

Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラの 性能特性

はじめに

HPLC オートサンプラモジュールに使用される一般的なサンプル導入原理はフロースルー注入です (図 1 A)。この注入モードにより、サンプルを吸引している間、計量デバイス、ループ、ニードルがバイパス位置に切り替わります。注入ステップの間、流路が切り替わり、サンプルがカラムに注入されます。反対に、アジレントの Feed 注入では、オートサンプラのサンプリング部は独立しており、内部容量の変更なく、ポンプフローは常にカラムに接続されます (図 1B)。インジェクションバルブを切り替えることで、加圧されたサンプルは、カラムへのフローストリームに直接注入されます。このモードは、サンプル希釈液の影響を緩和し、高速グラジエントが可能な極めて低いディレイボリュームを実現します。Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラでは、内蔵の専用バルブにより、両方の注入モードを使用できます。

著者

Haiko Herschbach and
Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

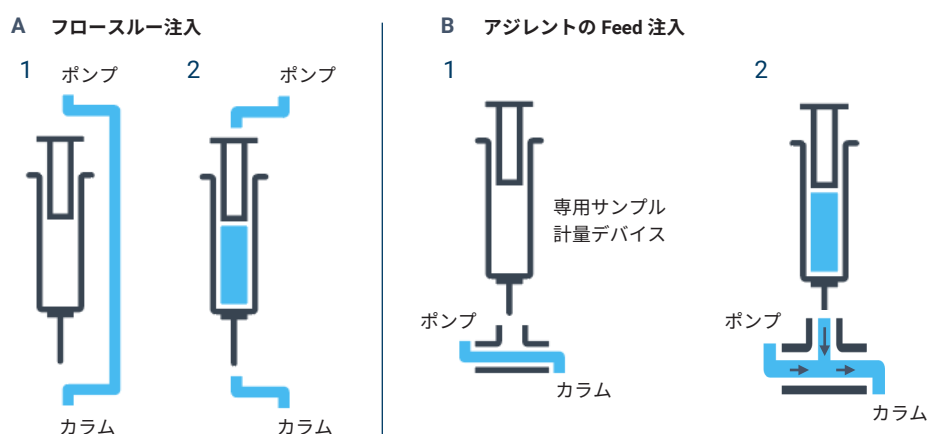


図 1. フロースルー注入およびアジレントの Feed 注入モードの原理の概略図

この技術概要では、新しい Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラで実行可能な、複数の LC 注入モード、フロースルー注入 (FT)、アジレントの Feed 注入 (FI) の性能について説明します。高精度のピーク面積とリテンションタイム、優れた直線性、最小限のキャリアオーバーにより、高い信頼性のデータが得られます。

実験

装置構成

- Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラ (G7167C)
- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) と Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (部品番号 G4212-60008)、またはキャリアオーバーの測定のために、Agilent Max-Light カートリッジセル、60 mm (部品番号 G4212-60007)

機器の設定

1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラは、標準のマルチサンプラのように、モジュール型 LC ユニットとして作られています。ソフトウェアユーザーインターフェースで、2つの注入モード、フロースルー注入と Feed 注入を簡単に切り替えることが可能です (図 2)。1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラは、ポンプフローに対し注入速度を適応させることで、注入フローを調整できます。つまり、HPLC ポンプの制御により、カラム付近の流量が常に一定に保たれます。フラッシュアウト容量は自動で計算され、手動で設定することも可能です。注入量とフラッシュアウト容量の合計は、71 μL 未満でなければなりません。

測定条件

すべての測定条件は、対応の結果とともに、「結果と考察」セクションに概説されています。

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.7

カラム

- Agilent ZORBAX RR StableBond C18、3.0 \times 100 mm、3.5 μm (部品番号 861954-302)
- Agilent Pursuit XRs C18、2.0 \times 50 mm、3 μm (部品番号 A6001050X020)

試薬

- カフェイン
- クロルヘキシジン

サンプル

- アジレントのイソクラティック標準 (部品番号 01080-68704)

溶媒と試薬

すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。試薬はドイツの VWR 社から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral 純水装置で精製しました。

その他

- パイアル、スクリュートップ、透明、認定、2 mL (部品番号 5182-0714)
- スクリューキャップ、青、認定、スリット入り PTFE/シリコンセプタム (部品番号 5185-5865)
- スクリューキャップ、圧着、青、PFTE/赤シリコンセプタム (部品番号 5190-7024)

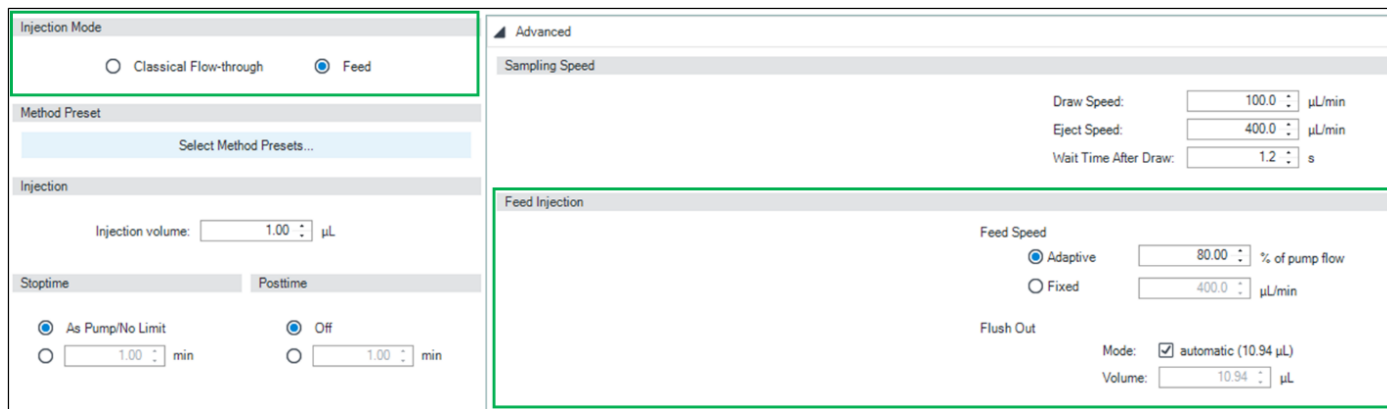


図 2. Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラのソフトウェアユーザーインターフェース

結果と考察

ピーク面積精度

表 1. 面積精度を測定するためのメソッド設定

モジュール	パラメータ	情報
ポンプ	移動相	水：アセトニトリル (85:15)、事前混合 (v:v)
	グラジエント	イソクラティック、事前混合 (v:v)、チャンネル A:B、50 %
	流量	1 mL/min
	フローランプ アップ/ダウン	100 mL/min ²
	ストップタイム	2.0 分
カラムコン パートメント	温度	30 °C
	カラム	Agilent ZORBAX RR StableBond C18、 3.0 × 100 mm、3.5 μm (部品番号 861954-302)
サンブラ	温度	室温
	吸引/排出スピード	100/100 μL/min
	吸引後待ち時間	1.2 秒
	ニードル外側の洗浄： 時間/溶媒	3 秒/水
	ニードル内側の洗浄： 時間/溶媒	オフ
	フィード速度	分析ポンプ流量の 80 % (フロースルー注入は非該当)
	フラッシュアウト： 容量/溶媒	自動/15 % アセトニトリル水溶液 (フロースルー注入は非該当)
	動作モード	アジレントの Feed 注入/フロースルー注入
	注入量	表 2 を参照
	UV 検出器	検出
	ピーク幅	> 0.025 分 (0.5 秒のレスポンスタイム)、10 Hz

表 2. 面積精度を測定するために使用した希釈。サンプル前処理：カフェイン原液：300 mg カフェイン + 100 mL 希釈液。希釈液：2 % アセトニトリル水溶液

希釈係数	前処理	濃度 (mg/mL)	注入量 (μL)
NA	原液、希釈なし	3	0.1
2	5 mL 原液 + 10 mL 希釈液	1.5	0.2
5	5 mL 原液 + 25 mL 希釈液	0.6	0.5
10	5 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.3	1
20	2.5 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.15	2
50	1 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.06	5
100	0.5 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.03	10
200	0.25 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.015	20
400	0.25 mL 原液 + 100 mL 希釈液	0.0075	40
1,000	0.1 mL 原液 + 100 mL 希釈液	0.003	100

Feed 注入モードとフロースルー注入モードでのピーク面積精度を測定するために、モデル化合物としてカフェインを使用し、イソクラティッククロマトグラフィー手法 (表 1) により測定しました。Feed 注入では、ポンプ流量の 80 % のフィード速度を適用し、フラッシュアウト容量は自動的に設定しました。フロースルー注入では、吸引スピードと待ち時間の一般的なデフォルト条件を適用しました。同等のピーク面積を得るために、適用注入量 (Feed 注入では 0.1 ~ 40 μL、フロースルー注入では 0.1 ~ 100 μL) は希釈率に反比例するように保ちました (表 2)。

Feed 注入モードでは、ピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は、100 nL および 200 nL の各最小注入量に対し、3.7 ~ 2.3 % です。0.5 μL と 1.0 μL に対し、RSD は 0.67 % と 0.55 % です。標準偏差はそれぞれ 4.0 nL、5.0 nL、3.0 nL、5.0 nL です。注入量が増加すると、ピーク面積 RSD は概して 0.15 % 未満となります (図 3)。それに対し、フロースルーモードでの測定から得られたピーク面積 RSD は同等です。

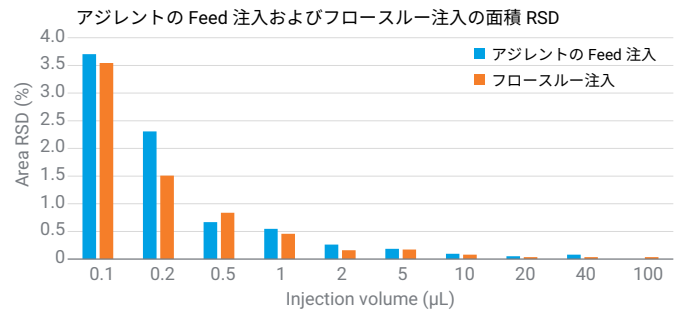


図 3. 0.1 ~ 40 μL のアジレントの Feed 注入と、0.1 ~ 100 μL のフロースルー注入のピーク面積 RSD

注入の直線性

1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラの注入の直線性を測定するために、1:100 と 1:1,000 の希釈率により前述のカフェイン原液の 2 つの希釈液を調製しました (表 3)。これらの溶液を Feed 注入とフロースルー注入により注入しました。最大 20 μL の少ない注入量で、濃度の高い方の溶液を使用し (レベル 1)、Feed 注入モードでは最大 40 μL 、フロースルー注入モードでは最大 100 μL のより多い注入量で、濃度の低い方の溶液を使用しました (レベル 2)。

Feed 注入モードとフロースルー注入モードの両レベルで得られた注入の直線性は、0.9999 以上の直線性相関を示しています (図 4)。

表 3. アジレントの Feed 注入とフロースルー注入モードで注入の直線性を測定するための希釈液。サンプル前処理：希釈液：2% アセトニトリル水溶液。カフェイン原液：300 mg カフェイン + 100 mL 希釈液。注入量：フロースルー：レベル 1: 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μL 。レベル 2：10、20、50、70、100 μL 。Feed 注入：レベル 1：0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μL 。レベル 2：5、10、15、20、40 μL

希釈係数	前処理	濃度 (mg/mL)	注入量 (μL)
100	0.5 mL 原液 + 50 mL 希釈液	0.03	レベル 1
1,000	0.1 mL 原液 + 100 mL 希釈液	0.003	レベル 2

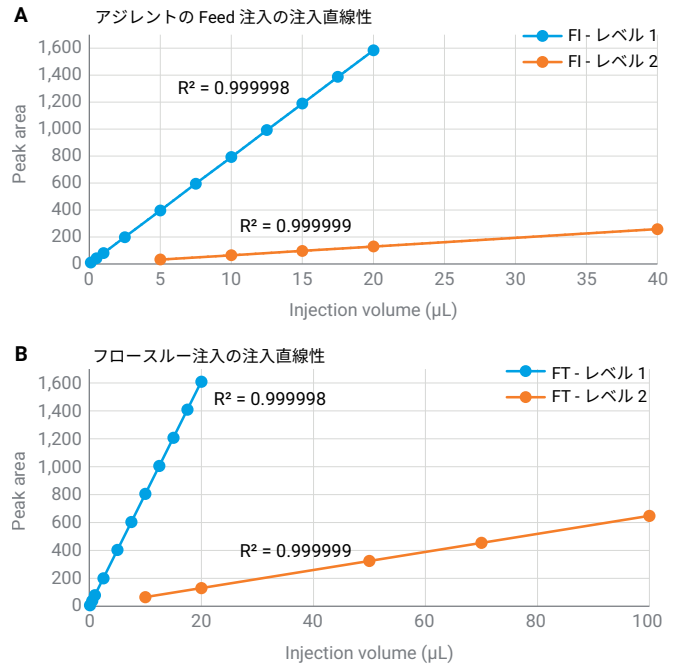


図 4. 注入量範囲全体におけるアジレントの Feed 注入モード (A) およびフロースルー注入モード (B) の注入の直線性。

リテンションタイム精度

リテンションタイム RSD を測定するために、4 種類の化合物を含むアジレントのイソクラティック標準 (部品番号 01080-68704) を使用しました (図 5)。約 17 分以内に化合物を分離するために、イソクラティックメソッドを適用しました (表 4)。Feed 注入プロセス中のポンプフローの変動に伴うフィード速度範囲におけるリテンションタイムの安定性を証明するために、リテンションタイム RSD 値は、ポンプ流量の 20 % および 80 % のフィード速度に対して測定しました (「実験 - 機器設定」を参照)。ポンプ流量の 20 % および 80 % のフィード速度により Feed 注入で得られたすべてのリテンションタイム RSD 値は 0.01 % 未満でした (表 5)。

表 4. リテンションタイム精度を測定するためのメソッド。サンプル前処理：さらに希釈することなくアジレントのイソクラティック標準 (部品番号 01080-68704) を使用し、サンプルバイアルに直接移しました。

モジュール	パラメータ	情報
ポンプ	移動相	水：アセトニトリル (50:50) + 0.1 % TFA、事前混合 (v:v)
	グラジエント	イソクラティック、事前混合 (v:v)、チャンネル A:B、50 %
	流量	1 mL/min
	ストップタイム	20 分
カラムコンパートメント	温度	30 °C
	カラム	Agilent ZORBAX RR StableBond C18、3.0 × 100 mm、3.5 μm (部品番号 861954-302)
サンブラ	温度	室温
	吸引/排出スピード	100/100 μL/min
	吸引後待ち時間	1.2 秒
	ニードル外側の洗浄：時間/溶媒	3 秒/移動相
	ニードル内側の洗浄：時間/溶媒	オフ
	フィード速度	ポンプ流量の 20 % および 80 %
	フラッシュアウト：容量/溶媒	自動/移動相
	動作モード	アジレントの Feed 注入
注入量	1 μL	
UV 検出器	検出	Sig = 254、4 nm、Ref = 360、100 nm
	ピーク幅	> 0.025 分 (0.5 秒のレスポンスタイム)、10 Hz

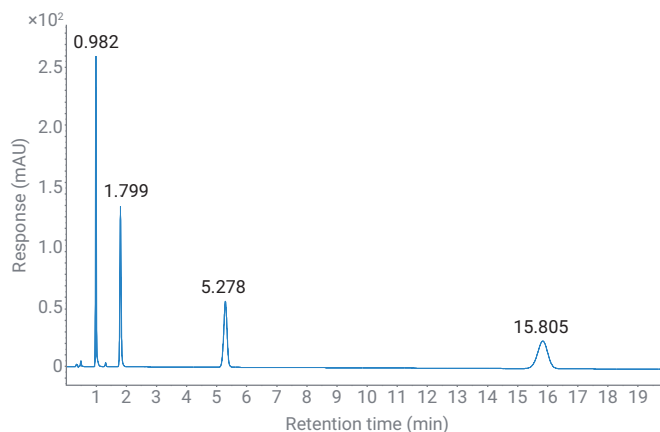


図 5. 80 % フィード速度での表 4 のメソッドを用いた、アジレントのイソクラティック標準 (部品番号 01080-68704) に含まれる 4 種類の化合物の分離。

表 5. 2 つの異なるフィード速度 (n = 10) で 4 種類の化合物に対し得られたリテンションタイム精度

フィード速度：ポンプ流量の 80 %			
ピーク	RT (分)	SD	RSD (%)
1	0.982	0.00044	<0.01
2	1.799	0.00134	<0.01
3	5.278	0.00507	<0.01
4	15.805	0.02136	<0.01
フィード速度：ポンプ流量の 20 %			
ピーク	RT (分)	SD	RSD (%)
1	0.991	0.00058	<0.01
2	1.806	0.00078	<0.01
3	5.276	0.00128	<0.01
4	15.763	0.00448	<0.01

キャリアオーバー

1回のサンプル注入から次の注入まで、注入システムによってサンプル間でサンプル量を移送することが可能です。この機器に関連するキャリアオーバーの一般的な値を求めるために、高濃度の粘着性のモデル化合物クロルヘキシジンを注入し、ブランク溶媒を注入しました。キャリアオーバーは、さらに希釈したリファレンス溶液に関して計算しました（図6）。クロルヘキシジンの測定はFeed注入とフロースルー注入モードでイソクラティックメソッドを用いて行いました（表6）。

Feed注入とフロースルー注入の試験の設定として、8種類の溶媒ブランクを注入して機器が清浄であることを確保した後、クロルヘキシジンリファレンス溶液2を3回注入しました。次の注入には高濃度のクロルヘキシジンリファレンス溶液1を含めました。最後に、ブランク溶液を3回注入してキャリアオーバーの量を測定しました（表7）。

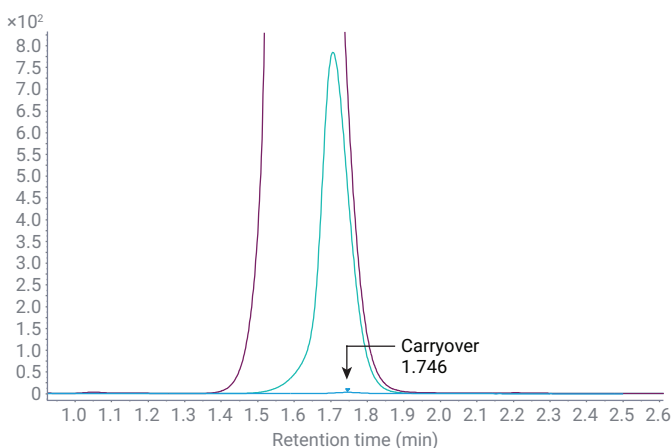


図6. キャリーオーバーの測定。高濃度リファレンス溶液1の注入（紫）、リファレンス溶液2の注入（緑）、高濃度注入後のブランク溶液の注入で得られた1.746分におけるキャリアオーバー（青）の重ね表示

表6. アジレントのFeed注入モードおよびフロースルー注入モードでキャリアオーバーを測定するためのイソクラティックメソッド

モジュール	パラメータ	情報
ポンプ	移動相	水：アセトニトリル（69:31）+ 0.1 % TFA、事前混合（v:v）
	グラジエント	イソクラティック、事前混合（v:v）、チャンネルA/B、50 %
	流量	0.5 mL/min
	ストップタイム	ブランクは2.5分、リファレンスは12分
カラムコンパートメント	温度	30 °C
	カラム	Agilent Pursuit XRs C18、2.0 × 50 mm、3 μm（部品番号A6001050X020）
サンブラ	温度	室温
	吸引/排出スピード	100/100 μL/min
	吸引後待ち時間	1.2 秒
	ニードル外側の洗浄：時間/溶媒	3 秒、50 % アセトニトリル水溶液 + 0.1 % TFA
	ニードル内側の洗浄：容量/溶媒	1) 250 μL/50 % アセトニトリル水溶液+ 0.1 % TFA 2) 250 μL/移動相
	シート洗浄：容量/溶媒	1) 250 μL/50 % アセトニトリル水溶液 + 0.1 % TFA 2) 250 μL/移動相
	フィード速度	分析ポンプ流量の80 %（フロースルー注入は非該当）
	フラッシュアウト：容量/溶媒	自動/移動相（フロースルー注入は非該当）
	動作モード	アジレントのFeed注入/フロースルー注入、表7を参照
	注入量	1 μL
UV検出器	検出	Sig = 257、4 nm、Ref = 360、16 nm
	ピーク幅	> 0.025 分（0.5 秒のレスポンスタイム）、10 Hz

表7. アジレントのFeed注入モードとフロースルー注入モードでキャリアオーバーを測定するための実験ワークフロー。リファレンス1：1.2 mg/mLクロルヘキシジン水溶液 + 0.1 % TFA。リファレンス2：リファレンス1をブランク溶液で1:10に希釈。ブランク溶液：水 + 0.1 % TFA

ステップ	試験ステップの説明	注入シーケンス
1	前処理	ブランク：8回注入 リファレンス2：3回注入
2	アジレントのFeed注入モードおよびフロースルー注入モード	リファレンス1：1回注入 ブランク：3回注入

キャリアオーバーは、ブランク注入とリファレンス注入における残留クロルヘキシジンのピーク面積比を使用して評価し、ppm で示されます。

キャリアオーバー [ppm] = ブランク/リファレンス 2 平均値におけるクロルヘキシジンのピーク面積 × 100.000

両方の注入モードのキャリアオーバーを測定するために、前述の実験を 10 回繰り返しました。フロースルー注入モードから得られたキャリアオーバーは、概して 1~3 ppm でした。Feed 注入モードから得られたキャリアオーバーは、概して 4~8 ppm でした (図 7)。両方の結果は良好な範囲に収まり、問題のある化合物に対して最小限のキャリアオーバーが確保されています。

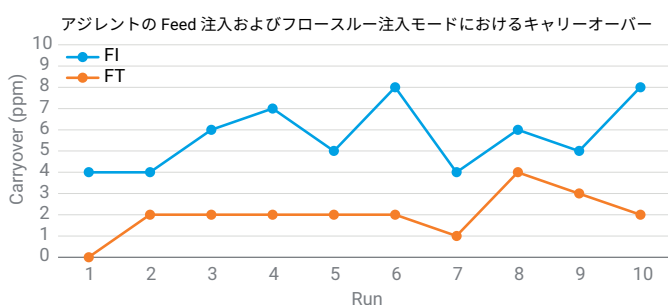


図 7. 10 回の繰り返し実験からの、アジレントの Feed 注入モードおよびフロースルー注入モードでのキャリアオーバー測定の結果

結論

この技術概要では、Feed 注入モードと従来のフロースルー注入モードでの Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラの性能特性について説明しました。アジレントの Feed 注入モードでの注入の面積精度の結果は、大容量注入でほぼ 0.15 % RSD 未満で、小容量注入の 20 nL の標準偏差よりも低くなりました。注入の直線性は常に 0.99990 を上回りました。ポンプ流量の 20 % および 80 % の Feed 注入に対するリテンションタイム精度は 0.01 % RSD 未満でした。キャリアオーバーは 4~8 ppm と測定されました。得られた性能により、複数の分野での定量アプリケーションに対する 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラの利便性が確認されています。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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いません。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。

DE20340753

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, May 9, 2023

5994-5952JAJP