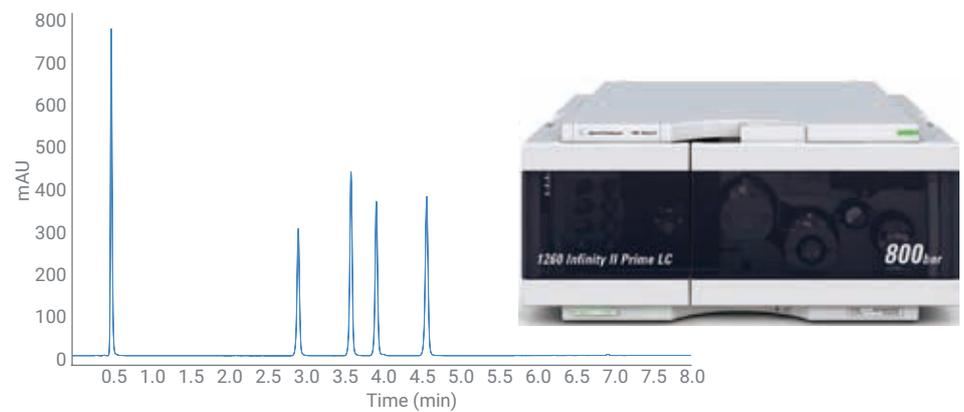


## Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ

精度と正確性に優れた低圧ミキシンググラジエントポンプ



### 著者

Melanie Metzloff and  
Patric Hörth  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプは、精度や正確性を損なうことなく、内径 4.6 mm のカラムを用いた従来のアプリケーションや、内径 2.1 および 3.0 mm のカラムを用いた高速分析に非常に柔軟に対応します。

この技術概要では、1260 Infinity II フレキシブルポンプの卓越した性能について説明します。厳しい条件下でのリテンションタイムの精度を評価し、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプと比較しました。さらに、両ポンプの組成精度、デレイボリューム、流量真度をステップグラジエントを用いて評価しました。

## はじめに

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプは低圧ミキシンググラジエントポンプで、動作圧力は最大 80 MPa です。一体型の多目的バルブにより、自動パージ、ミキサのイン/アウト切り替え、フィルタのバックフラッシュといった便利な機能を使用できます。

1260 Infinity II フレキシブルポンプの優れた性能を実証するために、複数の高度なアプリケーションを選択しました。1260 Infinity II フレキシブルポンプで得られた結果を、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプで得られた結果と比較しました。

## 実験方法

### 装置構成

実験では、次のモジュールを用いました。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G7112B)
- Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル (G7167A)、サンプル冷却システム (オプション #100) 付
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、標準フローセル: 光路長 10 mm、容量 13  $\mu$ L

### ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS 2.2 (M8413A)

### 試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22  $\mu$ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) 付の Milli-Q Integral システムで精製しました。アセトニトリルおよびアセトン、Merck (ダルムシュタット、ドイ

ツ) から購入しました。トリフルオロ酢酸 (TFA) およびギ酸 (FA) は、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

## メソッド

表 1. ステップグラジエントのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
カラム	リストリクシオンキャピラリー
溶媒	A) 0.3 % アセトン水溶液 B) 水
グラジエント	1 % ステップ 100 ~ 94 %A (20 ~ 45 分) 2 % ステップ 94 ~ 90 %A (45 ~ 55 分) 10 % ステップ 90 ~ 51 %A (55 ~ 80 分) 1 % ステップ 51 ~ 49 %A (80 ~ 90 分) 10 % ステップ 40 ~ 10 %A (90.01 ~ 110 分) 2 % ステップ 6 ~ 0 %A (110.01 ~ 135 分)
ストップタイム	140 分
流量	1 mL/min
カラム温度	30 °C
DAD	273/4 nm、参照波長 360/100 nm、10 Hz

表 2. 緩やかなグラジエントでのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
化合物	ポリフェノール混合物: カテキン、カフェイン酸、エピカテキン、エピガロカテキン (すべて Sigma-Aldrich から購入)
カラム	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 $\mu$ m (p/n 857700-902)
溶媒	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液
グラジエント	6% B (0 分) 12 % B (8 分)
ストップタイム	8 分
ポストタイム	3 分
流量	0.6 mL/min
注入量	2 $\mu$ L、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液)
サンプル温度	10 °C
カラム温度	30 °C
DAD	280/4 nm、参照波長 360/50 nm、40 Hz

表 3. 有機溶媒の割合が低い分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
化合物	サルファ剤: スルファニルアミド、スルファチアゾール、スルファメラジン、スルファクロロピリダジン、スルファメタジン (すべて Sigma-Aldrich から購入)
カラム	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 $\mu$ m (p/n 857700-902)
溶媒	A) 0.1 % TFA 水溶液 B) 0.1 % TFA アセトニトリル溶液
グラジエント	1% B (0 分) 25 % B (6 分)
ストップタイム	8 分
ポストタイム	3 分
流量	0.6 mL/min
注入量	2 $\mu$ L、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液)
サンプル温度	10 °C
カラム温度	45 °C
DAD	254/4 nm、参照波長 360/80 nm、20 Hz

## 結果と考察

### 実験 1: ステップグラジエント

溶媒 A にトレーサを含んだステップグラジエントを使用し、システムディレイボリューム、組成精度、ミキシングノイズ、流量真度を求めました。流量真度の評価には高精度フローメータ (FAM) を用いました。

同一条件でのステップグラジエントを、Jet Weaver ミキサ付きの 1260 Infinity II フレキシブルポンプ、Jet Weaver ミキサなしの 1260 Infinity II フレキシブルポンプ、1260 Infinity II バイナリポンプに適用しました。図 1 は、1、2、10 % ステップで 100 %A (水 + トレーサー) から 0 %A (水 + トレーサー) までの 3 つのステップグラジエントを重ね表示したものです。両ポンプともこのグラジエント範囲で優れた性能を示しました。3 つのグラジエントステップは、移動相 B の割合が少ない 1 % ステップにおいても同じ挙動を示しました。この結果は、1260 Infinity II バイナリポンプと 1260 Infinity II フレキシブルポンプのグラジエント性能が、移動相 B が 1 ~ 5 % のような厳しい条件下でさえ、同等であることを明確に示しています。

表 4. 有機溶媒の割合が高い分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
化合物	スタンレッド混合物: スタン I、スタン II、スタン III、スタン IV (すべて Sigma-Aldrich から購入)
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm (p/n 959941-302)
溶媒	A) 水 B) 95 % アセトニトリル
グラジエント	90% B (0 分) 100% B (4 分)
ストップタイム	4 分
ポストタイム	2 分
流量	1 mL/min
注入量	1 μL、ニードル洗浄 3 秒 (アセトニトリル)
サンプル温度	10 °C
カラム温度	40 °C
DAD	490/20 nm、参照なし、20 Hz

表 5. 高速グラジエントでのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
化合物	Agilent RRLC チェックアウトサンプル (p/n 5188-6529)
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm (p/n 959941-302)
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル
グラジエント	30% B (0 分) 100% B (1 分)
ストップタイム	2 分
ポストタイム	1 分
流量	2 mL/min
注入量	1 μL、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液)
サンプル温度	10 °C
カラム温度	60 °C
DAD	254/4 nm、参照波長 360/60 nm、80 Hz

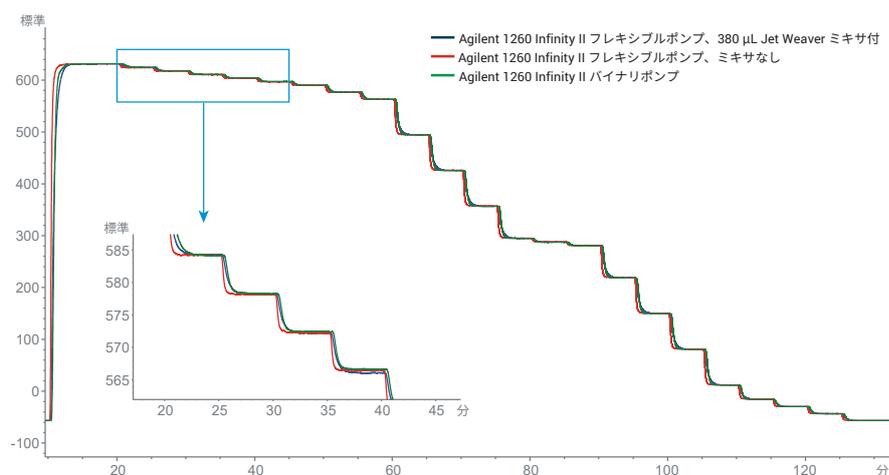


図 1. Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプのミキサ付きとミキサなし、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ、100 % から 0 % トレーサのステップグラジエント

ステップグラジエントに基づいて両ポンプの組成精度を算出しました。図 2 は、1260 Infinity II フレキシブルポンプ (380  $\mu$ L Jet Weaver ミキサありとなしの場合) と、1260 Infinity II バイナリポンプについての組成精度を示しています。組成精度の仕様範囲は、1260 Infinity II バイナリポンプが  $\pm 0.35\%$ 、1260 Infinity II フレキシブルポンプが  $\pm 0.4\%$  と定義しました。両ポンプの組成精度は、仕様範囲内でした。

表 7 にシステムディレイボリウム、ミキシングノイズ、流量真度をまとめています。予測したとおり、Jet Weaver ミキサなしの 1260 Infinity II フレキシブルポンプが最も低いディレイボリウムで、約 310  $\mu$ L でした。流路に 380  $\mu$ L Jet Weaver ミキサを追加すると、ディレイボリウムは 460  $\mu$ L に増加しました。1260 Infinity II バイナリポンプでは、ディレイボリウムは 610  $\mu$ L と算出されました。いずれのポンプのディレイボリウムにも、キャピラリー、リストラクションキャピラリー、検出器のセルの容量が含まれています。1260 Infinity II マルチサンブラは、測定時、流路内に含まれていませんでした。

ミキシングノイズは、グラジエントのそれぞれのステップで算出しました。表 7 は 3 つの異なるステップ (95%、49%、4% トレーサー) での値を比較しています。1260 Infinity II フレキシブルポンプと 1260 Infinity II バイナリポンプは同様の結果を示しました。ただし、380  $\mu$ L Jet Weaver ミキサ付きの 1260 Infinity II フレキシブルポンプが、ミキシングノイズに関して最良の結果となりました。ミキサを追加することにより、1260 Infinity II フレキシブルポンプのディレイボリウムがわずかに

増加しますが、混合性能が向上するため、UV シグナルが安定するようになります。以上の結果から、混合の効率がよく、ディレイボリウムを最小限に抑えるように設計された Jet Weaver ミキサの卓越した性能が、明確に示されました。

LC スタック構成に FAM を追加することにより、ステップグラジエントでの実際の流量をモニタリングしました。1260 Infinity II フレキシブルポンプの実際の流量 (0.998 mL/min)

は、設定値 1 mL/min をわずかに下回りました。1260 Infinity II バイナリポンプの実際の流量は 1.003 mL/min で、設定値をわずかに上回っています。しかし、両ポンプとも優れた性能を示し、仕様範囲である  $\pm 1\%$  に収まりました。

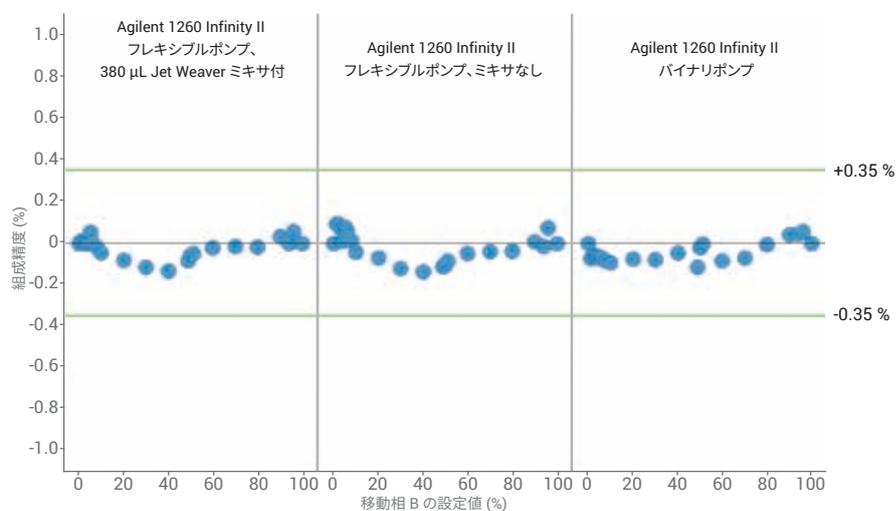


図 2. Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプのミキサありとなし、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプを用いた組成精度

表 7. ステップグラジエントの結果

	Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ、 380 $\mu$ L Jet Weaver ミキサ付	Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ	Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ
ディレイボリウム	約 460 $\mu$ L	約 310 $\mu$ L	約 610 $\mu$ L
95%A でのミキシングノイズ	0.015 %	0.048 %	0.023 %
49%A でのミキシングノイズ	0.024 %	0.040 %	0.045 %
4%A でのミキシングノイズ	0.013 %	0.034 %	0.012 %
平均流量 (mL/min)	0.998	0.998	1.003
$\Delta$ 平均流量 (%)	-0.164	-0.155	0.270

### 実験 2: 緩やかなグラジエントでのリテンションタイム精度

緩やかなグラジエントでのリテンションタイムの精度を求めるために、4つのポリフェノール化合物の混合物について分析しました。グラジエントは8分間で6%Bから12%Bにします。これは1分あたり0.75%の移動相Bの変化に相当します。図3は、1260 Infinity II フレキシブルポンプ(ミキサなし)と1260 Infinity II バイナリポンプで分析した2つのクロマトグラムを比較したものです。4つのポリフェノール化合物のリテンションタイムの精度(表8)は、両ポンプで類似していました。この実験により、緩やかなグラジエント条件下でも1260 Infinity II フレキシブルポンプのミキシング精度が高く、バイナリポンプも適していることが示されています。

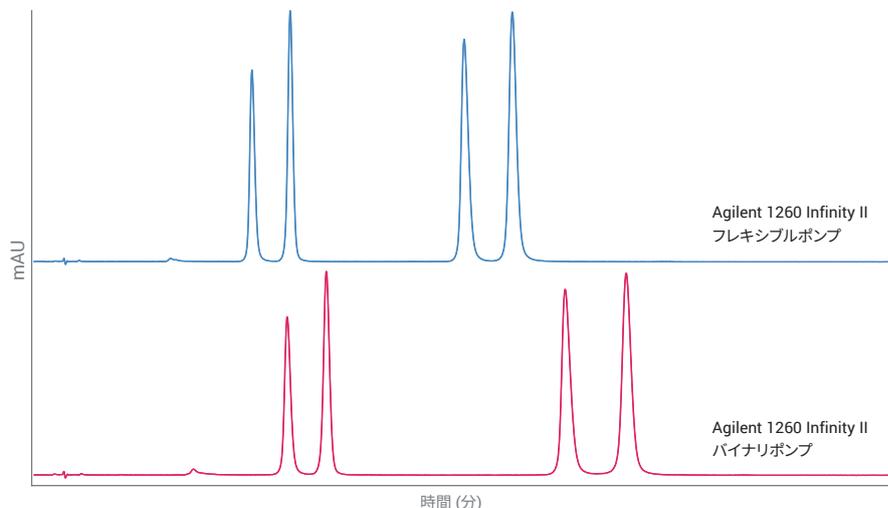


図3. 緩やかなグラジエント条件下でのポリフェノール化合物の分析。溶出順序: カテキン、カフェイン酸、エピカテキン、エピガロカテキン

### 実験 3: 有機溶媒の割合が低い場合のリテンションタイム精度

有機溶媒が1%から25%の割合のグラジエントで、5つのサルファ剤の混合物を分析しました(図4)。有機溶媒の割合が低くても分析できるのは、バイナリポンプの利点です。1260 Infinity II フレキシブルポンプは、組成範囲0から100%の仕様です。有機溶媒の割合が低い場合の両ポンプの性能を評価するために、リテンションタイムの精度を8回の連続分析から算出しました(表9)。

両ポンプは、リテンションタイムの精度に関して、優れた性能を示しました。溶出が早い2つの化合物、スルファニルアミドとスルファチアゾールについては、1260 Infinity II フレキシブルポンプが1260 Infinity II バイナリポンプよりも優れた性能を示しました。

表8. ポリフェノール化合物の分析におけるリテンションタイム (RT) の精度。8回の連続分析から算出しました。

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ				
	カテキン	カフェイン酸	エピカテキン	エピガロカテキン
平均 RT (分)	2.019	2.372	3.979	4.426
標準偏差 RT	0.0018	0.0015	0.0042	0.0036
RSD RT	0.087	0.061	0.106	0.081
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ				
平均 RT (分)	2.348	2.710	4.927	5.491
標準偏差 RT	0.0035	0.0023	0.0032	0.0033
RSD RT	0.151	0.085	0.066	0.060

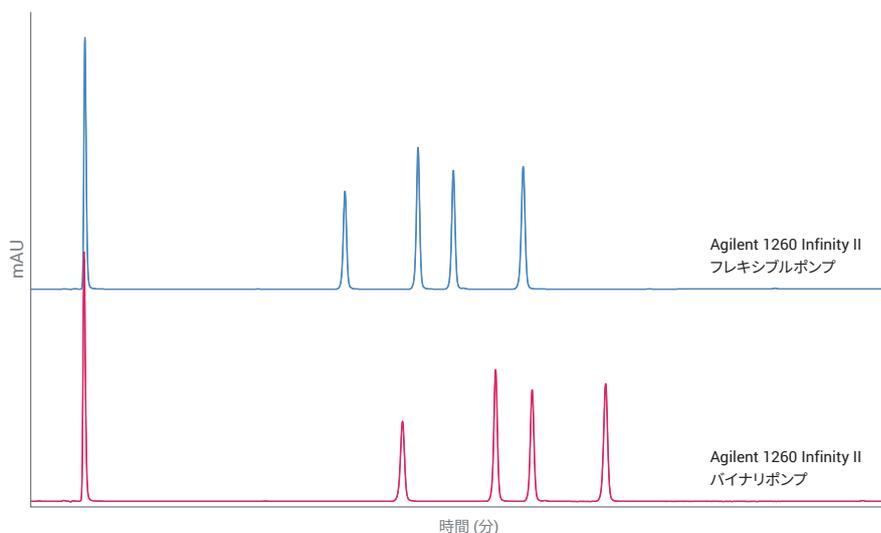


図4. 低い有機溶媒割合でのサルファ剤の分析。溶出順序: スルファニルアミド、スルファチアゾール、スルファメラジン、スルファクロピリダジン、スルファメタジン

#### 実験 4: 有機溶媒の割合が高い場合のリテンションタイム精度

この実験では、スタンレッド 1、2、3、4 を有機溶媒 90 ~ 100 % のグラジエントを用いて分析しました (図 5 および 表 10)。その結果、1260 Infinity II フレキシブルポンプはこの種のアプリケーションに最適で、1260 Infinity II バイナリポンプよりも性能が優れていることが示されました。

表 9. サルファ剤の分析におけるリテンションタイムの精度

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ					
	スルファニルアミド	スルファチアゾール	スルファメラジン	スルファクロロピリダジン	スルファメタジン
平均 RT (分)	0.505	2.926	3.607	3.935	4.586
標準偏差 RT	0.0005	0.0009	0.0012	0.0013	0.0005
RSD RT	0.092	0.032	0.033	0.033	0.010
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ					
平均 RT (分)	0.499	3.468	4.331	4.671	5.355
標準偏差 RT	0.0009	0.0044	0.0022	0.0022	0.0024
RSD RT	0.174	0.127	0.050	0.047	0.045

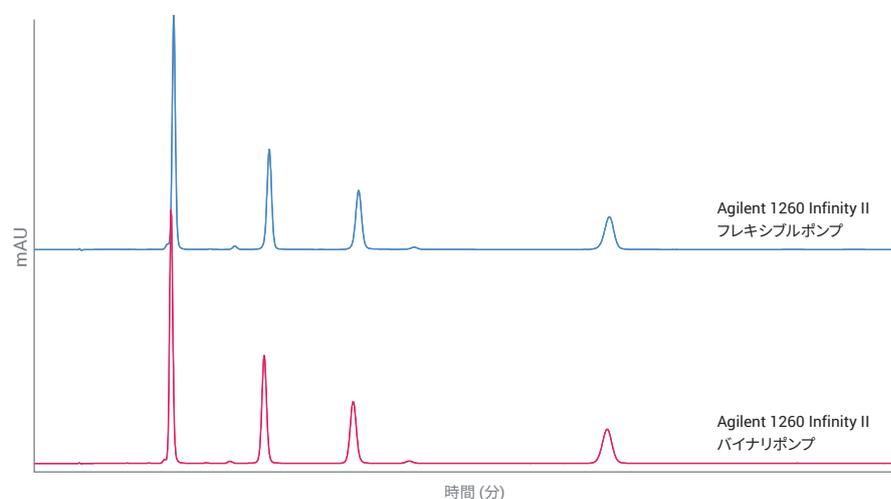


図 5. 高い有機溶媒割合でのスタンレッド化合物の混合物の分析。  
溶出順序: スタンレッド 1、スタンレッド 2、スタンレッド 3、スタンレッド 4

表 10. スタンレッド化合物の分析におけるリテンションタイムの精度。8 回の連続分析から算出しました。

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ				
	スタン I	スタン II	スタン III	スタン IV
平均 RT (分)	0.643	1.085	1.497	2.656
標準偏差 RT	0.0004	0.0008	0.0007	0.0014
RSD RT	0.055	0.070	0.047	0.053
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ				
平均 RT (分)	0.630	1.058	1.468	2.640
標準偏差 RT	0.0009	0.0018	0.0027	0.0044
RSD RT	0.147	0.173	0.187	0.166

## 実験 5: 高速分析におけるリテンション タイム精度

分析時間を短縮するために、2 mL/min という高流量にしました。グラジエント時間を 1 分間に設定し、有機溶媒を 30 ~ 100 % にしました (図 6)。1260 Infinity II バイナリポンプは、標準構成と低ディレイボリューム構成で検討しました。低ディレイボリューム構成では、ダンパとミキサをバイパスしました。1260 Infinity II フレキシブルポンプは、ミキサを取り付けた状態と取り付けていない状態で検討しました。すべての機器構成の圧力は約 54 MPa でした。

1260 Infinity II バイナリポンプの低ディレイボリューム構成が最も短い分析時間で、次に短かったのは 1260 Infinity II フレキシブルポンプの標準構成で分析した場合でした。

高速のクロマトグラフィー分析のリテンションタイムの精度 (表 11) を実証するために、3 つの代表的なピークを選択しました。この厳しい条件下でも、両ポンプおよび対応する機器構成でのリテンションタイムの精度が優れている (< 0.09 %RSD) が示されました。

続いての実験では、流量を 2 mL/min から 2.6 mL/min に上げました。システム圧力は約 75 MPa となりました。この実験では、1260 Infinity II フレキシブルポンプの標準構成のみを使用しました。これは、1260 Infinity II フレキシブルポンプの動作圧力上限が 80 MPa であるのに対し、1260 Infinity II バイナリポンプの上限は 60 MPa であるためです。

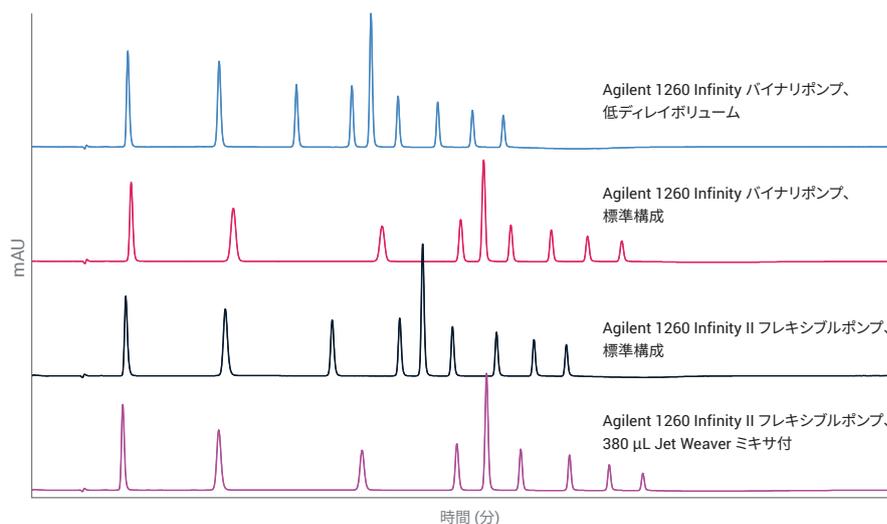


図 6. 流量を上げた RRLC チェックアウトサンプルの分析

表 11. RRLC チェックアウトサンプルの分析におけるリテンションタイムの精度。  
3 つの代表的なピークを選択しました。8 回の連続分析から算出しました。

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ、標準構成			
	ピーク 3	ピーク 6	ピーク 8
平均値	0.697	0.977	1.166
標準偏差	0.0004	0.0005	0.0005
RSD	0.051	0.047	0.040
Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ、380 µL Jet Weaver ミキサ付			
平均値	0.766	1.135	1.341
標準偏差	0.0005	0.0004	0.0000
RSD	0.060	0.031	0.003
Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ、標準構成			
平均値	0.813	1.112	1.290
標準偏差	0.0005	0.0005	0.0006
RSD	0.066	0.048	0.050
Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ、低ディレイボリューム			
平均値	0.614	0.850	1.023
標準偏差	0.0005	0.0006	0.0005
RSD	0.084	0.074	0.047

流量を 2.6 mL/min まで上げることにより、グラジエント時間は 1 分から 0.77 分に短縮できました (図 7)。すべてのピークが 1 分以内に溶出され、リテンションタイムの精度も優れており、仕様の 0.15 %RSD を下回りました。最後に溶出された化合物は、流量 2 mL/min の 1260 Infinity II バイナリポンプの低ディレイボリュームシステム構成 (1.095 分) よりも、1260 Infinity II フレキシブルポンプにおいて早く溶出されました (0.967 分)。

## 結論

Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプは、複数の困難な LC アプリケーションにおいて、リテンションタイムの精度に関して優れた性能を発揮しました。適用したステップグラジエントにより、1260 Infinity II フレキシブルポンプと Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプの優れた組成精度とミキシングノイズが示されました。両ポンプの実際の流量を測定し、モニタリングしたところ、流量真度は常に 0.3 % 未満でした。

システムディレイボリュームは、1260 Infinity II フレキシブルポンプで約 310  $\mu$ L、380  $\mu$ L Jet Weaver ミキサを付けた場合で 460  $\mu$ L でした。1260 Infinity II バイナリポンプでは、システムディレイボリュームは 610  $\mu$ L まで増加します。

この技術概要では、両ポンプの優れた性能を実証しました。さらに、1260 Infinity II フレキシブルポンプは、バイナリポンプの利点である困難なアプリケーションにおいても優れた結果を示しました。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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. 2018  
Printed in Japan, March 1, 2018  
5991-9031JAJP

化合物	平均 RT (分)	RSD RT (%)
1.アセトアニリド	0.171	0.103
2.アセトフェノン	0.351	0.071
3.プロピオフェノン	0.546	0.037
4.ブチロフェノン	0.668	0.021
5.バレロフェノン	0.710	0.019
6.ヘキサノフェノン	0.763	0.025
7.ヘプタノフェノン	0.842	0.025
8.オクタノフェノン	0.909	0.024
9.ベンゾフェノン	0.967	0.024

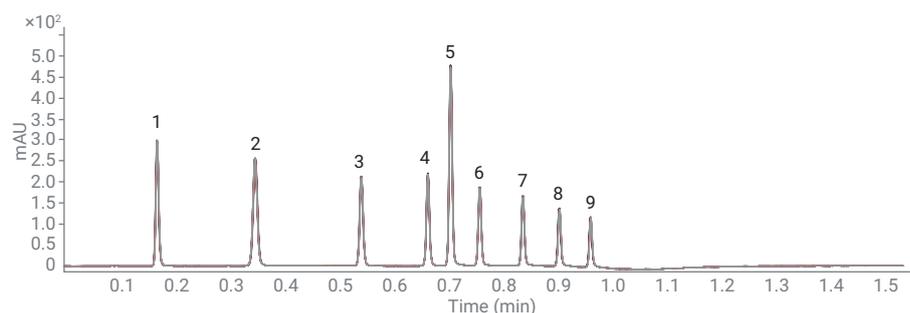


図 7. 背圧 75 MPa、流量 2.6 mL/min での 8 回のクロマトグラムの重ね表示