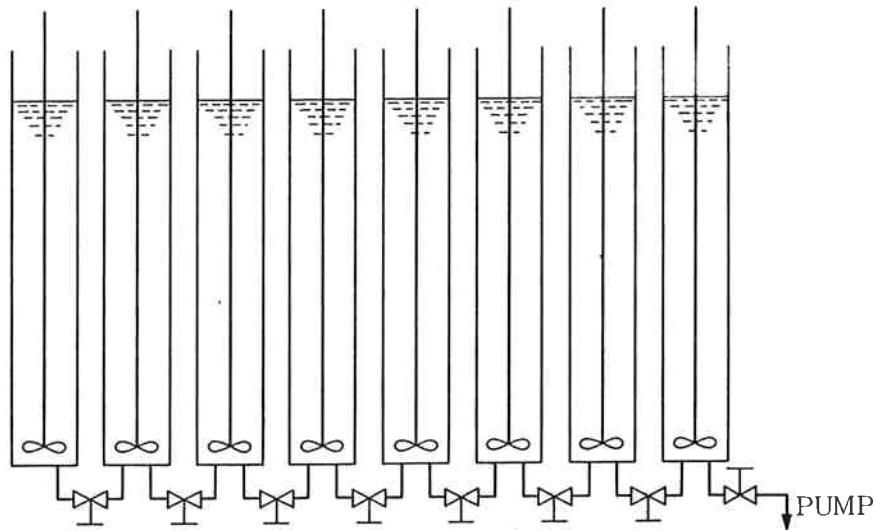


Fig. 2 Principle of gradient device (Multi tubus)

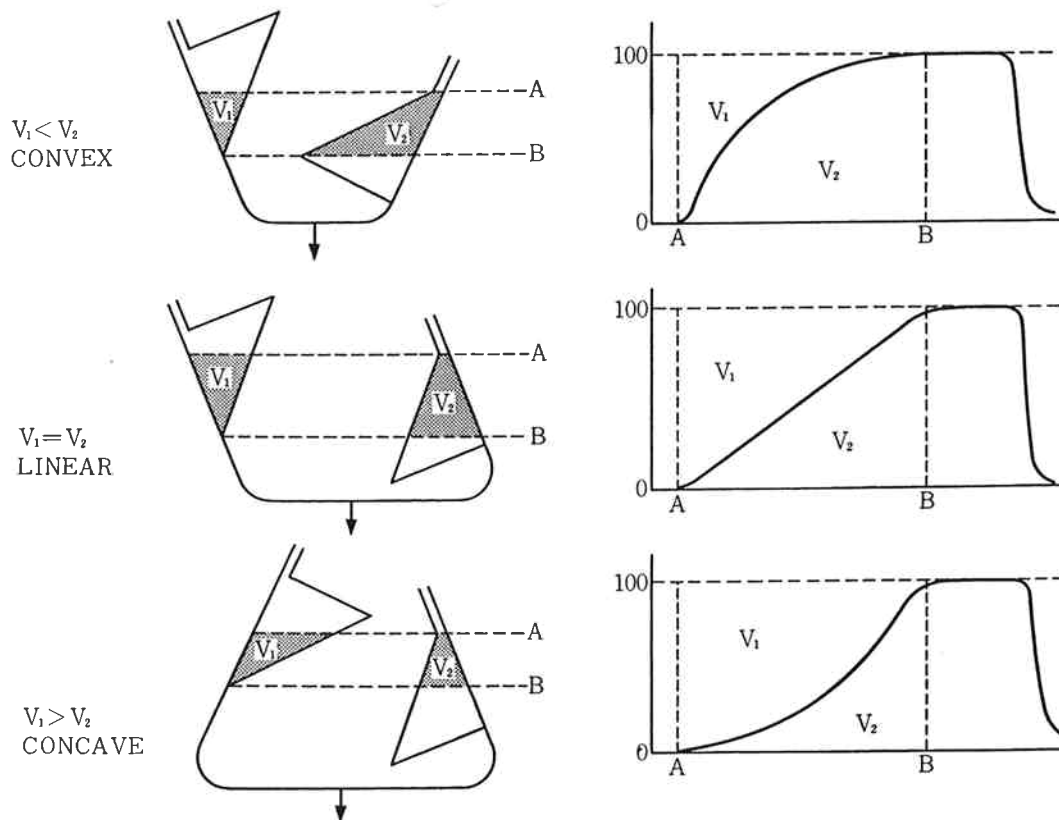


Fig. 3 Principle of gradient device (2 Pumps)

容された液体の水位によって両液の水平断面積の比をプログラムの信号によって変えることにより組成変化を行わしめた例もある⁵⁾。

最近の高速液体クロマトグラフィにおいては、ポンプを用いて2種類の溶液を混合器に送るやり方で、ポンプの吐出流量を変化させることによって濃度勾配を自由にコントロールできるものが通常用いられるが2台のポンプが必要になり装置が高価になる欠点を有する。Fig. 4にその1例を示す。

また、他の方法として混合槽に送る溶液の量を電磁バルブの開閉時間によって制御する方式があり、ポンプがプランジャ型かダイヤフラム型のような場合にはポンプの吸入側でバルブを開閉させればよい⁶⁾が、ガス圧型ポンプの場合はポンプの吐出側でバルブの開閉を行う必要

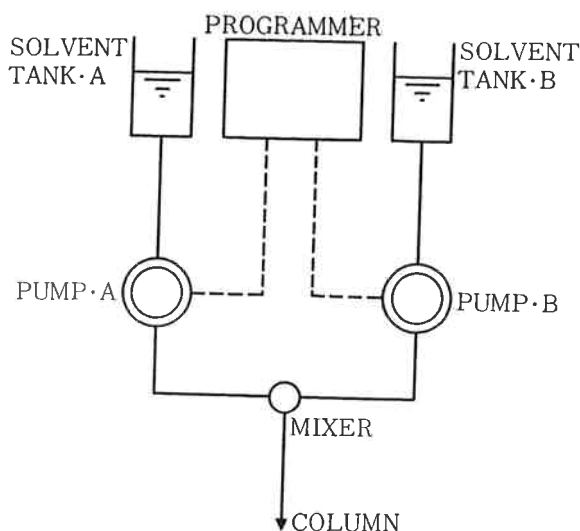


Fig. 4 Principle of gradient device (2 Pumps)

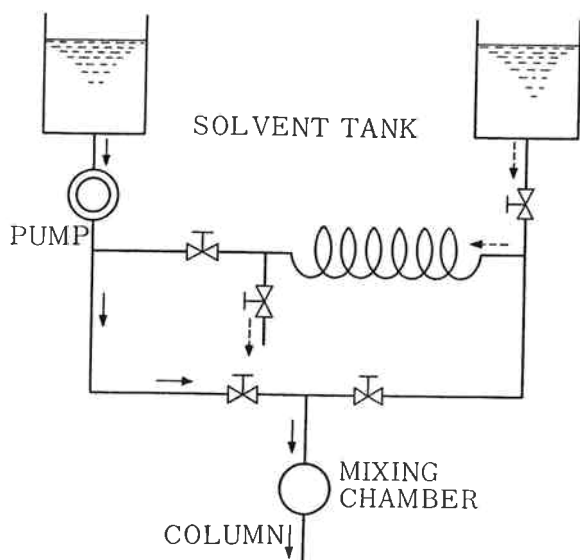


Fig. 5 Principle of gradient device (Holding coil)

があり、Fig. 5に示すように第1の溶液は直接ポンプで送り、第2の溶液はあらかじめ細い管の中にためておきその後方から第1の溶液で押し出すようにすれば1台のポンプで両溶液を交互にバルブ開閉のみで送ることができる⁷⁾。

今回新しく開発した本装置は、バルブ開閉型勾配制御方式であり、主として油圧制御に用いられるノズルとフラップによる制御方式を原理としている。即ち第1および第2の溶液槽に連結されたノズルの出口よりそれぞれの液が流出するとき、その必要とする混合比に応じ、プログラマによって決められた関数と時間比によりフラップを左右に作動させることにより、第1および第2の溶液の流入、流出を制御し異なった2液から一定量の液体を連続的に得るための液体定量混合装置である。

本装置は構造が簡単であり、バルブに比べ耐久性にすぐれ、かつ従来の各種の溶媒組成制御方式に比べ最も安価で再現性にすぐれたものが得られたのでここに報告する。

2. 原理と構造

本装置はノズルフラップ混合器、プログラマ、さらには液面を一定に保つ液面保持容器とから構成されている。

〔1〕ノズルフラップ混合器⁸⁾

油圧の制御に用いられるノズルフラップの原理は、ノズルから吹き出た液がフラップ板に当たるときの流量が、ノズル径とノズルとフラップ間のすきまの積、すなわち断面積に比例し、流入液圧力の $\frac{1}{2}$ 乗に比例することを利用したものである。著者らはこの原理を応用し、ノズルDを左右に設置しフラップ板をバルブの開閉動作と、流入液の流量制御と、2液の混合に役立てることを試みた。

一般にノズルの流量(体積)は次式で示される。

$$Q = \pi D X C_v \sqrt{\frac{2gP}{\gamma}} \dots\dots\dots(1)$$

ここでDはノズル径、Xはフラッパーノズル間のすきま、 C_v は測定液の流量係数で通常の液体では略々0.8~0.6、gは重力加速度、 γ は比重、Pは圧力である。

一般に液体クロマトグラフィの流量は0.5~10 ml/minと小さいため、ノズル径、すきまは十分小さくてよくフラップの駆動は楽である。試作したノズルフラップはノズル径0.4 mm ϕ 、アーマチュア変位160 μ 、フラップ変位200 μ (p-p)、アーマチュア電流30 mAでQ値は通常LCに用いられる溶媒の場合30~70 ml/minで市販のLC装置にはすべて装着が可能である。

内部構造はFig. 6から明らかなように、プログラマ

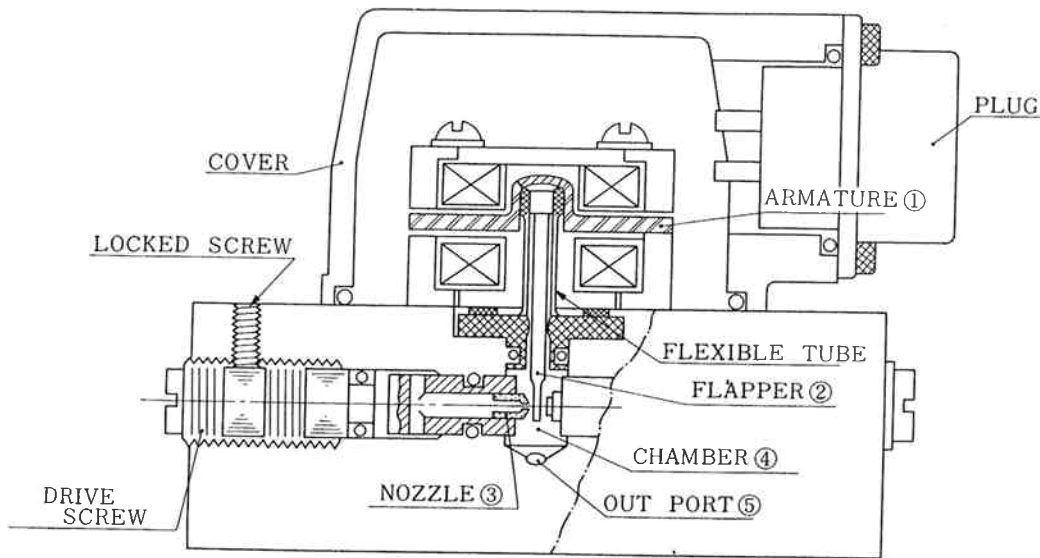


Fig. 6 Nozzle flapper system of gradient device

からの指示により可動するトルクモータとトルクモータに取付けられたフラップ板、フラップ板の左右に設けられた2つのノズル、さらにこれらを混合する液室とによって構成される。

フラップの変位はプログラムの出力信号をトルクモータを介してフラップの変位に変換するがPWM方式を用いてフラップの変位をON, OFF的に動作させ、ON, OFFの時間比を混合比に応じて決めている。左右に設けられたノズルはアマチュア変位のヒステリシスの補正のために左右共1mm移動できる構造とした。

実際の運転に際しては、液面保持容器から出た第1および第2の溶液は左右それぞれのノズルに接続され、約1.5mlの容積をもつ混合室内で一定量の濃度勾配を作成しアウトポートから流出しポンプへ導かれる。従って

ポンプの吸引側で溶媒組成を制御する方式のものなら、市販のLC装置に取付は可能である。

〔2〕 プログラマ⁹⁾

プログラマはトルクモータの変位を駆動する目的に用いるもので、走査時間設定、関数発生、比較、電圧—電流変換の各回路より設ける。走査時間はグラジエント容出の始まりから終わりまでの時間で液体クロマトグラフ側の使用条件、すなわち流速、カラムの種類などによって決まるものである。これらの条件を満たすため、10, 20, 40, 60minの4段階に切換えが可能となるよう設計し、クロック発振器の基準周波数を10min設定のとき300m/secとし、20, 40, 60minのときそれぞれ2T, 4T, 6Tとなるように分周回路を設けた。関数についてもLC装置側の使用条件により、リニア、 X^2 , X^4 ,

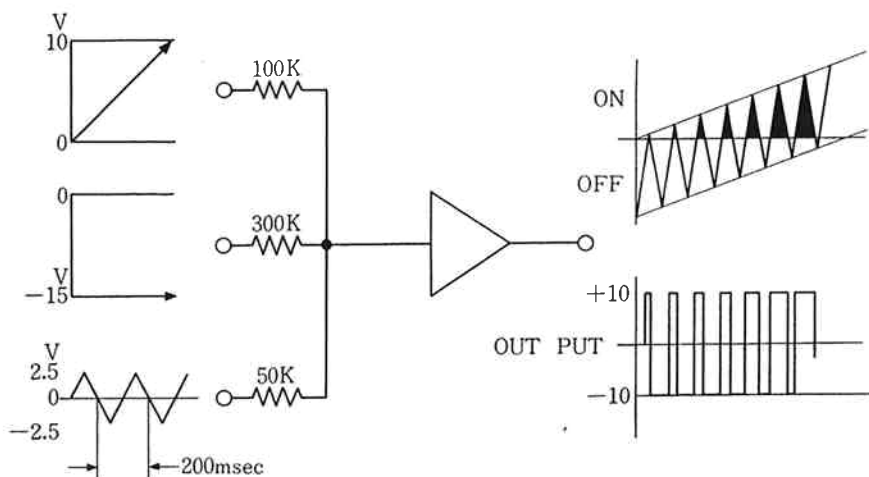


Fig. 7 Principle of comparator response

\sqrt{X} , $\sqrt[3]{X}$ が選択出来るようにした。この回路は200ステップの基準カウンタに比例したアナログ電圧を乗算器4ケを用いて作成した。比較回路はフラップの周期を決めるもので、三角波発生回路と比較回路がある。この部分の動作を Fig. 7 に示す。図で明らかなように基準カウンタに比例したアナログ電圧信号と三角波と一定基準

電圧を加算しこの極性により ON, OFF 出力を発生し、ノズルフラップを駆動させる。

なお測定途中での一定組成でのホールド、クリア回路と、任意の混合比にてクリアするためのレベル回路をも併せて設けた。

全体のブロックダイアグラムを Fig. 8 に示す。

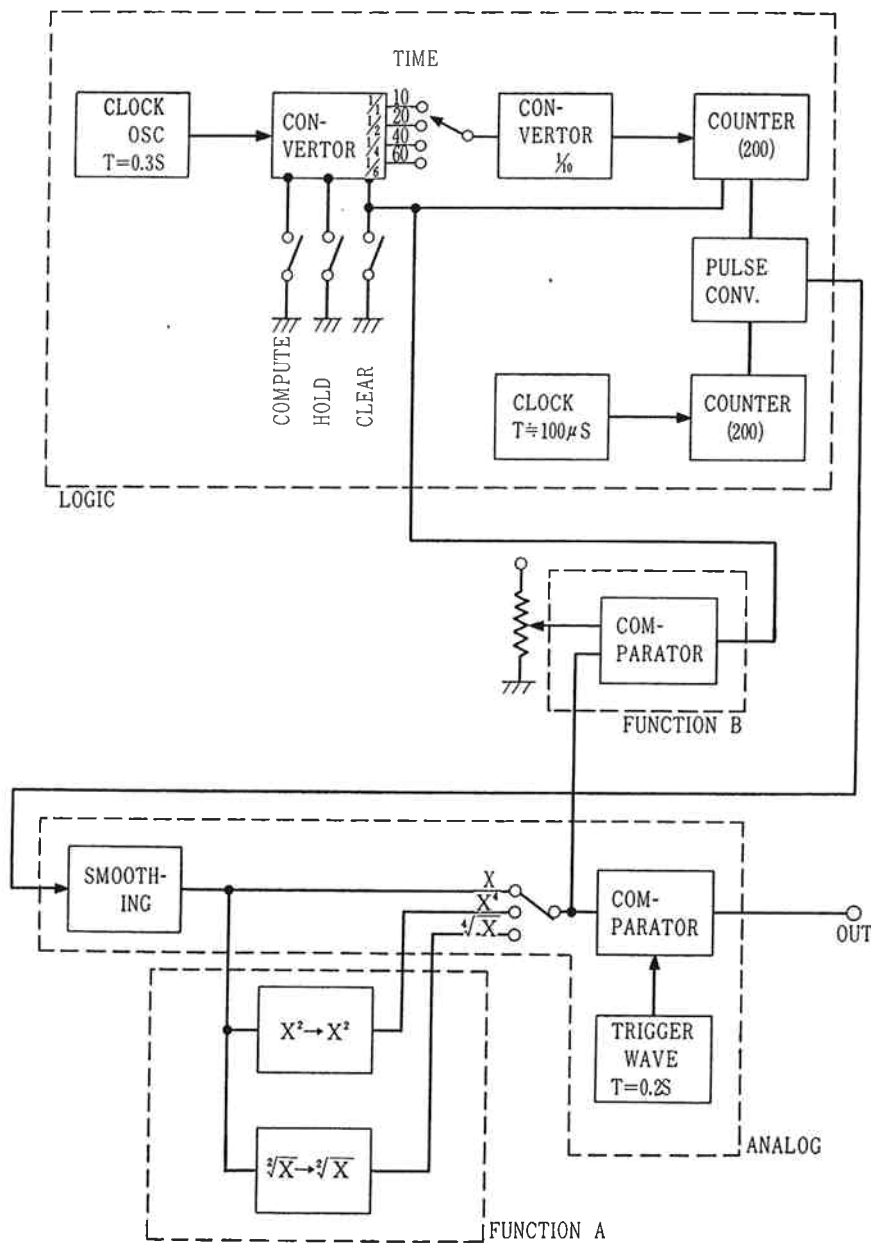


Fig. 8 Circuit

3. 実験と考察

[1] ノズルフラップ混合器

ノズルフラップ混合器において最も重要なことは、アマチュア変位である。アマチュアの電気的特性を Fig. 9

に示す。図より明らかなように入力電流が 30 mA 以下の範囲においては直線性もよく、左右の変位バランスも良いが 30 mA を超えると直線性がくずれるので、定格電流は 30 mA を超えない範囲で使用することが望ましいことが判った。またノズルとフラップ間のシール性に

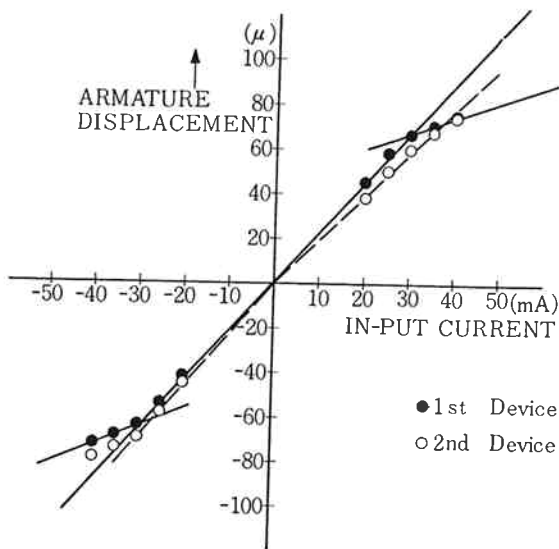


Fig. 9 Armature displacement

については2液の混合範囲が0~5%, 95~100%の付近で大きく影響を受ける。このためポンプによる吸引圧力を0.2kg/cm²と仮定し、ヘッド圧1kg/cm²の時、溶媒に水を用いて合計流量40ml/minのときの片側のシール性を測定した。この場合の洩れ量は0~0.1ml/minであり、シール性は最大0.25%であり、一般のLC装置の流量範囲内においては充分仕様を満足することが判った。

また本器は第1および第2の溶液の混合器をも兼用させているため混合槽内容積が再現性と応答性のうえで重要な要素となるが、加工上1.5mlのものを制作したが0.5~7ml/minの範囲内では性能に大きな支障を与えないことが実験的に証明された。

〔2〕 プログラマ

グラジエント曲線を得るための手段としては

- 1) シンクロナスマータ、ギャクラッチ又は無段変速機とポテンショメータを用いる方法
- 2) 電気回路で実現する方法

とがある。

前者は様々な曲線が自由に得られる利点はあるが機構が複雑であり大型化し高価となる欠点がある。後者は関数曲線を電気的に作るためプログラムの自由度は制限されるが、最近ではIC回路部品が豊富かつ安価に入手できるため、装置が小型化され取扱い易い安価なものが作れる利点があるため、本実験では後者を選んだ。

回路的にはデジタルとアナログ回路を組合わせたものであるが、とくに考慮した点はフラップ周期である。本装置は市販のプランジャ型ポンプに接続されることが多く、ポンプの吐出、吸引の周期とが同期する場合、再現性の低下が考えられる。また混合槽内でのおくれ要素と

プランジャ内での拡散も再現性に影響する。

そこで、三角波発生回路の時定数を変化させ、フラップの周期を100, 200, 500, 1000 m·secの4つについて実験を行ったところ、

- i) 周期を遅くする、すなわちフラップ板の振動回数が少いほど時間軸関数に合致し、ポンプとの干渉が発生する。
 - ii) 実験的に現状の系においては200 m·sec付近が最適である。
- ことが判った。

以上のことを考慮し、実験用に作成した装置の電気的特性のうち関数曲線を Fig. 10 に、応答特性を Fig. 11 に、ステップ特性を Fig. 12 に示す。

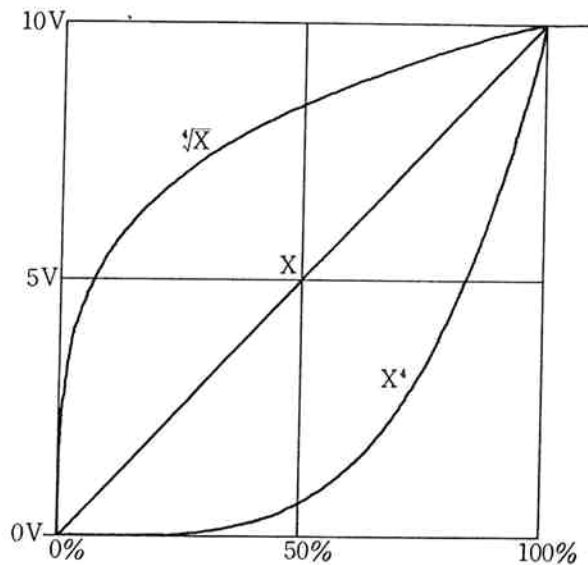


Fig. 10 Gradient function

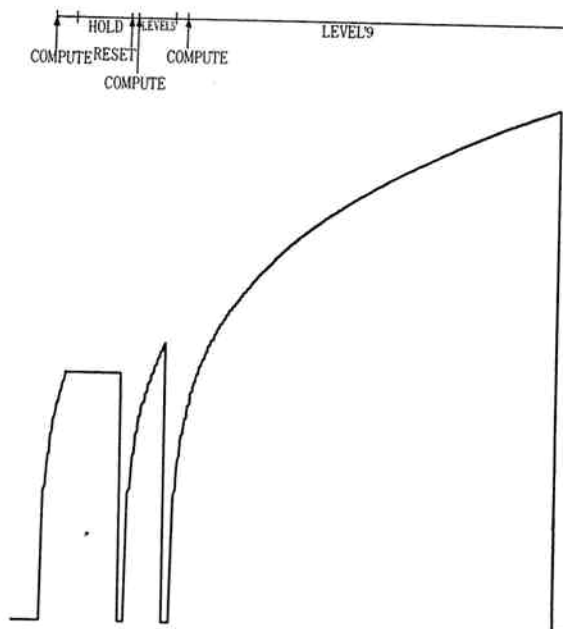


Fig. 11 Electric response

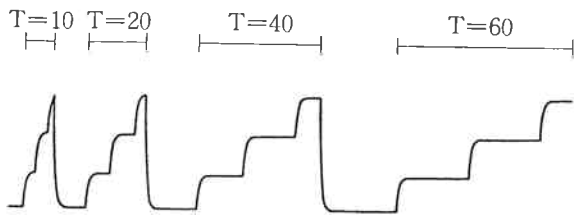


Fig. 12 Electric step response

[3] 液面水位の影響

ノズルへ流入する流量は前式(1)より圧力 P の $\frac{1}{2}$ 乗に比例するため液面水位のヘッド圧差により影響を受けることは明らかである。この影響を調べるため、関数=X、時間設定=10 minにてメタノール溶液にて実験した。この結果を Fig. 13 に示す。図の屈曲点まではヘッド

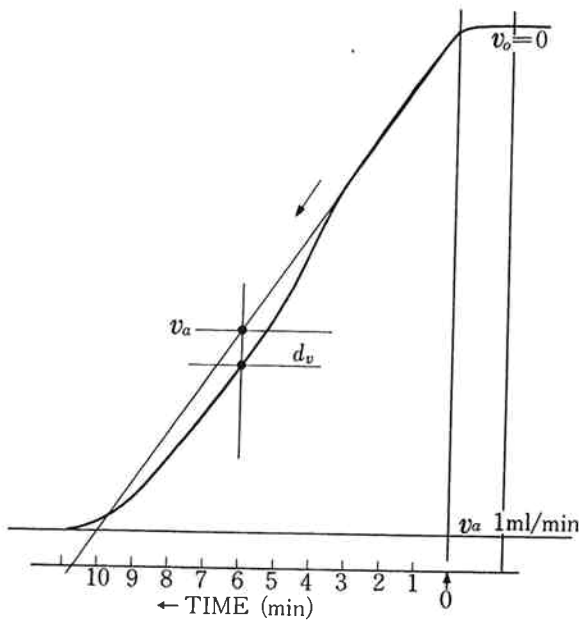


Fig. 13 Effect of head pressure

圧が一定の場合で屈曲点から以降はヘッド圧を変えた状態である。このように曲線が変化する理由は前式(1)との関係の他に、フラップ間隙からもう一方の液だめへの回り込みが考えられる。

例えば、A液槽の液圧を P_a 、B液槽の液圧を P_b とし、各流速を V_a, V_b, V_c とすると、 $P_a=P_b$ のときは

$$V_c = V_a + V_b \quad \dots\dots(2)$$

ここで $P_a > P_b$ とするとA液がB液に逆流するとし、逆流速を dv とすれば

$$V_c = (V_a + dv) + (V_b - dv) \quad \dots\dots(3)$$

このときのA液混合比は

$$\frac{V_a + dv}{V_a + V_b} \quad \dots\dots(4)$$

理想状態では $\frac{V_a}{V_a + V_b}$ であるから

真値関数からのずれ係数は

$$1 + \frac{dv}{V_a} \quad \dots\dots(5)$$

となる。

実験データから読み取った値をそれぞれ代入すると、液面水位10mmの変化は、真値に対し15%程度のズレを生じることが判った。

この結果より液面保持器は必要であることが立証できた。

[4] 流量の影響

プランジャ型ポンプの場合、流量を変化させることはプランジャの往復運動周期が異なるため、フラップ周期との関係において応答性に若干の問題が生じることが考えられる。又ポンプのチェック弁やプランジャ内における混合作用の影響も考えられる。これらの影響について調べたものが Fig. 14 である。

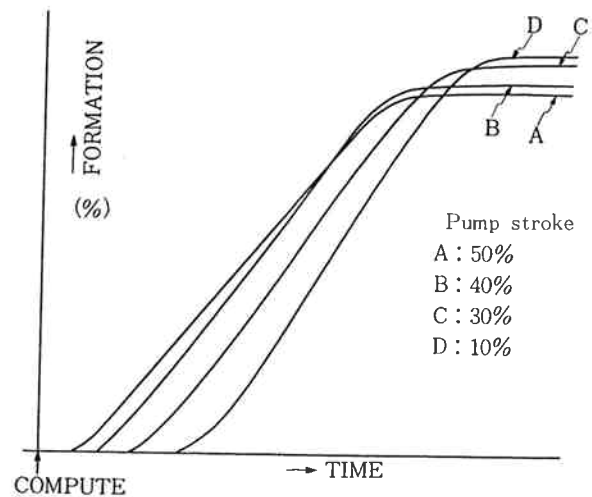


Fig. 14 Effect of flow rate

図より明らかなように流量の増減により初濃度および終端濃度での応答性が若干くずれる傾向がある。また、終濃度が若干異なっているのはUV検出器のフローセル内の乱流効果も影響しており本器のみの作用とは断定で

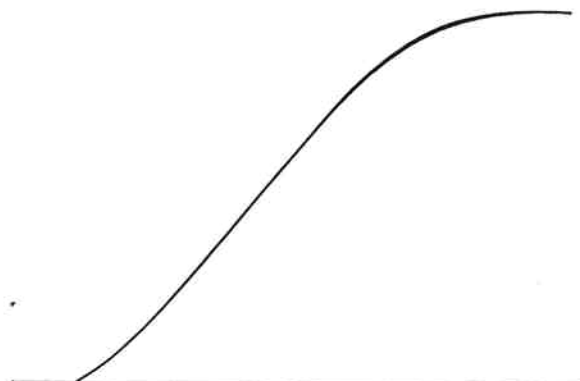


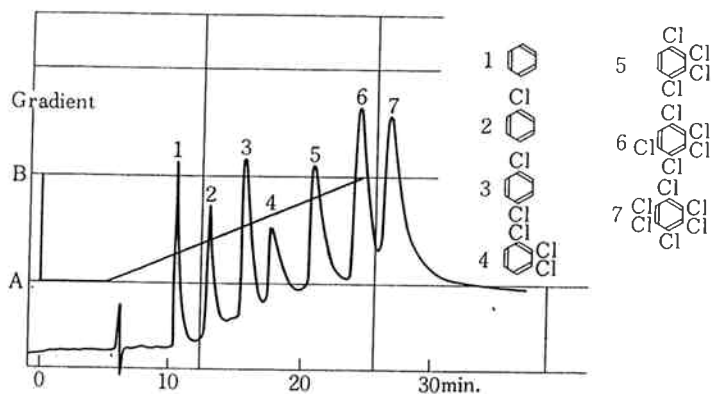
Fig. 15 Curve Precision

きない。

いずれにしても、液体クロマトグラフィにおいては測定中、流量を変えて使用することはなく、現実的には何ら支障はない。

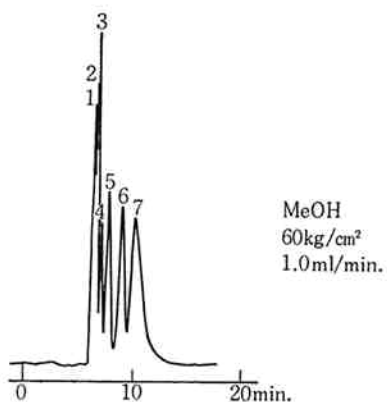
〔5〕 再現性について

液体クロマトグラフィにおいてグラジエント装置の最も重要な性能はくりかえし再現性である。著者らは実際のいろいろな装置に取りつけ、流速および関数を一定に

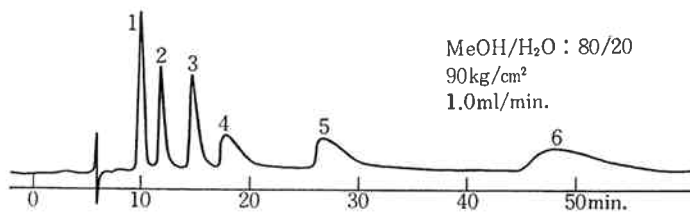


Date 75. 6.30 Column 4 mm, 60 cm
 Sample Chlorobenzenes Mobile Phase A ; MeOH/H₂O : 80/20, B ; MeOH
 Pressure 100 kg/cm²
 Flow Rate 1.0 ml/min.
 Sensitivity 10mV × 0.16
 Inj. Vol. 10 μl Chart Speed 18 cm/hr.

Fig. 16 Chromatogram of Chlorobenzenes



MeOH
 60kg/cm²
 1.0ml/min.



MeOH/H₂O : 80/20
 90kg/cm²
 1.0ml/min.

Date 75. 6.30 Column, 4 mm, 60 cm
 Sample Chlorobenzenes Sensitivity 10mV × 0.16
 Inj. Vol. 10 μl Chart Speed 18 cm/hr.

Fig. 17 Chromatogram of Chlorobenzenes

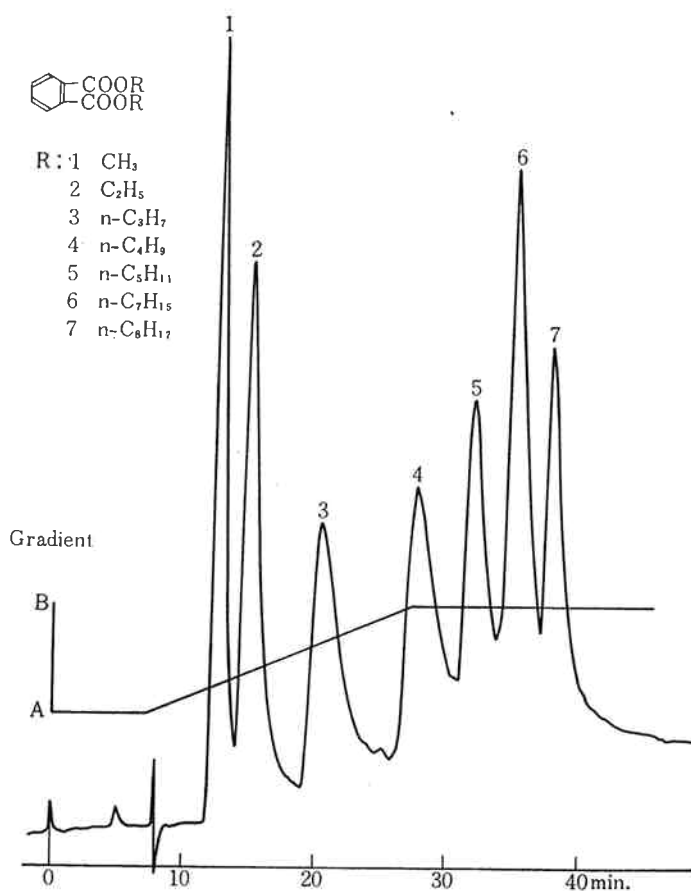
した時のくり返し再現性について調べた。実験に用いた装置は、当社の HLC-802UR, HLC-807 であり、溶媒メタノール、メタノール/アセトン、流速 2 ml/min, 検出器 UV 254 nm, レンジ ×0.32, にて行った。結果を Fig. 15 に示す。

図より明らかなようにくり返し再現性は非常に良好で

あった。

〔6〕 実サンプルの測定例

グラジエント装置を用いることによって分析時間が短縮できることはすでに述べた。Fig. 16 はこの 1 例であり、当社の放射線グラフトシリカゲルを用い Chlorobenzens を測定した例である。グラジエント装置を用い



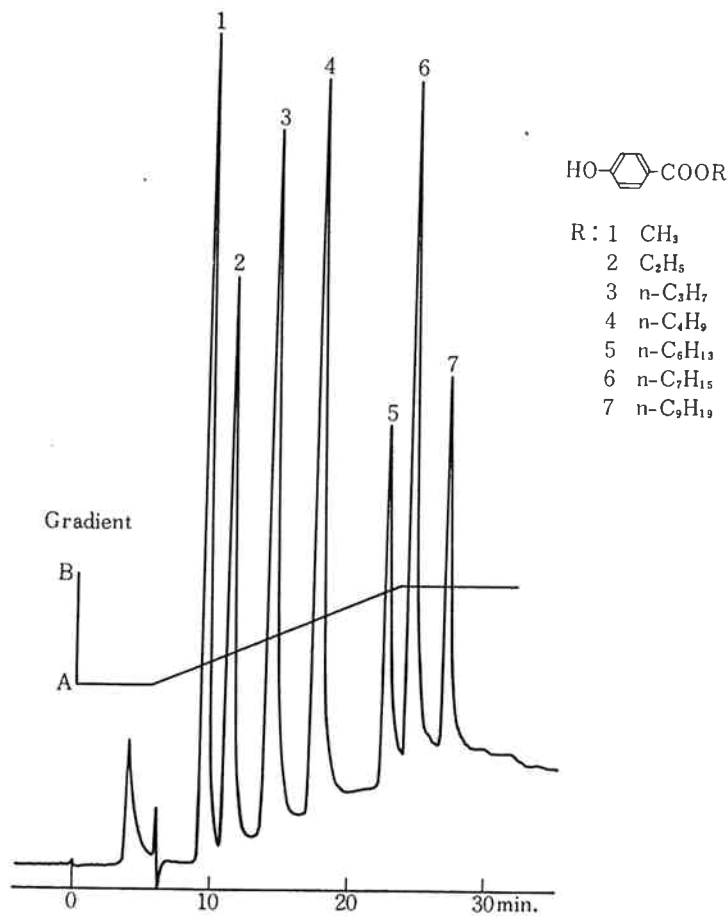
Date	75. 7. 1	Column	4 mm, 60 cm
Sample	p-Hydroxybenzoates	Mobile Phase	A ; MeOH/H ₂ O : 65/35, B ; MeOH
		Pressure	110 kg/cm ²
		Flow Rate	0.9 ml/min.
		Sensitivity	10 mV × 0.16
Inj. Vol.	10 μl	Chart Speed	18 cm/hr.

Fig. 18 Chromatogram of p-Hydroxybenzoates

ない場合の例を Fig. 17 に示す。Fig. 17 では展開液を MeOH のみの場合は分離が不完全であり、MeOH に H₂O を添加した場合、分離は改善させるが分析時間が長くなることが判る。このようにグラジエント装置は分離分析の時間短縮に非常に有用である。Fig. 18 は同じ

カラムを用いて p-Hydroxybenzoates を、Fig. 19 は同じく Phthalates を測定した例である¹⁰⁾。

また、Fig. 20 はカラムに当社の酢酸ビニル系ゲル (LS-140) を用い、DNS-アミノ酸を測定した例である¹¹⁾。



Date	75. 7. 1	Column	4 mm, 60 cm
Sample	Phthalates	Mobile Phase	A ; MeOH/H ₂ O : 80/20, B ; MeOH
		Pressure	100 kg/cm ²
		Flow Rate	0.7 ml/min.
		Sensitivity	10 mV × 0.16
Inj. Vol.	10 μl	Chart Speed	18 cm/hr.

Fig. 19 Chromatogram of Phthalates

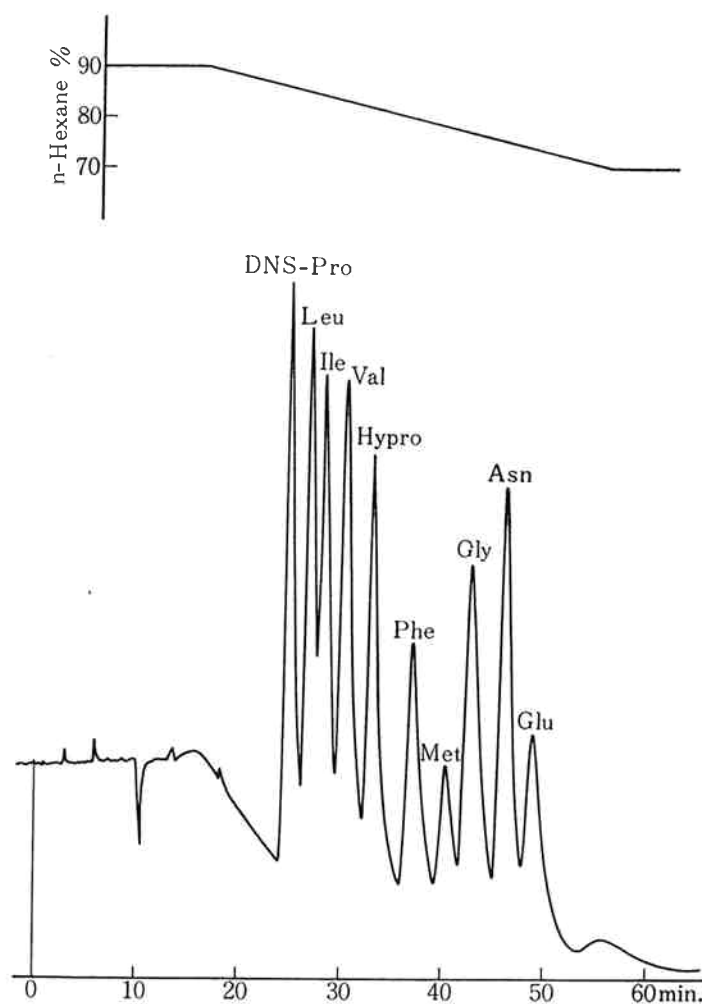


Fig. 20 Chromatogram of Amino Acid derivatives

4. むすび

液体クロマトグラフィ用グラジエント装置はすでにくつか商品化され、その報文も日増しに増加の一途をたどっているが、より安価で手軽に使用できる装置の開発が望まれている。この小論は、新しいグラジエント装置開発途上における基礎的な実験をもとにまとめたものである。

この小論の作成に当たり、データ作成に協力いただいた機器開発室の戸村めぐみ氏、日理工業株式会社の石井端雄氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) T. Reichstein, J. Van Euw; *Helv. chem. Acta*, 21, 1197 (1938).
- 2) Scott R.P.W.; *J. Chromatog. Sci.*, 9, 385 (1971).
- 3) 波多野他; “液体クロマトグラフィとその応用”, 講談社, 63 (1974).
- 4) 波多野他; “高速液体クロマトグラフィ”, 南江堂 15 (1973).
- 5) “日立製作所型録” および “日本国特許 (公開) 50-57959, 50-5057960”.
- 6) “LKB社型録 (Ultra Grad 1300)”.
- 7) “島津製作所型録” および “日本国特許 (公告) 50-19959 (デュポン社)”.
- 8) “日本国特許 (出願) 49-123082 (東洋曹達)”.
- 9) “日本国特許 (出願) 49-142226 (東洋曹達)”.
- 10) 戸村他; “近畿支部液クロ講習会 1975, 5”.
- 11) 中村他; “秋季生化学会, 日本化学会展示 1975, 10”.