

UHPLCシステムにおける 試料溶媒の影響を受けたピーク形状の改善

日光 政隆、尾坂 裕輔

ユーザーベネフィット

- ◆ UHPLCシステムにおいて試料溶媒の影響を受けてブロードになったピークの形状を改善することができます。
- ◆ 自動前処理機能の1つである「共注入」を用いることで、ピーク形状の改善が可能です。

■はじめに

UHPLC（超高速液体クロマトグラフ）分析では、粒子径2 μm前後の充填剤を使用したUHPLC用カラムを用いることで、高速・高分離を実現しています。UHPLC用カラムは、汎用的な HPLC（液体クロマトグラフ）用カラムに比べてカラム内径が細く、カラム内部での試料成分の拡散が小さくなります。しかしながら、ピークの形状はカラムを含めたシステム全体で起こる拡散の影響を受けるため、HPLCシステムで分析を行うと、カラム以外のシステム拡散による影響でUHPLC用カラムの性能を十分に発揮できなくなります。そのため、UHPLC分析には低拡散システムが求められ、試料が通過する箇所については内径0.1 mm前後の配管が採用されています。

一方、配管内径が小さくなるほど、試料と移動相がカラムに到達するまでの配管内で混合されにくくなります。そのため、試料溶媒が移動相よりも溶出力の強い溶媒の場合、試料成分そのものの保持が試料溶媒の溶出力の影響を受け、試料バンドが広がってしまい、結果としてピークがブロードになることがあります。

以下①、②の場合に、この現象が見られることがあります。

- ① UHPLCシステムでHPLC条件の分析を行ったとき。
- ② 移動相と試料溶媒の溶出力の差が大きく、かつ注入量が多いとき。

本稿では上記①、②の場合でピークがブロードになったときに、Nexeraシリーズのオートサンプラー搭載の自動前処理機能「共注入」を用いてピーク形状を改善した事例をご紹介します。

■UHPLCシステムでHPLC分析を行う際の留意点

例えば、HPLC分析で行われる10 μL注入の分析をUHPLCシステムで行うと、カラムまでの配管容量が小さいために試料溶媒は移動相によってほぼ希釈されることなくカラムへ到達します。その結果、試料溶媒の溶出力が移動相よりも強い場合は、溶媒効果による試料バンドの広がりが顕著になり、ピーク形状の劣化（リーディング）を引き起こします。

標準構成の当社UHPLCシステムNexera XRを用いて、表1に示したHPLC条件の分析を行いました。得られたクロマトグラムを図1に示します。Nexera XRは、システム拡散を抑えるために試料が通る流路については内径0.1 mmの配管を使用しています。配管容量が小さいため、溶媒効果の影響でピークがリーディングしていることが分かります。

分析の高速化などを目的にHPLCシステムからUHPLCシステムへ更新した場合に、HPLCシステムで行っていた分析条件をそのままUHPLCシステムで行うと、このようなピークの形状劣化を生じる可能性があり、試料溶媒について留意する必要があります。

表1 分析条件

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| System | : Nexera XR |
| Column | : Shim-pack™ VP-ODS*1 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : Water/methanol = 70 : 30 |
| Flow rate | : 1.0 mL/min |
| Column temp. | : 40 °C |
| Injection vol. | : 10 μL |
| Detection | : 272 nm (SPD-40V) |
| Sample | : Caffeine (sample solvent : methanol) |
| Co-injected reagent*2 | : Water (15 μL each before and after the sample) |

*1 P/N: S228-34937-91、*2 共注入時の試料希釈溶媒。図3の分析で使用。

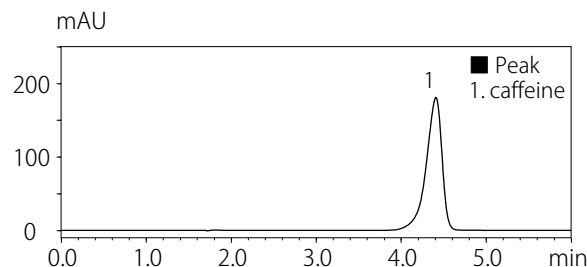


図1 標準構成のNexera XRで取得したクロマトグラム

■配管追加によるピーク形状の改善

図1で確認されたピーク形状の劣化は、配管容量が小さく、試料溶媒と移動相が十分に混合されないことが原因であるため、カラム入口に配管を追加することで、試料バンドの広がりを低減することが可能です。

標準構成のNexera XRのカラム入口に内径0.3 mm、長さ600 mmの配管を追加した構成（以降、構成A）を用いて得られたクロマトグラムを図2に示します。

配管を追加することでリーディングが抑制され、ピーク形状が改善していることが分かります。

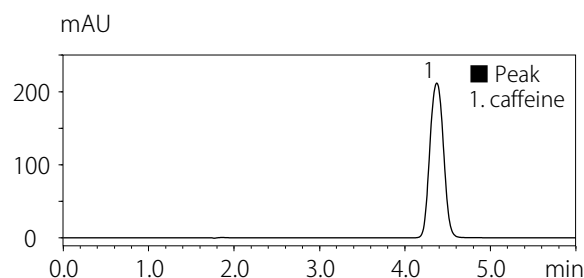


図2 構成AのNexera XRで取得したクロマトグラム

ただし、配管を追加して配管容量を大きくすると、システム拡散が大きくなるため、分析条件によっては逆にピークがブロード化し、理論段数が悪化します。

特に配管を追加したUHPLCシステムで、UHPLC分析を行う際は注意しなければならず、分析ごとに配管の付外し作業が必要となる場合もあります。

■自動前処理機能「共注入」を用いたピーク形状の改善

Nexeraシリーズのオートサンプラーには自動前処理機能が搭載されています。自動前処理機能の1つである「共注入」では、特定のバイアルから溶出力の小さい溶媒（共注入試薬）を吸引し、試料とともに分析カラムへ導入することが可能です。その際、混合動作や待ち時間を設定することも可能です。

共注入を行うことにより、前述の配管追加と同様の効果を得ることができます。配管の付け外しといった煩雑な作業を必要とせず、ソフトウェア上の設定だけでピーク形状を改善することができます。

共注入を使用して、表1の条件で分析を行いました。図3に共注入の設定内容を示します。共注入試薬（水）15 μ L、試料、共注入試薬（水）15 μ Lを順に吸引し、ニードル内で混合した後に注入を行いました。図4に得られたクロマトグラムを示します。共注入によりピーク形状が改善していることが分かります。

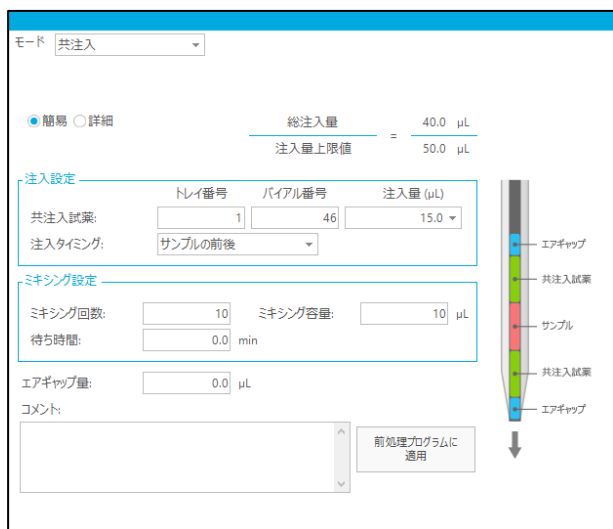


図3 自動前処理機能の共注入（簡易）設定画面

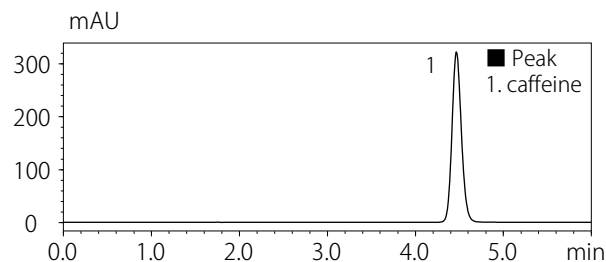


図4 水を共注入したときのクロマトグラム

図1、図2、図4のそれぞれのピークの理論段数を表2に示します。標準構成のNexera XRに比べて、構成AのNexera XRでは理論段数が約1.3倍、共注入を使用したときは理論段数が約2.8倍に向上しました。構成に変更を加えなくても共注入を使用することで、内径0.3 mm、長さ600 mmの配管を追加したときよりも、さらに高い理論段数が得られました。試料溶媒の希釈混合を活用することがピーク形状の改善につながるということがわかります。

表2 配管追加・共注入した際の理論段数

| | Theoretical plate number |
|----------------------------------------------|--------------------------|
| Standard configuration | 2737 |
| Configuration A | 3589 |
| Using co-injection in standard configuration | 7566 |

■UHPLC分析における試料溶媒の影響

UHPLC分析では、内径の細いUHPLC用カラムを使用するため、そのカラム段面積比に応じ、HPLC分析よりも注入量を減らして分析を行います。そのため、配管容量の小さいUHPLCシステムでも、試料溶媒が移動相で希釈され、カラムに到達します。

しかしながら、試料中に含まれる分析対象成分が希薄であるときなど、注入量を増やして分析を行う場合があります。

UHPLC分析で注入量を増加させる際に、試料溶媒が移動相よりも溶出力が強い場合は、カラムへ到達した試料が試料溶媒の影響を受けて、ピーク形状が悪化することがあり、注意が必要です。

このような場合にも、自動前処理機能の「共注入」を使用することで、ピーク形状を改善することができます。

■希釈溶媒を共注入したときの分析結果

Nexera XRを用いて、表3に示した条件の分析を行いました。得られたクロマトグラムを図5に示します。図5では水を共注入した場合としなかった場合のクロマトグラムを示しています。通常の分析では、注入量が増加すると試料溶媒の影響を受け、明らかにピーク形状が悪化していることが分かります。

図5の各クロマトグラムから求めた理論段数を表4に、1 μ L注入時の理論段数を100%として各注入量の理論段数をグラフで表したものを図6に示します。通常の分析では、注入量1 μ Lのときの理論段数を100%とすると、注入量2 μ Lでは63%まで低下し、注入量10 μ Lでは5%まで大きく低下していきます。一方、試料溶媒よりも溶出力の小さい水を共注入した場合、注入量1 μ Lのときの理論段数を100%とすると、注入量5 μ Lで70%の低下にとどまり、注入量10 μ Lでは29%と減少はしているものの、通常の分析に比べると低下は緩やかで、ピーク形状も十分に定量可能な状態を維持しています。

表3 分析条件

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------------|
| System | : Nexera XR |
| Column | : Shim-pack XR-ODS II*1 (75 mm×3.0 mm I.D., 2.2 μ m) |
| Mobile phase | : Water/methanol = 70 : 30 |
| Flow rate | : 1.0 mL/min |
| Column temp. | : 40 °C |
| Injection vol. | : 1、2、5、10 μ L |
| Detection | : 272 nm (SPD-40V) |
| Sample | : Caffeine (sample solvent : methanol) |
| Co-injected reagent | : Water (15 μ L each before and after the sample) |

*1 P/N: S228-41624-91

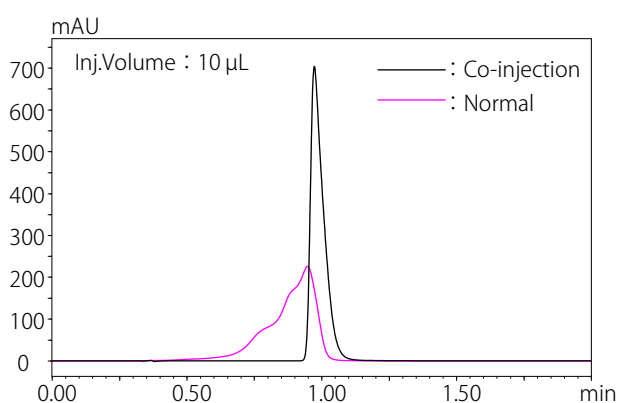
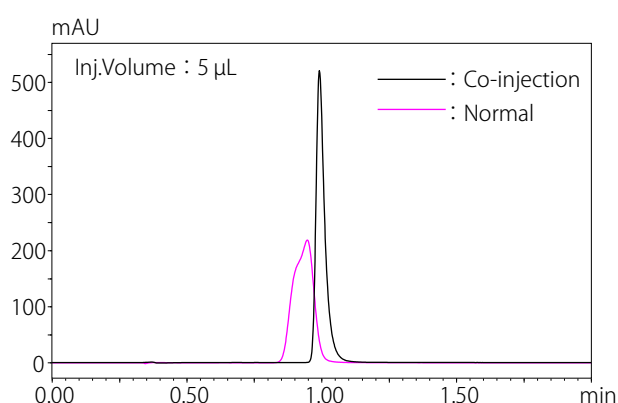
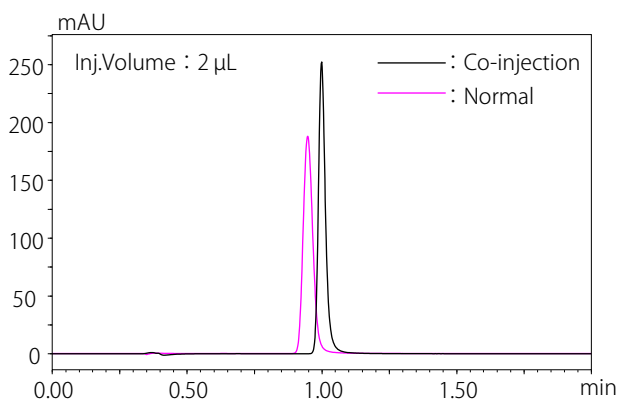
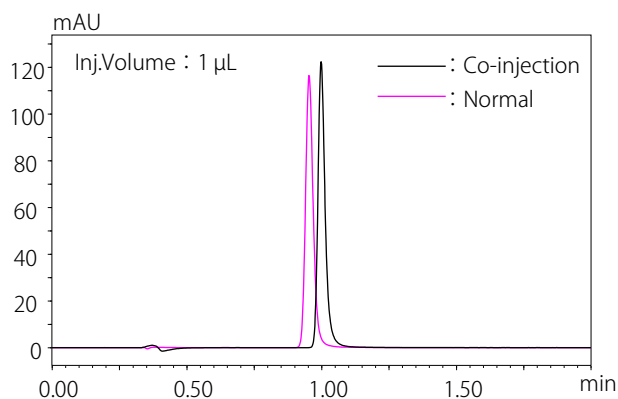


図5 水を共注入した場合としない場合の各注入量の比較クロマトグラム

表4 共注入の有無による各注入量の理論段数

| mode \ volume | Co-injection mode | Normal injection |
|---------------|-------------------|------------------|
| 1 µL | 6746 | 5226 |
| 2 µL | 6964 | 3277 |
| 5 µL | 4708 | 766 |
| 10 µL | 1928 | 265 |

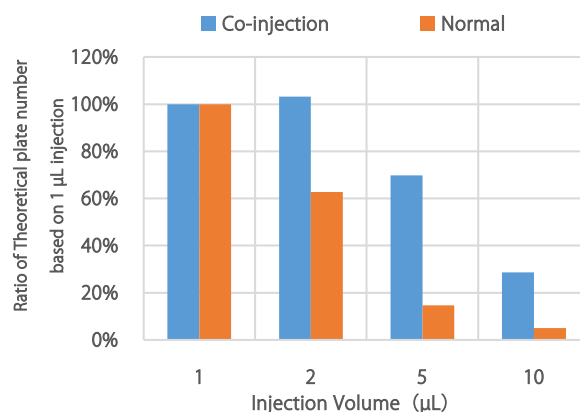


図6 1 µLを100%としたときの各注入量における理論段数の変化率

■まとめ

本稿では、Nexera XRが有する自動前処理機能「共注入」を使用することで、試料溶媒の影響でピークがブロードになった場合に、システムそのものに特別な変更を加えることなく、ソフトウェアの設定だけでピーク形状の改善を行うことが可能であることをご紹介しました。

HPLCシステムからUHPLCシステムへ更新した際に、UHPLCシステムで従来通りのHPLC分析を行いたい場合や、UHPLC分析において、注入量を増やして分析を行う場合に、試料溶媒の影響を防ぐことができるため、「共注入」を有するNexera XRは幅広い条件の分析に用いることが可能です。

なお、自動前処理機能「共注入」は、Nexera XRだけではなく、当社Nexeraシリーズのオートサンプラーすべてに搭載されております。

NexeraおよびShim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

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

01-00269-JP 初版発行：2022年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022