



## 大量注入

### Agilent Multimode Inlet (MMI) 用チュートリアル

ホットスプリットレス	2
コールドスプリットレス	3
溶媒ベント	3
チュートリアル	4

ますます多くの研究者が現在の解析を改善するために大量注入 (LVI) 方法を検討しています。キャピラリガスクロマトグラフィの従来の注入方法では、ほとんどの注入口とカラムへは一度に 1 ~ 2 マイクロリットルしか注入できません。注入量を増やそうとすると、検体ピークを広げ、歪ませ溶媒ピークが大きくなり、長く続き、検出器は飽和または損傷されます。

注入量の増加の必要性がある場合、通常トレース解析の向上を必要としています。システムに使用するサンプルを増やすと、検出器に達する検体の質量は比例的に増加し、ピーク面積とピークの高さが大きくなります。ベースラインノイズが一定に保たれる場合、ピークの高さが高くなると、シグナル/ノイズ比が向上し、システム検出限度が低下します。この他 LVI には、最初に処理されるサンプル量を減らすことができるという利点があります。たとえば、水のサンプルに 1000 ng/L の汚染物質が含まれているとします。現在のメソッドで汚染物質を抽出し、その汚染物質を 1 ミリリットルの溶媒で再構成する場合、抽出中の検体の濃度は 1000 ng/mL になります。この抽出を 1 マイクロリットル注入すると、カラムに 1 ng 入れることとなります。LVI では、10 マイクロリットルの注入量が可能であるとします。研究者は 100 mL のサンプルで開始し、より少ない溶媒でそのサンプルを抽出し、1 ミリリットルでそれを再構成するとします。以前と同様に、10 マイクロリットルの注入で 1 ng をカラムに入れますが、1 桁分少ないサンプル開始できます (また、ほとんどの場合 1 桁分少ない抽出溶媒)。LVI を使用するもう 1 つの利点は、実際に検出器に達する溶媒が少なくなることで。通常、実際にカラムに入り、検出器に達するのは、注入溶媒の 10 ~ 30% のみです。

LVI は、数マイクロリットルから 1 ミリリットル以上の範囲の注入量に適用できます。ほとんどの LVI の方法では、サンプル溶媒が選択的に蒸発され検体が分離カラムに移送される前に注入口システムから排出されます。この方法には、LVI は窒素の蒸発や溶媒の回転蒸発同様に、換気ドラフトはなく、GC の注入口で実行できるという利点があります。窒素の蒸発中に失われる検体



は注入口に保持され、LVI で正常に解析することができます。さらに、LVI プロセスは自動化できるので、再現が可能です。他の蒸発方法同様、LVI の方法は溶媒タイプ、注入口の温度、蒸発ガスのベント流、検体沸点の機能の 1 つです。また、蒸発中の注入口圧と注入口ライナーは溶媒排出と検体回収の速度に影響を与えます。チュートリアルでは、これらのパラメータの詳細について説明します。

## ホットスプリットレス

LVI を検討するほとんどの研究者の現在のメソッドでは、ホットスプリットレス注入を使用しています。この実証済みで確実なサンプル導入メソッドは、約 40 年にわたって有益に利用されてきました。しかし、サンプルの完全性に若干の問題があり、メソッド開発者にとっての課題でもありました。第一に、生成される蒸気雲がカラムに移送されるためには、注入口が溶媒と検体をフラッシュ蒸発するのに十分な温度である必要があります。注入口ライナー量はこの蒸気雲を収めるのに十分な大きさである必要があります。ライナー量が小さすぎる場合、気化したサンプルはライナーから排出され、反応表面に達し、検体を損失することになります。また、気化サンプルによって生成される圧力波は、入ってくるキャリアガス押し戻し、敏感な圧力および流量制御システムに入ることがあります。Agilent の圧力/流量計算機によると、240 °C、14.5 psig での 1 マイクロリットルアセトンの注入口への注入は、288  $\mu\text{L}$  のガスに膨張します。標準スプリット/スプリットレス注入口用のほとんどの注入口ライナーは、1 ミリリットルの公称容量になっています。同じ条件でわずか 3.5  $\mu\text{L}$  に注入量を増加させると、1 ミリリットルの蒸気雲が生成され、注入口ライナーから容易あふれ出ます。

また、ホットスプリットレス注入は熱的に不安定な検体にとって問題のある環境も作ります。有機塩素系農薬 DDT やエンドリンなどの化合物は、配列し直して、分解化合物を形成することができます。このプロセスは、通常解析に使用される注入口温度で加速されます。ライナーが効率よく学的に不活性化されると、検体の分解を最小化できます。ただし、注入口温度が高いと、不活性化されたライナーの寿命を縮めることがあります。

ホットスプリットレス注入によるもう 1 つの課題は、ニードルの分別の可能性または検体の識別力です。サンプルがシリンジから注入口に移送されると、ニードルがセプタムに触れるため、ニードルの温度が上昇します。ニードルの温度が上昇すると、溶媒が「沸騰」し、ニードル内に高沸検体が付着します。この分別の問題を避けるため、一部の研究者は溶媒プラグをシリンジに取り付けてから、必要なサンプル量を吸引します。これは、溶媒プラグで注入口の付着物を洗浄するものです。この問題への効率的な対応方法は、高速注入を行うことです。高速注入では、ニードルがセプタムに触れる時間と、サンプルがニードルに触れる時

間を最小限にします。この問題がありながらも、ホットスプリットレスでは良好な解析が行えます。コールドスプリットレスなどの別の方法を使用すると、この問題に対応でき、解析結果が向上します。

## コールドスプリットレス

Agilent Multimode Inlet (MMI) は、標準スプリット/スプリットレス注入口と同じライナーと消耗品を使用するので、既存のホットスプリットメソッドおよびホットスプリットレスメソッドとの互換性があります。ただし、温度がプログラムできるので、コールドスプリット解析とコールドスプリットレス解析も実行できます。コールドスプリットレスモードでは、サンプルが注入される際に蒸発しないよう、MMI はサンプル溶媒の通常の沸点より低い温度に冷却されます。注入はシリンジから注入口への単純な液体移送です。シリンジが注入口から離れると、注入口が加熱され、サンプルを蒸発し、カラムに移送します。まず溶媒が蒸発してカラムに移動するので、通常のホットスプリットレス注入同様に検体へのフォーカスが可能です。その後検体は蒸発し、カラムに移動します。この主な利点は、検体が、一定した高温ではなく、できる限り低い注入口温度で蒸発し、熱化を最小限に抑えながら、幅広い検体を蒸発できるようにすることです。コールドスプリットレス操作は、ホットスプリットレスのように過剰熱応力をライナーに与えることがないため、耐用期間を長くします。コールドスプリットレスは、注入できるサンプル量を増加できる場合もあります。低速注入口温度プログラムが使用されている場合、溶媒はゆっくり蒸発し、ライナー量からあふれ出ることはありません。検体がカラム再フォーカスできれば、低速注入口温度プログラムはクロマトグラフィに有害な影響を与えることはありません。

## 溶媒ベント

溶媒ベントモードは、MMI が LVI を可能にする方法です。溶媒ベントモードでは、注入口はサンプル適用中に低い初期温度に維持されます。空気圧には、注入口は低注入口圧のスプリットモードになります。注入口ライナーからベントへ抜けるガスの流れによって、蒸発した溶媒が排出されず、注入される液体がライナー壁に付着し、溶媒が同等の速度で蒸発されるように、サンプルが注入されます。サンプル全体が注入されると、入口は検体を移送するためにスプリットレスモードに切り替わります。その後、注入口が加熱され、高濃度サンプルと残っている溶媒が蒸発しカラムに移送されます。サンプルが確実に移送されるまでの時間経過後、注入口はパージモードに切り替わり、注入口ライナーに残っている物を廃液に排出します。サンプル注入と溶媒ベント期間中、GC オープンは適切な

温度に保たれるので、溶媒はカラム上の検体に再フォーカスできず。この再フォーカスが完了すると、オーブンは分離を行うようにプログラムされています。

## チュートリアル

現在のホットスプリットレスメソッドを使用してこのチュートリアルを行うことも、機器に付属のチェックアウトサンプルを使用することもできます。チュートリアルでは水素炎イオン化検出器 (FID) MDL チェックアウトサンプル (製品番号 5188-5372) を使用して、メソッド開発プロセスをデモンストレーションします。このサンプルは、イソオクタン中に 4 つの炭化水素 (C13、C14、C15、C16) を含みます。より溶媒に接近して、また溶媒自に溶出する検体の LVI の動作を明確に示すため、水素炎イオン化検出器が使用されます。

### ステップ 1 - ホットスプリットレス

システムを回収計算のために較正するため、現在のメソッドで解析を実行する必要があります。最初のステップでは、既存のホットスプリットレスメソッドで単純に解析するか、以下の FID MDL アルカン混合体の条件を使用して解析します。

#### カラムおよびサンプル

タイプ	HP-5、30 m x 0.32 mm x 0.25 µm (19091J-413)
サンプル	FID MDL チェックアウト (5188-5372)
カラム流量	4 mL/min
カラムモード	コンスタントフロー

#### MMI

モード	スプリットレス
注入口温度	250 °C
初期時間	5 分
速度 1	0 °C /min
ページ時間	2 分
ページ流量	60 mL/min
セプタムページ	3 mL/min

## FID

温度	300 °C
H2 流量	30 mL/min
空気流量	400 mL/min
メイクアップ流量 (N2)	25 mL/min
Lit オフセット	通常 2 pA

## オープン

初期温度	50 °C
初期時間	2 分
速度 1	20 °C /min
最終温度	200 °C
最終時間	0 分

## オープン

サンプル洗浄	2
サンプルポンプ	6
注入量	1 µL
シリンジサイズ	10 µL
注入前溶媒 A 洗浄	3
注入前溶媒 B 洗浄	3
注入後溶媒 A 洗浄	3
注入後溶媒 B 洗浄	3
粘度遅延	0
プランジャ速度	高速
注入前ドゥエル	0
注入後ドゥエル	0

## データシステム

取込速度	20 Hz
------	-------

サンプルを 2、3 回解析してピーク面積の平均を求めることができます。図 1 にこの条件での FID MDL サンプルの典型的な結果を示します。

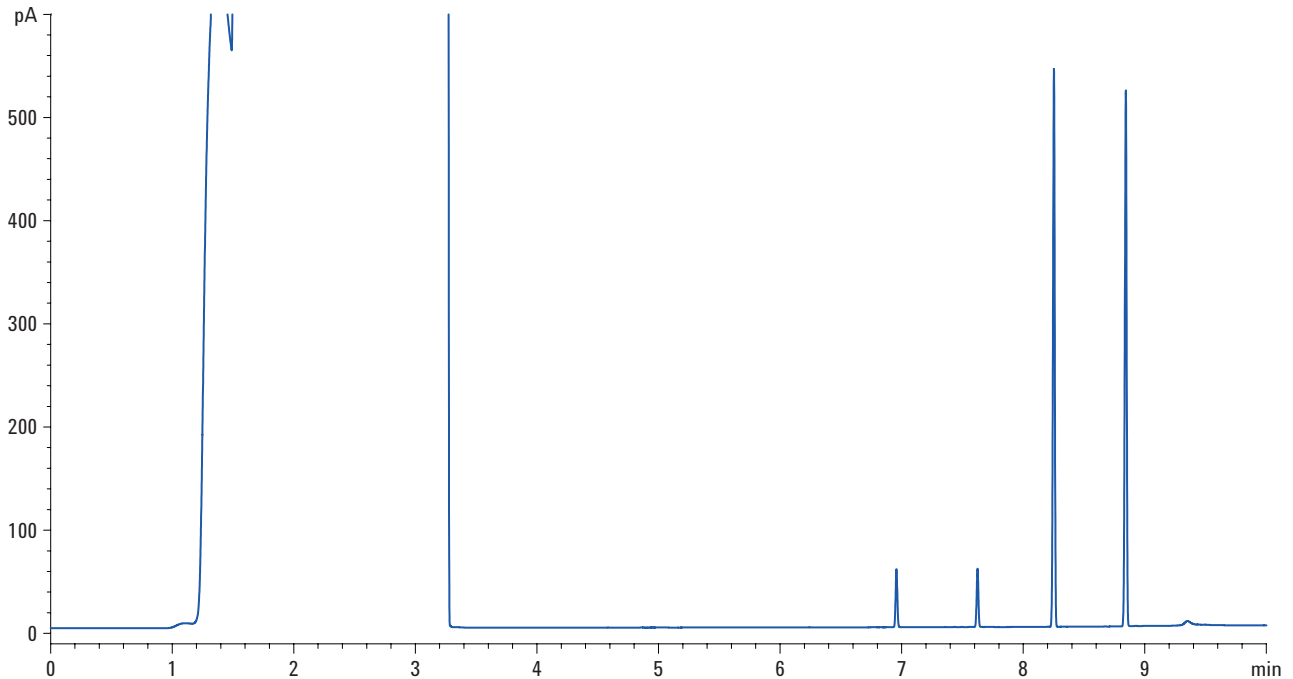


図 1 典型的なホットスプリットレス FID MDL サンプル結果

## ステップ 2 - コールドスプリットレス

コールドスプリットレス解析を行うには、注入口温度を変える必要があります。注入口の初期温度を、サンプル溶媒の通常沸点より 5 ~ 10 °C 低温度に設定します。この温度に 0.1 分間維持した後、注入口を 720 °C/min でホットスプリットレスメソッドでの注入口温度にプログラムします。以下の FID MDL メソッドの条件を参照してください (MMI 条件のみを示しています。その他の条件はすべてホットスプリットレスと同じです)。

## MMI

モード	スプリットレス
注入口温度	90 °C
初期時間	0.1 分
速度 1	720 °C
最終温度	250 °C
最終時間	5 分
パージ時間	2 分
パージ流量	60 mL/min
セプタムパージ	3 mL/min

ホットスプリットレスモードとコールドスプリットレスモードのピーク面積、ピーク幅、ピーク形状を比較します。図 2 に FID MDL サンプルの典型的なコールドスプリットレス結果を示します。このサンプルでは、ホットスプリットレスとコールドスプリットレスでの果はほぼ同一です。

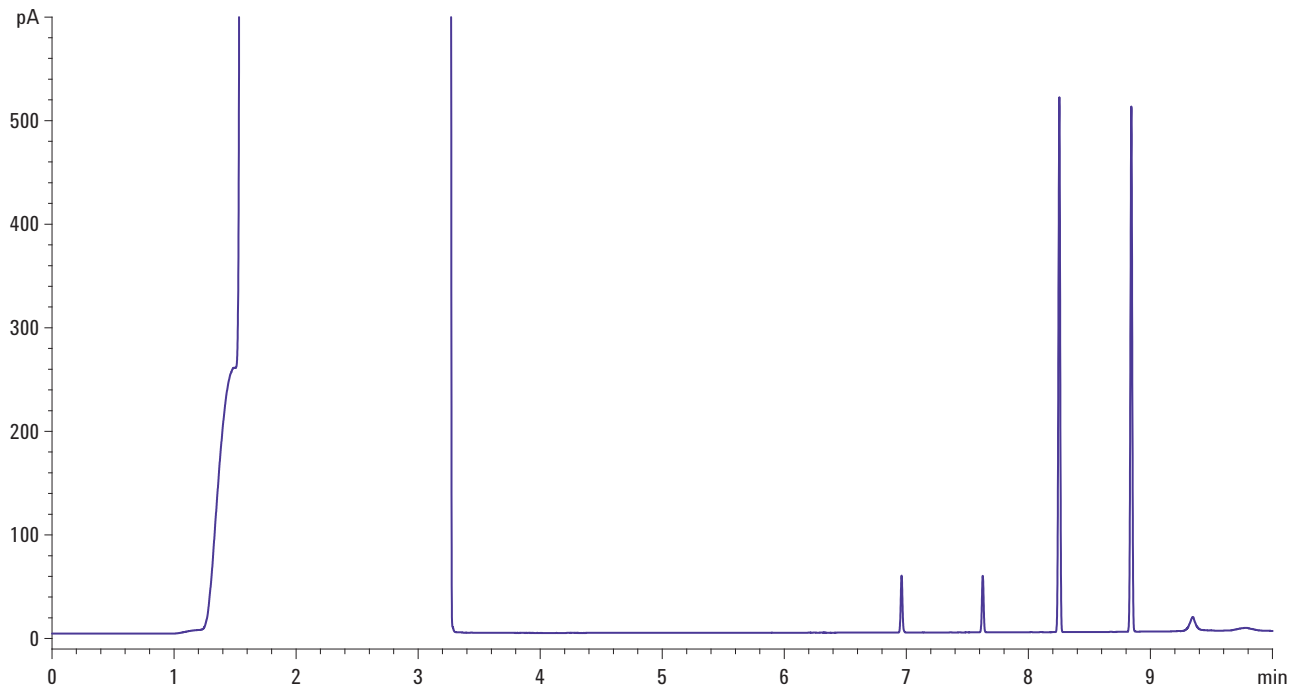


図 2 典型的なコールドスプリットレス FID MDL サンプル結果

### ステップ 3 - 溶媒ベント

ここで MMI モードから溶媒ベントに変更します。[ 溶媒排出計算機 ] ボタンが表示されます (図 3)。

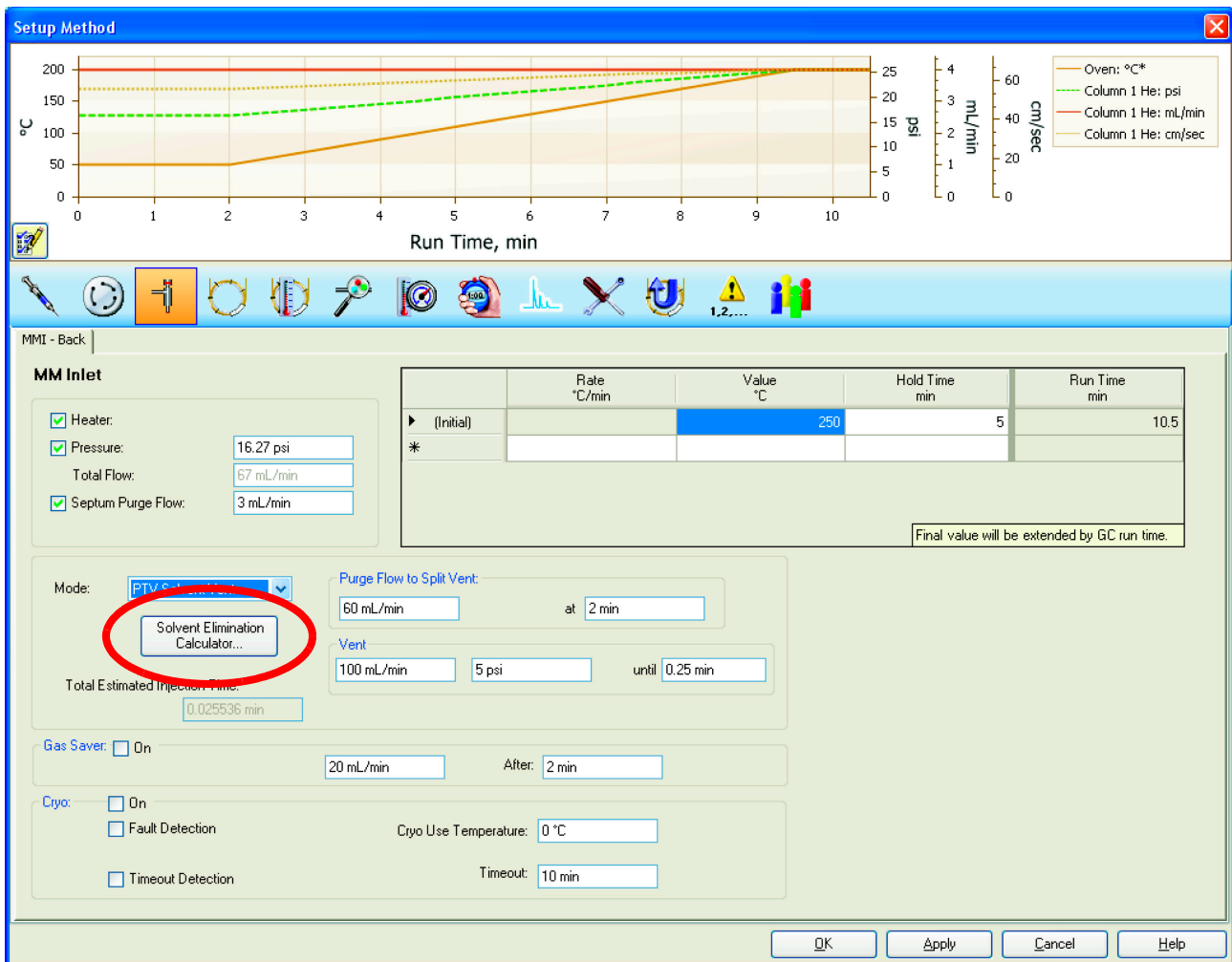


図 3 溶媒排出計算機へのアクセス

この計算機は、LVI メソッドの適当な開始条件を決定するために使用するように設計されています。計算機を開始するには、[ 溶媒排出計算機 ] ボタンをクリックします。最初の画面 (図 4) では、いくつかの情報の入力が必要になります。サンプル溶媒と必要な注入量を指定する必要があります。計算機は現在取り付けられているシンジを「認識」しており、その容量の 50% のみの注入を許可します。それ以上の量を指定すると、計算機はシステムではその注入ができないこと警告し、処理方法の選択が与えられます。3 つめの情報は最初の溶出検体の沸点です。これがわかっている



場合、その値に最も近い温度を選択します。不明な場合は、幅広い検体に対応できる 150 °C にしておきます。FID MDL サンプルでは、溶媒をイソオクタン、注入量を 5  $\mu$ L、沸点を 200 °C に設けます。[ 次へ ] をクリックして計算画面に移動します。

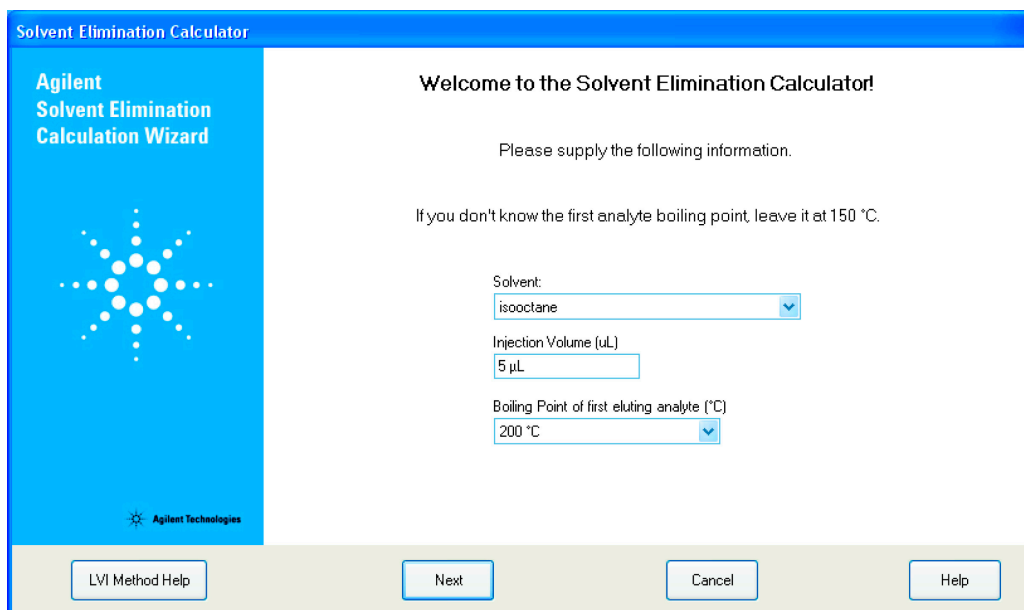


図 4 溶媒排出計算機

図 5 は計算画面を示します。指定した情報から、計算機は機器条件の初期設定を使用して、基本定理による溶媒排出速度を算出します。この [ 排出速度 ] には、LVI に特定の他の要因は考慮されないため、通常実際の解析においては早すぎます。[ 推奨注入速度 ] ではこれらの要因が考慮され、ベン時間後にライナーに少量の溶媒が残るように設定されています。この溶媒は、揮発性の高い検体の液体「トラップ」となり、回収を助けます。[ 推奨ベント時間 ] は、注入量を [ 推奨注入速度 ] で割って求められます。

#### 注記

詳細については、機器コントロールソフトウェアの LVI メソッドのヘルプを参照してください。

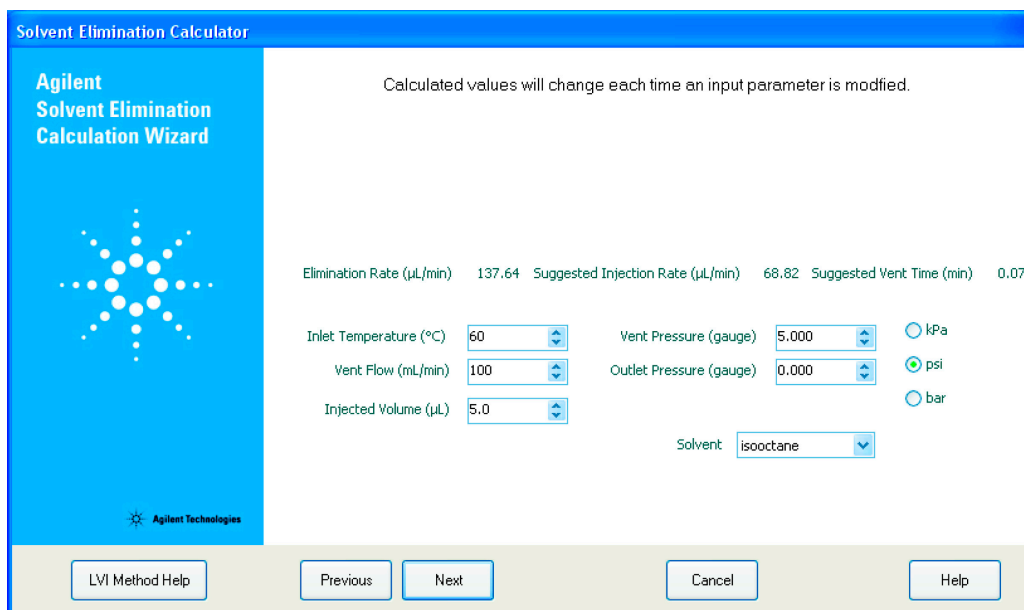


図 5 溶媒排出計算機の変数

排出速度を決定するための変数は、画面下部でユーザーが設定します。これらのパラメータの相関性を示すため、次のように変更（赤でマーク）し、表 1 での [ 排出速度 ] 値を記録します。

表 1 排出速度ワークシート

注入口温度 (°C)	ベント流量 (mL/min)	注入量 (µL)	ベント圧力 (psig)	出口圧 (psig)	溶媒	排出速度 (µL/min)
60	100	5	5	0	イソオクタン	137.64
<b>40</b>	100	5	5	0	イソオクタン	
60	<b>50</b>	5	5	0	イソオクタン	
60	100	5	<b>2</b>	0	イソオクタン	
60	100	5	5	<b>2</b>	イソオクタン	
60	100	5	5	0	<b>ヘキサン</b>	

注入口温度のわずかな変化が排出速度に大きく影響することに注意してください。ベント流量は排出速度に直接影響し、ベント流量が半量に減少すれば、排出速度も同等に低下します。ベント圧が低下すると、排出速度も低下します。ベント圧は、ベント中にカラムに達する溶媒量にも影することに注意してください。ベン

ト圧が増加すると、検体が移送される前にカラムにロードされる溶媒量が増えます。最後に、溶媒タイプ、にその通常の沸点は、排出速度に大きな影響を与えます。

チュートリアルを続けるには、計算値を [図 5](#) および次に示す値に戻します。[次へ] をクリックしてメソッド変更画面に移動します ([図 6](#))。

## MMI

モード	溶媒ベント
注入口温度	60 °C
初期時間	0.07 分
速度 1	720 °C
最終温度	250 °C
最終時間	5 分
ベント流量	100 mL/min
ベント圧	5 psig
ベント時間	0.07 分
パージ時間	2.57 分
パージ流量	60 mL/min
セプタムパージ	3 mL/min

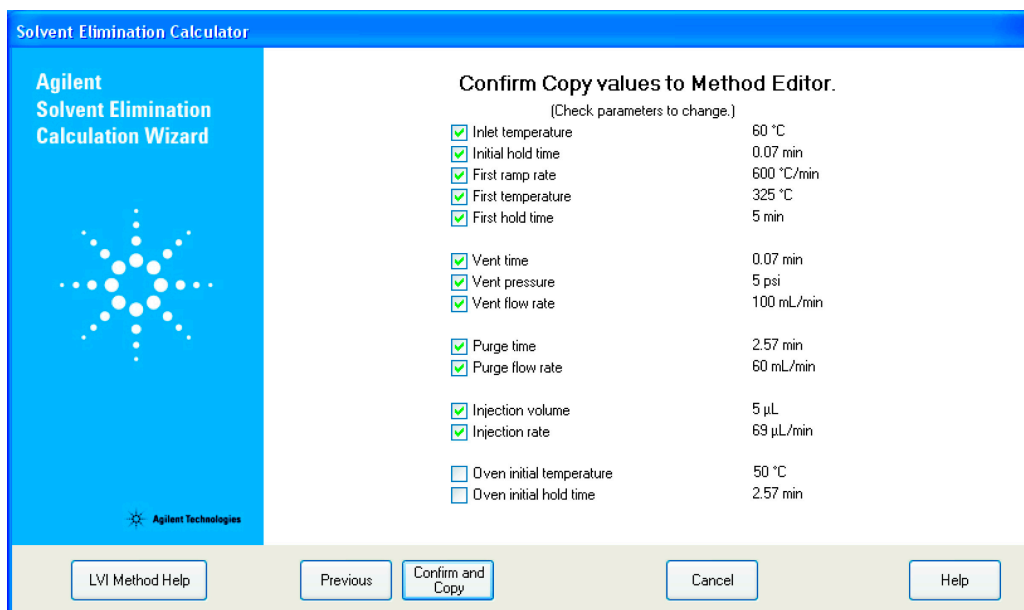


図 6 メソッドエディタへダウンロードされるメソッド変更（溶媒排出計算機）

この画面には、[パラメータの編集]画面にダウンロードされるすべてのメソッドの変更が示されます。これらのパラメータを許可するか、拒否するかが選択できます。オープンの初期温度と保持時間は、使用するメソッドでこの値を変更しないことが必要とされる場合のため（リテンションタイムロック済メソッドを使用する場合など）、自動的にオンにされません。FID MDL サンプルでは、[確認してコピー]をクリックして、[パラメータの編集]画面で[OK]をクリックします。

解析を行い、この解析と最初に行ったホットスプリットレス解析のピーク面積を比較します。図 7 は、この 2 つの解析を重ねたものです。赤の線は最初のホットスプリットレス注入結果で青の線は溶媒ベント結果です。

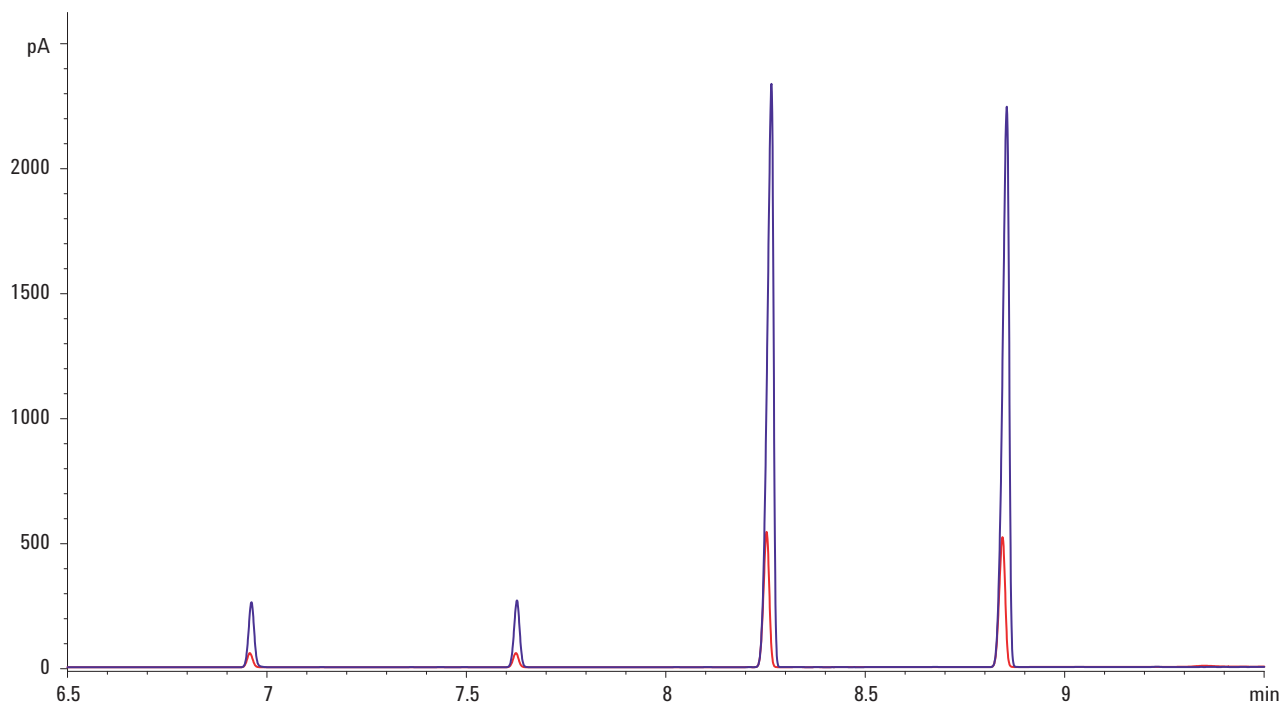


図7 最初のホットスプリットレス注入結果と溶媒ベント結果の重ね描き

表 2 は、2つの解析からの結果のピーク面積を比較したものです。検体のピーク幅は、基本的には両解析で同じです。結果は、ピークが5倍の高さになり、シグナル/ノイズ比が5倍に増加したことを示します。

表2 ホットスプリットレスと溶媒ベントの解析結果のピーク面積

注入口モード	溶媒面積	C13 面積	C14 面積	C15 面積	C16 面積
1 $\mu$ L ホットスプリットレス	17113114	56	56	555	554
5 $\mu$ L 溶媒ベント	36859256	261	268	2622	2596
溶媒ベント回収	44%	93%	96%	94%	94%

表 2 では、溶媒ベント回収は、溶媒ベント解析面積をホットスプリットレス面積の5倍で割って計算されています。検体では、回収はほぼ100%で、ほぼ1です。これは、溶媒ベント条件が機器の検出限界を本質的に5倍向上させたことを示します。溶媒回収は44%のみです。これは、5  $\mu$ L のサンプル注入から2.2  $\mu$ L のみがかラムに入ったことを示します。

これをより大きな注入量に当てはめてみましょう。25  $\mu$ L や 50  $\mu$ L のオートサンプラにより大きなシリンジを取り付けます。注入量を 10  $\mu$ L に増やし溶媒排出計算機で初期条件を決定します。この場合、FID MDL サンプルでは、MMI 条件は次のようになります。

## MMI

モード	溶媒ベント
注入口温度	60 °C
初期時間	0.15 分
速度 1	720 °C
最終温度	250 °C
最終時間	5 分
ベント流量	100 mL/min
ベント圧	5 psig
ベント時間	0.15 分
パージ時間	2.65 分
パージ流量	60 mL/min
セプタムパージ	3 mL/min

図 8 に 10  $\mu$ L 注入での検体ピークの拡大図を示します。最初の 2 つのピークはほぼ左右対称ですが、最後の 2 つのピークでは明らかにリーディングが見られます。これは、カラムの過負荷とカラムへ移送された溶媒量が一部の原因です。

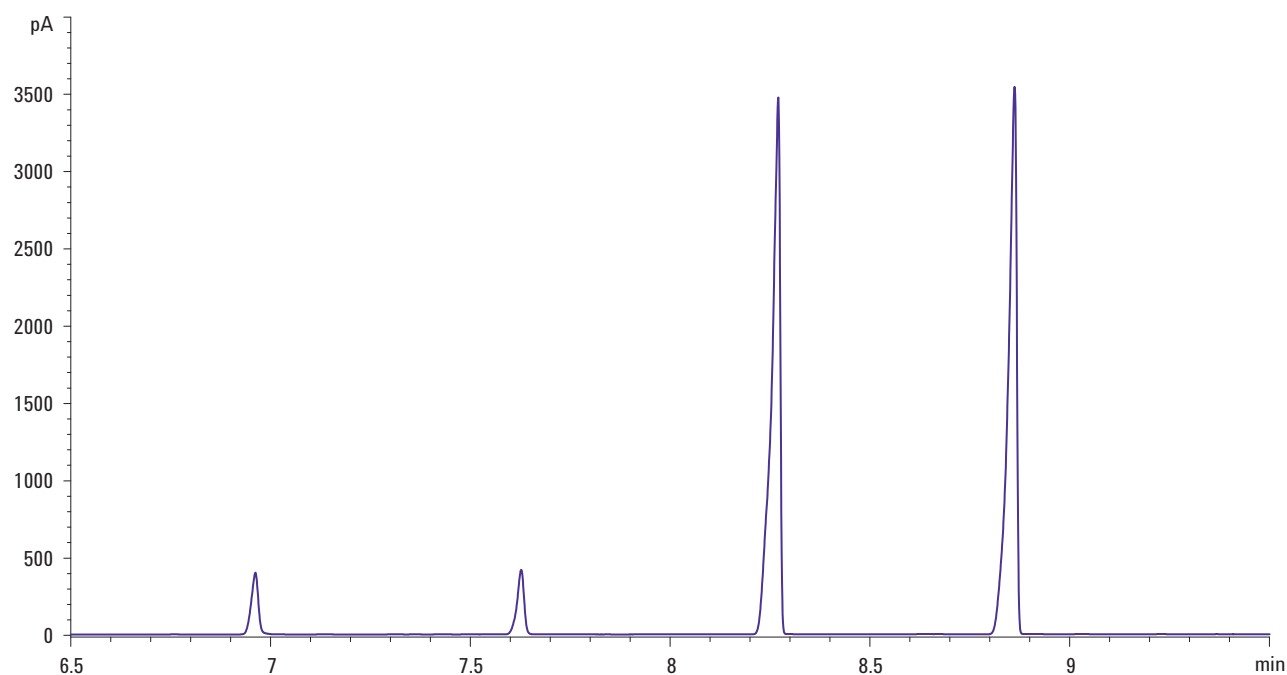


図 8 10  $\mu\text{L}$  注入での検体ピーク

表 3 は、最初のホットスプリットレス解析からの回収を示します。10  $\mu\text{L}$  の溶媒ベントの回収は、表 2 に示される 5  $\mu\text{L}$  の溶媒ベント解析よりわずかに低下しています。これは溶媒回収の低下によって裏付けられます。これを向上させるには、注入口温度を低くすると同時に、他のパラメータすべてを同じに保つか、ベント時間を少し短くします。どちらの場合も、より多くの溶媒が C13 をトラップするために残ります。この 2 つの方法では、注入口温度の方が早期溶出検体のトラップにより大きな影響があります。

表 3 最初のホットスプリットレス解析からの回収

注入口モード	溶媒面積	C13 面積	C14 面積	C15 面積	C16 面積
1 $\mu\text{L}$ ホットスプリットレス	17113114	56	56	555	554
10 $\mu\text{L}$ 溶媒ベント	59579040	493	510	5106	5208
溶媒ベント回収	35%	88%	91%	92%	94%

より大きな注入量にする最も容易な方法は、ベント時間を比例して増加する方法です。溶媒排出計算機でこの関係を試してみることができます。50  $\mu\text{L}$  の注入には、0.75 分のベント時間が必要

です。FID MDL サンプルの注入パラメータを以下に示します。カラムの過負荷を避けるため、FID MDL サンプルはイソオクタン中で 1:10 に薄められています。

## MMI

モード	溶媒ベント
注入口温度	60 °C
初期時間	0.75 分
速度 1	720 °C
最終温度	250 °C
最終時間	5 分
ベント流量	100 mL/min
ベント圧	5 psig
ベント時間	0.75 分
ページ時間	3.25 分
ページ流量	60 mL/min
セプタムページ	3 mL/min

この結果のクロマトグラムを [図 9](#) に示します。カラムへ移送される溶媒量が多すぎたため、ピークの形状に明らかな歪みがあります。この問題はいくつかの方法で修正できます。ベント時間をさらに長くすると、カラム中の溶媒量を減少できます。[図 10](#) は、0.75 分ではなく、0.90 分のベント時間でのクロマトグラムを示します。ピークの形状は大きく向上し、[図 7](#) の 5 µL のクロマトグラムに非常に似ています。カラムに移送される溶媒量を減少させる他の方法は、ベント流量を増やすか、ベント圧を減少させか、ベント時間中の注入口温度を上昇させる方法です。溶媒排出計算機で、パラメータの変更による排出速度への影響の大きさを調べることができます。この他の 2 つの方法でも、検体回収とピーク形状を向上させることができます。リテンションギャップを使用すると、検体ピークの再オーカスを助け、ピーク形状を向上させます。2 つめの方法では、ガラスウールやパッキンなどの保持材をライナーに使用します。ライナー中の材質は、溶媒ベント中に検体を保持し、カラムに移送される溶媒量を減少させることができます。ライナーに保持材を使用する場合、不可逆な吸収による検体の損失があることに注意が必要です。

詳細とサンプルの用途については、Agilent の Web サイト (<http://chem.agilent.com>) を参照してください。



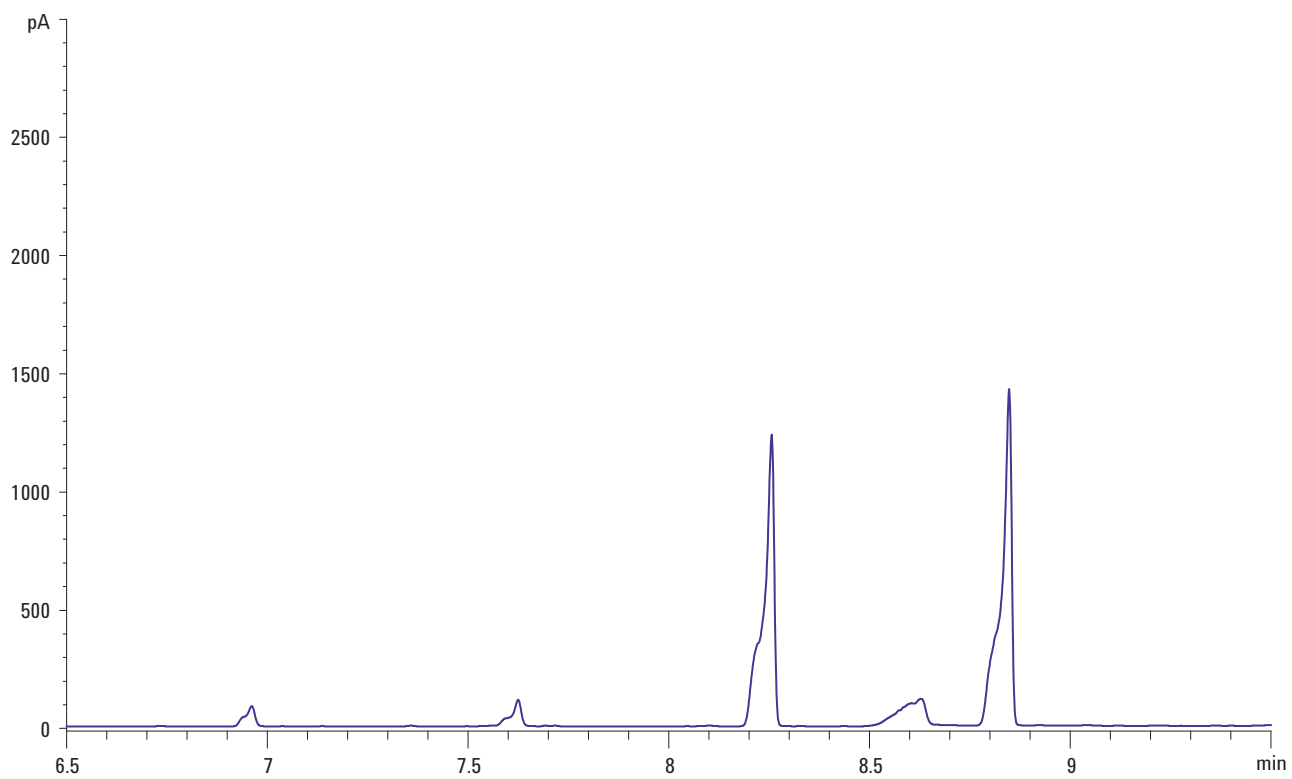


図 9 イソオクタン中で 1:10 に薄められた FID MDL サンプル

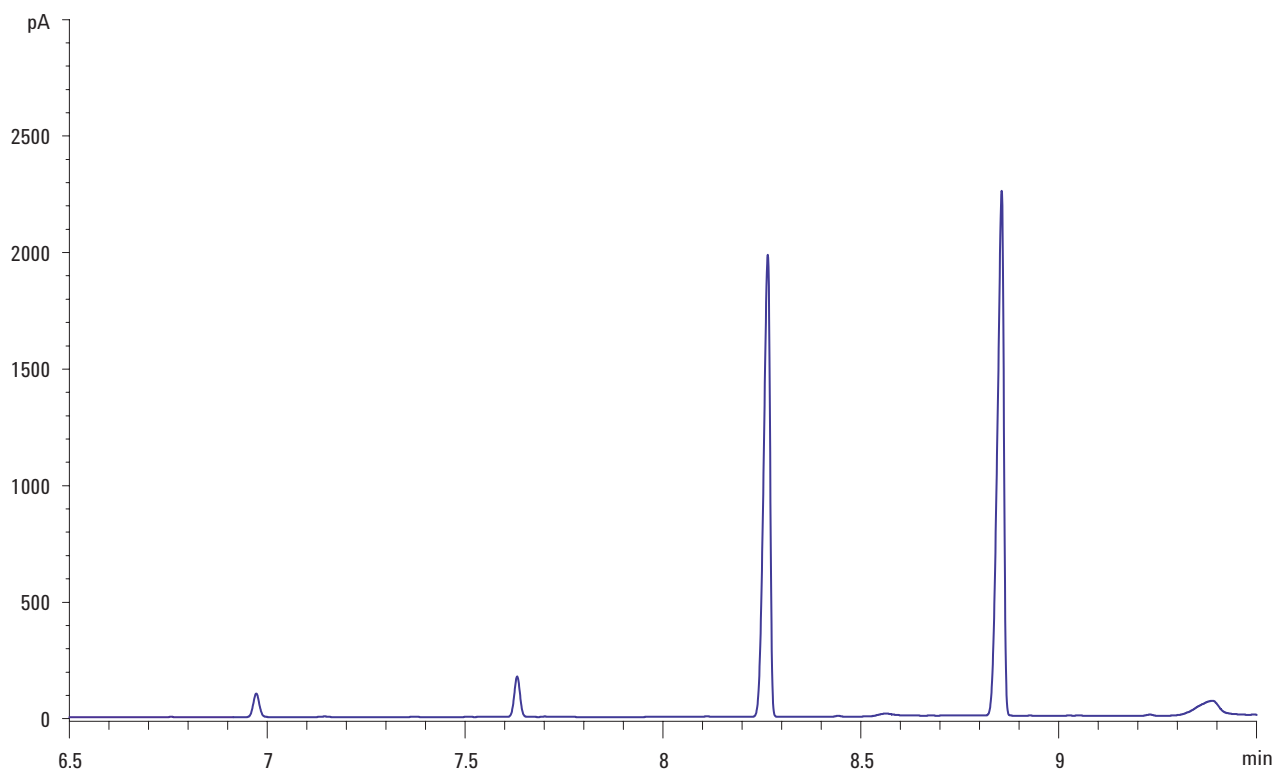


図 10 0.75 分ではなく、0.90 分のベント時間でのクロマトグラム



**Agilent Technologies**

## 注意

© Agilent Technologies, Inc. 2009

米国著作権法および国際著作権法に定められているとおり、Agilent Technologies, Inc. の事前の合意および書面による許諾なしに、このマニュアルの全または一部をいかなる形態（電子データや検索用データまたは他国語への翻訳など）あるいはいかなる手段をもって複製することはできません。

第2版 2009年5月

第1版 2009年4月

情報は予告なく変更される場合があります。

Printed in U.S.A.

Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road,  
Wilmington, DE 19808-1610 USA

## マニュアル製品番号

G3510-96020

## 保証

このマニュアルに記載されている内容は、「現時点」の状況を前提としており、以後の改訂版では事前の通知なしに変更されることがあります。また、適用法が許容する最大限の範囲において、Agilentはこのマニュアルおよびこのマニュアルに記載されているすべての情報に関し、商品性や特定用途への適合性についての黙示保障など、明示または黙示を問わず、一切の保証はいたしません。Agilentは、このマニュアルまたはこのマニュアルに記載されている情報の提供、使用または行使に関連して生じた過失、あるいは付随的損害または間接的損害に対し、責任を負わないものとします。このマニュアルに記載されている要素に関して保証条件付きの書面による合意がAgilentとお客様との間に別途にあり、その内容がここに記されている条件と矛盾する場合、別途に合意された保証条件が優先されるものとします。