

高温型ゲル・パーミエーション・クロマトグラフの開発

馬 場 信 行
竹 島 直 俊*
橋 本 勉

High Temperature Gel Permeation Chromatograph

Nobuyuki BAMBA
Naotoshi TAKESHIMA
Tsutomu HASHIMOTO

A new type high temperature gel permeation chromatograph with a total modular design, the Toyo Soda HLC-811 series, has been developed. With an improved circuitry and highsensitive detector, this model offers a rapid analysis at variable temperature ranging from room temperature up to 150°C and consistently high performance. An important feature of this series is its shorter response time as compared with the previous ones, which would enable users to save the cost for GPC monitoring of process and quality.

The present article is intended to illustrate the major features of the new model, theory of its operation, and some problems of interest encountered during the development research.

1. ま え が き

液体クロマトグラフィの一分野であるゲル・パーミエーション・クロマトグラフ (G・P・C) はとくに新しく開発された技術ではなく、1950年頃には分子ふるいによるゲル濾過法として、カラム充てん剤にデキストリンやゼラチン、寒天などを用い、たん白質、ペプチド、多糖類など生体高分子の分子量測定などに用いられていた。

GPC が公式に発表されたのは1964年であるが、それ以前に J. C. Moore によって口頭で 2 度発表されている。1つは1962年8月 Gordon Conference, 1つは1962年12月 Dallas で催された polymerization Symposium においてである。いずれもカラム充てん剤にポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体ゲルを用い、ポリスチレンの分子量を分別、測定した結果であり非常に反響を呼んだ。が理論的にもかなりうまく分子量分布を測れそうだということで認められた形になった。それは他の方法で得られた結果と良く一致する結果が出たためであり、彼によって名づけられた GPC の今日における発展の糸口でもあった。その後充てん剤であるポリスチレン

ゲルも改良され、プラスチック、ゴム、繊維など合成高分子の分子量測定法として普及し、最近ではさらに適用領域を広めオリゴマ、低分子量領域、高沸点有機物の分離法として使用されている。さらに最近では新水性ゲルで高分離なカラムが市販されるに至り、水系、有機系を問わず、各種試料の分子量分布を容易に、短時間に知ることができるようになった。これは、1970年代前半より大巾に発展した、高速、高圧下で用いることの出来る高分離能充てん剤の開発、そしてそのハードウェアの開発に依るところが大である。

GPC の基本原理を単純に考えると、カラム内に充てんされたゲル粒子は構造的に 3 次元網目構造を有し、この中に細孔 (pore) があり、試料高分子のふるい分け作用を利用する、すなわち、溶質分子の大きいものは小さなものより早く溶出し、溶出分子の移動速度はその分子の大きさに依存することになる。

GPC は、カラム分別法、光散乱法による沈澱濁度測定法、超遠心分離法のようにきわめて長い測定時間と高度の技術、さらに複雑な計算を一切必要とせず、再現性よいデータから、試料高分子の分子量分布あるいは大き

* 旭計器工業株式会社北九州工場

さの分布に関する情報が確実に得られる点で将来性ある測定手段と言えよう。

以上に鑑み、東洋曹達では1974年6月より GPC 専用機として高速液体クロマトグラフ HLC-801 を発売、逐次改良を施し HLC-801A, HLC-802 など常に GPC 分野の最先端をいく装置を提供し、多くの分析化学者に用いられている。しかしながら現在市販されている GPC 装置は高速ではあるが高温では用いられないという問題があった。今回新しく開発した高温 GPC システムは室温から高温まで幅広く使用できる装置である。

本報告は、主として装置の構成、原理を中心に、我々が HLC-811 を開発する途上得た経験をも含めて報告したいと考える。

2. 高温GPC (HLC-811形) 装置とその動作原理の概要

GPC 装置の主要部分は、ソルベントタンク、レベルゲージ、脱ガス器、定流量ポンプ、脈動防止器、フィルタなどからなる送液系、複数のカラムを収納し、かつ試料注入部を内蔵したオープン槽、オープン槽に熱風を吹き出す熱風発生機、カラムによって分離された試料高分子の成分濃度を溶媒との屈折率差として検出する示差屈折計、溶出量を報知するため溶出曲線上に一定溶出量ごとにパルス信号を送りだすマーカ系、オープンや屈折計を始め各部の温度を一定に保持するための温調器、検出器やマーカ、操作部などの電気系の各系である。

HLC-811 ではとくに装置の立上時間を短縮するためにカラム槽と熱風発生機とを独立させ PRE, MAIN ヒータによる制御を行なう。熱容量の大きなバルブボックスを廃止しオープン槽内に格納する、溶媒交換の早い脈動防止器の採用などを行ない、かつ安全性、信頼性の向上のため温調器はすべて2重安全形の採用、送液ラインの密閉とドレン部の集中化、送液流路のオーバプレッシャ対策も十分考慮し設計した。さらに実際測定される試料のうち特に分子量が大きく、かつ分布の広い試料による流路系でのつまりやカラム内での圧力変化に影響されず常に信頼性あるデータが得られる様、温度分布の均一化、接続配管の短縮化、レファレンス、サンプル両流路が完全に独立した2ポンプシステムによる送液流路を設けた。

Fig. 1 は東洋曹達、高温 GPC 装置 HLC-811 外観写真であり、Fig. 2 に構成概要を示す。

[1] 送液系

送液系の主要部分は、溶媒タンク、レベルゲージ、脱気装置、ラインフィルタ、定量小形ポンプ、アキュムレ

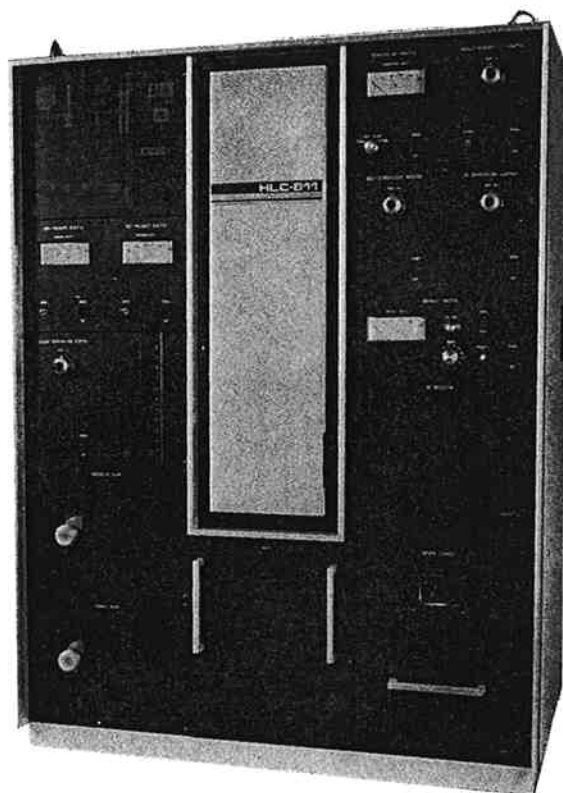


Fig. 1 General view of TSK Gel permeation chromatograph HLC-811

ータ、圧力センサなどで構成される。これらは耐蝕性を考慮し SUS 316 を使用した。

(1) 溶媒タンク

装置を運転するのに必要な溶媒約 7ℓ が収容できる。通常の測定条件では 4~5 日分の量に相当する。材質は SUS 316 の絞り加工品とし耐蝕性を向上させ、タンク内は必要に応じて N₂ パージも可能なようにした。

(2) レベルゲージ

溶媒タンク中の溶媒量を示すガラス管で脱ガス器より直接上方に出ており、外部よりレベルが見えるようになっている。

(3) 脱気装置

溶媒に溶解しているガスを昇温により除去するためのものでガラス槽を直接加熱する方式をとっている。脱気温度を正確に知るため液中に直接 pt 感熱体を取付けた。通常は測定温度より 20~30°C 高く設定する。

(4) ラインフィルタ

ポンプの吸入側に設けた SUS 316 焼結フィルタでメッシュは 100μ である。ここでは溶媒中のゴミを汙過し、ポンプのチェック弁内でのつまりを防止している。

(5) 定量小形ポンプ

高速 GPC に用いられるポンプは高分離能なカラム充

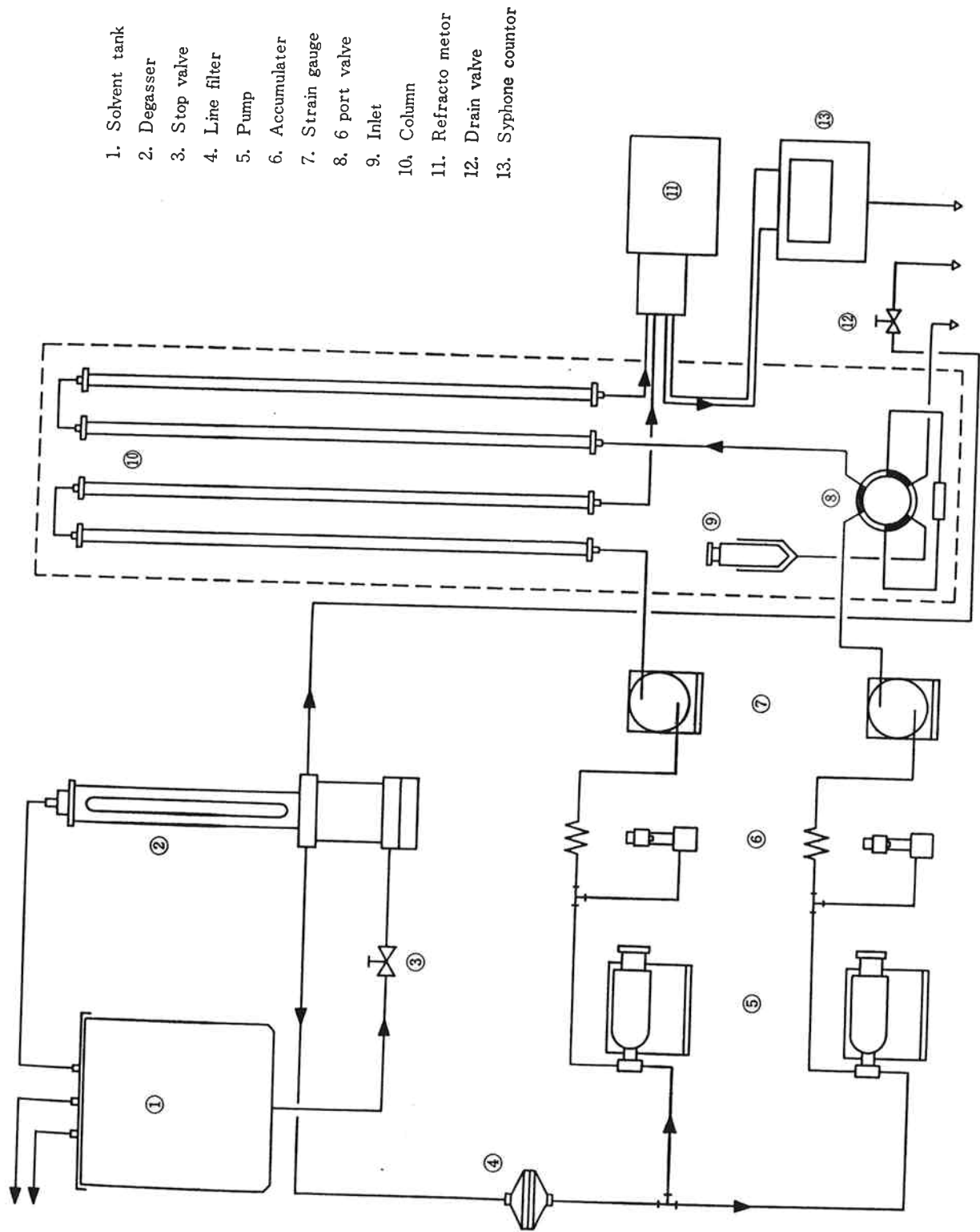


Fig. 2 Schematic diagram of flow system

てん剤の性能をフルに発揮させて定量性、再現性良いデータを得るための心臓部であり、検出器と合わせて最も重要な部分である。ポンプには定圧形と定量形とがあるが試料注入時のカラム内圧変化の影響を受けずに定量性あるデータを得るためには定量形ポンプが望ましい。しかし従来この種の装置に用いられているような1ポンプシステムでは定量形ポンプと言えども定量性あるデータは得られないため本装置の場合は単動プランジヤ往復形定量ポンプを2台使用し、レファレンス、サンプル各流路系を独立させるシステムを採用した。

単動プランジヤ往復ポンプは、プランジヤ軸と直角な軸のまわりに回転する偏心カムでプランジヤ末端のフォローディスクを押して吐出ストロークを行ない、スプリングで吸入ストロークを行なう方式である。流量調整は、ディスクの帰りを制限することによって行なう。通常GPCで使用する流量は1.0~1.5 ml/minである。Fig. 3に接液部の構造を、Fig. 4に定量ポンプの構成を示す。

定量ポンプに要求されることは、吐出精度と耐久性である。耐久性については有機溶媒を長時間送液する面から弁、弁座、シール材など接液部の材質を考慮する必要がある。吐出精度はデータの再現性、分子量の計算に重要な意味をもち、少くとも0.3%以下の精度が要求される。定量ポンプを精度よく用いるには、まずその据付配管において、ポンプの吸入行程で液注分離を発生させないために必要な圧力 NPSH (Net positive Suction Head) を考慮する必要がある。本装置の場合、溶媒に T. C. B を用いたとき NPSH avail 15.6 NPSH req 0.1 で十分満足すべきものとなっている。一方定量性について考える時、その体積効率 η に影響する因子を考慮する必要がある。 η はつぎのように定義される

$$\eta = 1 - \frac{Q_I}{Q_0}$$

Q_0 : 理論排水量 m^3/s

Q_I : 漏れ、逆流などによる減量 m^3/s

Q_0 はプランジヤの毎分往復数を n とすると

$$Q_0 = \frac{Vn}{60}, V = \sum AL$$

A : プランジヤ面積

L : ストローク

\sum : 送り出しを行なっているすべての作動面についての和

Q_I は1つはプランジヤシールやチェック弁からの洩れがある。この洩れ量を少なくするためにはプランジヤシールを工夫し、ボール弁の真球度を重視する必要がある。我々は TAYLOR HOBSON の装置を用い真球度

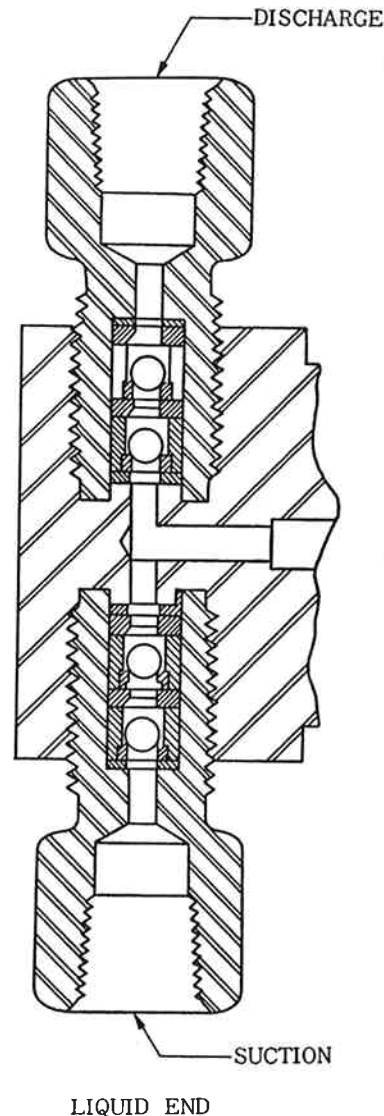


Fig. 3 Liquid part of controlled volume mini pump

を測定し 0.14μ なる平均値を得たが、これは国産他メーカーの平均が 0.2μ に対し良い結果であった。Fig. 5にその一測定例を示す。

Q_I に影響する第2の因子は弁の閉じ遅れによる液の逆流である。吐出終りに瞬間的にボール弁が着座しないと液は逆流し容積効率は低下する。弁の閉じ遅れはプランジヤの往復回数に比例し、また、粘性、比重の大きい液では着座遅れが大きくなる。Fig. 6には吐出容積比に対する吐出圧上昇の時間おくれを調べた結果を示す。

吐出精度は Q_I が液の粘性比重の関数であることより周囲温度の変化にも影響を受け、さらにはプランジヤの往復回数に比例することよりポンプ駆動モータの回転数を常に一定に保つことも必要である。本装置に内蔵された状態での吐出流量精度をクロマトピークの保持時間の

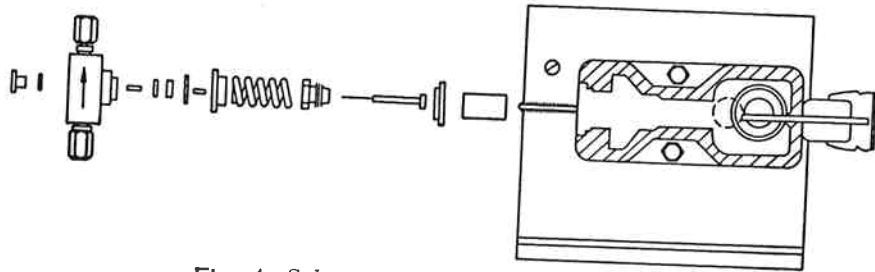


Fig. 4 Schematic diagram of mini pump

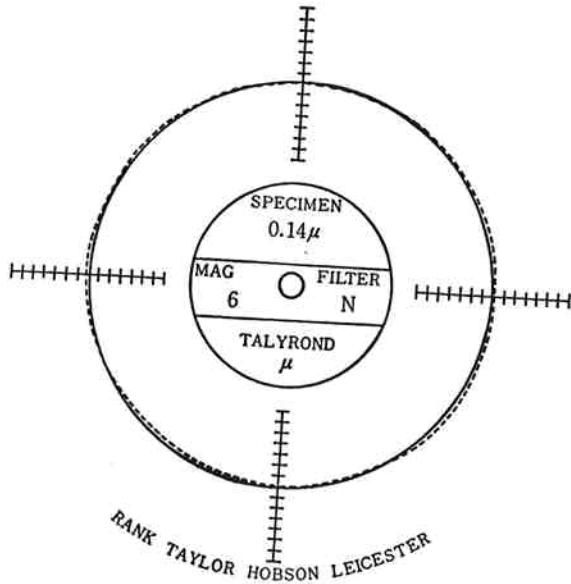


Fig. 5 Result of check ball

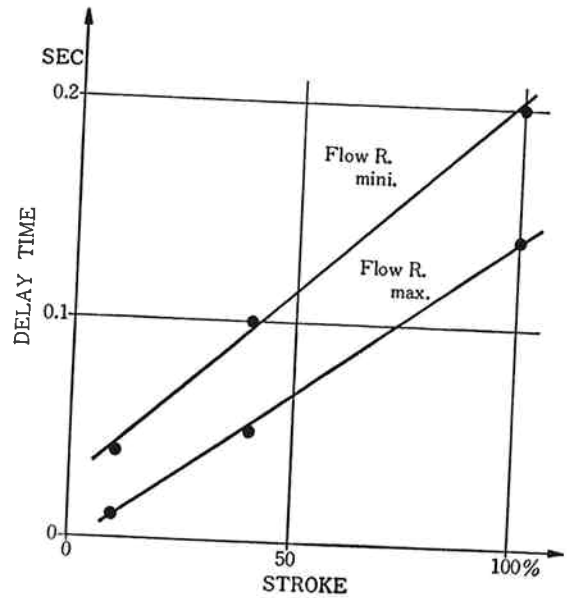


Fig. 6 Flow volume rate vs delay time

変化として調べた結果は平均偏差0.11%なる値を得た。とくに高温 GPC の場合は流量変動のセルへの影響が非常に敏感であるから、以上のべたような諸点については細心の注意を払う必要がある。

なお Fig. 7 に本装置の特長である 2 ポンプシステム

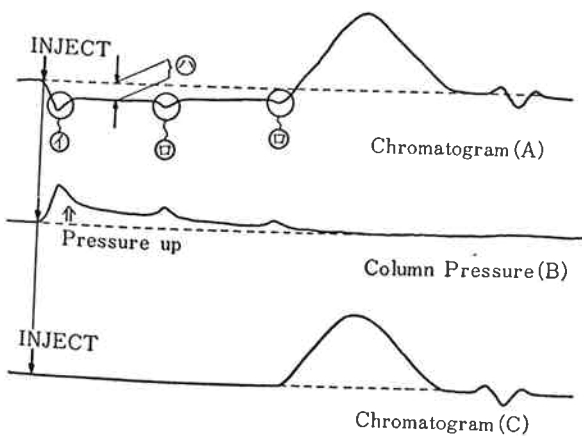


Fig. 7 Chromatogram of polyethylene

を 1 ポンプシステムと比較した場合のクロマトチャートを示す。

(6) アクムレータ

使用ポンプがプランジャ往復運動であるため必然的に脈動を生じる。この脈動を吸収し、サンプルバンプの開閉によるサージ圧を吸収し平滑な送液を得るためにアクムレータを用いる。高温 GPC に用いるアクムレータとしては、脈動吸収、サージ吸収といったことその他に、高耐圧、溶媒交換が容易、さらにはデッドボリュームが小さいことが要求される。アクムレータにはブルドン管形、スプリング形、ペロー形、水銀形などがあるが、試料注入時のカラム内圧変化にすばやく対応するためにはデッドボリュームの小さなものが要求される。

HLC-811 に用いているアクムレータはブルドン管形で効果を上げるため細管による抵抗体との組合せで用いている。Fig. 8 はアクムレータによる脈動除去の様子を示したもので(1)がアクムレータのない場合、(2)がブルドン管のみで構成した場合、(3)が本装置に用いているブルドン管と抵抗体の組合せによる場合の結果を示し

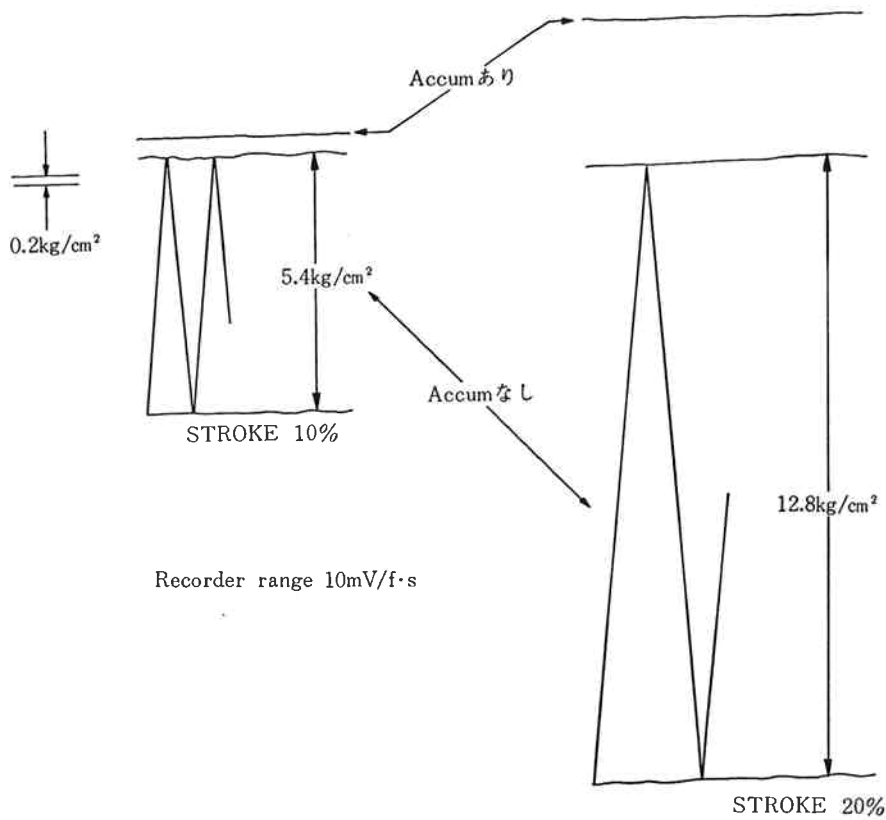


Fig. 8 Operation of accumulator

た。

(7) 圧力モニタ

レファレンス流路, サンプル流路それぞれの液圧を示し, かつ不測時の液圧上昇時に安全弁の代わりにする保護回路を有する圧力モニタがあり, それぞれのポンプと連動している。圧力モニタとしては従来ブルドン管式のゲージが用いられているがブルドン管内部の液交換がやりにくい, ポンプの性能あるいはアキュムレータの性能をゲージから読み取ることは難しいなどの点を考慮し, 本装置の場合は半導体ひずみゲージを用いた。

応力やひずみを測定するには, 従来抵抗線ひずみゲージがよく使われる。これは外力を受けて線が伸縮し, 断面積が変化することによる電気抵抗の変化を利用する。これに対し半導体ひずみゲージは, 形状変化による抵抗の変化は小さく, 外力を受けるとそれに応じて結晶そのものの固有抵抗が変わる現象——これをピエゾ抵抗効果と言う——を原理にしている。Ge, Si などの半導体の単結晶はピエゾ抵抗効果が大きいので, これらを素材にした半導体ひずみゲージは小さな外力を受けた場合でも大きな出力が得られる。HLC-811 に用いられているものはシリコンの単結晶にインジウムやホウ素など 3 価の元素をごく微量混入した P 形で, 標準抵抗値 120Ω のも

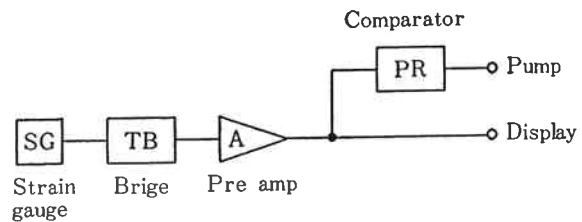


Fig. 9 Schematic diagram of pressure monitor

のを使用し, 温度補償回路, 計測アンプ, ポンプ保護回路を組合せ, アナログにて表示している。

Fig. 9 に回路の概要を示す。

[2] オープン系

オープン系は熱風発生機, カラム槽, 試料注入部を有する。オープン系は温調器により一定の操作温度に維持される。

(1) 熱風発生機

カラム槽内の温度分布の均一化, 槽内温度の立上がり特性の改善, さらにはカラムエンドや配管からの洩れによる溶媒が直接加熱源に触れることを防ぐため HLC-811 ではカラム槽と熱源とを分離する方式を採用した。熱風発生機は熱源に効率のよいコイルフィンヒータ容量 200 w のものを 8 本用い, 内 6 本を MAIN ヒータと

し、残り2本が予熱用 PRE ヒータとして用いている。MAIN と PRE ヒータの制御は温調器内のコンパレータにより行なっている。熱風発生機の構成を Fig. 10 に示す。

(2) カラム槽

カラム槽内には $\frac{3}{8}$ インチ、長さ 2 フィートのカラム

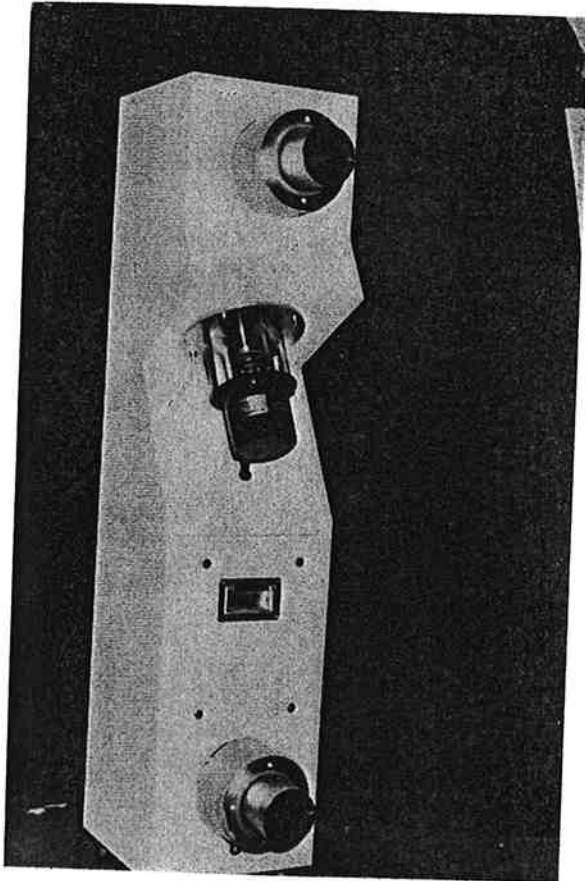


Fig. 10 Heating box

6本とプレカラム2本が収納される。槽内の温調精度は、ヒータ温度 t と槽内空気温度 t_a の差を出来るだけ小さくする必要がある。この差 $(t-t_a)$ は、平衡状態における熱入力 H に比例し、気流速度の乗乗に逆比例するため、空気循環機構による摩擦、じょう乱などに対し充分大きな気流速度を得る必要がある。HLC-811 カラム槽の温度を 135°C に設定した場合の立上時間を Fig. 11 に示す。安定後の槽内温度分布はカラムの上端と下端間で 1°C 以内であり、精度は 0.1°C 以内であった。

(3) 試料注入部

試料注入部は試料注入孔 (Sample inlet) とサンプルバルブ、サンプルループとから成る。これらはすべてカラム槽内に収納されカラムと同一温度に保持される。

試料容液をサンプルループ (通常は容量 2 ml) に詰めるには注射筒を用い注入孔より注入する。サンプルバルブは6方バルブで VALCO 社の高温用を用いている。このバルブは 200°C において 1000 psi の耐圧があり本装置の仕様を満足している。

Fig. 12 に試料注入部を示す。

[3] サイフォン系

ガラスサイフォン、光源、検出器とアンプ回路より成

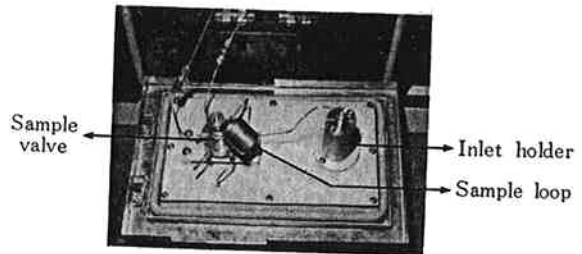


Fig. 12 Sample injection part

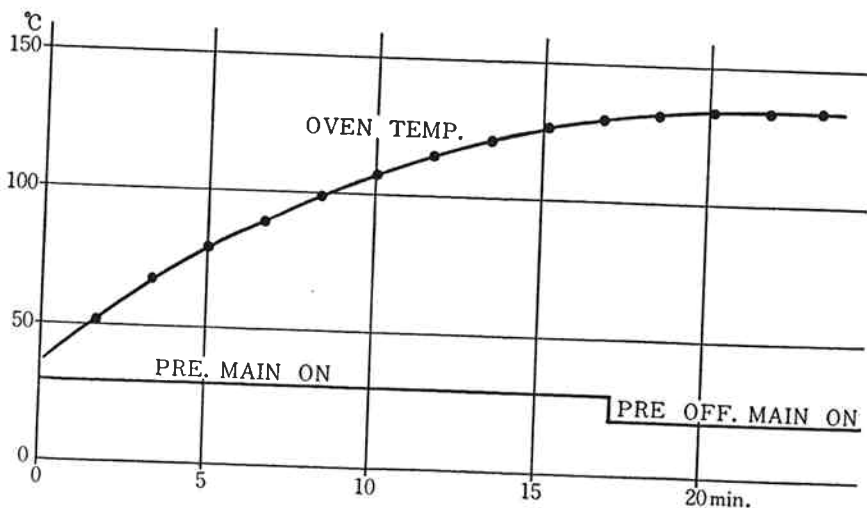


Fig. 11 Temp. up curve of oven

る。屈折計を出たサンプル流路の溶液はガラスサイフォンに流下する。2 ml たまるとサイフォン効果により液は流れ出しサイフォンは空になる。流れ落ちる液は光源からの光を横切り、光束は収束しフォトセルにより検知される。この信号を増巾し 2 ml 毎に記録計にマーク信号を記入している。サイフォン系も操作温度に昇温できる様、ヒータが格納されている。サイフォン周辺の温度はかなり上昇するため、光源と検出器は別の位置に設置され、それぞれオプティカルファイバによってサイフォンガラスの流下部に導かれている。

Fig. 13 にサイフォン系を、Fig. 14 に概略構成を示す。

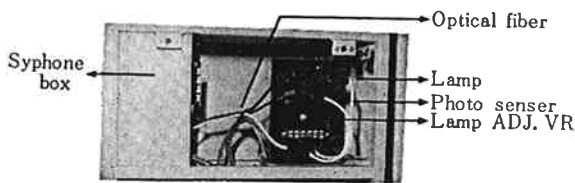


Fig. 13 Syphone system

[4] 示差屈折計 (Differential Refractometer)

屈折とは1つの物質から他の物質へ光束が通る時、光束が曲る効果を言う。屈折計はこの効果を測定し、屈折率は、沸点、氷点、密度などと同じように各物質の物理的な基本定数である。屈折計には、ある屈折率 n_1 の物質からある屈折率 n_2 の物質に光束が入射角 i で入射し屈折角 r で屈折するとき $\sin i \cdot n_1 = \sin r \cdot n_2$ の関係が成立する。これを Snell の法則と呼び、この原理を利用した偏光形屈折計と、反射率 $R = \frac{\tan^2(i-r)}{\tan^2(i+r)}$ で示される Fresnel の反射式を利用したフレネル形屈折計とに大別される。HLC-811 に用いた装置はフレネルの振巾

反射の法則による光学原理を用いたもので、溶媒がフローセルに注入されると、プリズムと溶媒によって平面状の界面が形成され、その界面に平行光線を照射するとプリズムの屈折率と溶媒の屈折率の関係によって定まる反射率で平行光線の一部がフォトセンサに入る構造になっている。ここで溶媒の屈折率が異なれば反射率も変化するので屈折率の変化が検知できる。示差屈折計とは上記の原理を利用し、フローセルを平行に2つ形成しその差を求めるようにしたものである。

示差法がすぐれている点は、レファレンスとサンプルの信号の差をとることによって、光源のフラツキや溶媒の温度変化などをキャンセルすることが可能であり、より微小な屈折率変化まで測定が可能である。

理想溶液の場合、溶液の屈折率 n_{sol} は

$$n_{sol} = c_1 n_1 + c_2 n_2$$

但し c_1, c_2 : 溶媒, 溶質のモルパーセント,

n_1, n_2 : 溶媒, 溶質の屈折率,

また Gladstone-Dale によると、溶液の屈折率の濃度依存は $\frac{\partial n}{\partial c} = R_2 - \frac{\rho_1}{\rho_2} R_1$ で示される。

c : 溶液濃度 g/cc

$$R_1 = (n_1 - 1) / \rho_1, R_2 = (n_2 - 1) / \rho_2$$

ρ : 密度 n : 屈折率

$\partial n / \partial c$ の値は溶媒および溶質高分子の組み合わせに応じ温度が定まれば一定の値をもつ。すなわち溶液の屈折率はその濃度に直線的に比例し、これはまたカラムより分離された試料高分子の $M_i \cdot N_i$ に比例するとみられる。

M_i : 成分高分子の分子量

N_i : その成分の個数

示差屈折計は溶媒と分離された成分高分子を含む溶液との屈折率の差から、成分濃度ひいては相対的含有量を知ろうとするものである。

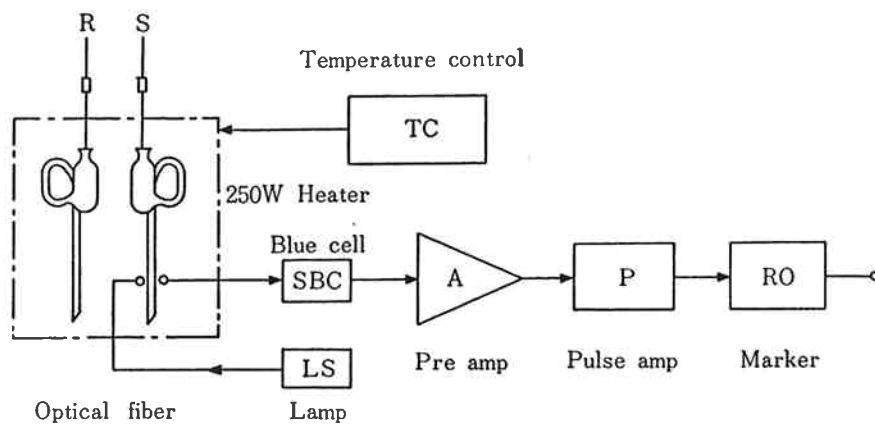


Fig. 14 Schematic diagram of syphone monitor

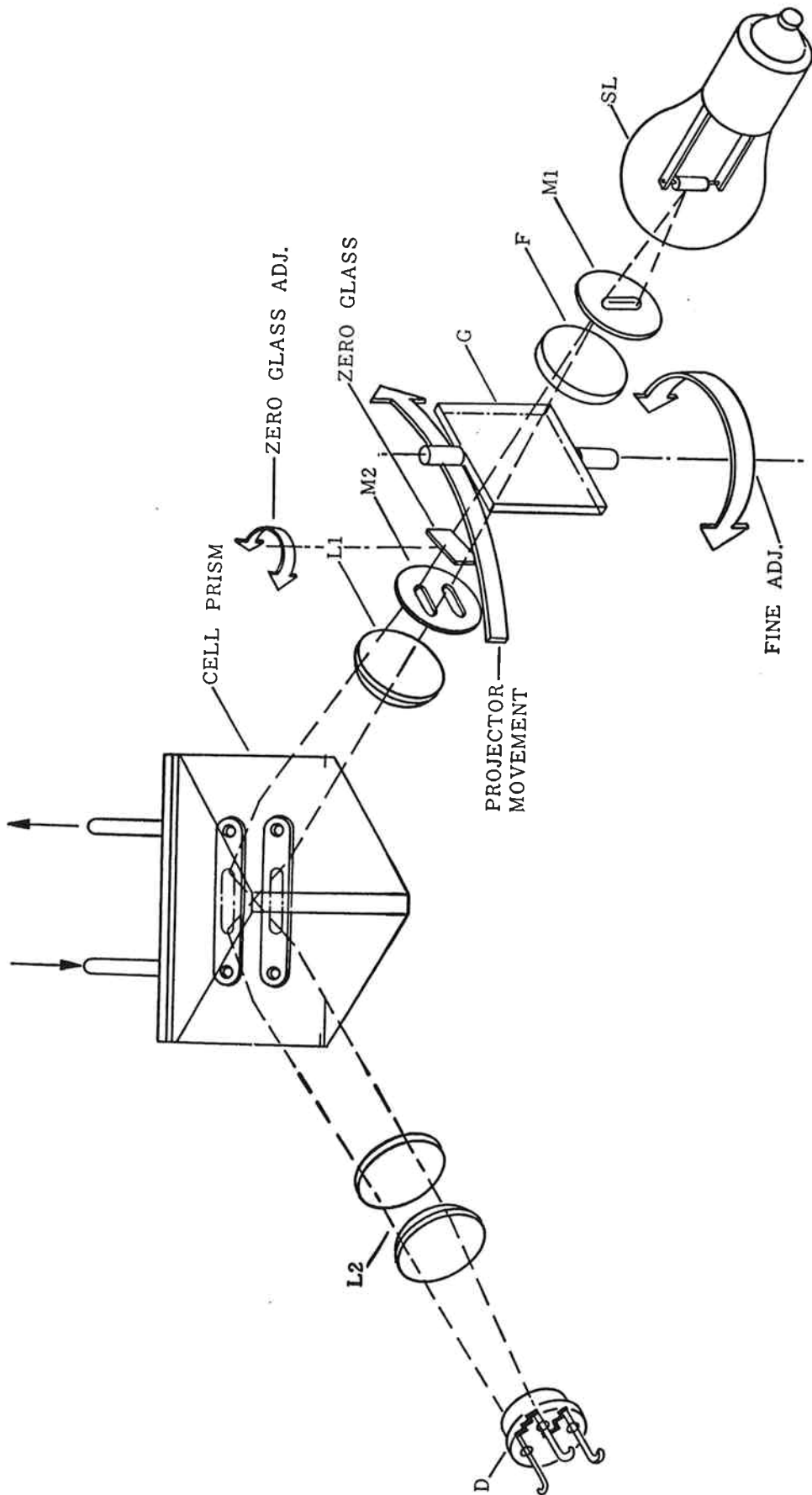


Fig. 15 Schematic diagram of optical system

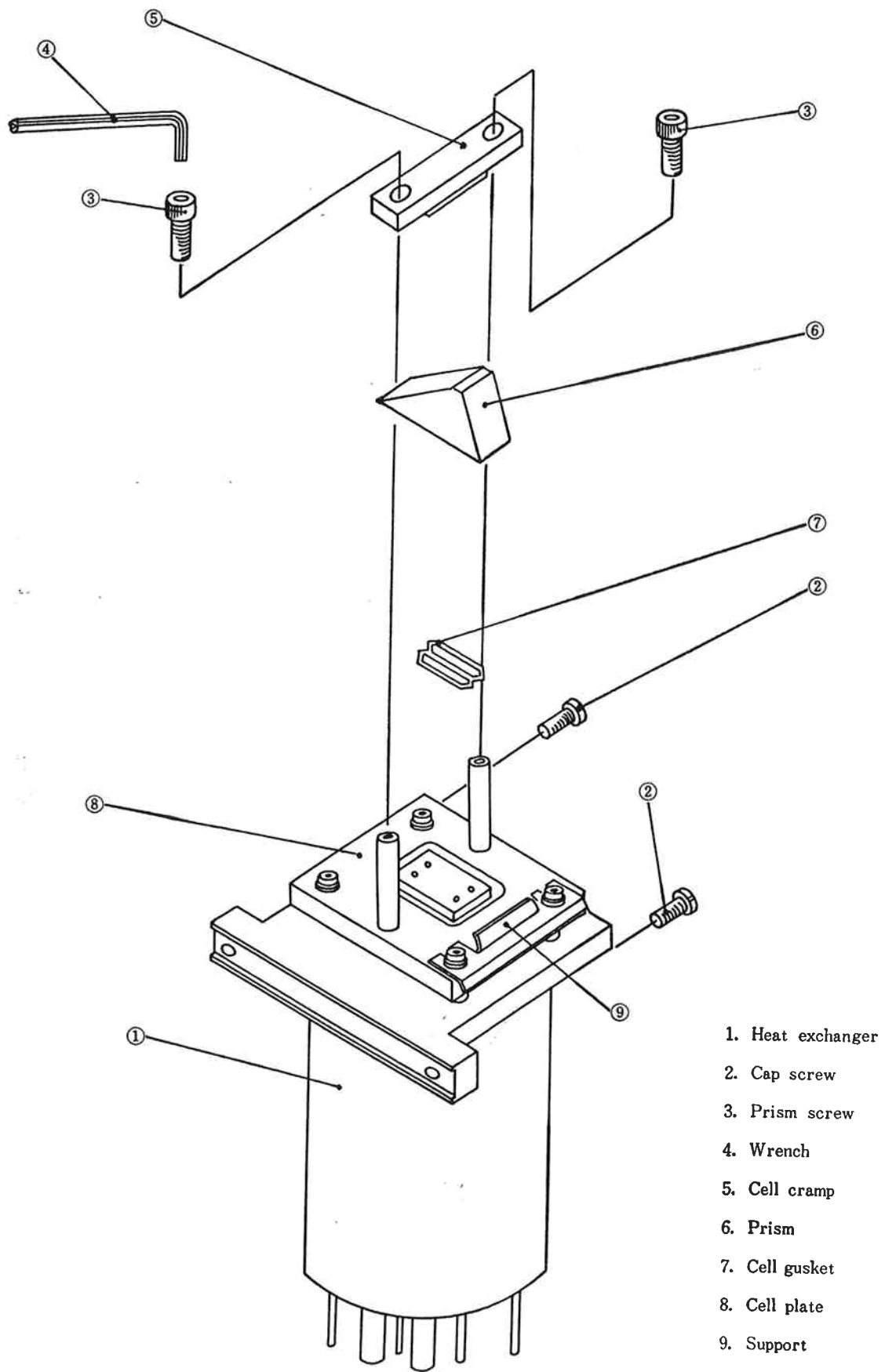


Fig. 16 Schematic diagram of flow cell

Fig. 15 に光学系を Fig. 16 にフローセル部の概要を示す。

光源ランプ (SL) から出る光はソースマスク (M₁) 赤外線遮蔽フィルタ (F), 微調整ガラス (G), ゼロ調ガラス (Z), 開口マスク (M₂) の順に通過し, レンズ (L₂) により照準される。マスク (M₂) によって形成された 2 本の平行光線は, セルプリズムに入り, Fig. 15 の様に液面のガラス上に照射される。サンプルとレファレンスのチェンバは, セルプリズムとステンレスの, プレートで締めつけられている薄いテフロンガasketで構成される。SL から L₁ はいわゆるプロジェクタとして独立した光学ベンチに設置され, それぞれ個有の屈折率をもつ溶媒に適応させるための入射角の調整を, このプロジェクタの支点を中心にして移動させて行なっている。入射角の微調整は, 微調整ガラス (G) を回して行なう。このガラスは光源ランプをわずかに移動することと同じ効果を持ち, 入射角をごくわずかに変えることができる。

液とガラスの界面で反射される二つの平行光線はレンズ (L₂) に入ることなしに放光され, 1 対の液とガラスの界面を透過した光線は, 薄い液膜を通過し, セルプレートに照射する。セルプレートは光が表面で拡散するように研磨してあり, 透過光は 2 つの光のスポットとなる。レンズ (L₂) はこれ等のスポット像をデュアルフォトセルの感光素子上に形成する。

入射角が, 両方のセルチェンバの溶媒に対して臨界角より僅かに小さく調整してあるとき, 等量の光がデュアルディテクタ (D) の両方の素子に照射されており, ここで一方のチェンバの液体の屈折率が変化したとすればフレネルの法則に従って, 全入射光線 I₀ と反射光線 I_r の割合が変化する。

$$\frac{I_r}{I_0} = T = 1/2 \frac{\sin^2(r-i)}{\sin^2(r+i)} + 1/2 \frac{\tan^2(r-i)}{\tan^2(r+i)}$$

その結果, デュアルディテクタの各々の素子上の光の照射量は同じでなく, 二つの液体間の屈折率の差となって表われる。

Fig. 16 の熱交換機 (Heat Exchanger) はサンプルおよびレファレンスの両液がセル室に入る前にその温度をセル室温度と同一にし, 屈折率の温度による影響をおさえるためのものである。これは後でも述べるが, 温調エレクトロニクスにより制御される。

HLC-811 に用いた示差屈折計の仕様を Table 1 に得られた結果のうち, 感度分布曲線を Fig. 17 に, 各設定温度におけるノイズを Fig. 18 に示す。

[5] 温度制御

高温 GPC の場合, その測定対象が高温溶媒でなければ溶解しないので装置の試料注入からサイフォンを通して廃液するまでの全系を昇温しなければならない。

昇温限界はポリスチレンゲルの分解を考え 150°C に抑え万一温調器の暴走に備え Sensbey による 2 重安全構造とした。GPC 溶出曲線のベースラインは各昇温部の温度の影響を敏感にうける。これは溶液の dN/dT あるいは $d/dT (dn/dc)$ が 10⁻⁵/°C ~ 10⁻⁴/°C の桁でかなり大きいこと, 温度が変化すると溶液の粘性抵抗や密度が変化し, これが負荷変動となり, セル室での流量バランスがくずれることに原因すると考えられる。

HLC-811 の温度制御は, オープン, セル, サイフォン, ディガッサ部で SSR (Solid State Relay) を使用した ON, OFF 制御方式をとっている。温度検出には 0°C で 100Ω の抵抗値をもつ白金感熱体を用い, P.I.D 動作を盛り込んだ回路構成となっている。

Table 1 Specification of RI monitor

1	Refractive index limit	1.40~1.55
2	Minimum detection	5 × 10 ⁻⁸ RIU
3	Flow cell volume	5 μl
4	Concentration sensitivity	1.5 μg/ml
5	Range	0.5 × 10 ⁻⁵ ~ 128 × 10 ⁻⁵ 9 レンジ
6	Drift	1 × 10 ⁻⁶ RIU 以下
7	Temp. seting	50~150°C
8	Power	AC 85~115v 50/60Hz 200w
9	Recorder	10mv