

フィード速度とオーバーフィード容量

超臨界流体クロマトグラフィーにおける注入パラメータ

技術概要

著者

Edgar Naegele Agilent Technologies, Inc. Waldbronn, Germany

概要

この技術概要では、フィード速度とオーバーフィード容量の2つの注入パラメータが及ぼすクロマト グラフィー分離への影響を解説しています。2つのパラメータは、Agilent 1260 Infinity II 超臨界流体ク ロマトグラフィー (SFC) マルチサンプラメソッドで設定できます。保持時間が類似してる化合物のイソ クラティック分離への影響を、SFC で一般的に使用されるさまざまな注入量について、メソッド最適 化のガイドラインを提案します。





Agilent Technologies

はじめに

Agilent 1260 Infinity II SFC マルチサンプラによ り、Agilent 1260 Infinity II 分析 SFC システムで は柔軟にサンプル注入量を変更できるように なりました¹。最少の注入可能量は 0.1 µL です。 1260 Infinity II SFC マルチサンプラには 100 µL のサンプルループを搭載できるため、大容量 の注入が可能です。1260 Infinity II SFC マルチサ ンプラの注入メソッドでは、フィード速度とオー バーフィード容量という2つの特別な注入パラ メータが設定できます。フィード速度はサンプ ル導入の速度を示し、オーバーフィード容量は サンプル注入後に追加されるフラッシュアウト の容量です。

この技術概要は、さまざまなフィード速度およ びオーバーフィード容量において、サンプル注 入量を変化させ、得られたクロマトグラフィー 結果を解説しています。測定はイソクラティッ ク分離を採用し、直線性や面積精度などの性 能パラメータについて解説しています。ここで 得られた結果から、メソッド作成のガイドライ ンとデフォルトパラメータを提案します。

実験方法

装置構成

Agilent 1260 Infinity II 分析 SFC ソリューションは 次の製品で構成されています。

- Agilent 1260 Infinity II SFC コントロール モジュール (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC バイナリポンプ (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC マルチサンプラ (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A) と 高圧 SFC フローセル
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラム サーモスタット (G7116A)

機器の設定

1260 Infinity II SFC マルチサンプラを、SFC ポン プとカラムに直接接続しました。フラッシング および洗浄ステップは、スタートアップキット に含まれている配管で実施しました。フラッ シュおよびフィードプロセス用溶媒とニードル 洗浄用溶媒の2種類の溶媒を接続する必要が あります。

カラム

Agilent ZORBAX RX-SIL、 4.6 × 150 mm、5 μm (p/n 883975-901)

ソフトウェア

LC および LC/MSシステム用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.07 SR3

サンプル

テオフィリン、カフェイン、チミン、テオブロミン (250 µg/mL、エタノール溶液) を含む SFC チェックアウト標準溶液 (p/n 5190–0584)

試薬

すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。

結果と考察

フィード注入では、サンプルをカラムに注入す る前に、サンプルを加圧します¹。注入をコント ロールする2種類のメソッドパラメータとして、 フィード速度とオーバーフィード容量がありま す。フィード速度は、移動相へサンプルを注入 する速度です。オーバーフィード容量は、サン プルを完全にフラッシュアウトするため、サン プル注入後にカラムに注入される溶媒の容量 です。両方のパラメータがクロマトグラフィー 分離に影響を与えます。

SFC メソッド

パーメーク	由容
////-·>	
溶媒A	CO ₂
移動相溶媒 B	メタノール
流速	2.5 mL/min
イソクラティック条件	12 % B
	ストップタイム:6分
背圧レギュレータ (BPR)	60 ° C、130 bar
カラム温度	40 ° C
 注入量	0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 μL
フィード溶媒	メタノール
オーバーフィード容量	4、3、2、1、0 μL
フィード速度	1,000、400、200、100、50 μL/min
ニードル洗浄	3秒、メタノール
ダイオードアレイ検出器	254 nm/4 nm、リファレンス. 360 nm/100 nm、
	データレート: 10 Hz、標準高圧 SFC フローセル

注入量とフィード速度が及ぼす分離への 影響

クロマトグラフィーへのフィード速度の影響を テストしました。注入量 (0.1 \sim 10.0 μ L) とフィー ド速度 (50 \sim 1,000 μ L/min) を変化させ、オー バーフィード容量は固定 (4 μ L) としました。こ の条件で分析すると、テストサンプル4種の化 合物は分離できることが分かりました。

例として、0.1、1.0、5.0、10.0 μL の注入量の結 果を図 1 に示します。5 μL 注入まではピーク はベースライン分離できていますが (図 1C)、 最大注入量の 10.0 μL ではベースライン分離で きない化合部もありました (図 1D)。注入量の 直線性についての検証結果は図 2 に示してい ます。







図 2. フィード速度 400 µL/min、オーバーフィード容量 4 µL を固定した時の各化合物における注入量直線性。

すべての化合物が、 $R^2 > 0.999$ 以上の優れた直線性を示しました。オートサンプラの性能指標として、再現性が挙げられます。ピーク面積の相対標準偏差 (RSD)を求めました。一般的に、面積 RSD は、最少注入量 (0.1 μ L)において、3.0 \sim 3.5 % 程度であり、注入量が 0.5 μ L を超えると 0.3 % 以下になります。Agilent 1260 Infinity II SFC マルチサンプラにおいては、 10.0 μ L までのすべての注入量において、RSD の値は 0.3 %

以下を維持しています。詳細については、アジ レントの技術概要¹を参照してください。

次にフィード速度を変化させることで、どのく らいまで注入量を増やすことができるかを検 証しました。図3は、イソクラテック分離にお いて、最大注入量がフィード速度の低下と共 に減ることを示しています。最初の3つのピー クは、フィード速度200 μL/min において注入量 10 μL で共溶出が始まりました。これら3つの ピークは、注入量が 5 μ L 以下ではベースピー ク分離していました (図 3 の A1 と A2)。フィー ド速度が 100 μ L/min では、注入量 5 μ L で共溶 出しましたが、注入量が 3 μ L 以下ではベース 分離していました (図 3 の B1 および B2)。さら に、最低速のフィード速度の 50 μ L/min では、 注入量 3 μ L で共溶出し、注入量 1 μ L 以下では 良好なベースピーク分離を示していました (図 3、C1 および C2)。



図 3. イソクラティック分離条件でのフィード速度と最大注入量の関係。A) 最初の 3 つのピークは、フィード速度 200 μL/min では注入量 10 μL で共溶出が 始まりました (A1)。注入量 5 μL では分離していました (A2)。B) フィード速度 100 μL/min では、注入量 5 μL で共溶出が始まり (B1)、注入量 3 μL までは 分離していました (B2)。この比較では、最低速のフィード速度の 50 μL/min では、注入量 3 μL で共溶出が始まり (C1)、注入量 1 μL では良好な分離能を示しました (C2)。



図 5. さまざまな注入量について、ピーク4のピーク高さとフィード速度の比較。

注入量の直線性は、50、100、200、500 µL/min のフィード速度において、0.1 µL から最大注入 量までで求めました (表 1)。

得られた注入量の直線性は、ほとんどが 0.9995以上ありました。直線性の計算に容量 の多い注入量が含まれている場合、図3に示 されるように、クロマトグラフィーによる分離 が悪くなるため、 R^2 の値は低下しました。

定量分析におけるもう 1 つの重要な指標は、 ピーク面積の再現性です。高速なフィード速度 値を用いる場合では、注入量を上げて高い分 離能を維持できます。先に示したように 0.5 μ L よりも多い注入量について面積 RSD は 0.3 % 以下を実現できます。図 4 は、50 μ L/min の低 フィード速度における、0.1 から 2 μ L の注入量 範囲での面積再現性の例を示しています。

すべての実験条件において、化合物 4 の溶出 時間は遅く、他の化合物と共溶出しませんで した。このため、化合物 4 は、分離以外のピー クパラメータに対するフィード速度の影響を検 証するための良い指標になります。例えば、 固定注入量では、特に注入量が多い場合は、 フィード速度が低下するにつれて、ピーク高さ は劇的に低くなります (図 5)。

フィード速度が 50 および 100 µL/min では、注 入量がそれぞれ 3 および 5 µL を超えるとピー ク高さに影響が出始めます。逆に、フィード速 度が 500 µL/min よりも高速な場合は、注入量 の増加に伴いピーク高さが高くなることが示 されました。これは早いフィード速度を用いる と、注入量を増やしてもピーク幅が広がらな いことを示しています。

表 1.0.1 μL から最大注入量までのフィード速度での注入の直線性

フィード速度 (μL/min) と 最大注入量 (μL)	化合物1	化合物 2	化合物 3	化合物 4
500/10	0.9995	0.9994	0.9993	0.9993
200/5	1.0000	0.9999	0.9998	0.9997
100/3	0.9999	0.9999	1.0000	1.0000
50/1	0.9998	0.9998	1.0000	1.0000



実際にピーク幅に対する検証を行いました。 図 6 に示すように、すべてのフィード速度にお いて、注入量の増加に伴ってピーク幅が広がる ことが分かりました。注入量が 0.5 μL までの場 合、フィード速度とはほとんど無関係に、ピー ク幅は注入量の増加とともに広がっています。 フィード速度が 50 μL/min および 100 μL/min と 低速の場合、それぞれ注入量が 2 および 5 μL を超えると、ピーク幅は急激に広がります。注 入量のピーク幅に対する影響は、フィード速度 が 400 μL/min と 1,000 μL/min の高速な場合は ほぼ同じであることが分かります。

最後のピークパラメータとして、ピーク対称性 について検証します(図7)。注入量が少ない場 合、ピーク対称性はさまざまなフィード速度に ついてほとんどがおよそ0.9を示しています。 対称性の値は、注入量が多くなると低下しま す。これは注入量が増加するとピークがデー リングすることを示しています。特にフィード 速度がより遅い場合はその影響は顕著です。

さまざまな注入量での

オーバーフィード容量の分離への影響 2 つ目のパラメータのオーバーフィード容量 は、すべてのサンプル量が確実にループキャ ピラリからカラムに送られるようにするもので す。オーバーフィード容量を十分にとることが、 低容量注入においてはサンプルの損失を避け るために重要になります (図 8)。

例えば、注入量が 0.1 µL の場合、4 µL のオー バーフィード容量を適用するとサンプルはすべ てカラムに注入されます。端的に言うと、少量 のサンプルは、オーバーフィード容量なしでも 注入可能ですが、一部損失する場合がありま す。図 9 は、0.1 ~ 10 µL の注入量においてオー バーフィード容量を変化させた時にピーク面 積値がどのように変化するかを検証した結果 を示しています。



図 6. さまざまな注入量について、化合物 4 のピーク幅とフィード速度の比較。







図 8. 注入量を 0.1 µL と固定にし、オーバーフィード容量を変化させた時のクロマトグラム。



図 9. 各注入量におけるオーバーフィード容量が与えるピーク面積値への変化。すべてのオーバーフィード容量について化合物 4 の 相対面積比を示しています。オーバーフィード容量が 5 μL の場合はすべてのサンプルがカラムへ導入されると想定しました。

注入量が最も少ない 0.1 µL でオーバーフィー ド容量が0の場合は、検出されたピーク面積 はわずか 20% 程度でした。サンプル注入量 が 10 µL の場合は、オーバーフィード容量が 0 であっても、検出されたピーク面積はおよそ 90%まで増加しました。より少ないサンプル 注入量も、オーバーフィード容量を4µLにする と、サンプルはカラムへ導入されることがわか りました。また、オーバーフィード容量が 3 µL および 4 µL の場合は、すべての注入量範囲で サンプルがカラムに導入されることが確認で きました。この計算では、5 µL のオーバーフィー ド容量を基準値として計算しました。その場合 オーバーフィード容量が 4 µL の場合の多くが、 オーバーフィード容量 5 µL の場合の 98 % 以 上のピーク面積値であることが分かりました。

フィード速度、オーバーフィード容量、 注入量の各パラメータが与える 理論段数への影響

フィード速度、オーバーフィード容量、注入量 のパラメータがどのようにカラム分離に影響 を与えるかを検証するために、実験計画法 (Design of Experiment: DOE) マトリックスを作成 しました。各パラメータを変更させ、理論段数 がどのように変化するかを検証したこの DOE マトリックスは、本技術概要の前のセクション で記載した結果を基準としました。フィード速 度については、100 µL/min と 1,000 µL/min の 値を使用しました。オーバーフィード容量につ いては1および10 µLを、それぞれフィード速 度の値と組み合わせて使用しました。さらに、 フィード速度が 550 µL/min とオーバーフィード 容量が 5.5 µL の中間点用のメソッドを作成し ました。注入量は 0.1、5.05、10 µL として、上 記の5つのメソッドを組み合わせました。その 他のパラメータは実験方法に記載されている 通りです。

すべてのパラメータを1つずつ順に変更するメ ソッドを作成し、1つのシーケンスに組み込み ました。シーケンスでは中間点用メソッドを3 回挟み込み、全体で17のシーケンスラインと しました。また、各分析は10回の繰り返し実 験を行いました。カフェインとテオブロミンの 混合物(250 mg/L、メタノール溶液)をテストサ ンプルとして使用しました。カフェインは約 k' =2で、テオブロミンは約 k'=4の保持時間比 で溶出しました。図10に3Dプロットで結果を まとめています。

最小注入量 0.1 μL においても、各パラメータ の影響が生じることが分かりました (図 10-A1)。フィード速度が最高値、かつ、オーバー フィード容量が最小値の場合に、理論段数が 最高値になることが分かりました。理論段数 は、フィード速度が低下すると減少し、逆に オーバーフィード容量が減少すると増加しまし た。溶出時間が遅いピークは、早いピークに 比べて理論段数は減少しましたが、同様の挙 動を示しました (図 10-A2)。注入量が増大する と、フィード速度とオーバーフィード容量の条



,000 (^{min}

550

100

E

フィード速度

1,000 (line)

550

100

ビード速度 (nL/

7

1,000

550

100

(hr

フィード速度

図 10. フィード速度、オーバーフィード容量、注入量について、DOE マトリックスを作成し、理論段数がどのように変化するかを比較しました。 例として、カフェイン (ピーク 2、k' = 2) とテオブロミン (ピーク 4、k' = 4) の 2 つの化合物を使用しました。フィード速度の範囲は 100 ~ 1,000 µL/min、オーバーフィード容量 の範囲は 1 ~ 10 μL、中間点用データとしては 550 μL/min のフィード速度および 5.05 μL のオーバー量のデータも取得しました。注入量はそれぞれ、A) 0.1 μL、B) 5.05 μL C) 10 µL です。(理論段数値の近いものを色分けして示しています)。

件が同じ場合でも、理論段数は減少しました。 この影響は、フィード速度が 550 µL/min よりも 遅い場合に、より顕著となります (図 10 の B1 および B2)。注入量が 10 µL の場合、理論段数 は減少しましたが、両方のピークで同じ挙動 を示しました (図 10 の C1 と C2)。分析の最適 化を求めるこれらの実験から、3D プロットの 左上部に分離条件がある場合に、最高の性能 が発揮できるという結論が得られました。オー バーフィード容量が少ない場合、フィード速度 は 500 µL/min 以上にすることが必要なことも 分かりました。先の結果と同じく、注入範囲 が 0.1 ~ 10 µL の場合、オーバーフィード容量 は3~4 µL が最適であることが示されました。 注入量が5µLよりも少ない場合に理論段数が 高くなることが分かりました。先に記述した注 入量の再現性を考慮すると、注入量は 0.5 ~ 5 μL にする必要があります。

まとめ

すべての実験結果はアイソクラテック分離で 検証した結果です。イソクラティック分離では、 グラジエント分離より注入量や今回検証した パラメータの影響を受けます。グラジェント溶 出では、化合物は主にカラムの入り口部分に 濃縮され、その後グラジエントで溶出が始まり ますが、アイソクラテック分離では化合物はカ ラム入り口部分にとどまらず溶出するため、サ ンプルを溶かしている溶媒や、今回の場合は フィード溶媒に多大な影響を受けると考えら れます。通常、イソクラティック溶出は、SFC の 主要なアプリケーションであるエナンチオマー の分離でよく用いられている分離方法です²。 今回の結果から、400 µL/min のフィード速度値 と 4 µL のオーバーフィード容量が、デフォルト 値として適していることが分かりました。大容 量のサンプル注入でカラムの入り口部分にサ ンプルが集中する場合は¹、フィード速度を低 速にすることが重要です。

また、サンプルが粘着性のある化合物や高い 汚染マトリックスで構成される場合は、オー バーフィード容量を増やす必要があります。

結論

この技術概要は、Agilent 1260 Infinity II SFC マ ルチサンプラを使用した場合のカラム分離に 対するフィード速度とオーバーフィード容量の 影響を検証しています。複数の実験結果から、 これらのパラメータの推奨デフォルト値を提案 しています。Agilent 1260 Infinity II SFC マルチサ ンプラの最適なクロマトグラフィー性能のため のアプリケーションを解説しています。

参考文献

- Naegele, E. 高精度かつ注入量可変の 超臨界流体クロマトグラフィー, Agilent Technologies Technical Overview, publication number 5991-7623JAJP, 2017.
- Naegele, E. Chiral Multicolumn Method Development on the Agilent 1260 Infinity II Analytical SFC System, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7624EN, 2017.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ 0120-477-111 email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、 医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。 本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに 変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社 © Agilent Technologies, Inc. 2017 Printed in Japan, April 1, 2017 5991-7626JAJP

