

# Application News

## No. L522

高速液体クロマトグラフィー

### 一体型 LC システム i-Series Plus の 自動前処理機能（共注入）を活用した ピーク形状の改善

超高速分析（以下 UHPLC）は、コンベンショナル分析（以下 HPLC）よりもさらに低拡散システムが求められ、配管内径も試料が通過する箇所については 0.1 mm 前後が採用されています。これは、UHPLC システムで使用するカラム内径の主流が 2.0~3.0 mm 程度と小さく、HPLC に比べカラム外拡散の影響をより大きく受けやすいためです。

しかしながら、配管内径が小さくなるほど試料と移動相が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高濃度の有機溶媒の場合、カラムへ到達した試料が試料溶媒の影響を受けてブロードになることがあります。この現象はカラム内径が小さいほど顕著に表れます。

ここでは、i-Series Plus の Nexera™-i MT に搭載された自動前処理機能（共注入）を用い、試料と希釈溶媒を自動的に混合させて分析することで、ピーク形状が改善された事例をご紹介します。

Y. Osaka

#### ■ 自動前処理機能

i-Series Plus はオートサンプラの自動前処理機能が搭載されており、「希釈」「添加」「共注入」の 3 つのモードがテンプレートで用意されています。ここでは「共注入（簡易）」を用いた例をご紹介します。共注入（簡易）は特定のバイアルから共注入用の溶媒を吸引し、試料と共に分析カラムへ導入させることが可能です。

その際、混合動作をさせたり、待ち時間を設定することも可能です。図 1 に設定した内容の動作を図 2 に示します。

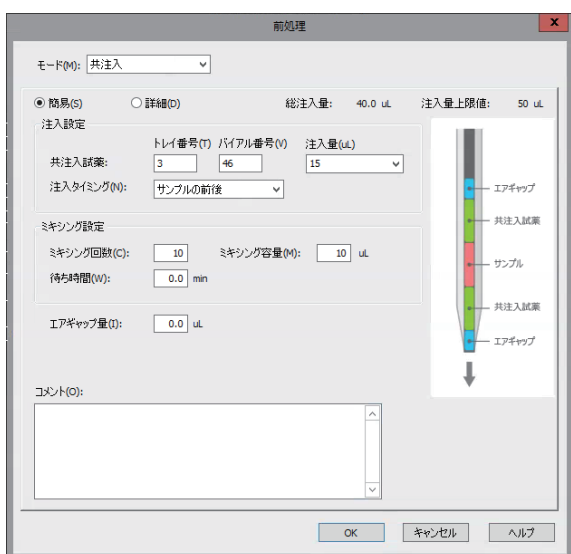


図 1 自動前処理機能の共注入（簡易）設定画面

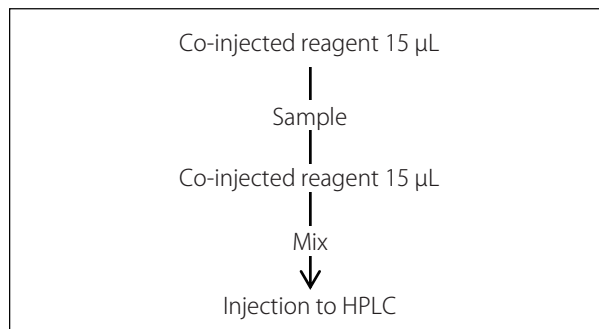


図 2 共注入（簡易）の流れ

#### ■ 希釈溶媒を共注入したときの分析結果

表 1 に分析条件を示し、図 3 には 1  $\mu$ L 注入時の理論段数を 100%としたときの各注入量の理論段数を示しています。共注入の動作は図 1 に示した内容です。図 4 に希釈溶媒を共注入した場合としない場合のクロマトグラムを示します。共注入を行わない通常の分析では、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くことがわかります。理論段数で確認すると 2  $\mu$ L では 1  $\mu$ L と比較して 84%に低下し、10  $\mu$ L 注入では 13%まで大きく低下していきます。一方、希釈溶媒である水を共注入した場合は 5  $\mu$ L 注入時で 89.9%の低下にとどまり、10  $\mu$ L でも 61.3%と減少はしているものの、通常分析に比べると低下は緩やかであり、かつピーク形状も充分に定量可能な状態を維持しています。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack™ XR-ODSII 75 mmL × 3.0 mmI.D., 2.2 $\mu$ m
Mobile phase	: Water/Methanol = 7/3 (v/v)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1, 2, 5, 10 $\mu$ L
Detection	: UV 272 nm
Sample	: Caffeine (Water/Methanol=4/6)
Co-injected reagent	: Water

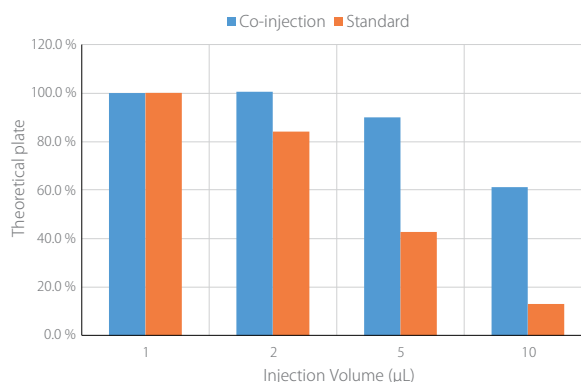


図 3 各注入量における理論段数 (1  $\mu$ L を 100%とする)

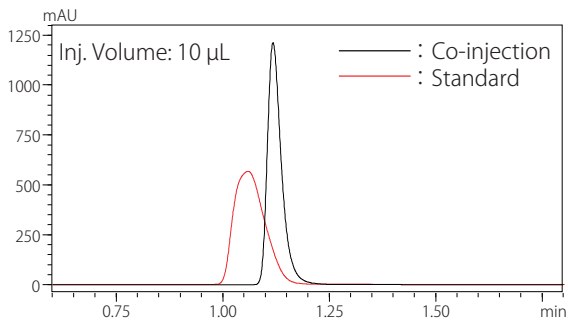
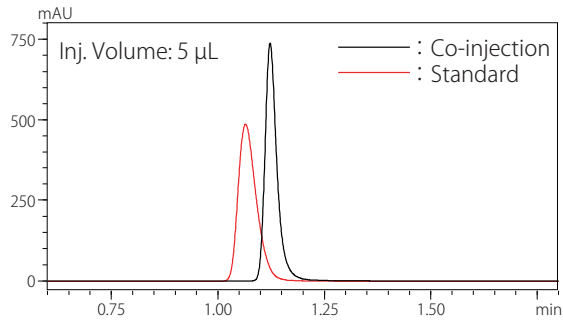
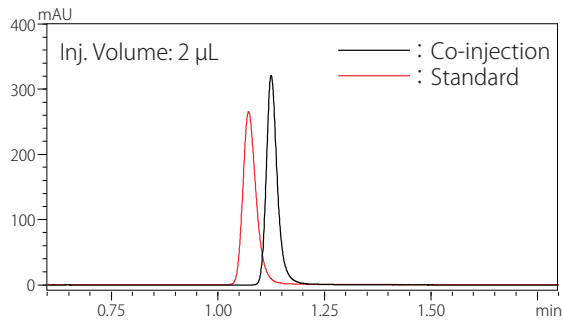
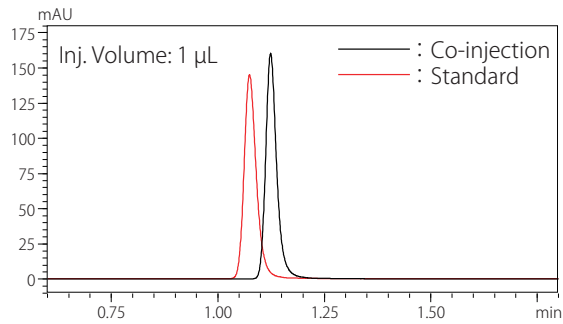


図4 希釈液を共注入した場合のピーク形状比較

## ■ イオンペア分析における共注入の効果

イオンペア分析においてもUHPLCシステムなど配管内径が小さい場合、試料とイオンペア試薬を含む移動相が十分に混ざらないためイオンペアを形成できず、結果としてピーク形状が崩れる、もしくはスプリットする場合があります。イオンペア試薬を含む溶媒を共注入することで、ピーク形状を改善させることができる場合があります。表2に分析条件を示し、図5に共注入の設定を示します。図6には共注入の有無によるクロマトグラムの比較を示します。

表2 分析条件

Column	: Shim-pack™ XR-ODSII 75 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 µm
Mobile phase	: Dissolve 3.4 g of monobasic potassium phosphate and 1.7 g of sodium lauryl sulfate in 1000 mL of a mixture of water and acetonitrile (1:1)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 15 µL
Detection	: UV 345 nm
Sample	: Berberine chloride (water)
Co-injected reagent	: Mobile phase

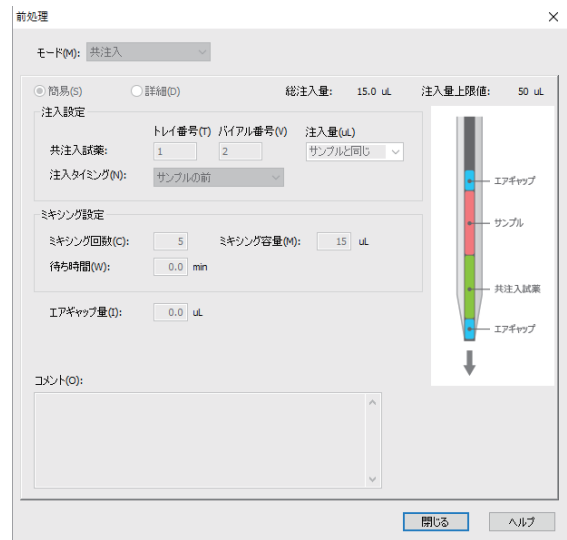


図5 イオンペア試薬を含む移動相を共注入する際の設定

図6のクロマトグラムに示すように、通常の分析ではピーク1およびピーク2の両方がスプリットしています。これは、イオンペア試薬を含む移動相と試料成分がカラムに到達するまでに十分に混合されなかったため、成分の一部のみがイオンペアを形成しているためと思われます。

一方、イオンペア試薬を含む移動相を共注入し、ニードル内で試料と移動相を混合させた場合では正常なピーク形状が得られています。

このように、自動前処理機能による共注入は、希釈や反応のための溶媒を画面一つで簡単に設定し、分析することが可能です。

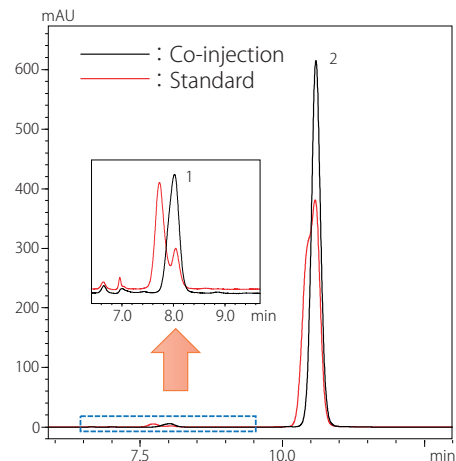


図6 イオンペア試薬を含む移動相を共注入した場合のピーク形状比較

Nexera と Shim-pack は、株式会社島津製作所の商標です。