

全自動分取システムの開発 (2)

馬 場 信 行
鈴 木 慈 雄
橋 本 勉

Automatic Preparative Liquid Chromatograph with a Built-in Micro-Computer. (Part II)

Nobuyuki BAMBA
Shigeo SUZUKI
Tutomu HASHIMOTO

This paper describes an improvement on full automatic preparative-scale liquid chromatograph HLC 827 and the method of operation concerned. The display of parameters was made easier to understand by modifying the controller of computer and using a teletype system. A description of the method of setting controlling parameters, the checking system for the apparatus, the stability of pump, and the reproducibility of autosampling is also included. Some examples of application are illustrated with the results for the overload effect and the purity monitoring of fractions.

1. ま え が き

分析用液体クロマトグラフィの最近の進歩は著しく、高速、高分離能という点でもガスクロマトグラフィ (GC) に匹敵するようになりつつある。当然の動向として IR, UV, NMR などの測定が可能な程度の量を各成分について分取したいという希望は強く、国内では当社と日本分析工業が分取型液体クロマトグラフィを販売している。しかしながら、これらの装置は分析に必要な試料を分取する工程が手動であり、操作が複雑であり分取のくり返し精度も十分ではない。

今回新しく開発した全自動分取システムは分取コントローラにマイクロコンピュータを用い、装置の動作を常にモニタしながらくり返し分取を行うため、常に最適の状態での分取であり一段と精度の向上がはかれた。

本報告は全自動分取装置 HLC-827 システムによって得られたいくつかの結果についてのべる。なお装置の原理、構成についてはすでに報告¹⁾したので、それを参照願いたい。

2. 実 験

〔1〕 装 置 実験に用いた装置の構成図を Fig. 1 に示す。ポンプはミルトンロイ社のデュアルプランジャポンプを使い、検出器には当社の示差屈折計と紫外線吸光計を用いた。試料注入はループ容量 3 ml の電動 6 方バルブを用いた。カラムは、ステンレス製の内径 20 mm、長さ 2 フィートのもので担体は多孔性ポリスチレンゲルの公称 G4000HG6 と G2000HG6 の 2 本を用いた。また溶媒は市販 1 級のテトラヒドロフランを用いた。

〔2〕 試 料 分別用試料、くり返し注入の再現性および装置の各動作テスト用として市販のフェノール樹脂、Pressure Chemical 社の標準ポリスチレン (PS-600) を用いた。これらは分子量の比較的小さなオリゴマであり、分別によって低重合度成分が分離し、分離の程度によって分別精度の変化がわかるので用いた。

3. 結 果 と 考 察

〔1〕 HLC-827 コントローラの動作チェック

HLC-827

④→ DATE 77 02 17

OFFSET 0032

START 0050

SCOT 0003

END 0050

ECOT 0003

HRATE 0010

DELAY 0010

PCOT 0001

⑤→ NO. T. BAND S. PITCH OP.

01 00:33:00 10 E

02 00:41:50 10 R

03 00:47:00 15 C

04 01:07:30 10 E

05 01:17:10 10 R

06 01:23:00 10 C

07 01:44:20 10 E

08 01:51:20 10 R

09 01:58:00 10 C

10 02:15:00 10 E

11 02:30:50 10 C

12 02:32:00 10 E

13 02:33:00 10 I

⑥→ NO. T. BAND S. PITCH OP.

01 00:33:09 PS

01 00:36:48 PT

01 00:37:10 VE

02 00:37:13 VS

02 00:37:22 PT

02 00:37:53 VE

03 00:37:56 VS

03 00:38:09 PT

03 00:38:46 VE

04 00:38:49 VS

04 00:39:09 PT

04 00:40:01 VE

NO. TIME ACT OP AREA

01 00:33:09 PS R

01 00:36:48 PT R

01 00:37:10 VE R

02 00:37:13 VS R

02 00:37:22 PT R

02 00:37:53 VE R

03 00:37:56 VS R

03 00:38:09 PT R

03 00:38:46 VE R

04 00:38:49 VS R

04 00:39:09 PT R

04 00:40:01 VE R

034774340

010589870

009204860

006642410

⑦→ NO. CN1 T1(SEC) T2(SEC) CN2

01 F 999 999 E

02 F 999 999 E

03 F 080 020 E

04 F 999 999 E

05 F 060 020 E

06 F 999 999 E

07 F 030 020 E

08 F 050 020 E

09 F 999 999 E

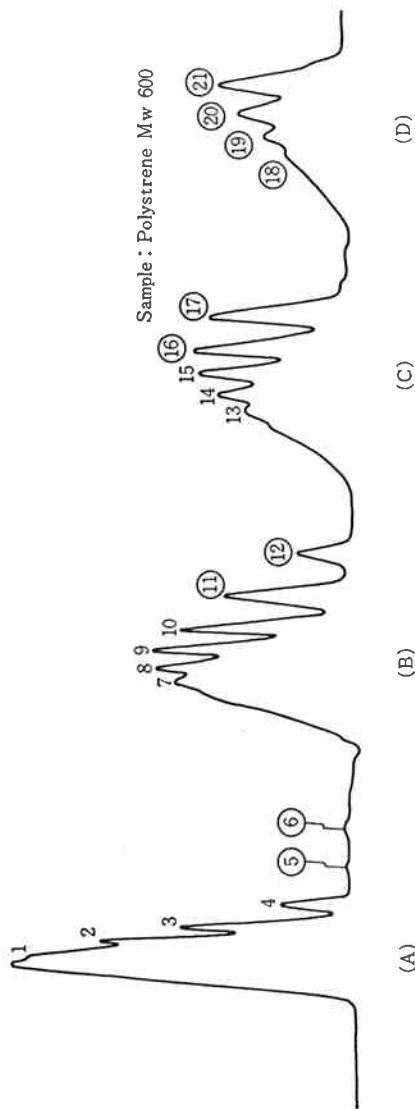


Fig. 2 Chromatogram of polystyrene and result of fraction

以前試作したコントローラによる測定結果は前報¹⁾の Fig. 13 に示されている。Fig. 13 での各種パラメータの打出しはプリンタの都合でわかりにくい表現となっている。

今回はテレタイプを使用したので打出しフォーマットが容易となり同様なサンプル (PS-600) の場合、打出しは Fig. 2 の如くであり、図中④は制御パラメータであり、ピークの検出に用いられる。⑤はタイムバンド指定であり試料の測定区間を区分し、区間中のサンプリングピッチとオペレーションコードを決定するためのデータとして用いる。⑥はコントロールアクションの指定でありどこからどこまで分取するかを決定するのに用いられる。⑦は得られた結果の一例を示したもので、サンプルピーク NO, リテンションタイム, アクションの区分, 制御シーケンスの指定, さらには面積が印字される。

〔2〕 制御用パラメータ

制御用パラメータには OFF SET, START, SCOT, END, ECOT, HRATE, DELAY, PCOT の 8 つがある。

(1) OFF SET Fig. 3 に示す如く、データ取込み不要区間で、サンプル注入後 OFF SET タイム(分)間はピークの検出は行なわない。

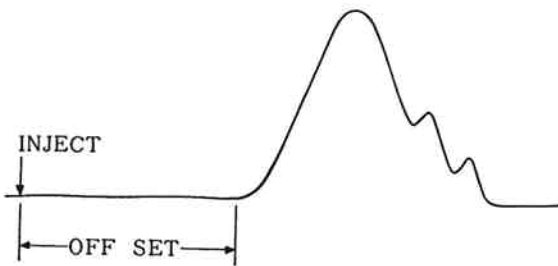


Fig. 3

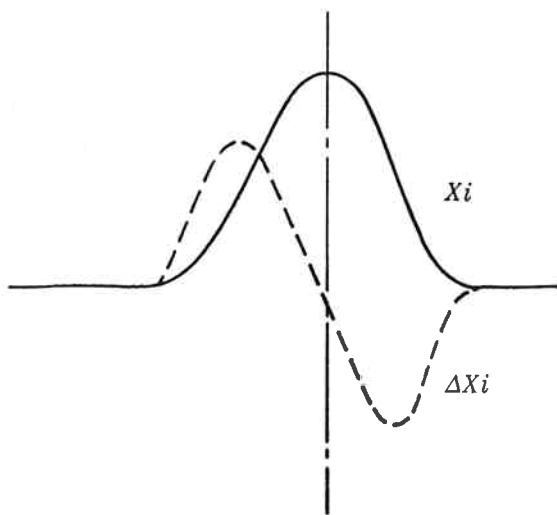


Fig. 4

(2) START Fig. 4 に示す如く、ピークスタート検出感度であり一次微分値が連続してある回数等しいか大きくなる時ピークスタートとする。

(3) SCOT ピークの立上がり判定条件の満足回数で通常のピークでは 3~5 回となる。

(4) END ピークエンド感度であり、ピークスタート感度と考え方は同じであり一次微分値が連続してある回数等しいか小となる時ピークエンドとする。ピークスタートと異なる点はピークエンドの判定を更に 1 つ付加したことで、上記 END とは別に END 判定時の値とそのピーク頂点との比が HRATE より大のときベースラインエンドとしている。以上がベースラインエンドであるが、ピーク頂点検出以後ベースラインに戻らない場合は谷間の検出を行なう。すなわち Fig. 5 のようになる。

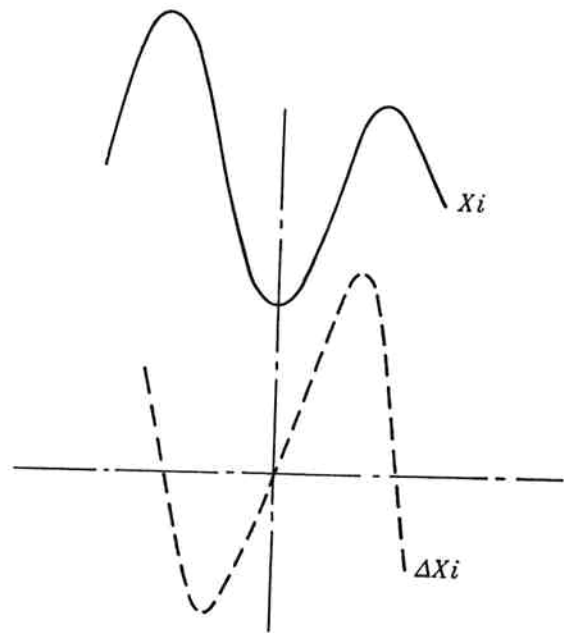


Fig. 5

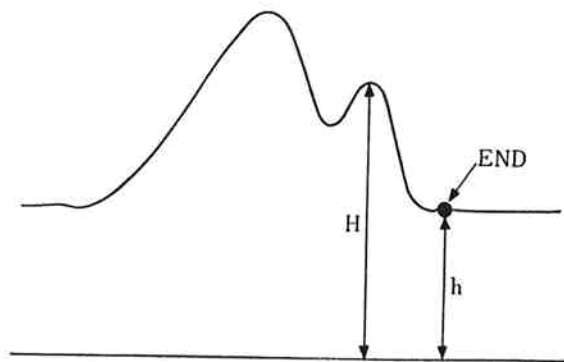


Fig. 6

④→ DATE	76 11 18	⑥→ NO.	T. BAND	S. PITCH	OP.	①→ NO.	TIME	ACT	OP	AREA
OFFSET	0018	01	00:19:55	10	E> 20sec ①	01	00:19:06	PS	E	
START	0040	02	00:20:15	10	F>	01	00:20:15	PT	E	011019290
SCOT	0003	03	00:23:50	10	E> 20sec ②	01	00:21:16	VE	E	
END	0030	04	00:24:10	10	F>	02	00:21:19	VS	E	
ECOT	0003	05	00:29:20	10	E> 20sec ③	02	00:29:28	PT	F	107287130
HRATE	0010	06	00:29:40	10	F>	02	00:31:19	VE	E	
DELAY	0010	07	00:32:20	10	E> ④	03	00:31:22	VS	E	
PCOT	0003	08	00:32:40	10	F>	03	00:32:38	PT	F	054232540
		09	00:34:50	10	E> ⑤	03	00:37:12	VS	E	
		10	00:35:10	10	F>	04	00:37:15	VE	E	
		11	00:37:40	10	E> ⑥	04	00:37:58	PT	F	005390050
		12	00:38:00	10	F>	04	00:39:20	VE	E	
		13	00:40:20	10	E> ⑦	05	00:39:23	VS	E	
		14	00:40:40	10	F>	05	00:40:42	PT	F	
		15	00:43:00	10	E> ⑧	05	00:40:42	VE	E	006117600
		16	00:43:20	10	F>					
		17	00:45:00	10	E					
		18	00:46:00	10	S					

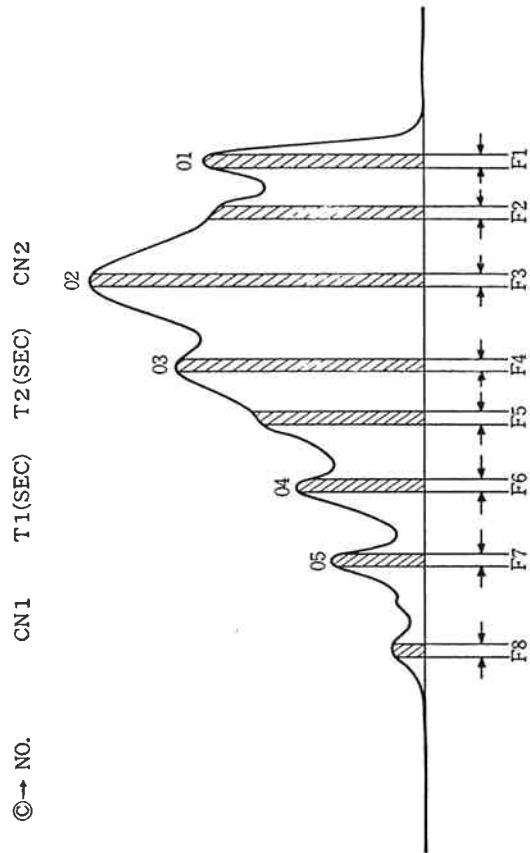


Fig. 7 Result of fraction by time band control

(5) **ECOT** ピークエンド条件 満足回数で SCOT と同じ考え方である。

(6) **HRATE** ピークエンドを判定するための補助的なパラメータとして用いる。Fig. 6 の H/h が HRATE となる。

(7) **DELAY** カラムを出た液はまず RI モニタに入り次いで UV モニタに入る。またモニタからリサイクル、フラクションコレクタ間にも配管容量があり、これら接続間での検出遅れやバルブの切替えタイミングを補償するために設けたものである。

(8) **PCOT** 同一分取工程の処理回数を決めるもので実際にはサンプラ、フラクション容量によって制約がある。

[3] タイムバンド指定のみでの分取制御

本コントローラはピークの判定とは無関係にタイムシーケンサとしても動作させることが可能である。タイムバンド入力パラメータには NO, T. BAND, S. PITCH, OP. の4つがある。

(1) **NO** 最大32まで測定区間を区分けできる。

(2) **T. BAND** 試料注入から測定区間までの時間幅で、時、分、秒の単位となる。

(3) **S. PITCH** タイムバンド内でのサンプリングピッチで最少単位は0.1秒となっている。従って測定区間を2秒毎にデータ収集を行なう場合は S. PITCH=20 となる。

(4) **OP.** オペレーションコードでタイムバンド内での処理内容を指定する。例えば(E)は排除、(R)はリサイクル、(C)はコントロールアクションの指定による。(F)は分取、(I)は注入、(S)は停止をあらわす。

Fig. 7はタイムバンド指定のみで分取した場合の例であり図中④は制御パラメータ、③がタイムバンド指定で分取したい区間を指定したものである。例えば NO. 01 と

02の区間は20秒であり20秒間のみ分取されることになる。③のコントロールアクション指定は何も行なわれない。④は得られた結果であり NO. 01 の分取については19分06秒よりピークが立上がり、20分15秒にピーク頂点21分16秒に谷間のエンドがあることを示している。

[4] コントロールアクション指定のみでの分取制御
コントロールアクションデータ入力にはコントロールアクション CN₁ と CN₂、コントロールタイム T₁ と T₂ がある。この4つのパラメータによりクロマトピークのどこからどこまでを分取するかを決定できる。

(1) **NO** 最大40まで指定できる。

(2) **CN₁** コントロールアクション CN₁ のコードは (F) Fraction, (R) Recycle (E) Eject の3つがある。コントロールアクションの動作はピークトップ検出判定時 T₁ が指定してあればタイム(1)を T₁ 秒駆動させる。999 と指定してあればタイム(1)は OFF となる。また T₁ が次のピークにまたがればピークエンドまで分取することになっている。

(3) **CN₂** このコードは (R) Recycle, (E) Eject, (I) Inject, (S) Stop の4つがある。Fig. 8に CN₁

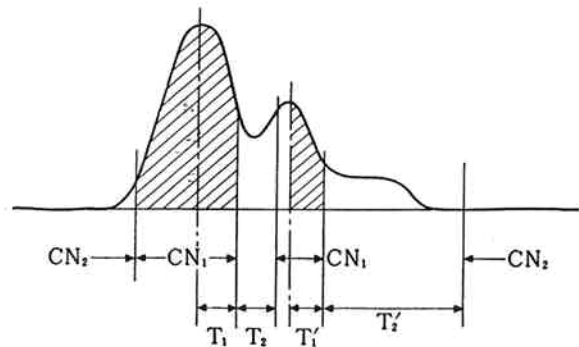


Fig. 8

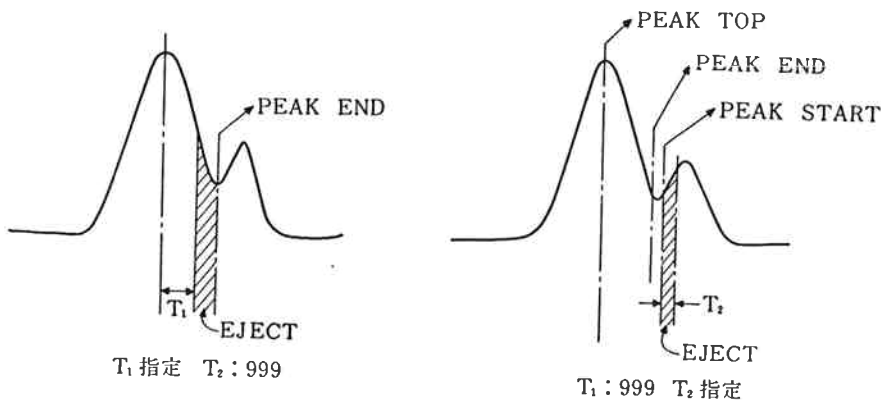


Fig. 9

Ⓐ→ DATE 76 11 25
 OFFSET 0018
 START 0040
 SCOT 0003
 END 0030
 ECOT 0003
 HRATE 0010
 DELAY 0010
 PCOT 0003

Ⓒ→ NO. CN1 T1(SEC) T2(SEC) CN2
 01 F 050 450 E
 02 F 060 080 E
 03 F 060 220 E
 04 F 045 090 E
 05 F 030 999 E

Ⓑ→ NO. T. BAND S. PITCH OP.
 01 00:18:30 10 E
 02 00:40:50 10 C
 03 00:46:30 10 E
 04 00:47:00 10 I

NO. TIME ACT OP AREA
 01 00:19:05 -F C
 01 00:21:02 -F C 009556950
 02 00:28:32 -F C
 02 00:30:28 -F C 027435020
 03 00:31:48 -F C
 03 00:33:37 -F C 020358890

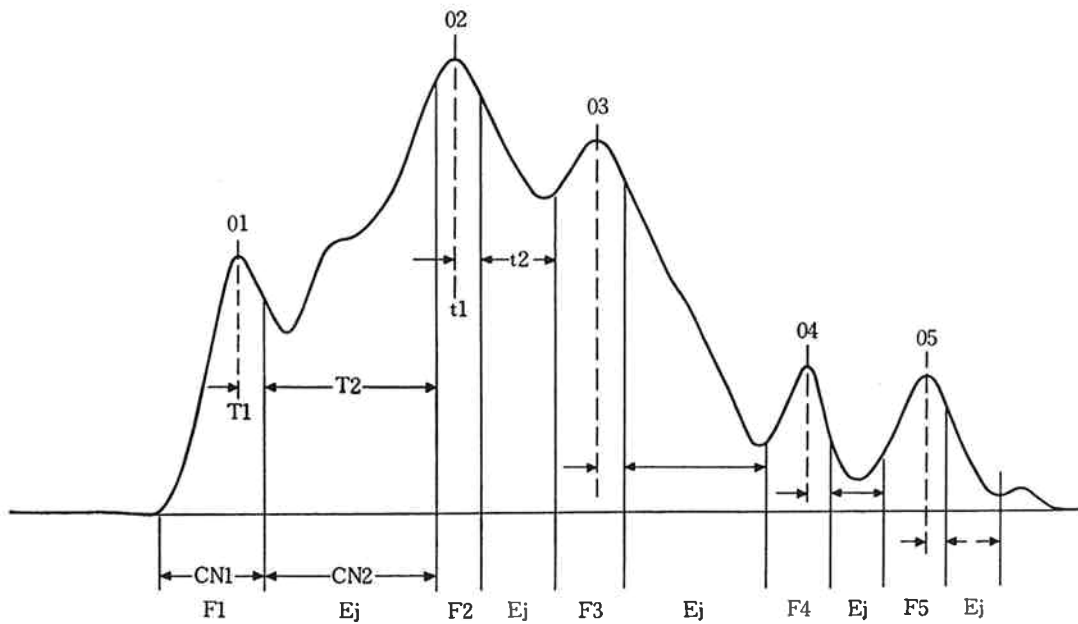


Fig. 10 Result of fraction by control action

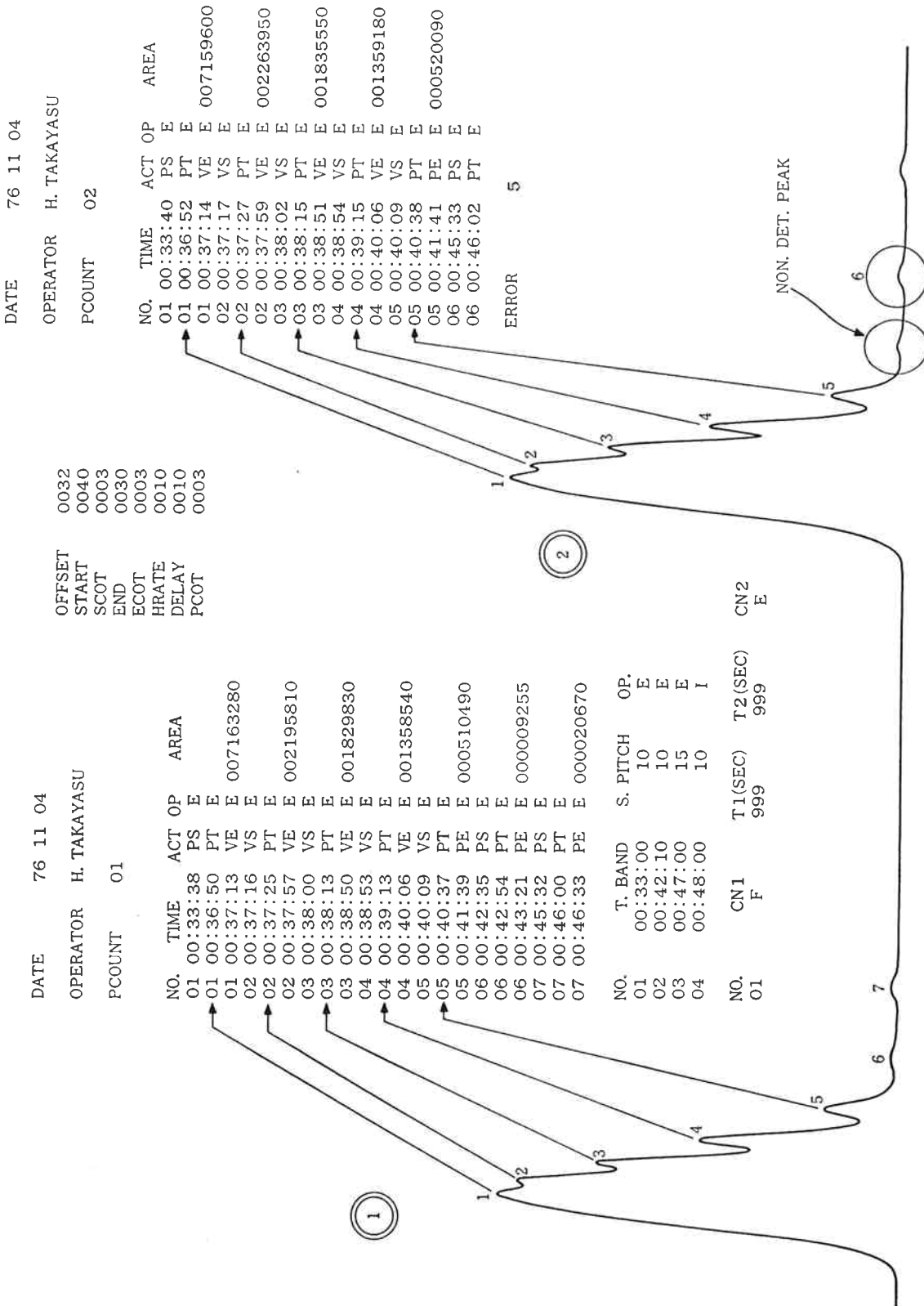


Fig. 11 Result of check system

と CN₂ の関係を示す。

(4) T₂ T₁ 時間以後 Eject コントロールアクションを行なう時間幅であり T₁ を指定して T₂ が 999 ならピークエンドまで Eject する。T₁ が 999 で T₂ 指定の場合は次回ピークスタートから T₂ 区間は Eject となる。

この関係を Fig. 9 に示す。

以上のことでわかるようにタイムバンド指定なしでコントロールアクション指定のみでの制御も可能である。

Fig. 10 はコントロールアクション指定のみで分取した場合の例であり、図中㉔は制御パラメータ、㉕がタイムバンド指定でこの場合はコントロールアクションを行なわせる区間の時間指定を行なえばよい。㉖がコントロールアクション入力指定で各パラメータの意味をクロマトグラム中に対比させて説明した。

[5] 装置のチェックシステムの確認

HLC-827 分取装置が正常に運転されているか否かをマイクロコンピュータにて常時モニタし、分取物の純度がくり返し注入によってもおちないように工夫されている。具体的なチェックシステムの手法としては

1) クロマトピークを最大40までリテンションタイムを記憶し、前回のピークのリテンションタイムより10秒 (ROM に書き込んだ時間で可変) 以内で今回のピークが現われれば装置に異常がないと判断し分取動作を行なわせる。

2) 前回あったピークが今回現われない時、又は検出されなかった場合にはシステムエラー(5)を印字し分取動作を止める。

装置のチェックシステムの一例を Fig. 11 に示す。データ①ではピークは No. 7 まで検出されているが、データ②では、データ①のピーク No. 6 が検出されずピ

ピークスタートで判定								
1	2018 ^秒	2020	2018	2019	2022	2022	2019	0.114%
2	2236	2237	2238	2239	2240	2239	2238.4	0.108
3	2280	2282	2283	2283	2284	2284	2283	0.118
4	2333	2334	2336	2336	2337	2337	2335	0.103
5	2409	2409	2411	2410	2412	2412	2411	0.058
6	2555	—	—	—	—	2555	2553	0.052
7	2732	2733	2735	—	—	2731	2727	0.168
ピークトップで判定								
1	36.50 ^{分秒}	36.52	36.53	36.54	36.55	36.55	36.53	0.14%
2	37.25	37.27	37.28	37.29	37.31	37.30	37.28	0.147
3	38.13	38.15	38.16	38.16	38.17	38.18	38.16	0.13
4	39.13	39.15	39.16	39.16	39.18	39.18	39.16	0.127
5	40.37	40.38	40.40	40.40	40.42	40.42	40.39	0.111
6	42.54	—	—	—	—	42.58	42.56	0.077
7	46.00	46.02	46.02	—	—	46.03	46.02	0.065
ピークエンドで判定								
1	37.13 ^{分秒}	37.14	37.15	37.16	37.17	37.17	37.16	0.108%
2	37.57	37.59	38.00	38.00	38.01	38.01	38.00	0.118
3	38.50	38.51	38.53	38.53	38.54	38.54	38.52	0.103
4	40.06	40.06	40.08	40.07	40.09	40.09	40.08	0.067
5	41.39	41.41	41.42	41.41	41.45	41.43	41.38	0.092
6	43.21	—	—	—	—	43.30	43.27	0.192
7	46.33	—	46.35	—	—	46.38	46.34	0.107

Table 1 Result of retention time by PS-600

ーク No. 7 をピーク No. 6 として検出したためリテンションタイムが10秒以内に入らずエラー(5)を印字し分取動作を停止したことが判る。

〔6〕 送液ポンプの定量性

HLC-827 装置に用いられているポンプはミルトンロイ社製のダブルプランジャポンプである。ポンプ自身の精度はカタログでは0.5%以内となっている。分取装置の場合とくにくり返し試料を注入し大量に分取物を得たい場合にはポンプの定量性が重要な決め手となる。

送液システムの定量性を調べるために、試料に PS-600 を用い7回くり返し注入による保持時間の偏差を出してみたところ Table 1 に示すようにピークスタートで判定した場合 0.103%、ピークトップで判定した場合 0.11%、ピークエンドで判定した場合で 0.112% となり十分な精度のあることが判った。

〔7〕 オートサンプラによるくり返し注入の精度

サンプル PS-600 を用い注入の精度をクロマトグラムの面積から調べた。

PS-600 のピーク No. 1~5 までの各ピークを谷間でタテ切りにした場合の各ピーク面積の7回の平均をとりその偏差を調べたところ $\pm 1.5\%$ であった。7回の注入中とくに値のおかしい1回を除き6回の平均をとった場合は $\pm 0.8\%$ の精度であり、本形式のオートサンプラでも使用は可能であるが、更に改良が望まれる結果とな

った。

〔8〕 カラムのオーバロードについて

試料に市販のフェノール樹脂を用いたカラムのオーバロードについて検討した。テストに用いた検出器は示差屈折計であらかじめダイナミックレンジを測定し、検出器がオーバロードすることはないことを確認してから行なった。ここで屈折計のダイナミックレンジは実測 4×10^{-3} RIU であり測定に支障はなかったが、UV 検出器の場合はフローセルの光路長 3 mm では試料の吸収が強く測定には不適であった。

Fig. 12 はその結果であり㉔が 30 mg 注入、㉕ 75 mg、㉖ 120 mg、㉗ 160 mg、㉘ 240 mg 注入時のクロマトグラムである。分離能の濃度依存性には2段階がある。第1段階は濃度とともに分離能が低下する領域であり、第2段階はさらに濃度が大きくなると急激にピークが乱れ、分離能が低下する領域である。通常 GPC でオーバロードと呼ばれるのは、この第2段階の濃度効果である。原因については、理論的には明確にされていないが、現象論的には試料溶液の粘度が主要因であり、この濃度効果は別名では Viscous Fingering とも呼ばれている。

したがって、同じ濃度でも試料の分子量によって、オーバロードが現われる濃度が異なる。高分子量の試料になるほど、分離能低下が現われる濃度域が低くなり、ま

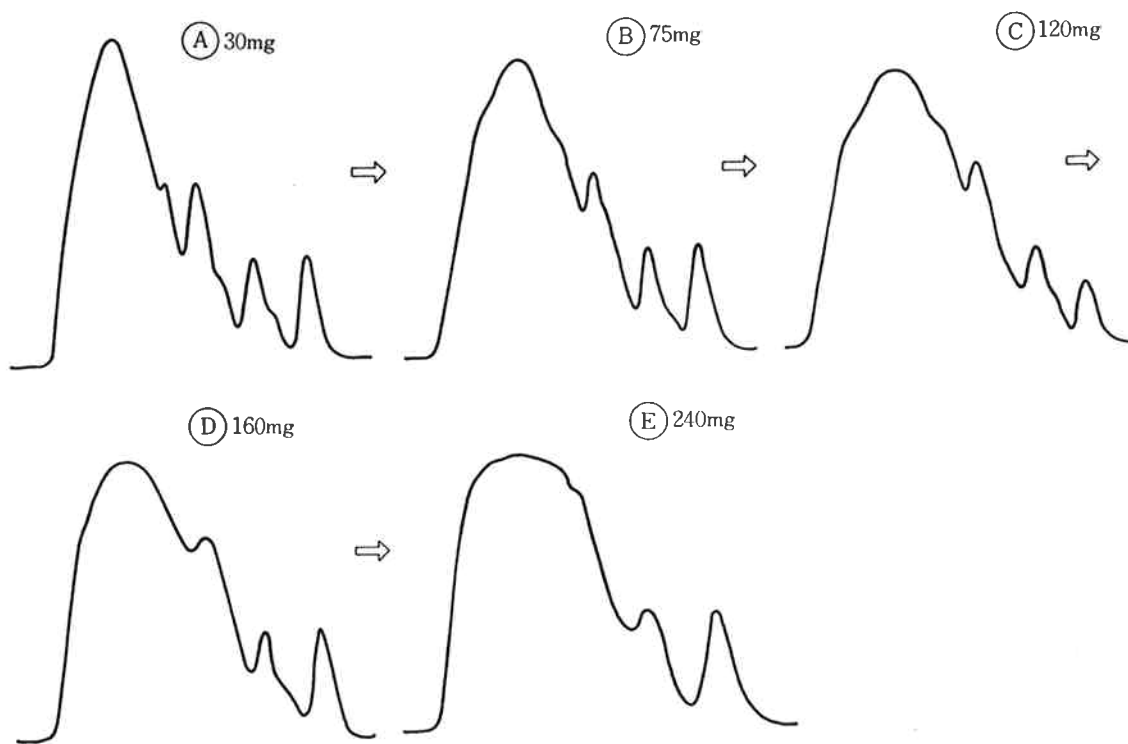


Fig. 12 Result of column over load

たオーバーロードの起こる濃度も低くなる。今回、測定例として用いたフェノール樹脂では、このデータよりわかる様に G4000HG, G2000HG の組合せによる 1 インチカラムの場合、通常注入量は 100 mg 程度であり、100 mg 以上の場合はプレカラムを用いるか、さらに大口径のカラムが必要となる。

[9] 分取物の純度

試料に塩化ビニール、カラムを GMHG 6 2 本とした場合の分取区分と分取物の純度について調べた。

HLC-827 の測定条件は、溶媒 T. H. F, 流速 5.5 ml/min, 30 mg 注入、分取物の測定は HLC-802 UR にデータ処理装置 CP 8 を取付けて行なった。

結果は Fig. 13 に示すごとく、分取区分①の MW/MN は 1.17、分取区分②の MW/MN は 1.266 であった。

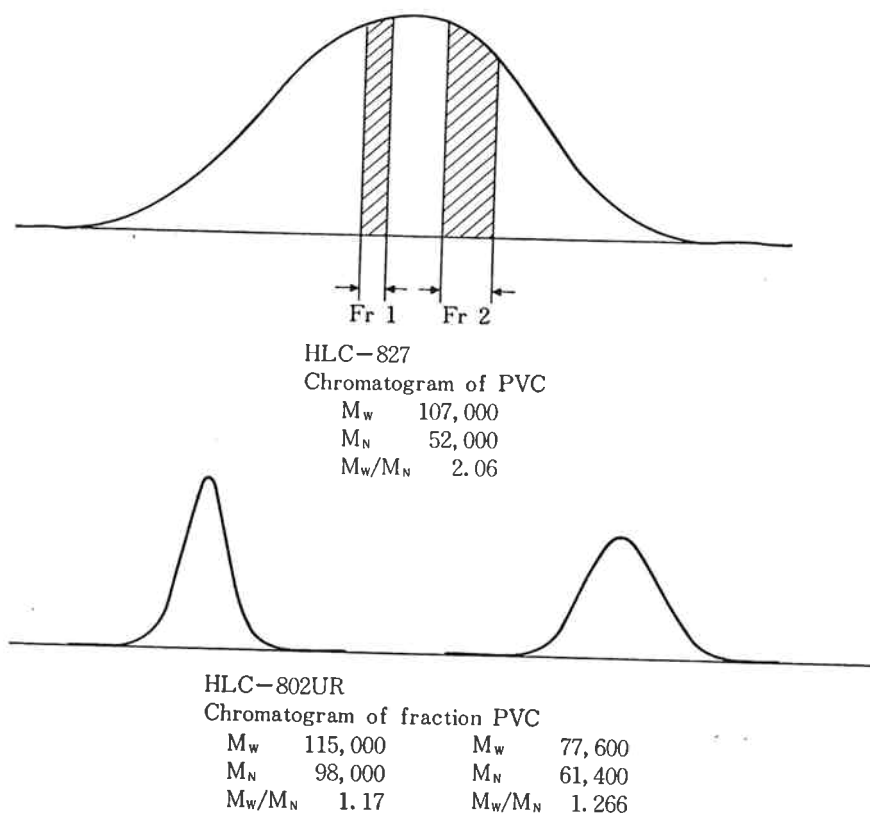


Fig. 13

4. む す び

今回開発した全自動システムの完成により開発当初目標として分析装置の自動化、マイクロコンピュータの有効利用、大規模分取システムへの足掛りなどの点で貴重な経験が得られ、さらに HLC-827 システムの拡大利用として大口径カラムを用いた大規模分取の引合い、受注があり大変うれしく思っている。

この小論は、前回報告した本システムの原理、構成に

つぐ第 2 報であり主としてコントロールシステムと実験によって得られた結果をまとめたものである。

最後にこの小論を作成するにあたり、装置の製造に協力いただいた旭計器工業株式会社の方々に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 馬場, 松崎, 橋本; “東洋曹達研究報告”, 20, (2), 121 (1976).