

# 高速液体クロマトグラフ用誘電率検出器の研究

渡辺 訓行， 東 正人， 仁木 栄次\*

(1976年11月16日受理)

高速液体クロマトグラフ用誘電率検出器を試作，検討した。検出器応答の近似式を求め実験とよく対応することを確認した。誘電率セルは平面型円形構造をしており製作が簡単で表面仕上げも容易でありダイヤモンド研磨により，鏡面に仕上げて用いた。セルに空気が入っても容易に抜け，又，セルに起因するクロマトグラムの広がりもほとんど問題にならない程度であった。流速依存性はなく，流量変動によるベースラインの変動もなかった。得られた近似式を考察すれば，なお若干の感度向上の方向が示される。示差屈折率検出器を補うものとして今後期待しうる検出器である。

## 1 緒 言

高速液体クロマトグラフィーの著しい進歩はカラム充てん剤と検出器の開発に負うところが大きい。検出器に関しては，現在，UV（紫外吸収）検出器とRI（示差屈折率）検出器が2本の柱であり，各々，特徴を有している。すなわち，前者では，高感度ではあるがUV吸収のあるものにしか応答しないし，後者では，万能型ではあるが感度は十分とはいえない。これら二つの検出器の改良はいうまでもなく，他の新しいタイプの検出器の開発も各所で行われている。著者らは誘電率という物性に着目し，これが屈折率と同質のものではあるが，必ずしも相関があるわけではなく，感度面でRI検出器と相補するような立場に立つ万能型検出器となりうると考え，試作，検討した。

これまで，誘電率を利用する液体クロマトグラフ用検出器の報告例はそれほど多くない。Haderkaによる，測定法の幾つかの提案があるが実験による検証を与えていない<sup>1)</sup>。Vespalecらはn-ヘキサンを移動相溶媒に用いて実際の液体クロマトグラフ系に近い実験を行っているが，理論的にはともかく実験的にはやや不足点がある<sup>2)</sup>。例えば，溶質の誘電率から予想される感度を示さないものがあり，特に，アルコール類は極端に感度が低い。又，検出器の応答に流速依存性がみられ，高速化する場合には問題がある。Erbeldingはn-ヘキサンやジクロロメタンを移動相溶媒にして，容積0.7 mlのセルを用いた結果を報告しているが，高速液体クロマトグラ

フ用検出器としては2けたも大きい容積であり，実際にそぐわない<sup>3)</sup>。このようなことから，高速液体クロマトグラフ用検出器の立場を踏まえつつ，理論的にも十分対応のつく実験結果をうることを目的とし，一応の成果を得たので報告する。

## 2 検出の原理

Fig. 1に本研究に用いた誘電率検出器のブロック図を示す。1対の電極を対じさせた流通型検出セル（Fig. 2に示す）でコンデンサーを作り，これをインダクタンスと組み合わせて発振器を構成する。移動相溶液の誘電率によりコンデンサーの容量が決まり，発振周波数が決まる。移動相溶液の誘電率が微小変化すれば発振周波数もそれに応じて変化する。同一の発振器を2台組み，一方は対照側として移動相溶媒のみを流し，他方はサンプル

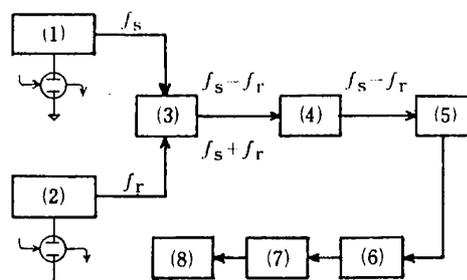


Fig. 1 Block diagram of dielectric constant detector

(1) Oscillator, sample side; (2) Oscillator, reference side; (3) Mixer; (4) Low pass filter; (5) Decade counter; (6) F-V converter; (7) Subtraction amplifier; (8) Chart recorder;  $f_s$ ,  $f_r$  are oscillation frequencies of sample side and reference side, respectively.

\* 東京大学工学部工業化学科：東京都文京区本郷 7-3-1

側として分離カラムを通った移動相溶液を流す。2台の発振器からの高周波をミキサーに通し二つの高周波の和と差に分ける。このうち差の成分だけをローパスフィルターで取り出し、F-Vコンバーターにより電圧に変換する。2台の発振器相互のしゃへいを極力、注意して行ったが、発振周波数を近づけると（～1 kHz 差程度）引き込み合って同一発振周波数になるため、あらかじめ50 kHzの周波数差を設定した。使用したF-Vコンバーターの変換周波数の上限が10 kHzのためローパスフィルターの後10進カウンターで周波数を1/10に落とす。このため50 kHzの周波数差は5 Vになり、減算回路でこれを相殺する。減算回路の出力をペン書きレコーダーに入れ通常のクロマトグラムを得た。

### 3 検出器

#### 3.1 誘電率セル

本研究に用いた流通型セルの概略をFig. 2に示す。平面型円形の電極が100 $\mu$ 厚さのテフロンをスペーサーにして対峙している。間げき部分の直径は10 mmである。この形の利点は表面の仕上げが容易なことである。電極の材質はステンレス鋼である。電極表面はダイヤモンド研磨（3 $\mu$ ペースト）により鏡面仕上げされた。液の流入流出用に内径0.6 mmのステンレスパイプを片側の電極に銀ろう付けした。両電極はテフロンのわく組みで中心が合うように固定される。締め付けによりテフロンスペーサーは圧縮され、電極間げきは約60 $\mu$ であった。これは、電極間げき部分のみによる容量（検出器として有効に働く部分の容量）の実測値（11.2 pF）より計算により求められた。これから間げき部分の容積

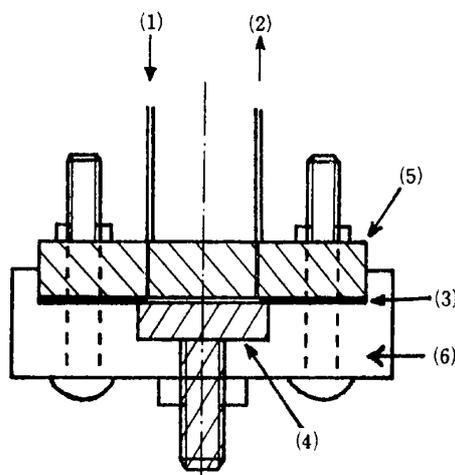


Fig. 2 Schematic profile of detection cell

(1) Inlet; (2) Outlet; (3) PTFE spacer, 100 $\mu$  in thickness; (4) Electrode; (5) Electrode, earth side; (6) PTFE

は約5 $\mu$ lである。電極支持部分などからの浮遊容量は誘電率既知の液体を満たしたときと空のときの容量の実測値から求められ、6.7 pFであった。

#### 3.2 発振器

発振及びバッファー回路をFig. 3に示す。周波数安定度の良いといわれるクラップ型発振回路により構成した。誘電率セルは発振回路の一部に組み込まれている。ステンレスパイプを取り付けた電極をアース側とした。セルに直列に入るインダクタンスのコアを出し入れすることにより発振周波数を微調整する。50 kHzの周波数差の設定はサンプル側のインダクタンスの微調整により行った。発振周波数は10 MHzに設定した。2台の発振器は電源投入後約1時間で安定し、発振周波数差の変動は約25 Hz/10 minであった。発振回路の後バッファー1段を経てミキサーに入れた。厚さ20 mmのウレタンシートで発振器の箱の部分の内張りする以外は特に温度制御を行わなかった。

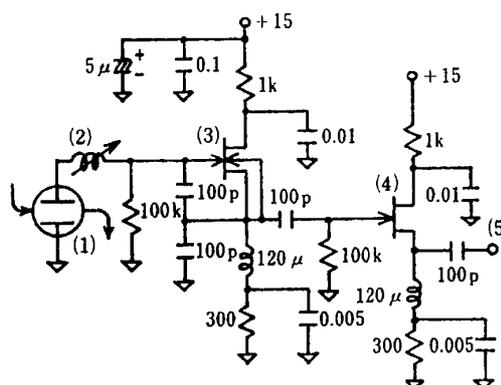


Fig. 3 Oscillator and buffer circuit

(1) Detection cell; (2) L, inductance for frequency fine tuning; (3) 3SK22; (4) 2SK19; (5) To mixer

#### 3.3 検出器の応答の近似式

誘電率セルに何も詰めないときの間げき部分による容量を $C_d$ 、浮遊容量を $C_f$ とする。誘電率 $\epsilon$ の液体を詰めたとき、容量は $C_f + \epsilon C_d$ となる。このときの発振周波数を決める同調回路はFig. 4で与えられる。 $C_0$ はセルに直列の、セル以外の容量で、Fig. 3における3SK22のゲート回路に入っている100 pF 2個の直列容量と考えるとよい。発振周波数は次式で与えられる。

$$f = \frac{1}{2\pi} \left\{ \frac{(k + \epsilon) C_d + C_0}{L(k + \epsilon) C_d C_0} \right\}^{1/2} \dots \dots \dots (1)$$

ここで  $k = C_f / C_d$

溶媒及び溶質の誘電率をそれぞれ $\epsilon_m$ 、 $\epsilon_s$ とし、十分低

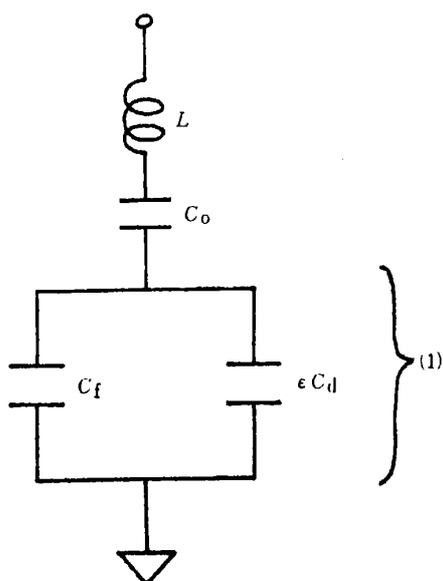


Fig. 4 Equivalent circuit for determining oscillation frequency

$C_d$  and  $C_f$  are the effective capacity and stray capacity of detection cell, respectively.  $\epsilon$ : Dielectric constant of liquid;  $C_0$ : Capacity except from detection cell;  $L$ : Inductance for frequency fine tuning; (1) Detection cell

濃度の溶質に対して, 移動相溶液の誘電率  $\epsilon$  を次式で近似する.

$$\epsilon = (1-m)\epsilon_m + m\epsilon_s = \epsilon_m + m(\epsilon_s - \epsilon_m) \dots\dots (2)$$

ここで  $m$  は溶質の体積分率である.

対照側とサンプル側の発振回路に対して,  $C_0$ ,  $C_d$ ,  $k$ ,  $L$  を近似的に等しいとおくと, それぞれの発振周波数は

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \left\{ \frac{(k + \epsilon_m)C_d + C_0}{L(k + \epsilon_m)C_d C_0} \right\}^{1/2} = f_0 \dots\dots (3)$$

$$f_s = \frac{1}{2\pi} \left[ \frac{\{k + \epsilon_m + m(\epsilon_s - \epsilon_m)\}C_d + C_0}{L\{k + \epsilon_m + m(\epsilon_s - \epsilon_m)\}C_d C_0} \right]^{1/2} \dots\dots (4)$$

式 (3), (4) の周波数差  $\Delta f$  は  $\frac{m|\epsilon_s - \epsilon_m|}{k + \epsilon_m} \ll 1$  のとき

$$\Delta f = \frac{m|\epsilon_s - \epsilon_m|C_0 f_0}{2\{(k + \epsilon_m)C_d + C_0\}(k + \epsilon_m)} \dots\dots (5)$$

と与えられる. 式 (5) より検出器の応答は  $m$  及び  $\epsilon_s$  に対して 1 次であることが分かる.

#### 4 装置及び試薬

高速液体クロマトグラフ装置: 東洋曹達製 HLC 802 UR に GPC ゲル TSKG 2000H (粒径  $5\mu\text{m}$ ) を内径

4 mm, 長さ 60 cm のステンレスカラムに詰められたものを 1 本ないし 3 本接続して使用した. 対照側は圧力のバランスをとるためにサンプル側と同数のカラムを接続した.

F-V コンバーター: テレダイン 4708 を用いた. 1 Hz ~ 10 kHz が (0.001~10)V に変換される.

ローパスフィルター: テレダイン op アンプ 1026 を用い 3dB 低下点を 500 kHz に設計した.

ミキサー: 3SK22 を使用した. ローパスフィルターへは 1 段バッファを通した.

10 進カウンター: SN 7414 で波形整形した後, 10 進カウンター SN 7490A に通した.

減算回路: テレダイン op アンプ 1026 を使用した.

LCR メーター: YHP 製 4261A, セルの間げき部容量及び浮遊容量の測定に使用した.

移動相溶媒: テトラヒドロフラン (THF), 和光試薬特級をそのまま用いた. 再使用に際しては蒸留した.

その他の試薬は市販品をそのまま用いた.

#### 5 実 験

THF を移動相溶媒とし, GPC 用分離カラムを使用した. GPC 用カラムを用いたのは, 分子サイズが類似のものは, ほぼ同じ溶出位置を示すこと, 若干溶出位置がずれてもピークの広がり, はほとんど不変なので, 種類の溶質について検出器の応答を直接比較できるためである. 試料注入はすべて THF 溶液として行った.

##### 5.1 検量線

Fig. 5 に溶質濃度に対する検出器の応答を示す. 横軸はカラム注入時の溶質の体積分率で表した. アセトン, シクロペンタン, シクロヘキサンでは直線性は十分であ

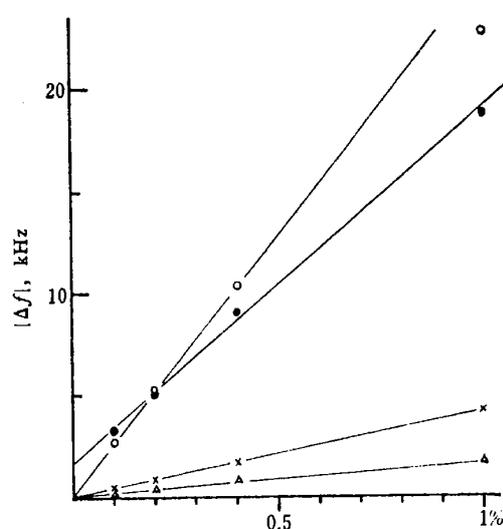


Fig. 5 Relation between responses of detector and solute concentration

△ Cyclopentane and cyclohexane; × Acetone;  
● Water; ○ Formamide

った。誘電率の大きいホルムアミドは濃くなると応答が低下するのがみられる。試料調製後 THF に水が吸収されるため水の検量線は若干ばらつき、かつ原点を通らなかった。

### 5.2 溶質誘電率 $\epsilon_s$ と応答 $\Delta f$ の関係

14 種の溶質について検出器の応答を求め、溶質の誘電率に対してプロットしたものを Fig. 6 に示す。誘電率の値は無極性溶媒中で測定された文献値のうち、本実験の測定温度に近い温度での値を採用した。この実験では、ピークの極大時には注入時より、ほぼ 10 倍うすめられることは、注入量とピークの広がり測定により確かめておいた。従って注入時の 1% 濃度は、検出セルでの極大時に 0.1% ( $m=10^{-3}$ ) となる。又  $C_d$  と  $k$  は LCR メーターで測定した。式 (5) において、数値、 $f_0=10^7$ ,  $C_0=50$  pF,  $C_d=11.2$  pF,  $k=0.6$ ,  $\epsilon_m=7.4$ ,  $m=10^{-3}$  を代入し、 $\epsilon_s$  に対して計算したものが Fig. 6 の実線である。THF のように比較的、極性の溶媒を用い、式 (2) のような粗い近似を使ったにしては、よく対応しているといえる。

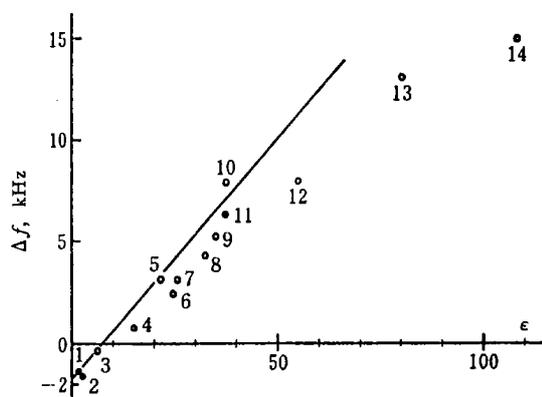


Fig. 6 Relation between response of detector and dielectric constant of solute

1: Cyclopentane; 2: Cyclohexane; 3: Methyl acetate; 4: Cyclohexanol; 5: Acetone; 6: Ethanol; 7: Acetylacetone; 8: Methanol; 9: Nitrobenzene; 10: Acetonitrile; 11: *N,N*-Dimethylformamide; 12: Dimethyl sulfate; 13: Water; 14: Formamide; Gel: TSK G2000H, particle size 5  $\mu$ m; Column: 1800 mm  $\times$  4 mm i. d., 28°C; Eluant: THE; Flow rate: 0.58 ml/min, 145 kg/cm<sup>2</sup>

### 5.3 クロマトグラムの測定例

Fig. 7 に 4 種の溶質についてのクロマトグラムを示す。誘電率検出器の後 RI 検出器を通過するように接続した。上が RI 検出器による応答で、下が誘電率検出器によるものである。いずれの場合も水によるピークが

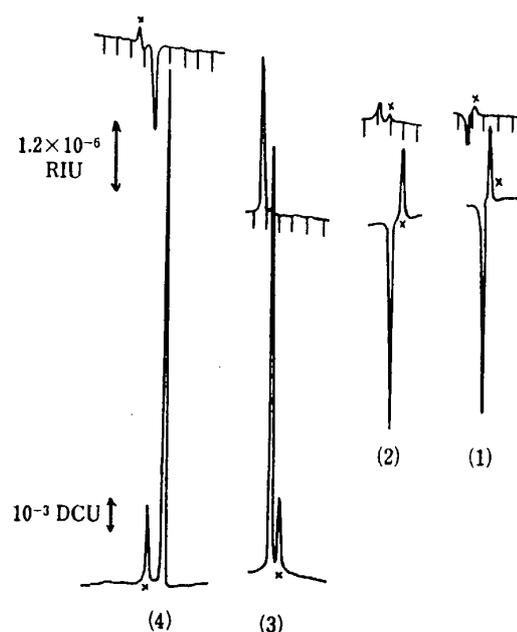


Fig. 7 Examples of chromatogram obtained by dielectric constant detector

Above: RI detector,  $1.2 \times 10^{-4}$  RIU/FS; Below: Dielectric constant detector; (1) Cyclohexane; (2) Cyclopentane; (3) Acetone; (4) Succinonitrile; Sample injection: 1% of solute in THE, 30  $\mu$ l; Obtained under same condition as Fig. 6;  $\times$  Water; RIU: Refractive-index unit; DCU: Dielectric constant unit

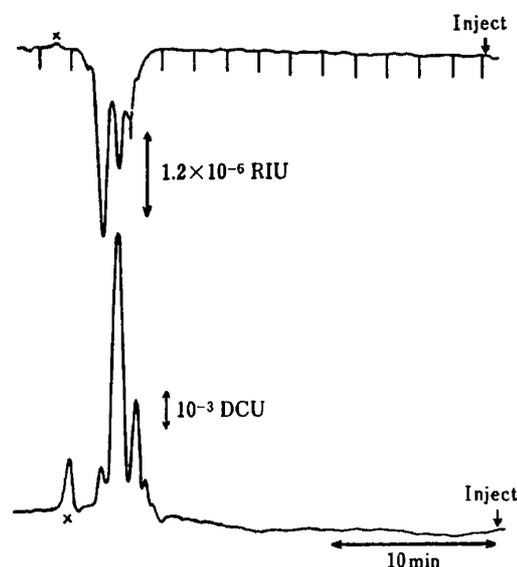


Fig. 8 Chromatogram of oligomer

Above: RI detector; Below: Dielectric constant detector; Sample: PEG 200, 2% in THE, 30  $\mu$ l; Obtained under same condition as Fig. 6;  $\times$  Water

現れている ( $\times$ 印)。溶媒の誘電率と屈折率に対する溶質のそれぞれの関係に応じてピークの向きが対応していることがよく分かる。Fig. 8 に PEG 200 の測定例を

示す。一連の化合物なので両検出器のピークの対応はよい。

#### 5.4 流速依存性

検出器の応答の流速依存性について検討した。溶質に *N,N*-ジメチルホルムアミドを用いた。注入時の濃度と注入量をそれぞれ 1%, 30  $\mu$ l と一定にした。流速を変えるとカラム効率 (理論段高さ) が変わるので, これを補正する必要がある。ガウス型の曲線を仮定し (本実験ではすべて妥当な仮定であった) ピークの広がりから, 検出セルにおける極大時の濃度を計算により求め, 100 ppm 当たりの応答として Fig. 9 に示した。流速による応答の変動はこの流速範囲ではみられないことが分かる。なお, 流量設定を変えることによるベースラインの変動はみられなかった。

#### 5.5 検出限界

$\Delta f \approx 25$  Hz を検出限界として, 幾つかの溶質についてこれを求めたものを Table 1 に示す。  $\Delta f = 25$  Hz は

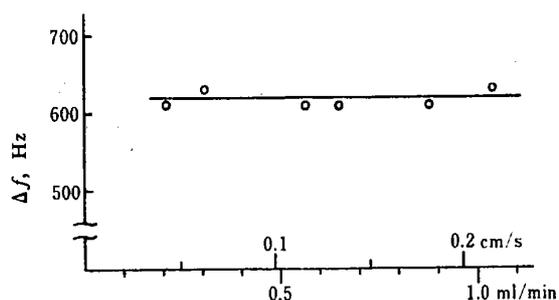


Fig. 9 Dependence of detector response on flow rate

Column : 1200 mm  $\times$  4 mm i. d.; Eluant : THF;  
Solute : *N,N*-Dimethylformamide, 100 ppm

Table 1 Lower limit of detection

Solute	$\epsilon$	ppm
Cyclopentane	1.965	16
Cyclohexane	2.023	16
Methyl acetate	6.68	100
Tetrahydrofuran	7.39	—
Cyclohexanol	15.0	37
Acetone	21.1	8
Ethanol	24.3	10
Acetylacetone	25.7	8
Methanol	32.6	6
Nitrobenzene	34.8	5
Acetonitrile	37.5	3
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	37.7	4
Dimethyl sulfate	55.0	3
Water	80.4	2
Formamide	109	2

Eluant : THF; Estimated from assumption that lower limit of detection corresponds to 25 Hz frequency change.

誘電率変化にして  $1 \times 10^{-4}$  単位に相当するものである。酢酸メチルのように移動相溶媒 THF に近い誘電率の溶質の検出限界は大幅に高くなる。セル部の温度調節, 発振回路の最適化, 高安定化などによって発振周波数差の安定性の改良の余地は十分にあり, (2~5) 倍の検出限界の向上が見込まれる。

## 6 総 括

高速液体クロマトグラフ用誘電率検出器を試作, 検討した。検出器応答の近似式を求め, 実験とよく対応することを確かめた。誘電率セルは平面型円形構造をしており製作が簡単で表面仕上げも容易であり, ダイヤモンド研磨により鏡面に仕上げ用いた。セルに空気を入れても容易に抜け, 又, セルに起因するピークの広がりも問題にならない程度であった。流速依存性はなく, 流量変動によるベースラインの変動もなかった。近似式からは発振周波数  $f_0$  とセルに直列の容量  $C_0$  を大きくすること, 移動相溶媒として  $\epsilon_m$  の小さいものを選ぶのが有利であるといえる。これらは相互にからみあうので, どれか一つだけ取り出して論じることができないが, 例えば, 他の因子がすべて変わらないとして  $\epsilon_m \sim 2$  の溶媒を移動相に用いるなら, 応答は誘電率単位にして, 本研究のものよりも 1 けたの向上し,  $10^{-5}$  単位の検出ができるであろう。しかし  $\epsilon_m$  が大きい場合でも, RI 検出器の感度が低い方面への応用は検討の価値があり, 今後期待しうる検出器である。

(1976年10月10日, 日本分析  
化学会第25年会において発表)

## 文 献

- 1) S. Haderka : *J. Chromatogr.*, **52**, 213 (1970); **54**, 257(1971); **57**, 181(1971); **91**, 167(1974).
- 2) R. Vespalec, K. Hana : *ibid.*, **65**, 53 (1972).
- 3) W. F. Erbelding : *Anal. Chem.*, **47**, 1983(1975).

☆

**Study of dielectric constant detector for high speed liquid chromatography.** Noriyuki WATANABE, Masato AZUMA and Eiji NIKI (Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

The oscillator type detector that causes an oscillation frequency change due to a minute change of dielectric property of mobile solution has been designed and constructed. The detection cell consisted of a pair of flat stainless steel electrodes separated from each other by a 60  $\mu$ m PTFE spacer. The volume of the cell is 5  $\mu$ l. The flat electrode is suitable to form a mirror plane by polishing. Experiments have been performed with a GPC column by using THF as a mobile phase. Response of the detector was independent of flow rate. The theoretical equation ap-

plicable to the response of the detector has been obtained and was tested with reasonable results. The responses are comparable to that of the conventional refractive-index detector in many cases but better than that of the conventional one in the favorable cases. The lower limit of detection is  $1 \times 10^{-4}$  (dielectric constant unit) but it may be improved one order of magnitude by choosing an optimum condition.

(Received Nov. 16, 1976)

### Keywords

Detector  
Dielectric constant  
Flow cell  
High speed liquid chromatography  
Refractive-index detector

## ヒドロキシナフトールブルー-過酸化水素系反応における 触媒作用を利用した極微量マンガンの定量

山根 兵, 深沢 力\*

(1976年10月30日受理)

ヒドロキシナフトールブルー (HNB) の過酸化水素による酸化反応はアルカリ性においてマンガンの共存により著しく促進されることから, この反応系を利用した反応速度法による極微量マンガンの定量法を研究した. HNB の酸化による吸光度変化 (青色が退色する) を 645nm で測定し,  $t$  に対する  $-\log A_t$  ( $A_t$  は  $t$  分後における吸光度) のプロットにより得られた直線の傾きから速度定数  $k$  を算出した. HNB  $2.0 \times 10^{-5}$  M, 過酸化水素  $2.7 \times 10^{-2}$  M, pH 10.4 という反応条件では検量線 (マンガン濃度と  $k$  との関係) は 5 ng Mn 付近まではほぼ直線となるが, 更にマンガンが増すと緩やかな曲線を示した. 5.0 ng Mn の場合の相対偏差パーセントは 4.5% ( $n=12$ ) であった.

他種イオンの多くは 1000 倍量程度の共存ではほとんど影響しないが, 鉄(III) は触媒作用を示して微量でも著しい正の妨害を示した. 本法の測定時間は 3 分程度と迅速であり, 感度は 0.01 ng Mn/ml であった.

### 1 緒 言

触媒作用を利用して反応速度の測定により極微量マンガン定量する方法としては, 古くから知られている過マンガン酸塩-シュウ酸塩系<sup>1)</sup>をはじめとし, 各種の酸化還元反応を指示反応 (indicator reaction) とする研究がなされている. なかでも芳香族アミン類<sup>2)~6)</sup>や各種染料<sup>7)~10)</sup>の酸化反応を利用するものが多く, 感度, 精度, 選択性あるいは操作の簡便さなどの特長を持ったものが報告されている. しかし, これらの特長の幾つかを同時に持ち合わせたような方法は見当たらず, 応用面から見ればなお多くの基礎研究が必要と思われる. 著者らも既にマラカイトグリーン-過ヨウ素酸カリウム系反応による方法を研究し, 応用した結果について報告した<sup>11)</sup>. 今

回は更に感度の向上と分析時間の短縮を目指して新たに  $o, o'$ -ジヒドロキシアゾ化合物を用いる方法について検討したところ, ヒドロキシナフトールブルー\*\* (HNB と略す)-過酸化水素系の反応が良いことが分かったので, この反応系を利用するマンガンの定量法を研究した.

本法の操作は簡単であり, 選択性は既報<sup>11)</sup>と同程度であったが, 感度は 0.01 ng Mn/ml で, これまでの多くの方法が (0.1~0.5) ng Mn/ml の感度であるのに対してより高感度であり, 又分析時間は約 3 分程度と迅速である.

### 2 試薬及び装置

マンガン標準溶液: 金属マンガン (99.99%) 0.250 g

\*\* 1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid, キレート滴定における指示薬として利用されている.

\* 山梨大学工学部応用化学科: 山梨県甲府市武田4丁目