

## Technical Review

## 液体クロマトグラフにおける試料導入装置

三上 博久、早川 禎宏

## Sample Introduction System in Liquid Chromatograph

Hirohisa Mikami, Yoshihiro Hayakawa

*Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation**1, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan***Abstract**

Sample introduction system is one of the most important parts in HPLC instrumentation which can influence the accuracy and precision of HPLC analysis. In this paper, we review the basic principle and feature of each type of manual injectors and autosamplers in HPLC sample introduction system and also describe basic approaches to reducing autosampler carryover which has been a big issue in HPLC analysis.

*Key words:* HPLC; sample introduction; sample injection; autosampler; manual injector; carryover

**1. 緒言**

HPLCにおける試料導入装置とは、日本工業規格「高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0124:2002」によると「測定用試料溶液を高速液体クロマトグラフのカラムに導入するための装置」と定義されている。試料導入装置には、マイクロシリンジなどを用いて手動で導入する手動試料導入装置－マニュアルインジェクターと多数の検体を順次自動で導入する自動試料導入装置－オートサンプラーがある。いずれにおいても、測定用試料溶液を一定量、再現性よく系内に導入するため、導入した試料の残存が少なく、吸着などが生じない材質・構造が求められる。

HPLC登場当初はマニュアルインジェクターが主に用いられていたが、HPLCの急速な普及に伴い自動化の要求が高まり、現在ではオートサンプラーが主流となっている。本稿では、マニュアルインジェクターおよびオートサンプラーの基

本原理と各方式の特徴について解説する。また、オートサンプラーにおける重要な課題であるキャリーオーバー抑制に関する基本的なアプローチについて述べる。

**2. マニュアルインジェクター**

初期のマニュアルインジェクターは、ガスクロマトグラフで用いられるような樹脂製セプタムを介してマイクロシリンジにより、試料溶液を移動相の流れにオンフロー導入する方式であった。しかし、ガスクロマトグラフと異なり高圧の液体が流れるHPLCでは、セプタムからの液漏れなどが問題となった。このため、高圧バルブを介して注入ポートおよび試料ループを移動相流路から切り離し、常圧で試料溶液を試料ループに導入後、バルブを切り換えてカラムに導入する方式が開発され、現在に至っている。

今日、マニュアルインジェクターをルーチン分析の現場で

株式会社島津製作所 分析計測事業部 応用技術部

〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

Tel: 075-823-1083

Fax: 075-841-9326

E-mail: h-mikami@shimadzu.co.jp

使用することは少なくなったが、HPLC 分析を簡便に行いたい場合には欠かせない装置である。また、オートサンプラーで何か問題が生じた時（例えば、ゴーストピークの出現）、原因究明のための確認用として重宝することもある。一方、マイクロあるいはナノ LC システムにおける微量注入などでは、それらに適したマニュアルインジェクターが開発されている。

### (1) マニュアルインジェクターの基本原則

Figure 1 に、コンベンショナル分析で一般に用いられるマニュアルインジェクターの基本原則図を示す。

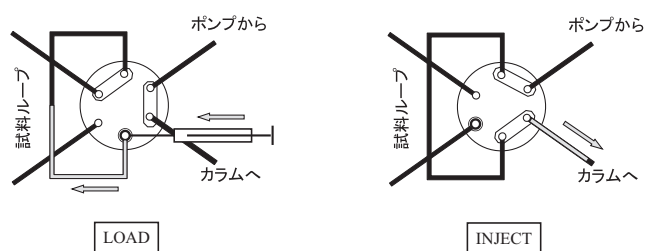


Figure 1. マニュアルインジェクター／マイクロシリンジ計量方式

マニュアルインジェクターを用いた試料導入は、基本的には以下の手順で行う。

#### ① 試料溶液の試料ループへの導入 (Figure 1 **LOAD**)

試料ループが移動相流路から切り離された状態（常圧）で、試料溶液をシリンジにより注入ポートから試料ループに導入する。この時、シリンジおよび注入ポートは試料溶媒などで十分洗浄しておく。

#### ② 試料溶液のカラムへの導入 (Figure 1 **INJECT**)

バルブを切り換えて、試料ループを移動相流路に接続して、試料溶液をカラムへ導入する。

### (2) マニュアルインジェクターの方式

一般分析に用いるマニュアルインジェクターは、試料溶液の計量方式に基づき、大きく 2 つに分類することができる。

#### ① マイクロシリンジで計量する方式 (Figure 1)

マイクロシリンジを用いて任意の量を計量後、試料ループに導入する方法である。試料溶液毎に導入量を変えることができ、一般にはこの方法が広く用いられている。試料導入量は、試料ループ容量の概ね 1/2 以下にするのが望ましい。

#### ② 試料ループで計量する方式 (Figure 2)

試料導入量に応じた一定容量の試料ループを取り付け、容量の大きなシリンジを用いて過剰量の試料溶液を導入し、試料ループで計量する方法である。①のマイクロシリンジによる計量より、ばらつきを抑制できる。繰り返し同じ量を導入する時に適しているが、導入量を変更するには、試料ループを付け換える必要がある。また、試料ループに導入する試料溶液量は、試料ループ容量の 3 倍以上必要であり、概ね 5 倍以上が望ましい。従って、試料溶液が少量しかない場合には

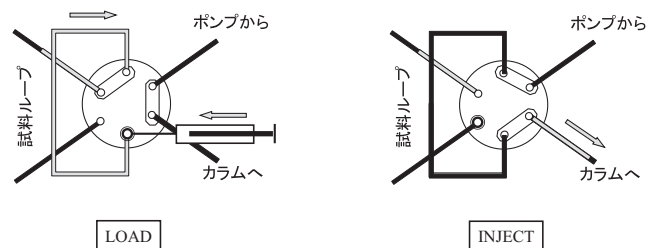


Figure 2. マニュアルインジェクター／試料ループ計量方式

適さない。

マニュアルインジェクターの使用にあたっては、いずれの方式でもシリンジや注入ポートの洗浄方法や頻度、シリンジによる試料ループへの導入速度（速すぎたはいけない）、バルブを切り換える速度（遅すぎたはいけない）など個人による差も出やすく、ある程度の熟練度が必要である。

### 3. オートサンプラー

オートサンプラーは、人に代わって昼夜を問わず試料溶液を繰り返し自動注入してくれる装置であり、オートインジェクターとも呼ばれる。オートサンプラーの基本性能としては、導入量の再現性、直線性、正確さが良好であること、試料の残存量や最少必要量が少ないことなどが求められる。近年、これら基本性能のさらなる向上に加えて、分析の微量化や検出器の高感度化に対応したキャリアオーバー抑制性能、超高速 LC (UHPLC) による分析のハイスループット化に対応した高速注入性能、さらには多検体を処理するために試料成分の分解や試料溶媒の揮散を抑制する冷却機能の付加、試料の自動希釈や自動誘導体化に対応した前処理機能の付加なども求められるようになってきている。このため、オートサンプラーは、現状も進化過程にあると言える。

#### (1) オートサンプラーの基本原則

オートサンプラーは、基本的にはマニュアルインジェクターの動作を自動化した装置であるが、分析機器メーカーにより、あるいは同じ分析機器メーカーでも機種により、方式、細部の構造や機構が異なる場合がある。以下に、オートサンプラーの基本原則を示すが詳細は省略してある。自分が使用するオートサンプラーの取扱説明書などを読み、構造や機構を十分に理解しておくことが大切である。

#### (2) オートサンプラーの方式

オートサンプラーの方式を試料の計量方法で分類すると、計量ポンプ（もしくは計量シリンジ、以下同じ）の吸引量で計量する方式、一定容量の試料ループで計量する方式などがある。また、カラムへの導入方法で分類すると、試料ループのみがカラム流路につながる方式、試料ループに加えてニードルも直接カラム流路につながる方式などがある。

##### ① 試料計量方法による分類

###### a) 計量ポンプの吸引量で計量する方式

導入量より容量が大きい試料ループ内に、計量ポンプで計

量した試料溶液を満たす方式で、マニュアルインジェクターの方式①に対応する。導入量は装置の仕様範囲内で、試料溶液毎に任意に選ぶことができる。繰り返し注入再現性は、基本的に計量ポンプの精度に依存する。

b) 試料ループで計量する方式

バルブに取り付けられた一定容量の試料ループに計量ポンプを用いて試料溶液を満たす方式でマニュアルインジェクターの方式②に対応する。導入量は、試料ループ容量に固定されるため、導入量を変更するには試料ループを付け替える必要がある。この方式は、構造がシンプルで繰り返し注入再現性に優れ、またメンテナンスも容易であるため、初期のオートサンプラーでよく用いられていた。

②カラムへの導入方法による分類

a) 試料ループのみがカラム流路につながる方式

計量ポンプを用いてニードルから吸引された試料溶液が試料ループ内に保持され、バルブ切り換えにより試料ループのみが移動相流路に接続されて試料溶液がカラムに導入される方式である。試料計量方法は、①a) および b) のいずれの方式にも対応する。ニードルや注入ポートは移動相流路から切り離されているため、これらには圧力がかからず、構造をシンプルにできる。Figure 3 に、その一例を示す。

通常、試料吸引量は実際のカラム導入量より多く必要とな

るため、試料溶液が少量の場合には適さない。一方、試料溶液がカラムに導入される際、移動相が流れるのは小容量の試料ループのみであり、グラジエント溶離における設定からの遅れ時間を少なくできる。この点、特にUHPLCでは、次に述べる方式より有利な場合もある。

b) 試料ループおよびニードルがカラム流路につながる方式

計量シリンジやポンプを用いてニードルから吸引された試料溶液がニードルと試料ループ内に保持され、次にバルブ切り換えにより、これらが移動相流路につながり、試料溶液がカラムに導入される方式。試料計量方法は、①a) の方式に対応する。Figure 4 に、その一例を示す。本方式では、注入ポートの高耐圧性が求められる。

試料導入時、ニードルおよび試料ループは移動相流路の一部になっており、吸引された試料溶液がそのまま全量カラムに導入される。このため、分析中試料ループはもとよりニードル内部も移動相で洗われることになる。試料吸引量はカラムへの導入量だけでよいいため、試料溶液を無駄なく使える。試料溶液が微量である場合、a) の方式より有利である。現在、一般分析に用いられるオートサンプラーの多くはこの方式を採用している。

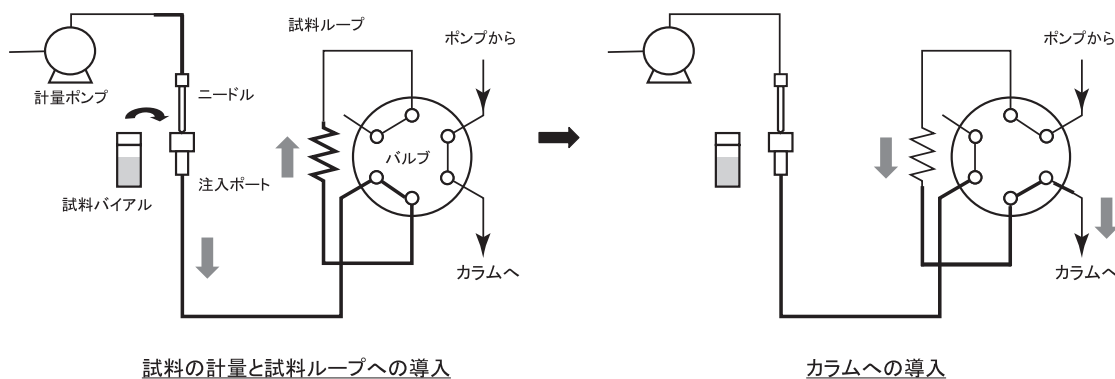


Figure 3. オートサンプラー／試料ループのみがカラム流路につながる方式

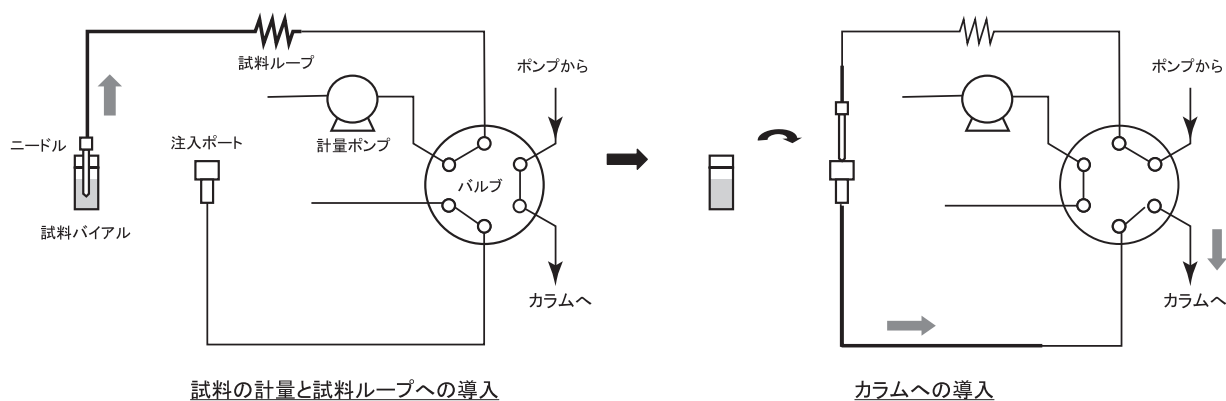


Figure 4. オートサンプラー／試料ループおよびニードルがカラム流路につながる方式

#### 4. オートサンプラーにおけるキャリーオーバーの抑制

HPLC 技術の進歩につれて、オートサンプラーに対する要求は高度化、そして多様化してきている。特に、近年 LC/MS の普及に伴い、定量下限の設定が検出器による SN 比のみではなく、オートサンプラーのキャリーオーバーに依存する場合も多くなってきており、キャリーオーバー抑制が HPLC 分析においてますます重要な課題となっている。

ここ数年来、オートサンプラーのキャリーオーバー抑制技術が大きく進歩しており、高感度 LC/MS に対応するためキャリーオーバー抑制に重点をおいた装置が上市されている。これらの装置では、キャリーオーバー抑制のため、流路に試料成分（分析種および夾雑成分）を吸着させない、吸着した試料成分を洗浄により徹底除去するという考えに基づき、いろいろな工夫がなされている。以下に、一般に広く用いられている試料ループおよびニードルがカラム流路につながる方式（Figure 4）におけるキャリーオーバー抑制について、基本的なアプローチについて述べる。

##### (1) キャリーオーバーの原因

キャリーオーバーが起こる原因のひとつは、試料成分のオートサンプラー流路への吸着現象である。これら吸着現象は、種々の相互作用に基づくが、試料成分の性質を基にすると以下に大別できる。（ただし、これら相互作用が複合的に働くことも考えられる。）

##### ①イオン性成分および塩基性成分

流路の金属材質とのイオン性相互作用、配位性相互作用などによる吸着

##### ②脂溶性成分

流路の樹脂材質との疎水相互作用などによる吸着

また、このような吸着現象の他に、試料成分の移動相への溶解性やオートサンプラー流路内にある液の滞留部分などもキャリーオーバーの原因として考えられる。

##### (2) キャリーオーバーの発生箇所

キャリーオーバーの発生箇所としては、試料成分が接するあらゆる流路部が考えられるが、一般的にはニードルおよび注入ポートの可能性が高い。Figure 5 に、可能性のある主なキャリーオーバー発生箇所を示す。

##### ①ニードル内面および外面への吸着

ニードルの金属表面に対し、イオン性相互作用、配位性相互作用などによる試料成分の吸着が起こる。なお、ニードル内面への吸着の起こりやすさは、ニードル内面の滑らかさにも依存する。

##### ②試料成分の析出

試料溶媒と移動相で溶媒強度に差がある時（例えば、試料溶媒がメタノールで移動相の水比率が大きい場合など）、試料成分が移動相に接した際に析出してニードル内部などに残る。特に、グラジエント溶離法においては、初期移動相の溶媒強度が試料溶媒より小さい場合が多いため、イソクラティック溶離法と比較して発生しやすいと言える。

##### ③注入ポートでの試料残渣

注入ポートとニードル先端との間にある僅かな液の滞留部分に試料成分が残る。これはニードル外面に吸着した試料成分も寄与する。

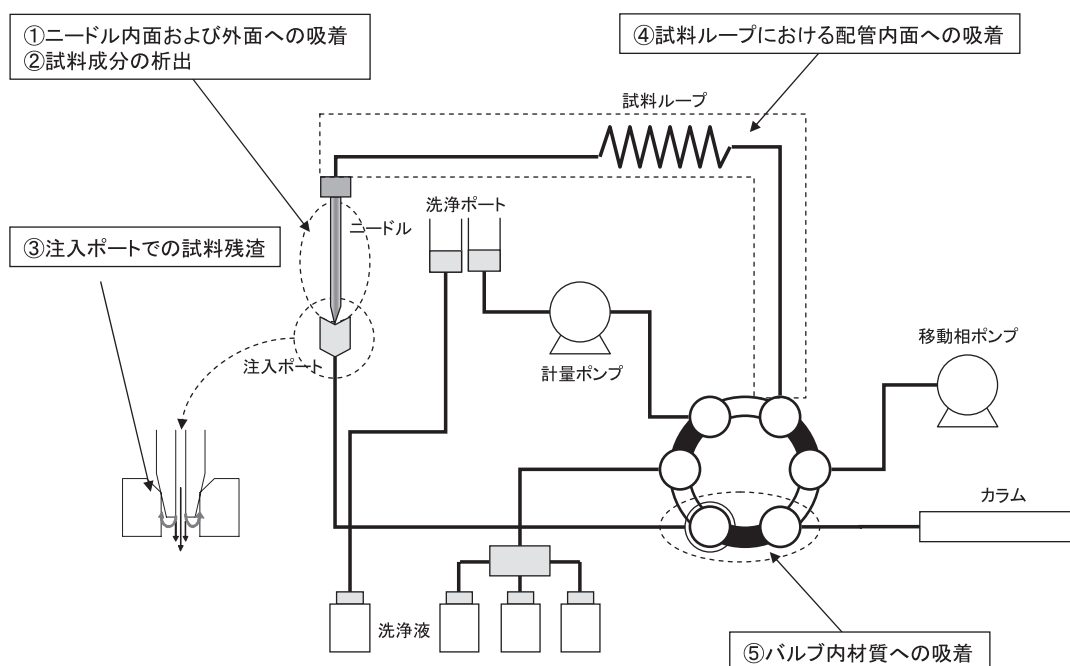


Figure 5. オートサンプラーにおける主なキャリーオーバー原因箇所

#### ④試料ループにおける配管内面への吸着

試料ループの金属表面に対し、イオン性相互作用、配位性相互作用などによる試料成分の吸着が起こる。また、同様の吸着は、容量としては小さいが注入ポートからバルブ、バルブからカラム入口の配管でも起こり得る。

#### ⑤バルブ内材質への吸着

オートサンプラーのバルブに用いられている樹脂製シール部で、疎水相互作用などにより試料成分の吸着が起こる。

### (3) キャリーオーバーの抑制策

キャリーオーバーの抑制策は、発生箇所毎にその原因を基にして考える。市販オートサンプラーでは、これらを基に構造や機構、接液部の材質、使用できる洗浄液の数や洗浄方法などにさまざまな工夫が行われている。

#### ①ニードル内面および外面への吸着

ニードルへの吸着抑制のためには、ニードル表面を吸着性の少ない樹脂や金属でコーティングすることが考えられる。また、吸着してしまった試料成分は洗浄液を用いてニードル表面を洗浄液で洗浄することにより除去する。

#### ②試料成分の析出

ニードルには分析中移動相が流れるため、移動相では洗浄できることになるが、これだけでは不十分な場合には、①と同様に洗浄液を用いて洗浄を行う。

#### ③注入ポートでの試料残渣

注入ポートを洗浄液で洗浄する。また、注入ポートやニードル先端を試料残渣が起こりにくい形状にする。

#### ④試料ループにおける配管内面への吸着

ニードルと同様、試料ループは通常移動相により洗浄されるが、不十分な場合には、洗浄液を用いて洗浄する。

#### ⑤バルブ内材質への吸着

バルブのシール材質を吸着性の低い樹脂に変更する。ただし、樹脂の選択にあたっては、その特性（耐磨耗性、耐酸性、耐塩基性など）も十分考慮する必要がある。また、吸着性の高い試料成分は、洗浄液による洗浄を行う場合がある。

## 5. まとめ

以上、HPLCにおける試料導入装置について、マニュアルインジェクターおよびオートサンプラーの基本原理と各方式の特徴について解説し、オートサンプラーにおけるキャリーオーバー抑制に関する基本的なアプローチについて述べた。試料導入装置は、HPLCの分析精度に大きく関わってくるものであり、基礎的な知識をしっかりと持ち、自分が使用する装置の構造や機構なども十分理解しておくことが大切である。本稿が試料導入装置への理解を深める上で、少しでもお役に立てば幸いである。