

## 液体クロマトグラフィ用示差屈折計の開発

馬 場 信 行  
相 浦 惇  
橋 本 勉

## Differential Refractometer for Liquid Chromatography

Nobuyuki BAMBA  
Makoto AIURA  
Tsutomu HASHIMOTO

Widely used as monitor in liquid chromatography is differential refractometer that detects relative content of separated substances from the difference of refractive index between a pure solvent and a solution containing separated substances.

Recently, we have developed a new differential refractometer (commercialized as TOYO SODA RI-8) with an improved optical system and temperature control system: Full scale deflection of this unit, of which flow cell angle is  $45^\circ$  and focal length of lens 150 mm, is  $1 \times 10^{-6}$  RIU and noise level of refractive index is less than  $1 \times 10^{-8}$  RIU at optimum condition.

This paper deals with appraisal of measurement results obtained from experiments.

## 1. はじめに

ゲルパーミエーションクロマトグラフ (GPC) の検出器として用いられる示差屈折計 (DRI) は溶媒と分離された高分子成分を含む溶液との屈折率の差から成分濃度ひいては相対含有量を知ろうとするものである。GPC の試料濃度はできるだけ希薄であることが望ましく、かつピークの広がりを押えるためにも試料注入量は 500  $\mu\text{l}$  以下が望ましい。試料測定に際し使用される分離カラムも最近では高理論段数のものが得られておりセル内での広がりも無視出来なくなっている。

このような背景において分子量分布の広い高分子試料を精度良く測定するためには高感度で信号/ノイズ (S/N) 比が大きいことが要求される。

今回新しく開発した DRI 検出器はセル角度  $45^\circ$ 、焦点距離 150 mm の偏光型示差屈折計であり、とくに分子量分布の広い高分子試料を精度良く測定出来るように配慮したものである。完成した DRI (TSK Model RI-8) の性能は、ノイズ  $1 \times 10^{-8}$  RIU 以下、最少検出

感度  $2 \times 10^{-8}$  RIU と従来の反射型屈折計に比較し 10~20 倍高感度であり、更に市販の偏光型屈折計に比較しても 3~5 倍高感度となっている。

この小論は試作した偏光型示差屈折計の原理、構造、性能と、開発途上得た知見について報告する。

## 2. 屈折計について

我々が日常目撃する光に関する現象、例えば光の直進、反射、屈折、干渉などを利用し古くから各種の光学測定器が開発されている。屈折計はこれらの現象をたくみに利用し各種のものが考案され実用に供せられている。屈折計が液体クロマトグラフィの検出器として脚光を浴びるようになったのは比較的 newらしく 1962 年 J. Moore がカラム充てん剤として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試料の分別を行なった時に検出器として使用された時であろう。

液体クロマトグラフィに使用される屈折計は現在 3 種類のものが市販されているがいずれも示差法を用い高感度化を図っている。示差法とは検出器の応答信号  $R_i$  が

式(1)で示される様に溶液の屈折率  $n_m$  と溶媒の屈折率  $n_s$  との差を求めたものである。

$$R_i = K(n_m - n_s) \quad (1)$$

ここでKは装置定数である。理想溶液の場合、溶液の屈折率  $n_m$  は、

$$n_m = c_1 n_s + c_2 n_i \quad (2)$$

ただし、 $c_1$ ,  $c_2$ , は溶媒および溶質のモルパーセント、 $n_s$  および  $n_i$  は溶媒、溶質の屈折率である。

また Gladstone-Dale によると溶液の屈折率の濃度依存性は、

$$\sigma n / \sigma c = R_2 - \rho_1 / \rho_2 R_1 \quad (3)$$

で示される<sup>1)</sup>。

$c$  は溶液濃度 (g/ml),  $\rho$  は密度,  $n$  は屈折率であり副指数の 1, 2は溶媒, 溶質を意味する。

$$R_1 = (n_1 - 1) / \rho_1 \quad (4)$$

$$R_2 = (n_2 - 1) / \rho_2 \quad (5)$$

$\sigma n / \sigma c$  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。式(2), (3)のいずれをみても溶液の屈折率はその濃度に直線的に比例することがわかる。GPC の場合には、カラムにより分離された高分子成分の分子量  $M_i$  とその成分の個数  $N_i$  の積に比例すると見られる。

[1] 反射型屈折計

反射型屈折計は別名フレネル型屈折計とも呼ばれ、試料溶液の屈折率変化をプリズムと溶液で構成される境界面に入射する光束の反射光の強度変化としてとらえるもので、その構造上セル体積が小さく、しかも耐圧性に優れているなどの利点があるが、検出器の応答が単純に屈折率の変化量の一次式として表わせず直線性に問題がある、また三角プリズムを用いた場合は測定対象物によってプリズムを交換する必要があり光学系の調整も難しいなどの欠点を有している。

反射率変化  $dR$  と屈折率変化  $dn$  の間には次式で表わされる関係があることはよく知られている<sup>2)-6)</sup>。

$$\frac{dR}{dn} = \frac{2}{n} \left[ \frac{\sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2} - \frac{\cos \theta}{\sin \theta_c}}{\sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2} + \frac{\cos \theta}{\sin \theta_c}} \right] \cdot \frac{\cos \theta}{\sin \theta_c} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2} + \frac{2}{n} \left[ \frac{\cos \theta - \frac{1}{\sin \theta_c} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2}}{\left\{ \cos \theta + \frac{1}{\sin \theta_c} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2} \right\}^3} \right] \cdot \frac{\sin \theta}{\sin \theta_c} \left\{ 1 - 2 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2 \right\} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{\sin \theta_c}\right)^2} \quad (6)$$

ここで  $n$  は溶液の屈折率,  $\theta_c$  はプリズムと溶液によって決まる臨界角,  $\theta$  は入射角である。(6)式の証明は平行光束が境界面に入射するとしてフレネルの反射の法則(式(7))

$$R = \frac{I_0}{I} = \frac{1}{2} \left( \frac{n_0 \cdot \cos \theta - n \cdot \cos \beta}{n_0 \cdot \cos \theta + n \cdot \cos \beta} \right)^2 + \frac{1}{2} \left( \frac{n \cdot \cos \theta - n_0 \cdot \cos \beta}{n \cdot \cos \theta + n_0 \cdot \cos \beta} \right)^2 \quad (7)$$

およびスネルの法則(式(8))を  $\theta_c$  を臨界角として書き

$$n_0 \sin \theta = n \sin \beta \quad (8)$$

直した式(9)とから計算によって求めることが出来る。

$$n_0 = n / \sin \theta_c \quad (9)$$

ただし  $n_0$  はプリズムの屈折率,  $\beta$  は屈折角,  $I$  は入射光束の強度,  $I_0$  は反射光束の強度である。

反射型屈折計を市販中のメーカーは東洋曹達工業(802型), と Laboratory Data Control社(LDC-SF-1107, model-3)があるが、前者はプリズムに高屈折率ガラスを用いたシリンダカルレンズの採用により屈折率範囲1.3~1.6までの範囲をプリズム交換なしに測定出来る特長を有している。Fig. 1にLDC社のSF-1107を、Fig. 2に東洋曹達工業の802型の構成を示す。

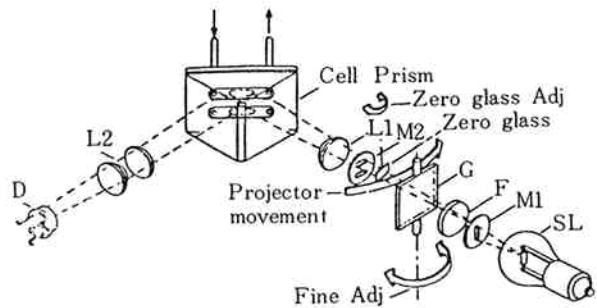


Fig. 1 the schematic diagram of the LDC model SF-1107.

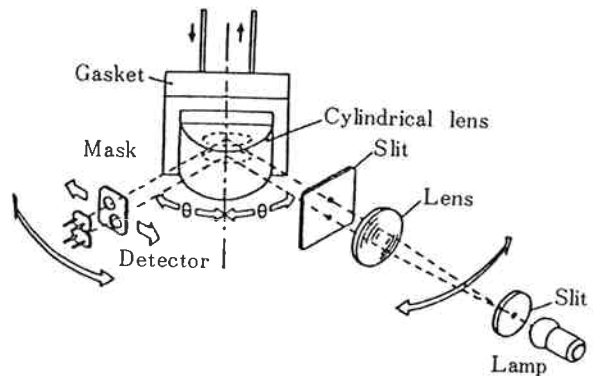


Fig. 2 The schematic diagram of the TSK model HLC-802.

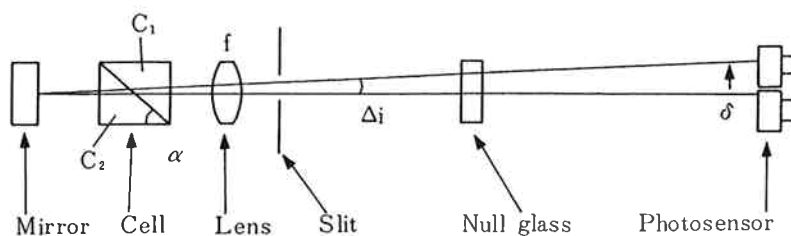


Fig. 3 Construction of differential refractometer

[2] 偏光型示差屈折計

偏光型示差屈折計は別名ブライス型屈折計とも呼ばれ通常石英ガラスの融着によって作られる直方体で対角面ガラスによって試料側セル  $c_1$  と基準側セル  $c_2$  に分かれています。 $c_1$  にはカラムで分離された溶液が通り、 $c_2$  には溶媒が通る。両液の屈折率の差により光束は変位しこの変位量が屈折率変化  $\Delta n$  に比例することを利用して作られたものである。Fig. 3 は偏光型屈折計の主要部の構成を示したものである。

$c_1$  と  $c_2$  において屈折率差  $\Delta n$  が生じると光束は角  $\Delta i$  だけずれ、ホトセンサの中心部において平衡時より  $\delta$  だけ変位する。この変位量  $\delta$  は次式で表わされる。

$$\delta = 2f \tan \alpha \Delta n \quad (10)$$

ここで  $f$  はレンズの焦点距離、 $\alpha$  はセル角度である。(10)式より明らかな様に屈折率の変化量は単純な一次式で表わされ高感度とするためには  $f$  及び  $\alpha$  を大きくすればよいことが判る<sup>7)</sup>。(10)式は一見単純な式であるがこの

式は光束のフローセルでの出射角を  $\omega$  とした時のレンズ焦点面上での光束の変位量  $\delta_y$  は次式で表わされる。

$$\delta_y = f \tan \omega \quad (11)$$

(11)式と  $c_1$  と  $c_2$  セル間、 $c_2$  と  $c_1$  セル間、更には  $c_1$  と空気間でのスネルの法則に従う光束の変位関係より導くことが出来るが、数式の簡略化のため溶媒の屈折率  $n_s$

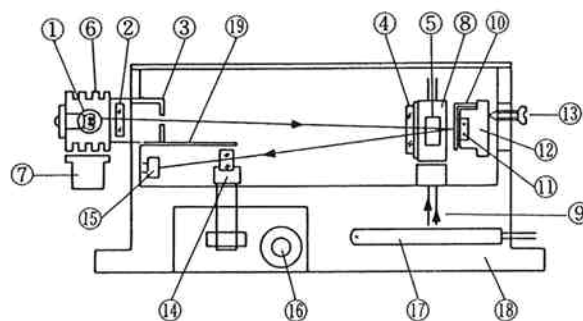


Fig. 4 The schematic diagram of the TSK model RI-8

Table 1 Chazacteristic properties of the DRI Detectors

Maker & Model	Measure Range	Cell Volume	Noise (no flow)	Drift RIU/H	Sensitivity (s/n=2)	Attenuation $10^{-5}/FS$	Pressure limit psi	Signal out put mv	Light source	Temperature range °C
TSK RI-8	1.0-1.8	10	$1 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-8}$	$25.6 \times -$ $0.1 \times$ 9 step	100	100	tungsten	R. T. -60
Shodex SE-11	1.0-1.75	8	$3 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-8}$	$256 \times -$ $0.25 \times$ 11 step		10/100	tungsten	water bath
Waters R-401	1.0-1.75	10	$2 \times 10^{-7a)}$ $3.6 \times 10^{-7b)}$	$1 \times 10^{-6c)}$ $1.65 \times 10^{-7b)}$	$6 \times 10^{-8c)}$ $4 \times 10^{-7a)}$	$128 \times -$ $0.25 \times$ 10 step	100	10/100	tungsten	water bath
Knauer 5100		8	$2 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$25.6 \times -$ $0.1 \times$ 9 step		10/100	luminescent diode 900 nm	10-60
IOTA		10	$5 \times 10^{-8b)}$ $2 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-7b)}$	$5 \times 10^{-8b)}$				LED (AsGa) 940nm	
Miczom-eritics 771	1.0-1.85	11	$2 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$	$200 \times -$ $1 \times 8$ step	200	10	tungsten	
ALTEX 156		8	$5 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-7}$	$64 \times -$ $0.1 \times$ 8 step		100	LED 900 nm	10-50
JAT RI-2		s = 8 r = 50	$8 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$128 \times -$ $1 \times 8$ step		1/10/100	tungsten	S. T. -50

と溶液の屈折率  $n_m$  の差  $\Delta n$  が  $(\Delta n/n_s)^2 \ll 1$  と仮定した場合に限ったことであり  $(\Delta n/n_s)^2$  が無視出来なくなる  $\Delta n \geq 10^{-2}$  の範囲では偏光型示差屈折計の応答は直線的でなくなることに注意する必要がある。

偏光型示差屈折計は低屈折率から高屈折率までセル交換なしに測定が可能で直線性もよく高感度化が比較的容易なため数多くのメーカーより市販されているが、セルの形状が複雑であり高価であるばかりか耐圧が低い、セル形状によっては流速の効果を受け易いなどの欠点を有している。Fig. 4 に偏光型屈折計の構成を、Table 1 に各メーカーの仕様をまとめたものを示す。Table 1 の作成にあたっては各社のカタログ及び取扱説明書と文献7), 8) に記述された数値を記入した。

[3] 干渉型屈折計

Fig. 5 に示すように、波長  $\lambda$  の単色平行光線  $L$  が空气中 (屈折率  $n_0=1$ ) におかれた平行平板 (屈折率  $n$ ) に入射した時反射光  $R_1, R_2$  及び透過光  $T_1, T_2$  の干渉を考えるに、それぞれの場合の光路差  $\Delta R, \Delta T$  は外面反射の際の位相の飛びを考慮に入れて次式で与えられる。

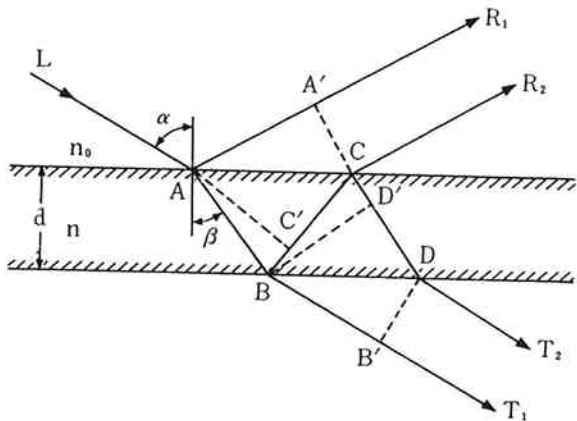


Fig. 5 Interference of parallel plate

$$\Delta R = 2dn \cos \beta + \frac{\lambda}{2} = 2d\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha} + \frac{\lambda}{2} \quad (12)$$

$$\Delta T = 2dn \cos \beta = 2d\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha} \quad (13)$$

故に明るさが極大(明)及び極小(暗)になる条件は次の如く与えられる。

$$2d\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha} = (2N + 1) \frac{\lambda}{2} \quad (\text{明: 反射光}) \quad (14)$$

$$2d\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha} = 2N \cdot \frac{\lambda}{2} \quad (\text{明: 透過光}) \quad (15)$$

但し  $N=0, 1, 2, \dots$

$d$  が一定の場合は上式の関係満足する  $\alpha$  の方向に対して明暗の干渉縞が認められる。この様に干渉を利用し屈折率を測定する方法は干渉屈折計といわれ古くから気体の屈折率を極めて精密に測定する目的で使用されてき

た。最も代表的なものは Jamin の干渉計でありその概要を Fig. 6 に示す。

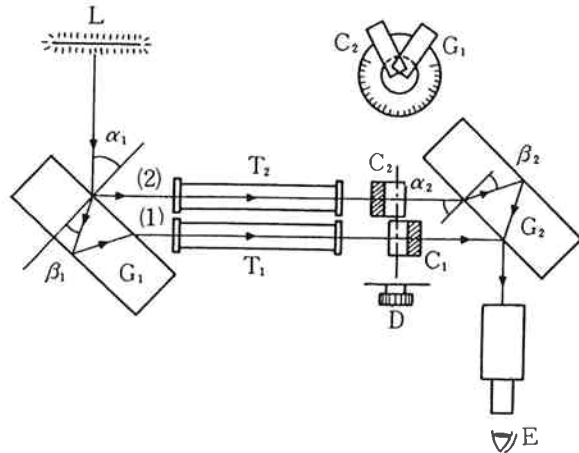


Fig. 6 Interference Refractometer of the Jamin Type

観測用望遠鏡に入る光の光路差は、平行平板  $G_1, G_2$  の厚み  $d_1, d_2$  が等しく、かつ屈折率  $n_1, n_2$  も等しいものとする

$$d_1 = d_2 = d_g, n_1 = n_2 = n_g \text{ であるから}$$

光路差  $\Delta$  は

$$\Delta = 2n_g d_g (\cos \beta_1 - \cos \beta_2) \quad (16)$$

ここで  $\beta_1$  は  $G_1$  における屈折角、 $\beta_2$  は  $G_2$  における屈折角であり  $\Delta = N \cdot \lambda$  を満足する方向に明縞が見える。

$G_1$  と  $G_2$  が完全に平行な時、即ち  $\beta_1 = \beta_2$  のとき干渉縞は見えないが  $G_2$  を僅かに回転すると  $\beta_1 \neq \beta_2$  となってその回転軸に平行な干渉縞が見られる。Fig. 6 に示すように両光束中に全く長さの等しい  $T_1, T_2$  の管を挿入した時、両者の屈折率の相異によって光路差を生じ干渉縞が移動する<sup>9)</sup>。

この原理を用いた液体クロマトグラフィ用検出器として市販されているものに OPTILAB 社の model 902 型がある。この装置は 546 nm の波長を用い、フローセルの光路長 10, 1, 0.2, 0.02 mm があり光路長 10 mm の場合は最も感度が良く  $10^{-5} \sim 2 \times 10^{-7}$  /FS のレンジがあり、ノイズレベルが  $5 \times 10^{-9}$  RIU であることから  $S/N=2$  とした場合の検出限界は  $1 \times 10^{-8}$  RIU と高感度測定が可能である。

この様に干渉型屈折計は高感度ではあるが2つの光路を厳密に等しくする必要があり製作はかなり難かしく偏光型や反射型の屈折計に比べかなり高価な装置となるため普及するに至っていない。

3. 東洋曹達型示差屈折計 (RI-8 型) 装置とその動作原理の概要

今回新たに開発した示差屈折計は光束の変位量から屈

折率を測定する、いわゆる偏光型である。本装置を試作するに当り次の点に注意して設計を行なった。

- (1) 簡単な光学系で取扱いが容易なこと
- (2) 焦点距離を大きくし高感度化すること
- (3) フローセルは液体クロマトグラフィの検出器として十分使用可能なセルボリュームとし、広範囲な流量範囲で使用可能なこと。
- (4) 変位量の検出はパイプリズムやミラーを用いないで直接検出可能な特殊なデュアルマスクシリコンホトセルを考案すること。
- (5) 流量の影響や、周囲温度変化に対し影響を受けにくくするためフローセル部と熱交換部の温度平衡に配慮すること。

などである。具体的には(2)については  $f=150\text{ mm}$  と市販装置の2倍の値を設定、(3)についてはセルボリューム  $10\ \mu\text{l}$  とし、セル角度  $67^\circ$ 、 $45^\circ$  の2種類、更には流速効果を検討するためフローセルの入口、出口方向の異なる3種類のセルを試作した。試作したセルの構造を Fig. 13, Fig. 14 と Fig. 22 にそれぞれ示す。

#### [1] 装置の構成

装置は東洋曹達製送液ユニット (HLC-803A) と組み合わせて使用出来る検出器ユニットとして外観を統一したもの (Fig. 7) と電気回路と光学ユニットとを分離したセパレートタイプ (Fig. 8) の2つのモデルを製作した。



Fig. 7 Front view of RI-8 (803A TYPE)



Fig. 8 Front view of RI-8 (Separate Type)

#### [2] 光学部の動作原理

光学部の構成は Fig. 4 に示した通りである。

光源ランプ①から出た光束はガラスウインドウ②と入射スリット③、レンズ④を通りフローセル⑤に入る。光源ランプは定格  $6\text{ V } 2\text{ A}$  のタングステンランプを長期間安定に動作させるため  $3\sim 4\text{ V}$  で点灯し、空冷フィン⑥に取付けられプロアモータ⑦で常時冷却される。セル⑤は石英製の直方体で対角面ガラスによりサンプルセルとレファレンスセルに分けられる。セルは当初、角度  $67^\circ$  液の出入口が上下方向にあるものを用いたが試作したセルの耐圧が低く、かつ流速依存性が大きいこともあり若干の感度低下は止むを得ないとし、角度  $45^\circ$ 、液の出入口を側面に設けたものと変更した。セルはセルホルダ⑧によって光学ベンチ上に設置されており熱交換機⑨と同一温度で平衡するように工夫した。サンプルセルにはカラムで分離された成分溶液が通り、レファレンスセルには基準溶媒が通る。両液の屈折率の差によって光束は曲げられ、セル室後方のマスク⑩を通り、バックミラー⑪により反射され再びセル室に入り再度曲げられる。バックミラーはミラーホルダ⑫に固定されており、光軸の調整は調整ネジ⑬によって行う。レンズ④は焦点距離  $150\text{ mm}$  の平凸レンズでありフローセルに平行光束を入射させている。バックミラーによって反射された光束は再びレンズを通り、オプティカルヌルグラス⑭を径でホトセンサ⑮にスリットの像を結ぶ。オプティカルヌルグラスは回転つまみ⑯によって回転し、ホトセンサ中心部へ光束を移動させる。ホトセンサ⑮は  $100\ \mu\text{m}$  の間隔で同一プレート上に設置された2個のシリコンブルーセルで構成されており、2個のシリコンブルーセルに同量の光量がある場合を基準とし、セル室内に成分溶液が通過中は片方の光量が増加し、もう一方は減少しバランスがくずれる。この光量の増減を電気的信号に変換したのち記録させる。⑯はカートリッジヒータでありヒータ周辺に取付けられたサーミスタにより温調、加熱される。⑰はアルミブロックであり光学ベンチと熱交換ブロックの両方の役目をもっている。⑱は遮光板でホトセンサに不要な迷光が入り込むのを防ぐために用いた。

偏光型屈折計は反射型屈折計に比べ、溶媒交換や設定温度変更時の再調整は極めて容易であるが若干の調整は必要となる。本装置の場合はバックミラーを調整することなく容易に平衡がとれる様にヌルグラスに多少大き目のものを用いた。オプティカルヌルグラスの変位によって移動する光束量  $\delta'$  は(17)式で表わされる。

$$\delta' = d \sin \theta \left\{ 1 - \frac{\cos \theta}{\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 - \sin^2 \theta}} \right\} \quad (17)$$

Fig. 9 はオプティカルヌルグラスの動作を示す図であり、本装置に使用したものは  $d=3\text{ mm}$ ,  $n_g=1.5168$  となっている。

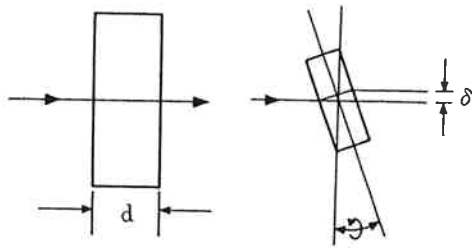


Fig. 9 Optical Null glass.

オプティカルヌルグラスの移動方法はタンゼントバー方式となっており、タンゼントバーは一辺 25 mm、ピッチ 0.5 mm のネジを 1 : 2 の回転比をもつ歯車によって容易に外部より調整できるようになっている。オプティカルヌルグラスは屈折計感度のサブスタンダードとして用いることが可能であることは式(7)より明らかである。本装置の場合、ヌルグラスの 1 回転はおよそ  $3.4 \times 10^{-5}$  RIU に相当する。

Fig. 10 はヌルグラスの回転と出力信号を屈折率に換算したものとの関係を示す図である。本装置の最底レンジは  $256 \times 10^{-6}/\text{FS}$  であり、このレンジにおいて十分な調節範囲があることがわかる。

[3] 電気回路の構成

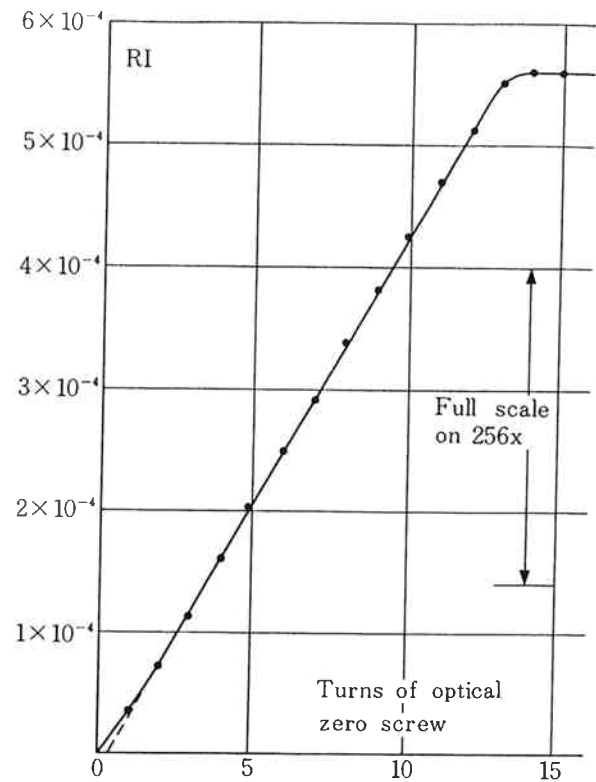


Fig. 10 Linearity to change in zero glass rotation.

電気回路は、ランプ点灯回路、電源回路、信号処理回路と温調回路で構成されている。

Fig. 11 に信号処理回路、Fig. 12に温調回路を示す。

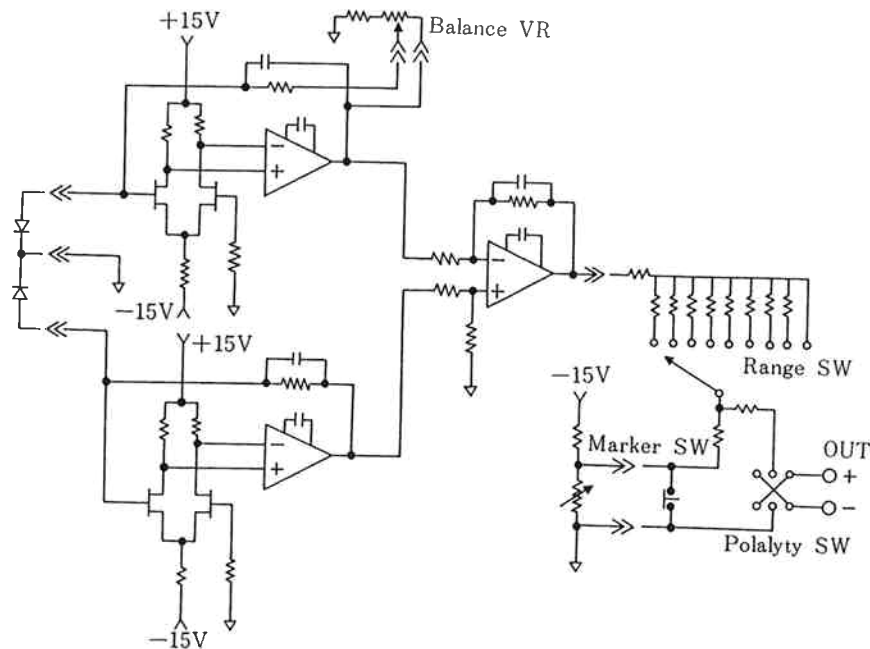


Fig. 11 Schematic diagram of amplifier

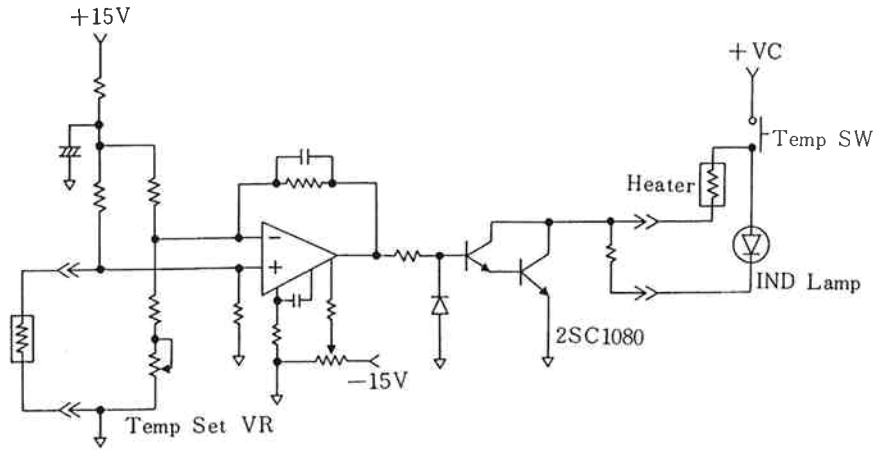


Fig. 12 Schematic diagram of temperature control circuit

4. 結果と考察

[1] 測定可能屈折率範囲

GPC で用いられる溶媒のうち低屈折率のものは水であり高屈折率のものはキノリンであろう。これらの屈折率はそれぞれ1.33, 1.61であるところから測定可能屈折率範囲は1.3~1.7は必要となる。偏光型屈折計の場合、測定可能屈折率範囲はフローセルの構造とセルに入射する光束巾によって制限される。今回試作した2種類のフローセルを Fig. 13, 14 に示す。

今  $c_1$ ,  $c_2$  のセル室に同一溶媒を封入し矢印方向より光束を入射させた場合、光束は中央の仕切板によって屈折する。この時の変位量を計算したものが Fig. 15 である。

ここで黒丸(●)はセル角度  $45^\circ$ 、白丸(○)はセル角度  $67^\circ$  の結果である。本装置に使用したセルに入射する光束の巾 (スツット巾) は  $0.8\text{ mm}$  であることから、理想状態での測定可能屈折率範囲は  $45^\circ$  セルで  $1.0\sim 1.8$ ,

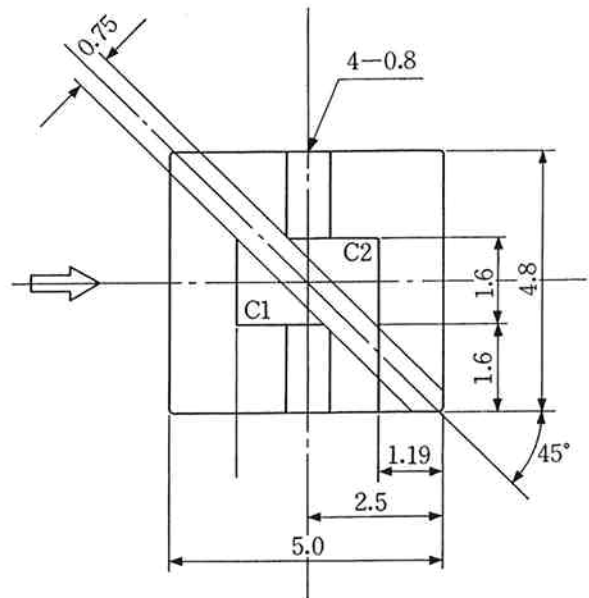


Fig. 13 Structure of the flow cell

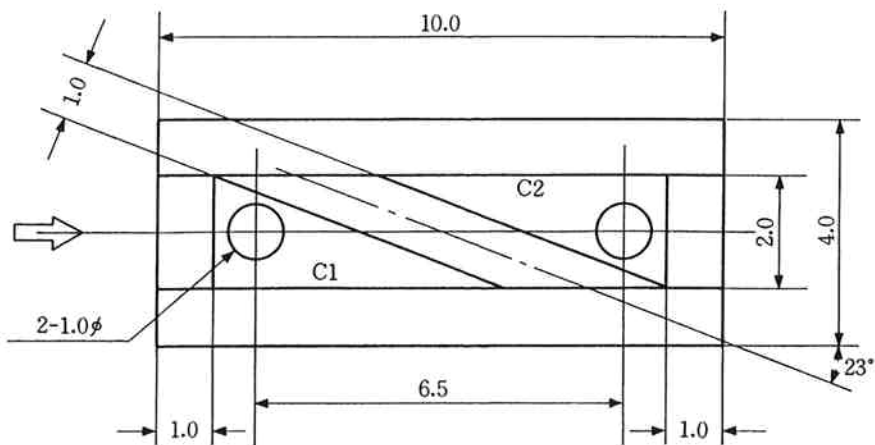


Fig. 14 Structure of the flow cell

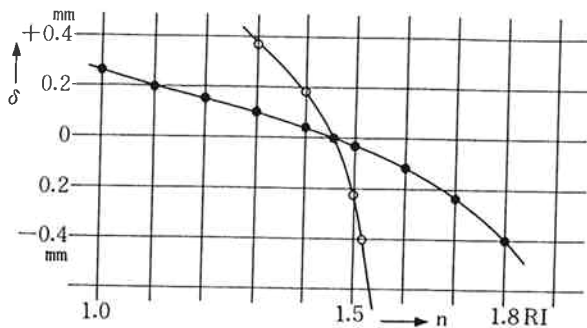


Fig. 15 Deviation of the image

67°セルで1.3~1.52であることがわかる。当初の目標範囲を1.3~1.6とすると感度はおよそ2.3倍低下するが45°セルを用いることにした。

[2] ダイナミックレンジ

試作した示差屈折計は光学系を簡略化するためホトセンサ面上での光束の変位を直接読みとる方法を採用したためダイナミックレンジは光学的零位法を用いた屈折計に比べ狭くなっている。直読法の場合は光束がホトセンサの中心より溶媒と溶液との屈折率差 ( $\Delta n$ ) によって式

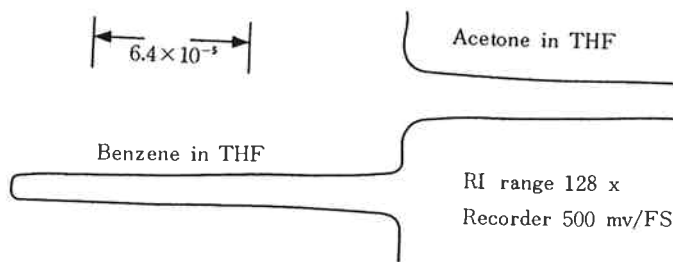


Fig. 16 Measurement of the dynamic range

(10)による  $\delta$  だけ変位し、 $\Delta n$  の増加とともに、ついには片側のセンサ面より光束がはずれてしまうことになる。計算によってダイナミックレンジを求めるとホトセンサのマスク巾  $100 \mu$  を考慮し最大  $2.3 \times 10^{-3}$  であることがわかる。実際使用するにあたっては本装置の場合最少検出感度  $2 \times 10^{-8}$  RIU を目標としているため、電気回路に要求されるダイナミックレンジはおよそ  $10^{-5}$  となるが回路素子の制限より  $10^{-4}$  (1mv~10v) としたため実質的なダイナミックレンジは、屈折率差にして  $1 \times 10^{-8}$  から  $4 \times 10^{-4}$  となった。Fig. 16 は溶媒にテトラヒドロフラン (THF) を用い溶液にアセトン、ベンゼンの THF 溶液を用いてダイナミックレンジを測定したものである。この結果より装置のレンジ切替は  $1 \times 10^{-6}/FS$  からバイナリストップにて  $256 \times 10^{-6}/FS$  までの9ステップと定めた。

[3] リニアリティ

2-2項で述べた様に  $\Delta n \leq 10^{-2}$  の範囲において光学的に直線性は保証されている。直線性の確認は次の3つ

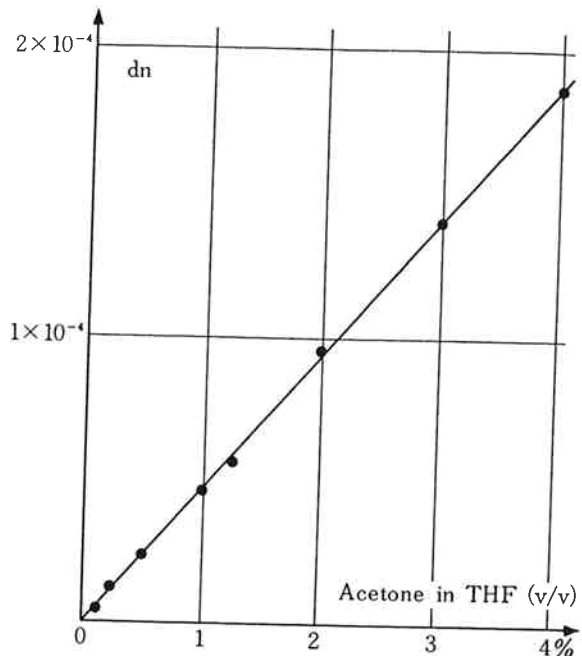


Fig. 17 Response of detector and solution concentration

の異なる方法によって行なった。

(1) 試料に THF 中に溶かしたアセトンを用いカラムを接続せずフローセル内に溶液が満たされた状態で検出器の応答を見た。Fig. 17 はこの結果を示したもので静的状態での直線性を示している。

(2) 試料に東洋曹達工業製標準ポリスチレンA-1000を、カラムに G3000H8,  $0.75 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$  を、溶媒に THF を用い流速  $1.0 \text{ ml/min}$  の条件下にて試料注入量を変化させた場合の直線性について調べ

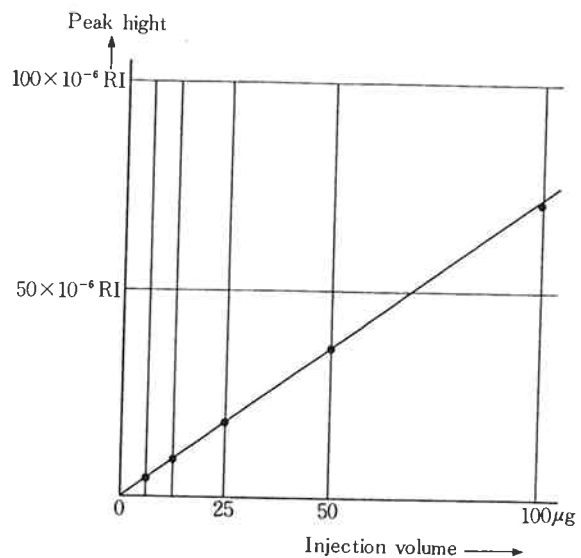


Fig. 18 Response of detector and injection volume



た。結果を Fig. 18 に示す。

(3) 試料に Saccharides を、カラムに TSK-GEL LS-450 NH<sub>2</sub> 0.75 cm × 30 cm, 溶媒に CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=65/35 を用い流速 1.5 ml/min の条件下にて試料注入量を変化させた場合の直線性について調べた。結果を Fig. 19 に示す。

以上3種の実験より本装置の直線性は静的状態、動的状態とも満足ゆく結果であった。

[4] ノイズ

試作した装置の総合性能を調べるうえで最も重要な項目はノイズとドリフトである。

ノイズに関しては DRI のホトセンサノイズを含む電気回路から発生するノイズと光路のゆらぎや光源のふらつきに起因する光学的ノイズがある。本

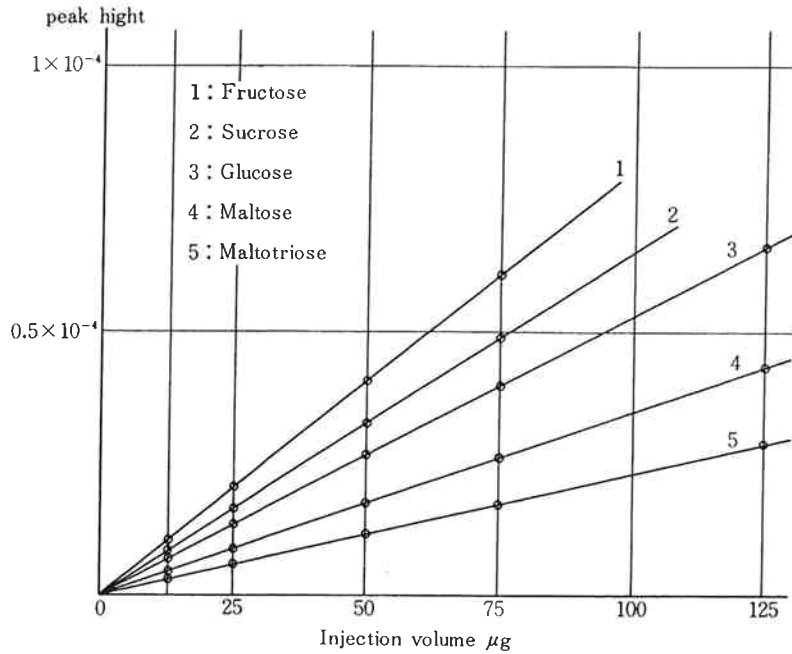


Fig. 19 Response of detector and injection volume

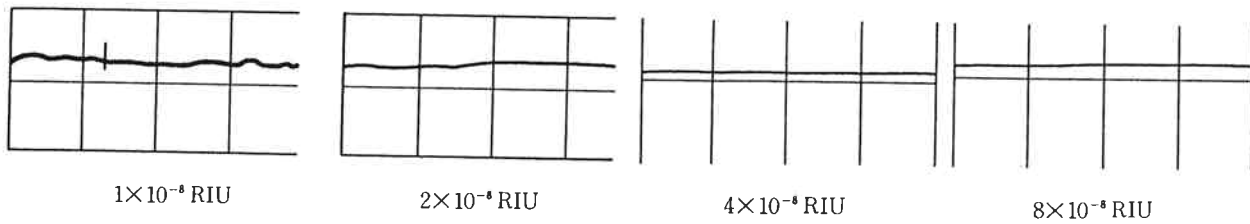


Fig. 20 Noise level of RI-8

装置は焦点距離が 150 mm と長く光学系内の温度ゆらぎも空気の屈折率の温度係数が  $dn/dT=1 \times 10^{-4}$  程度であることからこの部分の温度が変動すると光束が動揺しベースライン上のノイズも増加し易いため設計時に光学系を格納する部分の対流を極力押える配慮を行なった。電気ノイズと光学ノイズの両方を併せた場合のノイズは Fig. 20 に示すように  $1 \times 10^{-8}$  RIU 程度であり十分満足ゆくものであった。

この様に電氣的、光学的ノイズは装置自身に起因するものであるが液体クロマトグラフィシステムとして運転する場合は送液系の脈動がベースライン上にノイズとなって現われる。脈動とノイズの関係を定量的に論議することはまだ困難であるが2~3の実験例をもとにして考察してみた。

屈折率の圧力依存性は次式で示される。

$$\Delta n = (n-1)K \Delta p \quad (18)$$

定数  $K$  は水の場合  $46 \times 10^{-6}$ 、ベンゼンの場合  $94 \times 10^{-6}$  の値であることが知られており一般的に  $2 \times 10^{-6}$  と

して計算して差し支えない。 $\Delta p$  は両セル内の液圧差であるが、これはセルからドレインまでの導管抵抗によって決まるものである。ちなみに片方のセルの出口側に抵抗管を用いセル背圧を変化させた時の RI の応答を Fig. 21 に示す。

この結果から脈動すなわち流量変動とベースラインノイ

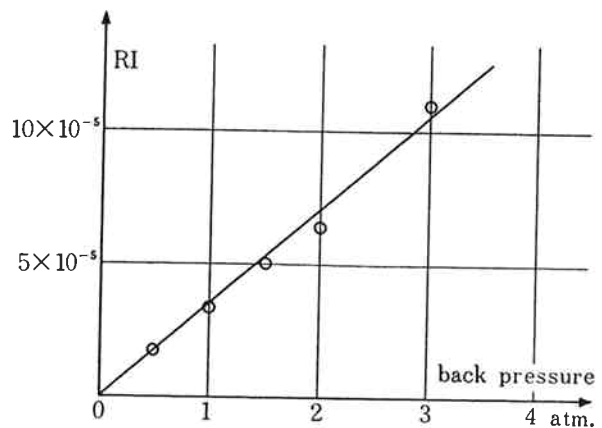


Fig. 21 Effect of compressibility

ズはあまり鋭敏に対応しない。このことは  $\Delta n$  と  $\Delta p$  の対応は  $\Delta n$  と密度の対応がもとになっているが液体の圧縮率は極めて小さく圧力が少々変化しても密度は変化しない。したがって  $dN/dP$  の値は極めて小さく静圧的な考え方では説明できない。しかし現実には脈動が大きいときベースライン上のノイズも増加することも事実であることから脈動とベースライン上のノイズとの関係は別の要因を考えねばならない。

次に考えられることはセル室内へ送液される流速が変動するとセル内での噴流の様相が変化するため、セル内で光束に照射される部分の密度分布が異なりノイズとなって現われるのではないかと考え、同一容量でフローセルへの入口、出口の構造の異なる2種類のセルを用いて実験した。実験に用いたセルは Fig. 13 のものと Fig. 22 のものである。

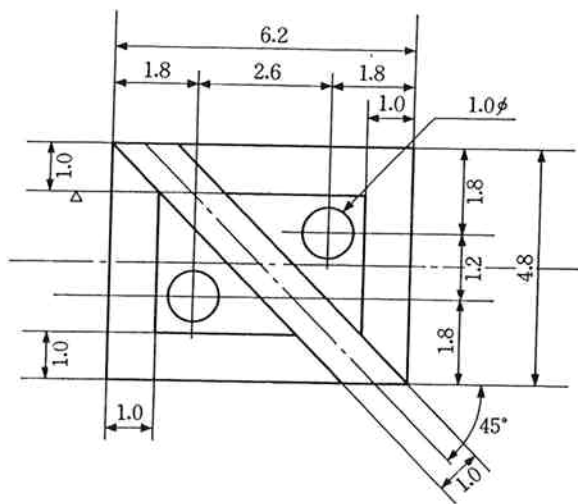


Fig. 22 Structure of the flow cell

2つのセルでの実験の結果、脈動に対するノイズの割合は Fig. 13 のものが若干良い程度で期待はずれの結果であった。ただ実験中に気付いたことは Fig. 22 のフローセルを用いた場合にピーク形状がある流量範囲においてリーディングを起すことが判明した。このことは一定流速の噴流が同一流体中に自由噴流した時、一定流速のコア領域と周囲の流体をまき込む遷移領域と、噴流の中心線流速が減少する発達領域に分類し考えた時、おのおの領域模様が複雑に変化するのに対し、Fig. 13 のものでは均一化がはかれることを示すものとして興味ある現象であった。

最後の実験は、屈折率の温度係数  $dN/dT$  が圧力係数  $dP/dT$  に比べ1桁大きいことに着目し、両フローセル内で光束に照射される部分の液温分布が異なった場合の脈動の影響について調べた。実験の方法としては光学ベンチを兼用するアルミブロック、(これは熱交換機としても作用している)とセル室の間に、ある温度勾配をも

たせる。

あるいはセル入口パイプを熱交換機内を通さないでセル室の温度とセルに流入する液の温度が異なるようにする、などの方法を用いた。この結果セル室と熱交換機の温度差が大きい時は脈動の影響を強く受ける、セル温度とセルへ流入する液温との差が大きいほど、また両セル間に流入するそれぞれの液温の差が大きいほど脈動の影響を強く受けることが判明した。

脈動すなわち流動変化とベースラインノイズの関係を定量的に結びつけることは今のところ困難であるが、少なくとも両セル間の温度差、流入液の温度差、更にはセル室と熱交換機の温度差が極めて大きなウエイトを占めていることは確かであり  $dN/dT$  のゆらぎがノイズの原因であることに間違いはないと考えられる。

#### [5] ドリフト

ドリフトの原因として考えられるものには光源ランプのヒラメントに起因するもの、電気回路のドリフト、温度に関するものがあるが、前2者は技術的に対応が可能でドリフトの程度も小さい。しかし温度に関するものはすでに述べた様に  $dN/dT$  が大きいため相当影響を受ける。温度変化がドリフトと結びつくためのパラメータとして、(1)両セル間の温度差、(2)光学系内の空気密度のゆらぎ、(3)光学系の温度歪、を考えた。

屈折計は極めて高感度で屈折率差  $10^{-8}$  を検出し得るものである。ここで屈折率差  $\Delta n$  と温度変化  $\Delta T$  の間には次式の関係がある。

$$\Delta n = (n-1)(c)(\Delta T) \quad (19)$$

$c$  は liquid thermal expansion と呼ばれるもので GPC で代表的に用いられる溶媒の屈折率の温度係数を計算すると THF で  $6.5 \times 10^{-4}/^{\circ}\text{C}$ 、水で  $7 \times 10^{-5}$ 、ベンゼンで  $6 \times 10^{-4}$  となる。このことは屈折率感度  $1 \times 10^{-8}$  RIU を目標とするときほぼ  $1.5 \times 10^{-5}^{\circ}\text{C}$  の温調精度を必要とすることになる。この値は実際上不可能に近い数字であるが両セル内の液温の差として考えればセルをマウントするセル台の構造と両セル内に流入する液温の差を一定に保つ熱交換機の構造、更には熱交換機とセル台の温度差をなくすような構造にしてやれば問題は解決出来るはずである。上記の内容をふまえて、試作した装置は光学ベンチにアルミブロックの鋳物を用い熱交換機とセル台を含む光学系が一体構造となるように設計し、かつランプの発熱が光学ブロックの温度を徐々に上昇させることを防止するための熱線吸収フィルタと空冷ブローアを組み合わせたフィンブロックにランプを取付け光学系外部に設置した。更に室温変動に対するドリフトの影響を除くため光学ブロックを温調した。温調方式は