

Glucose oxidase, galactose oxidase, cholesterol oxidase, and choline oxidase were immobilized and were used for determination of respective substrate in a continuous flow system. These enzymes were immobilized by reaction with glutaraldehyde onto the surface of alkylamino-bonded silica gel and packed in glass tubes (5 mm × 4 mm i. d.) as the enzyme reactors in the flow system. By positioning an electrolytic column just before the point of the immobilized enzyme reactors, the electroactive species such as L-ascorbic acid and uric acid in human serum could be eliminated. The hydrogen peroxide produced enzymatically in the enzyme reactors could be monitored amperometrically by an electrochemical flow cell. Calibration curves were linear for glucose in the range (5~700) mg dl<sup>-1</sup>, for galactose in the range (10~1000) mg dl<sup>-1</sup>, for free cholesterol in the range (5~200) mg dl<sup>-1</sup>, and for choline in the range (8~200) mg dl<sup>-1</sup>. Sam-

ple sizes were 5 μl for glucose and galactose assays, and 2 μl for free cholesterol and choline assays. But linear ranges could be changed by varying the sample sizes. The assays could be performed at a 120 samples h<sup>-1</sup> rate with satisfactory precision (<2% RSD) at a flow rate of 4.8 ml min<sup>-1</sup>. The immobilized enzyme preparations retained most of their original activities after repetitive use for more than 3 months, except for the immobilized galactose oxidase.

(Received Oct. 30, 1982)

### Keyword phrases

flow injection analysis with immobilized enzymes; amperometric determination; glucose, galactose, cholesterol, and choline in serum; electrolytic column for removing reducing substances.

## ナイロン 12 のゲルパーミエーションクロマトグラフィー

堺 正和<sup>®</sup>, 小川 俊夫\*

(1982年9月24日受理)

ナイロンのゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) は、その溶媒の種類が少ないこと、又溶媒の多くが高粘度であるため高温高压の条件が要求され、又その屈折率差が小さいことから、測定には高度な安定化が必要となり、その測定を非常に難しいものになっている。著者らはナイロン 12 の GPC について、*o*-クロロフェノール、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を溶媒とする 5 種類の溶出剤を用い、クロマトグラムの再現性や形状などの詳細な比較を行った。この結果 HFIP/トルエン (2/8) 混合溶出剤を用い、カラムに東洋曹達製 TSK-GEL (GMH6+G2000H) を使用することにより再現性のよい、かつ信頼性の高いクロマトグラムを得ることができた。又標準ポリスチレンによる検量線の作成も可能であるため、ポリスチレン換算の分子量分布も容易に求めることができた。

### 1 緒 言

ナイロンのゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) を行う場合まず問題になるのが溶媒であるが、その種類は少ない。

今までナイロンの GPC について報告されたものの多くはナイロン 6 { $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$ }<sub>n</sub> についてであり、溶媒もフェノール系が多く使用されている<sup>1)~5)</sup>。しかし、フェノール系溶媒は粘度が高く、溶解には加熱を必要とするなど、必ずしも最適な溶出剤とはいえない。

ナイロン 12 { $\text{NH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CO}$ }<sub>n</sub> に関してはヘキサメチルリン酸トリアミド (HMPT) 溶媒を用いて行ったものが報告<sup>6)</sup>されているにすぎない。HMPT のナイロン 12 の溶解性は高温 (100 °C) で長時間を必要とし室温では不溶である。又これら報告では再現性について記されておらず、又分散度の計算を試みたものも少ない。このためクロマトグラムの信頼性は低く、実用性は乏しいものである。

著者らは *o*-クロロフェノール (OCP) 及びヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を溶媒とする、5 種類の溶出剤を用い、ナイロン 12 のクロマトグラムの再現性や形状などの詳細な比較を行った。その結果、HF-

\* 宇部興産(株)枚方樹脂研究所：大阪府枚方市中宮北町 3-10

IP/トルエン (2/8) 混合溶媒系を使用すると, 常温付近でも再現性が良く, しかも信頼性の高いクロマトグラムを得ることができた. 以下にその詳細な検討結果を報告する.

## 2 実 験

### 2.1 試 料

分析に用いたナイロン 12 (屈折率  $n=1.51$ ) は現在市販されているものを減圧乾燥 ( $40^{\circ}\text{C}$ , 48 時間) した後, 実験に供した. 又標準ポリスチレン (PS) はプレッシャーケミカル社製及び東洋曹達製のものをを用いた (Table 1).

Table 1 Standard polystyrene

Pressure chemical				Toyo soda	
$M\ddagger$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$M\ddagger$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$M\ddagger$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$
$3.2 \times 10^6$	1.30	$2.04 \times 10^4$	1.06	$6.77 \times 10^6$	1.14
$2 \times 10^6$	1.30	$1 \times 10^4$	1.06	$4.48 \times 10^6$	1.14
$6.7 \times 10^5$	1.06	4000	1.10	$1.86 \times 10^5$	1.07
$1.1 \times 10^5$	1.06	2100	1.06		
$5 \times 10^4$	1.06	800	1.3		

† Molecular weight at the highest peak position of elution chromatogram

### 2.2 溶 媒

OCP ( $n_D^{25}=1.5565$ ),  $\alpha$ -クロロナフタリン ( $\alpha$ -CN) ( $n_D^{20}=1.6332$ ) 及びトルエン ( $n_D^{24}=1.4893$ ) は試薬特級, HFIP ( $n_D^{25}=1.2752$ ) はコマーシャルグレード (デュボン社製), トリフルオロ酢酸ナトリウム ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ ) は試薬一級をそのまま使用した.

### 2.3 装置及びカラム

実験に用いた装置は試作したもので, ポンプは協和精密 KHD 94 型プランジャーポンプを用い, 脈流消却器, 圧力計を備えている. カラムオープン及び試料注入部は常温  $\sim 200^{\circ}\text{C}$  まで昇温可能なものを試作し, 一定温度に保ち分析を行う, 試料注入はループ方式により常に一定量注入するようにした. 検出器は示差型屈折計 (昭和

電工製 SE-11 型) を常温で使用した. 流量測定は, 分取を可能にするためフラクションコレクター (大日本精機製 DFC-100) を用い, 容量法により行った. このシグナルはマーカーとして記録計に記録される.

カラムは東洋曹達製 TSK-GEL GMH6 (混合ゲルカラム) 2 本, 及び G2000H (低分子分析用) を用いた. これらカラムは有機溶媒系高速 GPC 用カラムで, GMH6 の排除限界分子量 (ポリスチレン分子量) は  $4 \times 10^8$ , G2000H は  $1 \times 10^4$  である.

実験条件は溶出剤によって若干異なるので Table 2 にまとめて示す. ここで流量の設定はカラムに加わる圧力の関係から, あまり圧力が上昇しないような流量を選んだ.

試料の調製は HFIP を用いない溶出剤の場合, 三角フラスコに試料を採取し, 一定量の溶媒を加えかくはんにより溶解を行った. HFIP を使用している場合は HFIP の気化が考えられるため, アンプルを用い試料採取, 溶媒添加後直ちに封管し試料溶液の作製を行った.

分散度 ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ) の計算は PS の検量線を作成しこれにより行った. 従って, ナイロン 12 の分布も PS 換算の値である.

### 2.4 分子量測定

装置は光源にヘリウム-ネオンレーザー (633 nm) を用いた低角度光散乱光度計 (KMX-6 クロマティクス社製) を用い, 分取試料をマイクロシリンジにて送液を行い常温にて散乱強度の測定を行った. なお分子量の計算は試料濃度が薄い ( $6 \times 10^{-4}$  g/ml) ので濃度一点法により行った. 633 nm における HFIP での示差屈折率 ( $dn/dc$ ) は  $0.2212$  g/ml である.

## 3 結 果

### 3.1 $o$ -クロロフェノール系溶出剤

OCP 系溶出剤はそれ自体粘度が高く, 常温でカラム圧力が上昇し, 測定が困難である. 粘度を下げるためカラムの高温化を行い,  $100^{\circ}\text{C}$  にて測定を行った.

見掛け上何ら問題のないクロマトグラムが得られた.

Table 2 Operating conditions

	Eluent				
	$o$ -Chlorophenol	$o$ -Chlorophenol/ $\alpha$ -Chloronaphthalene (5 : 5)	Hexafluoro- isopropanol	Hexafluoro- isopropanol (0.01 M $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ )	Hexafluoro- isopropanol/ Toluene (2 : 8)
Column	GMH6	GMH6	GMH6	GMH6	GMH6 (2本) + G2000H
Column temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	100	100	30	40	50
Flow rate (ml/min)	0.5	0.5	0.8	0.8	1.0
Detector sensitivity (RIU)	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$	$16 \times 10^{-5}$	$16 \times 10^{-5}$	$16 \times 10^{-5}$
Concentration (%)	0.5	0.25	0.4	0.4	0.4
Injection volume ( $\mu\text{l}$ )	400	400	200	200	400
Pressure ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ )	16	16	20	20	25
Chart speed (mm/min)	5	5	5	5	10

しかし、注入回数ごとにクロマトグラムの溶出位置の変動することが認められた (Fig. 1). これはゲルとナイロン 12 との間の吸着作用によると考えられる. 1 回目では吸着作用が強いため溶出が遅くなり, 2 回目以降それが次第に弱まり, ナイロン 12 の溶出位置が徐々に早くなるものと推定される<sup>2)</sup>.

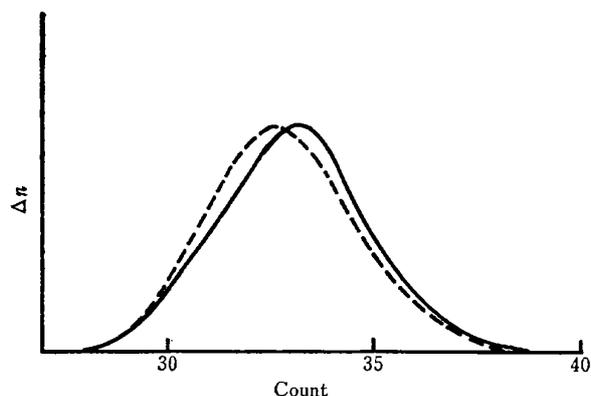


Fig. 1 Shift of chromatogram with number of injection

$\Delta n$ : Difference of refractive index of the solution and the eluent; —: First, - -: Fourth

PS の検量線によりナイロン 12 の分散度の計算を行った結果, 試料の注入回数に伴い Fig. 2 に示すように  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  が変化することが認められた. ところで OCP 溶出剤ではその屈折率とナイロン 12 との差が小さい (約 0.04) ことから, 高感度検出が要求され, GPC 測定上その条件は非常に厳しい. このため屈折率差を大きくすれば, OCP での問題が解決できるのではないかと考えられた. そこで OCP/ $\alpha$ -CN (5/5 容量比) 混合溶出剤を用い測定を行った.

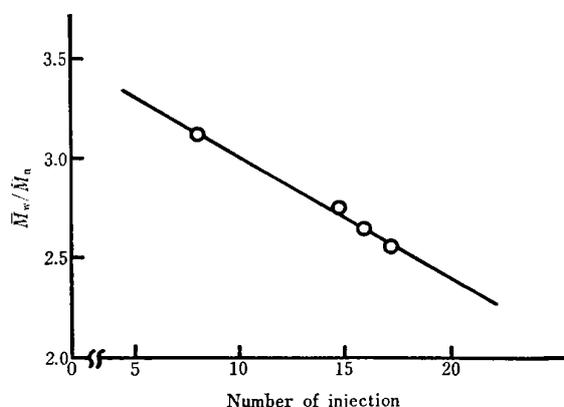


Fig. 2 Dependence of  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  on number of injection

$\bar{M}_w/\bar{M}_n$  was calculated by using the PS calibration curve

OCP/ $\alpha$ -CN 混合溶出剤も粘度が高いため, カラムの高温化が必要であった. 得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す. ここに示されるように高カウント側に不明ピークが現れ, ベースラインの戻りに影響を及ぼしている. しかし, 試料濃度は OCP 溶出剤の 1/2 ではほぼ同様なピーク面積のクロマトグラムが得られた. ここで, PS の検量線を用い分散度の計算を行った (Table 3). 分布値の変動は若干あるにしろ, その回数に影響されていることはない. ところが, Fig. 4, Table 3 に見

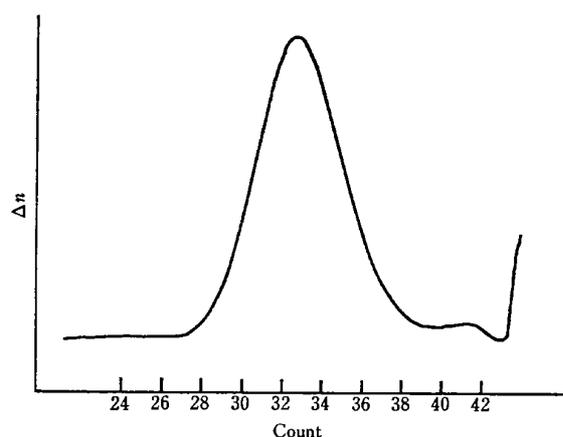


Fig. 3 Chromatogram of Nylon 12 obtained with OCP/ $\alpha$ -CN mixed solvent

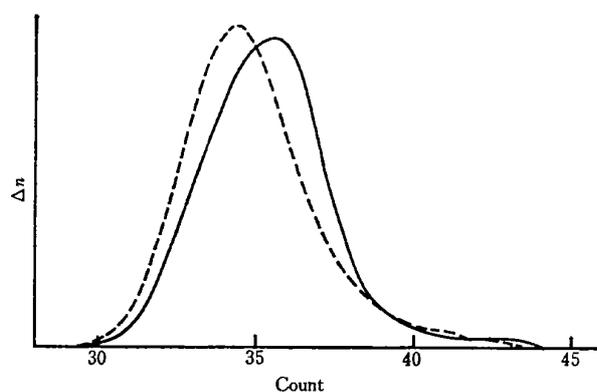


Fig. 4 Dependence of chromatogram on concentration

Sample concentration: - - - 0.25%, — 0.5%

Table 3 Analytical results by polystyrene calibration

	Concentration				
	0.25%		0.5%		
	1	2	1	2	3
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	4.29	4.62	5.91	5.72	5.69
Peak count	32.8	32.8	34.4	34.6	34.6

られるように濃度の影響が非常に大きい。これはオーバーロード効果によるもので、溶媒のもつ粘度が高いたためその影響は更に大きくなったと考えられる。このため、分散度の値は濃度により大きく影響を受けることになり求める値の信頼性が悪くなる。

以上のように、OCP 系溶出剤では注入回数に伴う分散度の移動や、濃度による影響が非常に大きいことが大きな問題である。

### 3.2 HFIP 系溶出剤

HFIP 溶媒は、ナイロン 12 の良溶媒で常温において十分溶解させることができ、更にその屈折率は 1.2752 と低く、ナイロン 12 との屈折率差が大きい (約 0.23) ため低濃度での測定が可能である。

Fig. 5 に HFIP 溶出剤で得られたクロマトグラムを示す。ここに見られるように、低カウント側にショルダー (矢印) が認められた。クロマトグラムの再現性については問題なく安定であったが、低カウント側のショルダー部分の不自然さはポリマーによるものかどうかを確認した。そこでこの部分を分取し、光散乱光度計によりその散乱強度測定を行った。もし、この部分にポリマーが存在すれば、散乱強度は溶媒の散乱強度に比べ強くなるなければならない (特に高分子側にあたるため、試料濃度が比較的薄くても十分散乱強度の確認はできる)。しかし測定結果は溶媒による散乱強度と同じであり、異常ショルダーはポリマーによるものではないことを示した。この原因については、現在のところ不明であり、クロマトグラムの信頼性は乏しい。そこで、これを改良するため、文献を参考にして 0.01 M のトリフルオロ酢酸ナトリウムを添加した HFIP 溶出剤を用いてみた<sup>7)</sup>。

0.01 M トリフルオロ酢酸ナトリウム-HFIP 溶出剤で得られたクロマトグラムを Fig. 5 に示す。先に示した

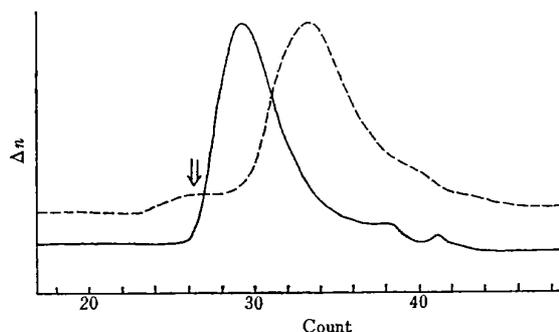


Fig. 5 Chromatograms of Nylon 12 obtained with HFIP and HFIP/0.01 M  $\text{CF}_3\text{COONa}$  as an eluent

— : HFIP/0.01 M  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ; - - : HFIP

(Fig. 5) クロマトグラムと比較すると、低カウント側ショルダーが消失し、又クロマトグラムの立ち上がりは急激で形状に大きな違いが見られる。しかしその再現性について問題はなかった。クロマトグラムの分散度の計算を行う場合、分子量既知で HFIP に溶解する単分散試料が必要となる。しかし PS は本溶媒に溶解しないため、現在のところ手に入る試料はなく検量線作成は不可能で、ナイロン 12 の GPC 測定を行い分散度の計算を行う場合に不都合が生じる点が問題である。強いて検量線を作成しようとする場合、ナイロン 12 の単分散試料を調製しなければならない。

このように、0.01 M トリフルオロ酢酸ナトリウム-HFIP 溶出剤ではクロマトグラムの分散度の計算を行えない欠点がある。そこで次に PS の検量線作成が可能で、HFIP の回収も行える溶出剤系として、HFIP/トルエン混合溶出剤を用いた。混合比はナイロン 12 が十分溶解する 2/8 の容量比とした。得られたクロマトグラムを Fig. 6 に示す。ベースラインが完全に戻りきらないうちに高カウント側に不明ピークが現れており、分散度の計算を行う場合ベースラインの取り方に影響し、求める分散度が大きく変動する。この不明ピークをなくすか、溶出位置をより高カウント側に移動させることができれば良い結果が得られるはずである。HFIP/トルエン混合溶出剤はそれ自体の粘度があまり高くなく、流動性も比較的良いため圧力上昇も少ない。そこで低分子分析用カラム (G2000 H) を 1 本追加し不明ピークの溶出位置を高カウント側に移動させてみた。この結果を Fig. 6 に示す。得られるクロマトグラムの立ち上がりも急激ではなく、再現性についても良好であった。又 PS による検量線の作成も可能である。PS の検量線を用いナイロン 12 の分散度の計算を行った (Table 4)。

ここに見られるように、その再現性もよく信頼性の高いクロマトグラムが得られた。又 HFIP/トルエン混合溶出剤での測定は比較的低温で行えること、高価な

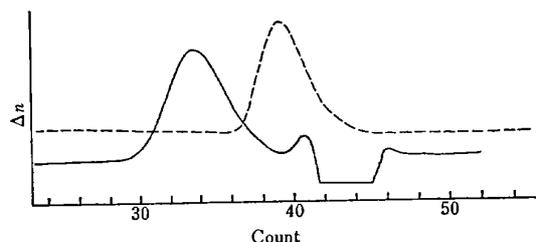


Fig. 6 Chromatograms of Nylon 12 obtained with a HFIP/toluene mixed solvent

— : GMH6 column system; - - : GMH6+G2000H column system

Table 4 Analytical results of nylon 12 with a HFIP/toluene mixed eluent and a polystyrene calibration

	Run number				
	1	2	3	4	5
$\bar{M}_n (\times 10^4)$	5.78	6.22	6.22	5.90	5.71
$\bar{M}_w (\times 10^4)$	13.35	13.88	14.69	12.89	12.84
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	2.30	2.23	2.36	2.18	2.25
Peak count	38.8	39.0	38.7	39.0	38.8

HFIP の使用量が少なくその回収も行えるため、実用性の面からも非常に有利である。

### 3.3 標準ポリスチレンを用いた場合の検量線

最後に、各溶出剤で作成した PS の検量線を Fig. 7 に示す。なお前述のように HFIP 溶媒は PS を溶解しないために検量線の作成はできなかった。Table 5 にはこれら溶出剤での検量線を用い、検量線作成に用いた PS の分布計算を行った結果を示す。検量線と Table 5 の値から判断する限り、各溶出剤における分離効果はあまり差がないようであるが、HFIP/トルエン (2/8) 混合溶出剤でカラムに GMH 6 (2本) と G 2000 H を用

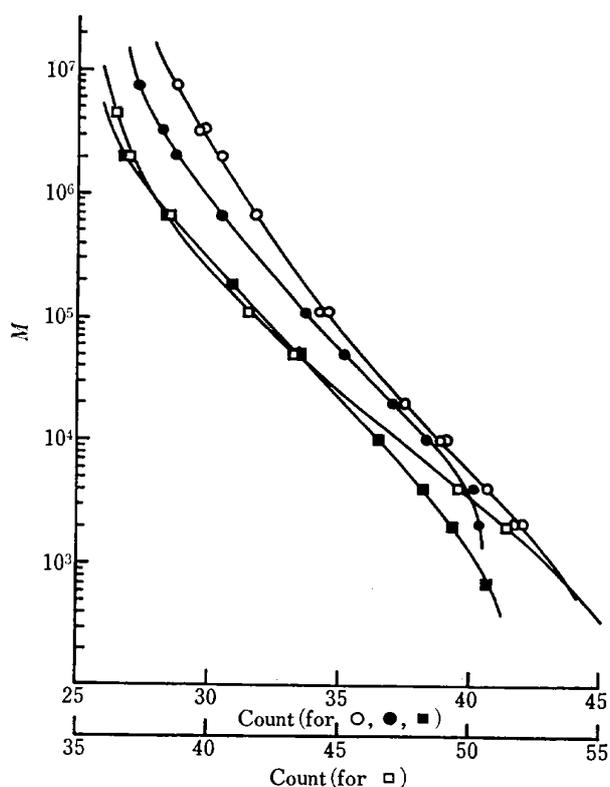


Fig. 7 Calibration curves of PS obtained with various eluents

Eluents—○: OCP/ $\alpha$ -CN, ●: HFIP/toluene, □: HFIP/toluene (G2000H added), ■: OCP

Table 5  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  of polystyrene used for preparation of calibration curve in various eluents

Polystyrene (M)	Eluent			
	<i>o</i> -Chlorophenol	<i>o</i> -Chlorophenol/ $\alpha$ -Chloronaphthalene (5:5)	Hexafluoroisopropanol/Toluene† (2:8)	Hexafluoroisopropanol/Toluene†† (2:8)
2100	1.34	—	—	—
4000	1.33	1.40	—	—
$1 \times 10^4$	—	1.26	1.29	—
$2.04 \times 10^4$	—	1.39	—	1.10
$5 \times 10^4$	1.31	—	1.50	1.15
$1.1 \times 10^5$	1.37	1.57	1.57	1.23
$3.9 \times 10^5$	1.54	—	—	—
$6.7 \times 10^5$	—	2.91	1.86	1.66
$1.8 \times 10^6$	—	—	—	2.14

† GMH6 column system; †† GMH6 + G2000H column system

いた場合、PS の分布は全体に狭い傾向にあり、分離効果がこれら溶出剤の中で最良であることを示している。

## 4 結 論

OCP 溶出剤ではナイロン 12 との屈折率差が小さく、高感度検出を必要とすること、又回数とともにピーク位置の移動、分散度の変動が生じた。その改良型としての OCP/ $\alpha$ -CN (5/5) 混合溶出剤の場合は屈折率差を大きくできたが、濃度効果が顕著であった。

HFIP のみの溶出剤では低カウント側に原因不明のショルダーを生じ、そのクロマトグラムの信頼性は乏しい。カルボン酸塩を添加した場合は一応良好なクロマトグラムが得られる。しかし PS が HFIP に不溶なため検量線作成に問題があった。

HFIP/トルエン (2/8) 混合溶出剤では、OCP 系で問題となっている点についてほぼ解決できる溶出剤であり、PS による検量線作成が行え分散度の計算も容易で、クロマトグラムの再現性もよく、その信頼性が高い。

今後、ナイロン 12 自身による検量線が作成できれば、HFIP/トルエン混合溶出剤による分子量分布が正確に求まるものと考えられる。

本研究を行うに当たり、宇部興産(株)枚方樹脂研究所岡本秀正博士には終始有益な御助言を頂いた。ここに感謝の意を表す。

(1981年10月, 日本分析化学会)  
第30年会において一部発表

## 文 献

- 1) E. K. Walsh: *J. Chromatogr.*, **55**, 193 (1971).
- 2) P. S. Ede: *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 275 (1971).
- 3) L. A. Prince, H. E. Stapelfeldt: "Gel Permeation Chromatography Seminar", Sixth International

- Seminor, Sep. (1968).
- 4) W. Conti, E. Sorta : *Eur. Polym. J.*, **8**, 475 (1972).
  - 5) G. L. Bata, J. E. Hazell, L. A. Prince : *J. Polym. Sci., Part C.*, **30**, 157 (1970).
  - 6) R. Panaris, G. Pallas : *Polym. Lett.*, **8**, 441 (1970).
  - 7) E. E. Drott : "Liquid Chromatography of Polymers and Related Materials", p. 41 (1977), (Marcel Dekker, Inc., New York).

☆

### Gel permeation chromatography of nylon 12.

Masakazu SAKAI and Toshio OGAWA (Hirakata Plastics Laboratory, Ube Industries, Ltd., 3-10, Nakamiyakitamachi, Hirakata-shi, Osaka)

In gel permeation chromatography (GPC), polymers have to be dissolved in an appropriate eluent which has low viscosity and high differential refractive index to the polymers. The eluent should be also satisfied for many other experimental requirements. In this study, we compared various eluents, *i.e.*, *o*-chlorophenol (OCP), an OCP/ $\alpha$ -chloronaphthalene ( $\alpha$ -CN) mixture, hexafluoroisopropanol (HFIP), HFIP/0.01 MCF<sub>3</sub>COONa, and a HFIP/toluene mixture, for this purpose. A home-made GPC apparatus equipped with a Showadenko Model SE-11 refractive index detector was used. GPC separations were made by using a set of two columns of Toyosoda TSK-GEL GMH 6. The temperature of column oven was varied depending upon eluents. The detector was operated at ambient temperature. Apparent chromatograms were good in OCP as eluent. However, the peak

positions and the widths of the chromatograms varied with injections. To improve this poor reproducibility,  $\alpha$ -CN was added into OCP. The chromatograms obtained thus, however, showed high concentration dependence, although the peak positions were reproducible. Generally, HFIP is a good solvent for polyamides. Pure HFIP, unfortunately, did not provide normal chromatograms: an unknown shoulder or peak appeared in lower elution count region. To eliminate this abnormal phenomenon, a small amount of CF<sub>3</sub>COONa was added into HFIP with reference to a published paper. The result was normal. We can obtain the molecular weight distribution curves from the chromatograms, if a calibration curve was prepared for Nylon 12. Unfortunately, polystyrene was insoluble in this eluent. Therefore, it was impossible to prepare or estimate the calibration curve of Nylon 12 from that of polystyrene. The most recommendable eluent was a HFIP/toluene mixture (2/8 in volume). Reproducible chromatograms were obtained together with the calibration curve of polystyrene. We conclude that a HFIP/toluene mixture was preferable to phenols as an eluent of GPC for Nylon 12.

(Received Sept. 24, 1982)

### Keyword phrases

gel permeation chromatography; hexafluoroisopropanol/toluene mixture as eluent; molecular weight distribution of Nylon 12; choice of eluent in gel permeation chromatography; gel permeation chromatography of Nylon 12.