



(U) HPLC 分析において 有機溶媒を使用する場合の 対処方法と使用上の注意

はじめに

このテクニカルノートには、(U) HPLC 分析において有機溶媒を安全に取り扱う方法と、機器や分離カラムに対する損傷を防ぐ方法についての概要が記載されています。

遊離ハロゲン化物、ヒドロペルオキシド、フリーラジカル、または酸化性の強酸が存在する場合、ステンレス製システムに腐食が生じる可能性があります。溶媒によっては、理想的でない条件下におかれた場合、反応が起きて有害な化合物が生成される可能性があります。次の溶媒を使用する際は、反応物質の生成を防止する必要があります。

- ハロゲン化アルカリ化合物（ヨウ化リチウム、塩化カリウムなど）およびその酸性溶液
- 硫酸や硝酸のような高濃度の無機酸。特に高温状態は要注意。
- ハロゲン化有機溶媒、またはラジカルや酸が生成する混合物（例えば、クロロホルム、塩化メチレンなど）
- 過酸化物が生成する可能性があるクロマトグラフィークレードのエーテル（THF、ジオキサン、ジイソプロピルエーテルなど）
- 強いキレート剤を含む溶媒（EDTA など）

さらにエーテルや環状エーテルは酸素の存在下で容易に分解されます。生成されるヒドロペルオキシドは機器のコンポーネントに害を与える可能性があります、故障の原因にもなります。

溶媒用容器の使用環境をコントロールすることで、溶媒の安定性を向上させることができます。水分、光、および空気を遮断する方法が最も効果的です。窒素やアルゴンなどの不活性ガスが容易に入手できる場合は、不活性ガス配管をボトルに接続し、ボトルの上部の空間に乾燥した不活性ガスを連続的に充填することをお勧めします。溶媒が消費される分を補充できればいいので、この不活性ガスは高流量で流す必要はありません。一般に、ガス流量は毎分 cm^3 で十分です。

熱や光によって触媒される反応もあります。直射日光を避け、熱源に近づけないでください。溶媒のボトルは、褐色のものを使用することが推奨されます。

安定剤に関する詳細なテクニカルノートについては、シグマアルドリッチのウェブサイトをご参照してください。

<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/learning-center/stabilizer-systems.html>



通常、使用前にすべての溶媒をろ過することが推奨されますが、バッファや混合溶媒を除く反応性溶媒のろ過は推奨しません。クロマトグラフィーに使用する前に空気に曝すことが溶媒の分解を引き起こす原因となる場合があるためです。

注記

BHT が添加された THF やエタノールが添加されたクロロホルムのように安定化剤を含む溶媒を使用する場合は、ろ過によって反応が起こることはありません。「溶媒に関する注意事項」[5ページ](#) を参照してください。

購入時に入っていたボトルをそのまま使用することが望ましいです。必要な場合は、溶媒ボトル内部に空気が入ってしまうことを防止するため、溶媒チューブと不活性ガスチューブを接続できる 2 つの穴が付いた蓋で容器を閉めてください。アジレントの溶媒チューブの外径は、およそ 1.6 mm です。

小さな溶媒ボトル (1 リットル以下) を使用することで、適切な時間内に溶媒を消費することが、反応の抑制に役立ちます。システムを使用していないときは、全てのチャンネルに対して低流量で (<0.1mL/min) 送液することを推奨します。機器で分析を実施していない間の溶媒の再循環または再使用は行わないでください。

注記

安定剤は時間の経過とともに減少し、その濃度をモニターすることは非常に困難です。

フラクションコレクタ内に捕集された溶媒が蒸発し、反応生成物の濃度が上昇し、重大な事故が発生する場合があります。ヒドロペルオキシドは熱、衝撃、摩擦などにより爆発するおそれがあります。その他にも残留溶媒物質の自己爆発が報告されています。

溶媒の変更

同じHPLC装置を使用してポリマー分析を行う場合、システム内の溶媒置換が必要になる場合があります。水から有機溶媒に変更する前に、カラム、キャピラリー、検出器 (RI 検出器のリファレンスセルを含む) からバッファを完全に洗い流す必要があります。新しい溶媒/移動相が、以前使用した溶媒/移動相と混和可能であることを確認してください。溶媒が混和しない場合は、混和可能な中間溶媒でシステム全体を洗い流してください。この手法により、バッファの塩析または混和性に関する問題が防止されます。

ハードウェアに及ぼす影響

有害な化合物がハードウェアと接触すると、腐食が生じる場合があります。ステンレスチールが腐食されるだけでなく、システムの他の部分も影響を受けます。流路に高品質の不活性材質のみを使用している場合、定期的に腐食性の汚染物質に曝される場合、システムコンポーネントの様々な箇所が劣化する可能性があります。

ポンプ

溶媒チューブ

標準的な溶媒チューブは、反応性溶媒に長期間曝されると曇ったり脆くなる可能性があります。これを防止するために、溶媒チューブに PN G7120-68070 を使用することを推奨します。

溶媒選択バルブ

溶媒選択バルブの素材は様々な溶媒に耐性があるものの、劣化によって気密性に問題が生じる場合があります。気密性が悪くなり、同じチャンネルのポート 1 とポート 2 の間で溶媒の漏れによる混合が発生する可能性があります。アプリケーションで溶媒選択バルブが必要ない場合は、バルブのバイパスも検討してください。

ジクロロメタン、MeOH、ヘキサンまたは THF などの低沸点の溶媒を使用する場合、溶媒選択バルブ内部に小さなガスの気泡が発生することがあります。こうしたガスの気泡は、デガッサにより除去することができます。

デガッサ

デガッサ内部に使用されている材質は汎用性が高く、様々な溶媒に耐性があります。脱気効率は、ユニットが反応性溶媒に長期間曝される場合にのみ影響を受けます。デガッサ内部のチューブは空気に対する透過性が高いため、真空状態が維持されず新しい溶媒が送液されない場合は、デガッサチャンバー内部で直接危険な反応が起きるおそれがあります。チャンバーのチューブを透過して充満する揮発性溶媒は、デガッサポンプ内で凝縮し、損傷を与える可能性があります。

ポンプの電源を切る前に反応性溶媒を洗い流すか、システムを使用していない場合でもデガッサチャンネルを介して低流量 (<0.1mL/min) で送液することを推奨します。

インレットバルブ

一般に、高い反応性を有する溶媒を使用する場合でも標準的なインレットバルブおよびアウトレットバルブが使用できますが、利用可能な場合はアクティブ インレットバルブの使用を推奨します。炭化水素（ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ベンゼン、トルエン）、エチルアセテートなどの無極性の非プロトン性溶媒 100%送液する場合に限り、N タイプのインレットバルブを使用することを推奨します。N タイプのバルブは、プロトン性、極性、または反応性の溶媒を使用すると腐食しますので注意してください。

ピストン

1290 Infinity ポンプおよび 1290 Infinity II ポンプ、さらに 1260 Infinity II Prime LC で使用されるセラミックピストンは、酸性の有機溶媒、特にリン酸系溶媒により損傷を受ける可能性があります。こうした溶媒の組み合わせが使用される場合、またはセラミックピストンが繰り返し故障する場合には、代替のサファイアピストンの使用が可能です。

サポートされているブランジャー アセンブリサファイア（旧タイプの場合は 5067-4695, EM ポンプヘッドの場合は 5067-6174）

ピストンシール

出荷時に装備される標準ポンプシールで、通常は問題なく使用可能です。しかし、混合溶媒を含まない炭化水素など電気伝導度が低い溶媒を使用する場合は、G131x ポンプおよび G711x ポンプには PTFE ベース（黒）のシールの代わりに PE シール（0905-1420 2個入）を使用することをお勧めします。

ローターシール

オートページバルブのローターシールは、ポリイミドや PEEK ブレンド材質のシールを使用しています。（別材質のシールに交換されている可能性もあります）反応性溶媒の種類によって、ローターシールは長期間曝されることで損傷し、漏れや圧力変動が発生する可能性があります。システムを使用していないときは、反応性溶媒を洗い流すか、つねに低流量で送液し、ポンプ内を洗浄することを推奨します。

サンプル

ニードルシート

注入サイクルの実行中は、流路はニードルシートの部分でオープンとなり、この部分が空気に曝されることは避けられません。ニードルシートの素材は有機溶媒の反応により影響を受け、長期間曝されると脆くなるおそれがあります。こうした事例では、劣化が進むとニードルでのキャリーオーバーまたは漏れが生じ、ニードルおよびニードルシートの交換が必要となります。

ローターシール

注入バルブのローターシールは、ポリイミドや PEEK ブレンド材質のシールを使用しています。（別材質のシールに交換されている可能性もあります）反応性化合物の種類によっては、ローターシールが長期間曝されることで損傷し、漏れやピーク高さの変動が発生する場合があります。システムを使用していないときは、反応性溶媒を洗い流すか、つねに低流量で送液し、オートサンプル内を洗浄することを推奨します。

リークセンサー

リークセンサーはポリマーで被膜されています。通常このポリマーは有機溶媒に耐性がありますが、DMSO はこのポリマーを膨張させます。したがって、DMSO と接触した場合、リークセンサーを交換する必要があります。（その他の溶媒でも膨張する可能性はあります。）一般に HPLC/GPC システム内のリークセンサーにより漏れが検出された場合、送液は完全に停止されます。通常リークセンサーを被膜しているポリマーは、DMSO 以外の有機溶媒で損傷することはありません。DMSO が漏れた場合は、リークセンサーが漏れを検出し送液を停止させますが、リークセンサーの交換が必要になります。

溶媒に関する注意事項

ハロゲン化有機溶媒

ハロゲン化（大半は塩素化）溶媒は通常、劣化や副反応を最小限に抑えるために安定剤が添加された状態で販売され、クロマトグラフィーなどの用途に頻繁に使用されます。安定化された溶媒のみを使用することを強くお勧めします。

塩素化溶媒に一般的に使用される安定剤には、アミレンなどがあり、特にクロロホルムにはエタノールが使用されることもあります。適切な安定剤を検討する際には、安定剤が溶媒のいずれかのクロマトグラフィー特性に影響を及ぼすかどうかを考慮することが重要です。アミレンなどの炭化水素系の安定剤は、塩素化溶媒の極性や選択性を変化させることはありません。しかし、クロロホルムを安定化するのによく使用されるエタノールは、クロロホルムの極性を大きくし、順相カラムを用いた分離に影響を及ぼす可能性があります。

通常クロロホルムは、ジクロロメタンや HFIP より毒性が低いとみなされています。ただし、ポリアミドや PET などの難溶性ポリマーは、常温で HFIP のみに可溶であるため、HFIPの使用は避けられません。よって、これらの溶媒の蒸気がラボに拡散/充填するのを避けるために、定期的に換気が十分なされているか検証する必要があります。クロマトグラフィーで精度のよい結果を得る、およびポリマーがカラムに吸着するのを防止するために、TFA のナトリウム塩 (0.2M) をHFIPに追加する必要があります。

エーテル

エーテルは通常、劣化や副反応を最小限に抑えるために安定剤が添加された状態で販売され、GPC の用途によく使用されます。ペルオキシドの蓄積を防止するため、BHT 200 - 500 ppm が溶媒に添加されます。RI 検出器の場合は、添加剤による影響はごくわずかです。（溶媒ピークのほうが影響が大きい）。

エーテルをUV検出器含む HPLC に使用する場合、添加剤として BHT を使用すると、芳香族の性質によりベースラインノイズや吸光度が増加することがあります。

溶媒に関する注意事項

バッファ及び添加剤を含む溶媒

その場合は ≥ 1 % エタノールを安定剤として使用することもできますが、エタノールは溶媒の極性を大きくし、クロマトグラフィーの結果が変わります。

安定化したエーテルのみを使用することを強くお勧めしますが、検出条件等により、それが不可能な場合もあります。上記に言及した情報を元に検討し、有害な反応生成物が生じないようにしてください。溶媒ボトルサイズを最小限にとどめ、溶媒を毎日新しい溶媒に取り替えることが必要です。

ボトルが開封済みの溶媒は、HPLC/GPC に適した品質ではなくなっている可能性があります。溶媒が酸素と接触した際に生成される汚染物質であるヒドロペルオキシドは、強力な紫外線吸収剤であり、曝露時間が長いと溶媒を使用不能にします。

エーテルを HPLC で使用する際には、UV のバックグラウンドを測定して溶媒の適合性を調べてください。最も一般的な方法は、流路からカラムを取り外し、器具をメタノールで洗い流し、UV 検出器（波長 230 nm）のオートゼロ機能を実行することです。これが完了したら、通常使用する流量でエーテルを送液し、システム完全を洗い流します。UV 検出器のオートゼロ機能がなければ、システム内部でエーテルが充満し平衡化したときに生じる UV のオフセットを調べてください。UV のベースラインの上昇が 0.3 AU を超える場合は、その溶媒の使用を避けることを検討してください。UV のベースラインの上昇が 1 AU を超える場合は、その溶媒は廃棄し、新しい未開封の溶媒を用いて作業を続けてください。エーテルのボトル開封後長時間経過していたり、ボトルの保管状態が悪いと、バックグラウンドが 2AU を超えることが頻繁に発生します。

バッファ及び添加剤を含む溶媒

水は HPLC の機器を腐食させることはありませんが、添加剤なしで HPLC や GPC に使用されることはほとんどありません。バッファ（塩）や添加された酸はポンプやチューブを損傷するおそれがあるため、アジレントの InfinityLab Bio-inert Solution を利用する場合を除き、通常は pH <2.5 を使用しないことが推奨されます。pH >10 の場合、シリカガラスや一部のポリマーに対する水酸化物イオンの腐食性を考慮する必要があります。こうした条件下で作業する場合、標準的な溶媒インレットフィルタの材質を PEEK または ステンレススチールに交換することを検討する必要があります。入手可能な場合、漏れやキャリーオーバーを防止するため、システム全体のバルブに備わっているローターシールを PEEK シールと交換する必要があります。水溶性のポリマーのほとんどが室温では 100 % の水に溶解しないため、 NaNO_3 (0.2 M) を添加する必要があります。塩を追加することにより、これらのポリマーが水に溶けるようになる温度が変わるため、室温での溶解が可能になります。

バッファまたは酸を添加した溶媒を使用する際には、塩の析出を防止するために注意が必要になります。溶媒ボトルに沈殿物が確認された場合は、新たな溶液を調製して使用してください。ポンプのピストンのまわりの析出（ポンプのピストン/シールの故障を引き起こすおそれがある）を防止するため、アクティブ シールウォッシュ オプションを使用する必要があります。

代替溶媒

可能な場合は、有害な溶媒をより危険性の低い代替溶媒への変更を検討してください。推奨される代替溶媒は以下のとおりです。

望ましくない溶媒	代替溶媒
ペンタンまたはヘキサン	ヘプタン
ジイソプロピルエーテル、 ジエチルエーテル または THF	2-MeTHF または MTBE または CPME
ジクロロエタンまたは四塩化炭素	クロロホルム
ジメチルホルムアミド、 ジメチルアセトアミド	アセトニトリル
ジクロロメタン	酢酸エチルまたはヘプタンまたは 乳酸エチル
ベンゼン	トルエン

当社では現在アプリケーションノートの一部を見直/修正を行っており、該当する用途でより危険性の低い代替溶媒を使用することを提案しています。

また、溶媒の供給業者も、より持続可能で環境に優しい代替溶媒を利用したポートフォリオを展開しています。次の情報をご覧ください。

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/solvents-and-reagents/greener-solvent-alternatives.html>

溶媒の略語

酸

TFA	トリフルオロ酢酸
NaAc	酢酸ナトリウム
EDTA	エチレンジアミン四酢酸

エーテル

THF	テトラヒドロフラン
MTBE	メチル tert-ブチルエーテル
2-MeTHF	2-メチルテトラヒドロフラン
CPME	シクロペンチルメチルエーテル

ハロゲン化有機溶媒

HFIP	ヘキサフルオロイソプロパノール
DCM	ジクロロメタン
TCM	トリクロロメタンまたはクロロホルム

有機溶媒

DMF	N, N-ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
MeOH	メタノール

安定剤

BHT	ブチルヒドロキシトルエン
-----	--------------

