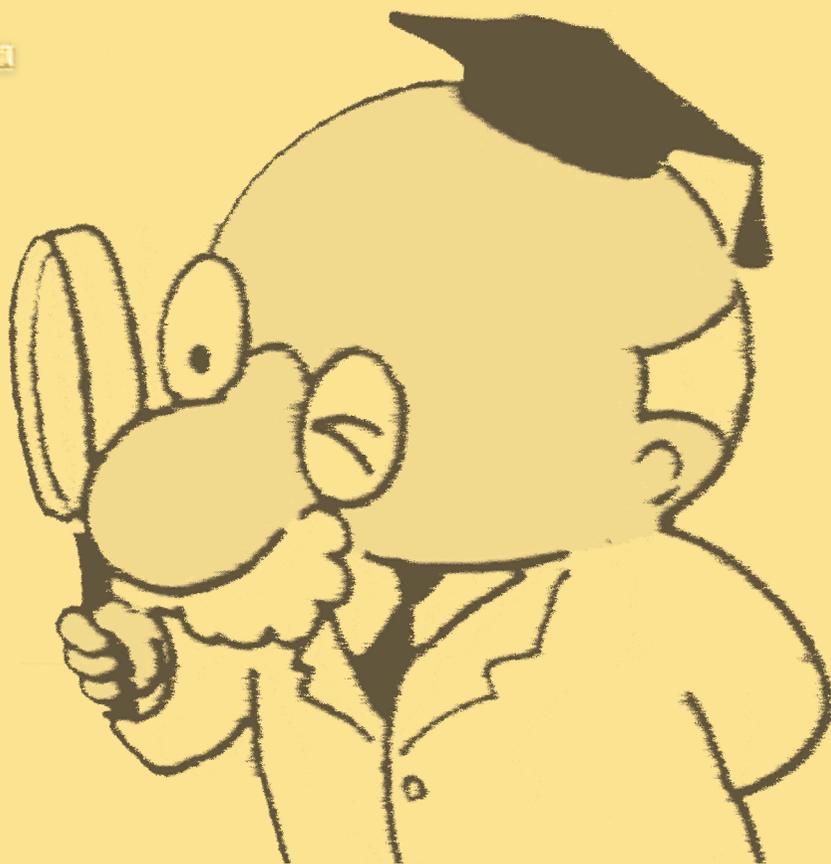


LC talk

特集号 “移動相の脱気”



1991

HPLCが市販されて既に20年を経過しました。この間の技術の進歩は、高精度低脈流ポンプ、再現性に優れたインジェクタ、高感度検出可能な各種検出器を登場させました。従って、高感度分析や自動連続分析を信頼性高く行えるかどうかは、今やむしろChemicalな要因が重要となってきています。例えば、試料成分の吸着や安定性、移動相の選択や調製の再現性の問題です。さらには、移動相中の溶存空気量が、検出器のベースラインの安定性や検出感度を左右することに留意しなければなりません。

さて、移動相中の溶存空気量の調整は、「移動相の脱気」の問題としてとらえることができます。そこで、本特集号は、「移動相の脱気」についてとり上げ、原理から実際までを解説させていただきます。本誌を参考にして頂き、用途に応じて脱気方法を選択・活用して頂きますよう、お願いいたします。



	1.移動相中の空気が引き起こす諸問題	4
	2.気泡発生メカニズム	5
	2-1) 液面上昇	6
	2-2) 圧力降下	6
	2-3) 溶媒混合	7
	3.流路中での気泡発生によるトラブル	8
	3-1) 移動相ビン内での気泡発生による送液トラブル	8
	3-2) ポンプ内での気泡発生による送液不良	9
	3-3) カラム内での気泡発生・滞留によるチャネリング	10
	3-4) 検出器セル内での気泡発生・滞留によるベースラインノイズ	10
	4.溶解している空気(酸素)による検出への悪影響	12
	4-1) 酸素溶解量が多いことによる検出への悪影響	12
	4-2) 酸素溶解量が多くしかも変化することによるUV検出への悪影響	13
	4-3) 空気溶解量が増えることによる屈折計ベースライン変動	13
	5.脱気方法	14
	5-1) 加温かくはん(1)	14
	5-2) アスピレータを用いた減圧脱気	14
	5-3) 加温かくはん(2)	15
	5-4) 気-液分離膜を用いた減圧脱気	16
	5-5) Heパージによる脱気	18
	5-6) 脱気方法以外	20
	6.分析条件別対処法	21
	6-1) 逆相カラム-UV短波長高感度ベースラインを得るために	21
	6-2) 糖分析カラム-屈折計で高感度ベースラインを得るために	22
	6-3) イオンクロマトアルカリ移動相条件に用いる炭酸ガストラップ	23

1. 移動相中の空気が引き起こす諸問題

まず、移動相を脱気することの重要性を再確認して頂くために、移動相中の空気が引き起こす諸問題

について例を示します。これらの問題は適切な脱気をするることによって解決することができます。

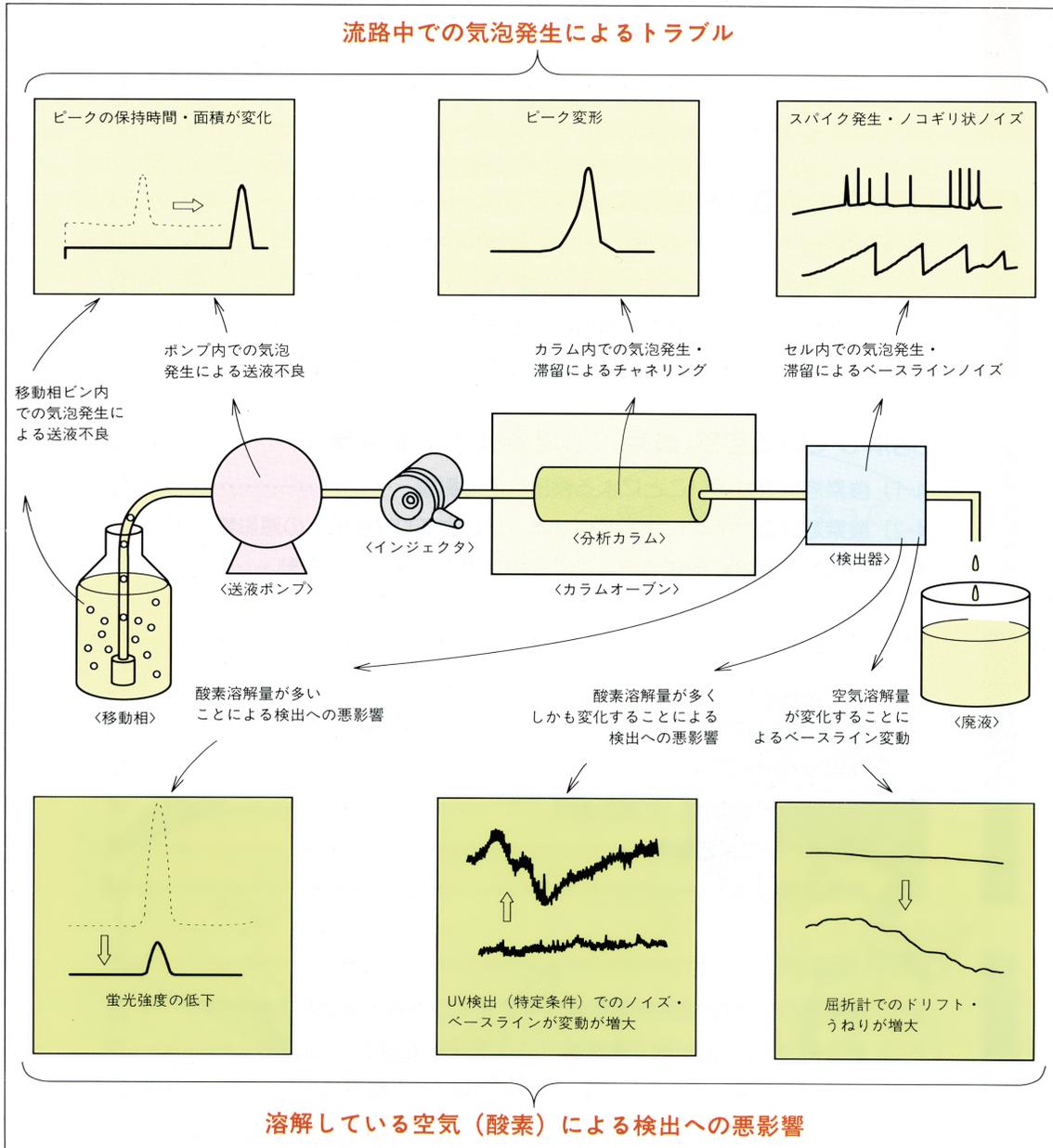


図1 移動相中の空気が引き起こす諸問題の例

これらの問題は大別すると、気泡発生が関係する問題と、気泡発生はしないが溶解している空気が関係する問題にまとめることができます。

なお、この他にも溶存酸素によって、試料成分・

移動相中の化合物・固定相が酸化を受ける場合があるとの報告もありますが、この号では割愛させて頂くことにします。

2.気泡発生メカニズム

さて、それでは気泡発生メカニズムについて確認してみることにしましょう。**気泡が発生する、**ということは、**溶液に対する空気の溶解量が飽和溶解量（飽和溶解度）を超える、**ということです。飽和溶解量は、溶液を放置した時に空気の入りが起こり（平衡）、最終的に溶解している量だと考えて下さい。しかし、この量は溶液の種類、気体の種類、また温度・圧力によって異なります。従って科学的に

は、「25°Cの水に接する酸素の分圧が0.2気圧のとき水1mlに対する酸素の飽和溶解量は、25°C1気圧換算で0.006mlである」などと表現します。

飽和溶解量以上に溶解している場合を過飽和といい、振動やかくはんによって容易に気泡が発生します。一方、飽和溶解量以下の溶液に対しては、気体が溶け込みやすいわけですが、その速度はあまり速くありません。

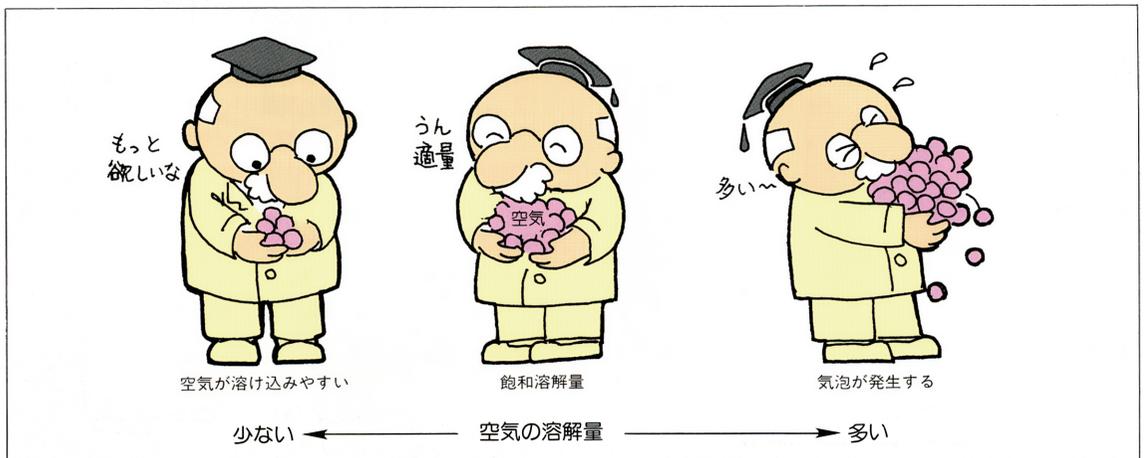
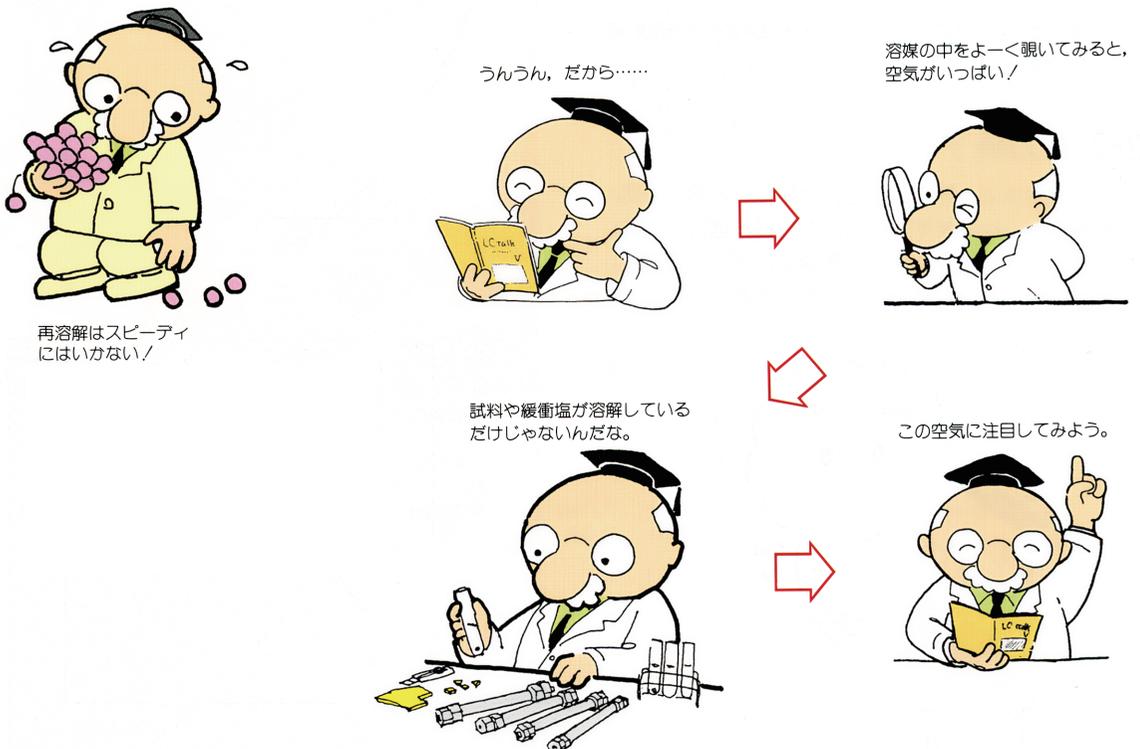


図2 飽和溶解量のイメージ



2-1 液温上昇

倉庫で冷えていた溶媒を、暖かい室内で用いる場合など、**温度が上がると一般に気体の飽和溶解量が減少するため、過剰に溶解している気体が気泡となって出てくることとなります。**コーラを暖めて開封した方が、炭酸ガス(CO₂)が勢いよく発生するのはこの原理です。

図3中に、水に対するO₂、N₂の飽和溶解量曲線がありますが、気体の分圧が1気圧の場合で示されています。実際の空気は、O₂=20%、N₂=78%ですが

ら、接液する気体が空気の場合、O₂、N₂の溶解量は、それぞれ約0.2、0.8を乗じたものになります。

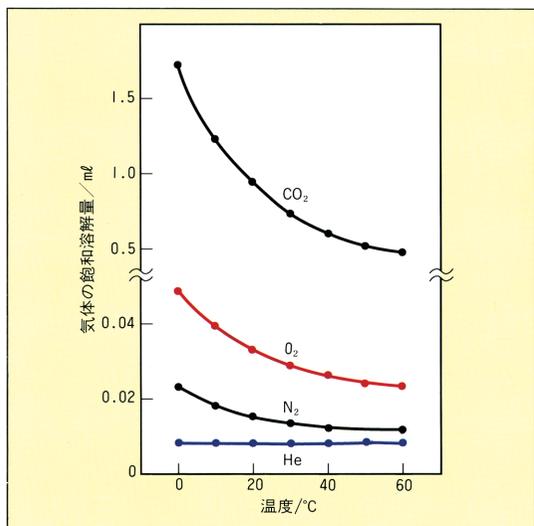
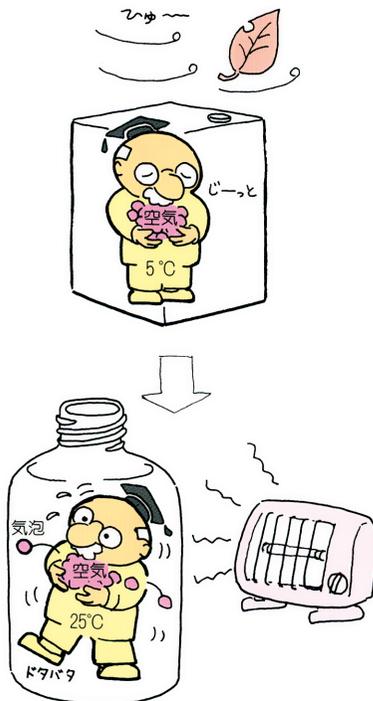


図3 水1mlに対するCO₂、O₂、N₂、He溶解量への温度影響 (気体分圧1 atm)



2-2 圧力降下

一般に気体は、圧力(分圧)が高いほど液体への溶解量が多くなります(図4)。逆に言えば、**圧力の高い状態で飽和溶解していた気体は、圧力が下がると気泡になって出てくることとなります。**

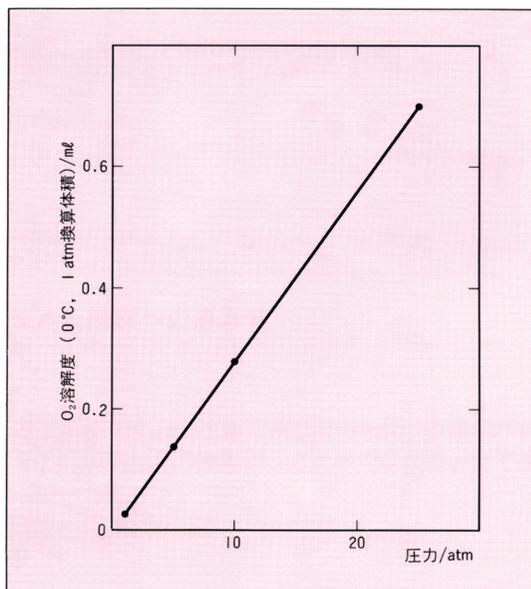
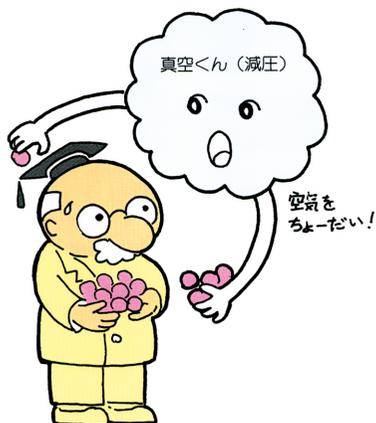


図4 水1mlに対するO₂の溶解度への圧力(分圧)の影響(25°C)



2-3 溶媒混合

気体の飽和溶解量は、液体の種類によって異なります。概して、極性の低い気体は、極性の低い溶媒に溶けやすくなります。図5では、ベンゼンとメタノールへの体積当りの気体の溶解量がほぼ同じことを示していますが、これを溶媒のモル数当りの溶解量、つまりモル分率で計算すると、溶媒の極性が低いほど溶解度が高いことが鮮明になります。

それでは、異なる溶媒を混合すると飽和溶解量はどうかのでしょうか？答えは、単独溶媒の溶解量の和に比べて小さくなる、というのが一般的です。図6に、水-エタノール混合溶液への O_2 溶解量(分圧1気圧)を示しました。A点は水100%への溶解量、B点はエタノール100%への溶解量です。水とエタノールを同量混合した時には、C点に相当する O_2 が溶液に存在するわけですが、この溶液の飽和溶解量はD点しかないため、C→D相当の O_2 が気泡として発生することになります。同じようなことが、水-メタノール、水-アセトニトリルへの空気の飽和溶解量にもみられます。

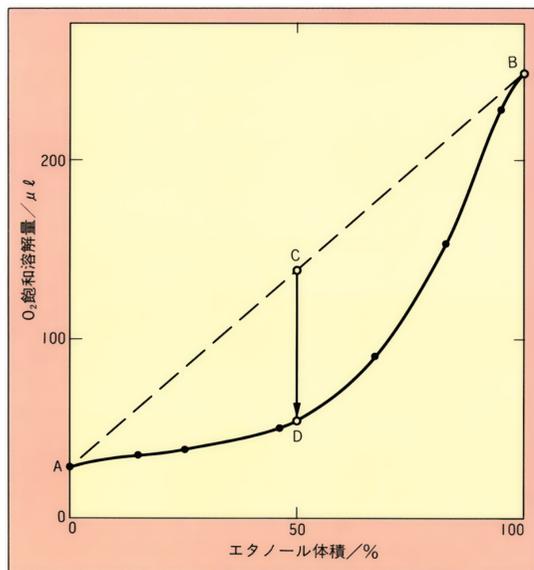


図6 水-エタノール混合溶液1mlに対する O_2 の溶解量 (分圧1 atm, 25°C)

また、混ぜる溶媒が水同士であっても気泡発生が生じる場合があります。というのは、一般に塩濃度が上がると空気の飽和溶解量が下がるが、その関係は直線的ではなく図7のように下に凸の曲線を示す場合があるからです。

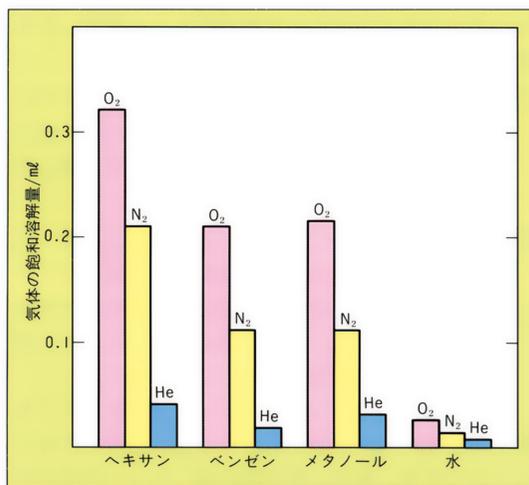


図5 溶媒1mlに対する気体の溶解量 (分圧1 atm, 25°C)

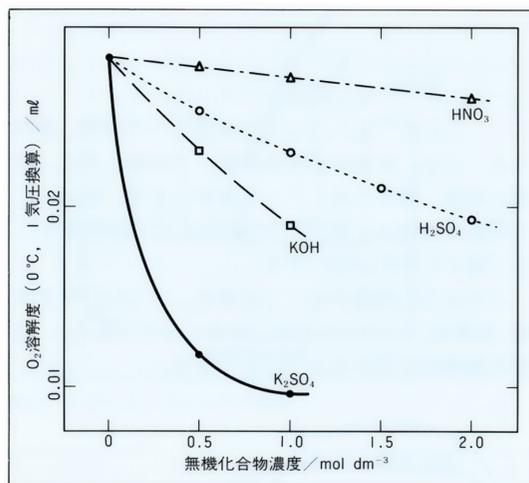


図7 水溶液1mlに対する O_2 溶解度 (25°C, 1 atm)

〈参考文献〉 S.R. Bakalyar, M.P.T. Bradley and R. Honganen, J. Chromatogr., 158, 277-293 (1978).
化学便覧 基礎編Ⅱ 8.7溶解度, 日本化学会編 丸善株式会社 (1984).

3. 流路中での気泡発生によるトラブル

それでは、1. 項で示した流路中での気泡発生によるトラブルについて、2. 項のメカニズムを念頭

において見直してみることにしましょう。

3-1) 移動相ビン内での気泡発生による送液トラブル

移動相ビン内で気泡発生する場合は、その移動相中の溶存空気が過飽和の状態であることを示します。例えば、次のようなことが考えられます。

①液温上昇……倉庫で冷えていた溶媒をすぐに移動相ビンに入れて暖かい室温で用いたり、朝に移動相をセットしたが昼になって室温が上がった場合です。

②混合溶媒のかくはん不足……特に、水-アセトニトリルを混合すると吸熱反応で液温が下がります。従って充分かくはんして過飽和な空気を除いたつもりでも、室温で暖められ、液温が上がるにつれて気泡発生することになります。

これらの気泡がサクションフィルタ・チューブを経てポンプヘッドに吸い込まれると、送液が正常でなくなります。まず、吸引時には、ヘッド内部がやや減圧になるために気泡が膨張します(図8)。このときプランジャは、膨張した気泡を含めて吸引容量の計量を行うことになります。次に吐出時には、ヘッド内部が高圧になるため気泡が収縮します。従って、送液される移動相量は正常時よりも小さくなります。このように、ヘッド内を気泡が不規則に通過することは、送液する移動相量が不規則になる(送液正確度・精度不良)ことを意味します。なお、この現象の有無は、送液ポンプの吐出圧力波形をモニタ(図9)すれば判ります。

このような問題が起こった場合、ピークの保持時間・面積値にバラツキが生じやすくなり(図10)、分析の信頼性に欠けるようになります。

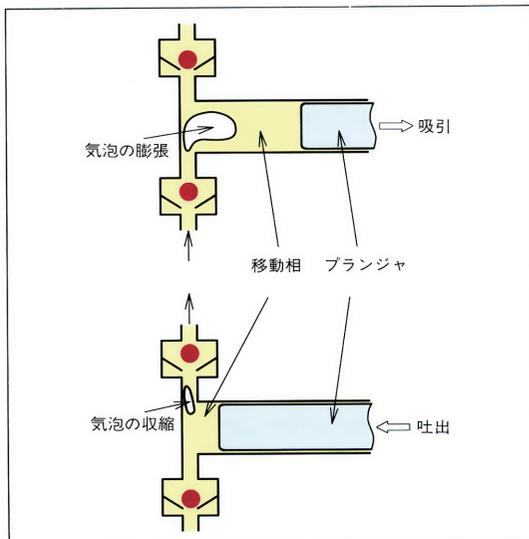


図8 気泡が入ったポンプヘッドの模式図

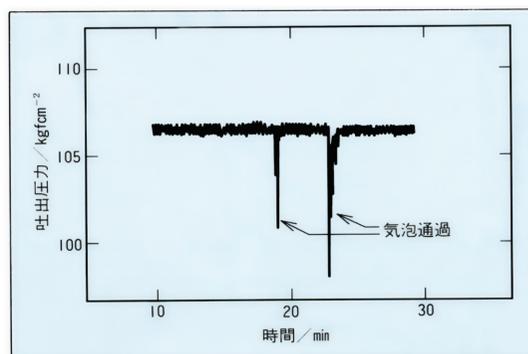


図9 吐出圧力波形の変化

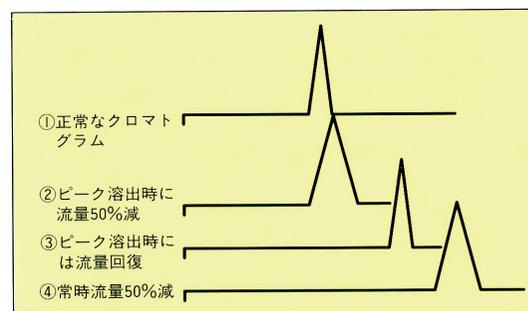


図10 送液量の不規則化によるクロマトグラム変化例

3-2) ポンプ内での気泡発生による送液不良

移動相ビン内の溶液に溶解している空気が飽和溶解量以下であっても、ポンプを通過する際に気泡が発生することがあります。

①**低圧混合グラジエント** ……異なる溶媒を大気圧（もしくはやや減圧）下で混合するため、メカニズム2-3により、図11中赤ワクの所で気泡が発生します。いくらグラジエントミキサがポンプ下流（高圧側）に設置してあっても、図中赤ワクの所ですでに混合が始まるので、多かれ少なかれ気泡発生が起こります。一方、高圧混合グラジエントの場合は、混合が始まる所がポンプ下流（高圧側）であるので、この問題は起こりません。

②**サクシオンフィルタの目詰まり** ……サクシオンフィルタが目詰まりしていると、吸引時の抵抗が大きく、フィルタ内部が減圧になって気泡が発生しやすくなります。目詰まりは、フィルタの放置によりゴミが付着したり、前の移動相が緩衝液であることを知らずにメタノールを流すことなどにより起こります。なお、目詰まりが軽度であれば、移動相の充分な脱気により気泡発生を防止できますが、これは本来は、フィルタの洗浄や交換によって解決すべき問題です。

これらによって発生するトラブルは3-1)の場合と同じです。

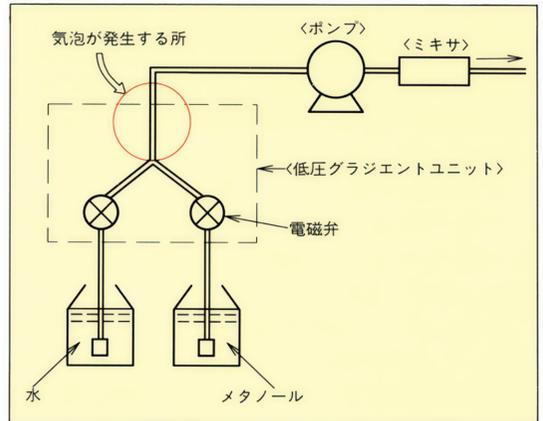


図11 低圧混合グラジエント

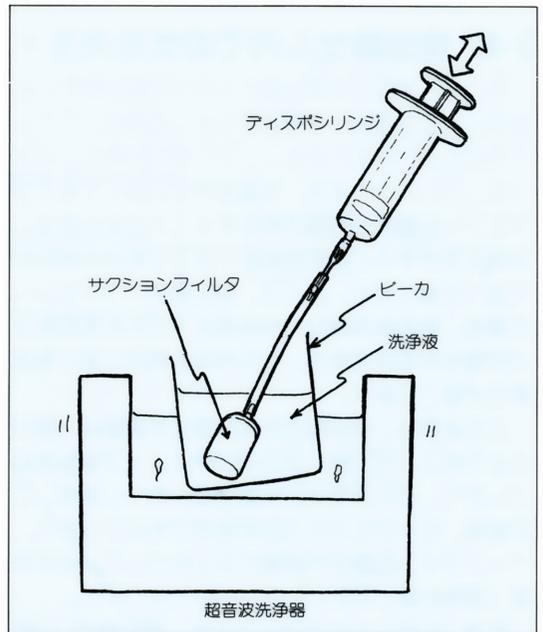


図12 サクシオンフィルタの洗浄

チョット
道草

サクシオンフィルタの洗浄法

サクシオンフィルタに不溶性物・ゴミが詰まった場合は、図12のように超音波洗浄器中で逆洗を試みてみましょう。化合物の析出であれば、洗浄液を水→A→イソプロピルアルコール→クロロホルム（A：酸性有機化合物なら希アンモニア水／メタノール、塩基性有機化合物なら希りん酸水／メタノール）に切り替えて洗います。さらにポンプを使って充分洗浄してみましょう（図13）。洗浄後も大流速時にサクシオンチューブに気泡が見える場合は交換して下さい。

なお、洗浄液として金属粉に対しては希硝酸（アルコールと触れないようにして下さい）を、金属イオンにはEDTA・2Na水を、たんぱくにはSDS水溶液を用いることが多いようです。

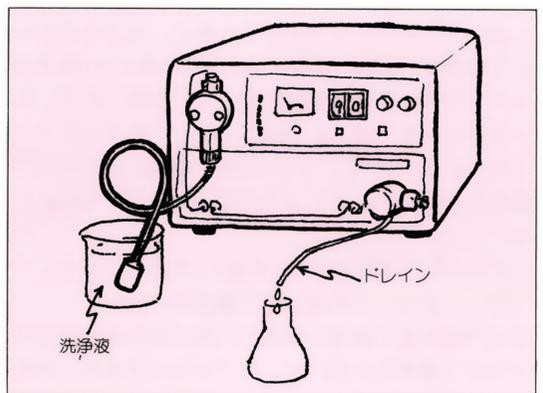


図13 サクシオンフィルタの洗浄

3-3) カラム内での気泡発生・滞留によるチャネリング

一般にカラム内では圧力がかかっているため、空気の飽和溶解度が上がっており、気泡は発生しにくいはずですが、カラム出口付近の比較的圧力の低い部分では、オープンで加温されていると気泡が発生しやすくなります。また、ポンプを素通りしてきた気泡が滞留することも考えられます。

このような場合には、カラム内での移動相の流れは一様でなくなり、結果的にピーク変形が起こる場合があります（図14）。

なお、カラムからの気泡の抜けにくさは、大口径カラムほど顕著になります。従って分取用カラムをHPLCに取り付ける場合は、少しでも気泡が浮力に逆らわなくて済むように入口側を下に出口側を上に取り付けることをおすすめします。

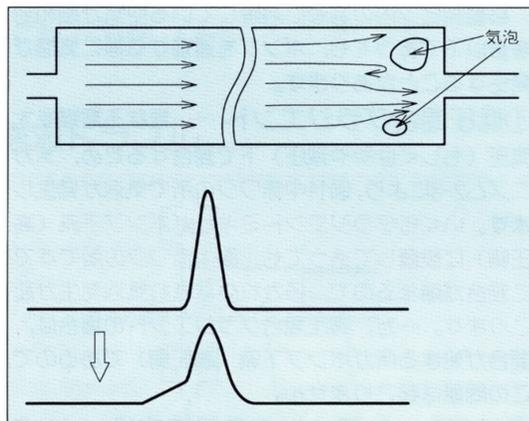


図14 カラム内気泡によるチャネリング

3-4) 検出器セル内での気泡発生・滞留によるベースラインノイズ

カラム、あるいは検出器セル部が加温されている場合、セルを通過する液温は上昇しており、圧力も大気圧に近い状態であることから気泡が発生しやすくなっています。また、加温されていなくてもグラジエントの場合は気泡が発生することがあります。溶媒を混合すると飽和溶解度が低下することは2-3)で述べた通りです。例えば、高圧混合グラジエントの場合、混合後流路中で常時高圧下のため気泡発生が抑制されるのですが、セル内は大気圧に近く気泡発生が起こります。

このような、セル内での気泡発生や滞留は、図15のようなスパイク状・ノコギリ状のノイズを引き起こしたり、ベースラインを振り切ったりします。この結果、ピークとノイズの区別ができなかったり、ベースライン位置が不明確になったりして、波形処理（面積計算）が正しく行われなくなります。

なお、3-3)、3-4)のケースとも、検出器がUV検出器や電気伝導検出器であれば、セル耐圧が高いため（ $\sim 30 \text{ kgfcm}^{-2}$ ）、検出器出口側に背圧をかけてカラム出口やセル内にかかる圧力を高め、気泡発生を防止できます。通常、背圧には0.3mm内径×2m長さのステンレスチューブを抵抗管として接続します。水、メタノールを1 ml/minで送液するとそれぞれ約2、1 kgfcm^{-2} 圧力が生じます。溶媒の種類により圧力が異なるのは次式に示すように溶媒粘性が効くためです。

$$[\text{圧力}] \propto [\text{溶媒粘度}] [\text{流速}] [\text{チューブ長さ}]$$

（但し、チューブ内径一定で層流のとき）

なお分取流量で使用する場合は、同じ抵抗管では圧力がかかり過ぎるため、チューブを短くするか、内径

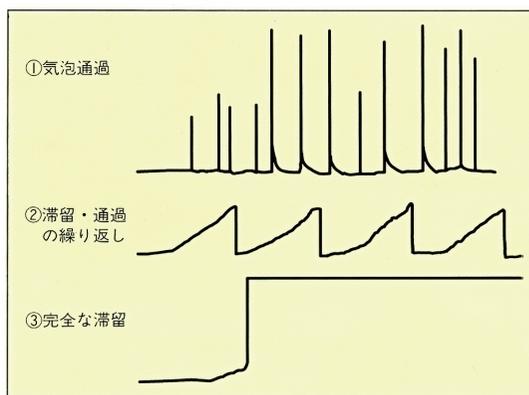


図15 セル内での気泡発生・滞留によるベースラインノイズ

表1 検出器と耐圧

検出器の種類	耐圧 (kgfcm^{-2})
UV (VIS) 検出器	~ 30
電気伝導度検出器	~ 30
蛍光検出器	~ 5
示差屈折計検出器	$\sim 1^*$
電気化学検出器	$\sim 0^{**}$

* 電気弁耐圧。セル耐圧は 7 kgfcm^{-2} まで。

** Ag/AgCl 参照電極を用いるとき。

の大きなチューブ（例えば0.8mm内径）を使って下さい。一方、セミマイクロなど流量が低い場合は（例えば0.1ml/min）、同じ抵抗管では圧力がかかりにくくなるため、0.2mm内径×6m長さのチューブなど背圧のかかりやすいものに変える必要があります。

ただし、電気化学検出器の場合は、セル耐圧が低いために背圧をかけられません。このような場合は、あらかじめ移動相中の空気を脱気しておく必要があります。

以上、流路中の気泡発生によるトラブルを見直し

てきましたが、ポイントはやはり温度上昇・圧力低下・溶媒混合です。図16に流路と圧力・温度の関係の例を示しましたので、みなさんのシステムではどの部分で発生の可能性が高いかを考えてみて下さい。

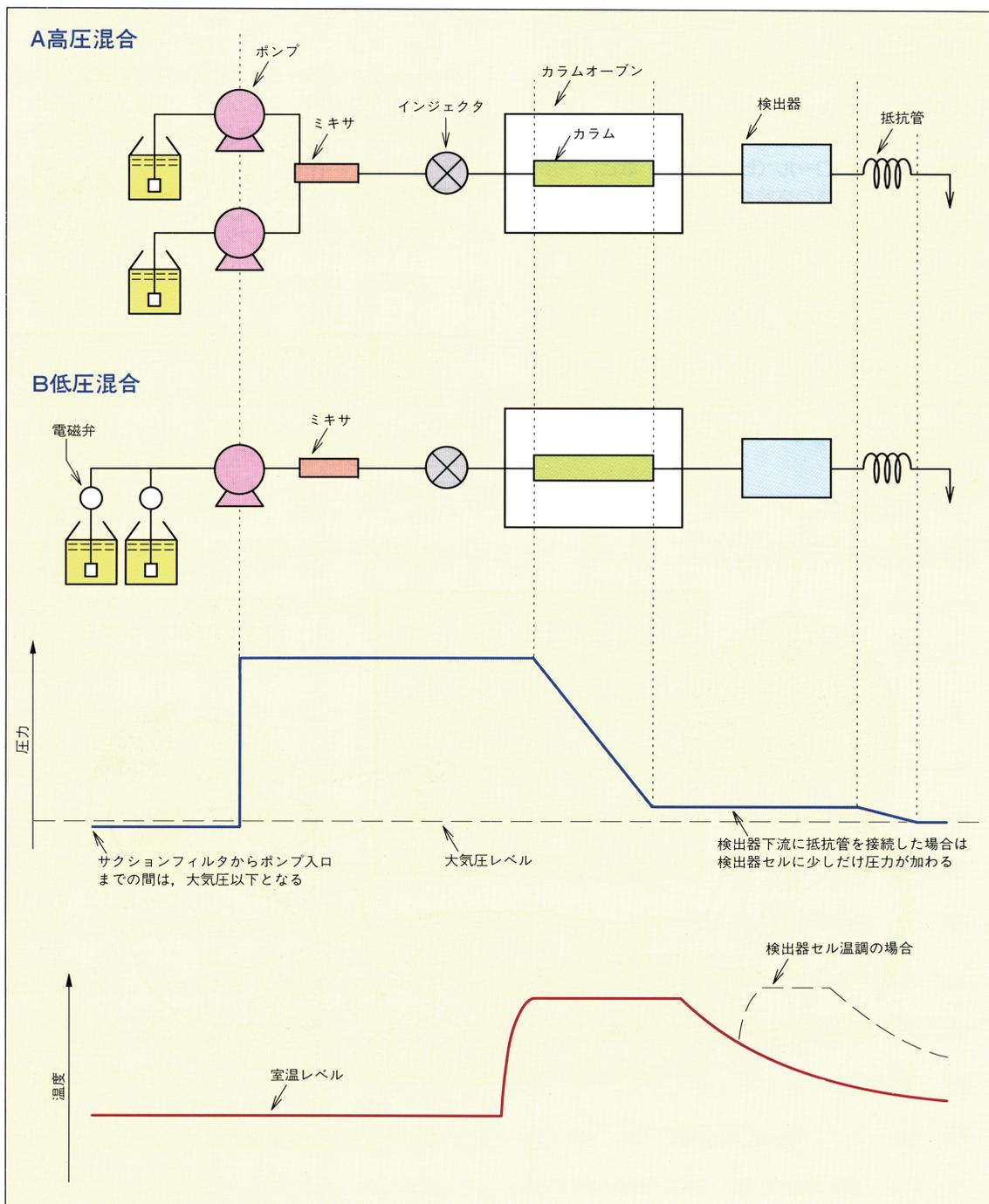


図16 HPLC流路と圧力・温度の関係

4.溶解している空気(酸素)による検出への悪影響

気泡発生が関係する不具合は、吐出圧力変動やペーライン上の気泡特有のノイズなどにより発見しやすいものです。しかし、気泡は発生しないが溶解

している空気が分析へ悪影響を及ぼす問題は、目につきにくく少々やっかいな問題です。

4-1) 酸素溶解量が多いことによる検出への悪影響

溶存している気体の中で、検出への影響が大きいのは酸素です。検出器セル内の溶液に対してその圧力・温度下で飽和溶解度以下であってもいろいろなイタズラをしてしまいます。

i) 蛍光検出……ピレン・ナフタレンなどの多環芳香族やトコフェロール(ビタミンE)など、一部の蛍光成分は、酸素の溶解量が多いと検出のレスポンスが低下します(O₂ quenching=消光)。実際には、溶媒のバックグラウンドも少し下がるのですが、レスポンス低下が大きく、例えばナフタレンでは溶存酸素を除いた時に比べて約1/4になる場合があります。

ii) 電気化学検出……特に還元電位下での測定を行う時、酸素の溶解量が多いとその還元電流が生じてしまい、S/Nが悪くなります。

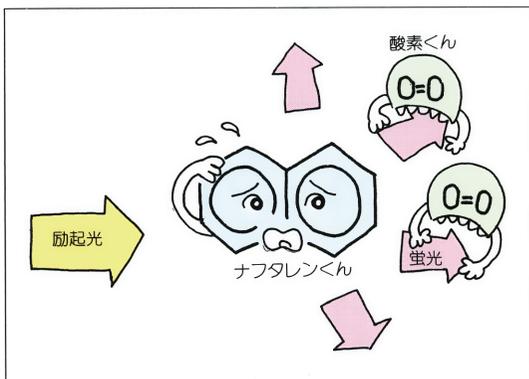
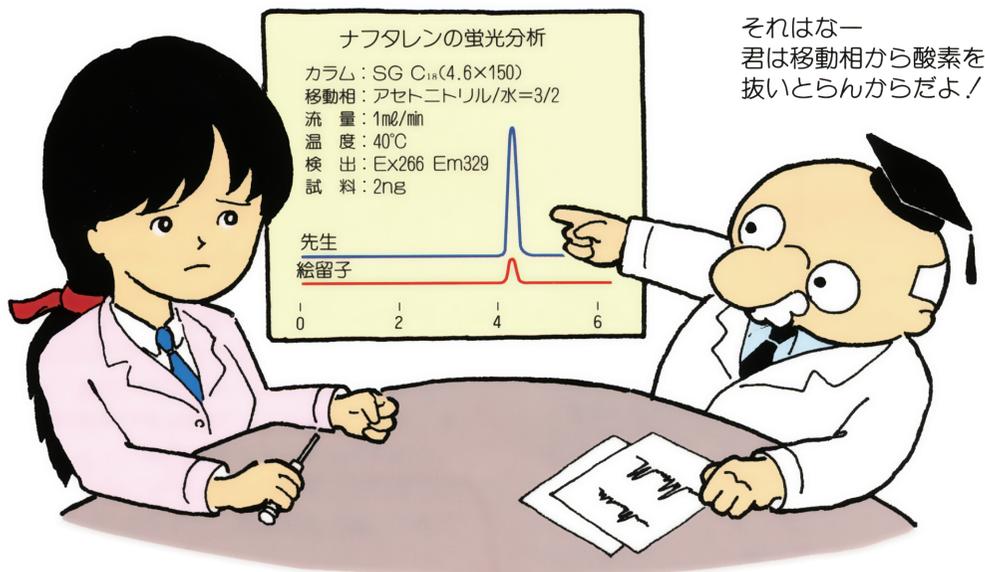


図17 “酸素くん”は蛍光が好物

同じ量注入しているのに
どーして私の方が
ピーク小さいんですか？



4-2) 酸素溶解量が多くしかも変化することによるUV検出への悪影響

一部の有機溶媒は、酸素の溶解量が多いと吸光度が増大します。これを逆に言えば、脱気を行うことにより移動相吸収によるバックグラウンドを下げるができるわけです。例えば、空気（酸素の分圧0.2気圧）が、飽和溶解量になっているメタノールを移動相として210nm測定を行っている時に、Heパージによる脱気を行えば、0.32AU以上バックグラウンドが下がります（図18）。従って、酸素溶解量が多い時は、ノイズレベルが大きいことは勿論、さらに移動相の液温変化などにより溶解量が変化することからベースライン変動も大きくなります。仮に0.01AUフルスケールで測定した場合、酸素の溶解量が1%変化するとベースラインはフルスケールの30%以上変化することになります。また、酸素溶解量の多いメタノールを用いてグラジエントを行った場合、ベースラインの傾きが大きくなります（図19）、ピークの波形処理に問題が生じやすくなります。

この溶存酸素の影響は、短波長域で大きいのですが、テトラヒドロフラン（THF）では、比較的長波長までこれが認められます。254nmでの影響は、THF>メタノール>アセトニトリル>水となります。一方、短波長域でもアセトニトリル（LC用）ではあまり影響がみられません。従って、吸光度増大は、酸素自体の吸収ではなく、溶媒あるいはその不純物と酸素の間の何らかの特異的な相互作用によるものと考えられています。

UVの短波長で高感度分析を行う場合は、LC用アセトニトリルを用いるのが原則ですが、分離の選択性からメタノールやTHFを用いる必要のある場合

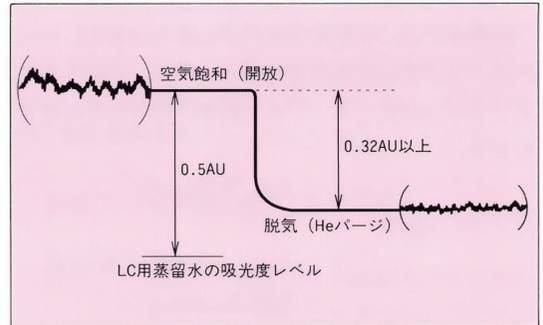


図18 メタノール210nm測定ベースラインに及ぼす脱気効果

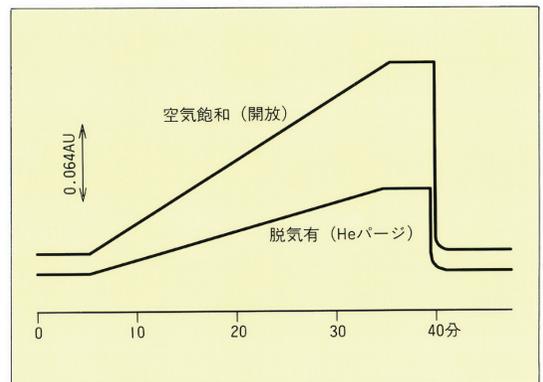


図19 水-メタノールグラジエント時の210nmベースライン変化に対する脱気の効果
メタノール40%変化（20→60% / 30分間リニア、60% 5分間ホールド）

は、溶存酸素量を減らし、しかも一定に保つような脱気を行って下さい。

4-3) 空気溶解量が変化することによる屈折計ベースライン変動

液体の屈折率は、固体・液体のみならず、気体の溶解によっても変化します。従って、屈折計では、液温変化による空気の溶解量変化が、ベースラインドリフト・うねりを引き起こすこととなります。仮にTHFを移動相として 8×10^{-6} RIUフルスケールで測定した場合、空気の溶解量が1%変化すると、ベースラインはフルスケールの10%以上変化することになります。この対処策としては、移動相液温を一定に保って溶解量変化を抑えるか、溶解量の温度依存性が少ないHeで溶解している空気を置換してやるのが適切です。

以上、この4. 項で示したように、溶存している空気（酸素）が検出に悪影響を及ぼす場合があることに留意して分析を行って下さい。

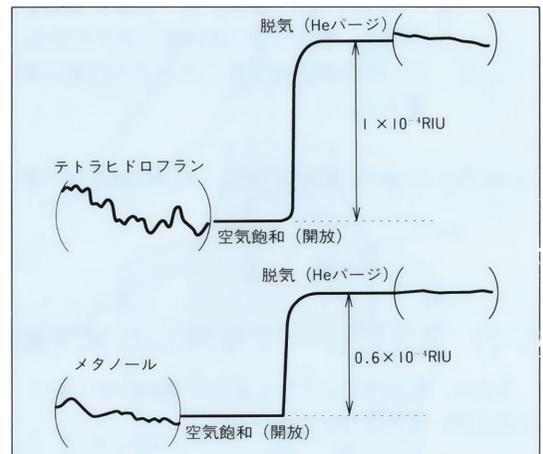
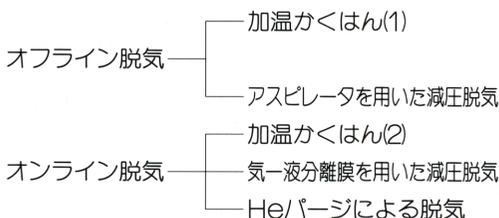


図20 屈折計ベースラインに及ぼす脱気効果

5.脱気方法

前項までに、移動相の脱気が必要な例を示しましたが、ここでは脱気方法を紹介します。大別すると、オフライン脱気とオンライン脱気に分けることができます。



オフライン脱気は、移動相ビンをポンプ入口部にセットする前にあらかじめ脱気しておく方法ですが、ポンプ入口部にセットした後に空気の再溶解が始まるため、脱気を充分してもあまり意味がありません。一方、オンライン脱気は、分析中に常時脱気をし続ける方法です。取り扱いはやや手間を要しますが、分析の信頼性を高めるのに有用です。それぞれ、長所・短所がありますので、以下に示します。

5-1) 加温かくはん(1)

移動相ビン内溶液の空気溶解量を、飽和溶解量の値へ減らすために用いられます。倉庫で冷えた溶媒を用いる際や、朝から昼にかけて室温上昇が予想される際、さらに水-アセトニトリルを混合した際は、分析中よりも移動相ビンを設定した時の方が液温が低いこととなります。そこで、**少し加温して素早く平衡状態に到達させます。液温が低いと、液体の密度も異なるわけですから、送流量にも影響します。この影響を除く効果も目的とします。**

オンライン脱気の気-液分離膜を用いた脱気や、He/パージによる脱気を行う場合も、あらかじめこの操作をしておくことが好ましいと言えます。

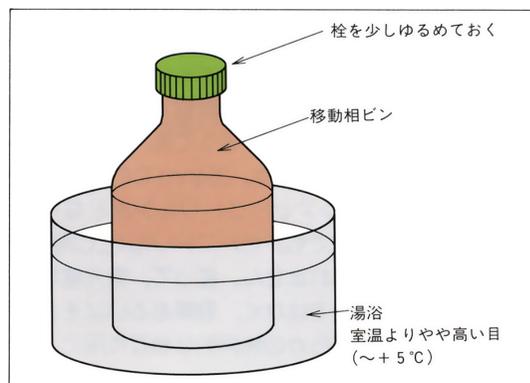


図21 加温かくはん(1)

〈操作〉 栓をゆるめた移動相ビンを、室温よりやや高い目の湯浴に入れる。時々ビンを取り出して栓を閉めて振り混ぜた後、ゆるめて余分なガスを抜く。丁度、分液ポートの圧力を抜く要領。ビンが室温よりも少し暖かくなった時点で完了とする。ビンの外壁を拭いて、ポンプ入口部に設置する。

〈長所〉 ○操作が簡便であり、特別な装置は不要。

〈短所〉 ○飽和溶解量への脱気であるので、低圧グラジエントや一部の高感度検出には適さない。
○加温しすぎると、脱気され過ぎるため、分析中に再溶解を引き起こしてベースラインドリフトを招く。

〈用途〉 ○通常感度のUV、屈折計、蛍光検出。ただし、カラムオープン・検出器セル加温や、高圧グラジエントの場合は、検出器に背圧がかけられることが必要。なお、5-6)の移動相ビン上置きか気泡トラップを併用することが望ましい。

5-2) アスピレータを用いた減圧脱気

本法も、基本的には余分な溶存空気を手早く除くために用いられます。

〈操作〉 移動相ビン口にアスピレータを取り付け、ビンを超音波洗浄器で振動するが、

移動相をかはんしながら、吸引し脱気する。小さな泡が勢よく出なくなれば終了。吸引し過ぎると、大きな泡が発生するが、これは移動相の沸騰である。

アスピレータでの吸引中は、接液気体が移動相蒸気となる（＝空気の分圧が0に近くなる）ため、溶存空気が飽和溶解量より低いレベルへ脱気されやすく

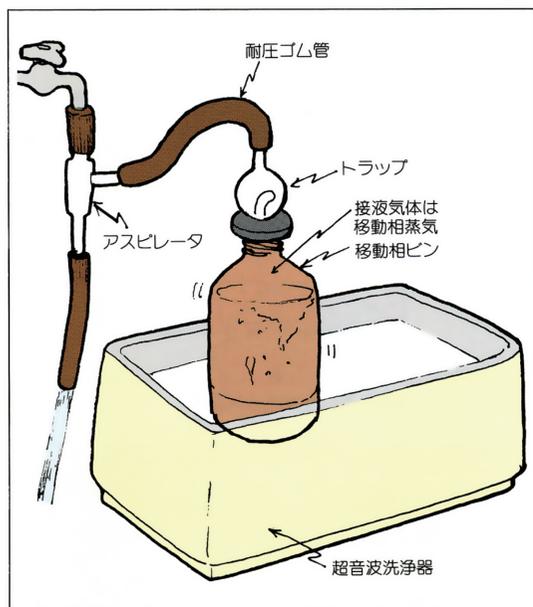


図22. アスピレータを用いた脱気

5-3) 加温かくはん(2)

オンラインで加温かくはんを行う方法です。移動相をカラム・検出器セルの温度に保温することができるため、一定組成送液では、気泡発生もなく、屈折計ベースラインも安定になります。移動相温度を上げるほど脱気能力は向上しますが、沸騰気泡のサクシオンフィルタへの進入防止や、サクシオンチューブやポンプヘッドの保温もしくは温調が必要になります。

〈操作〉 専用のリザービンに冷却器を付けて、ホットスターに設置する。温調効果を上げるため、湯浴を利用した方がよい。

〈長所〉 ○溶存空気量安定性に優れる。

〈短所〉 ○装置が大型となり、専用の栓を備えた移動相ビンや水配管が必要。
○混合溶媒系の場合、調製段階と送液段階で比率に誤差が生じる。
○安定化するのに時間を要する。
○ランニングコストが高い。

〈用途〉 ○屈折計、電気伝導度検出、電気化学検出器の高感度分析。
○UV検出、蛍光検出の高感度分析は、高温加温時に適。

なります。一方、ピンをポンプ入口部へ設置すると、接液気体は徐々に空気に置換されるため、空気の再溶解が始まります。また、吸引時に移動相蒸発の気化熱がうばわれ冷えやすいため、この場合にはポンプ入口部へ設置後に液温上昇すると共に、前述とは逆に飽和溶解量減少も、起こりやすくなります。

〈長所〉 ○短時間の操作で脱気できる。

〈短所〉 ○減圧にし過ぎると溶媒組成が変化する。
○屈折計や一部のUV検出などでベースラインドリフトしやすい。

〈用途〉 ○通常感度のUV、蛍光検出。ただし、カラムオープン・検出器セル加温や高圧グラジエントの場合は、検出器に背圧が必要。
○液温変化・溶媒組成変化が起こりやすいので高精度分析には不向き。
○移動相溶媒が水だけの電気伝導度検出、電気化学検出の場合は、飽和溶解量以下への過剰な脱気をすることにより、数時間分析が可能となる。

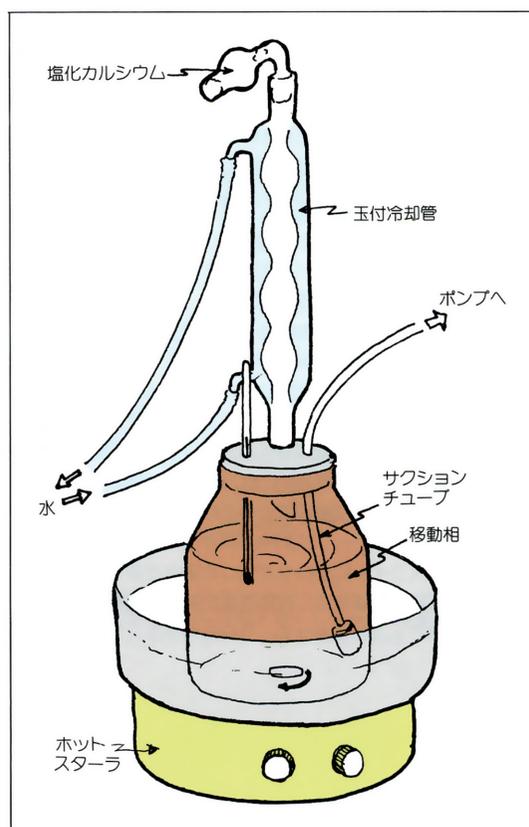


図23. 加温かくはん(2)

5-4) 気-液分離膜を用いた減圧脱気

移動相ビンと送液ポンプの間に設置するタイプで、単に“テカッサー”と呼ばれるほど広く用いられています。樹脂膜チューブの外側を減圧状態に保ち、膜の透過性を利用して、分子サイズの小さな酸素分子・窒素分子を移動相溶液から排出します。約85~95%の空気を除くことができるため、グラジエントを含めて流路中での気泡発生によるトラブルを防止できる上、一部の高感度検出に適するようになります。

〈操作〉 移動相ビンと送液ポンプとに接続する。樹脂膜チューブ、容量（チューブ容量は比較的少ないDGU-3A, 4Aで一流路当り約15ml）の2~3倍ポンブドレインから排出する。あるいは、ドレインから排出しながら、5秒ほどサクシジョンフィルタを液面より上げて故意に気泡を吸引させ、ドレインから気泡が出てくるのを待ち、出終わってから約10ml排出して移動相交換完了とする。

〈長所〉

- 移動相ビン形状・栓に制限がない（他のオンライン脱気では制限がある）。
- 混合溶媒の組成が変化しにくい。
- ランニングコストが安い。
- 扱いが容易。

〈短所〉

- 脱気能力が流量に依存する。^{注1)}
- 真空ポンプのON, OFFに同調して、脱気能力が変化する。^{注2)}

注1) 脱気能力は高流量になるほど劣るので、メタノール100%を移動相として流し210nmでモニターすると、流量を上げると吸光度が上がる（図28）。

また、水-メタノール高圧混合リニアグラジエント時に、ベースラインの吸光度変化は曲線を示す（図29）。

注2) 真空チャンバー内の減圧レベルが一定に達した時に、①真空ポンプの回転数がなお一定であるタイプと②真空ポンプが自動停止し、減圧レベルが再び下がると自動始動するタイプ、の2種がある。①は、安定化するのに非常に時間がかかるため、市販のほとんどのものは②となっている。この結果、メタノール210nm, THF254nm, THF屈折計ではベースラインにうねりが生じる場合がある（図30）。ただし、屈折計の場合は、脱気装置の複数流路を直列に接続する（図31）ことによって、うねりが小さくなる場合がある。

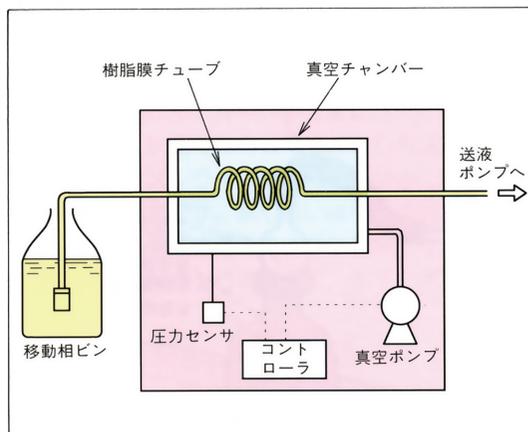


図24. 気-液分離膜を用いた減圧脱気装置

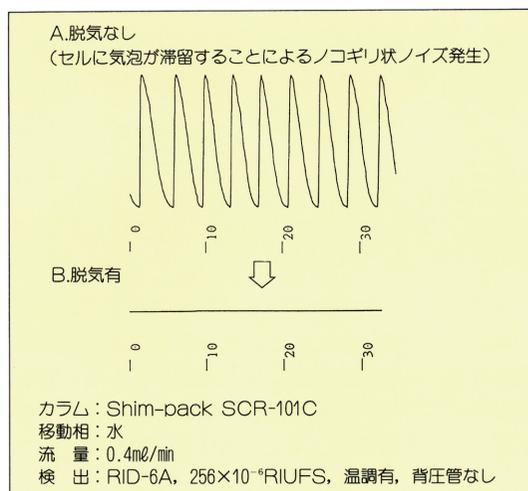


図25 気-液分離膜を用いた減圧脱気によるベースライン安定化例



- 〈用途〉
- 低圧・高圧混合グラジエントを用いた高精度（保持時間の再現性）分析。
 - 蛍光検出，電気伝導度検出，電気化学検出を用いた高感度分析。
 - UV検出を用いた高感度分析。ただし、溶存酸素量変動の吸光度への影響が大きい移動相を用いた場合は不適。
 - 通常感度の屈折計検出の分析。



図26. 気-液分離膜を用いた減圧脱気イメージ



図27. 高流量下では脱気能力が低下するイメージ

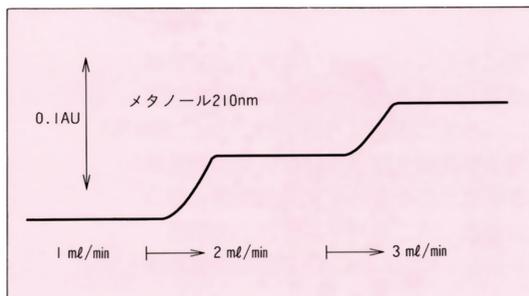


図28. 流量と吸光度

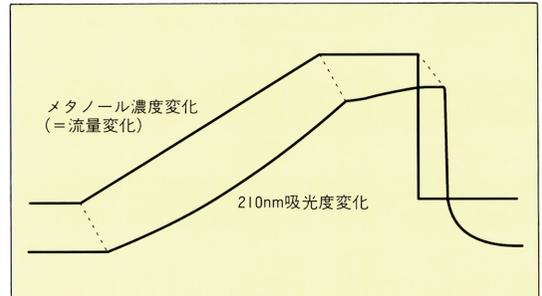


図29. 脱気能力流量依存性が高圧グラジエントベースラインに及ぼす影響を誇張したイメージ(水-メタノール，カラムなし)

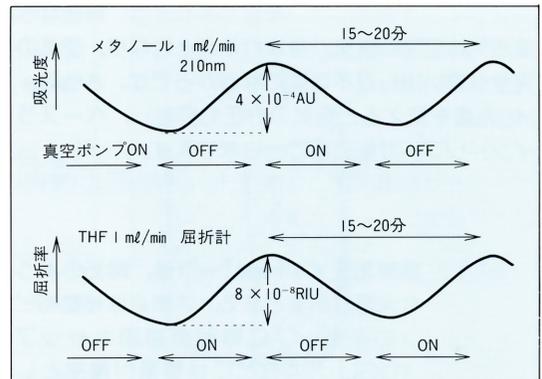


図30. 真空ポンプのON, OFFによりベースラインが変化する影響

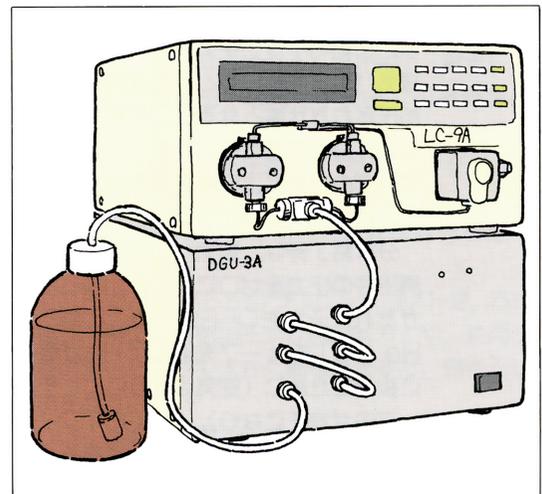


図31 複数流路を直列に接続することによって、屈折計ベースラインのうねりが小さくなる場合がある

5-5) Heパージによる脱気

移動相にHe(ヘリウム)をバブリングすると、溶解している空気が追い出されて代わりにHeが溶解することになります。Heは、図32に示したように各溶媒への溶解度がおしなべて低く、またその溶解度は図33に示したように温度の影響がわずかしかなりません。従って、溶存酸素の影響が強いUV検出や蛍光検出は勿論、屈折計においても高感度で安定したベースラインが得られます。本法は、Heパージ、あるいはHeガスバブリング、スパージ(sparge)などと呼ばれています。

ただし、移動相ビン中でHeパージをしても、ピンが開放になっている状態(図36)では、逆に余計ベースラインが安定しない場合があります。何故なら、接液気体に常に空気が含まれることになり、空気の完全な追い出しが不可能になるからです。さらに、He流量を変えると空気の分圧も変動し、ベースラインドリフトが生じることとなります。従って、Heパージをする場合は、できるだけ密閉加圧式で行うことが望ましいと言えます。

〈操作〉 密閉加圧式のHeパージは、図35のような流路が必要となる。注意点は移動相ビンのキャップに専用の密閉キャップ(DGU-10Aなどには標準付属品として含まれる)を用いることである。まず、初期にHe流量を上げて(圧力で調整する。例えば $0.2\sim 0.5\text{kgf/cm}^2$)10~30分流し、移動相中から空気を追い出す。次に排気バルブを閉じると、接液気体は少し加圧された状態となる。この時点で移動相は「分析に使える」状態になる。以後、ポンプの送液により移動相が減った分だけ、Heガスが供給されることになる。

分析終了時は、排気バルブを開けた後、調圧弁の圧力をゼロにするか、INバルブがあればそれをOFFにする。このとき、He OUTチューブを通してHeが徐々に抜けるために(空気は入りにくくチューブ内が減圧になり)、He OUTフィルタから移動相が逆流することがある。リーク用抵抗管がユニット内であれば、空気が逆流することにより、この問題を防止できるが、これが無い場合はHe OUTチューブとユニットの接続部を緩めて空気を導入する。

また、ユニット内のリリーフバルブは、調圧弁がこわれた場合や、高い圧力に設定し過ぎた場合、Heを逃がして移動

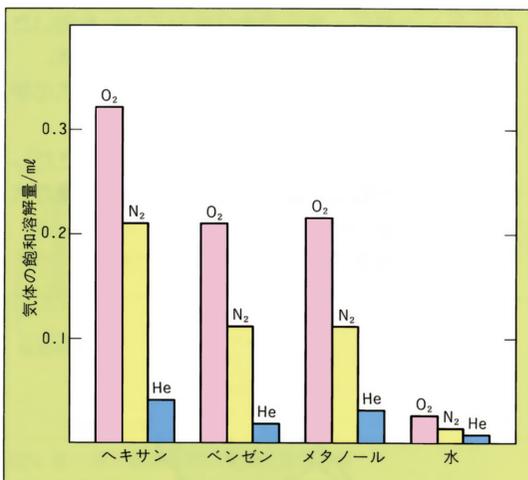


図32 溶媒 1 ml に対する気体の溶解量 (分圧 1 atm, 25°C)

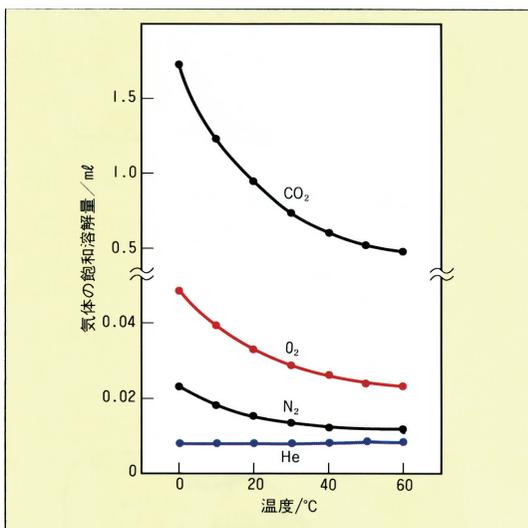


図33. 水 1 ml に対するCO₂, O₂, N₂, He溶解量への温度影響 (気体分圧 1 atm)

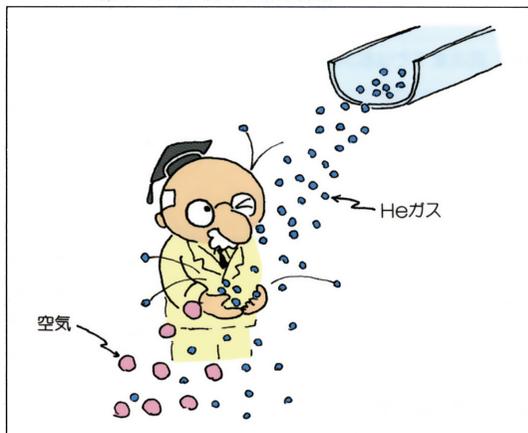


図34. Heパージのイメージ

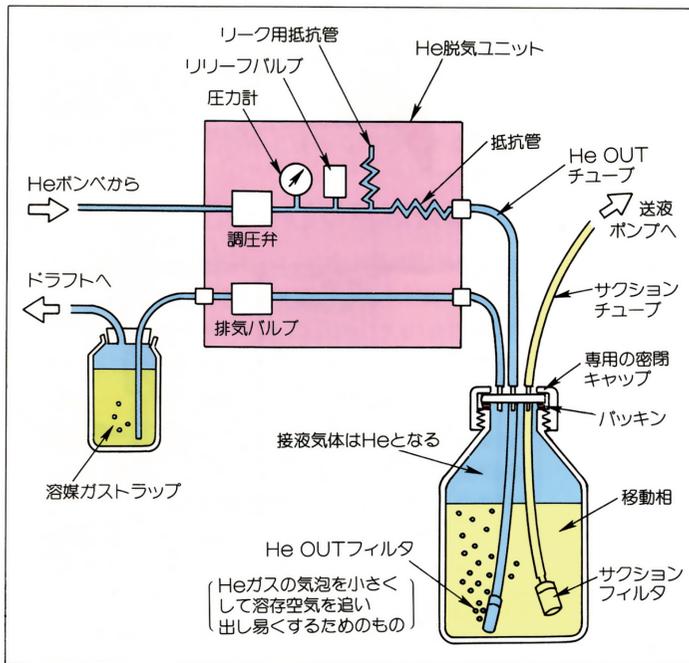


図35. Heパーージによる脱気（密閉加圧式）

相ビンに過剰な圧力がかかることを防止する。勿論、より安全性を高めるため、移動相ビンにもシートやネットを巻いて安全対策する（図37）ことが好ましい（シートやネットはDGU-10Aの標準付属品に含まれる）。

なお、溶媒ガストラップは、移動相中の揮発性溶媒蒸気が室内に拡散するのを防ぐために用いるが、密閉加圧式でないHeパーージの場合に、接液気体の圧力を一定に近づけるのに役立つ。

- 〈長所〉
- 脱気能力は最も優れている。
 - 脱気能力の送液流量依存性はない。

- 〈短所〉
- Heガスポンベ・レギュレータ・配管が必要となる。
 - 密閉加圧式でないと、ベースライン安定性が保てない場合があるため、移動相ビンの口径・形状に制限がある。
 - 揮発性溶媒を含む移動相を脱気する際には、溶媒組成が変化することがある。（密閉加圧式で定常状態に入った後は、組成変化は起こりにくい）

- 〈用途〉
- UV検出をはじめとする各種検出での高感度検出（密閉加圧式の場合。なお、

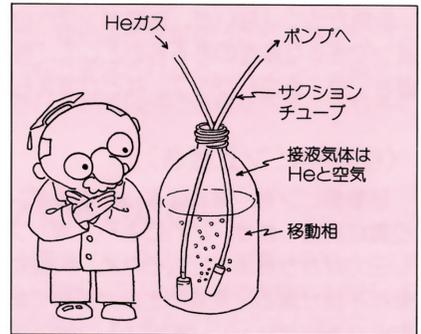


図36. 「ピン口開放でのHeパーージは not good」

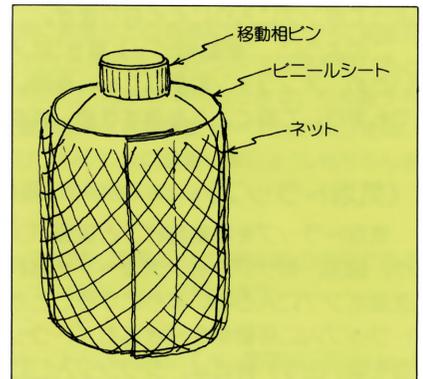


図37. 密閉加圧器式の移動相ビンの安全対策

開放系の場合は、蛍光検出・電気伝導度検出・電気化学検出での高感度検出）。

- 低圧・高圧混合グラジエントを用いた分析（それぞれの移動相ビンに単一溶媒を入れる場合は、高精度分析が可能）。

ところで、Heパーージのランニングコストは、方式の違い（例えば密閉加圧式か開放式か）や、使用法、機種の違いによって大きく異なりますが、例を示しておきます。

〈DGU-10A（密閉加圧式、全4流路）のランニングコスト計算例〉

（条件；2流路のみ使用、移動相1ℓビン×2、1日20時間運転、He圧力0.3kgf/cm²、初期パーージ20分、He（99.995%）ポンペ7㎡=15000円*）

- 初期パーージ 300ml/min×20min×2=12ℓ
- 定常状態 10ml/min（リーク流量）×1200min=12ℓ
- 移動相減少分補給 約2ℓ

トータル1日当り約26ℓ（56円）

*Heポンペ7㎡の市価は7000~20000円と幅がある。

5-6. 脱気方法以外

脱気方法ではないが、送液ポンプへの気泡流入を減少できる可能性のあるものとして、「移動相ビン上置き」や「気泡トラップ」などが考えられます。

〈移動相ビン上置き〉

移動相ビンを、図38のように送液ポンプより高い位置に設置します。これにより、ポンプ入口部に少し圧力がかかるようになるため、IN側逆流防止弁の動作不良が減る（逆流防止弁が正常であればあまり関係はありません）、ポンプ入口部に気泡が入ってもやや圧縮される、などの効果が期待されます。また、サクシオンチューブ内の小さな気泡は、浮力によってポンプに入りにくくなります。

このように、「移動相ビン上置き」はメリットが多いため、オンライン脱気ユニットを用いている場合でも実行して頂くことをおすすめします。

〈気泡トラップ〉

気泡トラップを移動相ビンと送液ポンプの間に設け、図39、40サクシオンチューブを流れる気泡が、送液ポンプに入らないようにすることができます。トラップ内に移動相を引き込む（トラップ内から気泡を吸い出す）時には、シリンジ入口に注射器を接続して吸引します。

本法の短所として、①移動相交換に時間を要する（例えば、少くとも内容量の10~20倍は液を流す必要がある）②低圧グラジエントを行うポンプ入口部には使えない（正常なグラジエントが出来なくなる）などがあり、オンライン脱気ユニットを用いている場合は、使う意味はありません。

以上が脱気方法の例ですが、それぞれの方法により脱気能力や最適用途が異なります。例えば、本紙P2で触れているアスピレータによる脱気は、ひと昔前には「必ずやるべきこと」と思われていたの

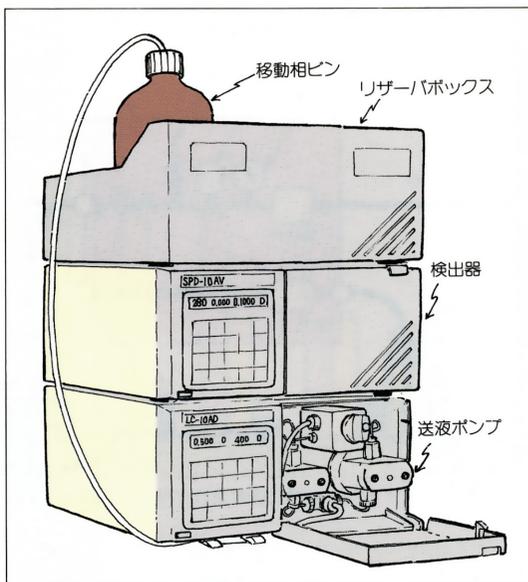


図38 移動相ビン上置きの場合

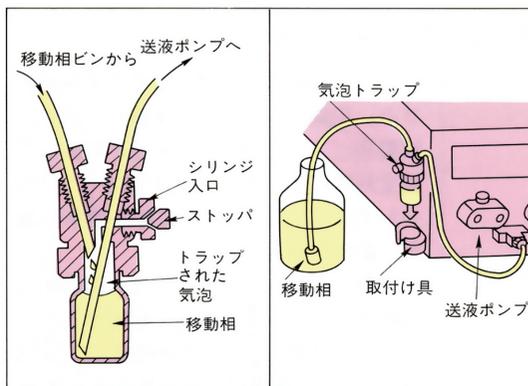


図39 気泡トラップ原理図 図40 気泡トラップ設置図

ですが、P15に示したような留意点があり、位置付けが変わってきました。本項を参考に、分析条件を考慮して有効な脱気方法を用いていただきますようお願いいたします。

6. 分析条件別対処法

前項では移動相の脱気方法別に特徴や用途を紹介しましたが、次は分析条件別に考えてみましょう。一般的に、通常感度の分析に対しては、5-1)加温かくはん(1)と5-6) 移動相上置きで充分である場合が

多いのですが、検出条件が異なったり高感度ベースラインの安定性が要求されると、オンライン脱気が必要であったり、脱気以外に留意すべきことも多くなります。

6-1) 逆相カラム-UV短波長高感度ベースラインを得るために

ODSなど逆相カラムとUV検出器の組み合わせは、HPLC分析の中で最もポピュラーなものですが、短波長で高感度検出を行うとなると、次の点に留意しなければなりません。

①HPLC流路・カラムの充分な洗浄を行う

移動相で1日洗浄している、というのは時間の無駄です。有効な洗浄法は、洗浄したい成分に対して移動相よりも溶出力が強い洗浄液を流すことです。例えば、油污れや疎水性の高い中性成分に対してはテトラヒドロフランなどを流す、シリカゲル表面への吸着成分に対してはメタノール/0.5M過塩素酸ナトリウムを含む0.01%りん酸水=4/1を流す、金属イオンに対しては0.1%EDTA・2Na水を流す(カラムを除く)、などです(LCtalk特集号IV P17参考)。インジェクタを含めた流路切替え/バルブ類は、数回別のポジションに切り替えながら洗浄します。サクシオンフィルタも本誌P9を参考にして洗浄して下さい。

なお、流路・カラムの洗浄は、他の高感度分析においても同様に留意すべきことです。

②移動相のバックグラウンドが低い試薬を用いる

図41~43に、逆相カラムの移動相としてよく使われるアセトニトリル、メタノール、THF試薬の吸収スペクトルを示します。LC用のアセトニトリルが短波長でのバックグラウンドが最も低いことがわかります。一方メタノ

ールやTHF試薬は、バックグラウンドが高いのでノイズが大きくなる上、溶解している酸素量の変動によりバックグラウンドが変化するため、高感度分析には不適切です。溶媒の種類によって分離の選択性やピーク形状が変わることがありますが、支障が少なければ、LC用アセトニトリルを利用すべきです。

また、緩衝液に酢酸などの有機酸系を用いたり、吸着抑制剤としてトリエチルアミンなどのアミン系を用いると短波長でのバックグラウンドが高くなります。りん酸ナトリウム系(吸着抑制剤は過塩素酸ナトリウムなど)を用いて、できるだけフレッシュに調製しましょう。もちろん水は、LC用蒸留水を利用しましょう。

③高感度検出器を用いる

当然のことですが、市販のLC用検出器の中でできるだけノイズレベルの低いものを用います。

④オンライン脱気を行う

LC用アセトニトリルを用いても、密閉加圧型のHe/パージなどオンライン脱気を行うことによるバックグラウンド低下がわずかに認められます。

以上、重要度の順に、4点のみ取り上げてみました。実際には多くの場合、①と②が適切な条件を満たしていないのではと思われます。分析条件も、洗い直してみて下さい。

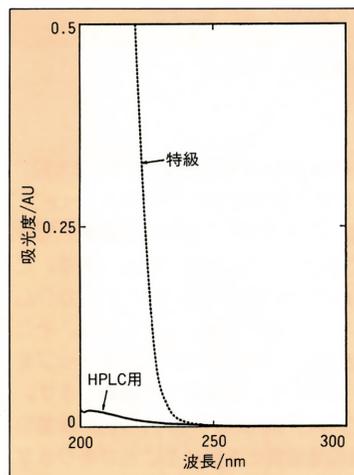


図41 アセトニトリル試薬の吸収スペクトル

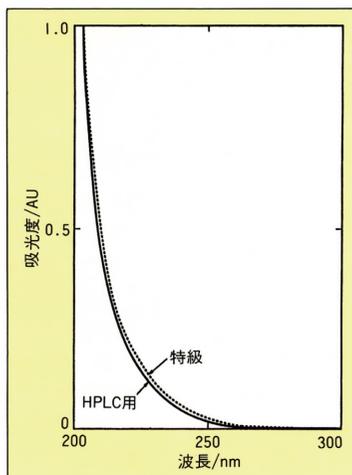


図42 メタノール試薬の吸収スペクトル

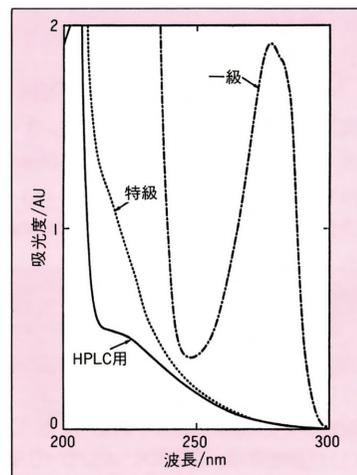


図43 テトラヒドロフランの(THF)試薬の吸収スペクトル

(それぞれ空気飽和・リファレンスはLC用蒸留水)

6-2) 糖分析カラム—屈折計で高感度ベースラインを得るために

UV検出が広く用いられる中で、糖分析やGPC (SEC=サイズ排除クロマトグラフィー) は基本的に屈折計による検出が行われています。一般に屈折計は、ベースライン安定性が悪いもの、と決めつけられがちですが、実は真犯人は移動相中の溶存空気やカラム温度変化であることが多いのです。

i) 酸位子交換カラム

(Shim-pack SCR-101Pなど)

この種のカラムは、シャープなピークを得るために分析カラム温度を80°C付近に設定します。従って、移動相ビン中で空気が飽和溶解量であっても、カラム出口及びその下流では気泡が発生しやすくなります。このとき、①あらかじめオンライン脱気を行って溶存する空気量を減らしておくか、②背圧をかけて気泡発生を抑制します。

ところが、②について言えば屈折計自体にあまり背圧をかけることができません。水を0.8mL/minで送液している時は、0.3mmI.D.×50cm (約0.4kgcm⁻²) くらいを限度に考えて下さい(目詰まり無し・サンプルセルのみ通液時が前提)。そこで、屈折計の前に抵抗管を入れます。図44のように、カラムオープン出口—屈折計入口間に0.2mmI.D.×50cmの空冷管(水冷してもよい)を入れ、圧力が少し少しかつた状態で冷やすことにより気泡発生を抑制することができます。

典型的な分析条件を以下に示します。

カラム: Shim-pack SCR-101P (7.9mmI.D.×300mmL.)

移動相: 水

流量: 0.8mL/min

カラム温度: 80°C

検出: 示差屈折計 RID-6A

(温調ON, 感度 2×10^{-6} RIUFS)

なお、移動相が水のみの場合、溶存する空気量変動による屈折率変化への影響はあまり大きくないため、セル中で気泡発生しなければ厳密な脱気でなくても前述の感度で使えます。

ii) 順相カラム

(Shim-pack CLC-NH₂など)

典型的な分析条件を以下に示します。

カラム: Shim-pack CLC-NH₂ (6mmI.D.×150mmL.)

移動相: アセトニトリル/水=7/3

流量: 1.2mL/min

カラム温度: 室温

検出: 示差屈折計 RID-6A

(温調ON, 感度 8×10^{-6} RIUFS)

この条件でまず注意すべきことは、移動相調製です。グラジエントのシステムでアセトニトリルと水の混合比を設定して送液するのは不適切で、5-1)項の加温かくはん(1)が必要です。分析中にオンライン脱気をする場合は、密閉加圧型のHe/パージを用いるべきです。できれば一

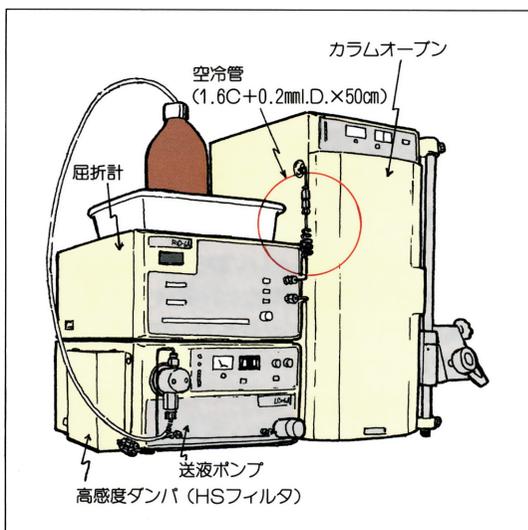


図44 カラムオープン出口—屈折計入口間の空冷管設置例



図45 エアキャップを巻いた分析カラム

定温度に保つことが望まれます。恒温室では 2×10^{-6} RIUFSでの分析が可能となります。

次にカラムの保温(正確には微小温度変化緩衝)です。室内の風の動きで微妙にカラム温度が変化します。このため、-NH₂基まわりの水層の厚さが変わり、カラム溶出液のアセトニトリル/水の比率が変動します。そこで、カラムに直接風が当たらないように、エアキャップを3重に巻く(図45)などして、温度変化を緩衝します。

なお、カラムオープンONの状態でも、カラムの設置位置等によりファン風の強弱変化を受けることがありますし、また逆相カラムでも同様の現象が生じます。

6-3) イオンクロマトアルカリ移動相条件に用いる炭酸ガストラップ

無機陰イオンの分析において、ほう酸/マンニトール/トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(pH 7.9)など弱アルカリ性移動相が用いられる場合があります。このような移動相は、空気中の炭酸ガス(CO₂)が溶解し易く、pHが下がって目的成分の保持時間が変化し易くなります。そこで、移動相の脱気と言いたい所ですが、アルカリ水溶液中のCO₂は脱気が困難です。この場合は、図46のような炭酸ガストラップを用いて、調製後の移動相が直接空気中のCO₂と触れないようにします。なお、一般分析においても、pHが高く緩衝能が弱い場合は本法が有効です。

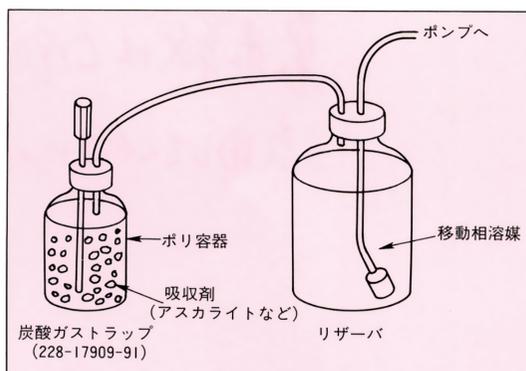


図46 炭酸ガストラップ接続例



私も「移動相の脱気」について、考え違いをしていたことがわかりました。皆さんも、用途に応じて脱気方法を選択して、信頼性の高いHPLC分析を行って下さい!!

〈関連製品〉 ()内は部品番号



気泡トラップ(228-23675-91)
サクシオンチューブ内の気泡を除きます。ただし低圧グラジエントには用いないで下さい。



DGU-3 A(228-24200-91)
気一液分離膜による減圧式、3 流路用



DGU-4 A(228-24201-91)
気一液分離膜による減圧式、2 流路用



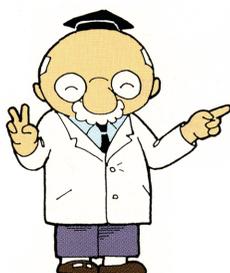
DGU-1 A(228-17641-91)
密閉加圧型Heパージ式、1 流路用



DGU-2 A(228-21996-91)
半開放型Heパージ式、4 流路用



DGU-10A(228-24845-91)
密閉加圧型Heパージ式、4 流路用



Heパージ式ユニット関連品
減圧器(670-12020-01)
ポンベジョイントHe(201-30044)
キャリアガス導管2.5M(201-48067)
ファイバ製パッキン(201-31745-84)



リザーバボックス(228-25038-91)
移動相ビン上置き用…1ℓビン7本収納
およびマニュアルインジェクタ2個取付可能

LC talk
Special Issue **V**

発行日：1991年8月29日

改訂日：2016年8月1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**”

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

※掲載内容は、1991年発行時に基づいています。