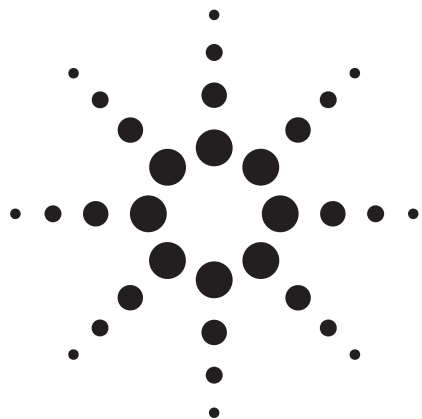




Agilent マルチモード注入口 (MMI) による 検出限界の改善

アプリケーションノート

全産業分野

著者

Bill Wilson and Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

本アプリケーションノートでは、マルチモード注入口で使用可能なホットスプリットレス、コールドスプリットレス、および溶媒ベントモードの3つの注入方法について解説します。コールドスプリットレスや溶媒ベントモードの注入を使用すると、大容量注入 (LVI) により、検出限界を下げる事が可能です。2 μL のホットスプリットレス、10 μL のコールドスプリットレス、および 25 μL の溶媒ベントモードを使用した 40 ppb の農薬標準試料のトータルイオンクロマトグラムを重ね描きした結果、LVI を使用すると S/N 比が改善されることが分かりました。



Agilent Technologies

はじめに

既存の分析方法の改善を目指し、大容量注入 (LVI) 技術を模索する分析者が増えています。キャピラリガスクロマトグラフィにおける従来の液体注入法では、ほとんどの注入口やカラムでは 1 度に 1 ~ 2 μL しか処理することができません。注入量を増やすと、分析対象物のピークに広がりやゆがみが生じ、溶媒ピークのテーリングが大きくなり、検出器の飽和や損傷の原因となります。

通常、注入量を増やす目的は、微量分析での検出限界を改善するためです。システムへ注入するサンプル量を増やすと、検出器に到達する分析対象物の量がそれに比例して増えるので、ピーク面積とピーク高さが大きくなります。ベースラインノイズが一定の場合、ピーク高さが大きくなると、S/N 比が向上し、システムの検出限界が下がります。LVI を使用すると、あらかじめ処理するサンプルの量を減らすことができるメリットがあります。10 ~ 100 倍の量の処理対象サンプルを注入し、注入口で濃縮することにより、10 ~ 100 倍少ないサンプル量でサンプル調整を開始しつつ、これまでと同じ量の分析対象物をカラムに入れることが可能です。LVI (溶媒ベント) を使用するもう 1 つのメリットは、実際に検出器に到達する溶媒の量を減らせることです。通常、実際にカラムに入り検出器に到達する溶媒の量は、わずか 10 ~ 30 % です。

LVI は、数マイクロリットルから最大 1 mL 以上の範囲の注入量に適用できます。ほとんどの LVI の手法では、分析対象物を分離カラムに移すまでに、サンプル溶媒が蒸発し注入口システムから排出されます。このように、LVI は溶媒の窒素エバポレーションやロータリーエバポレーションと似ており、排気フードではなく GC 注入口で実行できる利点があります。窒素エバポレーションでは失われる可能性のある分析対象物でも、注入口に残るので、LVI により確実に分析できます。さらに、LVI 処理は自動化でき、再現可能です。他のエバポレーション技術と同じように、LVI の方法は、溶媒の種類、注入口温度、気化溶媒のベントフロー、および分析対象物の沸点により、その機能が左右されます。その上、蒸発時の注入口圧力と注入口ライナが、溶媒の除去と分析対象物回収率の速度に影響を与えます。これらのパラメータについても、本アプリケーションノートで解説します。

実験

MMI 操作モード

Agilent マルチモード注入口 (MMI) では、標準のスプリット/スプリットレス注入口と同じライナと消耗品を使用できるので、既存のホットスプリットメソッドやホットスプリットレスメソッドと互換性があります。その操作モードには、ホットスプリット/スプリットレス (パルスドモードも含む)、コールドスプリット/スプリットレス (パルスドモードも含む)、溶媒ベントおよびダイレクトモードがあります。

ホットスプリットレス (注入量 1 ~ 3 μL 用)

LVI を検討中の分析者の多くが現在使用しているメソッドは、ホットスプリットレス注入です。このサンプル導入技術は実証済みで信頼性があり、ほぼ 40 年間成果を上げています。ただし、サンプルの完全性とメソッド開発に関わる課題もあります。第一に、溶媒と分析対象物が瞬時に気化して、発生した蒸気がカラムに移送されるように、注入口を十分に加熱する必要があります。注入口ライナには、この蒸気を収容するのに十分なボリュームが必要です。ライナボリュームが小さすぎると、気化したサンプルがライナから溢れ出て活性な面に達し、分析対象物が失われる可能性があります。さらに、気化したサンプルにより生じた圧力波が、入ってくるキャリアガスを押し戻し、繊細な圧力/流量制御部に入る可能性があります。Agilent の圧力/流量計算ツール [1] による実験では、240 $^{\circ}\text{C}$ で 14.5 psig の場合、注入口に 1 μL のアセトンを注入すると、288 μL のガスに膨張します。標準のスプリット/スプリットレス注入口用の注入口ライナの多くは、公称体積が 1 mL です。このような条件で、注入量をわずか 3.5 μL に増加させると、1 mL の蒸気が発生し、注入口ライナから簡単に溢れ出る恐れがあります。

また、ホットスプリットレス注入では、分析対象物が熱的に不安定または変化しやすい場合、扱いが困難になります。有機塩素系農薬 DDT およびエンドリンなどの化合物は、再配列して分解化合物を形成することがあります。これらの物質は通常分析に使用する注入口温度でも、このプロセスは加速されます。効果的にライナを化学不活性化すると、分析対象物の分解を最小限に抑制できます。ただし、注入口温度が高いと、不活性化されたライナの寿命が短くなります。

ホットスプリットレス注入のもう 1 つの課題は、ニードルでの分留や分析対象物のディスクリミネーションの可能性です。ニードルがセプタムに接するため、サンプルがシリンジから注入口へ移動するにつれて、ニードル温度が上昇します。ニードル温度が上昇すると、溶媒が「沸騰」して蒸発するため、沸騰した分析対象物がニードル内に蒸着します。このような分離の問題を避けるため、溶媒プラグを最初にシリンジに吸引しておき、次に必要なサンプル量を吸引する分析者もいます (7693A オートサンブラで利用可能)。これは、溶媒プラグにより付着物を注入口へ押し流すというアイデアです。この問題を効果的に解決する方法として、高速注入があります。この方法では、ニードルがセプタムに接す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。以上のような問題があるにも関わらず、ホットスプリットレス注入は、よく用いられる技術です。コールドスプリットレスなどの他の技術では、このような懸念を回避できるので、分析結果を改善できます。

コールドスプリットレス (注入量 1 ～ 10 µL 用)

MMI では、多用途向けに温度をプログラム制御可能であり、コールドスプリット分析およびコールドスプリットレス分析が可能です。コールドスプリットレスモードでは、MMI は、サンプル溶媒の標準沸点より低い温度に冷却されるので、サンプルを注入する際に、気化は起こりません。注入操作は、単純に液体をシリンジから注入口に移すだけです。シリンジが注入口から取り出されると、注入口が加熱されて、サンプルが気化しカラムに移動します。溶媒が最初に気化しカラムに移動するので、標準のホットスプリットレス注入と同じように分析対象物のフォーカシングが起きます。続いて、分析対象物が気化しカラムに移動します。大きな利点は、一定の高温ではなく最低限の注入口温度で分析対象物を気化できることです。これにより、熱による劣化を最小限に抑えながら、さまざまな分析対象物を気化できます。コールドスプリットレスの操作では、ホットスプリットレスほど激しい熱ストレスをライナにかけないので、ライナの使用寿命が延びます。コールドスプリットレスでは、場合によっては注入可能なサンプル量も増やせます。低速の注入口温度プログラムを使用すると、溶媒はゆっくりと気化するので、ライナボリュームから溢れ出ることがありません。カラム上で分析対象物をリフォーカスできる限り、低速の注入口温度プログラムがクロマトグラフィに悪影響を与えることはありません。

溶媒ベント (注入量 5 ～ 1000 µL 用)

溶媒ベントモードは、MMI で 5 µL を超える LVI を実現するメソッドです。溶媒ベントモードでは、サンプル注入の間、注入口温度が開始時の低温に保たれます。気体によって、注入口は注入口圧力の低いスプリットモードになります。注入口ライナを通りベントに抜けるガスの流れにより、蒸発した溶媒を排出します。サンプルをゆっくりと注入するので、入ってくる液体はライナの壁面に凝着し、溶媒は同じような速度で蒸発します。サンプルをすべて注入すると、注入口はスプリットレスモードに切り替わり、分析対象物の移動に備えます。注入口が加熱され、濃縮されたサンプルと残りの溶媒が気化し、その蒸気がカラムに移動します。サンプルの移動が完了するのに十分な時間が経過した後、注入口はパージモードに切り替わり、注入口ライナに残っている物質が排出されます。サンプル注入と溶媒の大気解放の間、GC オープンは適切な温度に保たれており、溶媒によりカラム上で分析対象物をリフォーカスできます。このリフォーカシングが完了したら、分離を実行するためにオープンプログラムを開始します。

LVI メソッド開発

MMI 上で LVI メソッドを効率的に開発するには、まず既存のメソッドを実行し、少量のサンプル注入に対するピーク面積を把握します。この結果を、LVI メソッドの性能を評価するベースラインとして利用します。次のステップでは、注入量を少し増やし (たとえば、2 ～ 5 倍に) 溶媒ベントモードに切り替えます。得られたピーク面積を比較し、注入量の増加を考慮すると、分析対象物の回収率を計算でき、条件をさらに最適化できます。

バックフラッシュ

あとから溶出する物質を取り除くための従来の焼き出し操作は、複雑なマトリックスを持つサンプルの場合、分析時間と同程度の時間がかかる場合があります。キャピラリー・フロー・デバイス (ここでは Purged Ultimate Union) にはバックフラッシュ [2、3] の機能があります。「バックフラッシュ」という用語は、カラム内のサンプル化合物をカラムの端から注入口に押し戻すカラム内の逆向きの流れを意味します。分析対象化合物がすべて溶出した直後にカラムの流れが逆になると、長時間かかる残留物の焼き出しが不要になります。そのため、カラムブリードとゴーストピークが最小化されるので、カラムが長持ちし、MS のイオン源をクリーニングする頻度が少なくて済みます。スプリットベントトラップは、通常よりも頻繁に交換する必要がある可能性があります。

機器条件

GC	Agilent 7890A
MS	Agilent 5975C MSD
カラム	HP-5MS UI、15 m × 0.25 mm × 0.25 µm (19091S-431UI)、注入口からパージ付きユニオンまで
MMI	コンスタントプレッシャー (～ 18 psi)、クロロピリホスメチル RT 8.297 min に固定、バックフラッシュのポストラン時は 2 psi
MMI ライナ	不活性処理済みダブルテーパー、ヘリックス (部品番号 5188-5398)
セプタムパージ	3 mL/min
パージ付きユニオン	4 psi。バックフラッシュのポストラン時は 70 psi
リストリクタ	0.7 m × 0.15 mm 不活性処理済みフューズドシリカチューブ (パージ付きユニオンから MSD まで)
シリンジ	10 µL、スプリットレス注入用 (5181-3354) 50 µL、溶媒ベントモード用 (5183-0318)
ALS	Agilent 7693A
MS パラメータ	
溶媒ディレイ	2.5 分
ゲインファクタ	1
質量範囲	44–550
スレッシュホールド	0
サンプル	2
チューニングファイル	atune.u

オープン

初期温度	70 °C
初期ホールド時間	1 分
速度 1	50 °C/min
温度 1	150 °C
ホールド時間	0 分
速度 2	6 °C/min
温度 2	200 °C
ホールド時間	0 分
速度 3	16 °C/min
温度 3	280 °C
ホールド時間	5 分
合計分析時間	20.933 分
ポストラン	5 min (バックフラッシュ用)
オープンポストラン温度	280 °C

サンプル:アセトン中の 40 ppb の農業標準試料 (化合物の一覧は、図 5 を参照)。

マルチモード注入口 (MMI)

パラメータ	ホット スプリットレス	コールド スプリットレス	溶媒ベント
初期温度	280 °C	30 °C	35 °C
初期時間	–	0.01 分	0.35 分
速度 1	–	700 C/min	700 °C/min
最終温度	–	320 °C	320 °C
ベントフロー	–	–	150 mL/min
ベント圧力	–	–	5 psig
ベント時間	–	–	0.33 min (計算ツール より、図 3)
バージ時間	0.75 分	1.25 分	1.5 分
バージ流量	50 mL/min	50 mL/min	50 mL/min
注入量	2 µL	10 µL	25 µL
注入速度	高速 –	高速 –	75 µL/min (計算ツール より、図 3)
クライオ	–	オン (液体 CO2)	オン (液体 CO2)
クライオフォルト検出	–	オン	オン
クライオ使用温度	–	125 °C	125 °C
タイムアウト検出	–	オン (15 分)	オン (15 分)

25 µL の溶媒ベント注入に対するパラメータは、ChemStation に入っている Solvent Elimination Calculator で決定しました。この計算ツールは、LVI メソッドの適切な開始条件の決定に役立つように作られています。MMI が PTV 溶媒ベントモードの場合、図 1 のように、追加ボタンが注入口画面に表示されます。

Solvent Elimination Calculator の最初の画面で (図 2)、サンプル溶媒と必要な注入量を入力します。この計算ツールは、どのようなシリッジが設定されているか識別でき、一度に注入できる量をシリンジボリュームの 50 % に制限します。もっと多い注入量を計算ツールに指定できますが、その注入量はメソッドにダウンロードできません。また、最初に溶出する分析対象物の沸点を計算ツールに入力する必要があります。これにより、初期注入口温度が設定されます。沸点が不明の場合、広範囲の分析対象物に適用可能な 150 °C のままにしておきます。

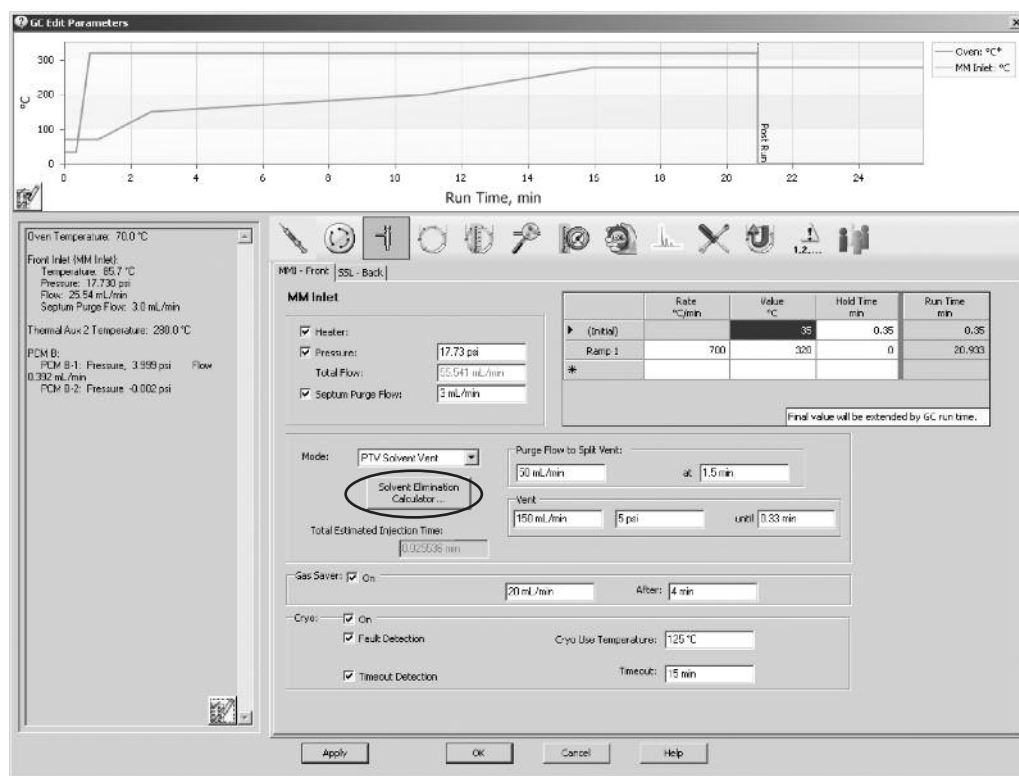


図 1. マルチモード注入口の「Solvent Elimination Calculator」。ChemStation に内蔵されており、メソッドを簡単に開発できます。

The screenshot shows the 'Solvent Elimination Calculator' wizard. The main window contains a 'Welcome' message and a form for inputting solvent and injection parameters. The 'Solvent' dropdown is set to 'acetone', the 'Injection Volume' is '25 uL', and the 'Boiling Point' is '150 °C'. The 'Next' button is highlighted, indicating the user should proceed to the next step.

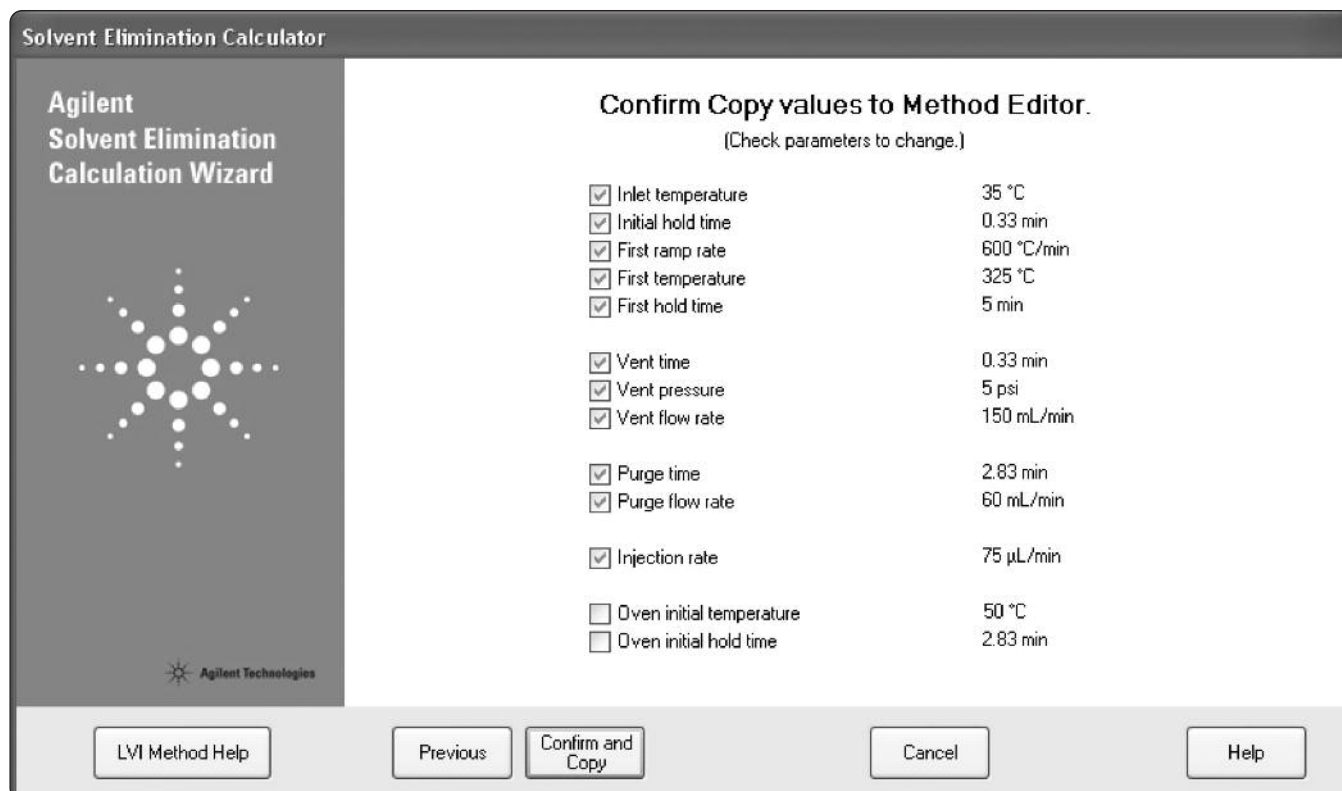
図 2. 溶媒を選択し、注入量を入力してから、計算を開始します。

図 3 は、計算画面を示しています。計算ツールは、基礎理論 [4] に基づいて溶媒の排出速度を決定します。この「Elimination Rate (排出速度)」には、LVI 固有のその他のファクター (たとえば、溶媒の蒸発による局所冷却) を考慮していないため、実際の経験から決定した速度よりも通常速くなります。「Suggested Injection Rate (推奨注入速度)」では、これらのファクターが考慮されていて、ベント終了時に少量の溶媒をライナに残すように設計されています。この溶媒は、より揮発性の大きい分析対象物に対する液体「トラップ」の役割をし、分析対象物の回収率を向上させます。「Suggested Vent Time (推奨ベント時間)」は、注入量を「Suggested Injection Rate (推奨注入速度)」で割った値です。

このウィンドウ内の下側部分で、排出速度を決定するさまざまな変数を設定します。注入口温度を少し変えるだけで、排出速度が大きく影響を受けます。ベントフローの変化には比例関係があり、ベントフローが 2 倍減少すると、排出速度も同じ割合減少します。ベント圧力が減少すると、排出速度は増加します。ベント圧力は、ベント中にカラムに到達する溶媒の量にも影響を与える点に注意が必要です。ベント圧力が大きいほど、分析対象物が移動する前に、より多くの溶媒がカラムに入ります。最後に、溶媒のタイプ、特にその沸点は排出速度に大きく影響します。

図 3. 選択した注入口温度とベントフローに基づいて、計算ツールが注入速度とベント時間を計算します。

図 4 の画面にはパラメータ編集画面にダウンロードされるメソッドの変更点がすべて表示されます。チェックボックスを使用して、各パラメータを許可する (チェックあり) か許可しないかを設定します。オープンの初期温度およびホールド時間については、現在のメソッドでこれらの値を変更してはいけない場合があるので (たとえば、リテンションタイムロッキングメソッドの場合)、自動的にチェックされません。



Solvent Elimination Calculator

Agilent Solvent Elimination Calculation Wizard

Confirm Copy values to Method Editor.
(Check parameters to change.)

☒ Inlet temperature	35 °C
☒ Initial hold time	0.33 min
☒ First ramp rate	600 °C/min
☒ First temperature	325 °C
☒ First hold time	5 min
☒ Vent time	0.33 min
☒ Vent pressure	5 psi
☒ Vent flow rate	150 mL/min
☒ Purge time	2.83 min
☒ Purge flow rate	60 mL/min
☒ Injection rate	75 µL/min
☐ Oven initial temperature	50 °C
☐ Oven initial hold time	2.83 min

図 4. 計算ツールが推奨する値を確認し、ChemStation にダウンロードします。

結果と考察

図 5 では、3 つの注入モードにおける 40 ppb の標準溶液のレスポンスを比較しています。

一番下のトータルイオンクロマトグラム (TIC) は、標準的な 2 μ L のホットスプリットレス注入の場合です。40 ppb の農薬の一部がほとんど見えません (カラムにそれぞれ 80 pg)。真ん中の TIC は、10 μ L

のコールドスプリットレス注入の場合です。MMI の開始温度は 30 $^{\circ}$ C でした。この TIC では、カラムへの各分析対象物の量は 400 pg です。最後に、一番上の TIC は、MMI の開始温度が 35 $^{\circ}$ C で、25 μ L の溶媒ベント注入の場合です。「はじめに」のセクションで述べたように、この TIC では、ホットスプリットレス注入の TIC (一番下) に比べ S/N 比が著しく改善されています。注入量は 25 μ L ですが、ピーク形状と分離能が維持されています。これは、注入中に溶媒がほとんど排出されたことを示しています。

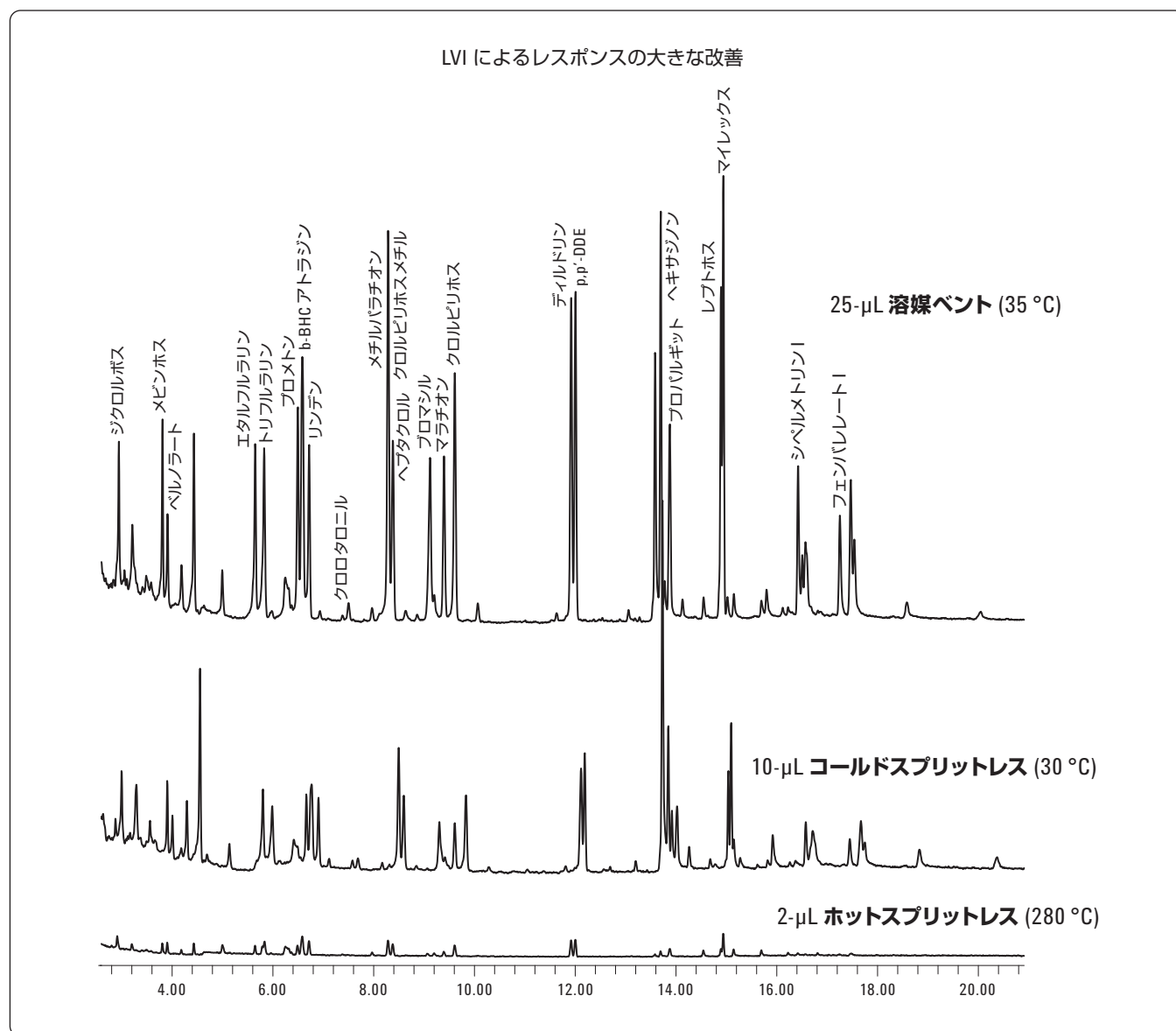


図 5. 3 つの注入モードで得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) の重ね描き (すべて同じスケールでプロット)

結論

新しい Agilent マルチモード注入口 (MMI) は、既存のスプリット/スプリットレス注入口とフォームファクターが同じであり、同じ消耗品 (たとえば、ライナ、O-リング、セプタム) を使用できるので、既存のホットスプリットレスメソッドを再現できます。さらに、温度をプログラム制御できるので、コールドスプリットレスと大容量注入 (LVI) のどちらのメソッドでも検出限界を改善できます。内蔵された Solvent Elimination Calculator により、初期条件を完全に設定可能であり、LVI メソッドを簡単に開発できます。アプリケーションの結果から、25 μ L の溶媒ベント注入では、2 μ L のホットスプリットレス注入と比較して S/N 比が大きく改善する (検出限界が下がる) ことが分かりました。

参考文献

1. 機器ユーティリティ DVD に同梱のアジレントの圧力/流量計算ツール。各ガスクロマトグラフおよび MMI アクセサリキットにて提供。
2. Chin-Kai Meng, 「バックフラッシュによる生産性の向上とカラム寿命の延長」, 5989-6018JAJ, December 2006.
3. Matthew Klee, 「Agilent 6890 GC ポストランコマンドを使用したシンプルなバックフラッシュ」, 5989-5111JAJ, June 2006.
4. J. Stanieski and J. Rijks, Journal of Chromatography 623 (1992) 105-113.

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
June 18, 2009
5990-4169JAJP



Agilent Technologies