

LC *talk*

特集号 “HPLC入門 – part 3”



2016



目 次

内 容	ページ
1. HPLC で用いる水のはなし (Vol.69 )	3
2. 無機陰イオンの検出法 (Vol.64 )	4
3. 送液ポンプのはなし (その 1) (Vol.95 )	5
4. 送液ポンプのはなし (その 2) (Vol.97 )	6
5. 電子天びんを知ろう (その 1) (Vol.66 )	8
6. 電子天びんを知ろう (その 2) (Vol.67 )	10
7. 化学発光検出のはなし (Vol.94 )	13
8. スケールアップによる分取条件の設定 (その 1) (Vol.68 )	14
9. スケールアップによる分取条件の設定 (その 2) (Vol.69 )	16
10. Q&A (読者のみなさまから) …1 ()	18
11. Q&A (読者のみなさまから) …2 ()	19

※表題・内容は、オリジナルの冊子からアップデートしている場合があります。

HPLC で用いる水のはなし

(LC talk Vol.69  より)

HPLC において、水は移動相や試料調製に不可欠なものです。移動相中に不純物が存在すると、バックグラウンドの上昇にともなうベースラインノイズの増大やドリフト、またマイナスピークやグラジエント分離時の不明ピークの出現といった現象が見られることがあります。一方、試料溶液中に不純物が存在すると、同じく不明ピークの出現や、その不純物が対象成分自身であれば定量値に影響を与えることになります。このような水が一因となって引き起こされるトラブルで困らないように、またデータの信頼性向上のために、今回は水についての基礎的なお話をします。

●水の純度は？

それでは、HPLC で用いる水にはどの程度の純度が必要でしょうか？「JIS K 0124:2013 高速液体クロマトグラフィー通則」には、以下の記載があります（引用）。

この規格で用いる水は、逆浸透法、蒸留法、イオン交換法、紫外線照射、ろ過などを組み合わせた方法によって精製した水で、分析に干渉しない水質のものとする。水質は比抵抗値、総有機物（TOC）、吸光度などを指標とし評価する。

では、もう少し具体的に見ていくことにしましょう。

●逆相クロマトグラフィーに用いる水は？

逆相クロマトグラフィーは、一般に有機物の分離分析に用いられる分析手法なので、移動相や試料調製に用いる水には有機物を十分に除去した水が望まれますが、用いる検出器によって求められる純度は異なってきます。紫外吸光度検出器を用いる場合は、市販 HPLC 用蒸留水を用いるのが一般的に推奨できます。市販 HPLC 用蒸留水は、紫外部に吸収を持つ不純物を取り除き、短波長域における吸光度を保証していますので、このグレードの水を用いれば基本的には安心であると言えます。

一方、自家精製の場合、蒸留やイオン交換だけでは通常不十分です。ぜひ超純水製造装置をお使いください。最近では、紫外線照射により有機物を分解させ有機体炭素（Total Organic Carbon：TOC）を低減できる超純水製造装置が主流となっています。特に、グラジエント分離法の場合、この TOC 量の差がゴーストピークの出力に顕著に現れることがあります。なお、蛍光検出器、質量分析計を用いる場合は、市販 HPLC 用蒸留水でも不十分なこともあります。このような場合、蛍光分析用グレードや LCMS 用グレードを用いるか、超純水製造装置を用いるのが良いでしょう。

なお、超純水は「JIS K 0211:2013 分析化学用語（基礎部門）」では、以下のように定義されています（引用）。

- a) TOC 値が非常に少なく、低効率が $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上（電気伝導率 $0.056 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下）に精製された水。
- b) 逆浸透膜、イオン交換樹脂（連続イオン交換体を含む）、活性炭、紫外線及び限外ろ過膜などを組み合わせて精製した水で、低効率が $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上（電気伝導率 $0.056 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下）の水。

●イオンクロマトグラフィーに用いる水は？

イオンクロマトグラフィーは、基本的にイオン性物質の測定に用いられる分析手法であることから、イオンが十分に取り除かれている水を用いることがもっとも重要になります。超純水製造装置から採水した水で、比抵抗が $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上ある水を用いるのがベストです。市販の HPLC 用蒸留水は、先述したように紫外吸光度検出器を用いた分析用として品質保証された水であり、必ずしも無機イオン分析用として保証された水ではありませんので、使用する際には、念のためその分析で問題を与えないことを確認してから使用した方が良いでしょう。一般に、「イオン交換水」や「精製水」と表示された市販の水は、メーカーによって品質がまちまちですのであまりお勧めはできません。以上の点から、イオンクロマトグラフィーでは、市販の水を用いるより超純水製造装置から採水した新鮮な水を用いるのがトラブルフリーで安心だと言えます。

●水の正しい扱い方は？

純度の高い水ほど、扱いには細心の注意が必要です。水は様々な物質を溶かし込みますので、空気と接触した時点で汚染がはじまると考えてください。市販の水を用いる場合は、なるべく早く使いきった方が良いでしょう。超純水製造装置では定期的なメンテナンスが重要です。市販の水も超純水製造装置の水も採水時は泡立てず、空気との接触を小さくすることが大切です。また、直接調製容器に採水するように心掛け、洗びんの使用は最小限にしましょう。洗びんの水は汚染され易い上、洗びん内壁から溶出したプラスチック可塑剤が溶け込んでいる可能性があります。（洗びんの水は頻繁に交換するようにしましょう。）なお、当然のことですが器具類は新鮮な水でよく共洗いして使用してください。（Nt）

無機陰イオン検出法

(LC talk Vol.64 Introductory より)

無機陰イオンは、水道水や河川水、各種飲料水をはじめ工業排水など、さまざまな分野で濃度が管理あるいは規制されています。ここでは、無機陰イオン分析における検出法について解説します。

●電気伝導度検出法

無機イオン分析には、イオンクロマトグラフが広く使われていますが、その代表的な検出法が電気伝導度検出法で、イオンの持つ電気伝導性を利用した方法です。一對の平行平板で構成された電極間に流入する移動相中に試料由来のイオン成分が含まれる場合、その領域では電気伝導度の変化が発生します。電気伝導度検出法はこの変化を検出するため、水溶液中でイオンとして存在しているものすべてが検出対象となります。それぞれのイオンは、当量電導度と呼ばれる固有の定数を持っており、この数値が大きいほど、大きなピークとして検出されます。単位は $S \cdot cm^2/mol$ で表され、1 mol あたりの電流の流れやすさを表しています。

電気伝導度検出法には、ノンサプレッサー方式とサプレッサー方式の2種類の方式があります。

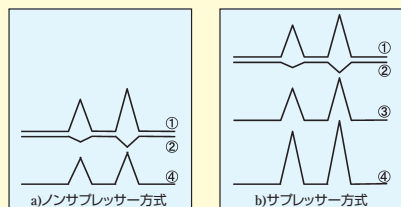
1) ノンサプレッサー方式

陰イオン分離カラムの出口に直接、電気伝導度検出器を接続する方式です。試料中の陰イオンは分離カラムで陰イオン交換し保持されるため、試料中の陽イオンと分離されます。この過程で試料中の陰イオンの対イオンは移動相の陽イオンとなります。また、この領域ではイオン交換のため移動相中の陰イオン濃度は減少します。電気伝導度検出器では、試料中の陰イオン、移動相中の陰イオン、陽イオンの3種類のイオンすべての電気伝導度の和として検出されます。(図1a) このため、使用する移動相には低濃度で溶出力が高い有機酸系の水溶液が用いられます。

この方式では、電気伝導度検出器さえあれば通常のHPLC装置で無機陰イオンの分析が可能になります。

2) サプレッサー方式

移動相組成を電気伝導度の小さい組成に変化させて、検出を容易にする方式をサプレッサー方式と呼んでいます。移動相には炭酸ナトリウム水溶液などが用いられます。陰イオンを分離するときには、ナトリウムイオンの存在により溶出イオンである炭酸イオンが生成し、検出器の手前でナトリウムイオンを除去することで弱酸の炭酸水に組成変化し電気伝導度が低くなります。試料中の無機陰イオンが溶出する領域では、対イオンとして存在する水素イオン濃度が高くなるため感度が向上します。(図1b)



①試料中陰イオン、②移動相中陰イオン、③移動相中水素イオンの各濃度変化による電導度変化、④得られるクロマトグラム

図1 電気伝導度検出の原理

ただし、サプレッサーによる、この感度上昇は陰イオン分析の場合だけで、陽イオン分析では原理上感度は上昇しません。

●直接吸光光度検出法

無機陰イオンの中にも紫外域の波長で吸収を持つものがあります。亜硝酸イオン、臭化物イオン、硝酸イオンなどは210 nm 付近の波長で検出が可能です。190 nm 付近では、さらに塩化物イオンなども検出が可能です。ただし、ノンサプレッサー方式で用いられる有機酸系の移動相の場合には、移動相自体がこの210 nm 付近の波長領域で吸収を持つため利用できません。サプレッサー方式で用いられる吸収の少ない炭酸系移動相との併用が一般的です。

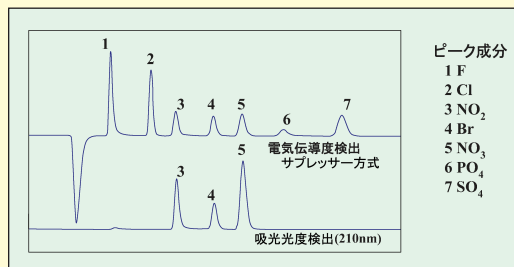


図2 電気伝導度検出と直接吸光光度検出の例

●間接吸光光度検出法

吸光度の高い移動相を用い、吸光度の小さい無機陰イオンが溶出することで生じる吸光度変化を利用した方法です。移動相に添加された紫外吸収を持つイオンが、試料中の陰イオンとイオン交換し、濃度変化することで吸光度変化が生じます。このため、使用する移動相は低濃度で溶出力が高く、モル吸光係数が高い組成である必要があります。

吸光度は負の変化となるため、得られるクロマトグラムも負のピークとなります。また、ピークの大きさは、試料濃度に比例するため、当量電導度の低いイオンほど相対的に感度上昇が期待できます。

図3は逆相系のカラム(ODSカラム)を用いた間接吸光光度検出の例です。移動相に添加されたイオン対試薬がODS表面で擬似イオン交換基として作用するため、無機陰イオンが分離されます。検出波長は、検出のために移動相に添加した有機酸の吸収波長を参考に決定しますが、この場合は282 nmです。また、この有機酸は、陰イオンを分離するための溶出イオンとして作用します。(le)

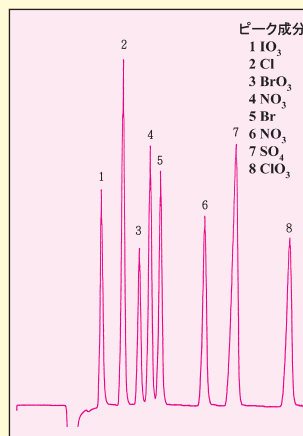


図3 間接吸光光度検出の例

送液ポンプのはなし (その1) …基本構造

(LC talk Vol.95 Introductory より)

今回と次回は、HPLC 装置の心臓部とも言える送液ポンプの基礎講座です。その 1 では、送液ポンプの基本構造についておはなしします。

● 送液ポンプの仕組み

HPLC で用いられる送液ポンプとしては、往復運動形ポンプ（別名プランジャーポンプ）が最も広く用いられています。図 1 に、往復運動形ポンプの構造（模式図）を示します。

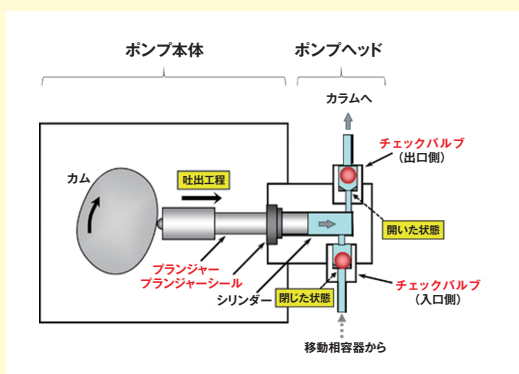


図1 往復運動形ポンプの構造(模式図)

往復運動形ポンプでは、プランジャーがシリンダー内を往復運動し、移動相の吸引・吐出を繰り返して移動相を移動相容器からカラムへと送ります。ポンプのシリンダー容量は、一般に分析用で 10 ~ 100 μL 程度であり、ポンプヘッドは 2 連のものが主流です。これは、2 つのポンプの位相をずらすことにより（片方が吸引している時、もう一方は吐出している）、脈流を低減して安定な送液を可能とするためです。

● プランジャー

プランジャーは、パルスモーターに付けられたカムの回転によりシリンダー内を往復運動し、移動相を移動相容器からカラムへと送り出すためのものです。図 2 に、プランジャーの例を示します。



図2 プランジャーの例

この写真で左側の半透明の部分が接液部分で、材質としては一般にサファイアが用いられます。プランジャーの太さは、機種や仕様によって異なります。

● プランジャーシール

プランジャーシールは、プランジャーとポンプヘッドの後ろ側（ポンプ本体側）をシールして、移動相がポンプ本体側に漏れないようにするためのものです。図 3 に、プランジャーシールの一例を示します。



図3 プランジャーシールの例

プランジャーシールの材質としては、超高分子ポリエチレン樹脂や添加剤入りふっ素樹脂などが用いられます。プランジャーシールは、送液ポンプ駆動時、プランジャーと常に摩擦状態にありますので、消耗品として定期的な交換が必要です。特に、りん酸塩緩衝液を用いる際には、早目の交換がお勧めです。

● チェックバルブ

チェックバルブは、逆止弁とも呼ばれ、ポンプヘッドの入口と出口に付いており、吸引・吐出工程における移動相の逆流を防いでいます。移動相吸引時には入口側チェックバルブが開き、出口側チェック弁が閉じます。一方、移動相排出時には出口側チェックバルブが開き、入口側チェック弁が閉じるようになっています。

チェックバルブには、図 4 に示すようなボールとボールシートと呼ばれる部品が入っており、ボールの上下により開閉を行っています。一般に、ボールはルビー、ボールシートはサファイアでできています。

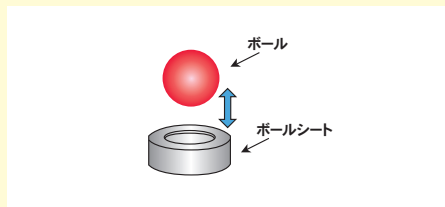


図4 ボールとボールシートの例(模式図)

図 4 において、上方向から圧力がかかるとボールが下に移動してボールシートに密着し、移動相を止めます。逆に、下方向から圧力がかかるとボールが上方向に移動して移動相を流すわけです。図 1 は吐出工程ですから、「入口側：閉－出口側：開」です。

送液ポンプの基本構造が分かったところで、次回は送液ポンプのメンテナンスとトラブル対処のポイントについておはなししましょう。

(MK)

送液ポンプのはなし（その2） …メンテナンスとトラブル対処

（LC talk Vol.97 Intrductory より）

その1では、送液ポンプの基本構造についてお話ししましたが、いかがでしたでしょうか？その2では、送液ポンプのメンテナンスとトラブル対処のポイントについて解説したいと思います。

■ メンテナンス

送液ポンプは、HPLC 装置の中で最も忙しく、長い時間稼働していますので、安定した送液のためのメンテナンスが大変重要です。図1で、送液ポンプの構造を復習しながら、メンテナンスのポイントを具体的に見ていきましょう。（その1で示した図では「吐出工程」でしたが、ここでは比較のため「吸引工程」にしました。）

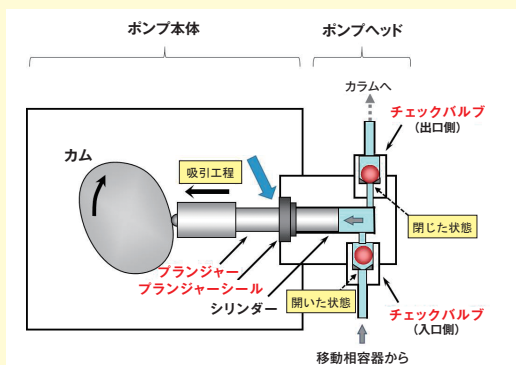


図1 送液ポンプの構造(模式図)

● プランジャーシール

送液ポンプの各部品の中で最も交換頻度が高いものがプランジャーシールです。プランジャーシールは、送液ポンプ駆動時、プランジャーと常に摩擦状態にありますので、定期的な交換が必須です。通常のダブルプランジャーポンプでは、左右のポンプヘッドのプランジャーシールを同時に交換します。

プランジャーシールの交換周期は、装置の取扱説明書に記載されていますが、あくまで一定条件下での目安であることにご注意ください。一般に、高圧、高流量で送液するほど、劣化が早くなります。また、移動相の塩濃度が高いほど、早目の交換がおすすめです。これは、プランジャーシールからポンプヘッド後側（図1の青矢印の部分）へにじみ出た移動相が乾燥し、析出した塩がシールを傷付けるためです。特に、りん酸塩緩衝液は、乾燥すると硬い結晶となりますので、最悪の場合、シールのみならずプランジャーを傷付けることがあります。

このようなことを防ぐため、送液ポンプには、通常プランジャーの後側を水で自動もしくは手動で洗浄できる専用の洗浄ラインがあります。お使いの装置でご確認ください。

プランジャーシールの交換手順は、以下の通りです。ただし、機種によって細かい部分が異なりことがあるので、お使いの装置の取扱説明書で確認してください。交換作業は、慣れればそれほど難しくありません。

【プランジャーシール交換手順】

- ① プランジャーが一番奥に引っ込んだ状態で、ポンプを停止します。これは、ポンプヘッドを取り外す際、プランジャーが折れるのを防ぐため、絶対忘れないようにしてください。通常、このようなサービス機能が装置に装備されていますので、ご確認ください。
- ② ポンプヘッドに接続されている配管類を外します。
- ③ ポンプヘッドを取り外します（図2）。この時、ポンプヘッドは、プランジャーに沿って水平にゆっくり引き抜いてください。

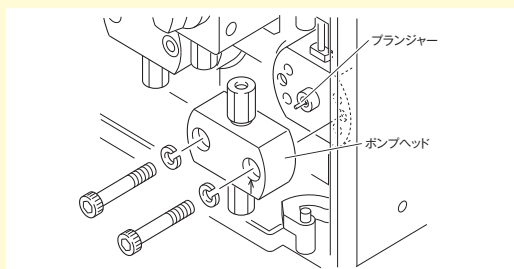


図2 ポンプヘッドの取外し

- ④ シール脱着用具（機種により形状が異なります）を用いて古いシールを取り出します（図3）。シール脱着用具は、両端の形状が異なり（古いシール用と新しいシール用）、間違えないようにしてください。
- ⑤ 清潔なガーゼに2-プロパノールを浸して、ポンプヘッド内側とシール取付部に付着しているシールカスなどを拭き取ります。ただし、緩衝液使用時には、最初に水で拭き取ってください。
- ⑥ 新しいシールをシール脱着用具に取り付けてポンプヘッドに垂直に差し込み、シール脱着用具をゆっくり引き抜きます（図4）。新しいシールを扱う時には、先の尖ったピンセットを絶対に使わないようにしてください。

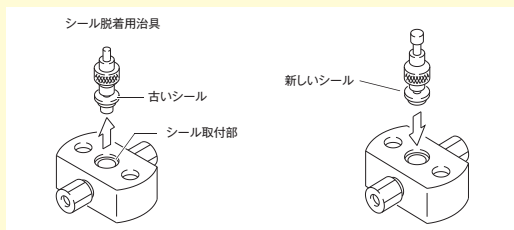


図3 古いシールの取出し 図4 新しいシールの取付け

- ⑦ ポンプヘッドを取り付け、配管類を接続します。
- ⑧ ポンプを駆動させ、圧力が安定しているか、液漏れがないかをチェックします。

● ブランジャー

ブランジャーのメンテナンスは、定期的な傷の確認と汚れの拭き取りです。ブランジャーを取り外し、その表面を肉眼もしくはルーペで確認します。傷が確認されれば交換、傷がなければ、清潔なガーゼに2-プロパノールなどを浸して、ブランジャー表面の汚れ（付着物）を拭き取ります（緩衝液使用時、水→2-プロパノール）。

● チェックバルブ

チェックバルブのメンテナンスは、基本的には超音波洗浄です。各チェックバルブをポンプ本体から取り外し、2-プロパノール（緩衝液使用時は、水→2-プロパノール）などを入れたビーカーに浸して超音波洗浄を行います。取り付ける時には、入口側と出口側を間違わないようにご注意ください。なお、チェックバルブは、非常に精密な部品ですので、一般的に分解洗浄は不可です。

● フィルター類

送液ポンプに付いているフィルター類としては、ポンプ出口に付いているラインフィルター（ブランジャーシールの削りかすやポンプ部品や移動相由来の微粒子などをトラップ）、移動相吸引チューブ（サクシオンチューブ）の先に付いているサクシオンフィルター（移動相中の微粒子をトラップ）があります。これらも定期的に超音波洗浄します。

■ トラブル対処

日常的にHPLC分析を行っているとき、いろいろなトラブルに遭遇します。よくあるトラブルの症状には、以下のものがあります。

- | | |
|--------------|-------------|
| a) 圧力の上昇 | f) 感度のふらつき |
| b) 圧力の変動 | g) 保持時間の変動 |
| c) ノイズの増大 | h) ピーク面積の変動 |
| d) ベースラインの変動 | i) ピーク形状の異常 |
| e) 感度の低下 | j) 不明ピークの出現 |

これらの症状の中で、通常送液ポンプが原因として関係するのは、a), b), c), g) です。（もちろん、他の症状に対して間接的に関わっていることもあります）

● 圧力の上昇

圧力上昇は、ポンプの圧力上限リミットの警告音ではじめて気が付くことが多々あります。圧力上昇は、急に起こる場合と徐々に起こる場合とがありますが、その主な原因は詰まりです。詰まっている箇所特定は、ポンプヘッドの下流側から順次配管を外して圧力変化を確認して行きます。一般的には、カラム入口、配管類、検出器セルでの詰まりが多いのですが、送液ポンプのラインフィルターが詰まっていることもあります。ラインフィルターが原因であれば、取り外して超音波洗浄を行います。洗浄では回復しない場合には、フィルター部（フリット）を交換します。

● 圧力の変動

圧力の変動は、なかなか気付きにくいものです。お使いの装置に圧力モニタ値をクロマトグラム上に表示できる機能があれば、ぜひ活用しましょう。圧力変動の原因としては、第一に送液ポンプが疑われ、ポンプ内の気泡、ポンプの液漏れ、チェックバルブの動作不良が挙げられます。

ポンプ内の気泡は、ドレインバルブを開き、ドレインチューブに注射器を取り付け、ポンプをバージしながら吸引除去します。何度バージしても気泡が溜まる場合、サクシオンフィルターが詰まっている可能性があります。この場合、ポンプ吸引時、サクシオンチューブ内が陰圧になり、気泡が発生します。サクシオンフィルターを超音波洗浄しても回復しない時には、新品と交換します。

ポンプの液漏れでは、ブランジャーシールを交換します。ブランジャーシールを交換しても改善されない場合には、ブランジャーに傷が付いている可能性がありますので、表面を確認し、必要な場合、交換します。

チェックバルブの動作不良は、主として図5に示すような原因により、入口側チェックバルブで起こります。超音波洗浄で回復しなければ交換です。

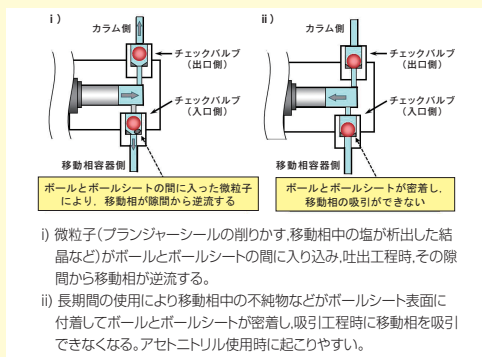


図5 チェックバルブ動作不良の原因

● ノイズの増大

ノイズ増大の原因の多くは検出器関連ですが、送液ポンプに関わるノイズの上昇もあります。これは、主に示差屈折率検出器や電気伝導度検出器など圧力変動の影響を受けやすい検出器で起こります。ただし、吸光度検出器の短波長域でも起こることがあります。ノイズ周期がポンプの動作と一致する場合、ポンプが疑われますので、圧力変動の対処に従います。

● 保持時間の変動

保持時間変動には、種々の原因が考えられます。その中で、送液ポンプの送液不良もよくある原因の一つです。これについても、圧力変動の対処に従います。

以上、送液ポンプのメンテナンスとトラブル対処のポイントについてお話ししましたが、トラブルにはいろいろなケースがあり、語り出すととても紙面が足りません。また、別の機会に詳しくお話ししたいと思います。（Mk）

電子天びんを知ろう（その1） …計量の不確かさとは？

（LC talk Vol.66  より）

島津製作所が天びんの自社生産を開始して2016年で102年を迎えます。その間における、もっとも革新的な出来事は天びんの電子化、いわゆる電子天びんの登場です。電子天びんは、その操作の容易さや測定の早さなどから急速に普及しました。ところが、その簡便さの裏には落とし穴が隠れており、それに気付かず使って大きな過ちを犯してしまう恐れもあります。電子天びんを正しく使うためにはどうしたらよいか、より正確に安定して計量するにはどんなことに気を付ければよいか…について、2回にわたってお話したいと思います。今回はその1回目として、天びんの計量値に含まれる不確かさの種類を中心にお話します。

■電子天びんの仕組み

●電子天びんがどんな原理で動いているのか、先ずはその仕組みを知ることが理解を深める近道です。電子天びんの仕組みには、主に次の2種類があります。

1. 電磁力平衡式
2. 電気抵抗線式（ロードセル式）

これらの原理はまったく異なりますが、いずれにも共通に言えることは、質量を直接量っているのではない、ということです。お皿に下向きにかかる力を量り、その力を電気信号に置き換えてデジタル表示しているのです。力を量る手段として、電磁力平衡式では磁石とコイルで発生させる電磁力を、電気抵抗線式では力で曲がる構造の金属に取り付けた歪ゲージの抵抗値の変化を利用しています。

●では、何故電子天びんは量ってもいない質量を表示できるのでしょうか？それは、質量の基準である分銅をお皿にのせて、「この力は〇〇グラムに相当します」ということを電子天びんに教えて換算させているからです。逆に言うと、この換算が正しく行われていない電子天びんは正確な質量を表示できません。

■不確かさの種類

●電子天びんの計量値には、不確かさが含まれます。この不確かさをできるだけ小さくすれば、より正確に計測することができます。そのためには不確かさのことをよく知ることが大切です。不確かさは、どのよう

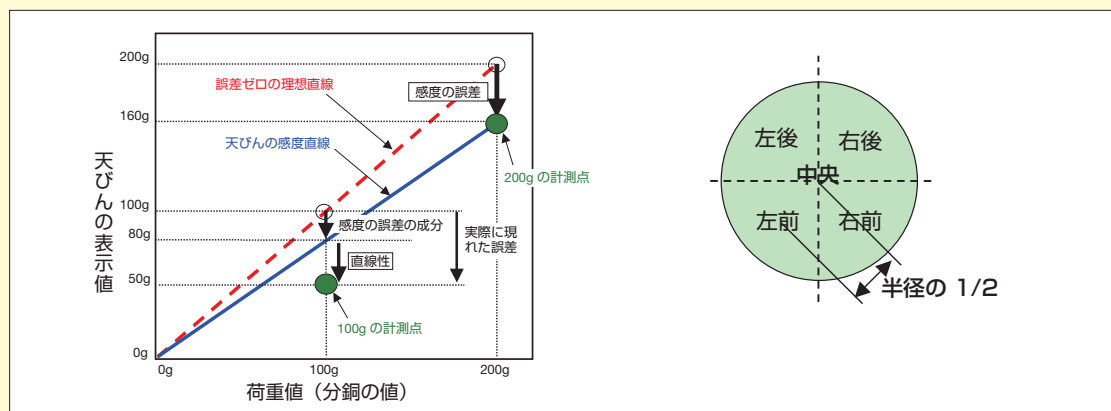
なときにどのような現れ方をするのか、様々な種類があります。その代表的なものをご紹介します。

1. 感度の誤差

天びんの計量値が正しい値からズレている割合を示します。通常、天びんのひょう量（測定上限荷重値）付近の計測点におけるズレ量で表します。極端な例ですが、ひょう量200 gの天びんの場合、200 g分銅をのせて160 gと表示すれば感度の誤差は200 gで-40 gとなります。そして計測範囲全体にその荷重比例配分されたズレ量が誤差として含まれることを表しています。例えば、100 gの計測点は200 gの半分ですから、ズレ量も半分の-20 gが誤差として含まれることになります。感度の誤差は、前記した電子天びんの仕組みのところで述べた、力から質量への換算がいかに正確に行われたか、その結果で生まれます。力から質量への換算の方法は、感度調整、キャリブレーションまたはスパン調整といった呼び名で取扱説明書に必ず記載されています。お客様が感度調整をどのように行うかにより感度の誤差は大きくも小さくもなるのです。

2. 直線性

天びんの計量値に含まれる誤差が前記の感度の誤差だけなら、誤差は計測点の荷重値に比例します。ですが実際にはそうはなりません。それは、感度の誤差以外にも誤差成分があるからです。ここでいう直線性もその一つです。感度の誤差と直線性の関係は、文章では分かりにくいので図で説明します。極端に誤差の大きい例にしています。ひょう量200 gの天びんで200 g分銅の計測値が160 g（感度の誤差が-40 g）のとき、100 gの計測値には比例配分の-20 gが感度の誤差の成分として含まれることになり、80 gと計測されるはずです。つまり、200 gの計測点と原点を結んだ直線天びんの感度直線の上に各計測点に乗るはずです。天びんの感度直線と誤差ゼロの理想直線との間の部分が、感度の誤差の成分です。しかし、実際には計測点は天びんの感度直線の上に必ずしも乗りません。例えば、100 gの計測値が50 gだったとすると、天びんの感度直線上の点80 gよりさらに誤



差が -30 g 上乗せされています。その誤差の上乗せ分が直線性です。

直線性は、天びん自体の状態や元々の性能により発生するもので、お客様がそれを小さくすることはできませんが、感度の誤差の成分なら感度調整を正しく行うことで誤差を小さくできます。天びんの計測値に現れた誤差の中身、つまり感度の誤差の成分はどれだけ含まれているのか、直線性はどれだけなのか、を見極めることが大切です。誤差が大きいからといってすぐに故障だとみなすのではなく、感度の誤差が影響していないかを常に気にかけることが電子天びんを正しく使う上で非常に重要になります。

3. 繰り返し性

同じものを連続して繰り返し計測したときにどれくらい同じ値が計測されるか、精密さを表した成分です。計測値のバラツキ程度を、標準偏差または幅で表します。繰り返し性は、天びん自体の状態や元々の性能にも依りますが、使い方や環境によっても左右されます。

4. 偏置誤差

天びんの皿上にのせる位置の違いによって現れる誤差です。丸皿の場合、皿中央にのせたときの計測値と、皿中央から皿半径の半分だけ 45° 方向にずらした位置 4 箇所（左前、右前、右後、左後）にのせたときの計測値との差で表します。偏置誤差は、天びん自体の状態や元々の性能に依り発生するものですが、お皿の中央に荷重がかかるように注意すればかなり抑えられます。

■不確かさの発生要因

●電子天びんの計量値に含まれる不確かさの種類を中心に述べてきましたが、不確かさがどのようにして生まれるのか、発生要因を知ることで不確かさを少なくする手法が見えてきます。不確かさの発生要因については次回述べますが、一つだけ紹介しておきます。

●これからの季節、乾燥してくると現れる静電気の影響です。粉や樹脂、ガラス容器などが帯電して、天びんの表示が不安定になる、繰り返し性が悪化するなどの状況を招きます。分銅だと異常は出ないのに実試料のときだけ異常が出る場合、静電気の影響が疑われます。対策は、部屋を加湿する、除電するなどが有効です。除電器として **STABLO-AP** という製品がありますので下記 Web を参考にしてください。

<http://www.an.shimadzu.co.jp/balance/products/p01/stablo-ap.htm>

(Hat)

電子天びんを知ろう（その2） …適切な計量のためには？

（LC talk Vol.67  より）

電子天びんを正しく使うためにはどうしたらよいか、より正確に安心して計量するにはどんなことに気を付ければよいか…について、2回にわたってお話しています。今回はその1回目として、天びんの計量値に含まれる不確かさの種類を中心にお話ししました。今回は2回目として、適切な計量を行うためにできることは何か…についてお話しします。

■不確かさの種類…前回のおさらい

●前号でお話しました、電子天びんの計量値に含まれる不確かさの種類についておさらいをしましょう。

1. 感度の誤差

天びんのひょう量（測定上限荷重値）付近の計測値が正しい値からズレている量です。そのズレ量の荷重比例量が感度の誤差成分として測定範囲全域に含まれます。最も注意を要する誤差ですが、ご自分で感度調整を行なうことにより矯正ができます。

2. 直線性

任意の計量値におけるズレ量から、前記した感度の誤差成分を除いてなお残る誤差のことです。天びん自体に起因する性能です。お客様の手で矯正することはできません。

3. 繰り返し性

同じものを繰り返し計量したときにどれ位違う値をとることがあるのか、バラツキの程度を表したものです。天びんの使い方や環境に左右されます。

4. 偏置誤差

天びんの皿上のにのせる位置の違いによって現れる誤差です。お皿のにのせる位置に気を付ければ抑えられます。

■不確かさの要因と対策

●不確かさがどのようにして生まれるのか、発生要因を知ることで適切な計量を行う手法が見えてきます。計量に影響を与える主な要因を対策も交えてお話しします。

1. 重力加速度

感度の誤差を生む一番手が重力加速度です。

一例を示します。東京で感度をピッタリ合わせた天びんを鹿児島まで運ぶと、1 kg 分銅の計測値は以下のように変わってしまいます。

東京 1000.00 g

鹿児島 999.70 g

これは、緯度によって重力加速度が違うことにより生じる現象です。つまり、南へ移動すると天びんは軽い目に表示し、北へ移動すれば重い目に表示するように感度の誤差が生まれます。また、重力加速度は緯度だけでなく、高さでも変わります。

ここで大切なことは、天びんをどれ位移動したら、また、ビルの何階分移動したらどれ位の感度の誤差が生じるのか、ということではなく、どのような短距離であっても天びんを移動したら感度調整をやり直すということなのです。

2. 温度

感度の誤差を生む二番手が温度です。天びん自体の温度が変化することで感度の誤差が生じます。電子天びんの仕様には、必ず感度の温度係数という数値があります。これは、温度が1℃変わると天びんの感度がどれ位の割合で変化するか、を表した数値です。表示がどれだけ変わるのか、分析天びんの例を示します。

感度の温度係数：2 ppm/℃

温度変化前：200.0000 g

5℃変化後：200.0020 g

天びんの温度を変化させる要因には室温があります。「私の実験室は、朝すぐに適温になってその後は安定するので、大丈夫」と思われるかもしれませんが、天びん自体の温度は室温のようにすぐには変わってきません。変化した温度に時間をかけてゆっくり馴染んでゆきます。朝エアコンを入れて室温が安定した頃に天びんの感度調整を行っても、その時の感度は正しく合いますが、すぐまたズレてしまいます。室温変化をなくすることがベストですが、現実的には重要な（高い精度を要する）測定は午後（天びんが室温に十分馴染んだ後）に行うことをお勧めします。そして、測定直前には感度調整を忘れず行いましょう。天びんの温度を変化させる要因は、室温以外にも直射日光や天びん



内部の電子部品による自己発熱などがあります。直射日光は当てない、天びんはできれば 24 時間通電しておくなどが有効です。

3. 容器

こんな経験はありませんでしょうか？ フラスコのような容器を使うと天びんの指示値がじわじわと一定方向に変動してしまう・・・これは、ドリフトという現象で容器の中に入っている空気の悪戯です。例えば、容器の温度がひょう量室内より低い場合、容器内の空気はひょう量室内で暖められて膨張し、容器から溢れ出ます。そのため、天びんの指示値は徐々に小さくなって行きます。

この空気密度の変化は、例えば容積 100 cm³ の容器で 2 ℃ 変化した場合、0.82 mg にも相当します。この状態では、測定値の繰返し性が大きく（悪く）なってしまいます。これを防ぐには、できるだけ天びんの温度に馴染ませるため、容器は天びんの側に置く、素手で触らないなどの配慮が有効です。

4. 風

重さを量っている機械式天びんに外から風を当てると、竿が揺れて不安定になることは容易に想像できます。電子天びんも同じことです。風の存在は不安定、繰返し性が悪くなるなどの要因となります。

1) 外から当たる風

エアコン、人の行き来など風の発生要因は身近にたくさん存在しますが、意外と見落としがちなのが部屋の扉です。扉が開き戸の場合、扉が団扇のように風を生むことに加えて、部屋の気圧が変わることによって天びん内部の空気の安定が乱されることも影響します。これらは、できるだけ風が天びんに当たらない設備上の配慮、天びんの使用者以外の方も含めてみんなで気を遣い合うことで随分防げます。また、できることなら扉は引き戸式が有効です。

2) ひょう量室内で生まれる風

ひょう量室内の空気が対流を起こすと、皿や測定物に風が当たってやはり不安定になります。対流の発生要因には、測定物とひょう量室内の温度差による上昇 / 下降気流や、測定物をひょう量室内に出し入れする際の空気の乱れなどがあります。

対流をできるだけ抑えるには、測定物を天びんの温度に十分馴染ませる、手をひょう量室内に入れない、測定物の出し入れは短時間に行い、ひょう量室の扉は必要以上開けない、といった配慮が必要です。さらに、ひょう量室内外の温度差をできるだけ少なくするため、使わないときはひょう量室扉を数ミリ開けておくこともお勧めします。また、いくら配慮しても対流を完全に抑えることは困難ですから、その影響を最小限とするため、皿から測定物をはみ出させないことも有効です。薬包紙の隅を折るなど細かい配慮が功を奏します。

5. 静電気

前回でもご紹介しましたが、空気が乾燥してくると現れる静電気により、天びんの表示が不安定になったり繰返し性が悪化したり、厄介な目に遭われている方も多いでしょう。部屋を加湿すれば静電気は空気中に放電して消えてしましますが、除電器を使うことも有効です。**STABLO-AP** という商品がありますので下記 Web を参考にしてください。

<http://www.an.shimadzu.co.jp/balance/products/p01/stablo-ap.htm>

また、天びんについてのご相談はこちらへ。

<http://www.an.shimadzu.co.jp/balance/contact/index.html>

以上、2 回にわたって電子天びんの計量に影響を与える要因についてお話ししました。お読みいただいたみなさんの何かのお役に立てば幸いです。今回お話しした他にも、振動、測定物の密度など様々な要因があります。それらはまた機会がありましたらお話ししたいと思います。

なお、今回付録として、天びんの日常点検と島津「ユニブロック」について簡単にご紹介します。次ページも是非お読みください。

(Hat)

付 録

■天びんの日常点検について

●自動車を運転する前の点検、みなさんはされていますか？ 最近の車はほとんど故障しなくなりましたが、車は不調になると何らかのメッセージを発してくれます。しかし、天びんは、例えばどんなに感度の誤差が出ていても何も言わず平然としていますから、異常に気付くことが難しいのです。よって日常的な点検が大切になります。日常点検の推奨内容を簡単に紹介しますので、みなさんの事情に合わせてアレンジしてみてください。

1. いつするか

使用する当日の朝、または測定を始める前

2. 何をするか

- 1) 外観上、汚れや異常がないか目視確認する。
- 2) スイッチや扉開閉など機能動作を確認する。
- 3) ゼロ点（荷重なし）表示の安定を確認する。
- 4) 感度校正用分銅が内蔵されている天びんの場合は感度調整を行なう。観測点（*1）を最低1点決め、相当する分銅を載せて器差を測定し、許容範囲内（*2）であることを確認する。

*1：推奨観測点の例は以下のとおりです。

- A) 日常使用する測定範囲の上限を超え単一分銅となる最小の荷重点
- B) 天びんのひょう量付近で切りの良い荷重点

*2：許容範囲は、天びんに要求される精度に応じて個々にお決めいただくものですが、天びん性能上の限界や作業現場における現実的なレベルもありますので、詳しくはご相談ください。

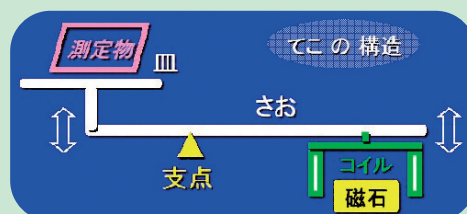
3. NG だったらどうするか

前記 4) 項の場合、再度感度調整を行なって再測定（感度校正用分銅が内蔵されていない天びんの場合は外部分銅にて感度調整を行なって再測定）、これを3回程度繰り返し、それでも NG の場合は、サービス会社にご相談ください。他の項目も状況に応じサービス会社にご相談ください。

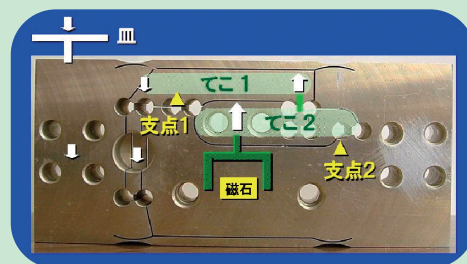
■おもしろメカ・・・「ユニブロック」

前号で電子天びんの仕組みのひとつに電磁平衡式があることをお話しました。電磁平衡式は高精度な電子天びんに広く使われています。荷重を受けてバランスをとる機械部分はその命ともいえ、多くの部品が複雑に組み合わせられて成り立っています。島津製作所では、その機械部分をひとつのアルミニウムの塊から削って作り1個の部品とすることに成功しました。そのユニークで高い技術の詰まったただ1個の部品を「ユニブロック」と名付けました。以下に概要をご紹介します。

電磁平衡式を簡単に言うと「てこ」の構造です。てこの片方に測定物を載せる皿が、他方に電磁力を発生させるコイルが取り付けられています。下図参照ください。実際はより複雑な構造になります。



このてこ構造の主要部分をアルミニウムの塊から削って作ったのが以下のユニブロックです。それもてこが2段階削り込まれています。



化学発光検出のはなし

(LC talk Vol.94 Introductory より)

今回は、化学発光検出についてのおはなしです。化学発光検出・・・という、馴染みのない方も多くおられると思います。化学発光検出は、超高感度検出を可能にする方法で、HPLCでの応用例はそれほど多くありませんが、基礎知識としてお読みください。

● 化学発光とは？

物質が電磁波、熱、摩擦、電界、化学反応などから外部エネルギーを吸収した励起状態から、熱放射をとまわずに特定の波長の光を放射（発光）して基底状態に戻る現象を「ルミネッセンス (luminescence)」と呼びます（図1）。この内、吸収するエネルギー源が化学反応である場合が、「化学発光（ケミルミネッセンス）」です。因みに、エネルギーとして光を吸収するのが「フォトルミネッセンス」で、蛍光やりん光が含まれます。また、ホタルや深海生物の発光は「バイオルミネッセンス」に分類されます。

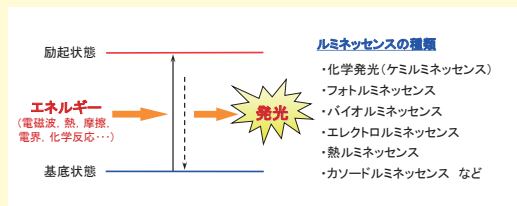


図1 ルミネッセンス

● 化学発光検出の特長

化学発光では、発光試薬による化学反応のエネルギーで物質を励起させるため、蛍光検出のように光源ランプ（キセノンランプなど）を必要としません。図2に、HPLCにおける化学発光検出の基本原理を示します。

化学反応のための発光試薬は、ポストカラム誘導体化と同様、発光試薬送液ポンプによりカラム溶出液に連続的に添加され、混合部で混合されます。生じた発光は、その強度が最も高くなる時点で光電子増倍管により測定されます。化学発光検出のフローセルは、できるだけ多くの光を光電子増倍管で受けられるよう、加工がしやすいフッ素樹脂チューブを渦巻状にしたものが多く用いられます。

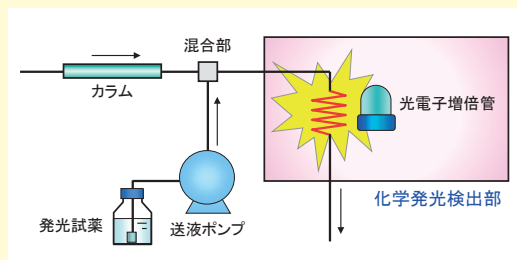


図2 化学発光検出の基本原理（模式図）

● 化学発光試薬の例

化学発光試薬には、励起された物質が自ら発光する直接発光タイプと化学反応により生じたエネルギーが他の物質を励起させる間接発光タイプがあります。

・直接発光タイプ

このタイプの代表例が、古くから血液の鑑識に用いられているルミノールです。図3に、ルミノールによる化学発光反応を示します。ルミノールは、強アルカリ性下、過酸化水素などの酸化剤、熱などの金属触媒の存在により、青色の光（425 nm）を出します。

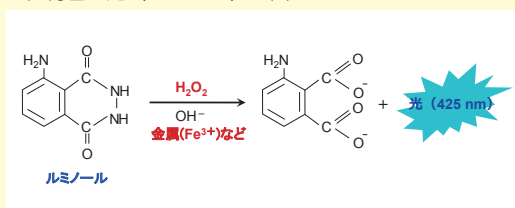


図3 ルミノールによる化学発光反応

HPLCにおいて、ルミノール反応は過酸化物質（過酸化脂質など）や金属含有物質の分析に応用されています。

・間接発光タイプ

このタイプの代表例は、しゅう酸ジエステル-過酸化水素系の化学発光です。図4に、しゅう酸ビス（2,4,6-トリクロロフェニル）（TCPO）による化学発光反応を示します。この反応では、TCPOと過酸化水素の反応により生じる活性中間体（1,2-ジオキセタンジオン）が二酸化炭素に分解する時、蛍光物質に励起エネルギーを与えます。

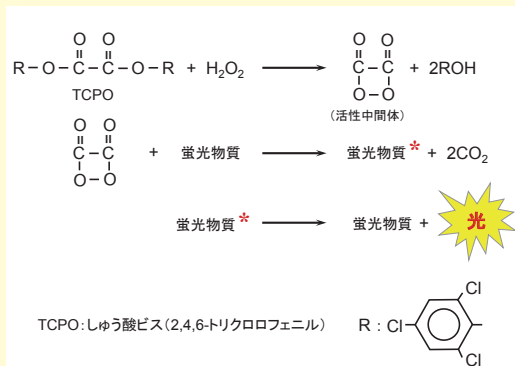


図4 しゅう酸ジエステル(TCPO)-過酸化水素系による化学発光反応

分析種が蛍光物質でない場合には、蛍光誘導体に変換して本法が用いられます。例えば、ダンシル化アミノ酸の例では、fmol(10-15 mol)あるいは数百amol(10-18 mol)の超高感度検出が可能となります。（Mk）

スケールアップによる分取条件の設定（その1） …コンベンショナルサイズでの分取可能量の見極め

（LC talk Vol.68 より）

HPLC による分取においては、太いカラムを用い、試料注入量を大きく設定すれば一度に大量の目的成分を効率的に取り出すことが可能です。しかし、分取用カラムや分取専用装置は一般に高価であり、それらを導入する際には、自分が必要とする分取量が十分得られるかどうか最大の関心事になります。

そこで、今回はコンベンショナル（通常分析）スケールから分取スケールへの「スケールアップ」の基本的な考え方について、2 回に分けて解説したいと思います。1 回目はコンベンショナルサイズでの分取可能量の見極めについての話です。

■分取量の目標設定

●分取の目的は「NMR や FTIR による構造解析に用いる」、「バイオアッセイにかける」、「化学合成の材料として使用する」など様々です。それら目的に応じて「できればこれくらいの分取量が欲しい」あるいは「最低限これだけの分取量が得られなければ意味がない」といった要望があるはずですから、まずはそうした目標値をしっかりと持つことが大切です。その上で仮に μg オーダーの分取量で十分であるなら、おそらく分取専用装置など必要なく、通常の HPLC 装置とカラムで十分達成できるかもしれません。逆に、 g （グラム）オーダーの分取量が必要となると、分取専用装置と分取カラムが必要となります。

●このように、要求される分取量によって選択すべき装置やカラムが大きく変わります。過剰投資や無駄な労力を避けるためにも、まずは「最低限どれだけの分取量が必要か」を見定めた上で、分取 HPLC の検討に取り掛かりましょう。

■「スケールアップ」とは？

●はたして分取 HPLC は、自分の要求を十分に満たすだけの分取量をもたらすことができるのか？ …… これを確認するには、実際に分取スケールで試してみるのがもっとも確実なのですが、それには専用装置やカラムが必要となります。特に、これから分取 HPLC や分取カラムの導入を考えようとする場合には、事前にうまく行くかどうかの見通しが無いのではリスクが大き

く、不安になります。

●そこで、いきなり分取スケールで考えるのではなく、まずはコンベンショナルスケールで分取できる量を算出してみて、その結果を分取スケールへと外挿し、どれくらいのサイズならどれだけの分取量が得られそうかを予想すること …… 「スケールアップ」が考えられます。このような「スケールアップ」の前提としては、実試料中の分析対象成分濃度を測定することができる HPLC 分析条件がすでに確立しており、その時使用される移動相が分取後の処理において問題にならないものであることが必要です。

■コンベンショナルサイズでの限界負荷量の見極め

●試料溶液中の分析対象成分濃度と、HPLC への注入体積がわかっているならば、両者の積から絶対注入量が求められます。一例として、注入量が $10 \mu\text{L}$ および $100 \mu\text{L}$ の時の絶対注入量の算出例を表 1 に示します。

表 1 試料中濃度と注入体積からの絶対注入量の算出

試料溶液中濃度 (mg/L)	絶対注入量 (μg)	
	$10 \mu\text{L}$ 注入時	$100 \mu\text{L}$ 注入時
0.01	0.0001	0.001
1	0.01	0.1
100	1	10
10000	100	1000

一般に、吸光光度検出器で測定される濃度範囲はサブ mg/L から数百 mg/L 程度ですので、そのままの状態では分取を行ってもせいぜい μg 前後の量しか得られないことがわかります。1 mg ($1000 \mu\text{g}$) 分取しようと考えたら、1% ($10,000 \text{ mg/L}$) 溶液を $100 \mu\text{L}$ 注入する必要があるということになります。

●次に、そのままの分析条件でどこまで試料溶液中の濃度を高くできるか、および注入体積を増やせるかを確認します。その実験例を図 1 に示します。

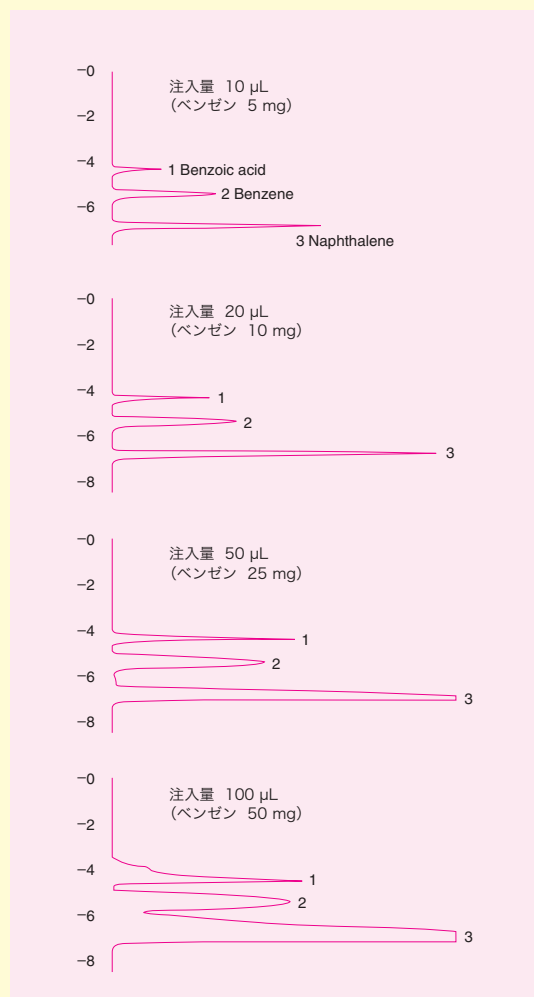


図1 コンベンショナルカラムを用いた試料負荷量試験の例

この例は、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、充填剤粒子径 5 μm のコンベンショナルサイズ ODS カラムを用い、500 mg/mL のベンゼンと微量の安息香酸およびナフタレンを含む混合溶液を分析した時のクロマトグラムです。高濃度のベンゼンのピークがスケールアウトしないよう、その吸収極大を避けて 270 nm で検出しています。

●この試験の結果、ピーク形状が維持できるのは 50 μL 注入まで、ベンゼン負荷量に換算すれば 25 mg までということがわかりました。なお、ここでは注入体

積を増やして実験した例を紹介しましたが、試料濃度を高くして検討するのも有効です。ここで重要なことは「目的成分が共存成分と分離するかどうか」であり、ピーク形状が多少歪んでも検出器がスケールアウトしても必ずしも問題ではありません。そう考えれば、クロマトグラムの見栄えなど気にせず、一度にできるだけたくさんの量をカラムに負荷する方が効率的と言えます。

■目標と現状との乖離の評価

●コンベンショナルスケールで可能な分取量が判明したら、それを目標とする分取量と比較してみましょう。

1) 目標とコンベンショナルスケールでの分取可能量がほぼ同じ場合

→あえて分取専用装置や大きなサイズのカラムを導入する必要なし

→わずかに目標に届かない程度であれば、数回繰り返し注入して分取

2) 目標値がコンベンショナルスケールでの分取可能量の 10 ~ 100 倍程度の場合

→ラボ用分取 HPLC の導入により目標を達成できる可能性あり

3) 目標値がコンベンショナルスケールでの分取可能量の数百倍以上の場合

→ラボ用分取 HPLC 装置での対応は困難

→工業用分取 LC を考えるか、クロマトグラフィー以外の分離精製法に変更

上記 2) に該当する場合は、分取用 HPLC 装置を検討する価値があると言えます。

次のステップでは、スケールアップの理論によりカラムと装置の選択を行ないます。その 2 で詳細について解説します。
(Gt)

スケールアップによる分取条件の設定（その2） …スケールアップの考え方と、条件設定における注意点

（LC talk Vol.69 より）

前回は、分取に先立って、コンベンショナル（通常分析）サイズによる分取可能量の見極めを行いました。今回はいよいよ分取サイズへとスケールアップします。ここでは、スケールアップに関する基本的な考え方について説明します。

■スケールアップの基本的な考え方

コンベンショナルから分取サイズにスケールアップする場合の基本的な考え方は以下のとおりです。

●充填剤が同じなら、カラムの断面積に比例して移動相流量と試料負荷量を増やすことによりほぼ同等の分離が得られます。もちろんこれは理想に過ぎませんが、それでもカラムや装置、分取の際の諸条件を決める上では重要な道しるべとなります。

●実例として、前回の図1をスケールアップした例を紹介します。前回ご紹介した例では内径 4.6 mm の ODS カラムを使用していました。これを、内径 20 mm で粒子径およびカラム長が同一のカラムにスケールアップするとします。両者の断面積比は約 1 対 19 ですから、移動相流量と試料負荷量も同様に 19 倍程度大きくすることにより、ほぼ同等のクロマトグラムが得られるものと推測されます。実際に試験したクロマトグラムを図1に示します。移動相流量は、内径 4.6 mm カラムでは 0.8 mL/min、内径 20 mm カラムでは 15 mL/min としました。試料注入量を断面積比に合わせて 20 倍にすることにより、ほぼ同等のクロマトグラムが得られました。

●なお、この図では注入量が 20 倍になっているにもかかわらず、両者の感度・面積がほぼ等しくなっています。これは、移動相流量比もほぼ同じ倍率に設定されていることにより、その分だけ移動相によって希釈され、結果としてほぼ同濃度の成分バンドが検出セルに同時滞留しているためと理解されます。

●このように、充填剤の性質が類似し、内径の異なるカラムのペアが入手できる場合には、容易にスケールアップを行うことが可能です。

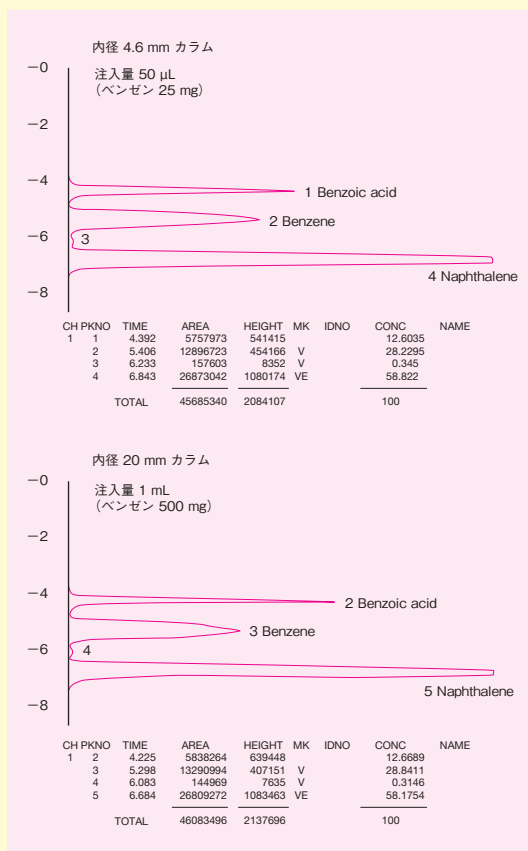


図1 内径4.6 mmカラムから内径20 mmカラムへのスケールアップ例



Prominence 分取システム
(分析→スケールアップ→分取に対応)



■カラムと移動相流量の決定

●内径 4.6 mm, 移動相流量 0.8 mL/min を出発点とし、種々のカラムでスケールアップを行ったときの断面積比と流量を表 1 に示します。

表 1 カラム内径と断面積比および流量設定例

カラム内径(mm)	断面積比	流量設定例(mL/min)
4.6	1	0.8
10	4.7	3.8
20	18.9	15
30	42.5	30
50	118	90

ただし、実際には溶液の粘性やカラム耐圧の問題から、分取カラムに対して上に示した流量を通過することができない場合があります。そのようなケースでは、逆に分取カラムでの流量を先に決定し、コンベンショナルカラムでの流量を後からそれに合わせて決める方がよいでしょう。

■分析条件の再確認

以上の手順でコンベンショナルサイズから分取サイズへのスケールアップを行うことができます。しかし、ここで思わぬ問題が発生するケースがあります。以下に挙げる諸点について、事前に十分な検討を行いましょう。

1. 分取後に悪影響を与えない移動相の選択

●一般に、分取した溶液は何らかの後処理（濃縮・精製する、他の分析機器で解析する、別の実験にかけるなど）に供せられます。分取物は移動相に溶解した状態で得られますから、後処理においてそれが問題にならないようあらかじめ考えておく必要があります。分取した溶液を蒸発乾固することを考えれば、移動相はなるべく不揮発性の塩を含まない組成にしておくことが重要です。分析用 HPLC ではりん酸が多用されますが、分取用 HPLC ではその代わりに乙酸・酢酸・トリ

フルオロ酢酸などが使用されることが多いようです。また、逆相モードにおいてはできるだけイオン対試薬を使わない、水リッチよりは有機溶媒リッチな組成にする、といった工夫が必要となります。

●分取後にバイオアッセイを行なう場合には、その妨害となるもの（例えば毒性の高い溶媒など）を移動相に添加しないことも重要です。

2. コスト

●分取サイズともなれば、HPLC 装置（特にポンプ）やカラムが高価になりますし、移動相の消費量も著しく増えます。コスト的に見合うかどうかをよく検討しましょう。例えば、分離や負荷圧の面で問題がないのなら、高価なアセトニトリルよりも安価なメタノールを選択するのが適切です。さらに、純度面でも問題がなければ、試薬のグレードを HPLC 用から特級、あるいは一級試薬に下げること検討すべきでしょう。さらに、試料成分が溶出しない時間帯の溶出液を移動相びんに戻すことができる流路切換バルブ（溶媒リサイクルバルブ）を用いれば、溶媒消費量を低減できる可能性があります。

●一般に分取カラムは高価なので、その消耗によるコストも無視できません。なるべくその延命を図るため、ガードカラムを装着し、可能な限り低めかつ変動の少ない負荷圧で使用することをお勧めします。

3. 安全性

●使用する溶媒の量が増えますので、液漏れなどの対策も抜かりなく行う必要があります。例えば、ポンプのプランジャシールからの液漏れに備え、プランジャヘッド下部にトレイなどを設置するとよいでしょう。

●可燃性溶媒を使用するときは特にご注意ください。周辺に引火の恐れがある機器を置かないこと、静電気による引火が発生しないよう廃液タンクにアースを設置することなどの対策をしてください。

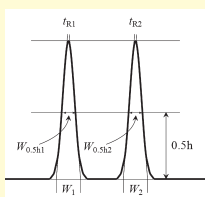
(Gt)

Q&A（読者のみなさまから）… 1

（LC talk パスワード より）

●分離度の計算式で、「1.18」という係数がありますが、この係数の意味を教えてください。

分離度 (R) は、(1) 式で示されるように、隣接する 2 つのピークの保持時間の差をピーク幅 (W) の平均で除して得られます。また、日本工業規格 (JIS) や日本薬局方などでは、ピーク半値幅 ($W_{0.5h}$) を用いる (2) 式が掲載されています。この「1.18」という係数についてのご質問です。



$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad \dots (1)$$

$$R = 1.18 \times \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \right) \quad \dots (2)$$

ガウス分布 (正規分布) では、 $W = 4\sigma$ 、 $W_{0.5h} = 2.354\sigma$ ですので、 $W = 1.7W_{0.5h}$ となります。これを (1) 式に代入すると (2) 式が得られます。ピーク半値幅の方が測定しやすいので、(2) 式がよく用いられます。なお、分離度の詳細につきましては、Vol.81 および Vol.82 の「入門」をご覧ください。

●理論段相当高さは「 H 」で表されますが、時々「 h 」という記号を見かけます。「 H 」との違いは何なのでしょう？

理論段相当高さ「 H 」(height equivalent to a theoretical plate) は、「カラム効率を理論段一段に相当する長さで表すもの」¹⁾と定義されています。この理論段相当高さは、理論段数 (N)、カラム長さ (L) を用いて、式 (1) で表されます。

$$H = \frac{L}{N} \quad \dots (1)$$

日常、カラム性能を比較する時には、理論段数を用いることが多いですが、カラム長さが 2 倍になれば理論段数も理論上 2 倍になります。従って、カラム長さに関わらずカラム効率を比較しようとすると、理論段数よりも理論段相当高さの方が適しているということになります。

一方、換算理論段相当高さ「 h 」(reduced height equivalent to a theoretical plate) は、「理論段相当高さを、充填剤の平均粒子径の値で除したもの」¹⁾であり、式 (2) で与えられます。

$$h = \frac{H}{d_p} \quad \dots (2)$$

換算理論段相当高さは、充填剤粒子径が異なるカラムの効率を比較する際に用いられます。

[引用文献]

1) JIS K0214: 2013 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)

●「カラム外体積」とは何でしょうか？

「カラム外体積 (カラム外容積) (extra-column volume) は、日本工業規格 (JIS) では、「ピークバンドの広がる要因となるクロマトグラフのカラム充填部以外の容積。試料導入部、検出器、配管、カラムフィッティングなどの容量の合計で、装置の性能に関わる指標の一つ。」¹⁾と定義されています。

HPLC 装置に当てはめると、図 1 に示すようになります。HPLC で得られるクロマトグラムには、このカラム外体積に起因するピークの広がりが含まれます。従って、いくら高理論段数のカラムでも、装置のカラム外体積が大きければ、その性能をできないこととなります。特に、カラム容量が小さい場合 (例えば、内径 2 mm のカラムなど) や保持容量 (保持時間) の小さい成分の場合、この影響が顕著となります。配管チューブの内径や長さ、接続部 (フィッティング) の内容量やデッドボリュームに注意してください。

[引用文献]

1) JIS K0214: 2013 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)

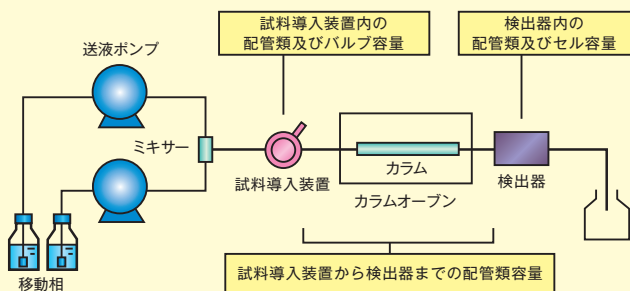


図 1 カラム外体積

Q&A（読者のみなさまから）… 2

（LCtalk より）

●先輩に、「全く同じカラムを2本接続したら理論上、理論段数は2倍になるけど、分離度は2倍にならないよ…」と言われました。どう考えれば良いのでしょうか？

HPLC で用いられる二つの大切な基本式を思い出しましょう。

一つは、理論段相当高さ (H) を表す式 (1) です。

N は理論段数, L はカラム長さであり, 式 (1) より式 (2) が得られます。

$$H = \frac{L}{N} \quad \dots (1)$$

$$N = \frac{L}{H} \quad \dots (2)$$

式 (2) から、理論段相当高さと同じであれば、理論段数がカラム長さに比例することが分かります。つまり、全く同じカラムを2本接続すると理論段数は2倍になります。

もう一つは、分離度 (R) を理論段数, 分離係数 (α), 保持係数 (k) で表した式 (3) です。

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right) \quad \dots (3)$$

全く同じカラムを2本接続して理論段数が2倍になっても、式 (3) から分離度は2の平方根である1.41倍にしかならないことが分かります。

【参考文献】

1) LCtalk, Special Issue IX, p.4 ~ 5, p.9 (2015)

●単位の表記で、「ms」と「m s」をはっきり区別するように先輩から言われました。違いがよくわからないのですが・・・。

先輩の方のおっしゃる通り、国際単位系 (SI) において、これは確かに大きな違いです。ポイントは、「m」と「s」の間の空白 (スペース) の有無です。

・「ms」は、「ミリ秒」を表します。「m (ミリ)」は、20個あるSI接頭語のひとつで、「 10^{-3} 」を表します。接頭語を用いる時には、単位記号との間に空白を挿入せず、単位記号の直前に置くと定められています。

・「m s」は、「メートル秒」を表します。この場合の「m」は、SI基本単位の一つである「メートル」です。単位記号の積は、空白または中点で表すことになっており、「m」と「s」の間の空白により「メートル」と「秒」の「積」であることがわかります。空白の代わりに中点を用いて、「m・s」と表すこともできます。

【参考文献】

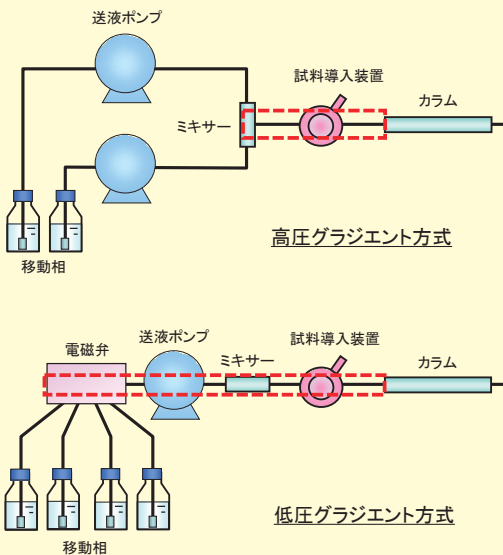
1) LCtalk, Special Issue IX, p.6 (2015)

●「dwell volume」とは何でしょうか？

「dwell volume」(ドゥエルボリューム) とは、HPLC装置における複数の移動相の合流地点からカラム入口までの容量のことです。グラジエント溶離時には、このドゥエルボリュームがグラジエント遅れの原因となります。

ドゥエルボリュームは、高圧グラジエント方式と低圧グラジエント方式で異なります。図1に示すように、高圧グラジエント方式におけるドゥエルボリュームは、ミキサー以降の容量 (ミキサー容量, 試料導入装置内の容量, その他の配管容量) ですが、低圧グラジエント方式においては、電磁弁以降となりますので、ポンプ内の容量も加わります。

従って、ドゥエルボリュームは、一般的に低圧方式の方が大きくなります。また、同じグラジエント方式でも、各容量に差があるため機種間による違いもあります。グラジエント溶離を用いた分析メソッドを移管する際には、ドゥエルボリュームの違いが分離パターンに影響を与えることを念頭に置いてご注意ください。



〔点線〕 ドゥエルボリューム

図1 ドゥエルボリューム

【参考文献】

1) 中村 洋監修, (公社) 日本分析化学会編: LC/MS, LC/MS/MSの基礎と応用, p.90, オーム社 (2014)
2) LCtalk, Special Issue IX, p.17 (2015)

超臨界流体抽出／超臨界流体クロマトグラフシステム
Supercritical Fluid Extraction/Chromatograph System

Nexera UC



Unified Chromatographyという もうひとつの可能性、ただ一つの可能性

❖ 目的成分の抽出から分析までを自動化

超臨界流体で固体試料から成分を自動抽出し、そのままオンラインで分析。

❖ 不安定な化合物もそのまま分析

これまで試料の前処理操作で酸化や加水分解されやすい不安定な化合物の分析も可能。

❖ 究極の高速・高分離・高感度を実現

高感度/高分離分析を超臨界流体によって実現し、多成分一斉分析をより短時間に行うことができます。

LC talk
Special Issue **X**

発行日：2016年8月10日

編集・発行：株式会社島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
“LC talk club” 編集長 三上 博久

連絡先：分析計測事業部 “LC talk club” 事務局
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

E-mail : analytic@group.shimadzu.co.jp