

AGILENT 7696A サンプル前処理ワークベンチ アプリケーション集

一貫性、精度、安全性に優れた
サンプル前処理を実現

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

目次



本書に含まれるアプリケーションノート内の語句を検索するには、下の検索ボタンをクリックすると、Acrobat の検索ウィンドウが開きます。

🔍 検索

サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

はじめに.....	4
■ エネルギーと化学.....	6
■ エネルギーと化学関連のアプリケーションノート.....	7
Agilent 7696A ワークベンチを用いた複雑なマルチ ステップサンプル前処理の自動化.....	8
Agilent 7696A ワークベンチを用いたサンプル 前処理の自動化.....	18
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた ジェット燃料中 FAME 汚染物質の GC/MS 分析.....	20
メソッド EN14105:2011 を使用したバイオディ ーゼル GC 分析に対応する Agilent 7696A サ ンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処 理の自動化.....	32
■ 環境.....	42
■ 環境関連のアプリケーションノート.....	43
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ を用いた鉱油分析のための自動クリーンアップ.....	44
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用 いた廃油中 PCB 抽出物の自動精製.....	50
Agilent J&W DB-35ms ウルトライナートカラムと DB-XLB カラムを用いた GC/ μ ECD による水サンプ ル中塩素系殺虫剤および除草剤のサブ μ g/L 分析.....	56
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベン チを用いた EPA メソッド 8270 の分析品質 保証 (AOA) 基準の作成.....	68
GC/MS/MS によるエストロンの分析.....	72

(続く)

目次



本書に含まれるアプリケーションノート内の語句を検索するには、下の検索ボタンをクリックすると、Acrobat の検索ウィンドウが開きます。

🔍 検索

サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

agilent.com/chem/jp

■ 食品試験.....	78
■ 食品試験関連のアプリケーションノート.....	79
哺乳瓶から溶出するビスフェノール A の分析.....	80
菓子類に含まれる着色料の分析.....	92
自動サンプル前処理を使用したサケ油中の 脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定.....	104
Agilent 1260 Infinity LC を使用したステビア葉中の ステビオシドおよびレバウジオシド A の定量.....	108
自動サンプル前処理によるオリーブオイル中の 脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定.....	112
■ 医薬品.....	120
■ 医薬品関連のアプリケーションノート.....	121
点眼薬の品質管理におけるサンプル前処 理の自動化.....	122
■ 分析一般.....	130
■ 分析一般のアプリケーションノート.....	131
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベン チによる連続希釈の前処理自動化：水 素炎イオン化検出器の性能評価に使用す るサンプルセットの作成.....	132
アジレントサンプル前処理ワークベン チを使用した QC テストの自動化.....	136
バッチモードによるサンプル前処理ワー クベンチの機能向上.....	138
■ クイックリファレンスガイド.....	142



より確実なサンプル前処理と標準試料作成のために

手動によるサンプル前処理は手間がかかり、一貫性に欠ける可能性があります。時間のかかる再分析や消耗品の無駄、さらにプロトコルや規制要件の規定通りにサンプルの前処理が行われないことで、長期的なリスクが発生するおそれがあります。

スタンドアロン型サンプル前処理装置である Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、このような前処理の問題解決に貢献します。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、エラーが発生しやすいサンプル前処理ワークフローを自動化します。高精度の自動化機能を直感的なソフトウェアと組み合わせることで、一貫性のあるサンプル処理が保証され、分析者間の変動が排除されます。研究者は、より重要なタスクに注力することができます。

また、7696A サンプル前処理ワークベンチは、無駄を削減し、誤った手順が引き起こす再分析を防ぎ、コスト削減に貢献します。さらに、ほとんどのドラフト内に設置できるため、有害化合物に対する曝露を最小限に抑えることができます。

(続く)

詳細情報

クリックすると次の内容を表示できます。

- ▶ [7696A サンプル前処理ワークベンチの Web ページ](#)
- ▶ [7696A サンプル前処理ワークベンチのカタログ](#)
- ▶ [7696A オンラインカリキュレータ](#)

ポスター

- ▶ [メソッド EN14105:2011 を使用したバイオディーゼル GC 分析に対応するサンプル前処理の自動化](#)
- ▶ [自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上](#)

ビデオ

- ▶ [7696A サンプル前処理ワークベンチ: 紹介ビデオ](#)
- ▶ [7696A ワークベンチに関するお客様の声: Research Institute of Chromatography](#)
- ▶ [7696A ワークベンチに関するお客様の声: Institute of Food Safety & Health](#)

機能拡張により、面倒なサンプル前処理の簡略化が可能に

計量、希釈、誘導体生成などに伴う誤差を防止する新たな自動化技術により、7696A サンプル前処理ワークベンチの機能がさらに高まりました。

- **WeighStation:**

GC または LC バイアルに正確な量（小数点以下 5 桁まで）の原料を直接計量できる高精度計量ステーションです。ASTM および EN 石油化学分析標準に適合しています。

- **LC バイアルラック :**

オートサンプリャにバイアルを直接配置でき、バイアルの配置および転写エラーを排除します。

- **希釈ウィザード :**

メソッド開発を迅速にし、マウスのクリックを最小限に抑え、検量線やその他の連続希釈用の標準を自動的に生成します。

本書の内容

本書では、さまざまな分析分野、サンプルの種類、前処理手法における、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの使用例を紹介します。次のような役立つヒントや手法もあわせて紹介します。

- 非常に少ないサンプル量での精度の維持
- 分析者間の変動誤差の最小化
- コストを押し上げる再分析の必要性の軽減
- 健康および安全上のリスクの軽減
- 重量測定法による真度、精度、再現性の向上
- GC および LC 用サンプル前処理のためのデータセキュリティとトレーサビリティの確保



サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。
詳しくはホームページをご覧ください。

agilent.com/chem/jp



エネルギーと化学

揮発性・不揮発性サンプル
(ガソリンから重油まで)の
高精度計量および希釈を保
証

高精度のサンプル前処理により、最終結果の誤差は最小限に抑えられます。自動化することで、常に高い精度が得られます。次のアプリケーションでは、バイオディーゼル分析において、サンプルの希釈、誘導体化等の手間のかかる作業を、ワークベンチを使うと簡単に自動化できることを説明します。

[目次に戻る](#)

[アプリケーションノートを見る](#)

エネルギーと化学



サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

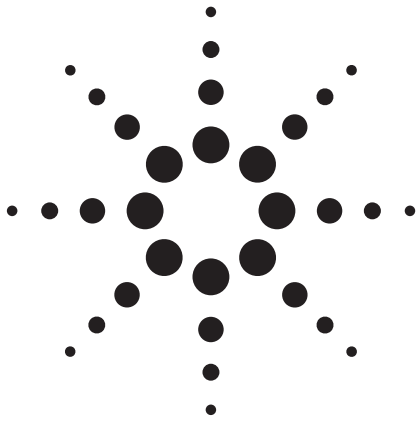
agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

Agilent 7696A ワークベンチを用いた複雑なマルチステップサンプル前処理の自動化.....	8
Agilent 7696A ワークベンチを用いたサンプル前処理の自動化.....	18
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いたジェット燃料中 FAME 汚染物質の GC/MS 分析.....	20
メソッド EN14105:2011 を使用したバイオディーゼル GC 分析に対応する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理の自動化.....	32

[目次に戻る](#)

[アプリケーション分野の紹介に戻る](#)



Agilent 7696A ワークベンチを用いた 複雑なマルチステップサンプル前処理 の自動化

アプリケーションノート

バイオ燃料・代替エネルギー

著者

James D. McCurry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、マルチステップのサンプル前処理を自動化しました。ワークベンチの性能を実証するテスト例として、ASTM メソッド D6584 を選択しました。このメソッドでは、ガスクロマトグラフィー分析の前に、不揮発性汚染物質の複雑な誘導体化が求められます。このワークベンチを用いて、複数の種類のバイオディーゼルと、ターゲット化合物の定量に用いるキャリブレーション標準を前処理しました。ワークベンチを用いたサンプル前処理の結果は、手作業での前処理で得られた結果とほぼ同じでした。また、その分析精度はきわめて高く、業界で定められた仕様内に十分に収まりました。ワークベンチをさらにテストするために、複数の化学者グループに、バイオディーゼルサンプル用の自動サンプル前処理メソッドを実行してもらいました。このテストでも、各グループで得られた分析結果はほぼ同じで、分析精度はきわめて高くなりました。



Agilent Technologies

はじめに

化学分析のサンプル前処理には、溶媒を添加するだけの簡単なケースもあれば、その後の機器測定を向上させるために化学反応を生じさせるような複雑なケースもあります。サンプル前処理はあらゆる化学測定に不可欠な要素ですが、この作業を心待ちにしている化学者はほとんどいません。複雑で退屈なうえに、有害な化学薬品を扱わなければならないケースなら、なおさらです。そのため、手作業によるサンプル前処理は、多くのミスや精度低下の原因となることがあります。ミスを減らして精度を高めるために、手作業によるサンプル前処理では、多くの場合、大容量の化学物質や高価な計測用ガラス容器を用いて、ハンドリングや分注、計量を簡便にしています。

手作業による前処理が難しいメソッドの例として、ASTM メソッド D6584 が挙げられます。このメソッドでは、B100 バイオディーゼルに含まれる遊離グリセリンと総グリセリンを測定し、製品品質が良好であることを確かめます [1]。バイオディーゼルに含まれる各種のグリセリンは不揮発性なので、ガスクロマトグラフィー (GC) では測定できません。メソッド D6584 には、そうした化合物をトリメチルシリル化試薬により誘導体化し、GC で分析できるようにするためのサンプル前処理プロトコルが記載されています。このサンプル前処理手順は複雑で、時間がかかるうえに、きわめて不快なおいを持つ毒性溶媒のピリジンを使用します。そのため、このサンプル前処理手法は、バイオディーゼルの扱う化学者の間では嫌がられています。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、自動サンプル前処理のために設計されたスタンドアロン型の機器です [2,3]。このワークベンチでは、2 台の 7693A 注入タワーに取り付けられたシ

リンジを用いて、液体を計量して 2 mL バイアルへ分注します。各種の化学リソース、標準、サンプルの入ったバイアルは、3 つの 50 ポジショントレイに設置されます。サンプルトレイコンパートメントには、バイアルを動かすロボットアーム、ボルテックス混合ステーション、サンプル加熱ステーションが備わっています。

7696A ワークベンチ手順の設計

ASTM D6584 の前処理手順は、表 1 に示す 6 つのステップですべて説明できます。手作業で行う場合、この前処理では、大量の標準、試薬、溶媒、使い捨てガラス容器を消費します。Agilent ワークベンチでは、小さい 2 mL バイアルを使用するため、この前処理手順を 10 分の 1 にスケールダウンすることが可能です。また、このワークベンチでは、2 つのシリンジを用いて液体を分注するため、使い捨てガラス容器に伴う費用も排除されます。表 1 には、ワークベンチを用いた場合に、各ステップが 2 mL バイアルに合わせてどのようにスケールダウンされるかも示しています。

ワークベンチを用いたサンプル前処理手順の構築に先立ち、まず必要な化学リソースと、ワークベンチトレイにおける各リソースのポジションを決定しました。表 2 には、各リソースとそれぞれのトレイポジション、各リソースの分注に用いたピペッティングシリンジのパラメータを示しています。ワークベンチソフトウェアでは、図 1 に示すように、サンプルトレイのリソースを上から見た図も表示されます。この例では、トレイポジション 1~10 にある 10 のサンプルと、各サンプルとともに使用する 10 の n-ヘプタンリソースを示しています。n-ヘプタンバイアルは、トレイポジション 101~110 に配置されています。

表 1. ASTM メソッド D6584 では、6 ステップの誘導体化によりバイオディーゼル中のグリセリンを誘導体化し、高温 GC 分析に対応できるようにサンプルを前処理します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでは 2 mL バイアルを使用するため、手作業でのサンプル前処理を 10:1 にスケールダウンする必要があります。

ステップ	15 mL バイアルを用いた手作業でのサンプル前処理	10:1 スケールダウン → 2 mL バイアルを用いたワークベンチのサンプル前処理
1	B100 100 mg をテフロン製スクリューキャップを備えた 15 mL バイアルに添加	B100 10 mg をテフロン製スクリューキャップを備えた 2 mL バイアルに添加
2	ISTD1 溶液 (ブタントリオール) 100 µL をバイアルに添加	ISTD1 溶液 (ブタントリオール) 10 µL をバイアルに添加
3	ISTD2 溶液 (トリカブリン) 100 µL をバイアルに添加	ISTD2 溶液 (トリカブリン) 10 µL をバイアルに添加
4	誘導体化試薬 (MSTFA) 100 µL をバイアルに添加し混合	誘導体化試薬 (MSTFA) 10 µL をバイアルに添加し混合
5	室温で 15 分間反応	室温で 15 分間反応
6	n-ヘプタン 8 mL をバイアルに添加し混合	n-ヘプタン 800 µL をバイアルに添加し混合

表 2. バイオディーゼル中のグリセリンの誘導体化を完了させるためには、4つの化学リソースが必要です。各リソースとトレイポジション、シリンジパラメータはワークベンチソフトウェアで設定します。記載のシリンジ吸引スピードを用いて、各リソースをシリンジにロードします。記載のシリンジ分注スピードを用いて、各リソースを2 mL サンプルバイアルに分注します。

化学リソース	トレイ ポジション	シリンジ サイズ (μL)	シリンジ吸引 スピード (μL/min)	シリンジ排出 スピード (μL/min)
ISTD1 (ビリジン中 1000 μg/mL ブタントリオール)	51	100	250	500
ISTD2 (ビリジン中 8000 μg/mL トリカプリン)	52	100	250	500
MSTFA 誘導体化試薬	53	100	250	500
n-ヘプタン	101-110	250	500	2000

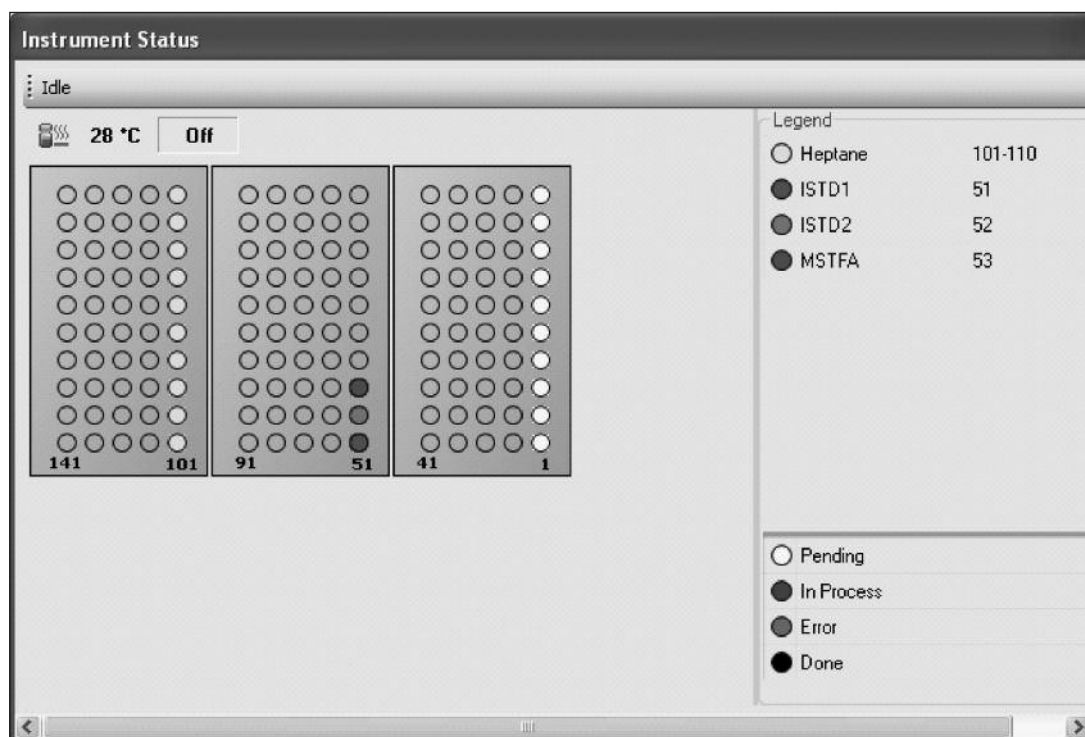


図 1. ワークベンチソフトウェアでは、サンプルトレイの各化学リソースを上から見た図が表示されます。この例では、化学リソースのほかに、トレイポジション 1~10 に 10 のサンプルが配置されています。

ワークベンチには化学天秤がないため、サンプルの計量はできません。バイオディーゼル 10 mg を計量するのはきわめて難しいため、エッペンドルフリファレンス容量調節ピペット (10~100 μL) を用いてサンプルを分注しました。バイオディーゼル 10 mg の計量にあたっては、手作業でピペットを用いて、バイオディーゼル 11.4 μL を風袋引きした 2 mL バイアルに移し、0.1 mg にもっとも近くなる重量を記録しました。

手作業によるサンプル前処理ワークフローを再現するために、表 2 に示した各ステップについてワークベンチメソッドを作成しました。たとえば、ADD_ISTD1.M と呼ばれるメソッドにより、

第 1 の内標準溶液 (ISTD1) をすべてのサンプルに添加してから、ADD_ISTD2.M メソッドを用いて第 2 の内標準溶液 (ISTD2) を添加しました。このアプローチなら、シリンジを溶媒で洗浄するのは、別のリソースに切り替えたあとだけで済みます。これにより、必要な洗浄溶媒の量が大幅に減少し、洗浄溶媒を補充せずに多くのサンプルを前処理することが可能になります。シリンジ洗浄ステップを含むワークベンチサンプル前処理手順を表 3 に示しています。図 2 に示すように、ワークベンチのシーケンスキューにより各メソッドを実行すれば、サンプル前処理が完了します。

表 3. サンプル前処理プロトコルの各ステップと各ステップの実行に必要なワークベンチメソッド

ステップ	バイオディーゼル前処理プロトコル	メソッド名	備考
1	ISTD1 溶液 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加	ADD_ISTD1.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
2	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
3	ISTD2 溶液 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加	ADD_ISTD2.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
4	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
5	MSTFA 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加し混合	ADD_MSTFA.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
6	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
7	室温で 15 分間反応	Reaction.M	すべてのサンプルで 15 分の待機時間 1 回を使用
8	n-ヘプタン 800 µL をすべてのサンプルバイアルに添加し混合	ADD_Heptane.M	フロントタワーの 250-µL シリンジを使用

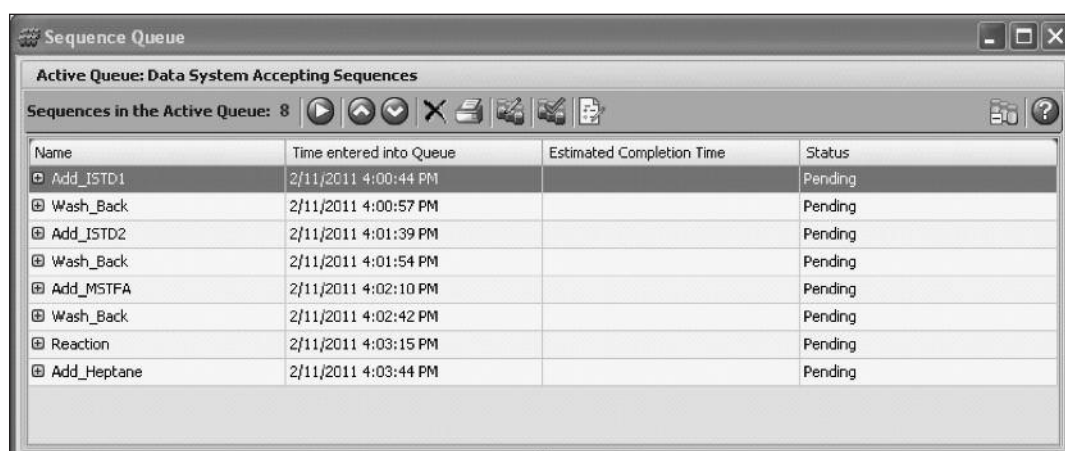


図 2. 表 3 に示すワークベンチメソッドの実行に使用するワークベンチシーケンスキュー

実験方法

ASTM D6584 の実行に対応するように Agilent 7890A GC を構成しました。構成の概要を表 4 に示しています。バイオディーゼルサンプルおよび標準の分析に用いた GC 条件を表 5 に示しています。

GC キャリブレーション用標準の作成

ASTM D6584 では、サンプルに用いるのと同じ前処理手順で、5 つのキャリブレーション用標準を誘導体化することも求められています。標準の GC 分析で得られた検量線の直線性を評価してから、サンプルを分析しました。キャリブレーション用標準の前処理は、サンプルと同じプロトコルを用いて、手作業とワークベンチの両方で行いました。手作業で前処理したバイオディーゼルサンプルの定量には、手作業の前処理で得られた検量線を使用しました。ワークベンチで前処理したサンプルの定量には、ワークベンチで前処理した標準により得られた検量線を使用しました。

手作業によるサンプル前処理とワークベンチによるサンプル前処理の比較

多くのユーザーが考える最初の疑問は、「スケールダウンしたワークベンチサンプル前処理で、手作業のサンプル前処理と同じ結果が得られるのか？」という点でしょう。その疑問に答えるために、手作業の ASTM プロトコルとワークベンチを用いて、2 種類のバイオディーゼルサンプルを前処理しました。第 1 のバイオディーゼルサンプルは、小規模な地元製造業者のもので、原材料にキャノーラ油を使用しました。第 2 のサンプルは全国規模の製造業者のもので、原材料に大豆油を使用しました。手作業とワークベンチのいずれのプロトコルについても、各バイオディーゼルサンプルを 2 回繰り返して前処理および分析し、ASTM メソッドに従って繰り返し精度 (単一ユーザー精度) を評価しました。

マルチユーザー精度 - 再現性

マルチユーザー精度を評価するために、4人の化学者に大豆バイオディーゼルサンプル、キャリブレーション用標準、表2に示す化学リソースおよびワークベンチを提供しました。各化学者に表3に記載したサンプル前処理手順のリストを提供し、ワークベンチプロトコルを開発および使用するように依頼しました。それぞれが開発したワークベンチ前処理プロトコルを用いて、大豆バイオディーゼルサンプルを2回繰り返して前処理したのち、GC分析を実施しました。

表 4. ASTM メソッドによるサンプル分析に用いたガスクロマトグラフィー機器構成

標準 Agilent 7890A GC ハードウェア

G3440A	Agilent 7890A シリーズ GC
オプション 122	EPC コントロール搭載クールオンカラム注入口
オプション 211	EPC コントロール搭載キャピラリー FID
G4513A	Agilent 7693A ALS

カラム

分析カラム	Select Biodiesel for Glycerides (バイオディーゼルのグリセリド分析用カラム) 15 m x 0.32mm id x 0.1 μm フィルム (p/n cp9078)
-------	--

データシステム	Agilent Multi-Technique Chemstation
---------	-------------------------------------

消耗品

5181-1267	10 μL テフロン製固定オートインジェクタシリンジ
-----------	----------------------------

標準および試薬

5190-1408	バイオディーゼル D6584 キャリブレーション用標準キット
5190-1407	バイオディーゼル MSTFA キット 試薬グレードの n-ヘプタン

表 5. ASTM メソッド D6584 の GC 機器条件

クールオンカラム注入口

初期温度	50 °C
温度プログラム	オーブントラックモード
カラム流量	ヘリウム、3 mL/min 定流量モード
カラム温度	
初期	50 °C で 1 分間
スピード 1	15 °C/min で 180 °C まで、0 分間保持
スピード 2	7 °C/min で 230 °C まで、0 分間保持
スピード 3	30 °C/min で 380 °C まで、10 分間保持
水素炎イオン化検出器	380 °C

結果

GC キャリブレーション用標準の作成

グリセリン、モノオレイン、ジオレイン、トリオレインの5レベル検量線を図3に示しています。この検量線の作成に用いた5つの標準の前処理には、Agilent ワークベンチを使用しました。グリセリンの検量線を用いて、バイオディーゼルサンプルに含まれる遊離グリセリンを定量しました。サンプル中のモノグリセリドの定量にはモノオレインの検量線を用い、ジグリセリドにはジオレインの検量線を用い、トリグリセリドにはトリオレインの検量線を使用しました。同じキャリブレーション用標準を手作業でも前処理し、それを用いて検量線を作成しました。表6では、手作業のサンプル前処理とワークベンチのサンプル前処理をおこなった4つの化合物すべてについて、検量線と比較しています。手作業のサンプル前処理とワークベンチのサンプル前処理では、ほぼ同じ検量線が得られました。また、ワークベンチによるサンプル前処理の相関係数 (r^2) は、0.99 以上という ASTM の仕様を上回りました。

表 6. 手作業およびワークベンチによるサンプル前処理で得られた検量線は、各化合物の傾きと切片の値が示しているように、一致性がきわめて高くなりました。いずれの前処理メソッドも、0.99 以上という ASTM の相関係数値 (r^2) 要件を満たしています。

化合物	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ		
	傾き	y 切片	r^2	傾き	y 切片	r^2
グリセリン	1.0433	0.0028	0.9997	1.1027	0.0049	0.9995
モノオレイン	1.3446	-0.0171	0.9997	1.3786	0.0044	1.0000
ジオレイン	1.2176	-0.0010	0.9999	1.2086	-0.0014	0.9999
トリオレイン	0.8303	-0.0018	0.9965	0.8703	0.0030	1.0000

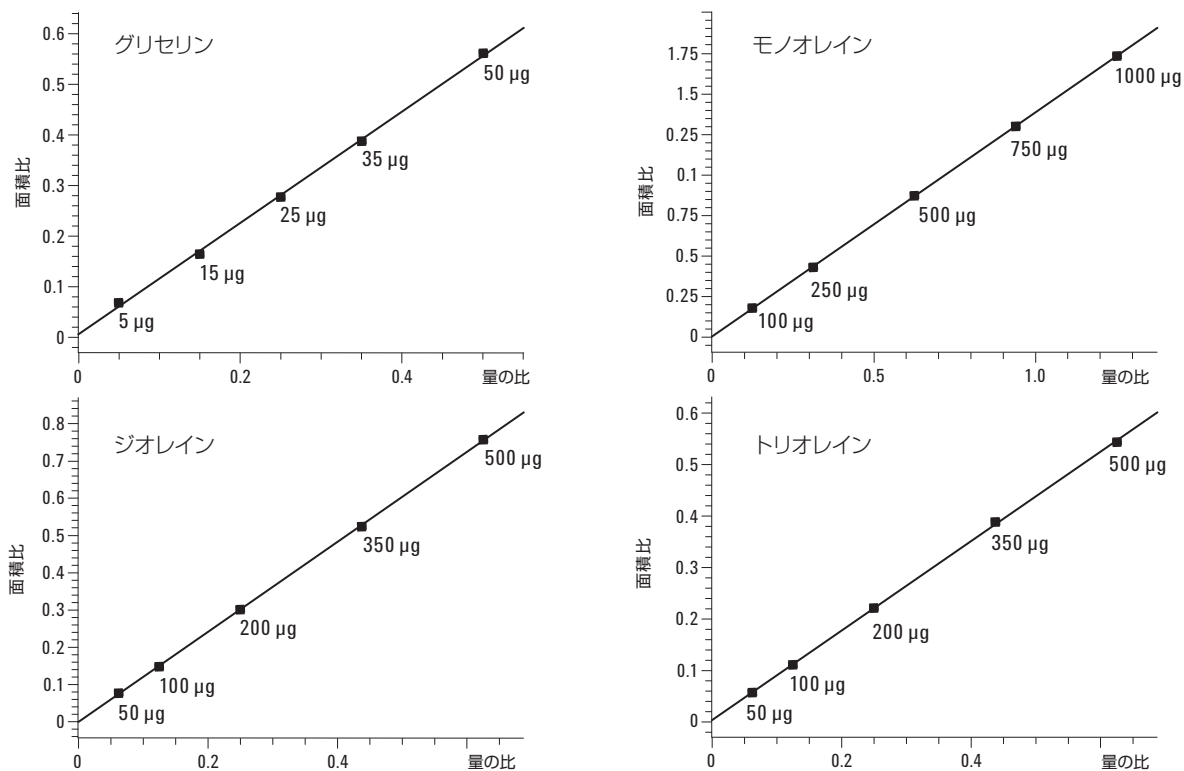


図 3. ワークベンチを用いて前処理した標準の検量線

手作業によるサンプル前処理とワークベンチによるサンプル前処理の比較

手作業およびワークベンチにより前処理したバイオディーゼルサンプルを、ASTM メソッド D6584 に従って分析しました。図 4 では、手作業およびワークベンチによるサンプル前処理で得られたバイオディーゼルサンプル 1 (キャノーラ) のクロマトグラムを比較しています。各種グリセリンが溶出する領域では、どちらのクロマトグラムも同じに見えます。すべてのサンプルについて、遊離グリセリンおよび総グリセリンを定量しました。結果を表 7 に示しています。ワークベンチによるサンプル前処理では、手作業で前処理した場合と同じ結果が得られました。どちらのサン

プルについても、2 回繰り返して前処理および分析を行い、サンプル前処理の繰り返し精度を測定しました。繰り返し精度 (r) を用いれば、各サンプルの繰り返し分析の誤差を調べ、単一オペレーターにおける精度を測定することができます。表 7 に示すように、ワークベンチを用いたサンプル前処理の繰り返し精度は、ASTM がこの分析について定める最低繰り返し精度を上回っています。この結果は、10 分の 1 にスケールダウンしても、ワークベンチを用いたサンプル前処理では、大容量の化学薬品や試薬、溶媒を用いる手作業のサンプル前処理と同じ精度を容易に得られることを示しています。

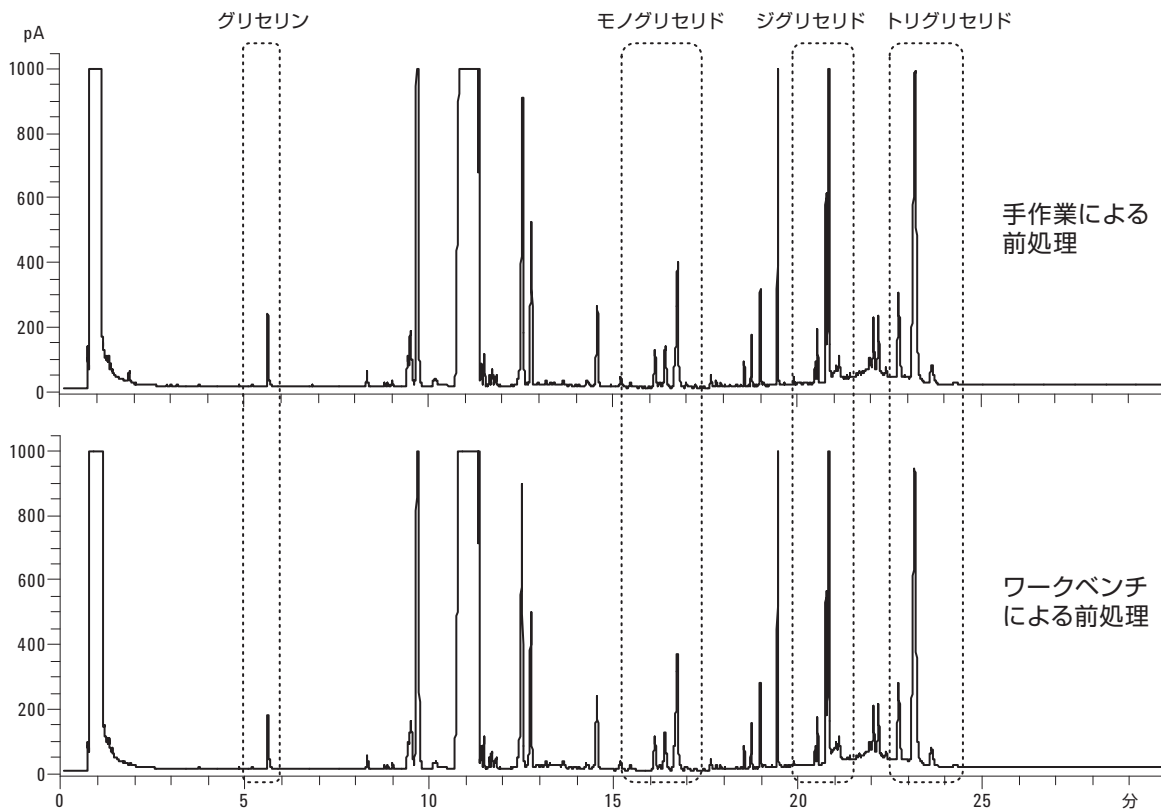


図 4. 手作業および Agilent ワークベンチを用いて前処理したキャノーラバイオディーゼルサンプルのデータ比較。これらのクロマトグラムからは、グリセリン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドが分離される 4 つの領域における一致性が著しく高いことが見てとれます。

表 7.2 種類のバイオディーゼルのいずれについても、ワークベンチにより前処理したサンプルの結果は、手作業で前処理したサンプルの結果とほぼ同じでした。ワークベンチで前処理したサンプルの精度 (繰り返し精度) は、ASTM 仕様内に十分に収まっています。

	バイオディーゼルサンプル 1 (キャノーラ)						繰り返し精度 (r) 仕様
	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ			
	分析 1	分析 2	r	分析 1	分析 2	r	
遊離グリセリン	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.58E-04
モノグリセリド	0.169	0.169	0.168	0.163			
ジグリセリド	0.282	0.286	0.291	0.286			
トリグリセリド	0.533	0.536	0.565	0.554			
総グリセリン	0.984	0.991	0.007	1.023	1.003	0.020	0.083

	バイオディーゼルサンプル 2 (大豆)						繰り返し精度 (r) 仕様
	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ			
	分析 1	分析 2	r	分析 1	分析 2	r	
遊離グリセリン	0.008	0.008	0.000	0.008	0.008	0.000	0.002
モノグリセリド	0.138	0.144	0.141	0.140			
ジグリセリド	0.022	0.023	0.022	0.021			
トリグリセリド	0.009	0.009	0.006	0.005			
総グリセリン	0.177	0.184	0.007	0.176	0.174	0.002	0.046

異なる分析者間での分析精度 - 再現性

図 5 では、4 日にわたって 4 人の化学者が個別に前処理した同一の大豆バイオディーゼルサンプルの分析結果を示しています。各化学者のクロマトグラフィー分析結果は、ほぼ同じになりました。各化学者により得られた定量分析結果と、グループ間精度

(再現性) 評価を表 8 に示しています。これらの結果は、複数の化学者がそれぞれ自動ワークベンチプロトコルを用いて同一サンプルを前処理した場合にも、きわめて高い精度が得られることを示しています。

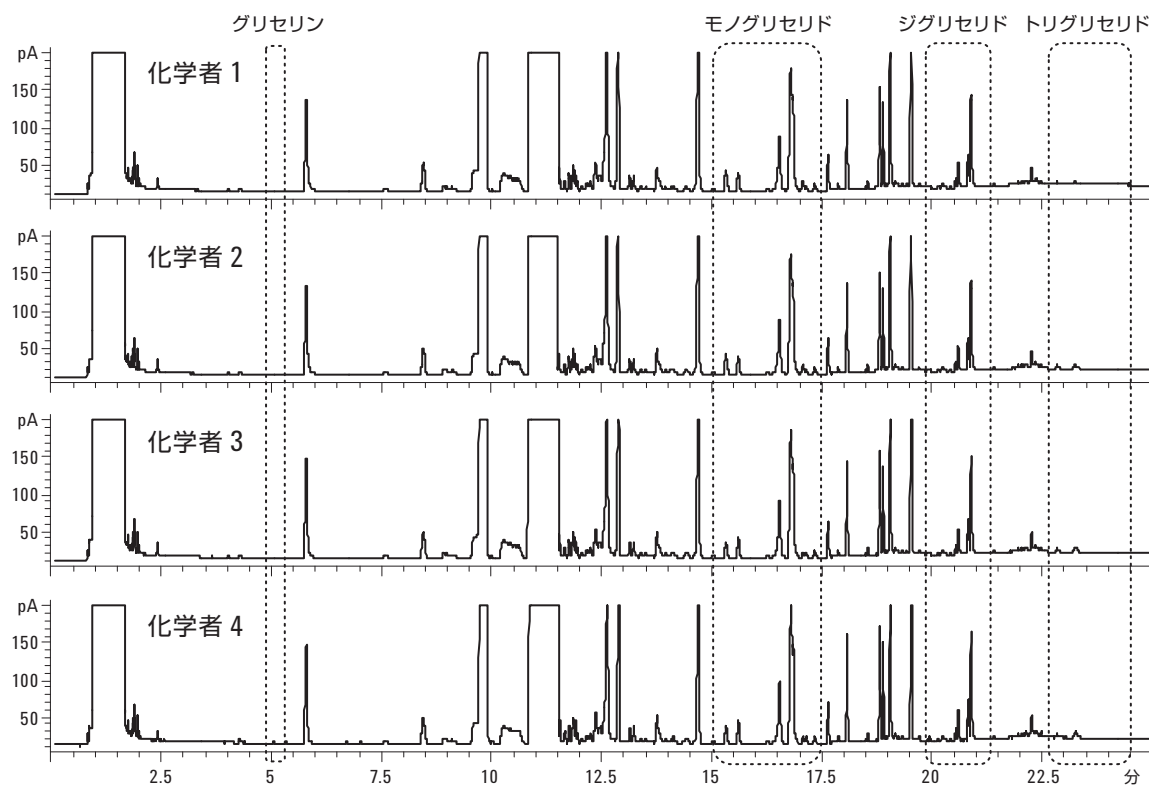


図 5. 4 日にわたって 4 人の化学者が前処理した大豆バイオディーゼルサンプルのデータ比較。各化学者がそれぞれワークベンチサンプル前処理プロトコルを開発し、ASTM メソッド D6584 を用いてサンプルを分析しました。ほぼ同じ結果が得られています。

表 8. Agilent ワークベンチを用いた自動サンプル前処理では、各化学者がほぼ同じ結果を得られました。精度 (再現性) は、複数オペレーターに関して定められた ASTM 仕様を十分に満たしています。

	化学者 1			化学者 2			再現性 (r)	ASTM R 仕様
	分析 1	分析 2	平均	分析 1	分析 2	平均		
遊離グリセリン	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
モノグリセリド	0.107	0.114	0.111	0.109	0.118	0.113		
ジグリセリド	0.032	0.034	0.033	0.033	0.036	0.034		
トリグリセリド	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.008		
総グリセリン	0.152	0.161	0.156	0.154	0.166	0.160	0.005	0.094

	化学者 3			化学者 4			再現性 (r)	ASTM R 仕様
	分析 1	分析 2	平均	分析 1	分析 2	平均		
遊離グリセリン	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
モノグリセリド	0.116	0.114	0.115	0.113	0.114	0.113		
ジグリセリド	0.033	0.033	0.033	0.032	0.033	0.032		
トリグリセリド	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006		
総グリセリン	0.160	0.157	0.159	0.155	0.157	0.156	0.004	0.091

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A ワークベンチを使えば、複雑なマルチステップのサンプル前処理プロトコルを自動化できることを実証しています。ワークベンチを用いたサンプル前処理により得られた分析結果は、従来の手作業によるサンプル前処理で得られた分析結果に一致しました。2 mL バイアルに合わせて前処理手順をスケールダウンしても、ワークベンチを用いたサンプル前処理では、きわめて高い定量精度が得られました。また、ワークベンチによるサンプル前処理のスケールダウンにより、溶媒、試薬、キャリブレーション用標準の使用量が 10 分の 1 になりました。使い捨てガラス容器や高価な計量用ガラス容器を使う必要もありません。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

参考文献

1. “D6584 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography”, ASTM International:100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
2. 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ」カタログ、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6908JAJP、January 28, 2011
3. 「自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6874JAJP、December 10, 2010

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。

本資料に記載の情報、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. 2011

Printed in Japan

March 1, 2011

5990-7525JAJP



Agilent Technologies

Agilent 7696A ワークベンチを用いた サンプル前処理の自動化



化学分析のサンプル前処理には、単純な希釈もあれば、マルチステップの誘導体化を行うケースもあります。サンプル前処理はあらゆる化学測定に不可欠な要素ですが、多くの場合は煩雑であり、また、有毒な化学薬品を用いることもあることから、必ずしも快適な作業とはとらえられていません。手作業による前処理が難しい例として、ASTM メソッド D6584 が挙げられます。このメソッドは、B100 バイオディーゼルに含まれるグリセリンを測定するために用いられるもので¹、GC 分析の前に不揮発性のグリセリンを誘導体化することが求められます。このサンプル前処理手順は複雑で、時間がかかる

うえに、きわめて不快なおいを持つ毒性溶媒のピリジンを使用します。

Agilent 7696A ワークベンチは、自動サンプル前処理のために設計されたスタンドアロン型の機器です^{2,3}。この機器により、ASTM D6584 のような複雑なサンプル前処理を実行できることは、市販のバイオディーゼルの用いた分析で実証されています。ワークベンチを用いて得られた分析結果は、手作業の前処理で得られた分析結果と同じでした (図 1)。また、ワークベンチを使えば、経験の浅いユーザーでも一貫した正確な分析結果を得られます。図 2 は、これまでバイオディーゼルの扱った経験のない 4 人の化学者により得られた優れた分析結果を示しています。このアプリケーションの詳細については、アジレント資料 5990-7525JAJP に記載されています。

おもな利点

- 経験に関係なく、手作業での前処理と同じ結果が得られます。
- 使用する消耗品が減少します。
- 高価な試薬の使用量が減少します。
- 有毒化学物質への曝露が減少します。
- 重要な業務 (メソッド開発、データ検証など) に割ける時間が多くなります。

¹ “D6584 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography,” ASTM International:100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

² 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ」カタログ、資料番号 5990-6908JAJP、January 28, 2011

³ 「自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上」Rebecca Veeneman and Dale Synder、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6874JAJP、December 10, 2010



Agilent 7696A ワークベンチを用いた複雑なサンプル前処理の自動化

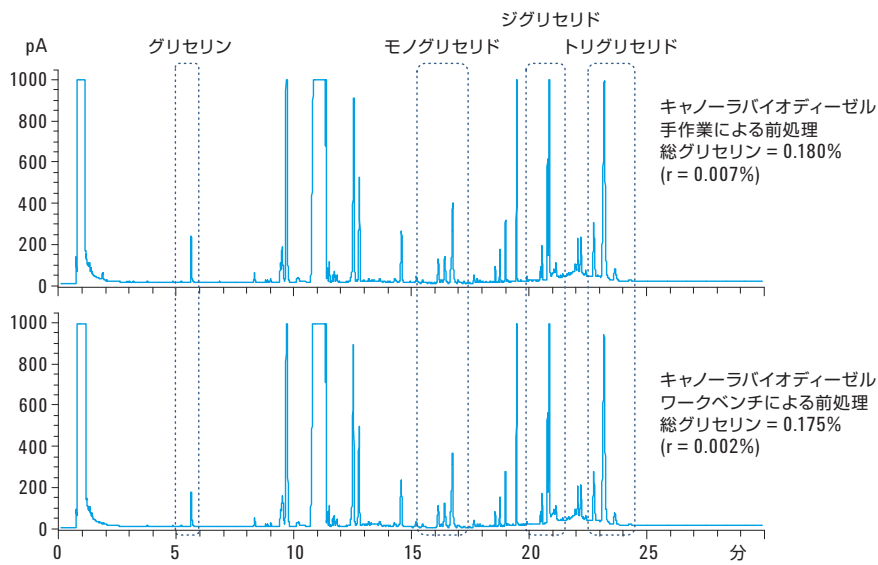


図1. ワークベンチにより前処理したサンプルでは、手作業により前処理したサンプルと同じ分析結果と、手作業のケースよりも高い精度が得られました。各サンプルを2回繰り返して前処理し、繰り返し精度 (r) を測定しました。

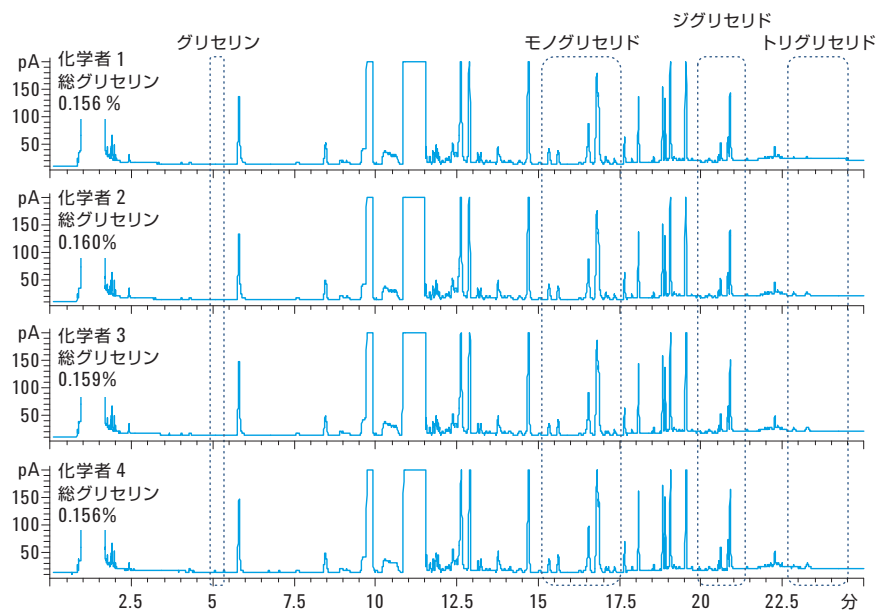


図2. Agilent ワークベンチを用いて4人の化学者が前処理した大豆バイオディーゼルサンプルのデータ比較 ほぼ同じ結果が得られています。

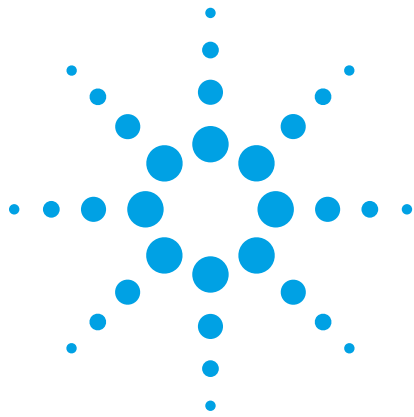
ホームページ：
www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ：
 0120-477-111
email_japan@agilent.com

本資料に記載の情報は、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. 2011
 Printed in Japan, September 8, 2011
 5990-8204JAJP





Agilent 7696A サンプル前処理 ワークベンチを用いた ジェット燃料中 FAME 汚染物質の GC/MS 分析

アプリケーションノート

燃料

著者

James D. McCurry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE
19808

概要

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、IP585 メソッドによるジェット燃料中 FAME 総含有量の GC/MS 分析用キャリブレーションスタンダードとサンプルの前処理を行いました。ワークベンチでは、手動によるサンプル前処理作業の 10 分の 1 の試薬とスタンダードの使用量で済み、優れた分析結果を得ることができました。ワークベンチで調整したスタンダードを使用した GC/MS キャリブレーションは、再分析なしにすべての性能基準を満たすため、ラボでの分析時間を大幅に短縮します。ワークベンチで前処理したジェット燃料サンプルは、複数の異なる FAME 濃度レベルでメソッドの精度要件を上回りました。既知の FAME 濃度サンプルの回収率についても、ワークベンチを使って得られた分析結果は手動での結果よりも良好でした。



Agilent Technologies

はじめに

Energy Institute メソッド IP585 では、GC/MS を使用して、商用ジェット燃料中の微量脂肪酸メチルエステル (FAME) を測定します [1]。FAME による汚染は、多種製品パイプライン (MPP) を使用してバイオディーゼルとジェット燃料の両方を輸送することにより発生します。ジェット燃料製造企業とユーザーで構成される組織、ジョイントインスペクショングループ (JIG) は、FAME の総含有量に 5 mg/kg の制限を定めました。最近のアジレントの論文に、メソッド IP585 を実施したときの Agilent 5975C シリーズ GC/MSD システムの動作と性能が記載されています [2]。

ほとんどの機器測定と同様に、キャリブレーションスタンダードとサンプルの前処理を適切に行うことが、高品質な結果を得るための重要な役割を果たします。IP585 メソッドでは、目盛り付きマイクロピペットを使用して 1 mL のキャリブレーションスタンダードを作成します。マイクロシリンジを使用して、1000 mg/mL のヘプタデカン酸メチル-d33 (C17:0-d33) が含まれる高価な内部標準溶液をすべてのキャリブレーションスタンダードとサンプルに加えます。測定量が少ないため、これらの手順には、スタンダードとサンプルの調整を正しく行うための高い技術が必要です。高い確度と精度でマイクロリットル単位の液体を分注し、混合するように専用に設計された機器を使用してサンプル前処理を自動化する方法がアプローチとしては適切です。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、自動的にサンプル前処理を行うために設計された専用のスタンドアロン機器です。この機器は 2 つの Agilent 7693A 注入タワーを使用し、2 mL バイアル間で指定した体積の液体を移動します。さまざまな試薬、スタンダード、サンプルなどが入っているバイアルを 3 つの 50 ポジショントレイに設置します。サンプルトレイコンパートメントには、ロボットアーム、ボルテックス混合ステーション、サンプル加熱ステーションが含まれます。Agilent ワークベンチを使用したキャリブレーションスタンダードの前処理は、手動で前処理したスタンダードよりも良好なキャリブレーションを実施できることがわかっています。さらに、ワークベンチを

使用して 2 mL バイアルで前処理したサンプルは、手動で前処理したサンプルと同じ定量結果を示すことがわかりました [3]。このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A ワークベンチを使用して、FAME 混入レベルが異なる 3 つのジェット燃料サンプルとともに 11 種類のキャリブレーションスタンダードを前処理しました。溶媒、スタンダード原液、内部標準溶液などのリソースの使用量を削減するために、スタンダードとサンプルの量を、1 mL からその 10 分の 1 の 100 μ L に削減しました。IP585 メソッドの精度仕様を使用して、ワークベンチで前処理したときの分析結果を、手動による前処理の結果と比較しました。

ワークベンチを使用した自動前処理手順の作成

線形希釈により調整したキャリブレーションスタンダード

IP585 メソッドでは 10 個の作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) を使用して GC/MS システムを較正します。各 WCS には、表 1 に示す 6 種類の FAME が異なる濃度で含まれています。表 2 に概要を示した線形希釈のスキームは、各 WCS を 1 mL 量、手動で作成するようにメソッドに記載されています。ワークベンチでの自動前処理では、表 3 に示した各スタンダードの最終的な量をこの手動スキームの 1 mL から 100 μ L に変換しました。スタンダードの調整では、4 つのリソースをワークベンチのソフトウェアで定義しました (表 4)。最初のリソースは、最終的な WCS を入れるために使用する 10 本の空バイアルでした。次のリソースは、希釈用溶媒として使用する 1,000 μ L の 99 % n-ドデカンが含まれるバイアル、3 番目のリソースは、1,000 μ L の作業用標準溶液 (WSS) が含まれるバイアル、最後のリソースは、500 μ L の内部標準溶液が含まれるバイアルでした。図 1 に、キャリブレーションスタンダードの自動前処理のためにワークベンチソフトウェアで使用するリソースのレイアウトを示します。

表 1. ジェット燃料中の FAME 総含有量の定量に使用した化合物

化学名	一般名	記号	分子式	分子量
ヘキサデカン酸メチル	パルミチン酸メチル	C16:0	$C_{17}H_{34}O_2$	270.45
ヘプタデカン酸メチル	マーガリン酸メチル	C17:0	$C_{18}H_{36}O_2$	284.45
オクタデカン酸メチル	ステアリン酸メチル	C18:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298.50
オクタデカン酸メチル	オレイン酸メチル	C18:1	$C_{19}H_{36}O_2$	296.49
オクタデカジエン酸メチル	リノール酸メチル	C18:2	$C_{19}H_{34}O_2$	294.47
オクタデカトリエン酸メチル	リノレン酸メチル	C18:3	$C_{19}H_{32}O_2$	292.45

バイオディーゼルの製造に使用する一般的な原料油の 95 % でこれらの 6 種類の FAME が検出されました。

表 2. 線形体積希釈を使用して 1 mL の各作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) を調整するための手動スキーム

作業用標準溶液 (WSS) の量 (μL)	n-C12 溶媒の量 (μL)	内部標準 (ISTD) の量 (μL)	各 FAME の最終濃度 (mg/kg)
1000	0	10	100
800	200	10	80
600	400	10	60
400	600	10	40
200	800	10	20
100	900	10	10
80	920	10	8
60	940	10	6
40	960	10	4
20	80	10	2
0	1000	10	0

表 3. 100 μL の作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) を調整するためのアジレントワークベンチの線形体積希釈の手順

作業用標準溶液 (WSS) の量 (μL)	n-C12 溶媒の量 (μL)	内部標準 (ISTD) の量 (μL)	各 FAME の最終濃度 (mg/kg)	作業用キャリブレーションスタンダード (WCS)
100	0	1	100	高濃度 Std 5
80	20	1	80	高濃度 Std 4
60	40	1	60	高濃度 Std 3
40	60	1	40	高濃度 Std 2
20	80	1	20	高濃度 Std 1
10	90	1	10	低濃度 Std 5
8	92	1	8	低濃度 Std 4
6	94	1	6	低濃度 Std 3
4	96	1	4	低濃度 Std 2
2	98	1	2	低濃度 Std 1
0	100	1	0	ブランク

表 4. IP585 キャリブレーションスタンダードの自動前処理のためのワークベンチリソースのレイアウト

リソース	リソースのタイプ	バイアルの範囲	使用量
作業用キャリブレーションスタンダード (WCS)	空容器	51~60	1
n-ドデカン溶媒	ケミカルリソース	61	1000 μL
作業用標準溶液 (WSS)	ケミカルリソース	71	1000 μL
内部標準溶液 (ISTD)	ケミカルリソース	81	500 μL

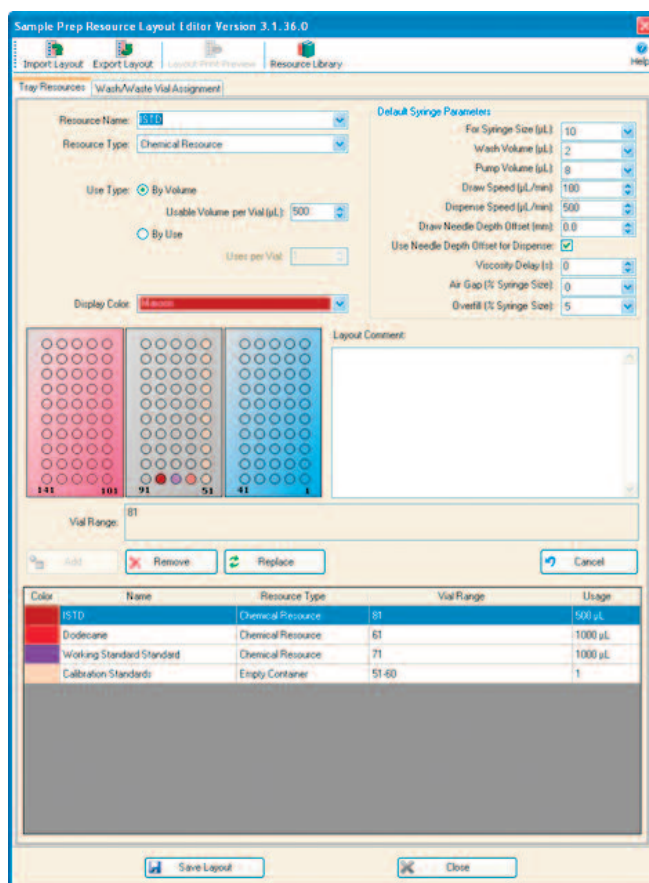


図 1. IP585 キャリブレーションスタンダードの自動前処理のためのアジレントワークベンチのリソースのレイアウト。自動前処理が完了すると、ポジション 51~60 の空バイアルには濃度の異なる 10 種類のキャリブレーションスタンダードが調整されていることとなります

リソースのレイアウトの完了時に、表 3 に示すスタンダードを調整するように 2 つのアジレントワークベンチメソッドを作成しました。最初のメソッド "IP585_Low.M" を 2~10 mg/kg の低濃度スタンダード用に、第 2 のメソッド "IP585_High.M" を 20~100 mg/kg の高濃度スタンダード用に使用しました。これらの

各メソッドのサンプル前処理手順の詳細を表 5 および 6 に示します。ワークベンチソフトウェアを使用すると、「ドラッグアンドドロップ」グラフィックインタフェースを使用してメソッドを迅速かつ容易に構築することができます。図 2 に示すメソッド IP585_Low.M は、代表的なメソッドの例です。

表 5. 100 µL の低濃度の各作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) を調整するための Agilent ワークベンチのメソッド

手順	Agilent ワークベンチ による処理	説明	シリンジ
1	洗浄	250 µL シリンジの溶媒洗浄	250 µL
2	添加	100 µL の n-C ₁₂ を低濃度ブランク (バイアル 1) に	250 µL
3	添加	98 µL の n-C ₁₂ を低濃度 Std 1 (バイアル 51) に	250 µL
4	添加	96 µL の n-C ₁₂ を低濃度 Std 2 (バイアル 52) に	250 µL
5	添加	94 µL の n-C ₁₂ を低濃度 Std 3 (バイアル 53) に	250 µL
6	添加	92 µL の n-C ₁₂ を低濃度 Std 4 (バイアル 54) に	250 µL
7	添加	90 µL の n-C ₁₂ を低濃度 Std 5 (バイアル 55) に	250 µL
8	洗浄	25 µL シリンジの溶媒洗浄	25 µL
9	添加	2 µL の WSS を低濃度 Std 1 (バイアル 51) に	25 µL
10	添加	4 µL の WSS を低濃度 Std 2 (バイアル 52) に	25 µL
11	添加	6 µL の WSS を低濃度 Std 3 (バイアル 53) に	25 µL
12	添加	8 µL の WSS を低濃度 Std 4 (バイアル 54) に	25 µL
13	添加	10 µL の WSS を低濃度 Std 5 (バイアル 55) に	25 µL
14	洗浄	25 µL シリンジの溶媒洗浄	25 µL
15	添加	1 µL の ISTD を低濃度ブランク (バイアル 1) に	25 µL
16	添加	1 µL の ISTD を低濃度 Std 1 (バイアル 51) に	25 µL
17	添加	1 µL の ISTD を低濃度 Std 2 (バイアル 52) に	25 µL
18	添加	1 µL の ISTD を低濃度 Std 3 (バイアル 53) に	25 µL
19	添加	1 µL の ISTD を低濃度 Std 4 (バイアル 54) に	25 µL
20	添加	1 µL の ISTD を低濃度 Std 5 (バイアル 55) に	25 µL
21	洗浄	25 µL シリンジの溶媒洗浄	25 µL
22	混合	低濃度ブランク (バイアル 1) を 1500 rpm で 30 秒間	
23	混合	低濃度 Std 1 (バイアル 51) を 1500 rpm で 30 秒間	
24	混合	低濃度 Std 2 (バイアル 52) を 1500 rpm で 30 秒間	
25	混合	低濃度 Std 3 (バイアル 53) を 1500 rpm で 30 秒間	
26	混合	低濃度 Std 4 (バイアル 54) を 1500 rpm で 30 秒間	
27	混合	低濃度 Std 5 (バイアル 55) を 1500 rpm で 30 秒間	

表 6. 100 µL の高濃度の作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) を調整するための Agilent ワークベンチのメソッド

手順	Agilent ワークベンチ による処理	説明	シリンジ
1	洗浄	250 µL シリンジの溶媒洗浄	250 µL
2	添加	100 µL の n-C ₁₂ を高濃度ブランク (バイアル 2) に	250 µL
3	添加	80 µL の n-C ₁₂ を高濃度 Std 1 (バイアル 56) に	250 µL
4	添加	60 µL の n-C ₁₂ を高濃度 Std 2 (バイアル 57) に	250 µL
5	添加	40 µL の n-C ₁₂ を高濃度 Std 3 (バイアル 58) に	250 µL
6	添加	20 µL の n-C ₁₂ を高濃度 Std 4 (バイアル 59) に	250 µL
7	洗浄	250 µL シリンジの溶媒洗浄	250 µL
8	添加	20 µL の WSS を高濃度 Std 1 (バイアル 56) に	250 µL
9	添加	40 µL の WSS を高濃度 Std 2 (バイアル 57) に	250 µL
10	添加	60 µL の WSS を高濃度 Std 3 (バイアル 58) に	250 µL
11	添加	80 µL の WSS を高濃度 Std 4 (バイアル 59) に	250 µL
12	添加	100 µL の WSS を高濃度 Std 5 (バイアル 60) に	250 µL
13	洗浄	25 µL シリンジの溶媒洗浄	25 µL
14	添加	1 µL の ISTD を高濃度ブランク (バイアル 2) に	25 µL
15	添加	1 µL の ISTD を高濃度 Std 1 (バイアル 56) に	25 µL
16	添加	1 µL の ISTD を高濃度 Std 2 (バイアル 57) に	25 µL
17	添加	1 µL の ISTD を高濃度 Std 3 (バイアル 58) に	25 µL
18	添加	1 µL の ISTD を高濃度 Std 4 (バイアル 59) に	25 µL
19	添加	1 µL の ISTD を高濃度 Std 5 (バイアル 60) に	25 µL
20	洗浄	25 µL シリンジの溶媒洗浄	25 µL
21	混合	高濃度ブランク (バイアル 2) を 1500 rpm で 30 秒間	
22	混合	高濃度 Std 1 (バイアル 56) を 1500 rpm で 30 秒間	
23	混合	高濃度 Std 2 (バイアル 57) を 1500 rpm で 30 秒間	
24	混合	高濃度 Std 3 (バイアル 58) を 1500 rpm で 30 秒間	
25	混合	高濃度 Std 4 (バイアル 59) を 1500 rpm で 30 秒間	
26	混合	高濃度 Std 5 (バイアル 60) を 1500 rpm で 30 秒間	

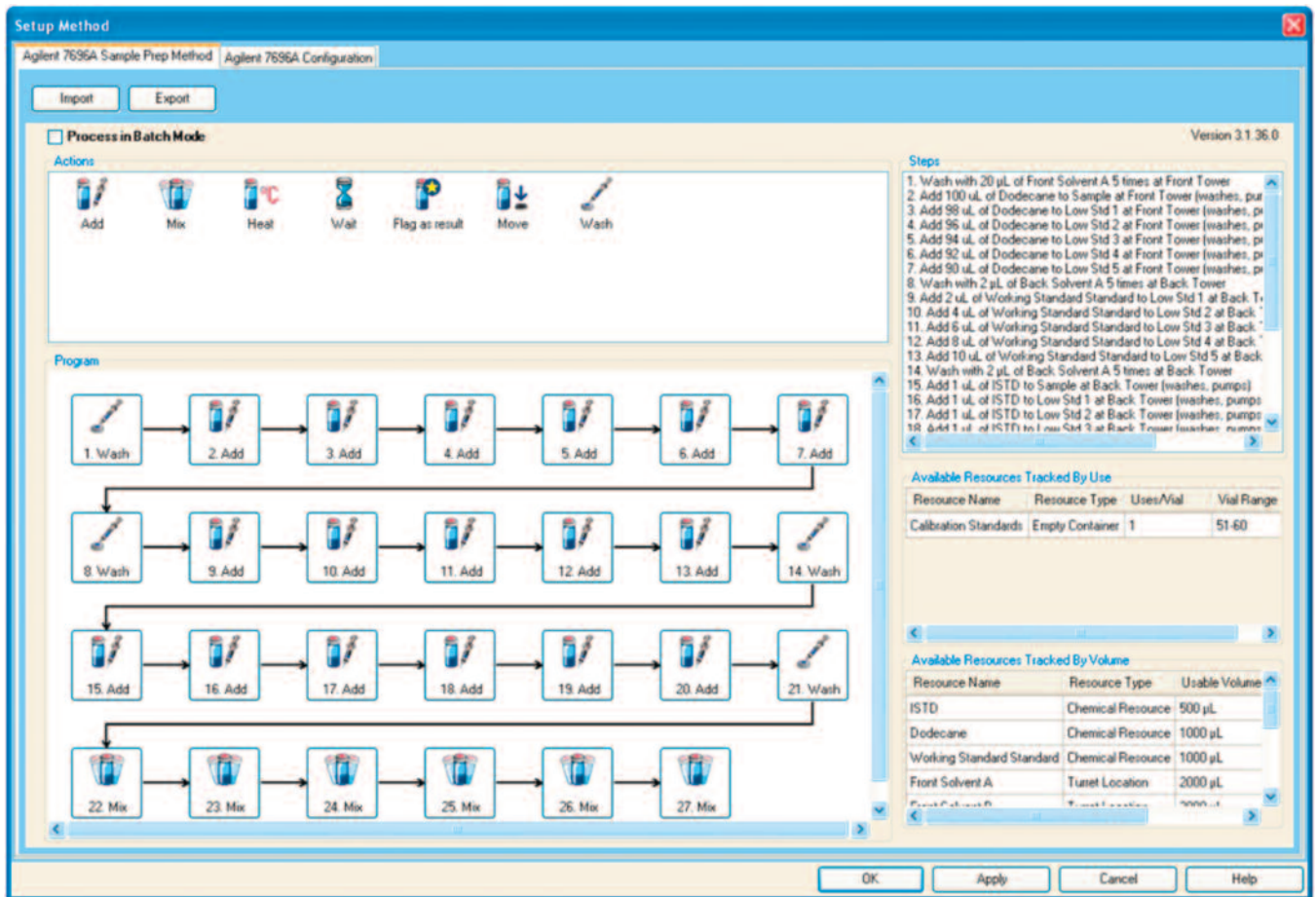


図 2. 5つの低濃度キャリブレーションスタンダードを前処理するための Agilent ワークベンチのメソッド IP585_Low.M。各メソッドの手順は、「ドラッグアンドドロップ」グラフィックインターフェイスを使用して構築しました

Agilent ワークベンチのバッチモードを使用した ジェット燃料のサンプル前処理

IP585 メソッドで、1 mL のジェット燃料を 2 mL バイアルにピペットで測り取り、これに 10 µL の内部標準溶液を加えるサンプル前処理を行いました。複数のサンプルを手動で前処理する場合、一般的には各ジェット燃料サンプルを個々のバイアルに入れ、その後、各サンプルに内部標準を加えるようなワークフローで行います。この効率的なワークフローは、Agilent ワークベンチソフトウェアのバッチモード機能を使用して実行することができます。バッチモードでは、サンプル前処理時間を最小限に抑えるために、すべてのサンプルの各サンプル前処理ステップが完了してから次の手順に移ります。シリンジ溶媒洗浄はリソースの変更時にのみ必要なため、溶媒洗浄用リソースや廃棄されるリソースも減少します。

ジェット燃料サンプルの前処理では、ワークベンチには 2 つのリソース、つまり各ジェット燃料サンプルが含まれる複数のバイアルと、内部標準溶液が含まれる 1 つのバイアルだけが必要です。このアプリケーションノートでは、10 個の個別のジェット燃料サンプルをワークベンチのリソースとして定義しました。これらのバイアルをトレイのポジション 51~60 に置き、前処理中のクロスコンタミネーションの可能性を排除するために、各バイアルを 1 回ずつ使用するよう設定しました。内部標準バイアルをトレイのポジション 81 に置きました。サンプル前処理では 10 本の空のキャップ付き 2 mL バイアルをトレイのポジション 1~10 に置きました (図 3)。バッチモードのワークベンチメソッド、IP585_Samples.M では、100 µL の各ジェット燃料サンプルを個別の空バイアルに分注し、次に内部標準溶液を 1 µL 加えて混合しました。図 4 に、ジェット燃料サンプルをバッチモードで前処理するメソッドを示します。

実験方法

作業用キャリブレーションスタンダード (WCS) とサンプルの手動での前処理

メソッド (表 2) に記載した手順に従い、1,000 μL の目盛付きピペットと 25 μL のピペットシリンジを使用して、10 種類のキャリブレーションスタンダードと溶媒ブランクを 2 mL バイアルに手動で調整しました。3 種類の異なるジェット燃料サンプルをそれぞれ個別の 2 mL バイアルにピペットで 1 mL 測り取り、次に 10 μL の内部標準液を加えてサンプルの前処理を手動で行いました。これらのサンプルには総量が既知の FAME が含まれています。全体的な繰り返し精度を確認するために 2 セットのサンプルを調整しました。各スタンダードとサンプルを手で振り混ぜ、完全に混合しました。

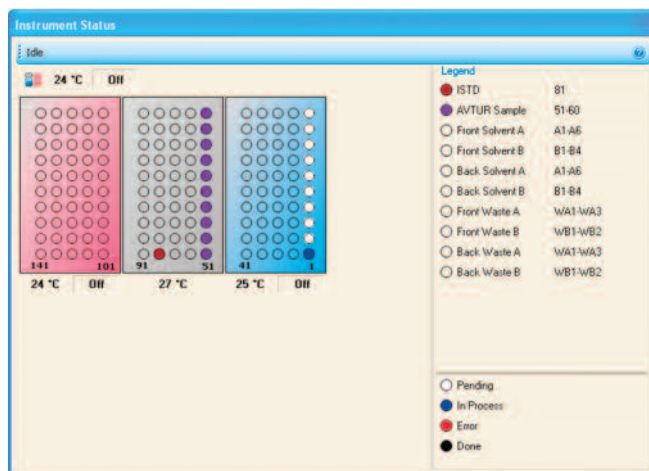


図 3. 10 種類のジェット燃料サンプルを自動前処理するためのアジレントワークベンチのリソースのレイアウト。自動前処理が完了すると、ポジション 1~10 の空バイアルには、最終的に 100 μL の各ジェット燃料サンプルと内部標準が含まれることとなります

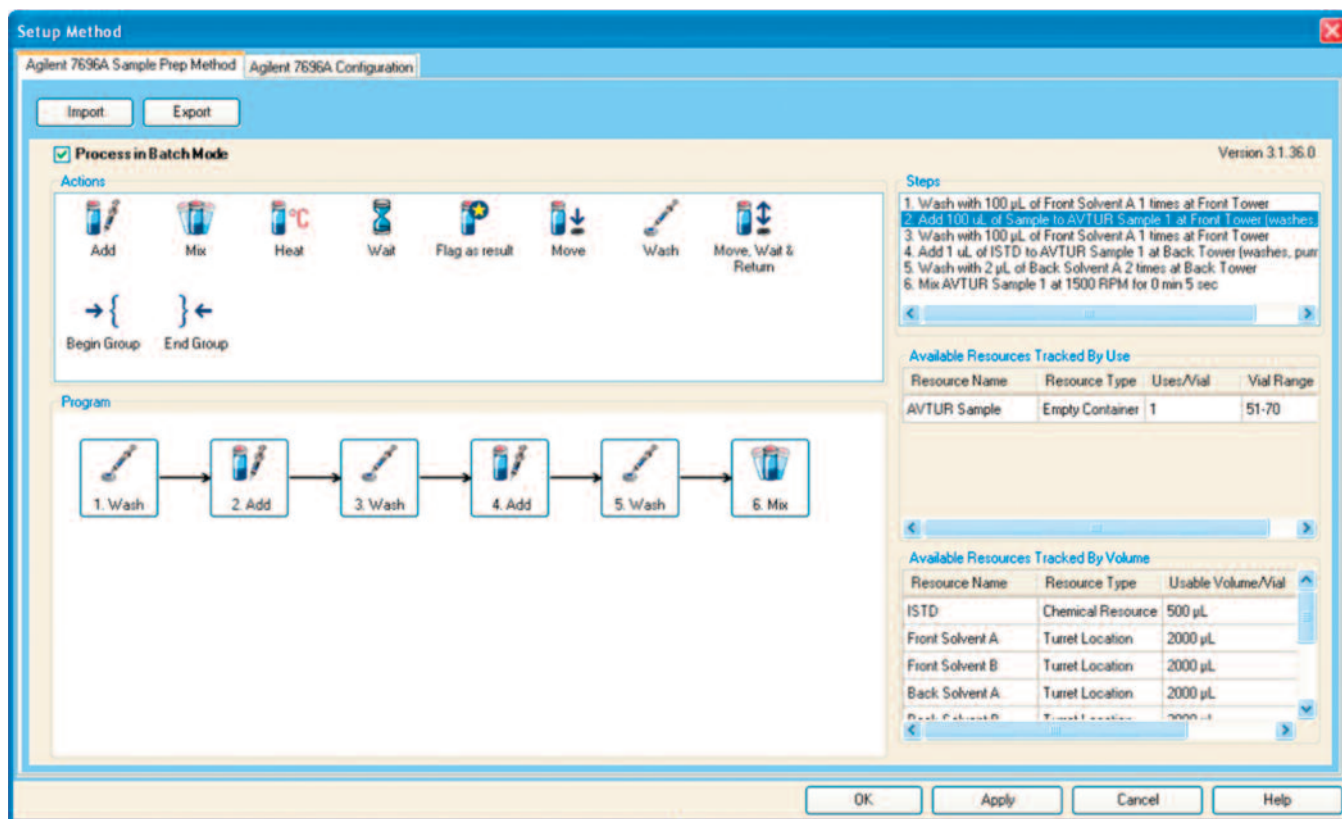


図 4. 10 個のジェット燃料サンプルを前処理するためのバッチモードの Agilent ワークベンチメソッド。次のステップに移る前に、10 個のすべてのサンプルで各ステップを実行しました。この効率的なワークフローにより時間とリソースの使用量が最小限に抑えられました

キャリブレーションスタンダードと ジェット燃料サンプルの自動前処理

フロントタワーに 250 µL のシリンジを、リアタワーに 25 µL のシリンジを使用して Agilent ワークベンチを構成しました。250 µL シリンジでは吸引速度 500 µL/min と排出速度 1000 µL/min を使用しました。25 µL シリンジでは吸引速度 100 µL/min と排出速度 500 µL/min を使用しました。各シリンジで、液体の排出時にニードルがバイアルの底に近付くように、排出深さを 0 mm に設定しました。この結果、バイアルに液体を完全に移動できるため、最高の精度が得られました。高回収率バイアル内部の v 字形状によって GC/MS オートサンブラが 100 µL という少量のスタンダードとサンプルにアクセスできるため、ここではこのバイアルを使用しました。

ワークベンチのシーケンスキューを使用し、IP585_Low.M および IP585_High.M メソッドを使用して 5 つの低濃度スタンダードと 5 つの高濃度スタンダードの調整を行いました。GC/MS キャリブレーションの検証後、ワークベンチのバッチモードメソッド、IP585_Samples.M を使用して、異なる量の FAME をスパイクした 3 種類のジェット燃料サンプルを 2 セット前処理しました。

ジェット燃料中 FAME の GC/MS 分析

Agilent 7693A 自動液体サンブラを備えた Agilent 5975C GC/MS システムを IP585 メソッドに従って構成しました。この構成を表 7 に、機器の動作条件を表 8 に示します。すべての標準試料またはサンプルの分析前に Agilent 5975C オートチューンプログラムを使用して、質量分析装置を調整しました。キャリブレーションスタンダードと n-ドデカン溶媒ブランクを最初に分析し、ジェット燃料サンプルの分析前に、低濃度レベルと高濃度レベルのキャリブレーションの直線性能を評価しました。キャリブレーションを正しく実施した後、2 セットのジェット燃料サンプルのそれぞれを 1 回ずつ GC/MS 分析しました。個々の FAME ピークを定量し、この個別の FAME の結果を合計することで、各サンプルの FAME 総含有量を算出しました。

表 7. ジェット燃料中 FAME の GC/MS による分析の機器構成

コンポーネント	説明
Agilent 5975C シリーズ MSD	不活性電子イオン源を備えた質量分析装置
Agilent 7890A GC システム	100 psi スプリット/スプリットレス注入口および質量分析装置インタフェースを備えたガスクロマトグラフ
Agilent 7693A ALS G1701EA	150 バイアルトレイを備えた Agilent 7890A GC 用自動液体インジェクタ データの取り込みおよび分析のための MSD Chemstation ソフトウェア

表 8. GC/MS 機器の条件

GC の条件	
注入口温度	260 °C
注入口モード	スプリットレス
注入口ライナ	プリットレスライナ、シングルテーパ、ガラスウール入り (p/n 5062-3587)
サンプル量	1 µL
カラム	HP-INNOWAX、50 m x 0.2 mm x 0.4 µm 膜厚 (p/n 19091N-205)
カラム流量	ヘリウム、0.6 mL/min、定流量
オープンプログラム	
初期温度	150 °C で 5 分間
オープン昇温レート 1	12 °C/min で 200 °C まで、17 分間保持
オープン昇温レート 2	3 °C/min で 252 °C まで、6.5 分間保持
質量分析装置インタフェース	260 °C
質量スペクトルの条件	
イオン源	70 eV 電子イオン化
ソース温度	230 °C
四重極温度	150 °C
データ取り込み遅延	20 分

結果

手動調整とアジレントワークベンチによる調整でのキャリブレーション性能の比較

手動で調整したキャリブレーションスタンダードとアジレントワークベンチで調整したキャリブレーションスタンダードを Agilent 5975C GC/MS システムで分析しました。ワークベンチによる低濃度および高濃度スタンダードから得られた個々の FAME 検量線を図 5 および 6 に示します。強制的に原点 0 を通した回帰分析の後、これらのすべての検量線は直線として表示されます。手動によるキャリブレーションとワークベンチによるキャリブレーションの比較を表 9 に示します。低濃度のキャリブレーションでは、手動とワークベンチのキャリブレーションの傾きは非常に近く、相関係数 (R^2) は、すべて 0.985 を上回るメソッド要件を満たしています。高濃度のキャリブレーションは、リノール酸メチル (C18:2) とリノレン酸メチル (C18:3) のキャリブレーションを除き、同じ性能を示します。この場合、ワークベンチで調整したスタンダードはメソッド要件を容易に満たしますが、手動で前処理したスタンダードは直線性に関しては不合格となります。したがって、手動で調整したジェット燃料サンプルは、高濃度のスタンダードを作り直し、キャリブレーションを正しく検証するまでは分析できませんでした。この結果、手動で調整したサンプルの結果を得るまでに時間が大幅に増えました。一方、ワークベンチによるキャリブレーションは最初から適切であったため、ワークベンチで調整したジェット燃料サンプルは直ちに分析することができました。

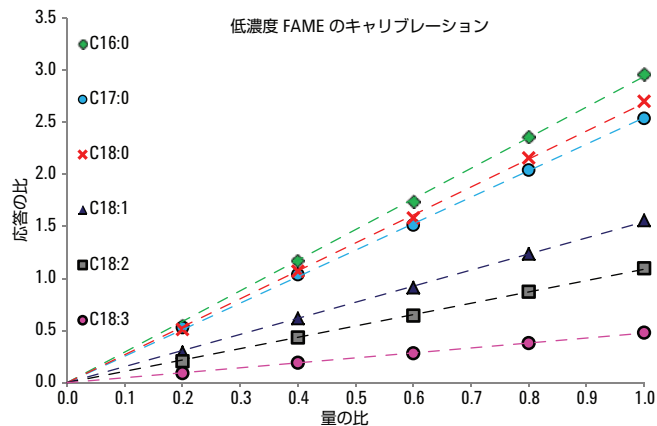


図 5. アジレントワークベンチを使用して調整した 2、4、6、8、および 10 mg/kg FAME スタンダードの低濃度検量線。メソッドのプロトコルに従い、強制的に原点を通る検量線としました。各検量線は、このメソッドの直線性要件である $R^2 > 0.985$ を上回りました

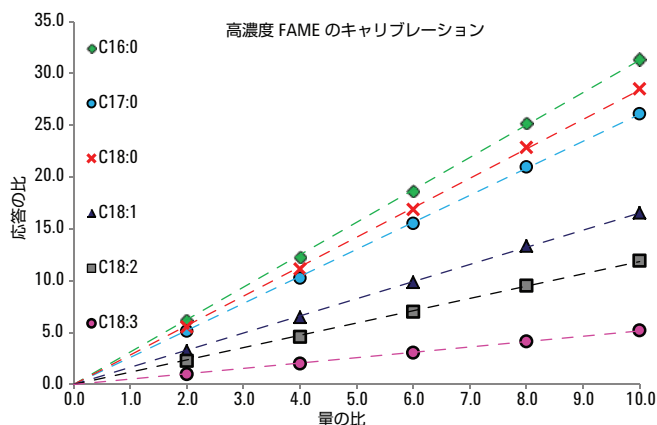


図 6. アジレントワークベンチを使用して調整した 20、40、60、80、および 100 mg/kg FAME スタンダードの高濃度検量線。メソッドのプロトコルに従い、強制的に原点を通る検量線としました。各検量線は、このメソッドの直線性要件である $R^2 > 0.985$ を上回りました

表 9. 手動および Agilent ワークベンチで調整したスタンダードを使用し
て作成した検量線で測定した傾きと相関係数 (R²) の比較

低濃度キャリブレーション (2~10 mg/kg)

FAME	傾き		R ²	
	手動	ワークベンチ	手動	ワークベンチ
C16:0	2.941	2.941	1.000	0.999
C17:0	2.441	2.544	1.000	1.000
C18:0	2.664	2.684	1.000	0.999
C18:1	1.539	1.545	1.000	0.999
C18:2	1.105	1.090	1.000	0.999
C18:3	0.478	0.475	1.000	0.999

高濃度キャリブレーション (20~100 mg/kg)

FAME	傾き		R ²	
	手動	ワークベンチ	手動	ワークベンチ
C16:0	4.962	3.127	0.985	1.000
C17:0	4.777	2.606	0.985	1.000
C18:0	4.815	2.840	0.985	1.000
C18:1	2.510	1.653	0.985	1.000
C18:2	1.713	1.184	0.984	0.999
C18:3	0.705	0.516	0.983	0.999

C18:2 および C18:3 FAME の手動による高濃度検量線は R² の最小要件
0.985 を満たしません。

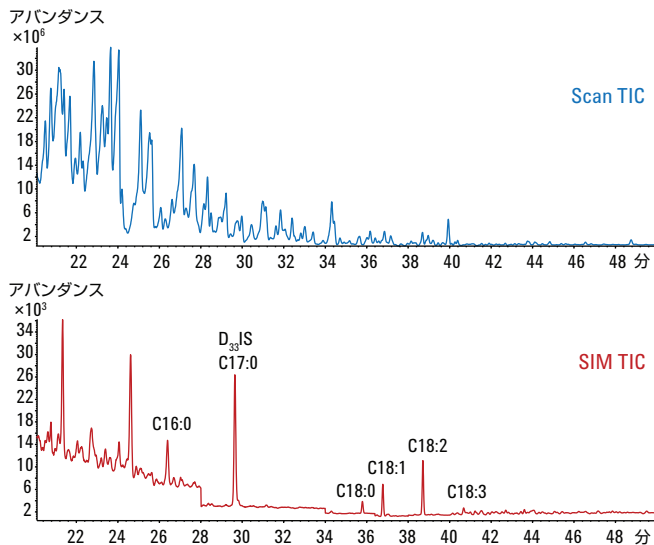


図 7. Agilent ワークベンチで調整した総含有量 5 mg/kg の FAME が含ま
れるジェット燃料サンプルから得られた SIM/SCAN GC/MS データ

手動とアジレントワークベンチによる サンプル前処理の比較

ジェット燃料に含まれる FAME の分析の代表的な GC/MS SIM/SCAN クロマトグラムを図 7 に示します。手動で前処理したジェット燃料と Agilent ワークベンチで前処理したジェット燃料の分析結果の比較を表 10、11、および 12 に示します。2 セットの各サンプルで、FAME 総含有量の繰り返し精度 (r) を計算し、IP585 メソッドで公開された仕様と比較しました。繰り返し精度は、同じ日に同じ装置を使用して同じオペレータが同じサンプルについて取得した 2 セットの結果の差を利用して計算した精度の測定値です。5 mg/kg の FAME スパイクでは (表 11)、手動で前処理したサンプルの繰り返し精度は IP585 メソッドの仕様を満たしません。したがって、この結果は無効です。一方で、ワークベンチのすべてのサンプルでは、繰り返し精度はメソッドの仕様を大幅に上回っていました。さらに、ワークベンチサンプルで取得した結果は、ジェット燃料サンプルにスパイクした FAME 総含有量により近いものとなりました。

表 11. ジェット燃料に FAME を 5 mg/kg スパイクしたときに、手動によるサンプル前処理と Agilent ワークベンチによるサンプル前処理で得られた分析結果の比較

ジェット燃料への 5 mg/kg のスパイク – 手動による前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	1.1	0.0	0.3	0.4	3.8	1.2	6.8
分析 2	0.5	0.0	0.2	0.9	2.6	0.7	4.9
					平均		5.9
					r (計算)		1.9
					r (IP585)		1.4

ジェット燃料への 5 mg/kg のスパイク – Agilent ワークベンチによる前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	0.5	0.0	0.1	0.9	2.7	0.5	4.7
分析 2	0.6	0.0	0.2	0.9	2.7	0.6	5.0
					平均		4.9
					r (計算)		0.3
					r (IP585)		1.3

表 10. ジェット燃料に FAME を 1 mg/kg スパイクしたときに、手動によるサンプル前処理と Agilent ワークベンチによるサンプル前処理で得られた分析結果の比較

ジェット燃料への 1 mg/kg のスパイク – 手動による前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
分析 2	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
						平均	1.3
						r (計算)	0.0
						r (IP585)	0.7

ジェット燃料への 1 mg/kg のスパイク – Agilent ワークベンチによる前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
分析 2	0.7	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.2
						平均	1.3
						r (計算)	0.1
						r (IP585)	0.7

表 12. ジェット燃料に FAME を 40 mg/kg スパイクしたときに、手動によるサンプル前処理と Agilent ワークベンチによるサンプル前処理で得られた分析結果の比較

ジェット燃料への 40 mg/kg のスパイク – 手動による前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	4.4	0.0	1.7	7.9	24.0	4.1	42.1
分析 2	4.7	0.0	1.8	8.3	25.1	4.3	44.2
						平均	43.1
						r (計算)	2.1
						r (IP585)	7.5

ジェット燃料への 40 mg/kg のスパイク – Agilent ワークベンチによる前処理

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	総量
分析 1	4.8	0.0	1.8	8.3	25.4	4.2	41.4
分析 2	4.3	0.0	1.7	7.9	24.0	4.1	39.1
						平均	40.2
						r (計算)	2.3
						r (IP585)	7.1

結論

IP585 GC/MS メソッドを使用してジェット燃料中の FAME を測定したところ、Agilent ワークベンチは、キャリブレーションスタンダードとサンプルの前処理を正しく自動化できることがわかりました。比較の結果、非常に少量のサンプルと試薬を正確に処理する必要がある手動による前処理では、優れた分析結果を得るのが難しいこともわかりました。このアプリケーションノートでは、手動による前処理と比較して、ワークベンチが総合的に優れた性能を実現できることを示しました。ワークベンチを使用すると、再分析を回避することで大幅な時間の短縮となり、試薬の使用量も 10 分の 1 になりました。

参考文献

1. “IP 585/10 “Determination of fatty acid methyl esters (FAME), derived from bio-diesel fuel, in aviation turbine fuel – GC-MS with selective ion monitoring/scan detection method” , The Energy Institute, London, UK.
2. “GC/MS Analysis of Trace Fatty Acid Methyl Esters (FAME) in Jet Fuel Using Energy Institute Method IP585” , James D. McCurry, Agilent Technologies, Agilent Publication Number 5990-6974EN, November 10, 2011.
3. 「自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上」 Rebecca Veeneman and Dale Synder, アジレント資料番号 5990-6874JAJP, December 2, 2010.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012

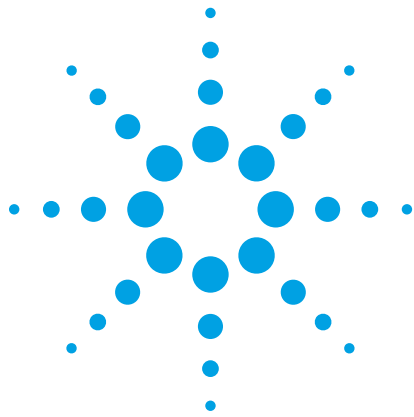
Printed in Japan

January 12, 2012

5990-9717JAJP



Agilent Technologies



メソッド EN14105:2011 を使用した バイオディーゼル GC 分析に対応する Agilent 7696A サンプル前処理ワーク ベンチによるサンプル前処理の自動化

アプリケーションノート

燃料

著者

James D. McCurry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE
19808

概要

最近改訂された EU メソッド EN14105 には、B100 バイオディーゼルに含まれるグリセロール夾雑物質の GC 分析に使用する標準およびサンプルについて、手動での前処理手順が記載されています。これには複数のステップと複雑な手順が含まれていますが、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用することにより、このメソッドにおける標準およびサンプルの前処理を自動化すると同時に、試薬の使用量と化学物質の廃棄量を 10 分の 1 まで削減することができました。ワークベンチで前処理した標準のキャリブレーション性能はメソッド要件を上回りました。市販のバイオディーゼルサンプルの検討では、メソッドの仕様を大きく上回るきわめて高い精度でサンプルの前処理ができることがわかりました。



Agilent Technologies

はじめに

EU 規制に準拠する国では、燃料に含まれる遊離および総グリセロールと、モノ、ジ、およびトリグリセリドの量を測定することで B100 バイオディーゼルの品質を確認しています。ガスクロマトグラフィー (GC) メソッド、EN14105 は、これらの化合物を分離、定量するために開発されたものです。このメソッドは、GC 分析前に不揮発性のグリセロール、モノ、およびジグリセリドなどの化合物を誘導体化し、揮発性のシラン化合物を生成するための複雑な手順の概要を示しています。2011 年に欧州標準化機構 (CEN) は、GC 性能、グリセリドの定量、および全体的な精度を向上するためにこのメソッドを改訂しました [1]。このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して、キャリブレーション標準およびサンプルの前処理を自動化する方法について説明します。

ワークベンチは、自動でサンプル前処理を行うために設計されたスタンドアロン機器です。この機器は 2 つの Agilent 7693A 注入タワーを使用して、2 mL バイアル間で指定容量の液体を移動します。さまざまなケミカルリソース、標準およびサンプルが含まれるバイアルを 3 つの 50 ポジショントレイに収納します。サンプルトレイには、ロボットアーム、ボルテックス混合ポート、サンプル加熱ポートが含まれます。バイオディーゼル分析では、ワークベンチを使用して、EN14105 メソッドに類似した ASTM メソッド D6584 のサンプル前処理を適切に行いました [2]。ワークベンチで前処理したサンプルの分析結果は、手動で前処理したサンプルから得られた結果と同等でした。

Agilent ワークベンチ Easy SamplePrep (ESP) ソフトウェアがバージョンアップし、ケミカルリソースと時間をより効率的に使用できるようになりました。ESP はシンプルな操作性を提供しているため、ワークベンチの各前処理を表すドラッグアンドドロップアイコンを使用して、サンプル前処理メソッドを迅速に構築することができます。バッチモードと呼ばれる新しい操作モードにより、ワークベンチはすべてのサンプルに 1 ステップずつ共通の処理を繰り返し行ってから、次の処理に移ることができます。バッチモードを使用するメソッドでは、サンプル前処理時間の短縮に加えて、溶媒洗浄と溶媒廃棄の容量を大幅に削減できます [3、4]。

実験方法

ワークベンチによる EN14105 キャリブレーション標準の前処理

ワークベンチは、ブルーライン 25 µL ガスタイトシリンジ (p/n G4513-80241) をバックタワーに、ブルーライン 500 µL ガスタイトシリンジ (p/n G4513-60561) をフロントタワーに使用して構成しました。標準とサンプルの前処理に使用したケミカルリソースを表 1 に示します。標準グリセリド溶液を前処理するために使用した 3 つのリファレンスグリセリドは、Nu-Chek Prep (www.nu-chekprep.com) から購入しました。各ケミカルリソースを個別の 2 mL 高回収ガラスバイアル (p/n 5183-2030) に入れ、テフロンライニングセプタム (p/n 5040-4682) 付きのスクリーキャップを使用して密封しました。

表 1. メソッド EN14105:2011 に使用したケミカルリソースと標準

リソース	説明	サプライヤ
ヘプタン	キャピラリ GC グレード	Sigma Aldrich p/n H9629
グリセロール原液	ピリジン中に 0.5 mg/mL	Sigma Aldrich p/n 44892-U
ブタントリオール溶液	ピリジン中に 1 mg/mL	p/n 5982-0024
MSTFA	シリル化試薬	p/n 5190-1407
標準グリセリド溶液	THF 中に 2.5 mg/mL	Nu-Chek Prep
モノグリセリド RT 標準	ピリジン中に 10 mg/mL	p/n 5190-1410
ピリジン	無水グレード	Sigma Aldrich p/n 270970

Agilent ESP ソフトウェアを使用してケミカルリソースのトレイレイアウトを決定し、1 バイアルあたりの使用量やシリンジパラメータなどの初期値を割り当てました。レイアウトについて表 2 で説明し、図 1 に図を示します。

表 2. 図 1 に示した標準およびサンプルの前処理に使用する Agilent ワークベンチのケミカルリソース

リソース名	リソースのタイプ	使用のタイプ	容量 (μL)	バイアルの範囲
ヘプタン	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	81~95
グリセロール原液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	61
ブタントリオール溶液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	62
MSTFA	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	63
標準グリセリド溶液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	64
モノグリセリド RT 標準	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	65
ピリジン	ケミカルリソース	ポリウム	500	71
空バイアル				51~55

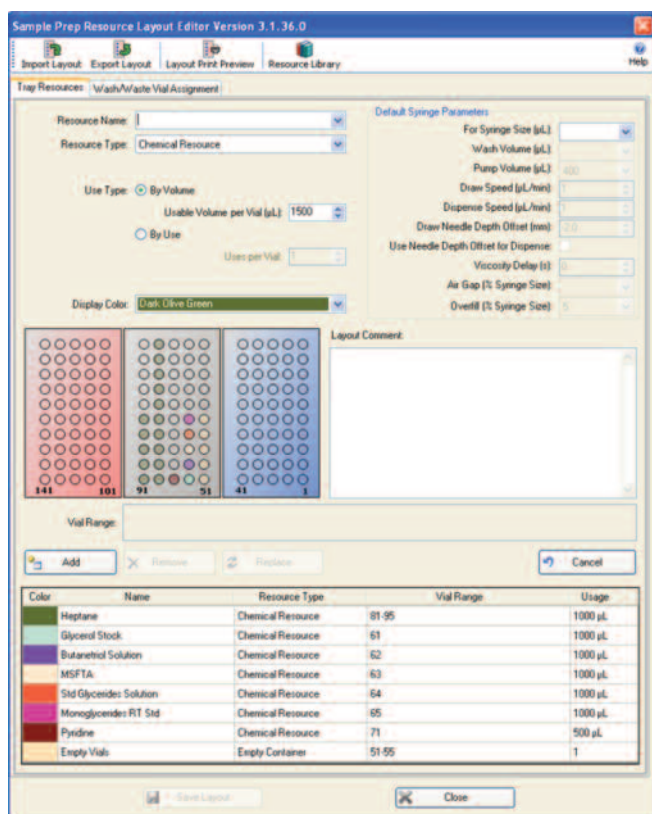


図 1. メソッド EN14105 を使用した標準およびサンプル前処理のための Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアのレイアウト

EN14105 メソッドでは、線形希釈を使用して5つのキャリブレーション標準を前処理する必要があります。4つの標準には、検量線作成のための異なる濃度のグリセロールと同じ濃度の内部標準である1,2,3-ブタントリオールが含まれます。もう一つのキャリブレーション標準には、バイオディーゼルに含まれるこれらの化合物を同定するために使用する3つのモノグリセリドが含まれます。EN14105 メソッドでは、約10 mLの各キャリブレーション標準を前処理するために使用する手順について概説しています。ワークベンチでは2 mLバイアルを使用するため、ボリウムを10分の1にスケールダウンする必要があります [2]。表3では、これらの5つのキャリブレーション標準の前処理に使用する37のステップを説明します。これは線形希釈であるため、標準の前処理にはESP バッチモードを使用しませんでした (図2)。高回収ガラスバイアルを使用し、ニードル深さオフセットを0にして、これらの標準の前処理に必要な少量の混合を確実に完了することが重要です。さらに、シリンジ内での気泡の発生により生じる可能性のある誤差を排除するために、各リソースを分注するときに5%の過充填を使用しました。

EN14105 用 B100 バイオディーゼルサンプルのワークベンチによる前処理

EN14105 メソッドでは、100 mg のバイオディーゼルサンプルを反応バイアルに計量し、シラン処理を行う必要があります。ワークベンチのサンプル前処理のスケールが10分の1に削減されたため、2 mL の高回収ガラスバイアルに計量したサンプルはわずか10 mg でした。化学天秤がないため、ワークベンチではサンプルの自動計量はできません。10 mg のバイオディーゼルの計量は非常に困難なため、エッペンドルフリファレンス調整式ピペッタ (10~100 µL) を使用してサンプルを計量しました。10 mg のバイオディーゼルの計量は、11.5 µL のバイオディーゼルの風袋測定後の2 mL 高回収ガラスバイアルに手でピペティングし、最も近い0.01 mg の単位まで重量を記録することで行いました。

表3. メソッド EN14105 のキャリブレーション標準を前処理するために使用するワークベンチメソッド

ステップ	ワークベンチによる処理	説明	シリンジ	吸引速度 (µL/min)	排出速度 (µL/min)	ニードル深さオフセット (mm)	粘性待ち時間(秒)	過充填 %
1	洗浄	5 µL のブタントリオールでシリンジを3回	25 µL	250	1,000		0	
2~6	追加	8 µL のブタントリオールを空バイアル1、2、3、4、5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
7	洗浄	洗浄溶媒 A でシリンジを	25 µL	250	1,000		0	
8	洗浄	5 µL のグリセロール原液でシリンジを	25 µL	250	1,000		0	
9	追加	1 µL のグリセロール原液を空バイアル1に	25 µL	250	1,000	0	2	5
10	追加	4 µL のグリセロール原液を空バイアル2に	25 µL	250	1,000	0	2	5
11	追加	7 µL のグリセロール原液を空バイアル3に	25 µL	250	1,000	0	2	5
12	追加	10 µL のグリセロール原液を空バイアル4に	25 µL	250	1,000	0	2	5
13	追加	5 µL のモノグリセリド RT 標準を空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
14	追加	20 µL の標準グリセリドを空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
15	追加	20 µL のピリジンを空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
16	洗浄	洗浄溶媒 A でシリンジを3回	25 µL	250	1,000		0	
17~21	追加	15 µL の MSTFA を空バイアル1、2、3、4、5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
22~26	混合	空バイアル1、2、3、4、5を2,500 RPM で15秒間						
27	待機	15分間						
28~32	追加	800 µL のヘプタンを空バイアル1、2、3、4、5に	500 µL	1,250	5,000	0	2	5
33~37	混合	空バイアル1、2、3、4、5を2,500 RPM で15秒間						

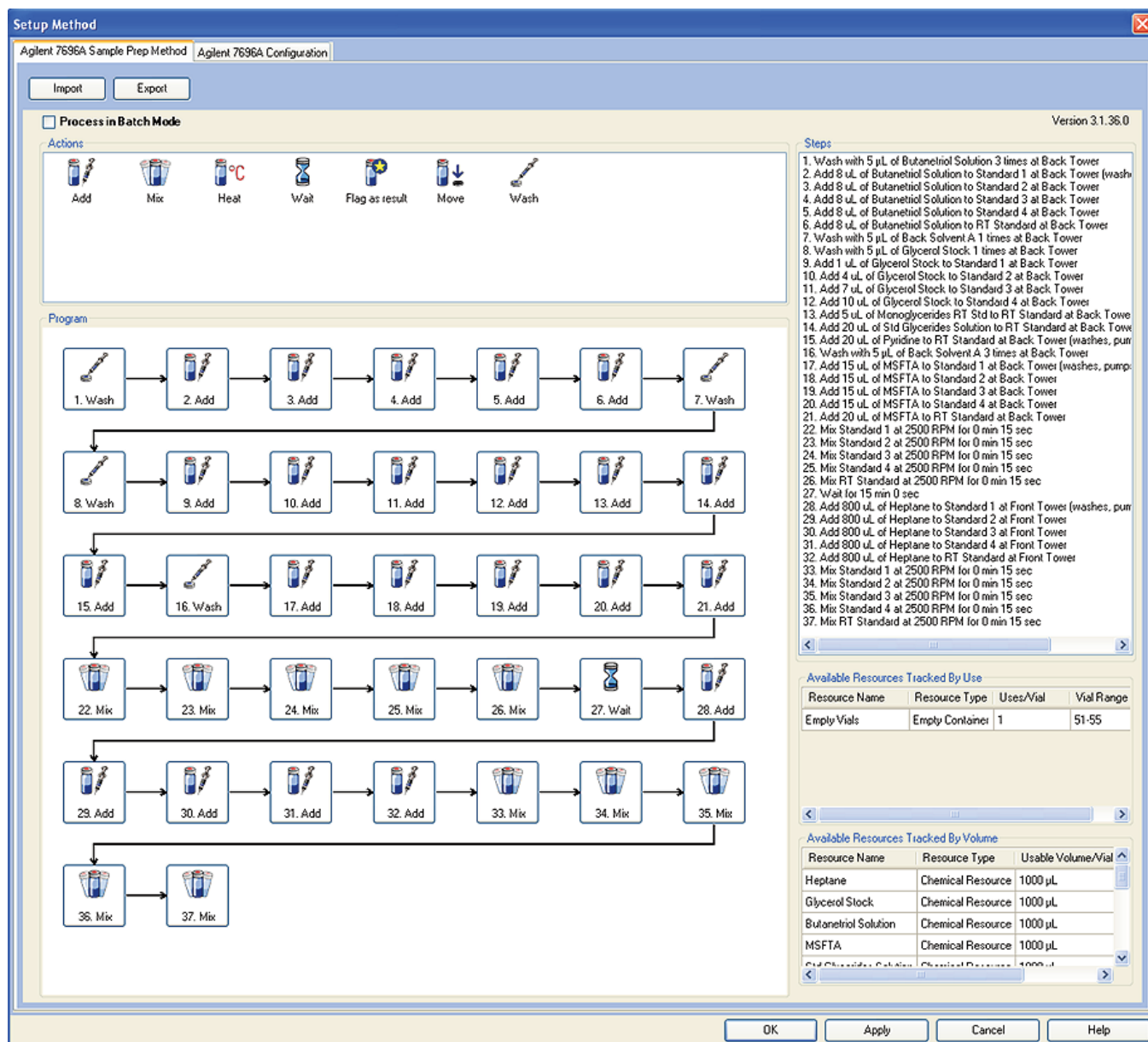


図 2. メソッド EN14105 用のキャリブレーション標準の前処理に使用する Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアメソッド

EN14105 メソッド用のサンプル前処理は、一定量のブタントリオール原液、標準グリセリド原液、ピリジン、および MSTFA をサンプルに追加して、不揮発性化合物を誘導体化することにより行います。追加して 15 分後にヘプタンを加えて混合し、反応を抑制します。ワークベンチには 2 mL バイアルを使用するため、添加する各試薬の量が 10 分の 1 まで削減しました。このサンプル前処理のステップを表 4 に示します。ESP ソフトウェアを使用してバッチモードメソッドを作成し、時間とリソースを削減しました。バッチモードメソッドを図 3 に示します。

標準の前処理とサンプル前処理の両方に同じリソースレイアウトを使用するため、ESP ソフトウェアのシーケンスキューを使用して両方のメソッドを同時に実行することができます。このアプリケーションノートでは、大豆油由来の B100 バイオディーゼルの前処理を 10 回繰り返して、ワークベンチによるサンプル前処理の精度を評価しました。

表 4. メソッド EN14105 用のバイオディーゼルのサンプル前処理を行うためにワークベンチが使用する個々のステップ

ステップ	ワークベンチによる処理	説明	シリンジ	吸引速度 (μL/min)	排出速度 (μL/min)	ニードル深さ オフセット (mm)	粘性待ち 時間 (秒)	過充填 %
1	洗浄	5 μL のブタントリオールでシリンジを 3 回	25 μL	250	1,000	0	0	
2	追加	20 μL のピリジンを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
3	追加	8 μL のブタントリオールを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
4	追加	20 μL の標準グリセリドを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
5	追加	20 μL の MSTFA を各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
6	混合	各サンプルを 2,500 PRPM で 15 秒間						
7	待機	15 分間						
8	洗浄	200 μL の洗浄溶媒 A でシリンジを 1 回	25 μL	250	1,000		0	
9	追加	800 μL のヘプタンを各サンプルに	500 μL	1,250	5,000	0	2	5
10	混合	各サンプルを 2,500 RPM で 15 秒間						

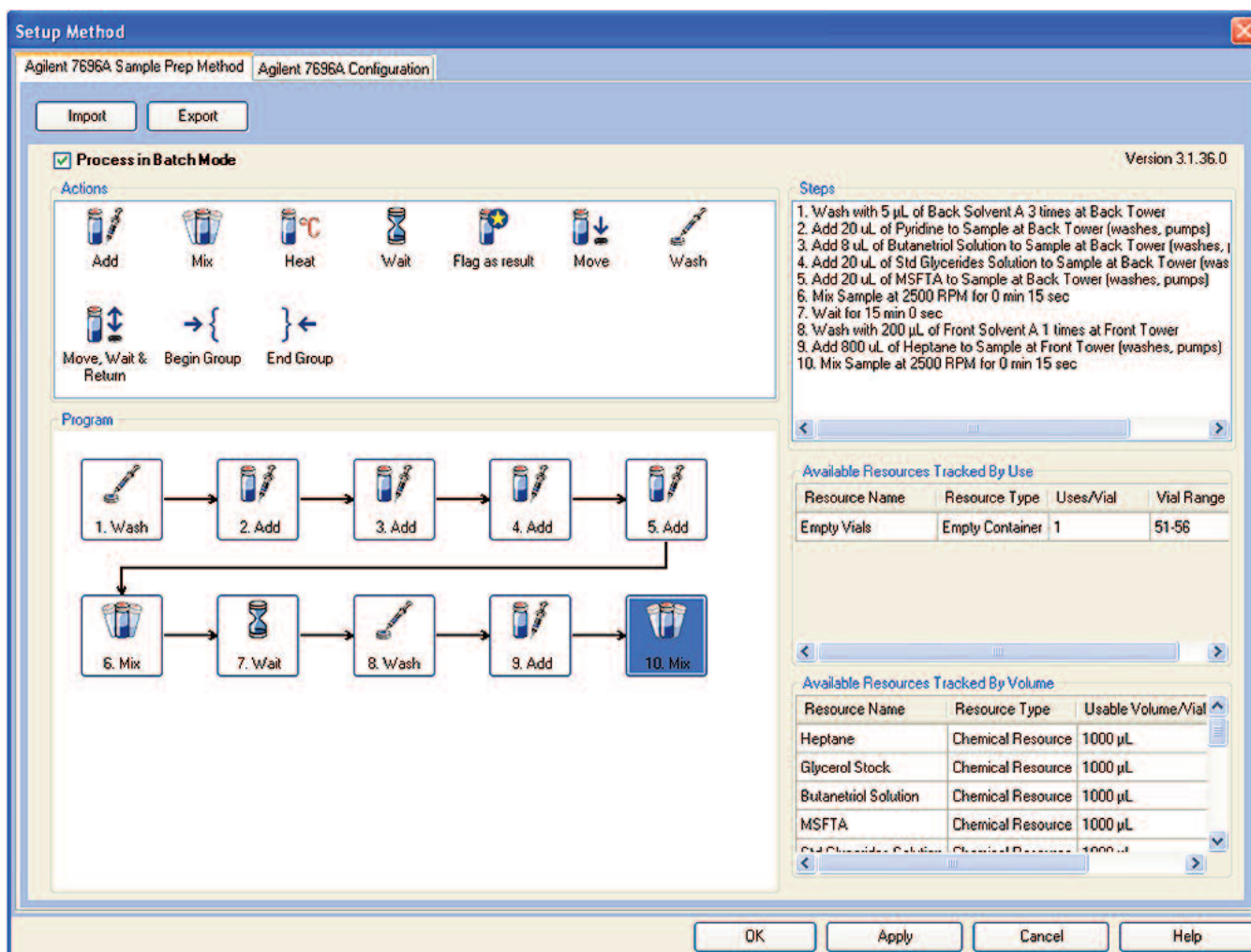


図 3. EN14105 のバイオディーゼルサンプルの前処理に使用する Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアのバッチモードメソッド

ワークベンチで前処理した標準およびサンプルの GC 分析

EN14105:2011 の要件に準拠するように Agilent 7890A ガスクロマトグラフ (GC) を構成しました。機器の構成と機器の測定条件を表 5 に示します。1 μL の各標準と各サンプルをこのシステムに 1 回注入しました。7890A GC の制御、データの収集、データ解析の実行に Agilent OpenLab CDS Chemstation を使用しました。

表 5. ワークベンチで前処理した標準とサンプルをメソッド EN14105:2011 を使用して分析するための Agilent 7890A GC の構成と測定条件

機器の構成

G3440A	Agilent 7890A シリーズ GC
オプション 122	EPC で制御されたクールオンカラム注入口
オプション 211	EPC で制御されたキャピラリ FID
G4513A	Agilent 7693A ALS
カラム	Select Biodiesel for Glycerides 15 m x 0.32 mm、0.1 μm (p/n cp9078)
データシステム	Agilent OpenLab CDS Chemstation C.01.03

GC の動作条件

クールオンカラム注入口

初期圧力	ヘリウム、11.353 psi
初期温度	50 $^{\circ}\text{C}$
温度プログラム	オープントラックモード
カラム流量	ヘリウム、5 mL/min、定流量
カラム温度	
初期	50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間
昇温レート 1	15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 180 $^{\circ}\text{C}$ まで 0 分間保持
昇温レート 2	7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 230 $^{\circ}\text{C}$ まで 0 分間保持
昇温レート 3	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 370 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 分間保持
水素炎イオン化検出器	380 $^{\circ}\text{C}$

結果と考察

ワークベンチで前処理した EN14105 標準

3 つのモノグリセリドと標準グリセリドのリテンションタイムを、リテンションタイム標準のデータにより決定しました。このクロマトグラムを図 4 に示します。4 つの濃度レベルのグリ

セロールキャリブレーション標準から得られたデータを使用してグリセロールの検量線を作成しました。この検量線を図 5 に示します。この検量線の相関係数は 1.000 であり、EN14105 メソッドの要件である 0.9 を満たしています。

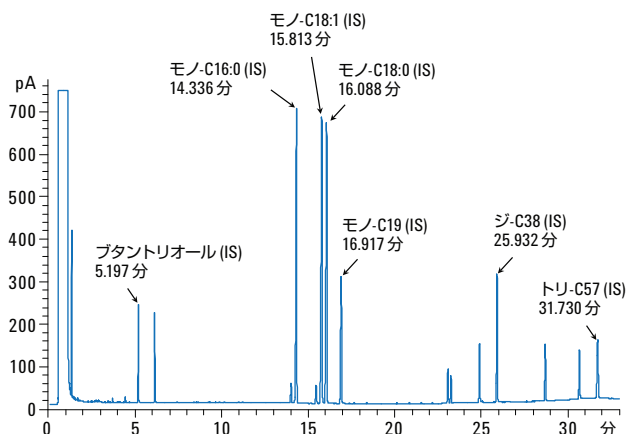


図 4. ワークベンチを使用して前処理したリテンションタイム標準による同定。3 つのモノグリセリドのほか、4 つの内部標準 (ブタントリオール、モノ-C19、ジ-C38、トリ-C57) もこの混合物に加えられました。

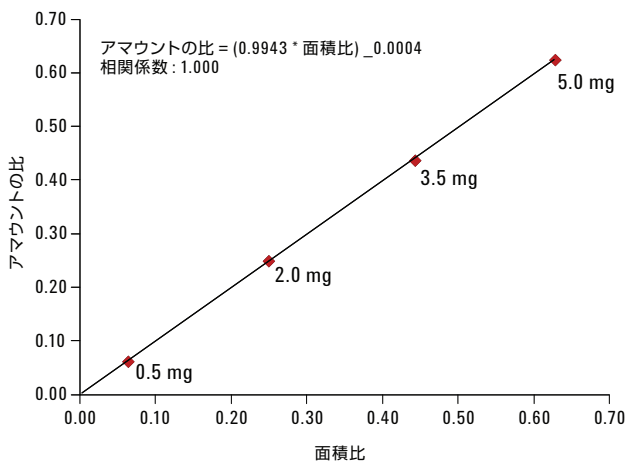


図 5. ワークベンチで前処理した 4 つのキャリブレーション標準から得られたデータを使用して作成したグリセロールの検量線。相関係数は、EN14105 メソッドで求められる 0.9 の値を超えています。

ワークベンチで前処理した B100 バイオディーゼルサンプル

ワークベンチで処理した 1 つのサンプルのクロマトグラムと 10 個のサンプルクロマトグラムの重ね書きを図 6 に示します。重ね書き表示した 10 個のクロマトグラムは、リテンションタイムとピーク応答のいずれも 1 つのクロマトグラムとほぼ同一です。この結果は、各サンプルを高精度で前処理できるワークベンチの能力を示しています。図 7 に 4 つの定量領域を詳細に示します。これらのクロマトグラムも、ワークベンチで前処理した 10 個のバイオディーゼルサンプルを重ね書きしたもので、ほとんど同一の結果を示しています。グリセロールとモノグリセリドの領域では、同定されたピークだけが定量され、報告されています。ジおよびトリグリセリドの領域では、対応する領域で溶出したすべてのピークが定量され、ジグリセリドまたはトリグリセリドとして報告されます。

最終的な結果を確認する前に、カラム性能のコントロールを計算する必要があります。このコントロールは、ジ-C38 内部標準とトリ-C57 内部標準の相対応答係数 (RRF) を計算することにより決定します。トリグリセリドを確実に検出するには、RRF が 1.8 未満でなければなりません。表 6 に示すように、ワークベンチで前処理した各サンプルは、このカラム性能のコントロールの条件を満たしていました。

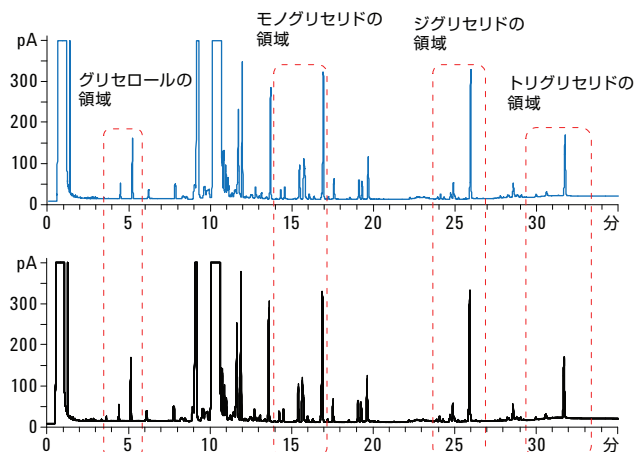


図 6. 上のクロマトグラムは、Agilent ワークベンチを使用して前処理した B100 サンプルを 1 回分析したものです。グリセロールおよびグリセリドの各定量領域を赤で示します。下のクロマトグラムは、ワークベンチを使用して前処理した 10 個のサンプルを重ね書きしたものです

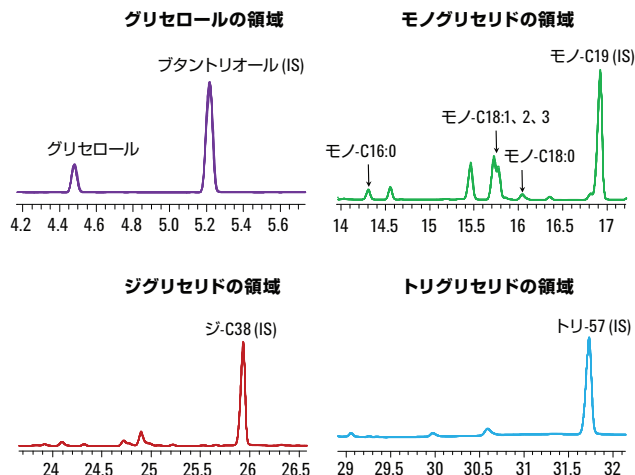


図 7. 4 つの定量領域の拡大図。これらのクロマトグラムは、Agilent ワークベンチを使用して前処理した 10 個のサンプルを重ね書きしたものです

表 6. カラム性能のコントロールパラメータ

サンプル	A_{DiC38}/M_{DiC38}	A_{TriC57}/M_{TriC57}	RRF
SRM01	24.4	16.5	1.5
SRM02	24.4	16.4	1.5
SRM03	24.4	16.4	1.5
SRM04	24.4	16.4	1.5
SRM05	24.5	16.5	1.5
SRM06	24.6	16.5	1.5
SRM07	24.5	16.0	1.5
SRM08	24.9	16.0	1.6
SRM09	24.9	16.0	1.6
SRM10	25.0	16.2	1.5

カラム性能のコントロールとして、ジ-C38 およびトリ-C57 内部標準の相対応答係数 (RRF) は 1.8 未満でなければなりません。ワークベンチで前処理した 10 個すべてのバイオディーゼルサンプルはこの要件を満たしています (A = ピーク面積、M = 化合物の質量)

グリセロールのキャリブレーションおよびカラム性能コントロールの基準を満たしている状態で、遊離グリセロール、モノ、ジ、トリグリセリドおよび総グリセロールを、ワークベンチで前処理した 10 個のバイオディーゼルサンプルについて算出しました。これらの結果を表 7 に示します。各成分について計算した低い RSD から、これらの 10 個の測定結果で優れた精度が得られていることがわかります。EN14105:2011 メソッドには、1 人のユーザーの精度に加えて複数のラボ間での精度についても記載があります。このアプリケーションノートでは、1 人のユーザーの結果であり、これをメソッドの基準と比較します。

1 人のユーザーの精度は繰り返し精度 (r) とも呼ばれます。繰り返し精度は、同じ装置で同じテストサンプルを使用し、同じオペレータによって得られた 2 つのテスト結果の違いです。EN14105 メソッドには、サンプルで測定される各成分の繰り返し精度の記載があります。これを用いる際に、最も差の大きい 2 つの結果 SRM01 および SRM10 を使用しました。サンプルの各結果の差の絶対値を取り、メソッドで求められる最小の差と比較しました。図 8 に示すように、ワークベンチを使用して前処理したサンプルは、定量されたすべての成分についてメソッドの繰り返し再現性の仕様を満たしています。

表 7. Agilent ワークベンチを使用して前処理した 10 個の B100 バイオディーゼルの分析結果

サンプル	サンプルの 重量 (mg)	重量 %				
		遊離グリセロール	モノグリセリド	ジグリセリド	トリグリセリド	総グリセロール
SRM01	10.90	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM02	10.40	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM03	10.63	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM04	9.59	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM05	11.12	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM06	9.93	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM07	10.46	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM08	9.66	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM09	9.74	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM10	10.01	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	平均	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	標準偏差	0.000	0.00	0.00	0.00	0.000
	RSD	1.871%	0.00%	0.00%	0.00%	0.202%

表 8. Agilent ワークベンチを使用して前処理した 2 種類の B100 バイオディーゼルサンプルの繰り返し精度 (r) で表した分析精度。各成分の繰り返し精度 (r calc) は EN14105:2011 メソッドの仕様 (r spec) を満たしています。

サンプル	重量 %				
	遊離グリセロール	モノグリセリド	ジグリセリド	トリグリセリド	総グリセロール
SRM01	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM10	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
r calc	0.001	0.00	0.00	0.00	0.001
r spec	0.003	0.04	0.02	0.02	0.020

結論

改訂された EU メソッド EN14105:2011 に従って、Agilent 7696A ワークベンチはバイオディーゼルに含まれるグリセロール夾雑物質の GC 分析用標準およびサンプルの自動前処理を精度良く実行できることがわかりました。ワークベンチは 2 mL バイアルを使用するため、EN14105 の前処理のスケールが 10 分の 1 まで減少しました。この結果、この分析を実行する際の試薬のコストが下がり、廃棄される化学物質の量が減少しました。ワークベンチで前処理したキャリブレーション標準は、このメソッドにより設定されたすべての性能基準を満たしました。ワークベンチを使用してバイオディーゼルサンプルの前処理を 10 回繰り返したところ、GC 分析による結果は EN14105 メソッドの要件を超えるきわめて高い精度を示しました。

参考文献

1. DIN EN14105:2011-07 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, and triglyceride contents”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels.
2. “Automation of a Complex, Multi-Step Sample Preparation Using the Standalone Agilent 7696A WorkBench”, James D. McCurry, Agilent Technologies, Publication Number 5990-7525EN, March 1, 2011.
3. 「バッチモードによるサンプル前処理ワークベンチの機能向上」、Rebecca Veeneman、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9271JAJP、December 21, 2011.
4. 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いたジェット燃料中 FAME 汚染物質の GC/MS 分析」、James D. McCurry、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9717JAJP、January 12, 2012.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012
Printed in Japan
February 24, 2012
5990-9893JAJP



Agilent Technologies



環境

メソッドの QC 要件を上回る再現性の高い希釈と精製の自動化を実現

環境ラボでは、分析回数やサンプルの数が多いため、サンプル前処理手順でミスが発生しがちです。検量線の作成、内部標準やサロゲート標準の添加などに伴う単純なエラーを自動化によって防ぐことができます。場合によっては、油の精製も自動化できます。手間のかかる作業をワークベンチで自動化することで、分析者はより重要な作業に集中でき、ラボの生産性が向上します。

[目次に戻る](#)

[アプリケーションノートを見る](#)

環境



サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

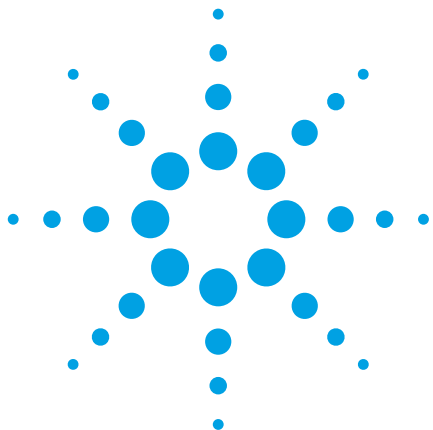
agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた たばこ油分析のための自動クリーンアップ.....	44
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた たばこ油中 PCB 抽出物の自動精製.....	50
Agilent J&W DB-35ms ウルトライナートカラムと DB-XLB カラムを用いた GC/ μ ECD による水サンプル 中塩素系殺虫剤および除草剤のサブ μ g/L 分析.....	56
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた EPA メソッド 8270 の分析品質保証 (AQA) 基準の作成.....	68
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用した GC/MS/MS によるエストロンの分析.....	72

[目次に戻る](#)

[アプリケーション分野の紹介に戻る](#)



Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた 鉱油分析のための自動クリーンアップ

アプリケーションノート

自動サンプル前処理

著者

Frank David、Karine Jacq、
Bart Tienpont
Research Institute for Chromatography,
President Kennedypark 26,
B-8500 Kortrijk, Belgium

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808,
USA

概要

水サンプル中の鉱油 (炭化水素油) の測定では、液液抽出後に Florisil を用いて抽出液のクリーンアップを行い、GC-FID で分析します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムを使えば、液液抽出後のサンプルの脱水とクリーンアップを自動化できます。鉱油画分を得るクリーンアップ工程はきわめて効率的に行うことができ、また、鉱油画分に関しては高い回収率と優れた再現性が得られます。抽出液の分析には GC-FID を使用します。LTM (低熱容量) システムを用いた GC との組み合わせにより、高スループットの自動メソッドが実現します。



Agilent Technologies

はじめに

ディーゼル油や潤滑油などの炭化水素オイルによる環境汚染は、GC-FID を用いて測定されます。このメソッドは、炭化水素オイルインデックス (HOI)、鉱油、または全石油系炭化水素 (TPH) の測定にも用いられ、環境分析におけるもっとも重要なアプリケーションのひとつです。水サンプルの前処理では、例えばヘキサンのような沸点 36 °C~69 °C の無極性 (炭化水素) 溶媒による液液抽出 (LLE) から始めます。次に、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水させた後、Florisil を通すことで、脂質といった強極性物質を抽出物から除去して、サンプルをクリーンアップします。その後、抽出液に N₂ ガスを吹き付けて濃縮 (または Kuderna-Danish 濃縮装置を利用) し、GC-FID で分析します [1]。

従来のカラムクロマトグラフィーや固相抽出の代わりに分散固相抽出 (d-SPE) を用いれば、クリーンアップ手順を最小化することができます。d-SPE では、少量の吸着剤をサンプルに添加します。マトリックス (この場合では LLE で共抽出された高極性物質) が吸着剤に結合し、溶液から除去されます。クリーンアップの効率を高めるためには、d-SPE の前に抽出液を脱水させる必要があります。

その後、鉱油抽出液を GC-FID で分析します。一般には、膜厚の薄い 10~30 m カラムを使用します。分析時間は 30 分ほどです。最近では、LTM (低熱容量) テクノロジーを用いれば、サンプルスルーブックが大幅に向上することが実証されています [2]。

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを用いて、炭化水素オイルインデックスの分析メソッドのうち、脱水および分散固相抽出手順を自動化する方法を紹介します。ワークベンチを使用する前に、LLE で得られた抽出液を、1~1.5 mL ほどに濃縮します (ロータリーエバポレーターや N₂ ガスなどを使用)。その後、硫酸ナトリウムを予め充填したオートサンプルバイアルを用いて、濃縮した抽出液を脱水させます。続いて、Florisil を充填したバイアルでクリーンアップを行います。最終的に得られた抽出液を、LTM テクノロジーを用いた高速 GC-FID で分析します。

実験手法

化学物質と分析用溶液

分析用の鉱油サンプルとして、ディーゼル油と潤滑油の 1:1 混合物 (シクロヘキサン中で各 5,000 µg/mL、cat no 31630、Restek、ベルフオンテ、米国) を使用しました。C10~C40 の偶数の n-アルカン標準物質 (ヘキサン中で各 50 µg/mL、cat no 31678、Restek) は、再現性試験に用いました。

ステアリン酸ステアリル (cat no 31860、Restek) を用いて、ISO 9377 メソッドの記載に従ったクリーンアップ手順の性能を確認しました。アセトン溶媒として 2,000 µg/mL になるように調整しました。

これらのストック溶液から、各 n-アルカン 5 ng/µL とステアリン酸ステアリル 80 ng/µL を含むキャリブレーション溶液をヘキサンで調整しました。また、鉱油 400 ng/µL とステアリン酸ステアリル 80 ng/µL を含むキャリブレーション溶液をヘキサンで調整しました。

ストック溶液から、アセトン溶媒に用いて 2 種類のスパイク溶液を準備しました。第 1 のスパイク溶液には、各 n-アルカン 50 µg とステアリン酸ステアリル 800 µg が添加されています。第 2 のスパイク溶液には、鉱油 4,000 µg とステアリン酸ステアリル 800 µg が添加されています。このスパイク溶液を水サンプル 900 mL に添加し、ヘキサン 50 mL で抽出しました。TurboVap を用いて、ヘキサン抽出液を窒素により 10 mL に濃縮しました。液液抽出の回収率を 100 % と仮定すると、ヘキサン抽出液 10 mL 中の濃度はキャリブレーション溶液と同じになります。この抽出液を複数のバイアルに分け、7696 ワークベンチメソッドの再現性試験を行いました。

無水硫酸ナトリウム (ACS グレード、cat no 23,931-3、Sigma-Aldrich、スタインハイム、ドイツ) を用いて、ヘキサン抽出液を脱水させました。クリーンアップ用の吸着剤には Florisil (cat no 03286-100G-F、Fluka、Sigma-Aldrich) を使用しました。Na₂SO₄ と Florisil はいずれも、予め 140 °C で一晩加熱しました。

まず、硫酸ナトリウム 20 mg (± 2 mg) を 1.5 mL 高回収率バイアルに加えました。このバイアルは Dry とラベルします。別の 1.5-mL 高回収率バイアルには、Florisil 30 mg (± 2 mg) を加えました。このバイアルは Clean-up とラベルします。すべてのバイアルにスクリュウキャップで蓋をし、吸湿を防ぎました。

サンプル前処理

水サンプルのヘキサン抽出液を 1.5 mL 高回収率バイアルに入れ (Sample とラベルします)、ワークベンチのトレイに配置しました。無水硫酸ナトリウム 20 mg を含む Dry バイアルと、Florisil 30 mg を含む Clean-up バイアル、200 µL インサートを備えた空のバイアル (Final とラベルします) もトレイに配置しました。

フロントタワーに 500 µL シリンジ、バックタワーに 250 µL シリンジを設置しました。シリンジ洗浄にはヘキサンを用いました。

7696 ワークベンチのリソースレイアウト例を図 1 に示します。Dry、Clean-up、Final バイアルの配置位置が反映されています。

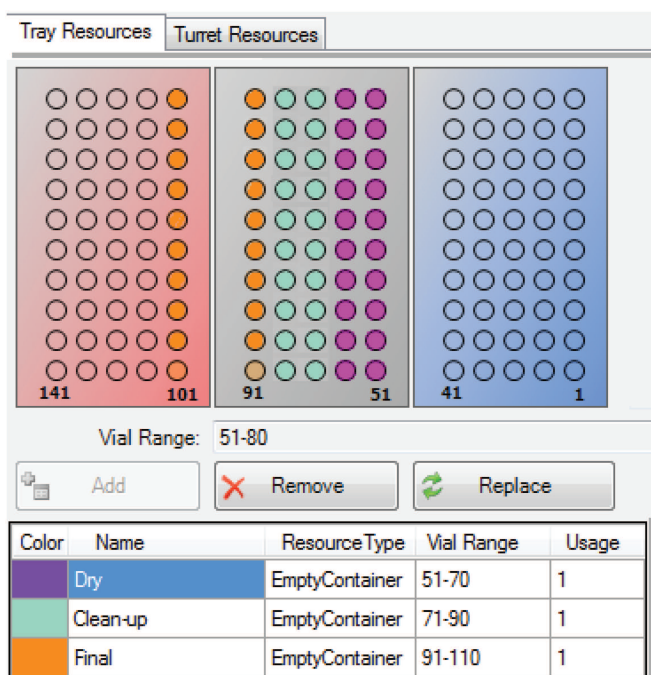


図 1. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチのリソースレイアウト

このワークベンチメソッドをまとめると、以下のようになります (コマンドを太字、コメントを細字で記載)。

1. **フロントタワーで Sample 500 μ L を Dry に添加**
(抽出液のアリコートに硫酸ナトリウムに添加)
2. **Dry を 1 分間混合**
(2,000 rpm、双方向、4 秒オン、1 秒オフ)
(混合により、サンプルと吸着剤を十分に接触させ、水分を除去)
3. **バックタワーで Dry 350 μ L を Clean-up に添加**
(脱水抽出液のアリコートを Florisil に添加)
4. **Clean-up を 1 分間混合**
(2,000 rpm、双方向、4 秒オン、1 秒オフ)
(混合により、サンプルと吸着剤を十分に接触させ、極性物質を除去)
5. **バックタワーで Clean-up 150 μ L を Final に添加**
(クリーンアップ後の抽出液を GC-FID 分析用のバイアルに移動)
6. **Final に結果フラグを立てる**
(前処理の終了したバイアルの位置を表示)

機器構成

分析には Agilent 7890 GC システムを使用しました。この GC は、SSL 注入口、LTM II オープンドア、FID を搭載していません。分離には 0.32 mm x 10 m、0.10 μ m DB-5HT カラム (製品番号 123-5701LTM) を使用しました。

分析条件を表 1 にまとめています ([2] も参照)。

表 1. 分析条件

注入	1 μ L、スプリットレス (パージ開始時間 0.4 分) 350 °C スプリット/スプリットレスライナ (製品番号 5183-4647)
キャリア	ヘリウム、9 mL/min コンスタントフロー
GC オープン温度	340 °C 一定
LTM	40 °C (0.5 min) – 200 °C/min – 240 °C – 100 °C/min – 340 °C (0.5 min) 分析時間: 3 分
FID	340 °C、H ₂ 40 mL/min、空気 400 mL/min

結果と考察

水サンプル中鉱油の測定の最初の手順は、液液抽出です。一般に、溶媒 50 mL (ヘキサン) を用いて大量のサンプル (900 mL) を抽出します。この手順は自動化できないため、従来の方法で行います。その後、得られた抽出液を濃縮します (例えば、Zymark 製 TurboVap を用いて窒素で乾燥させます)。濃縮したサンプル (1~2 mL) を 2 mL オートサンブラバイアルに移した後は、残りの工程を 7696 サンプル前処理ワークベンチが処理します。

Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで行われるサンプル前処理手順を図 2 に示します。最初のステップでは、ヘキサン抽出液のアリコートを硫酸ナトリウムで脱水させます。微量の水でも次のクリーンアップの性能を低下させるため、このステップは重要となります。その後、脱水抽出液のアリコートを、Florisil を入れたバイアルに移します。Florisil 吸着剤は、140 °C で活性化させ、残留する水を除去する必要があります。また、必要最小限の Florisil の量を確認するための試験も実施しました。使用量が 20 mg 未満の場合は、十分なクリーンアップ効率が得られませんでした。余裕をみて 30 mg (\pm 2 mg) が妥当な量であると判断しました。

Florisil 抽出液を攪拌した後、アリコートをした空のバイアルに移します (200- μ L インサート装備)。この抽出液を高速 GC-FID で分析します。バイアルには抽出液 150 μ L が入っているため、必要に応じて、このメソッドを大量注入と組み合わせることもできます。

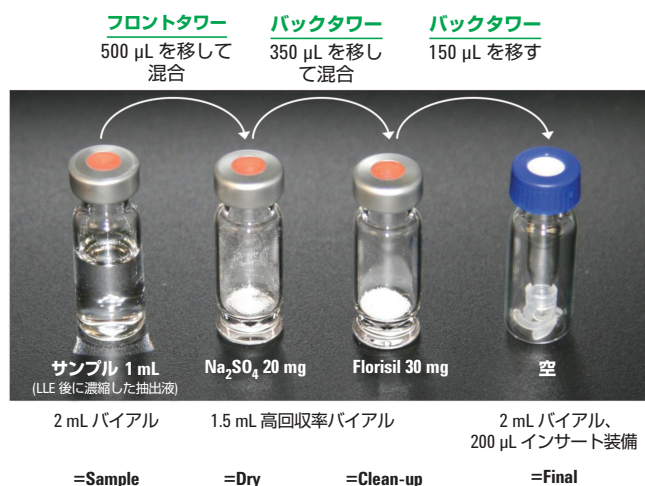


図 2. ワークベンチでの各ステップにおける 2 mL バイアルの写真

1. 濃縮後のヘキサン抽出液
2. Na_2SO_4 への抽出液の移動後 (脱水)
3. Florisil への抽出液の移動後
4. 最終抽出液

鉱油サンプルで得られた代表的なクロマトグラムを図 3 に示します。上図は、脱水・クリーンアップを行っていないサンプル (抽出液中 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から得られたクロマトグラムを示しています。鉱油サンプルには、一定量のステアリン酸ステアリル (抽出液中 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が添加されています。この化合物 (より極性の高いマトリックスの模倣剤として使用) は、C38 前後で溶出します。

脱水・クリーンアップを行ったサンプル (理論上は図 3 上図と同じ濃度) で得られたクロマトグラムを図 3 下図に示しています。鉱油に対して同じ分離プロファイルが得られていることが明らかにわかります。ステアリン酸ステアリルは、ほとんど (ピーク面積が脱水・クリーンアップしていないサンプルの 5% 未満) 除去されています。

再現性を評価するため、ヘキサン中にアルカン (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とステアリン酸ステアリル (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む 6 つのサンプルに、Agilent 7696 ワークベンチメソッドを適用しました。表 2 に、4 つの n-アルカンおよびステアリン酸ステアリルのピーク面積を示しています。RSD は概ね 1% 前後でした (C40 は 2.5%)。回収率 (脱水・クリーンアップを行ったサンプルと行っていないサンプルのピーク面積比) は 80% を上回りました。ステアリン酸ステアリルの回収率は 1.9% (n=6 の平均) で、5% を大きく下回りました。

表 2. n-アルカンおよびステアリン酸ステアリルのピーク面積の再現性 (n = 6) と、脱水・クリーンアップの有無を対比した回収率

化合物	平均レスポンス	SD	RSD (%)	回収率 (%)
C10	58.1	0.542	0.93	99.6
C20	62.7	0.612	0.97	99.8
C30	60.4	0.656	1.09	101.1
ステアリン酸ステアリル	16.0	2.792	(17.5)	1.9
C40	50.5	1.293	2.56	86.4

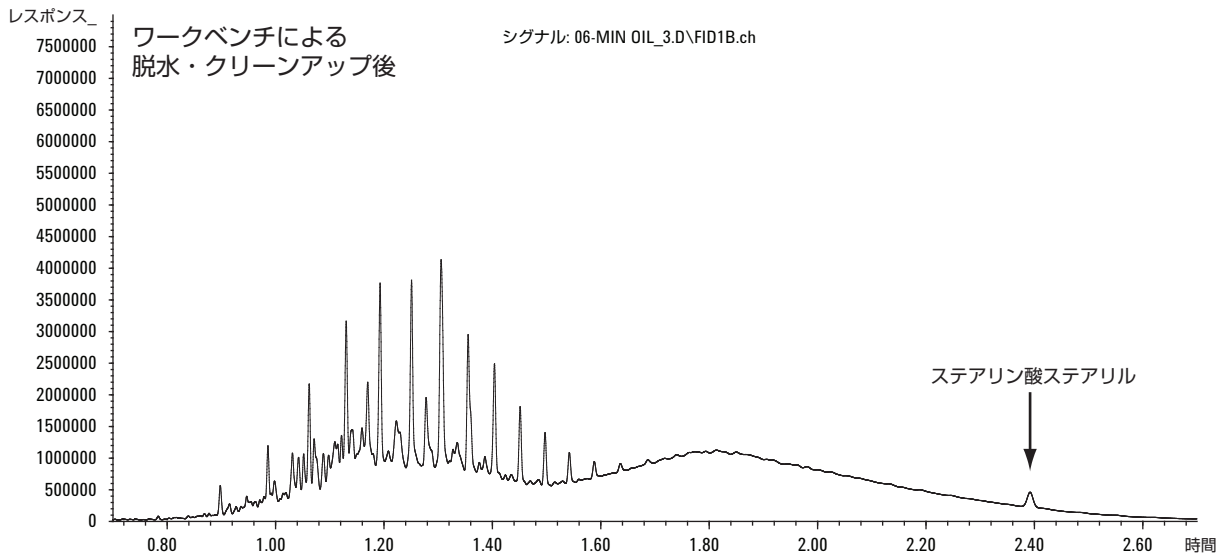
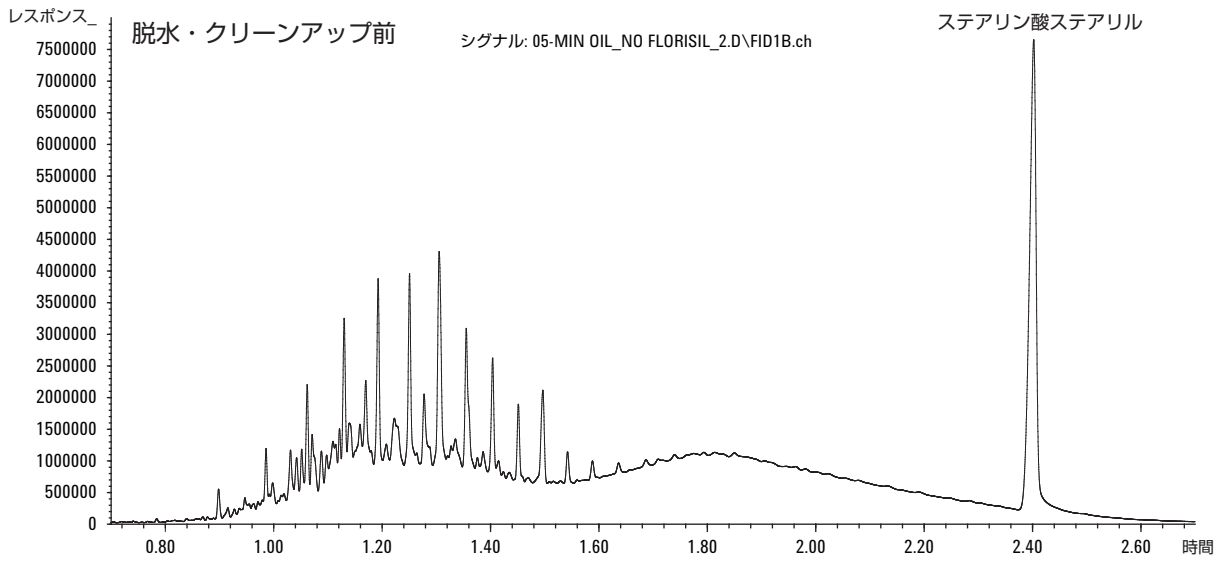


図 3. 石油系オイル 400 ng/μL とステアリン酸ステアリル 80 ng/μL の GC-FID クロマトグラム。上図：ヘキサン抽出物の脱水・クリーンアップ前、
下図：Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチシステムによるヘキサン抽出物の脱水・クリーンアップ後

鉛油 (400 µg/mL) とステアリン酸ステアリル (80 µg/mL) を含むヘキサン抽出液で、同じように再現性と回収率を評価しました。結果を表 3 にまとめます。

このデータは、鉛油ピークの面積和の再現性が全体的にきわめて優れている (RSD < 1 %) ことと、ステアリン酸ステアリルが効率的に除去されている (平均回収率 = 2.3 %, つまり 5 % 未満) ことを明らかにしています。鉛油画分の回収率は、95 % を上回りました (基準値 : 80 % < 回収率 < 110 %)。

表 3. 鉛油およびステアリン酸ステアリルのピーク面積の再現性 (n = 10) と、脱水・クリーンアップの有無を対比した回収率

	ピーク面積		回収率 (%)	
	鉛油	ステアリン酸ステアリル	鉛油	ステアリン酸ステアリル
脱水・クリーンアップなし	9342.0	895.4		
1	9760.9	20.6	104.5	2.3
2	9745.4	20.6	104.3	2.3
3	9602.1	19.7	102.8	2.2
4	9839.3	16.4	105.3	1.8
5	9841.8	23.0	105.3	2.6
6	9704.5	18.1	103.9	2.0
7	9800.4	16.6	104.9	1.8
8	9745.4	23.0	104.3	2.6
9	9735.6	19.6	104.2	2.2
10	9658.4	31.6	103.4	3.5
平均	9743.4	20.9	104.3	2.3
標準偏差	75.4		0.8	
RSD (%)	0.77		0.77	

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムを用いて、水サンプル中鉛油の測定における分散固相抽出クリーンアップメソッドを自動化しました。液液抽出によるヘキサン抽出物を脱水させ、クリーンアップしました。得られた抽出液を GC-FID で分析しました。

このメソッドでは、鉛油画分において高い回収率と優れた再現性が得られると同時に、クリーンアップもきわめて効率的に行うことができます。LTM (低熱容量) GC との組み合わせにより、高スループットのメソッドが実現します。

参考文献

1. International standard ISO 9377-2, Water Quality, Determination of hydrocarbon oil index, part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography, 2000.
2. F. David, K. Jacq and R.L. Firor, Agilent LTM II (Low Thermal Mass : 低熱容量) システムを用いたハイスループット鉛油分析、9/2011、アジレント・テクノロジー 資料番号 5990-9104JAJP

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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は、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., 2011

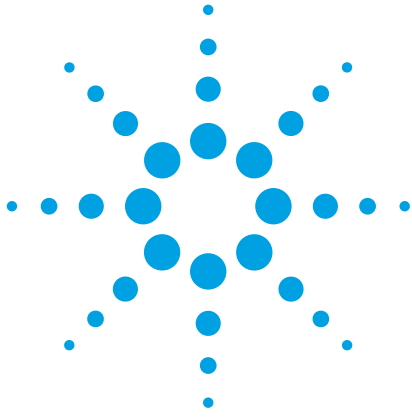
Printed in Japan

October 11, 2011

5990-9163JAJP



Agilent Technologies



Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた 廃油中 PCB 抽出物の自動精製

アプリケーションノート

自動サンプル前処理

著者

Frank David、Bart Tienpont、Karine Jacq
Research Institute for Chromatography
Pres. Kennedypark 26,
B-8500 Kortrijk,
Belgium

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808
USA

概要

石油由来の廃油や変圧器油、鉱油を含む固形廃棄物は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 含有の有無が調査されます。この分析は一般に、カラムクロマトグラフィー、固相抽出 (SPE)、または分散固相抽出 (d-SPE) による精製後に、GC-ECD または GC-MS により分析されます。シリカまたは酸性シリカでの精製では、PCB に干渉し、分析システムを汚染する可能性のある極性成分が除去されます。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムにより、 $\text{SiOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 吸着剤を用いた分散 SPE メソッドを自動化しました。このメソッドでは、抽出物を効率的に精製し、高い再現性を得ることができます。GC-ECD、GC-MS、GC-MS/MS と組み合わせ、さらにバックフラッシュを使用すれば、廃油中 PCB の正確な自動測定が可能になります。



Agilent Technologies

はじめに

鉱油、変圧器油、廃油、などに含まれるポリ塩化ビフェニル (PCB) の測定は、環境ラボで一般的におこなわれているルーチンアプリケーションです。オイルの希釈/溶解後、サンプル精製によりマトリックスの大半を除去します。精製メソッドは一般に、従来のカラムクロマトグラフィーや固相抽出 (SPE) をベースにしています。廃油 (鉱油) 中 PCB の測定には、複数の SPE メソッドが適用され、専用のカートリッジも提供されています。たとえば、EN 12766 では、酸性シリカ/アニオン交換 (SiOH-H₂SO₄/SAX) とシリカ (SiOH) の組み合わせが用いられます。油サンプルをヘキサン溶液中でカートリッジにとおせば、PCB フラクションがすぐにヘキサンとともに溶出します。極性のあるマトリックス成分は、SPE カートリッジ上に残ります [1]。

分散固相抽出を用いれば、固相抽出メソッドを最小限の手順で簡略化することができます [2]。SPE との違いは、吸着剤を抽出液に添加し、サンプルを混合することです。極性のマトリックス成分は活性の高い吸着剤と結合し、無極性の溶質は溶液中にとどまります。同様のアプローチは、農薬分析で広く用いられる QuEChERS 法でも使われています [3]。

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを用いて、分散 SPE メソッドを簡略化および自動化できることを実証します。オイルと PCB を含む抽出液/溶液から一定分量を、あらかじめ計量した吸着剤の入ったバイアルに移します。このバイアルを攪拌し、シリカの入った別のバイアルに上澄みを移し、さらに精製したのち、PCB フラクションの一定分量を空のバイアルに移して、GC-ECD、GC-MS、GC-MS/MS で分析します。

この精製手順では、極性のマトリックス成分が除去されるため、PCB 抽出液には無極性のマトリックス成分が残されています。これらの成分は、PCB 測定にそれほど影響しませんが、特に分子量の大きい物質は、分析システムに蓄積したり、カラムやイオン源を汚染したりすることがあります。そのため、アプリケーションノート 5989-7601 EN で示されているように、バックフラッシュを使用することを推奨します [4]。

実験

試料

BCR 標準サンプルを用いて、精製メソッドを評価しました。BCR-449 (IRMM、ヘール、ベルギー) は、高濃度 (mg/kg) の PCB を含む廃油サンプルです。この油から、100 mg/mL のヘキサン溶液を調製しました。

内部標準物質として、オクタクロロナフタレン シグマアルドリッチ、ベアアセ、ベルギー) を使用しました。10 ppm のイソオクタン溶液を使用しました。

次の 3 種類の吸着剤を使用しました : 44 % H₂SO₄ コーティングシリカゲル (cat no 21334-U、Supelco、ベルフォンテ、ペンシルベニア州、米国)、Discovery DSC-SAX (cat no 57214-U、Supelco)、洗浄シリカゲル (cat no 21342-U、Supelco)。1 つ目の 2 mL バイアルには、H₂SO₄ コーティングシリカ 100 mg と SAX 100 mg を添加しました。これらのバイアルに SiH というラベルを貼りました。2 つ目の 2 mL バイアルには、洗浄シリカゲル 100 mg を添加しました。これらのバイアルには SiOH というラベルを貼りました。すべてのバイアルにスクリュューキャップで蓋をして、湿気から保護しました。重量はすべて 100 mg で、精度は ± 5 mg です。

サンプル前処理

廃油溶液の一定分量をピペットで 2-mL バイアルに移しました (サンプル)。最終的には、100- μ L インサートを入れたバイアルを使用します。酸性シリカ/SAX を含む 2 mL バイアル (SiH) とシリカを含む 2 mL バイアル (SiOH) もラックに入れ、100- μ L インサートを入れた空のバイアル (最終抽出液用) と、ヘキサン溶液のバイアル (ケミカルリソース)、内部標準溶液を含むバイアル (ケミカルリソース) も配置しました。7696 ワークベンチの設定例を図 1 に表します。

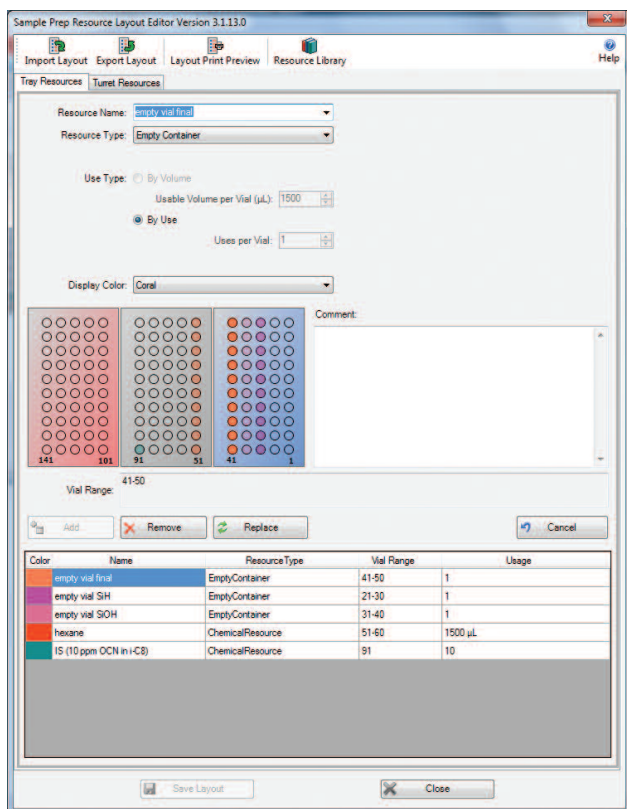


図 1. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチの設定例

ワークベンチのメソッドをまとめると、次のようになります。

- 1 **フロントタワーでサンプル 50 μ L (ヘキサン中 10 % 廃油) を SiH に添加**
(サンプルのフラクションを、酸性シリカと SAX を含むバイアルに添加)
- 2 **フロントタワーでヘキサン 1,350 μ L を SiH に添加**
(さらにヘキサン溶液を添加)
- 3 **フロントタワーで IS 150 μ L を SiH に添加**
(内部標準を添加、最終容量は 1.5 mL、油 5 mg および IS 1,500 ng に相当)
- 4 **SiH を 4,000 RPM で 5 分間攪拌**
(攪拌により、吸着剤とサンプルが十分に混合されます)
- 5 **2 分間放置**
(これにより、極性フラクションが吸着剤と結合します)
- 6 **フロントタワーで SiH 1,000 μ L を SiOH に添加**
(上澄みを 2 番目の精製バイアルに移送)
- 7 **SiOH を 4,000 RPM で 5 分間攪拌**
(攪拌により、吸着剤とサンプルが十分に混合されます)
- 8 **2 分間放置**
(これにより、極性フラクションが吸着剤と結合します)
- 9 **フロントタワーで SiOH 200 μ L を最終バイアル (Vial final) に添加**
(精製した抽出液を、インサートを入れたたバイアルに移送)
- 10 **最終バイアルを表示**

機器構成

分析には、Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS システムを使用しました。この GC は、MMI 注入口を搭載しています。分離には 0.25 mm x 30 m、0.25 μm DB-5MS カラム (p/n 122-5532) を使用しました。カラムのアウトレットに、一定圧力 28 kPa で Quick-Swap コネクタを接続しました。MS トランスファーラインのフューズドシリカリストリクタは 0.17 m x 110 μm です。

分析条件を表 1 にまとめました。

表 1. 分析条件

注入方式	1 μL、パルスドスプリットレス
注入口温度	85 °C (0 分) – 720 °C/min – 325 °C (5 分)
キャリアガス	ヘリウム、1 mL/min コンスタントフロー バックフラッシュ時: –2 mL/min
オープン温度	80 °C (1 分) – 10 °C/min – 305 °C – 7.5 分維持
MS	MRM モード CE 25 V、1 トランジションあたりのドウェルタイム 100 ms トリクロロビフェニル: 256.0 > 186.0、258.0 > 186.0 テトラクロロビフェニル: 293.8 > 222.0、291.8 > 222.0 ペンタクロロビフェニル: 325.8 > 256.0、327.8 > 256.0 ヘキサクロロビフェニル: 359.9 > 289.9、361.9 > 289.9 ヘプタクロロビフェニル: 393.8 > 323.8、395.8 > 323.8 オクタクロロナフタレン (IS): 404.0 > 404.0 (CE OV)

バックフラッシュ 23.5 分で開始

結果と考察

Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチでおこなったサンプル前処理手順を図 2 に示します。廃棄鉛油の溶液は、油成分が存在するため、暗い茶色をしています。このサンプルから油 5 mg に相当する分量を、SiOH/H₂SO₄100 mg と SAX 吸着剤 100 mg を含むバイアルに移すと、溶液は透明度を増し、吸着剤が黒くなります。この手順は、マトリックスの大部分を除去するため、きわめて重要です。2 番目の精製手順では、残留しているコンタミ物質の一部をシリカ材で除去します。最後に、フラクションをインサートバイアルに移します。この溶液は透明です。この色は、精製が効率的におこなわれたことを示しています。

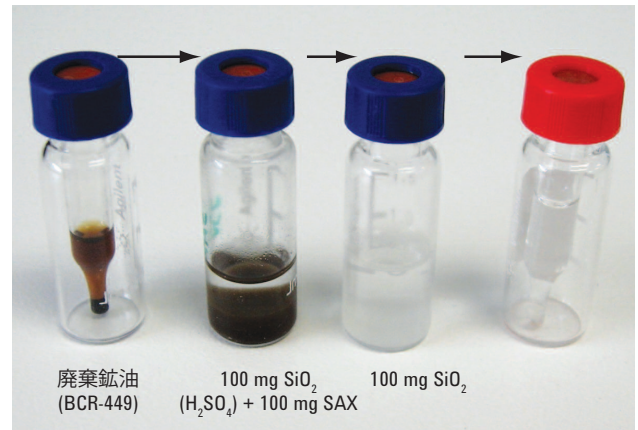


図 2. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチの各精製手順における 2 mL バイアルの写真

図 2 の左から右の各バイアルについて：

1. ヘキサン中廃油の原液
2. SiH への廃油移送後 (コンタミ物質が酸性シリカ/SAX に結合)
3. SiOH バイアルへの抽出物移送後
4. 最終抽出液

得られた抽出液を GC-MS/MS で分析しました。前述のサンプル前処理メソッドに従って処理した標準サンプル BCR-449 の 5 つの分液から得られたクロマトグラム (MRM の TIC) を図 3 に示しています。内部標準は 22.8 分で溶出しています。PCB は容易に検出することができます。このクロマトグラムから、再現性がきわめて良好であることがわかります。

表 2 に、6 種類のターゲット化合物における相対ピーク面積の再現性を示しています。RSD % は 5 % 前後でした。

表 2. 相対ピーク面積の再現性

化合物	RT (分)	相対面積 (化合物/IS)	RSD (%)
PCB52	15,463	0,027	4,51
PCB101	17,151	0,037	6,10
PCB118	18,326	0,105	9,76
PCB153	18,731	0,086	4,54
PCB138	19,246	0,095	5,58
PCB180	20,448	0,026	4,03
OCN (IS)	22,849		

GC-ECD 分析や GC-MSD 分析でも、同様の結果が期待できます。

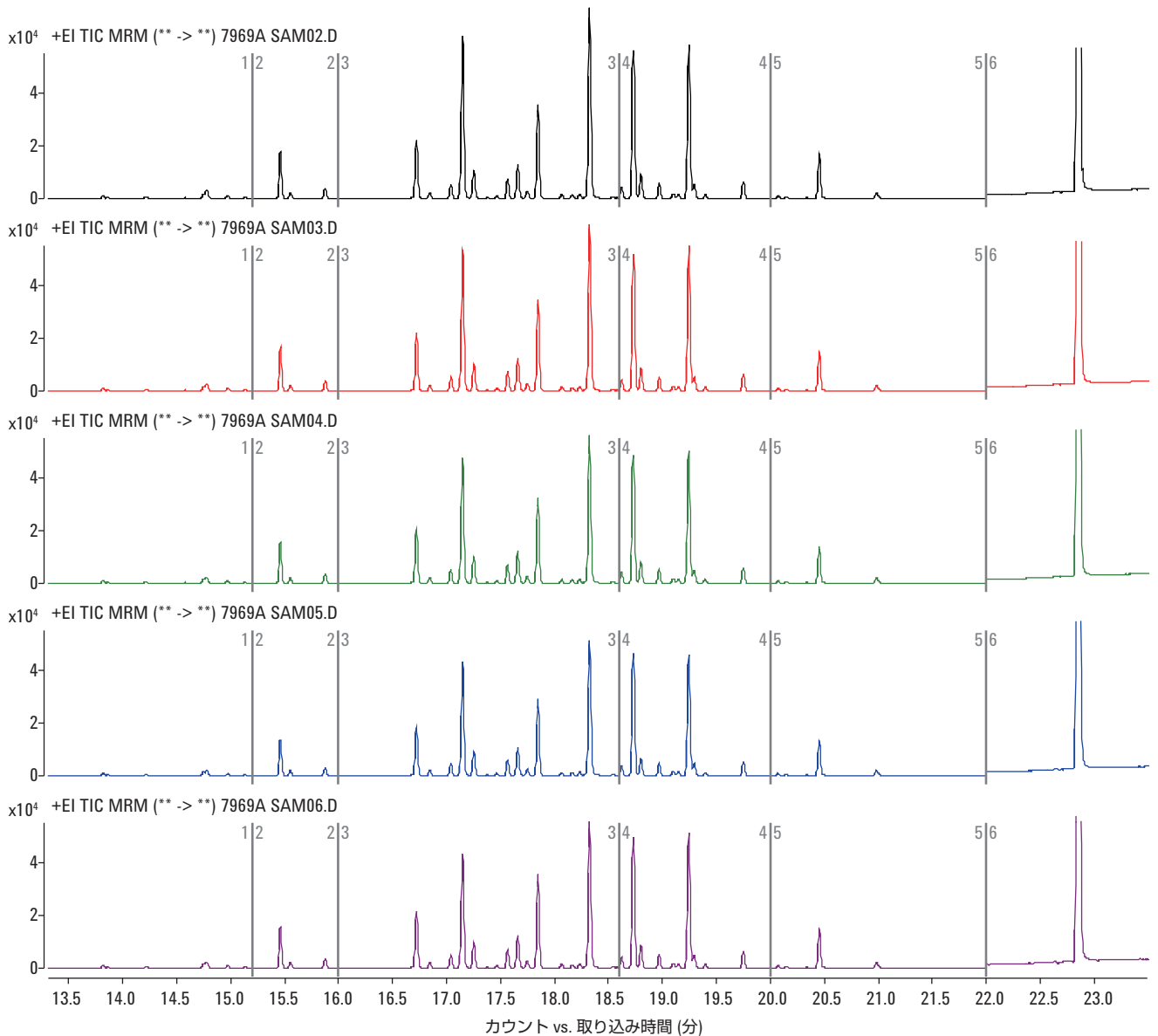


図 3. 廃油中 PCB 抽出液の MRM モード GC-MS/MS 分析で得られた TIC クロマトグラム

ただし、PCB フラクションのなかには、まだ無極性マトリックス成分が存在していることに留意する必要があります。これらの化合物は、各種の吸着剤では除去されません。GC-ECD や、SIM モードの GC-MS、MRM モードの GC-MS/MS といった分析では、これらが同時に抽出された場合は検出されません。しかし、こうした物質は、注入口やカラムを汚染し、最終的には検出器も汚染することがあります。そのため、参考文献 [4] で示されているように、バックフラッシュの使用を推奨します。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムを用いて、廃棄鉱油中 PCB 測定における分散 SPE メソッドを自動化しました。SiOH/H₂SO₄ + SAX 吸着剤を用いた 2 ステップの d-SPE の後に、シリカ吸着剤を使用しました。抽出物は効果的に精製され、高い再現性が得られました。GC-MS または GC-MS/MS と組み合わせ、さらにバックフラッシュを使用すれば、廃油中 PCB の正確な自動測定が可能になります。

参考文献

1. Information on sample preparation and analysis of PCBs in waste oils can be found in reference methods DIN EN 12766 and DIN EN 61619.
2. P. Sandra and F. David, The 1999 Belgian Dioxin Crisis: the Need to Apply State-of-the-Art Analytical Methods. Chapter 40 (pages 643–652) in A Century of Separation Science, Ed. H.J. Issaq, Publisher: Marcel Dekker, New York, 2002, ISBN 0-8247-0576-9
3. For more information on QuEChERS:
<http://quechers.cvua-stuttgart.de/>
4. F. David and M.S. Klee, GC/MS Analysis of PCBs in waste Oil Using the Backflush Capability of the Agilent QuickSwap Accessory, 11/2007, Agilent application note 5989-7601 EN

詳細情報

本書に記載のデータは、代表的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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., 2011

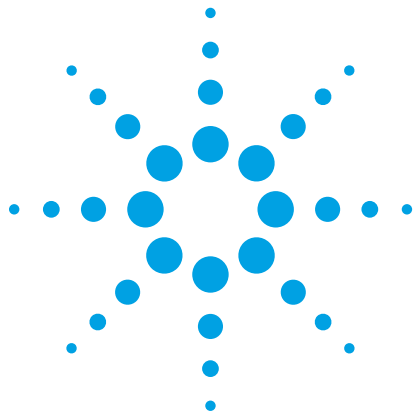
Printed in Japan

October 11, 2011

5990-9164JAJP



Agilent Technologies



Agilent J&W DB-35ms ウルトライナートカラムと DB-XLB カラムを用いた GC/ μ ECD による水サンプル中 塩素系殺虫剤および除草剤の サブ μ g/L 分析

アプリケーションノート

環境

著者

Doris Smith、Ken Lynam
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808

概要

Agilent SPEC C18AR 液固抽出 (LSE) ディスクを用いて、水サンプル中の塩素系殺虫剤および除草剤を抽出しました。その後、Agilent J&W DB-35ms ウルトライナート (UI) 一次カラムと DB-XLB 確認カラムを用いたデュアルカラム GC/ μ ECD 分析をおこないました。この方法を使えば、規定の最大汚染濃度以下の塩素系化合物において、高感度で一貫した分析をすることが可能です。メソッドのキャリブレーション範囲は 1~100 ng/mL で、これは予想される分析対象物の抽出濃度に対応しています。濃度 0.01 μ g/L で分析対象物を添加した水サンプルと水道水サンプルを抽出および分析し、このアプリケーションの効率を検証しました。

はじめに

殺虫剤と除草剤は、農業環境や居住環境で一般的に用いられています。残留農薬は、多くの環境水や地表水で検出されます。こうした残留農薬は、農薬使用場所からの流出や土壌からの地下水への浸出により、水源に侵入します。農薬は環境や健康に深刻な影響をおよぼすことから、汚染された飲料水の摂取による人体への影響が懸念されています。長期的な農薬への曝露による健康被害としては、肝臓疾患、癌のリスクの上昇などが指摘されており、最近の研究では、内分泌障害に関する懸念も高まっています [1,2]。欧州連合 (EU) および米国環境保護庁 (EPA) は、飲料水中の最大農薬濃度に関する規則を定めています [2,3,4]。



Agilent Technologies

信頼できる分析結果を一貫して得るためには、カラムとライナの不活性が重要です。特に、エンドリンや DDT などの分析困難な農薬は、注入口やカラムの活性部位との相互作用の影響を受けやすくなります [5,6]。現行規則で求められる微量濃度の検出を正確におこなうためには、フローパスの活性を最小限に抑える必要があります。このアプリケーションでは、Agilent ウルトライナートカラムおよびライナを用いて、サンプルフローパスの不活性を確保しています。

塩素系農薬の定量は、デュアルカラムアプローチを用いた GC/μECD によりおこなわれました。Agilent J&W DB-35ms ウルトライナート GC カラムを一次分析カラムとして使用し、一次カラムよりも固定相の極性が低い Agilent J&W DB-XLB カラムで確認分析をおこない、分析対象物の検出結果を確認しました。

DB-35ms UI は、塩素系農薬に対する優れた感度を備えており、EPA 508.1 メソッド [7] の対象となる 37 種類の殺虫剤および除草剤すべてを効率的に分離できます。EPA 508.1 メソッドでは、内部標準としてペンタクロロニトロベンゼン、サロゲート標準として 4,4'-ジプロモビフェニルの使用が推奨されています。この 2 つの化合物は分析対象物と共溶出するため、CLP 農薬分析で一般的に用いられる 2 つのサロゲート標準 (テトラクロロ-m-キシレン (TCMX) とデカクロロビフェニル) に変更し、アプリケーションを修正しました。これらのサロゲート標準は、農薬から良好に分離されます。

キャリブレーション用標準の前処理には、多くの時間とリソースを費やす必要が生じることがあります。また、手動サンプル前処理では、エラーが生じやすく、再現性や精度が低下することがあります。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使えば、多くのサンプル前処理作業を自動化し、溶媒の使用量や分析時間を大幅に削減することが可能です。Agilent 7696A ワークベンチについては、複数のサンプルアプリケーションにおいて、ばらつきやエラーを低減しながら、高い精度と再現性を得られることが実証されています [8,9,10]。

液固抽出を用いて、水サンプルから塩素系殺虫剤および除草剤を抽出しました。ターゲット農薬は微量レベルで存在しているため、検出可能濃度の農薬を抽出するためには大量のサンプルが必要となります。現行のメソッド手順のサンプル量は 1 L ですが、この量で通常のカートリッジ抽出を用いると、長い時間がかかることとなります。Agilent SPEC C18AR 47 mm LSE ディスクを使えば、ターゲット農薬を効率的に保持しながら、サンプル抽出を高速化することが可能です。

実験手法

この研究では、デュアル μECD 検出および Agilent 7683B オートサンブラを搭載した Agilent 7890A シリーズ GC を使用しました。不活性ティー (継手) を使用し、一次カラムと確認カラムに 1:1 でフローを分割しました。表 1 に、分析に用いたクロマトグラフィー条件をまとめています。表 2 にフローパス消耗品、表 3 にサンプル前処理補用品を記載しています。

表 1. クロマトグラフィー条件

カラム 1	Agilent DB-35ms UI 30 m x 0.32 mm, 0.25 μm (p/n 123-3832UI)
カラム 2	Agilent DB-XLB 30 m x 0.32 mm, 0.5 μm (p/n 123-1236)
GC/μECD	Agilent 7890 シリーズ GC
サンブラ	Agilent 7683 オートサンブラ、5.0 μL テーパードシリンジ (p/n 5181-1273)
CFT デバイス	不活性ティー (p/n G3184-60065)
スプリット比	1:1
リテンション	5 m x 0.32 mm id 不活性フューズドシリカチューブ
ギャップ	
注入口	2 μL スプリットレス、250 °C
バージ流速	0.5 分で 60 mL/min
キャリア	ヘリウム、平均速度 35 cm/s、80 °C
オープン	80 °C (0.5 分)、26 °C/min で 80 °C~175 °C、6.5 °C/min で 175 °C~235 °C、15 °C/min で 235 °C~300 °C (6 分)
μECD	340 °C、 コンスタントカラム+ メイクアップ (N ₂) = 30 mL/min

表 2. フローパス消耗品

バイアルとキャップ	MS 認定茶色クリンプトップガラスバイアルおよびキャップキット (p/n 5190-2283)
バイアルインサート	250 μL ガラス/ポリマーバイアルインサート (p/n 5181-8872)
シリンジ	5 μL テーパード (p/n 5181-1273)
セプタム	アドバンストグリーン (p/n 5183-4759)
注入口ライナ	ウルトラライナートシングルテーパーライナ (p/n 5190-2292)
フェラル	0.5 mm id ショート、85/15 ベスベル/グラファイト (p/n 5062-3514)
CFT フィッティング	インターナルナット (p/n G2855-20530)
CFT フェラル	SilTite フェラル、0.32 mm id (p/n 5188-5362)
20 倍拡大鏡	20 倍拡大鏡ループ (p/n 430-1020)

表 3. サンプル前処理補用品

SPEC ディスク	Agilent SPEC C18AR 47 mm (p/n A74819)
SPEC マニホールシステム	SPEC 6-ポジションマニホール (p/n A712) SPEC ディスクホルダ (p/n A713) SPEC 1 L フラスコ (p/n A714)

試薬と化学物質

すべての試薬と溶媒は、ACS または Ultra Resi グレードのものを使用しました。JT Baker の酢酸エチル (EtOAc)、メタノール (MeOH)、塩化メチレン (MeCl₂) を VWR International (ウェストチェスター、ペンシルベニア州) から購入しました。塩酸 (HCl) と亜硫酸ナトリウム (Na₂SO₃) を Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入しました。EPA 508.1 分析対象物およびサロゲート標準を Ultra Scientific (ノースキングスタウン、ロードアイランド州) から購入しました。

溶液と標準物質

濃度 50 mg/mL の亜硫酸ナトリウム水溶液を作成しました。残留塩素を還元するために、サンプル採取の際にこの溶液をサンプルに添加しました。各溶液を等量で混合し、1:1 EtOAc:MeCl₂ 溶液を作成しました。

冷却バス中で水およそ 22 mL が入った 50 mL 計量フラスコに塩酸 25 mL を 1 滴ずつ加え、6 N HCl 溶液を作成しました。溶液を室温に戻したのち、水で容量いっぱいまで希釈し、よく混合しました。

市販の前処理済み農薬原液を用いて、分析対象物の濃度が 1 µg/mL となるように酢酸エチルで希釈し、分析対象物の一次希釈標準を作成しました。この溶液を用いて、メソッド分析用の試薬水サンプルを作成しました。酢酸エチル中 1 µg/mL の濃度でサロゲート標準を作成し、抽出前に水サンプルに添加しました。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、濃度 1~100 ng/mL の範囲で、純分析対象物とサロゲート標準から酢酸エチル中でキャリブレーション用標準を作成しました。

サンプル前処理

Agilent SPEC C18AR 47 mm 液固抽出ディスクを用いて 1 L の水サンプルを抽出しました。GC 分析前に抽出物を乾燥させ、濃縮させました。図 1 に LSE サンプル前処理手順を示しています。

水 1 L を採取し、50 mg/mL Na₂SO₃ 水溶液 1 mL を加え、残留している遊離塩素を還元しました。6 N HCl を用いて、サンプルの pH を pH 2 以下に調整しました。品質管理サンプルに適量の添加溶液を添加し、分析対象物濃度が 0.01 µg/L の QC サンプルを作成しました。

真空マニホールシステムを組み立てたのち、しわのあるほうが上になるようにしてフィルター上に SPEC ディスクを設置しました。1:1 EtOAc:MeCl₂ 5 mL を添加し、ディスクを 1 分間浸したのち、真空下でゆっくりと吸引しました。次に、MeOH 5 mL をディスクに添加し、再びゆっくりと吸引しました。ディスクの乾燥を防ぐために、ディスク表面に層が残るようにしました。その後、試薬水 5 mL でディスクを洗浄し、真空下で吸引しました。このときも、ディスク表面に層が残るようにしました。

MeOH 5 mL を水サンプル 1 L に添加し、よく混合しました。適量のサロゲート標準添加溶液を添加し、サンプルを振とうしました。約 75~100 mL/min の速度で抽出ディスクに水サンプルを通過させました。その後、約 10 分間、ディスクに空気を通過させ、ディスクを乾燥させました。

ろ過用ガラス容器を取り外し、コレクションチューブの入ったフラスコに交換しました。フリット底のドリップチップの周囲にチューブがフィットしていることを確認し、ろ過装置を再び組み立てました。サンプル容器を EtOAc 5 mL で洗浄し、使い捨てピペットを用いてディスクに移しました。溶液を真空下できわめてゆっくりと吸引しました。MeCl₂ 5 mL を用いて、容器洗浄手順を繰り返しました。ガラス製の使い捨てピペットを用いて、2 ポーションの 1:1 EtOAc:MeCl₂ 3 mL でろ過リザーバーを洗浄しました。

無水硫酸ナトリウム 5~7 g が入ったガラス製乾燥チューブに溶離液を通過させました。2 ポーションの 1:1 EtOAc:MeCl₂ 3 mL で乾燥チューブを洗浄しました。抽出物と洗浄液を遠心分離管に集め、Labconco CentriVap 遠心濃縮機 (78100 シリーズ) を用いて約 0.8 mL に濃縮させました。濃縮の際、チューブの内壁を EtOAc で 2~3 回洗浄しました。最終抽出液量が 1.0 mL になるように EtOAc で調節し、GC 分析用のオートサンブラパイアルに移しました。

サンプル抽出手順

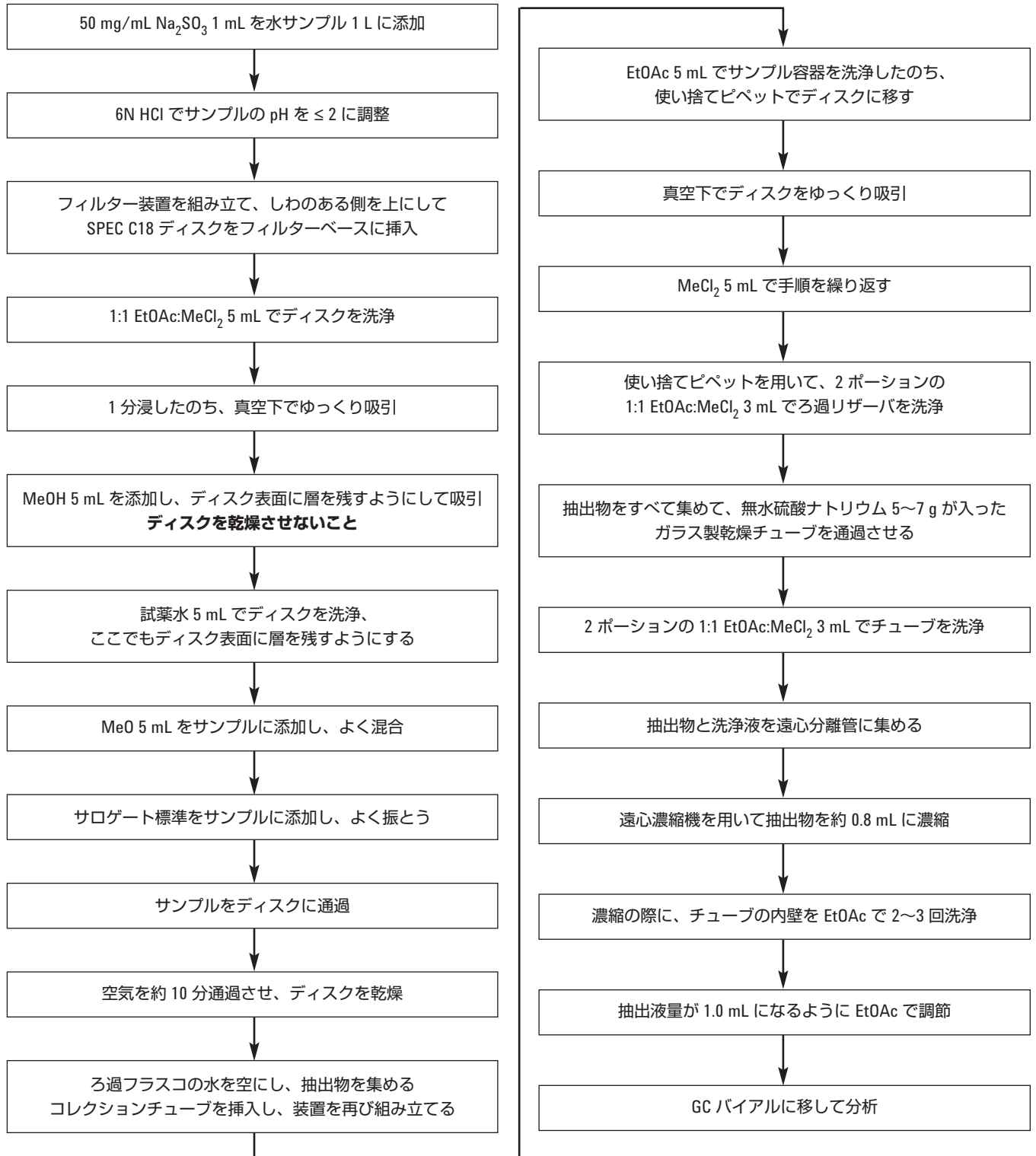


図 1. 水サンプル中塩素系農薬抽出のフローチャート

結果と考察

Agilent DB-35ms UI 一次カラムと Agilent DB-XLB 確認カラムを用いて、37 種類のターゲット塩素系殺虫剤および除草剤を 23 分未満で分離できました。図 2 は、酢酸エチル中で作成した 50 ng/mL 標準のデュアルカラム GC/μECD クロマトグラムを示しています。図

3 のクロマトグラムの拡大図からは、DB-35ms UI カラムを用いて分析した 10 ng/mL EPA 508.1 標準のピークレスポンスと分離能が優れていることが見てとれます。図 4 は、DB-XLB カラムの分離と選択性の違いを示しています。この違いは、確認カラムとしての利点を実証しています。

EPA 508.1 塩素系殺虫剤および除草剤の分離

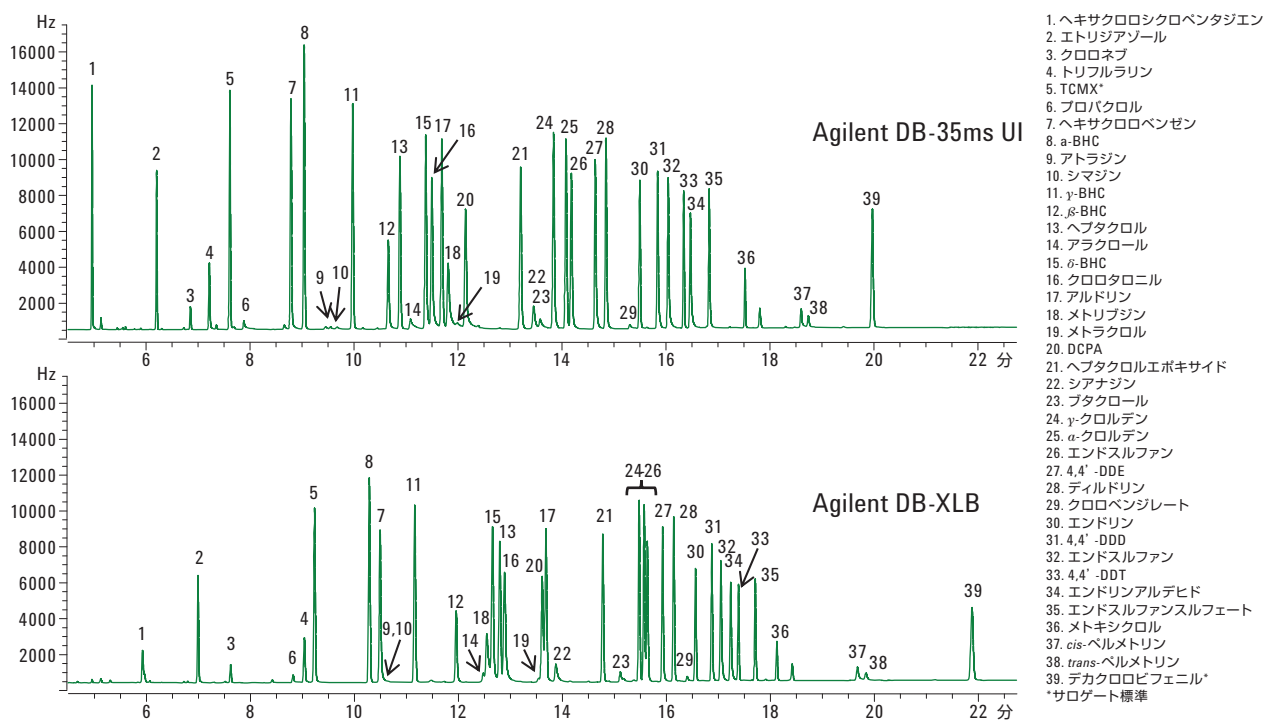


図 2. Agilent J&W DB-35ms UI 30 m x 0.32 mm、0.25 μm カラム (p/n 123-3832UI) と DB-XLB 30 m x 0.32 mm、0.5 μm カラム (p/n 123-1236) を用いて分析した 50 ng/mL 農薬標準の GC/μECD クロマトグラム。標準物質は Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて酢酸エチル中で作成。クロマトグラフィー条件は表 1 を参照

Agilent DB-35ms UI における EPA 508.1 低濃度農薬のピーク形状と分離能

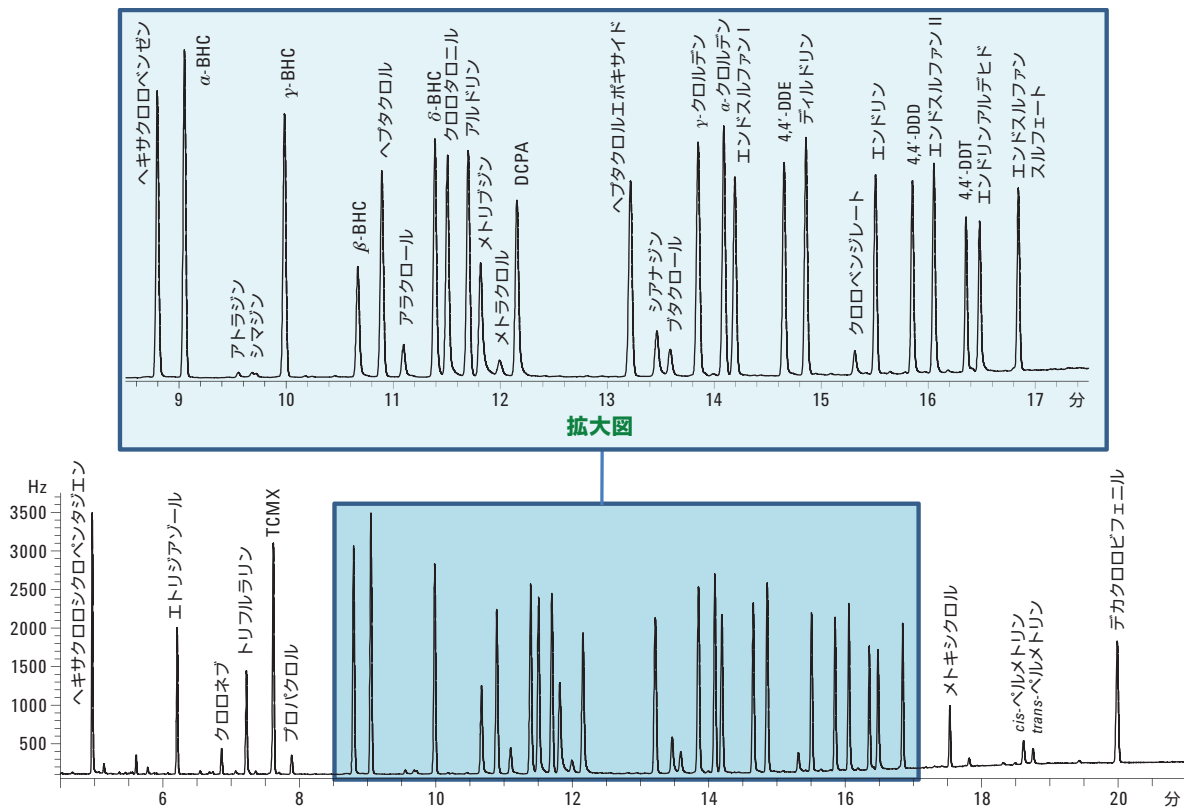


図 3. Agilent J&W DB-35ms UI 30 m x 0.32 mm, 0.25 μ m カラムを用いて分析した 10 ng/mL 塩素系農薬標準の GC/ μ ECD クロマトグラムの拡大図。クロマトグラフィー条件は表 1 を参照

Agilent DB-XLB における EPA 508.1 低濃度農薬のピーク形状と分離能

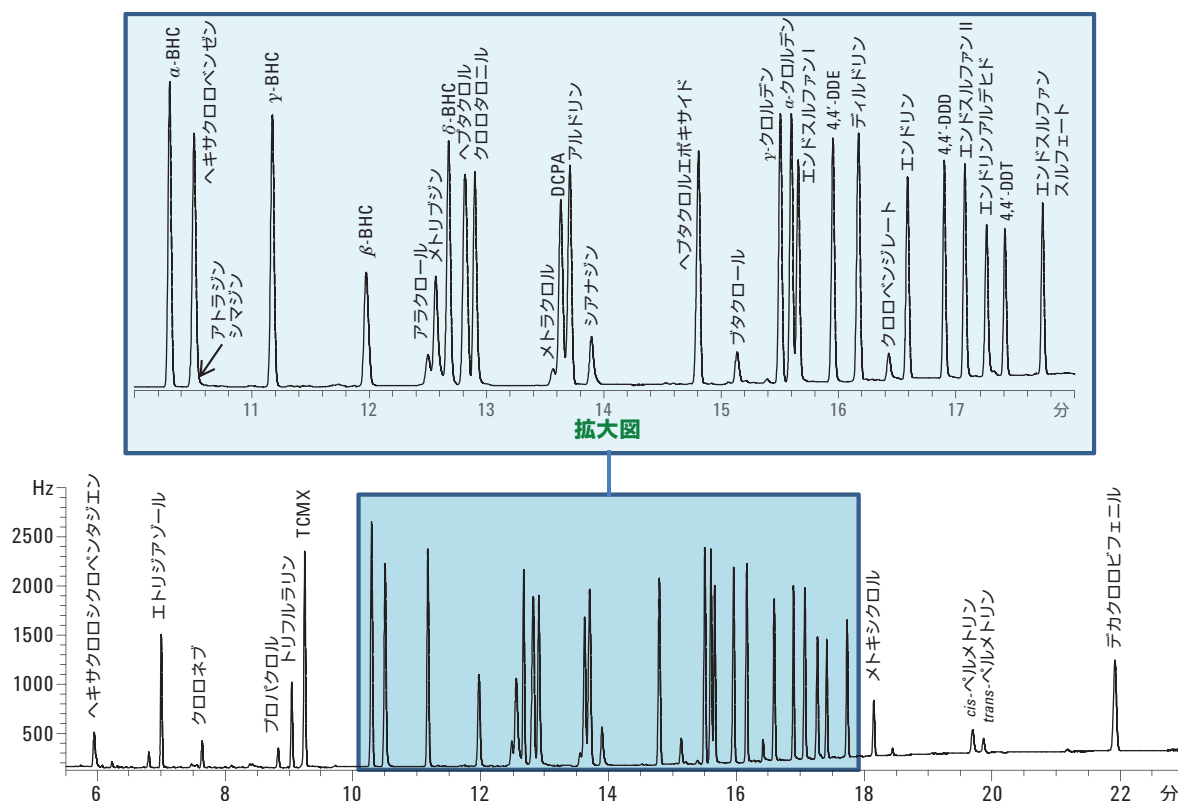


図 4. Agilent J&W DB-XLB 30 m x 0.32 mm, 0.5 μm カラムを用いて分析した 10 ng/mL 塩素系農薬標準の GC/μECD クロマトグラムの拡大図。クロマトグラフィー条件は表 1 を参照

7ポイント検量線を作成し、メソッドの直線性を評価しました。検量線の相関係数 (R^2) として定義される直線性を調べれば、ガスクロマトグラフィーカラムの性能を評価できます。市販の前処理済み酢酸エチル中標準を適切に希釈し、7つの濃度のキャリブレーション用溶液を作成しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、濃度 1、2.5、5、10、25、50、100 ng/mL のキャリブレーション用標準を前処理しました。

レスポンスの非直線性は、注入口やカラムの不具合や吸着の指標となります。Agilent DB-35ms UI カラムと Agilent DB-XLB カラムでは、この分析のキャリブレーション範囲において、0.993 以上の相関係数 (R^2) が得られました。各農薬の値を表 4 に示しています。

表 4. GC/μECD により分析した EPA 508.1 塩素系農薬キャリブレーション用標準の相関係数 (R²)

直線性の評価結果

分析対象物	R ² 値		分析対象物	R ² 値	
	Agilent DB-35ms UI	DB-XLB		Agilent DB-35ms UI	DB-XLB
ヘキサクロロシクロペンタジエン	0.9996	0.9930	ヘプタクロルエポキシサイド	0.9998	0.9998
エトリジアゾール	0.9982	1.0000	シアナジン	0.9994	0.9998
クロロネブ	0.9982	0.9981	ブタクロール	0.9990	0.9992
トリフルラリン	0.9976	0.9976	γ-クロルデン	0.9998	0.9999
TCMX (ss)	0.9997	0.9997	α-クロルデン	0.9998	0.9998
プロバクロル	0.9996	0.9986	エンドスルファン I	0.9998	0.9997
ヘキサクロロベンゼン	0.9996	0.9991*	4,4'-DDE	0.9998	0.9998
α-BHC	0.9998	1.0000	ディルドリン	0.9998	0.9999
アトラジン	0.9941	*	クロロベンジレート	0.9940	0.9985
シマジン	0.9971	*	エンドリン	0.9998	0.9996
γ-BHC	0.9999	0.9998	4,4'-DDD	1.0000	0.9999
β-BHC	0.9998	0.9999	エンドスルファン II	0.9999	0.9999
ヘプタクロル	0.9999	0.9998	4,4'-DDT	0.9993	0.9996
アラクロール	0.9986	0.9989	エンドリンアルデヒド	1.0000	0.9999
δ-BHC	0.9999	0.9996	エンドスルファンスルフェート	0.9997	0.9997
クロロタロニル	1.0000	1.0000	メトキシクロル	0.9993	0.9982
アルドリン	0.9998	0.9994	cis-ペルメトリン	0.9992	0.9992
メトリブジン	0.9997	0.9985	trans-ペルメトリン	0.9988	0.9995
メトラクロル	0.9973	0.9987	デカクロロビフェニル (ss)	0.9998	0.9997
DCPA	0.9996	0.9998			

(ss)-サロゲート標準 *共溶出

このメソッドでは、微量レベルの塩素系農薬を高い感度で検出できました。欧州連合指令では、飲料水中の各農薬の含有量限界が 0.1 μg/L と定められています [3]。この濃度を確実に検出するためには、規定の閾値を大きく下回る検出下限 (LOD) を備えたメソッドが求められます。図 5 は、抽出後の 0.01 μg/L 添加試薬水サンプルを Agilent DB-35ms UI カラムおよび Agilent DB-XLB カラムで分析した結果を示しています。このサンプルに添加した濃度は、規定の限界値を 1 桁下回るものです。また、EPA が飲料水中農薬に関して定めている最大汚染濃度 (MCL) と比べても、同等または下回る濃度です [1]。

Agilent SPEC C18AR 液固抽出ディスクを用いたサンプル前処理では、添加水サンプル中の塩素系農薬を効率的に保持し、予備濃縮することができました。既定の MCL レベルの微量農薬を測定する場合、農薬を検出レベルに濃縮するために、大量のサンプルが必要になります。大きい 47 mm C18 ディスクを使用することで、水サンプル 1 L を 75~100 mL/min の速度で抽出することができました。これにより、サンプルを約 10 分で処理し、サンプル前処理時間を短縮してスループットを向上することが可能になりました。

抽出水サンプルブランクと添加サンプルの GC/μECD クロマトグラムの比較

- | | | | |
|-------------------|-------------|-----------------|--------------------------|
| 1. ヘキサクロシクロペンタジエン | 11. γ-BHC | 21. ヘプタクロルエポキシド | 31. 4,4'-DDD |
| 2. エトリジアゾール | 12. β-BHC | 22. シアナジン | 32. エンドスルファン |
| 3. クロロネブ | 13. ヘプタクロル | 23. フタクロール | 33. 4,4'-DDT |
| 4. トリフルラリン | 14. アラクロール | 24. γ-クロルデン | 34. エンドリンアルデヒド |
| 5. TCMX* | 15. δ-BHC | 25. α-クロルデン | 35. エンドスルファンスルフェート |
| 6. プロバクロル | 16. クロロタロニル | 26. エンドスルファン | 36. メトキシクロル |
| 7. ヘキサクロベンゼン | 17. アルドリン | 27. 4,4'-DDE | 37. <i>cis</i> -ヘルメトリン |
| 8. α-BHC | 18. メトリプジン | 28. ティルドリン | 38. <i>trans</i> -ヘルメトリン |
| 9. アトラジン | 19. メトラクロル | 29. クロロベンジレート | 39. デカクロロビフェニル* |
| 10. シマジン | 20. DCPA | 30. エンドリン | *サロゲート標準 |

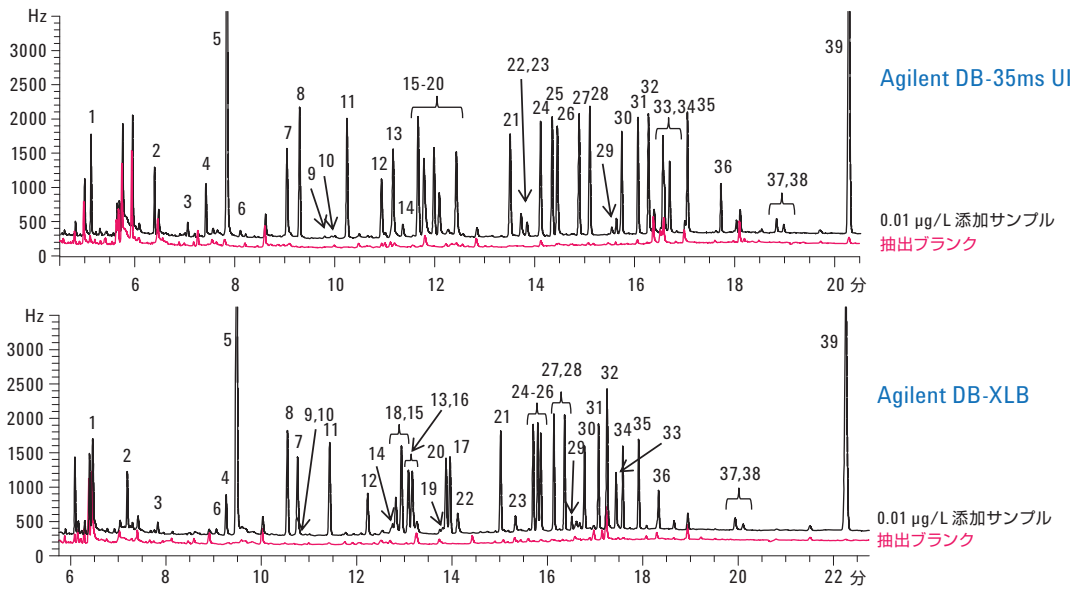


図 5. Agilent J&W DB-35ms UI 30 m x 0.32 mm、0.25 μm カラム (p/n 123-3832UI) と Agilent DB-XLB 30 m x 0.32 mm、0.5 μm カラム (p/n 123-1236) を用いて分析した 0.01 μg/L 添加水サンプルと抽出ブランクの GC/μECD クロマトグラム。
図 1 に示すサンプル前処理手順に従ってサンプルを前処理および抽出しました。クロマトグラフィー条件は表 1 を参照

このメソッドを用いて、飲料水サンプル中の塩素系農薬も分析しました。水道水サンプルを採取し、図 1 に示すサンプル前処理手順に従って前処理し、表 1 のクロマトグラフィー条件で分析しました。この水道水サンプルからは、この研究の検量線範囲のターゲット塩素系化合物は検出されませんでした。このサンプルの GC/μECD クロマトグラムを表 6 に示しています。

抽出水サンプルブランクと飲料水サンプルの GC/μECD クロマトグラムの比較

- | | | | |
|-------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| 1. ヘキサクロシクロペンタジエン | 11. γ-BHC | 21. ヘプタクロルエポキシサイド | 31. 4,4'-DDD |
| 2. エトリジアゾール | 12. β-BHC | 22. シアナジン | 32. エンドスルファン |
| 3. クロネブ | 13. ヘプタクロル | 23. プタクロール | 33. 4,4'-DDT |
| 4. トリフルラリン | 14. アラクロール | 24. γ-クオルデン | 34. エンドリンアルデヒド |
| 5. TCMX* | 15. δ-BHC | 25. α-クオルデン | 35. エンドスルファンスルフェート |
| 6. プロバクROL | 16. クロロタロニル | 26. エンドスルファン | 36. メトキシクROL |
| 7. ヘキサクロロベンゼン | 17. アルドリソ | 27. 4,4'-DDE | 37. cis-ペルメトリン |
| 8. α-BHC | 18. メトリブジン | 28. ティルドリン | 38. trans-ペルメトリン |
| 9. アトラジン | 19. メトラクROL | 29. クロロベンジレート | 39. デカクロロビフェニル* |
| 10. シマジソ | 20. DCPA | 30. エンドリン | *サロゲート標準 |

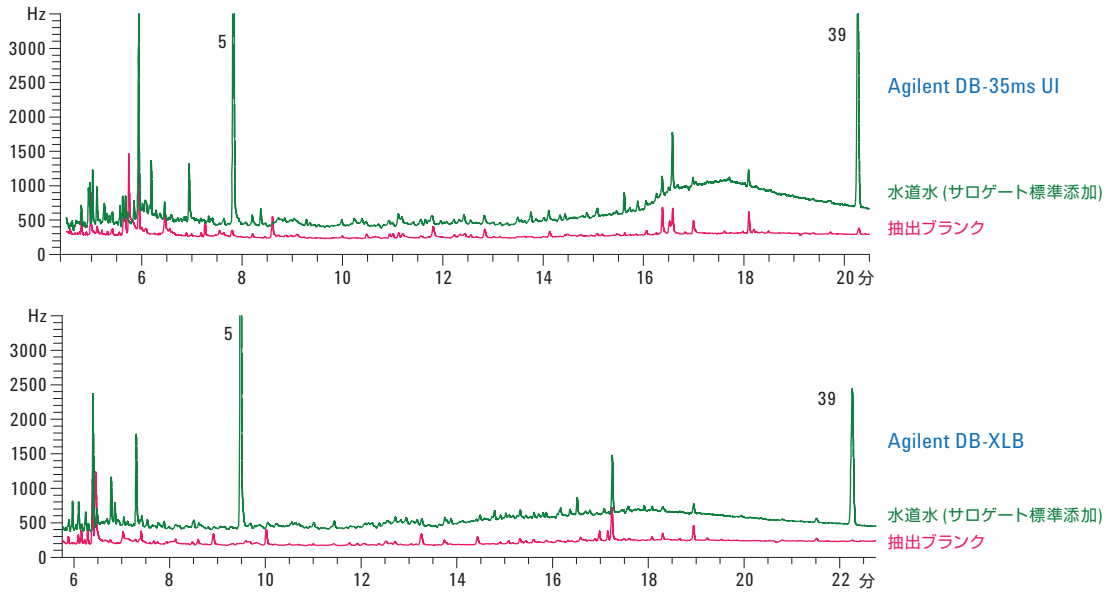


図 6. Agilent J&W DB-35ms UI 30 m x 0.32 mm、0.25 μm カラム (p/n 123-3832UI) と Agilent DB-XLB 30 m x 0.32 mm、0.5 μm カラム (p/n 123-1236) を用いて分析した水道水サンプルと抽出ブランクの GC/μECD クロマトグラム。
 図 1 に示すサンプル前処理手順に従ってサンプルを前処理および抽出しました。クロマトグラフィー条件は表 1 を参照

結論

このアプリケーションノートでは、水サンプルにサブ µg/L レベルで含まれる塩素系殺虫剤および除草剤を効率的に抽出および検出できる分析メソッドを紹介しています。Agilent J&W DB-35ms UI キャピラリーカラムを使えば、37 種類のターゲット農薬すべてを良好に分離できます。また、優れた感度が得られるため、低濃度でも確実に定量できます。塩素系農薬の分離に Agilent DB-XLB を用いれば、分析対象物の確認をおこなうことが可能です。

Agilent SPEC C18AR 47 mm 液固抽出ディスクにより、水サンプルからの農薬の抽出と予備濃縮を効率的におこなうことができました。これにより、微量化合物の検出が向上すると同時に、サンプル前処理時間を短縮できました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで前処理したキャリブレーション用標準では、どちらのカラムについても、この研究の範囲において 0.993 以上の相関係数 R^2 が得られました。

この研究では、水サンプル中農薬について EU および EPA が定める最大汚染濃度の 10 分の 1 の濃度を検出できました。濃度 0.01 µg/L で添加した水サンプルを良好に前処理および分析できたことは、低濃度塩素系農薬測定における Agilent J&W DB-35ms UI カラムと Agilent DB-XLB カラムの有効性を示しています。水道水サンプルの分析では、このメソッドの検量線範囲における農薬は検出されませんでした。

謝辞

Agilent LSE 手順に関する助言と提案を与えてくださった Joan Stevens 博士に感謝します。

参考文献

1. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(1):71-133.
2. EPA. List of Drinking Water Contaminants & MCLs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, Retrieved October 14, 2003 from <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html#mcls>.
3. ECC Council Directive 80/778/ECC. Official Journal of the European Communities, No. L 229, August 30, 1980, p 11.
4. EEC. Drinking Waters Directive, Official Journal N229/11, Directive 80/778/EEC, 1988.
5. Ken Lynam and Doris Smith. Challenging Pesticide Analysis Using an Agilent J&W DB-35ms Ultra Inert GC Column. (2010) Agilent Technologies, Inc. Publication Number 5990-6595EN.
6. Limian Zhao and Allan D. Broske (2010) Evaluation of the Ultra Inert Liner Deactivation for Active Compounds Analysis by GC. Agilent Technologies, Inc. Publication Number 5990-7380EN.
7. US EPA 1995. Method 508.1. Determination Chlorinated Pesticides, Herbicides, and Organohalides by Liquid-Solid Extraction and Electron Capture Gas Chromatography. Revision 2.0.
8. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチカタログ (2011). アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6908JAJP.
9. Rebecca Veeneman and Dale Snyder (2010) Improved Data Quality through Automated Sample Preparation. Agilent Technologies, Inc. Publication Number 5990-6974EN.
10. James D. McCurry (2011) Automation of a Complex, Multi-Step Sample Preparation using the Standalone Agilent 7696A WorkBench. Agilent Technologies, Inc. Publication Number 5990-7525EN.

詳細情報

本書のデータは一般的な結果を表すものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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., 2012

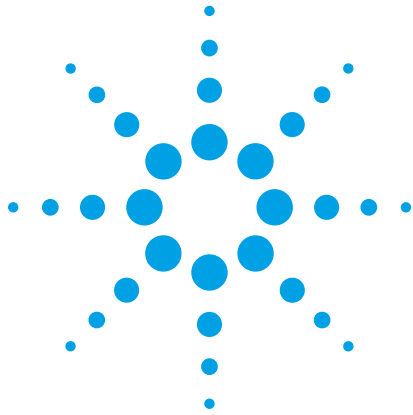
Printed in Japan

January 24, 2012

5990-9735JAJP



Agilent Technologies



Agilent 7696A サンプル前処理 ワークベンチを用いた EPA メソッド 8270 の分析品質保証 (AQA) 基準の作成

アプリケーションノート

環境

著者

Darren DeBoo
GEOAnalytical, Inc.
Twinsburg, Ohio
USA

Peter Mrozinski
Agilent Technologies
Wilmington, Delaware
USA

概要

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いてキャリブレーション用標準の前処理を行うことで、EPA メソッド 8270 に対してラボが設定した分析品質保証基準を十分に満たす相対レスポンスファクターの再現性と回収率が得られます。

はじめに

分析品質保証 (AQA) は、民営組織、政府機関、学術機関を問わず、あらゆるラボが適切に業務を実施するために欠かせない要素です。特に環境保護庁 (EPA) の規制対象となる分析においてデータの信頼性は重要で、それは幅広い分析実施手順を厳密に守るかどうかによって決まります。もっとも一般的な手順の例は、検量線の使用と、添加サンプルの回収率の測定です。

検量線は、一連の化合物の標準を調製して作成されます。その濃度範囲は、未知サンプル中の分析対象成分の予想濃度に近い濃度とします。最も適合性の高い直線に対する各キャリブレーションポイントの逸脱の度合いをもとに、キャリブレーションの精度を評価します。この精度は、使用する標準の原材料の品質や、キャリブレーション用標準の前処理の精度と再現性に直接的に左右されます。標準を添加したサンプルからの分析対象成分の回収率も、分析の効率と精度を評価する指標です。こちら、使用するキャリブレーション用標準の品質に左右されます。

キャリブレーション用標準は、手作業で前処理されるのがもっとも一般的です。この前処理には、面倒で時間のかかるピペッティング手順が含まれますが、こうした手作業の手順の精度は、オペレーターのスキルや人的ミスの可能性による影響を受けます。また、オペレーターが有毒化学物質にさらされるおそれもあります。自動分注システムを使えば、人的ミスをプロセスから排し、キャリブレーション用標準前処理の正確性と精度を確保することができます。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使うことで、検量線精度および回収率レベルに関する AQA 要件を満たす自動前処理が可能になることを実証します。実証試験のモデルとして、半揮発性有機化合物 (SVOC) の検出に関する EPA メソッド 8270 を使用しました。このメソッドでは、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) を用いて固体、液体、気体サンプルを分析し、EPA の規制対象である 90 の SVOC の有無を調べます。

自動前処理メソッドを用いることで、13 のキャリブレーション確認化合物 (CCC) の検量線平均相対レスポンスファクター (RRF) の相対標準偏差に関して、当ラボの AQA 要件を満たす標準が得られました。同様に 13 の化合物の回収率についても、許容限度内でした。また、システム性能化合物 (SPCC) および CCC 以外の化合物に関して、このメソッドで規定されている他のすべての要件を満たしました。

実験方法

標準および試薬

農薬グレード以上の塩化メチレンを用いて、キャリブレーション用標準を作成しました。SVOC 標準は Sigma-Aldrich および Restek から入手しました。濃度は 1,000 µg/mL です。重水素化内標準およびサロゲート標準も Restek から入手しました。

装置

キャリブレーション用標準の前処理には Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。表 1 に示す設定を用いました。分析には GC/MS を使用しました。

表 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの設定

フロントシリンジ	500 µL
バックシリンジ	100 µL
ヒーターセットポイント	周囲温度
ヒーターオフセット	0 °C
ポンプ数	2
洗浄量	400 µL
吸引スピード	800 (µL/min)
分注スピード	2,500 (µL/min)
吸引ニードル深さオフセット	0 mm
粘度ディレイ	4 秒
オーバーフィル	シリンジサイズの 5 %
エアギャップ	シリンジサイズの 0 %
サンプル処理スキーム	連続

サンプル前処理ワークベンチを用いた キャリブレーション用標準の前処理

ワークベンチを用いてキャリブレーション用標準の前処理を連続的に行いました。まず、さまざまな量の塩化メチレンをバイアルに分注したのち、さまざまな量の SVOC 標準作業用溶液を同じバイアルに加え、各バイアルの総体積をすべて 1 mL としました。8 つのキャリブレーション用標準の濃度は、0.5~80 µg/mL の範囲としました。各分注手順の間に、シリンジを塩化メチレン 400 µL で洗浄しました。

結果

検量線

SVOC キャリブレーション用標準の GC/MS 分析で得られた各ピークの面積を積分すれば、ピーク面積と濃度を関連付けることができます (図 1)。検量線の各濃度でレスポンスファクターを計算するには、ピーク面積をキャリブレーション用標準の濃度で除算します。その後、キャリブレーション用標準のレスポンスファクターを内標準のレスポンスファクターで除算し、RRF を算出します。

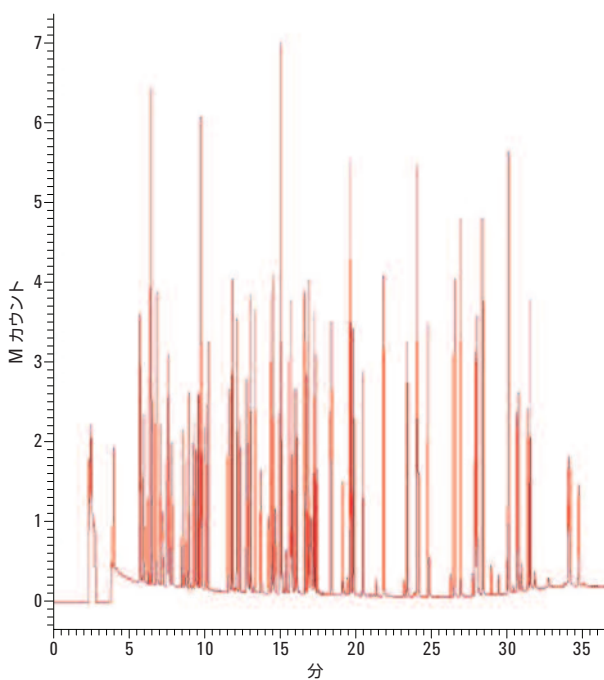


図 1. EPA メソッド 8270 GC/MS 分析で得られた代表的なトータルイオン電流 (TIC) クロマトグラム。キャリブレーション用標準混合液を 10 µg/mL で添加

検量線作成に用いたキャリブレーション用標準のすべての濃度の RRF から平均 RRF を計算します。また、各濃度において求めた RRF の相対標準偏差 (RSD) を算出します。当ラボの AQA 基準では、13 の CCC について RSD を計算することが求められています。RSD は 30 % 未満でなければなりません。表 2 からは、ワークベンチを用いて前処理した CCC の RRF が、すべてこの品質基準を満たしていることがわかります。実際に、13 の CCC のうち、8 つについては RSD が 10 % 以下でした。

回収率

ワークベンチを用いて作成した検量線から、添加キャリブレーション用標準の回収率を測定しました。ラボの AQA 基準では、すべての回収率が 80~120 % に収まることが求められています。表 3 から、すべての回収率がこの基準を満たしていることがわかります。測定した 13 の化合物のうち、7 つで回収率が 95~100 % の範囲内でした。この高い回収率は、ワークベンチ自動システムで前処理した標準から得られた検量線を用いた定量の優れた精度を実証しています。

表 3. 添加キャリブレーション用標準の回収率

キャリブレーション確認化合物	回収率 (%)
フェノール	114.21
1,4-ジクロロベンゼン	97.28
2-ニトロフェノール	99.69
1,2,4-ジクロロフェノール	108.1
ヘキサクロロブタジエン	98.53
4-クロロ-3-メチルフェノール	96.33
2,4,6-トリクロロフェノール	95.71
アセナフチレン	92.92
N-ニトロソジフェニルアミン	97.70
ペンタクロロフェノール	115.06
フルオランテン	89.91
Di-n-フタル酸オクチル	108.55
ベンゾ[a]ピレン	99.05

表 2. 検量線全体の相対レスポンスファクター (RRF)、平均 RRF、% RSD

キャリブレーション確認化合物	検量線の各濃度 (µg/mL) の RRF								平均 RRF	%RSD
	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50	80		
フェノール	1.581	1.502	1.597	1.722	1.413	1.342	1.053	1.082	1.412	17.1
1,4-ジクロロベンゼン	1.600	1.618	1.848	1.725	1.710	2.074	1.722	2.030	1.791	10.0
2-ニトロフェノール	0.119	0.113	0.106	0.114	0.116	0.111	0.126	0.109	0.114	5.3
2,4-ジクロロフェノール	0.330	0.306	0.332	0.330	0.338	0.293	0.299	0.280	0.314	6.8
ヘキサクロロブタジエン	0.227	0.230	0.241	0.265	0.283	0.261	0.283	0.312	0.263	11.2
4-クロロ-3-メチルフェノール	0.417	0.416	0.420	0.422	0.442	0.379	0.438	0.464	0.425	5.8
2,4,6-トリクロロフェノール	0.529	0.495	0.476	0.460	0.477	0.451	0.410	0.403	0.463	9.1
アセナフチレン	2.195	2.137	1.960	2.012	2.062	1.914	1.962	2.389	2.079	7.6
N-ニトロソジフェニルアミン	0.868	0.795	0.721	0.673	0.650	0.646	0.658	0.678	0.711	11.3
ペンタクロロフェノール	0.157	0.140	0.129	0.136	0.128	0.118	0.094	0.088	0.124	18.8
フルオランテン	1.006	0.961	0.948	0.920	0.956	0.990	0.972	1.147	0.988	7.1
Di-n-フタル酸オクチル	2.038	2.557	2.825	3.159	3.281	3.471	4.018	—	3.050	21.2
ベンゾ[a]ピレン	1.092	1.080	1.069	0.984	0.951	0.914	0.987	1.060	1.017	6.6

結論

正確かつ精度の高いキャリブレーション用標準の前処理は、あらゆる分析ラボで必ず必要な要素です。特に、環境関連ラボの EPA メソッドでは重要です。メソッド 8270 は、化学的に多様な多成分の化合物を分析するため、困難なメソッドとなっています。Agilent サンプル前処理ワークベンチを使うことで、分析ラボに求められる精度と確度を確保し、報告可能な EPA メソッド 8270 の分析結果を得ることができます。手作業でのキャリブレーション用標準前処理に伴う面倒な作業や長い作業時間、人的ミスを排除できます。

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。

本資料に記載の情報、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. 2012

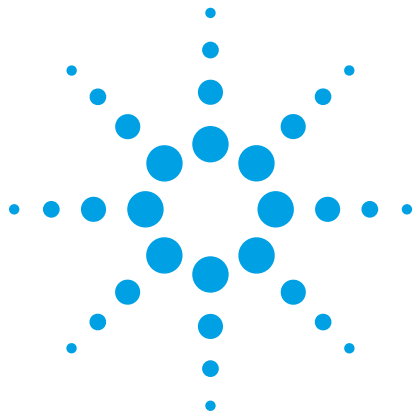
Printed in Japan

August 17, 2012

5991-0973JAJP



Agilent Technologies



Agilent 7696A サンプル前処理 ワークベンチを使用した GC/MS/MS によるエストロンの分析

アプリケーションノート

著者

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE
USA
Selene Hernandez Ruiz, Ph.D.
Chemical and Environmental
Engineering
Arizona University
Tucson, Arizona
USA
Anthony Macherone, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE
USA

概要

内分泌攪乱物質の分析は多くのラボで需要が高まっており、それは臨床化学、産業暴露、創薬および薬剤開発、また新たな汚染や残留性有機汚染物質を含む環境分析など、様々な分野へ広がっています。そのため、実際に分析を行うラボでは、分析装置に加えて、サンプル前処理の精度および再現性の維持にも負荷がかかっています。このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる自動化ワークフローを使用した GC/MS/MS 分析について説明します。



Agilent Technologies

はじめに

地下水、地表水、および飲料水源に含まれるエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、コルチコステロイド、グルココルチコイドなどの内分泌攪乱物質 (EDC) の正確な分析に対するニーズが高まっています。環境中のこれらの化合物は、主に家畜や人のホルモン治療により生じる医原性のもので、多くの場合、親薬物および代謝物の排泄物は、従来の廃水処理工程では完全には分解されません。この結果、これらの化合物が河川などの淡水で見つかり、帯水層に移行します。EDC は、ppt レベルでも発生する有害作用を発生します。例として、魚類および両生類の異常なオス/メス比、魚類の可逆的な雌性化、生殖経路の阻害、雌雄同体のような形態変化、正常なフェロモン応答の乱れなどがあり、これだけに留まりません。数十年の間広く使用されてきた結果、これらの化合物は至るところに残留しており、人への健康に対する大きなリスクとなっています。そのため、これらの化合物の環境中での移動および動態の研究はきわめて重要です。このアプリケーションノートでは、内分泌攪乱物質分析のためのキャリブレーション標準の作成と誘導体化のサンプル前処理を 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して自動化する方法について説明します。

実験方法

標準および試薬

エストロン (E1)、BSFTA/TCMS (99 %/1 %)、無水アセトニトリル、無水ピリジンは Sigma-Aldrich Corp. (米国) から購入しました。E1 の原液を無水アセトニトリルで希釈し、キャリブレーション標準を作成するために必要な混合液を作成しました。

機器

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用してキャリブレーション標準を作成し、対象化合物の自動誘導体化を行いました。測定に用いた機器は、コールドスプリットレス注入ができるマルチモード注入口 (MMI) を備えた Agilent 7890A シリーズ GC と、Agilent 7693A 150 ポジションオートサンブラ付きの Agilent 7000B トリプル四重極 MS で行いました。機器の条件を表 1 および 2 に示します。

表 1. GC/MS の条件

GC の実行条件

分析カラム	15 m HP-5MS UI (p/n 19091S431UI) x 2 Agilent パージ Ultimate ユニオン (p/n G1472A) を使用して直列に接続
注入量	2 µL
注入モード	コールド、スプリットレス、マルチモード 注入口 (MMI) を使用
注入口温度	70 °C で 0.01 分保持 450 °C/min で 280 °C まで昇温、 280 °C で 3 分保持 3 分後に 20 mL/min 1.5 分後に 30 mL/min
ガスセーブ パージフロー クライオ クライオ使用温度	オン 72 °C
障害検出 タイムアウト検出 オープン温度	30 分 10 分間オン 120 °C で 0.5 分保持 40 °C/min で 240 °C まで昇温、 240 °C で 0 分保持 5 °C/min で 280 °C まで昇温、 280 °C で 3.75 分保持
キャリアガス	定流量モード、ヘリウム カラム 1 : 0.8 mL/min カラム 2 : 1.0 mL/min
平均速度 トランスファーライン	23.498 cm/sec
温度	280 °C
分析時間	15.25 分
MS の条件	
チューニング ゲイン係数	atunes.eiex.tune.xml 50
取り込みパラメータ コリジョンガス クエンチガス 溶媒待ち時間 MS 温度	マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 1.5 mL/min 2.25 mL/min 6.0 分 イオン源 300 °C 四重極 150 °C

表 2. MRM のパラメータ

時間セグメント	開始時間	化合物名	プリカー サイオン (m/z)	プロダク トイオン (m/z)	デュエル デュエル (ms)	コリ ジョン エネルギー (V)
1	10.5	E1	342.0	257.0	150	15
1	10.5	E1	342.0	244.0	150	15

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた前処理

Trinh 他 (2011) は、1,000 倍の濃度 (1.0 L のサンプル量を 1.0 mL に濃縮) を考慮して、1.0 ng L⁻¹ に近い E1 の MDL を示しました。この評価では、7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して 1.0、2.5、5.0、10.0、および 50.0 ng/mL の 5 つのキャリブレーション標準を前処理しました。また、誘導体化にも 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。10/10/80 (% v/v) BSTFA+TCMS/無水ピリジン/無水アセトニトリルを乾燥したキャリブレーション標準に加えて 60 °C で 30 分間加熱しました。

結果と考察

7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理

7696A サンプル前処理ワークベンチによる自動化によってサンプル前処理に必要な分析時間が大幅に短縮され、サンプルエラーが発生する可能性が低減されます。それと同時に、手動の作業で得られる回収率と精度が維持されます。このアプリケーションノートでは、1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) の 3 回繰り返し分析のデータを用いると回収率は 133.37 % となりました。また、5 つのレベルでそれぞれ算出した再現性の平均は、5.162 % RSD (3.32~6.89 の範囲) となりました。表 3 および 4 にこれらの結果を示します。図 1 に、1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) の E1 についての定量および定性用の SRM (Selected Reaction monitoring) クロマトグラムを示します。

表 3. 1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) での低いキャリブレーション標準の S/N および回収率 (%)

名前	サンプルの種類	レベル	E1 メソッド 実験濃度	E1 面積	E1 最終濃度	S/N
Std_1_1	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	48.18	1.29	11.20
Std_1_2	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	42.01	0.94	9.00
Std_1_3	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	45.97	1.17	12.40
					% 回収率	113.37

表 4. キャリブレーション標準の %RSD (5 レベル、n = 3 回の繰り返し)

名前	サンプルの種類	レベル	実験濃度	E1 面積	
Std_1_1	キャリブレーション	1	1	48.18	
Std_1_2	キャリブレーション	1	1	42.01	
Std_1_3	キャリブレーション	1	1	45.97	
				% RSD	6.89
Std_2_1	キャリブレーション	2	2.5	65.86	
Std_2_2	キャリブレーション	2	2.5	65.75	
Std_2_3	キャリブレーション	2	2.5	59.74	
				% RSD	5.49
Std_3_1	キャリブレーション	3	5	134.20	
Std_3_2	キャリブレーション	3	5	147.65	
Std_3_3	キャリブレーション	3	5	137.09	
				% RSD	5.07
Std_4_1	キャリブレーション	4	10	184.80	
Std_4_2	キャリブレーション	4	10	167.32	
Std_4_3	キャリブレーション	4	10	173.81	
				% RSD	5.04
Std_6_1	キャリブレーション	5	50	931.48	
Std_6_2	キャリブレーション	5	50	874.49	
Std_6_3	キャリブレーション	5	50	887.74	
				% RSD	3.32

GC/MS/MS 分析

この実験では、1.0~50.0 ng/mL の 5 つの濃度レベルで 3 回繰り返し注入を行いました。図 2 に、合計で 15 回の注入で得られた相関係数 $R^2 = 0.996$ の検量線を示します。

機器の検出下限

Wells 他 (2011) は、サンプルセットが 30 未満の場合、Student の t 分布片側検定を使用して機器の検出下限 (IDL) を推定できると述べています。99 % の信頼度と $n-1$ の自由度の場合、この実験の Students-t テーブル値は 6.965 です。低キャリブレーション標準の 6.965 および 6.89 % RSD を IDL 方程式 (式 1) に代入すると、E1 の IDL の推定値は 0.48 pg オンカラムとなります。この値は、99 % の信頼度と $n = 7$ 回の繰り返しで 0.7 ng L-1 の MDL を測定した Trinh 他 (2011) の結果とよく一致しています。

$$IDL_{\%RSD} = \frac{(6.965 \times 6.89\% \times 1.0 \text{ pg})}{100} = 0.48 \text{ pg}$$

式 1. 1.0 ng/mL キャリブレーション標準の面積 % RSD に基づく IDL の推定値 ($n = 3$)

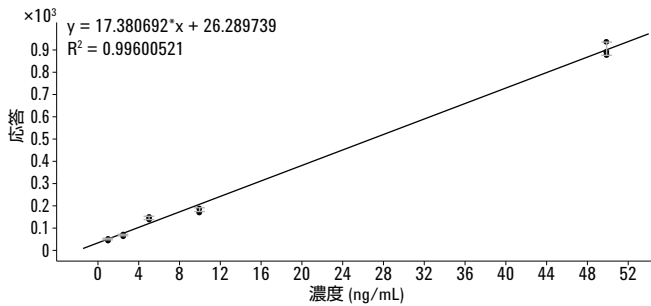


図 2. E1 の検量線: 5 つのレベルにおける 3 回の繰り返し注入

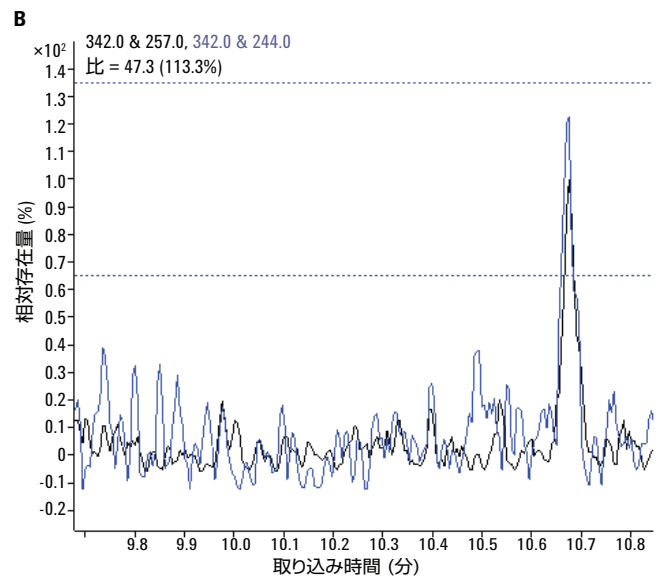
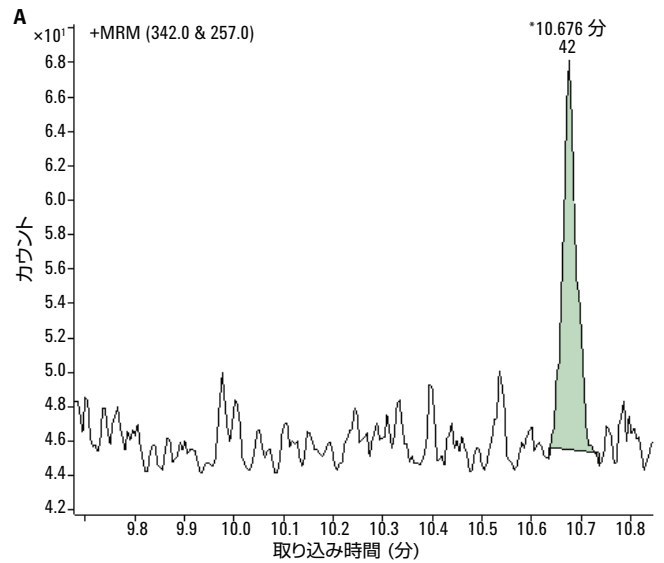


図 1. 1.0 ng/mL の E1 の SRM クロマトグラム。A は定量 SRM 342 → 257 を示し、B は定性トランジション 342 → 244 を示します。B における 2 つの点線はクオリファイア比の許容可能な範囲を示しています。S/N の計算のノイズ領域は 10.4~10.6 分です。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、誘導体化を含む自動ワークフローによって、エストロゲンやその他の内分泌攪乱物質の分析におけるサンプル、キャリブレーション標準、および QC サンプルを高精度で前処理することが可能です。このアプリケーションノートでは、サンプル誘導体化の自動化を含めた GC トリプル四重極質量分析装置を使用した分析の有効性を説明しています。優れた回収率と精度が検量線の濃度範囲で得られ、論文で報告されている MDL と一致する IDL が算出されました。

参考文献

1. Trinh T., *et al.* "Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry". *J. Chrom A*, 1218 (2011) 1668–1676.
2. Wells G, Prest H, Russ CW. 「シグナルノイズ比は質量分析計の性能指標として合理的か?」. アジレントアプリケーションノート資料番号 5990-8341JAJP. (2011)、アジレント・テクノロジー株式会社

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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., 2013

Printed in Japan

January 9, 2013

5991-1695JAJP



Agilent Technologies

食品テスト

サンプル希釈および FAME 誘導体化の精度を保証

FAME の誘導体化プロセスの手順は複雑ではありませんが、誤差が発生する可能性があります。手順を自動化することで、手動操作によるミス回避し、分析者はデータ採取と結果解析に集中できます。

[目次に戻る](#)

[アプリケーションノートを見る](#)



食品テスト



サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

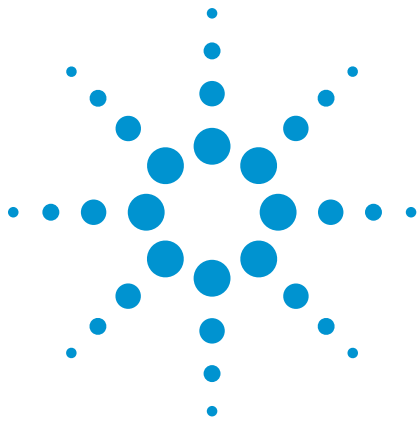
agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

哺乳瓶から溶出するビスフェノール A の分析	80
菓子類に含まれる着色料の分析	92
自動サンプル前処理を使用したサケ油中の脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定	104
Agilent 1260 Infinity LC を使用したステビア葉中のステビオシドおよびレバウジオシド A の定量	108
自動サンプル前処理によるオリーブオイル中の脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定	112

[目次に戻る](#)

[アプリケーション分野の紹介に戻る](#)



哺乳瓶から溶出する ビスフェノール A の分析

アプリケーションノート

コンシューマプロダクツ

著者

Syed Salman Lateef
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

概要

ビスフェノール A は食品容器のプラスチック表面から溶出することがあり、血漿、尿、地下水などのさまざまなマトリックスで検出されてきました。ビスフェノール A は、エストロゲンなどの生体ホルモンと類似した作用を持つ内分泌攪乱物質であり、健康にマイナスの影響を与えることがあります。このアプリケーションノートでは、哺乳瓶から抽出されたビスフェノール A と、構造的に類似したビスフェノール F を定量するメソッドについて説明します。このメソッドは、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用した Agilent 1260 Infinity LC システム上で開発したものです。メソッドの部分的バリデーションを実施し、面積とリテンションタイムの直線性、堅牢性、精度を確認しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して希釈系列を自動的に生成し、分析時間を短縮しました。ビスフェノール A の定量下限 (LOQ) が 1.06 ng/mL であることがわかりました。サンプル回収率の実験では、ビスフェノール A について 80 % の回収率が得られました。このメソッドを Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) メソッドに変換しました。UHPLC メソッドは、実験条件は同じですが、ピークがよりシャープで高くなり、分離能と S/N 比が向上しました。いずれのメソッドも、哺乳瓶など食品容器の品質管理におけるビスフェノール A の定量に適用することができます。



Agilent Technologies

はじめに

ビスフェノール A (BPA) は、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の製造に使用されるモノマーです。熱や pH の変化など、さまざまな環境条件の下で微量の BPA がこれらのポリカーボネートプラスチックの表面から溶け出し、これを最終的に人が摂取することがあります。BPA は、尿、地下水、血漿など各種のマトリックスで検出されています。その値を超えると毒性の影響が現れるしきい値があるという仮定に基づき、米国環境保護庁 (US EPA) は、BPA の参照用量 (RfD) として、体重 1 kg あたり 1 日に 50 µg という量を設定しました¹。ポリカーボネートプラスチック製の哺乳瓶は、子どもにとって潜在的な危険性があります。このアプリケーションノートでは、構造的に類似した市販の化合物、ビスフェノール F (BPF) (図 1) を BPA とともに使用して分離効率を測定しました。

Ballesteros-Gomez 他は、BPA の分離、同定、定量に使用する各種の分析メソッドを確認しました²。また、ASTM 規格テストメソッド D 7574-09 は、環境水からビスフェノール A を抽出するための SPE に基づくオフラインメソッドを説明したものです³。BPA は蛍光化合物であるため、蛍光検出器 (FLD) が哺乳瓶中の BPA 濃度の検出に高い感度を示します。このアプリケーションノートでは、(U)HPLC/FLD 検出による SPE ベースのオフライン抽出手順を使用して BPA と BPF を同時に定量するメソッドについて説明します。

実験方法

機器およびソフトウェア

次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity バイナリ LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity オートサンプラおよびサーモスタット (G1367E、G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (TCC) (G1316C)
- 8 µL フローセル付き Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1312B)

次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して UHPLC 分析を開発し、実行しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンプラおよびサーモスタット (G4226A、G1330B)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- 8 µL フローセル付き Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1312B)

ソフトウェア :

- Agilent ChemStation B.04.02

サンプル前処理 :

- Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ

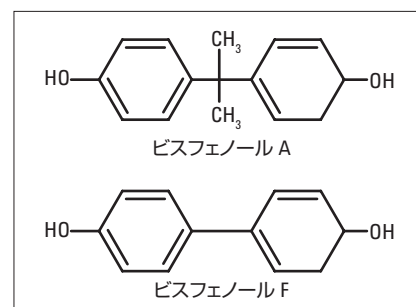


図 1
ビスフェノール A およびビスフェノール F の分子構造

試薬および材料

使用したすべての薬品と溶媒は HPLC グレードのものであります。純水は、Milli Q 水精製システム (Millipore Q-POD Element、米国) から得られたものを使用しました。スーパーグラジエントグレードのアセトニトリルとメタノールは Lab-Scan (タイ、バンコク) から、リン酸二水素カリウムは Fluka (ドイツ) から購入しました。ビスフェノール A とビスフェノール F の標準サンプルは Sigma-Aldrich (インド) から購入しました。米国製の BPA を含まない哺乳瓶と、3 種類の異なるブランドの国産ポリカーボネート製哺乳瓶を購入しました。

クロマトグラフィーパラメータ

Agilent 1260 および Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した逆相液体クロマトグラフィーの分析条件を表 1 に示します。

パラメータ	Agilent 1260 Infinity LC システム	Agilent 1290 Infinity LC システム
カラム:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 100 mm、 5 µm (p/n 959996 902)	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 100 mm、 1.8 µm (p/n 959964 902)
TCC 温度:	40 °C	
FLD:	励起: 230、発光: 316	
FLD 取り込みレート	9.26 Hz	
ゲイン:	15	
サンプルサーモスタット:	4 °C	
移動相 A:	10 mM リン酸二水素カリウム水溶液	
移動相 B:	100 % アセトニトリル	
グラジエント:	時間 (分) %B	
	0 5	
	2 5	
	2.1 35	
	12.5 35	
	12.6 70	
	17 70	
	18.1 5	
	23 5	
流量:	0.9 mL/min	
注入量:	20 µL。移動相 A を使用し、フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄	

表 1
Agilent 1260 Infinity LC および Agilent 1290 Infinity LC システムで使用する分析条件

標準の前処理

BPA と BPF を正確に計量して 100 % メタノールに個別に溶解し、それぞれ約 300 µg/mL の原液を生成しました。未使用時は 4 °C で保管しました。

5 % アセトニトリル、95 % 10 mM リン酸二水素カリウム水溶液の希釈用緩衝液により原液を希釈して、BPA および BPF の 400 ng/mL 溶液を前処理しました。表 2 に示す直線性レベルは、400 ng/mL 溶液を順次希釈することで得られたものです。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、段階希釈によって直線性レベルを作成しました。最初のシーケンスでは、400 µL の希釈溶液をすべてのバイアルに加えしました。第 2 のシーケンスでは、400 ng/mL の溶液から 300 µL を最初のシーケンスのレベル 7 のバイアルに加え、15 秒間攪拌しました。直前のレベルから 300 µL を取り出し、次のレベルのバイアルに加えて段階希釈を行いました。2 つのシーケンスを実行する代わりに、これらのステップを 1 つのメソッドにプログラミングし、1 回のシーケンスとして実行することもできます。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの設定で使用したシリンジパラメータを表 3 に示します。アジレントアプリケーションノート⁵では、7696A サンプル前処理ワークベンチの設定について詳細に説明しています⁴。

直線性レベル	ビスフェノール A (ng/mL)	ビスフェノール F (ng/mL)
LOD	0.195105	0.195105
1	1.06224	1.06224
2	2.478559	2.478559
3	5.783305	5.783305
4	13.49438	13.49438
5	31.48688	31.48688
6	73.46939	73.46939
7	171.4286	171.4286

表 2
ビスフェノール A およびビスフェノール F の希釈表

サンプル前処理

図 2 の説明に従って、ポリカーボネート製哺乳瓶から BPA を抽出しました。SPE アダプタ (p/n 12131001) と外径 3 mm のチューブ (p/n 5062-2483) を使用して、サンプルを Agilent Bond Elut Plexa SPE カラム、200 mg、6 mL (p/n 12109206) にロードしました。Agilent 20 ポート真空抽出マニホールド (p/n 12234104) を SPE の設定に使用しました。ASTM メソッドで説明されているサンプルの取り扱いに関する注意事項に従いました³。最後のステップ (図 2) で再溶解した溶液をサンプル分析に直接使用しました。

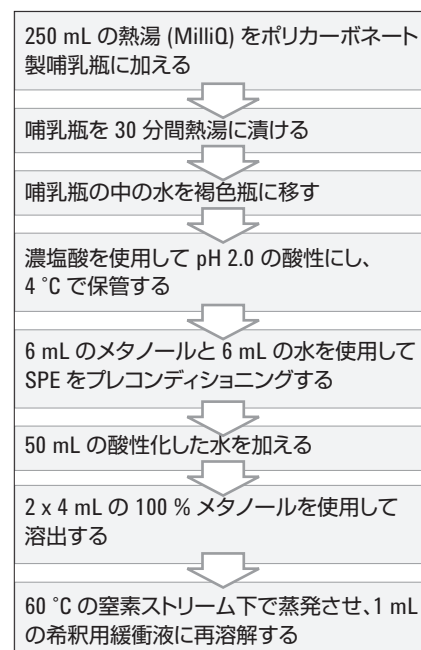


図 2
哺乳瓶からの BPA の抽出と SPE を使用したサンプル前処理

	溶媒 事前洗浄 1	分注洗浄	分注ポンプ	分注設定
ポンプ数または洗浄回数	1	1	3	
洗浄ボリューム (µL)	50	50	20	
吸引速度 (µL/min)	1250	1250	1250	1250
分注速度 (µL/min)	2500	2500	2500	2500
ニードル深さオフセット (mm)	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0
粘度遅延	0	0	0	0
タレット溶媒	A			
エアギャップ (% シリンジ体積)	0			0

表 3
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチに使用する 500 µL シリンジパラメータ

手順

直線範囲を得る前に、再溶解した哺乳瓶の抽出物を注入し、BPA のおよその濃度を測定しました。移動相 A の溶液 20 μ L をブランクとして注入し、次に各直線性レベルを 6 回繰り返しました。各レベルの面積およびリテンションタイム (RT) 情報を使用して、相対標準偏差 (RSD) の値を計算しました。直線範囲で各直線性レベルの平均面積を濃度に対してプロットし、検量線を作成しました。低い方の直線性レベルの注入から BPA および BPF の検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) を求めました。

メソッドの堅牢性を評価するために、次の 6 つの重要なメソッドパラメータを評価しました。

- 流量 \pm 2 %
- カラム温度 \pm 2.5 %
- 注入量 \pm 5 %
- 励起および発光波長 \pm 3 %
- ステップグラジエント \pm 10 %
- 緩衝液濃度 \pm 10 %

堅牢性の各パラメータで、標準濃度 30 ng/mL の BPA および BPF 溶液を 7 回繰り返して注入しました。

再現性の実験を行うために、図 2 の説明に従って、BPA を含まない哺乳瓶からサンプルを抽出しました。このサンプル 50 mL に対し、少量または大量の BPA および BPF をスパイクしました。スパイクした両方のサンプルを SPE の対象としました。検量線を使用して、得られたサンプルの濃度を確認しました。理論上の濃度と実験値を比較して、回収率の値を得ました。

最後に、3 つの異なるブランドの哺乳瓶を分析し、標準の HPLC メソッドを使用して、2 種類のビスフェノールの溶出濃度を測定しました。

次に、このメソッドを Agilent 1290 Infinity LC システムに変換し、同じ実験条件を使用して 1.8 μ m カラムで分析し、このメソッドの分離能と感度をテストしました。このメソッドでは、各標準の LOD、LOQ、および直線性とメソッドの精度を面積および RT の RSD により評価しました。

結果と考察

分離および検出

メソッド開発時に酸性および塩基性移動相を使用して、BPA と BPF の分離を C18 カラムでテストしました。メソッドを完成させる前に、哺乳瓶から抽出した水サンプルもテストしました。

その後の実験には Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用しました。低温 (35 $^{\circ}$ C) の TCC によって溶離時間の近い不純物から BPA を最適に分離することができましたが、マトリックスサンプルの分析時には 40 $^{\circ}$ C の方が適切であることがわかりました。リニアグラジエントによって 2 つのビスフェノールが分離されましたが、メソッド堅牢性の予備実験では、グラジエントを変化させると大きな変動が発生しました。この結果ステップグラジエントメソッドを採用し、このメソッドによって比較的堅牢な結果が得られました。ASTM メソッドでは、低温でのビスフェノールの保管が推奨されているため、分析中はオートサンプラを 4 $^{\circ}$ C に設定しました。図 3 は、最終的なメソッドを使用して 2 つのビスフェノールを分離したクロマトグラムを示しています。

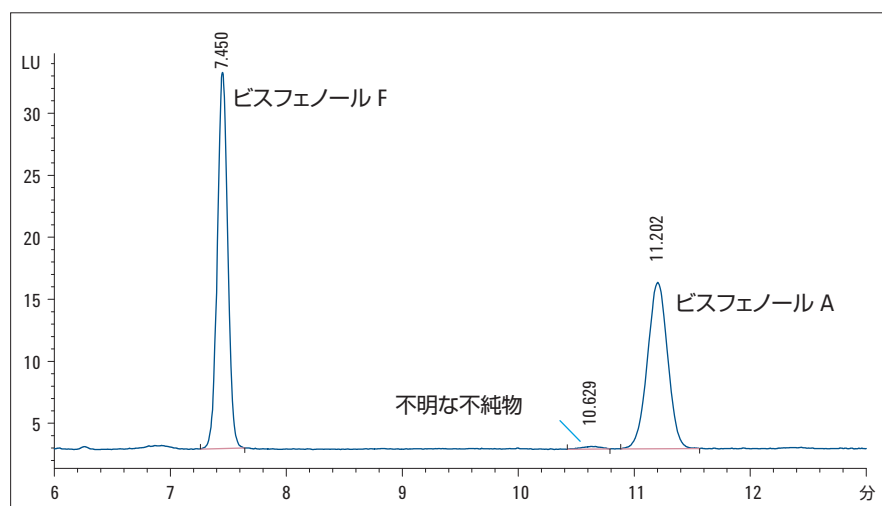


図 3
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用したビスフェノール F とビスフェノール A の 30 ng/mL 溶液の分離。230 nm (励起) と 316 nm (発光) の FLD 設定を使用してクロマトグラムを収集しました

検出下限 (LOD) および 定量下限 (LOQ)

S/N 比が 3 を超える対象化合物濃度を LOD、S/N 比が 10 を超える対象化合物濃度を LOQ と見なしました。ノイズの計算には peak-to-peak メソッドを使用しました。図 4 に、LOQ レベルでの BPA のクロマトグラムをブランク (移動相) の注入と重ね合わせて示します。BPA では、LOD は S/N = 4.3 で 0.19 ng/mL、LOQ は S/N = 15.1 で 1.06 ng/mL でした。

直線性

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して、直線範囲を持つ検量線 (表 2 を参照) を生成しました。ワークベンチはサンプル処理を自動化し、一貫性のある結果を提供します。プログラムを再度実行するだけで、異なる直線範囲を生成することができます。LOQ レベルの BPA から開始して直線性レベルを確立しました。LOD および LOQ の値を、直線性の結果とともに表 4 に示します。注入量を増やすことで LOD および LOQ の値をさらに下げることができますが、このアプリケーションでは、哺乳瓶から得られた値が直線範囲内にいることがわかってきたため、この操作は不要でした。

リテンションタイム (RT) と面積の 精度

面積精度は直線性レベルの RSD (%) として測定しました。レベル 1 (L1) で、BPA と BPF についてそれぞれ 5.6 % および 7.2 % の最大 RSD 値が得られました。同様に、RT の精度の計算で、BPA と BPF についてわずか 0.14 % と 0.11 % の最大 RSD 値が得られました。面積の RSD 値のグラフを図 5 に示します。

サンプル 番号	名称	LOD ng/mL	S/N	LOQ ng/mL	S/N	直線範囲	R ² 値	レベル数
1	ビスフェノール F	0.19	5.1	0.46	12.4	1.06–171.43	0.99999	7
2	ビスフェノール A	0.19	4.3	1.06	15.1	1.06–171.43	0.99998	7

表 4

BPA および BPF の LOD、LOQ、および直線性。サンプルは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理しました。ポリカーボネート製哺乳瓶で見られる BPA のレベルは直線範囲内に収まっていた

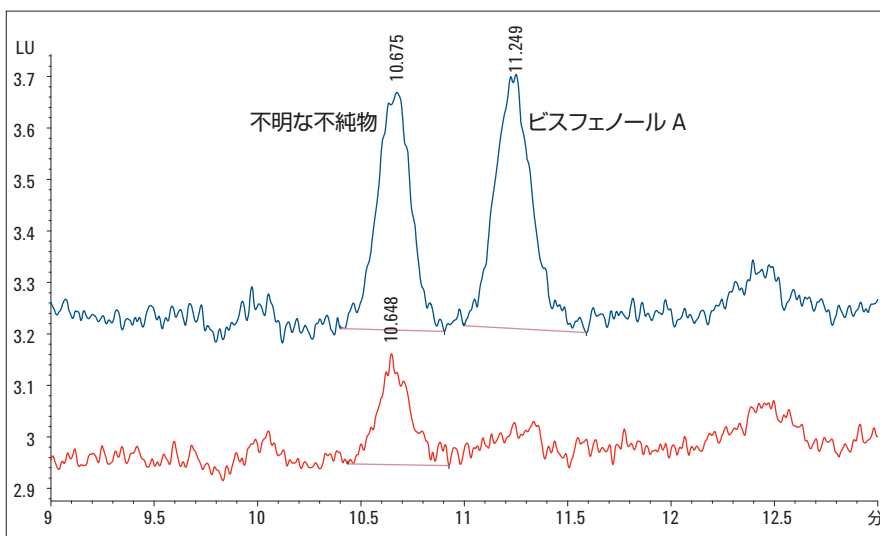


図 4

ビスフェノール A の LOQ レベル、1.06 ng/mL (21 pg オンカラム) 溶液を 20 μ L 注入したものとブランク注入との重ね表示。この濃度で得られた S/N 比は 15 でした

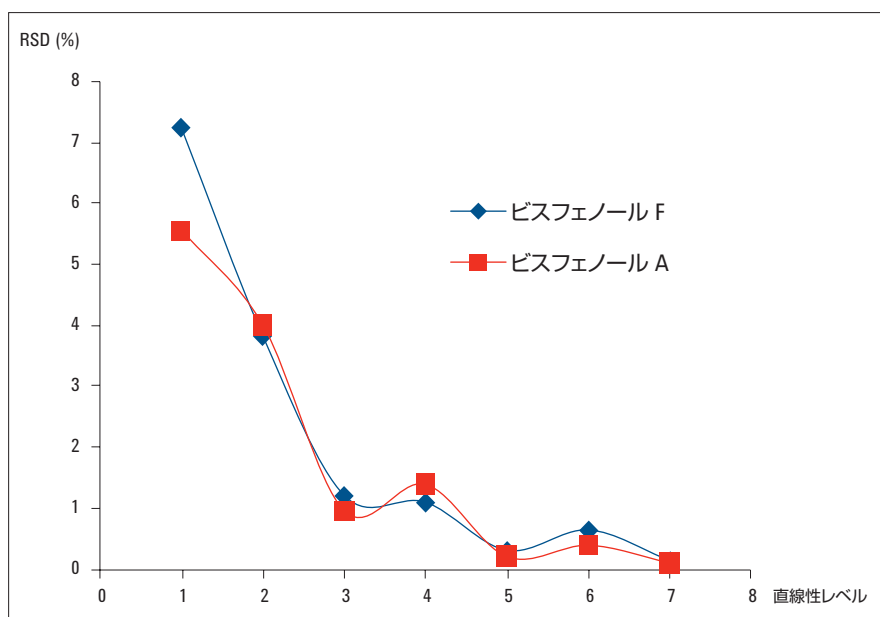


図 5

BPA および BPF の各濃度レベルにおける 6 回の繰り返しでの RSD (%) として測定された面積精度

堅牢性

メソッドの堅牢性をテストするために、30 ng/mL の BPA と BPF が含まれる標準溶液を使用しました。6 つの重要なメソッドパラメータ (流量、カラム温度、注入量、励起および発光波長、ステップグラジエント、緩衝液濃度) を個別に変化させ、7 回繰り返し注入してデータを収集しました。最後の 6 回の繰り返しで得られた化合物のピーク面積を分析用に比較しました。面積とリテンションタイムの許容偏差をそれぞれ $\pm 5\%$ と $\pm 3\%$ に設定しました。

堅牢性テストの結果を表 5 にまとめます。赤い数値は、結果が許容偏差を超えていることを示します。流量が $+2\%$ 変化した結果、2 つのビスフェノールの面積が減少しました。特に、ビスフェノール A では、カラム温度が 2.5% 変化することによってピーク面積にマイナスの偏差が発生することがわかりました。BPA と不純物との分離を比較すると (図 3、RT 10.6 を参照)、温度の上昇によって結果の品質が下がり、温度が $35\text{ }^\circ\text{C}$ まで低下すると結果が向上することがわかりました。

サンプル分析には $40\text{ }^\circ\text{C}$ の方が適切であることがわかりました。堅牢性の結果は、分析中にカラム温度を維持することの重要性を示しています。FLD 励起波長を 230 nm に設定し、発光波長を 316 nm に設定すると最大のピーク面積が得られるため、この設定が理想的であることがわかりました。3 nm の変動があっても、面積パーセンテージの偏差は許容限界を超えないため、 316 nm の発光波長の設定は堅牢です。ただし、励起波長は制御する必要があります。10% の偏差によって BPA と BPF の両方のピーク面積が減少するため、緩衝液濃度の変化も

重要です。堅牢性の結果は、このメソッドが通常の使用では高い信頼性を提供し、メソッドパラメータを意図的に変更しても、かなりのレベルまで性能が影響を受けないことを示しています。ただし、一部のパラメータは重要であり、慎重に制御する必要があります。

サンプルマトリックスからの回収率

BPA を含まない哺乳瓶をブランクマトリックスとして使用しました。スパイク分析を 2 回繰り返し、BPA と BPF の回収率をテストしました。低標準スパイクには、BPA を含まない哺乳瓶の 50 mL 水抽出液にそれぞれスパイクした BPA (30 ng) と BPF (30 ng) が含まれていました。別の高標準スパイクは、BPA を含まない哺乳瓶の 50 mL 水抽出液にそれぞれスパイクした BPA (50 ng) と BPF (50 ng) で構成されていました。対象化合物は、前述のように水サンプルから抽出し

ました。水溶液のリニア曲線 (「直線性」の項を参照) を使用して、面積を濃度の値に変換しました。低および高濃度値を理論値と比較しました。回収率の実験結果を表 6 に示します。BPA は、高濃度値で 80% の回収率を示しました。80% は、ASTM メソッドで報告される値よりも高い値です。このメソッドでは、平均的な単一のラボで 70% の回収率が得られます。

化合物名	低濃度での回収率 (%)	高濃度での回収率 (%)
ビスフェノール F	70.2	75.9
	70.1	74.1
ビスフェノール A	76.9	79.6
	75.1	81.1

表 6
2 回繰り返し実行したスパイク分析の回収率の結果

パラメータ	変化	BPF		BPA と不明物質の分離		BPA	
		% 面積	% RT	% 面積	% RT	% 面積	% RT
流量: 0.9 mL/min $\pm 2\%$	高: 0.92 mL/min	-4.6	-1.2	1.9	-5.1	-1.2	
	低: 0.88 mL/min	0.1	1.9	1.9	-1.9	2.2	
TCC: $40\text{ }^\circ\text{C} \pm 2.5\%$	高: $41\text{ }^\circ\text{C}$	-4.2	-0.4	1.7	-5.0	-0.6	
	低: $39\text{ }^\circ\text{C}$	-3.1	0.9	2.1	-10.0	1.3	
インジェクタ: $20\text{ }\mu\text{L} \pm 5\%$	高: $21\text{ }\mu\text{L}$	2.6	0.2	1.9	0.0	0.2	
	低: $19\text{ }\mu\text{L}$	-7.6	0.1	1.9	-9.8	0.1	
波長: 230~316 $\pm 3\text{ nm}$	233~316	-2.2	0.0	1.9	-5.7	0.0	
	227~316	-7.0	0.2	1.9	-4.6	0.2	
	230~319	-3.2	0.1	1.9	-4.5	0.1	
	230~313	-3.5	0.1	1.9	-3.0	0.1	
ステップグラジエント 開始ポイント: $2\text{ 分} \pm 10\%$	高: 2.2 分	-3.8	2.9	1.9	-4.1	2.0	
	低: 1.8 分	-3.3	-2.4	1.9	-3.8	-1.5	
緩衝液濃度: $10\text{ mM} \pm 10\%$	高: 11 mM	-4.2	0.2	1.9	-6.0	0.2	
	低: 9 mM	-5.9	0.1	1.8	-9.8	0.1	

表 5
濃度 30 ng/mL における堅牢性テストメソッドの結果と標準メソッドとの比較。表の赤字の値は、偏差が面積の許容限界 5% とリテンションタイムの許容限界 3% を超えていることを示します

サンプル分析

抽出手順と開発した分析メソッドを使用して哺乳瓶の BPA および BPF の含有量を測定しました。ブランド 1、ブランド 2、およびブランド 3 のラベルが付いた哺乳瓶を 2 回繰り返して分析しました。分析結果を、サンプル分析の実施前に作成した検量線と比較しました。SPE の対象となるブランクの水サンプルでは BPA は見られず、この実験で使用したプラスチックからは BPA が溶け出ていないことを示しています³。3 つのブランドの哺乳瓶からは異なる量の BPA が検出されました (図 6A を参照)。標準からの BPA の発光スペクトルをサンプルのスペクトルと重ねて示しました。良好な重なり合いが見られ、BPA の存在が確認されました (図 6B を参照)。異なるブランドの分析により、濃度の高いものでは 4 ng/mL が、低いものでは 0.5 ng/mL が検出されました (表 7 を参照)。これらの値は、Sun 他により以前に観察された値 (0.6 ng/mL) と一致しています⁵。体重 10 kg

の乳児がブランド 2 の哺乳瓶で 250 mL を摂取すると、この乳児は 1 日に体重 1 kg あたり 0.1 μg の BPA を取り込むこととなります。これは、EPA により設定された 1 日に体重 1 kg あたり 50 μg という参照用量よりも低い値ですが、一部の実験では懸念が示されています⁶。また、結果から、どの哺乳瓶からも BPF が検出されなかったこともわかりました。

化合物名	BPF (ng/mL)	BPA (ng/mL)
ブランド 1	0	0.76
	0	0.52
ブランド 2	0	4.26
	0	4.46
ブランド 3	0	2.08
	0	2.58

表 7
異なるブランドの哺乳瓶から 250 mL の水に抽出された BPA および BPF の濃度

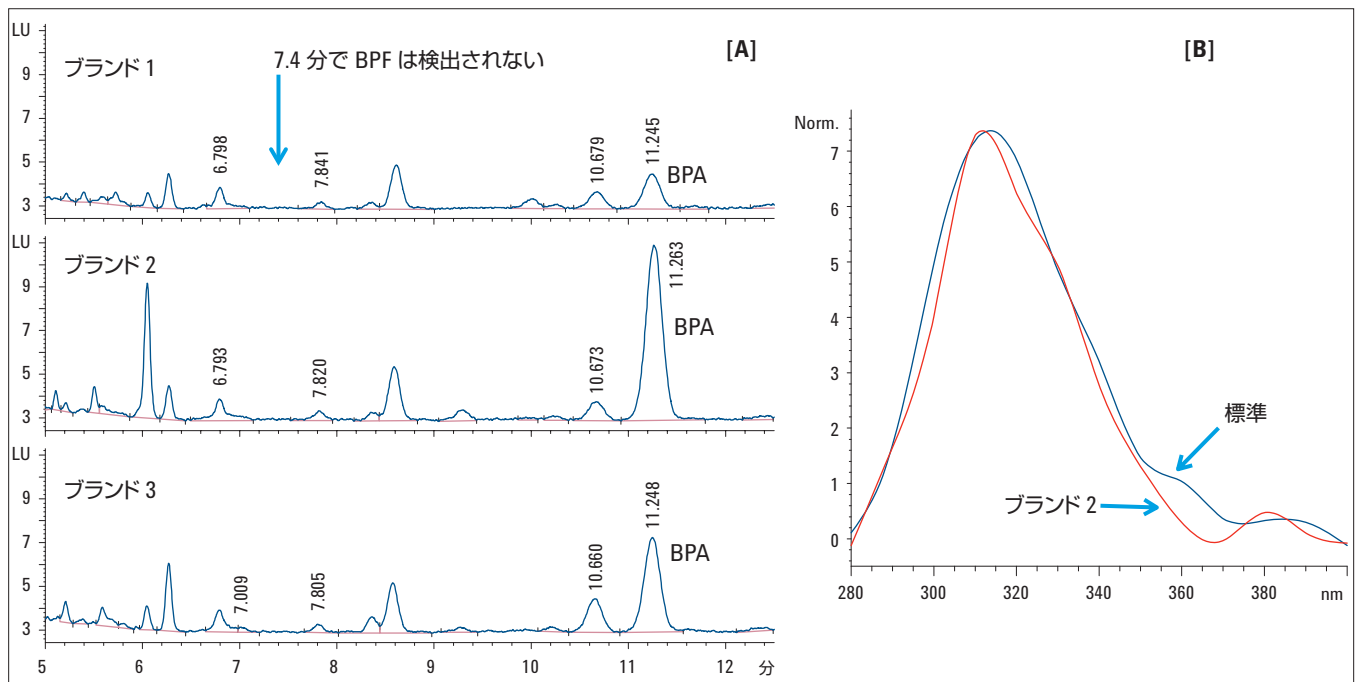


図 6
[A] 3 つの異なる哺乳瓶から得られた BPA および BPF の分析クロマトグラムの重ね書き表示。[B] 標準とブランド 2 のサンプルから得られた BPA の発光スペクトルの重ね書き表示

UHPLC メソッド

分析時間を図 7 に示したものと同一に維持したまま、HPLC メソッドを Agilent 1290 Infinity LC システムの UHPLC メソッドに変換しました。この変換は、分離能と感度の効果を調べるために行いました。UHPLC メソッドでは、同じ移動相、グラジエント、検出器設定を使用しました。カラムのサイズは同一のままですが、UHPLC メソッドでは粒子サイズを 5 μm から 1.8 μm に下げました。UHPLC メソッドではピークが約 1.2 分早く溶出しました。これは、Agilent 1290 Infinity LC システムの方がディレイボリュームが小さいからです。また UHPLC メソッドの方が HPLC メソッドよりもピークがシャープで、分離能が優れていました。最も低い直線性レベル L1 と最も高い直線性レベル L7 におけるピーク面積、ピーク高さ、ピーク幅、分離能、S/N などのピーク特性を表 8 で比較しました。この結果は、BPA の分離能が HPLC メソッドの 1.9 から UHPLC メソッドの 2.5 に向上したことを示しています。S/N 比もほぼ 2 倍になり、その結果感度も向上したため、LOQ と LOD のレベルを再定義することができました。

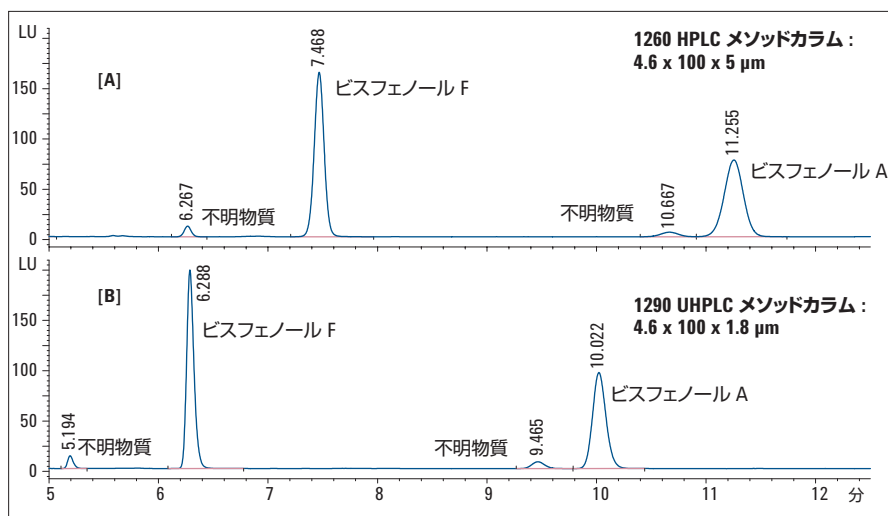


図 7 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 100 カラムで BPA および BPF のレベル 7 の標準を分離する HPLC メソッド [A] および UHPLC メソッド [B] のクロマトグラムの重ね書き表示。HPLC メソッドでは 5 μm の粒子サイズを、UHPLC メソッドでは 1.8 μm を使用しました

化合物名 (レベル)	HPLC メソッド					UHPLC メソッド				
	ピーク面積	ピーク半値幅	ピーク高さ	分離能	S/N	ピーク面積	ピーク半値幅	ピーク高さ	分離能	S/N
BPF (L7)	1037.0	0.10	163.7	-	3683.0	930.5	0.07	199.6	-	6784.8
BPA (L7)	934.1	0.19	76.3	1.9	1715.7	825.8	0.13	96.4	2.5	3276.7
BPF (L1)	7.5	0.10	1.1	-	27.4	7.2	0.07	1.4	-	42.6
BPA (L1)	8.1	0.20	0.6	1.8	15.1	9.4	0.14	1.0	2.5	31.6

表 8 最初の直線性レベルと最後の直線性レベルの HPLC および UHPLC メソッドのピーク面積、ピーク半値幅、ピーク高さ、分離能、および S/N 比の比較。UHPLC メソッドの方が HPLC メソッドよりも感度と分離能が優れています

同じキャリブレーションレベル (表 2 を参照) を使用したときの BPA と BPF のキャリブレーションが直線であることがわかりました (BPF の R^2 : 0.99991、BPA の R^2 : 0.99993)。面積および RT の RSD (%) をすべての濃度レベルについて計算しました。この結果は、面積の偏差の RSD (%) が UHPLC メソッドで比較的低いことを示しています。図 8 に示すように、BPA のレベル 1 で 3.0 % の値が見られました。BPA と BPF のいずれについても、RT の最大 RSD は 0.1 % 未満でした。

結論

Agilent 1260 Infinity LC システムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用して、ビスフェノール A とビスフェノール F を分離し、定量しました。キャリブレーション標準は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理しました。メソッドを開発し、部分的バリデーションを実施しました。このメソッドは、さまざまな哺乳瓶から 80 % の回収率値でビスフェノール A とビスフェノール F を定量します。このメソッドは、哺乳瓶の品質管理を目的とした BPA および BPF レベルの測定に適用することができます。Agilent 1290 Infinity LC システムへのメソッド変換は、検出器とメソッド条件を同一に維持することで効果的に行われました。HPLC と UHPLC のいずれのメソッドも直線的で、高精度の結果が示されました。ただし、UHPLC メソッドの方が HPLC メソッドよりも優れた分離能と S/N 比、またシャープなピーク幅と高いピーク高さが得られました。

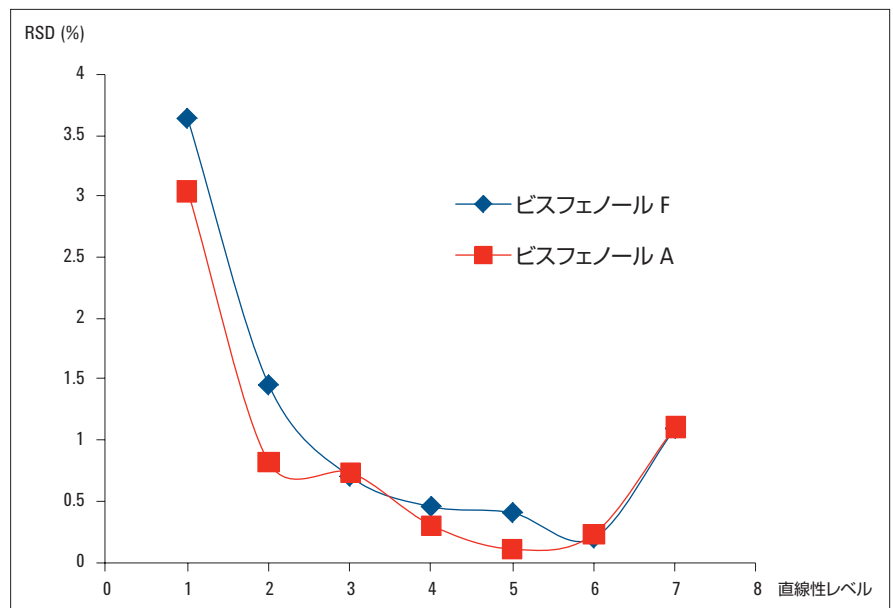


図 8
UHPLC によって BPF および BPA の RSD (%) として測定された面積精度。各濃度レベルで測定を 6 回繰り返ししました

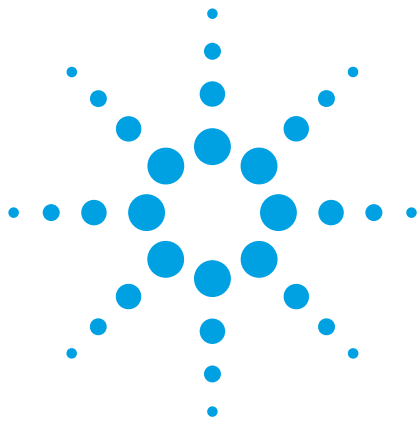
参考文献

1. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Bisphenol A. (CASRN 80-05-7), <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>
2. Ballesteros-Gomez; S. Rubio; D.Perez-Bendito, "Analytical methods for the determination of bisphenol A in food," *J. Chrom A*, 1216: 449-469, **2009**.
3. ASTM method," Standard Test Method for Determination of Bisphenol A in Environmental Waters by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," D7574-09.
4. W.D. Snyder," Agilent 7696A Sample Prep WorkBench: How to automate Preparation of a Sample Set by Serial Dilution for Measurement of Flame Ionization Detector Performance," Agilent Application note, Publication Number, 5990-6850EN, **2010**.
5. Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima, "High-Performance Liquid Chromatography with Peroxyoxalate Chemluminescence Detection of Bisphenol A Migrated from Polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label," *J.Chrom B*, 749: 49-56, **2000**.
6. S.K. Ritter, "Debating BPA's Toxicity. The Precautionary Principle Serves as a Dividing Line in Arguments Over the Safety of Bisphenol A," *Chemical & Engineering News*, 89: 14-19, **2011**.

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Published in Japan, December 1, 2011
5990-9398JAJP





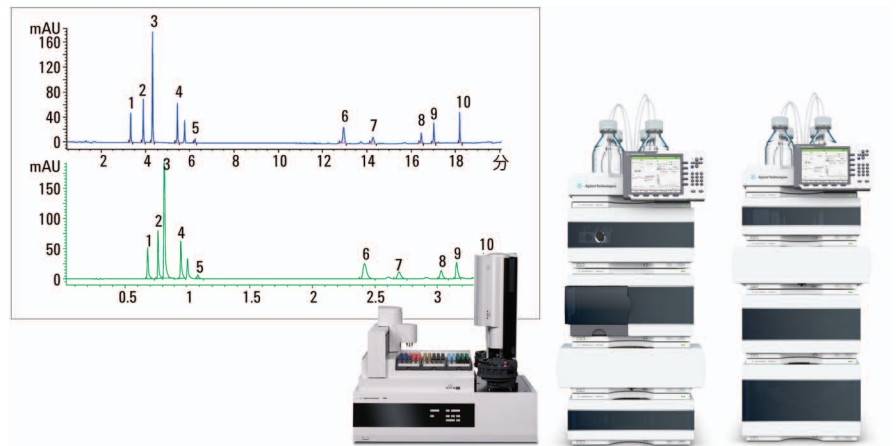
菓子類に含まれる着色料の分析

アプリケーションノート

食品分析

著者

Siji Joseph,
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India



概要

合成または人工着色料は、商品の外観を良くする目的で食品や飲料の添加物として使用されています。この実験では、10種類の合成着色料を同時に測定するための堅牢な逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) メソッドを開発しました。分離と定量は、Agilent Poroshell EC-C18 カラムを使用して Agilent 1260 Infinity LC システムにより行いました。メソッドの堅牢性は部分的バリデーションにより確認しました。菓子類からの着色料の分析結果から、このメソッドが構成成分の多い食品中の合成着色料の定量に適していることがわかります。最後に、この HPLC メソッドを、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した、分析時間の短い超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) メソッドに効果的に変換し、分離能を低下させずに高速分析を行うことができました。Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用し、さまざまな波長での測定を行い、異なる着色料をその最大吸光度で定量しました。各着色料の検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、精度、確度、および直線性を両方のメソッドを使用して求めました。LOD、LOQ、および直線性の実験のためのサンプル前処理は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを分析ワークフローに組み込むことによって省力化しました。



Agilent Technologies

はじめに

着色料は、染料、色素、または食品に加えたときに発色する物質として定義されています¹。主に植物または動物由来の天然および合成着色料があります。ターメリックやサフラン等がこれに当たります。合成色素は、タートラジンやインジゴカルミンなどの化学合成着色料です²。食品を着色することは多くの理由があります。例えば、長期間の保存条件で生じる退色の調整、自然に発生する色の変化の補正、無色の食品の着色などがその例です。実際に、市場に出回っているほとんどの包装食品に着色料は使用されています¹。一日の許容量を超える人工着色料の過剰摂取が、子どもの行動異常を引き起こす可能性があることが指摘されています³。米国食品医薬品局 (FDA) は、許可された着色料だけを食品に使用するように管理する規制を設定しています。この規制では、着色料を同定し、定量するための高精度の分析手法の重要性を強調しています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いて開発した逆相高圧液体クロマトグラフィーメソッドを紹介します。食品着色料は水溶性であるため、逆相 HPLC はこれらの物質の理想的な分析手法となります。

メソッド

機器およびソフトウェア

次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity クォータナリ LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity クォータナリポンプおよびデガッサ (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンブラ (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212B)、Max-Light フローセル付き (光路長 60 mm) (G4212-60007)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラム、4.6 x 150 mm、2.7 μ m (693975-902)

また次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して UHPLC 分析を開発し、実行しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ、デガッサ (G4220A) および 100 μ L Jet Weaver ミキサ付き
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、Max-Light フローセル付き (分散ボリューム 1.0 μ L、光路長 10 mm) (G4212-60008)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラム、内径 2.1 mm、長さ 75 mm、2.7 μ m 粒子を充填 (697775-902)

いずれのシステムも、Agilent ChemStation バージョン B.04.02 を使用して制御しました。

リニアリティ確認のための液の希釈は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理しました。

試薬および材料

使用したすべての化学物質と溶媒は HPLC グレードのものであり、超純水は Milli Q 水精製システム (Millipore Elix 10 モデル、米国) から採取したものを使用しました。メタノールはスーパーグラジエントグレードのもので、Lab-Scan (タイ、バンコク) から購入しました。リン酸水素二ナトリウムおよび α -リン酸は Fluka (ドイツ) から購入しました。ジメチルスルホキシド (DMSO) は Qualigens (インド) から購入しました。タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ボンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー/エリオグラウシン、ボンソー 3R、およびエリスロシン B の標準は Aldrich (インド) から購入しました。回収率および定量分析のための菓子類は実験室所在地で購入しました。

分析条件

逆相液体クロマトグラフィーと UHPLC に使用する分析条件を表 1 に示します。

着色料標準溶液

タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ボンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー/エリオグラウシン、ボンソー 3R、およびエリスロシン B の標準原液は、約 20 mg の標準物を秤量し、10 mL メスフラスコに移すことで個別に調製しました。300 μ L 量の DMSO を各フラスコに加え、移動相 A および B を 80:20 の比率で事前に混合した溶液を希釈液として使用しました。必要に応じて超音波処理を利用しました。

標準混合溶液と直線性レベル

約 100 μ L の各標準溶液を正確に混合し、各着色料の濃度が 200 ppm になる 2,000 μ L の標準混合液を調製しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、この 200 ppm の標準混合溶液をさらに段階希釈した溶液を調製し、これを用いてリニアリティを確認しました。濃度を変えた標準溶液は 0.01~200 ng/ μ L の範囲に対応していました (10 個のレベルと 6 回の繰り返し)。

パラメータ	Agilent 1260 Infinity クォータリ LC システム	Agilent 1290 Infinity LC システム
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 150 mm、2.7 μ m (p/n N693975-902)	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 75 mm、2.7 μ m (p/n 697775-902)
カラムオープン	45 °C	45 °C
注入量	5 μ L (フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄)	1 μ L (フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄)
サンプルトレイ温度	5 °C	5 °C
移動相 A	10 mM Na ₂ HPO ₄ 、pH 7	10 mM Na ₂ HPO ₄ 、pH 7
移動相 B	メタノール	メタノール
グラジエント	0 分 : 5 % B 4 分 : 30 % B 10 分 : 40 % B 14 分 : 40 % B 18 分 : 95 % B 22 分 : 95 % B 22.1 分 : 5 % B	0 分 : 5 % B 0.15 分 : 5 % B 0.5 分 : 30 % B 2.3 分 : 40 % B 2.6 分 : 40 % B 3.25 分 : 95 % B 4.00 分 : 95 % B 4.01 分 : 5 % B
ポストラン時間	5 分間	1 分間
流量	1.2 mL/min	0.7 mL/min
フローセル	60 mm 光路 (p/n G4212-60007)	10 mm 光路 (p/n G4212-60008)
測定波長	288 nm : インジゴカルミン 428 nm : タートラジン 484 nm : サンセットイエロー FCF 511 nm : ボンソー 4R およびボンソー 3R 520 nm : アマランスおよびカルモイシン 530 nm : エリスロシン B 626 nm : ファストグリーン FCF およびアシッドブルー	288 nm : インジゴカルミン 428 nm : タートラジン 484 nm : サンセットイエロー FCF 511 nm : ボンソー 4R およびボンソー 3R 520 nm : アマランスおよびカルモイシン 530 nm : エリスロシン B 626 nm : ファストグリーン FCF およびアシッドブルー
データサンプリングレート	20 Hz、ピーク幅 0.013 分 (0.25 秒の応答時間)	80 Hz、ピーク幅 0.003 分 (0.062 秒の応答時間)

表 1
Agilent 1260 Infinity LC システムと Agilent 1290 Infinity LC システムの設定

着色料の定量および回収率の実験のためのサンプル前処理

さまざまな着色料が含まれる菓子から5種類のサンプルを調製し、着色料の定量と回収率算出の実験に使用しました。2gの菓子に含まれる着色料を400 µLのDMSOと20 mLの希釈液を順次に加えるシンプルなプロセスによって抽出しました。超音波処理し、Beckman Coulter Allegra X22R 遠心機システム (C0650 ロータ付き) を使用して 8,300 rcf で 10 分間遠心分離した後、0.25 µm PTFE Agilent Econofilter シリンジフィルタメンブレンで溶液をろ過し、分析に使用しました。スパイクした/スパイクしていない菓子サンプルを使用して回収率の実験を行いました。カラム上で標準物が 25 ng となるよう、混合標準液をスパイクしました。抽出手順はそれまでの手順と同一です。

注意事項

溶液の状態で化合物を長期に安定して保存するために、未使用時には、前処理済みのすべての溶液をアルミホイルで包み、4 °C の冷暗所に保管しました。分析時には、冷却機能付きのオートサンブラで温度を 5 °C に維持しました。

手順

表 2 に、200 ng/µL の標準混合溶液をさらに希釈することにより作成したキャリブレーションレベルを示します。その後の 2 つのシーケンスで 500 µL シリンジを取り付けた Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、直線性レベルを作成しました。最初のシーケンスでは固定量の希釈液を各バイアルに加え、第 2 のシーケンスでは、250 µL の 200 ng/µL 溶液をバイアルに加えて 15 秒間攪拌しました。2 つのシーケンスを実行する代わりに、これらのステップを 1 つのメソッドにプログラミングし、

1 つのシーケンスとして実行することもできます。直前のレベルから 250/100 µL を取り出し、これを次のレベルのバイアルに加えることで、段階的に溶液を希釈して行きました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの設定で使用するシリンジパラメータを表 3 に示します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ⁴の設定については、アジレントアプリケーションノート (資料番号 5990-6850JAJP) で詳細に説明しています。

DMSO で希釈した 5 µL の溶液ブランクとし、各キャリブレーションレベルについて 6 回繰り返し注入しました。各レベルの面積およびリテンションタイム (RT) 情報を使用して、標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD) の値を計算しました。検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) は、低い方の直線性レベルの注入から得られました。各リニアリティレベルの着色料のピーク面積の平均値を濃度に対してプロットし、リニアリティカーブを作成しました。

初期濃度 (ppm または ng/µL)	採取した液量 (µL) (第 2 のシーケンス)	希釈液の液量 (µL) (最初のシーケンス)	合計量 (µL)	測定した液の濃度 (ng/µL)	5 µL 注入した時のサンプル量 (ng)	レベル名
200	250	250	500	100	500	10
100	100	400	500	20	100	9
20	250	250	500	10	50	8
10	100	400	500	2	10	7
2	250	250	500	1	5	6
1	100	400	500	0.2	1	5
0.2	250	250	500	0.1	0.5	4
0.1	100	400	500	0.02	0.1	3
0.02	250	250	500	0.01	0.05	2
0.01	100	400	500	0.002	0.01	1

表 2
キャリブレーションレベル作成のための希釈の詳細

パラメータ	溶媒事前予備洗浄 1	分注洗浄	分注ポンプ	分注設定
ポンプ数または洗浄回数	1	1	2	
洗浄ボリューム (µL)	250	250	50	
吸引速度 (µL/min)	500	500	500	500
分注速度 (µL/min)	2500	2500	2500	2500
ニードル深さオフセット (mm)	-1	-1	-1	-1
粘度遅延 (秒)	1	1	1	1
タレット溶媒	A			
エアギャップ (% シリンジ容量)	0			0

表 3
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのシリンジパラメータ

6つの重要なメソッドパラメータを変更し、メソッドの堅牢性を評価しました。各着色料が約30 ng (オンカラム) 含まれる標準混合液を6回繰り返して注入することで、メソッドの堅牢性を確認しました。2gの菓子に25ngの着色料標準物をスパイクしたサンプルとスパイクしないサンプルを用意し、回収率の実験を行いました。10種類のすべての着色料標準物の吸収スペクトルを使用してUVスペクトルライブラリを作成しました。リテンションタイムとともにこのライブラリを使用して、菓子に含まれる着色料を同定しました。

このメソッドを変換して、UHPLC用の効果的なメソッドを作成しました。各着色料の検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、および直線性を評価し、メソッドの精度を面積とリテンションタイム (RT) のRSDにより確認しました。UHPLCメソッドを使用したすべての着色料の線形曲線もプロットしました。UHPLCメソッドを使用すると、分離能を低下させずに非常に高速の分析を行うことができます。

結果と考察

分離および検出

Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm x 4.6 mm, 2.7 μm) カラムを使用することで、10種類の着色料を20分間で良好に分離できました。異なる着色料では極大吸収波長も異なることがわかりました。10種類の着色料のクロマトグラフィー溶出パターンを図1に示し、着色料のリストをそれぞれの極大吸収波長とともに表4に示します。ChemStationソフトウェアのピーク純度機能を使用して各ピークの純度をチェックし、メソッドの特異性を評価しました。精度、直線範囲、確度、特異性、回収率、および堅牢性の実験を行ってメソッドのバリデーションを行いました。

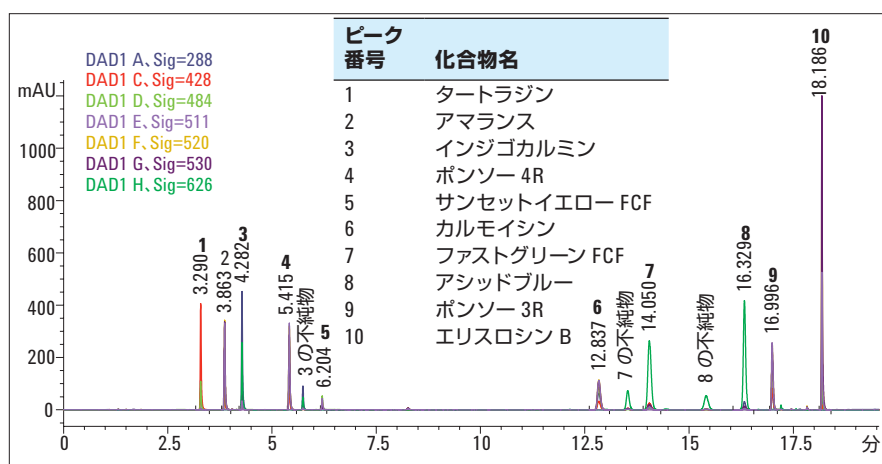


図1 15 cm の Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを使用した 10 種類の着色料の分離。7つの異なる波長のトレースを重ね書きしました。

サンプル番号	化合物名	分子式	分子量	リテンションタイム	極大吸収波長
1	タートラジン	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂	534.36	3.29	428
2	アマランス	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	3.86	522
3	インジゴカルミン (インジゴチン)	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	466.35	4.28 (不純物 5.74)	288 および 612
4	ボンソー 4R (ボンソー SX)	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	5.41	510
5	サンセットイエロー FCF	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	452.37	6.20	482
6	カルモイシン	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	502.43	12.83	518
7	ファストグリーン FCF	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ O ₁₀ S ₃ Na ₂	808.85	14.04 (不純物 13.52)	622
8	アシッドブルー / エリオグラウシン	C ₃₇ H ₃₄ Na ₂ N ₂ O ₉ S ₃	792.85	16.32 (不純物 15.40)	628
9	ボンソー 3R	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₇ S	494.45	16.99	512
10	エリスロシン B	C ₂₀ H ₈ I ₄ O ₅	835.89	18.18	530

表4 着色料と、各着色料について観察された極大吸収のリスト

検出下限 (LOD) および 定量下限 (LOQ)

S/N 比が 3 となる対象化合物濃度を LOD、S/N 比が 10 となる対象化合物濃度を LOQ と見なしました。各着色料について観察された LOD および LOQ の値を表 5 に示します。例として、ポンソー 4R (0.1 ng オンカラム) の LOD のクロマトグラムをブランクと重ね書きして図 2 に示します。

直線性

前処理済みのすべての濃度について注入を 6 回繰り返して、LOQ レベルから最大濃度レベルまでの各着色料について、面積応答と濃度値の関係を求めました。すべての着色料について得られた回帰係数を表 5 に示します。

ピーク 番号	化合物名	LOD (ng)	LOQ (ng)	トータル レベル (n=6)	オンカラムの 直線範囲 (ng)	線型方程式	R ² 値
1	タートラジン	0.05	0.1	8	0.1~100	$y = 15.477x - 5.7137$	0.9993
2	アマランス	0.1	0.25	7	0.25~100	$y = 12.686x - 5.8682$	0.9993
3	インジゴ カルミン	0.05	0.1	8	0.1~100	$y = 16.723x - 5.9163$	0.9993
4	ポンソー 4R	0.05	0.1	8	0.1~100	$y = 13.168x - 5.0258$	0.9993
5	サンセット イエロー FCF	0.25	0.5	8	0.5~1000	$y = 1.8621x + 7.2227$	0.9992
6	カルモイシン	0.25	0.5	8	0.5~1000	$y = 10.018x + 41.05$	0.9993
7	ファスト グリーン FCF	0.1	0.25	7	0.25~100	$y = 31.981x - 14.22$	0.9993
8	アシッド ブルー	0.05	0.1	8	0.1~100	$y = 36.351x - 12.193$	0.9994
9	ポンソー 3R	0.1	0.25	9	0.25~1000	$y = 11.324x + 39.972$	0.9992
10	エリスロシン B	0.05	0.1	8	0.1~100	$y = 40.628x - 10.168$	0.9997

表 5

10 種類のすべての着色料の LOD、LOQ、および直線性の結果。0.1 ng/μL の標準溶液を 2.5 μL 注入することにより 0.25 ng のオンカラム濃度が得られました。

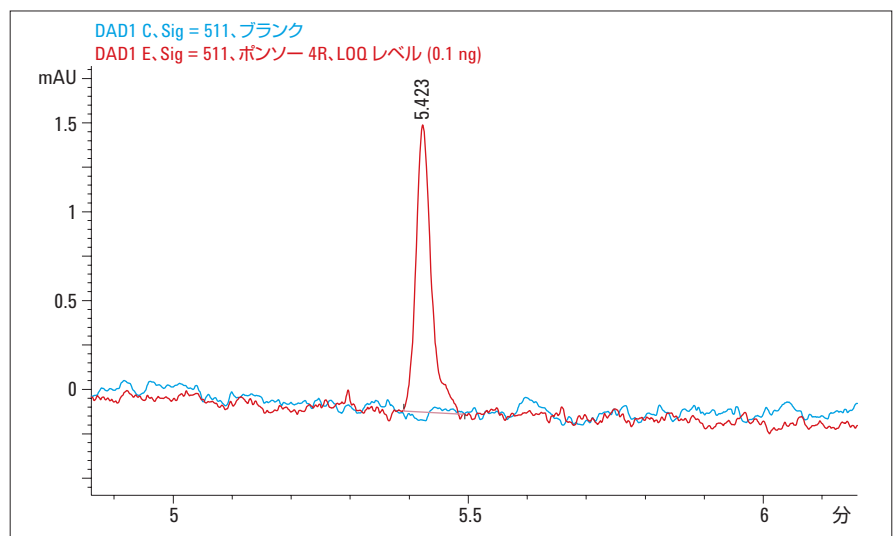


図 2

ポンソー 4R の LOQ (0.1 ng) のクロマトグラムとブランクとの重ね書き表示

リテンションタイムと面積の精度

メソッドの精度を確認するために、1、10、および 100 ng の (オンカラム) 濃度で 10 種類のすべての着色料のリテンションタイム (RT) と面積の相対標準偏差 (RSD) の値を計算しました。観察された面積の最大 RSD 値は 1.19 % (1 ng のカルモイシン)、RT の最大 RSD 値は 0.09 % (10 ng のタートラジン) でした。10 種類の着色料から得られた面積の RSD 値のグラフを図 3 に、RT の RSD 値を図 4 に示します。

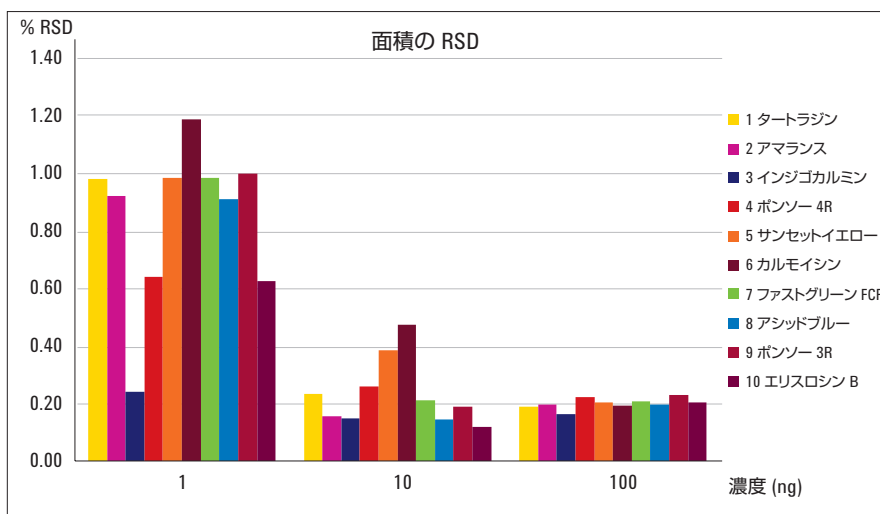


図 3
1 ng、10 ng、および 100 ng の (オンカラム) 濃度ですべての着色料について得られたピーク面積の再現性

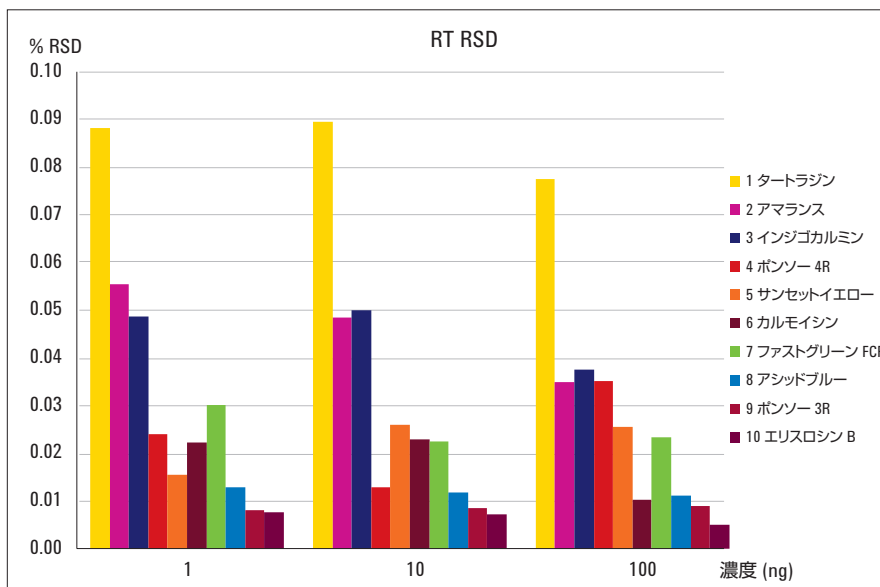


図 4
1 ng、10 ng、および 100 ng の (オンカラム) 濃度ですべての着色料について得られたリテンションタイムの再現性

堅牢性

6つの重要なメソッドパラメータを意図的に変化させることで、メソッドの堅牢性を評価しました。面積とリテンションタイムで得られたデータのばらつきを計算し、元のメソッドと比較しました。標準物をスパイクした着色料の混合溶液を6回繰り返して注入しました。リテンションタイムと面積の許容偏差をそれぞれ±3%と±5%に設定しました。この実験で使用した堅牢性テストの条件を表6に、堅牢性の実験の結果を図5および図6にまとめます。

サンプル番号	パラメータ (実際の値)	変更の幅	変更後の値
1	流量 (1.2)	2%	1.224 mL/min 1.176 mL/min
2	注入量 (5 µL)	2%	5.1 µL 4.9 µL
3	波長 (288、428、484、511、520、530、626 nm)	(±) 3 nm	波長 (291、431、487、514、523、533、629 nm) 波長 (285、425、481、508、517、527、623 nm)
4	pH (7.0)	(±) 0.15	10 mm 緩衝液 pH 7.15 10 mm 緩衝液 pH 6.85
5	カラム温度 (45 °C)	(±) 2 °C	47 °C 43 °C
6	グラジエントの勾配 (6.25、4分間で5~30、13.75、4分間で5~30、13.75、4分間で40~95)	~10%	6.75、4分間で5~32、14.25、4分間で38~95 5.75、4分間で5~28、13.25、4分間で42~95

表6
この実験で使用した堅牢性テストの条件

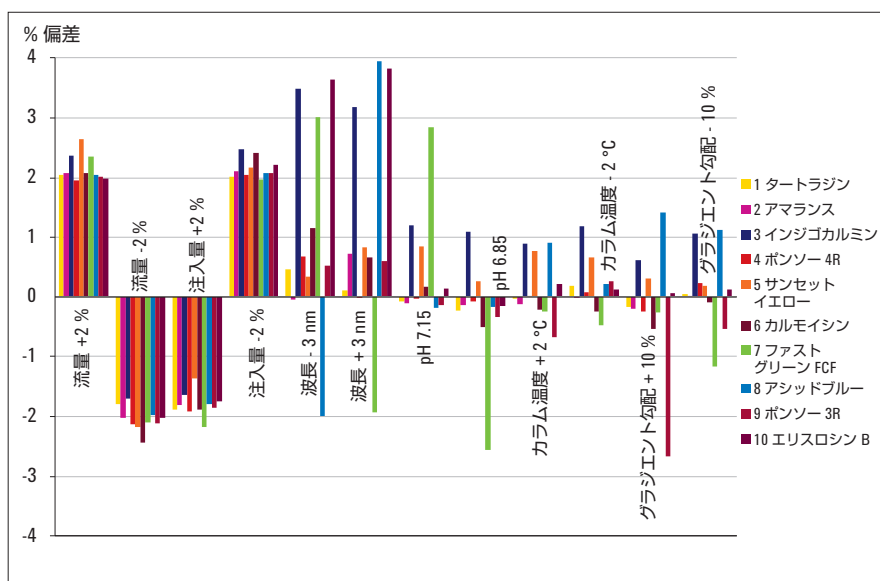


図5
堅牢性テストの結果のまとめ (面積)

10 種類の全着色料の面積のばらつきが、変化させたすべてのパラメータの許容限界内であることがわかりました。また、移動相の流量、注入量、および pH に対するリテンションタイムのばらつきも、この堅牢性の実験の許容限界値内であることがわかりました。ただし、カラム温度の上昇がリテンションタイムのばらつきに与える影響は、2 つの化合物で許容限界値を超えました。カラム温度を下げると、3 つの化合物でリテンションタイムのばらつきが許容限界値を超えました。リテンションタイムに大きな影響を与える重要なパラメータの 1 つがグラジエントの勾配であることがわかりました。グラジエントの勾配を $\pm 10\%$ 変化させると、6 つ以上の化合物が許容限界値を超えるリテンションタイムのばらつきになることがわかりました。堅牢性の検証結果は、このメソッドが通常の使用では高い信頼性を提供し、パラメータを意図的に変更しても、かなりのレベルまで性能が影響を受けないことを示しています。

菓子類に含まれる着色料の回収率

5 種類の異なる色のついた菓子に含まれるさまざまな着色料の回収率測定を標準添加法により行いました⁵。この分析では、10 種類の全着色料の標準混合溶液を 25 ng (オンカラム) 使用しました。標準物をスパイクしたサンプル、スパイクしていないサンプル、および標準クロマトグラムの各着色料のピーク面積を個別に測定しました。標準物をスパイクしたサンプルとスパイクしていないサンプルの検出器応答の違いを、標準クロマトグラムで測定された応答と比較し、回収率の百分率として表しました。菓子に含まれるすべての着色料の回収率は 98 % を超えました。標準物をスパイクした、またはスパイクしていない赤い菓子の抽出サンプルと標準混合溶液で観察されたクロマトグラムを図 7 に示します。

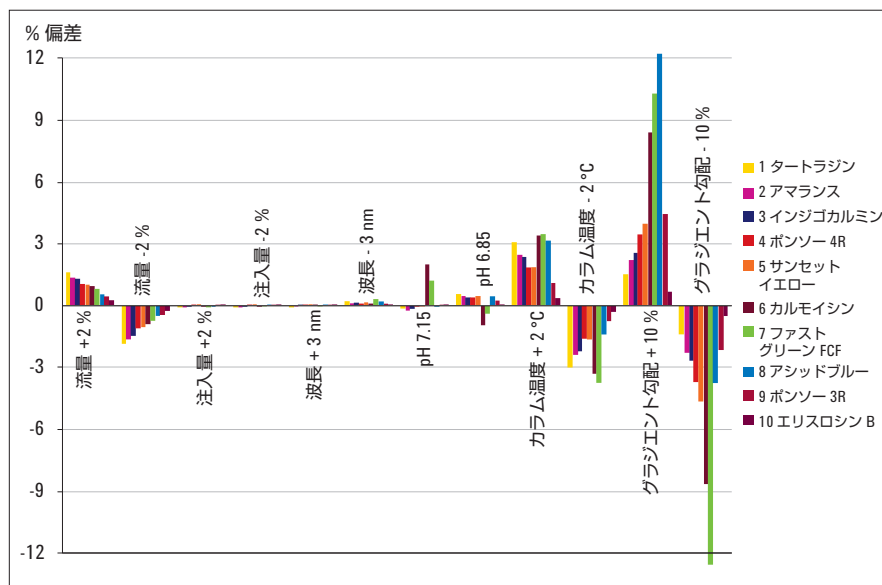


図 6
堅牢性テストの結果のまとめ (リテンションタイム)

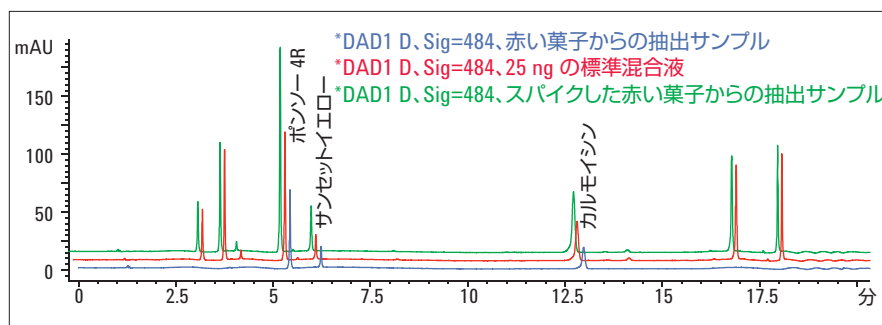


図 7
スパイクした/スパイクしていない赤い菓子の抽出サンプルと標準混合液の重ね書き

菓子類に含まれる着色料の定量

面積応答を使用して、さまざまな色のついた菓子に含まれる着色料を測定しました。線形曲線から得られた線形方程式を計算に使用しました。さらに、社内で作成した UV スペクトルライブラリを利用し、スペクトルのマッチ度を使用して化合物を同定しました。5 種類の異なる菓子 1 g に含まれる着色料の量の計算値を表 7 に示します。赤い菓子に含まれるボンソー 4R のピークとライブラリスペクトルとの間で確認されたスペクトルの重ね書きを図 8 に示します。

項目番号	菓子の色	成分	存在量 (µg/g)
Sweet_1	青	アシッドブルー	44.7
Sweet_2	黄	タートラジン	61.7
Sweet_3	緑	タートラジン	52.5
Sweet_4	オレンジ	アシッドブルー	10.9
		タートラジン	24.8
		ボンソー 4R	26.9
Sweet_5	赤	サンセットイエロー FCF	43.3
		ボンソー 4R	27.5
		サンセットイエロー FCF	38.3
		カルモイシン	20.6

表 7

1 g の菓子に含まれる着色料の量の計算値

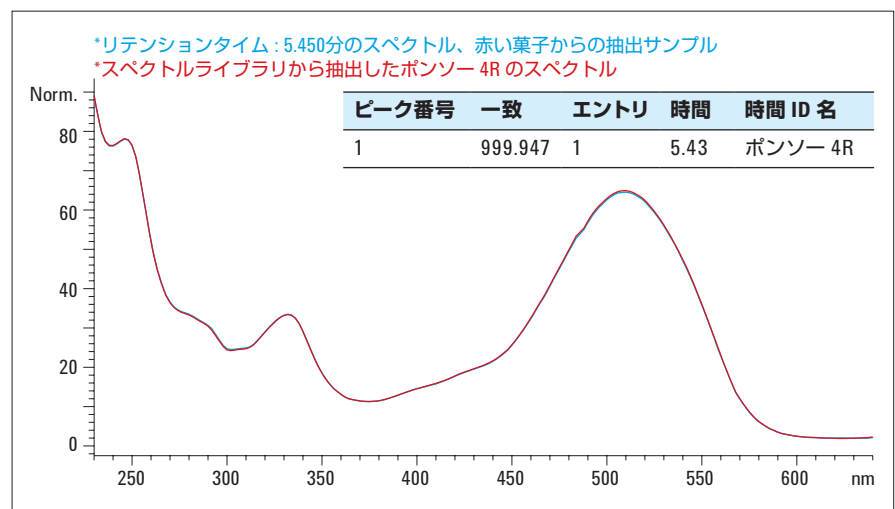


図 8

赤い菓子のボンソー 4R のピークとライブラリスペクトルとのスペクトルの重ね書き

UHPLC メソッド

ダイオードアレイ検出器付きのUHPLCを用いた10種類の着色料の分離メソッドを開発しました。このUHPLCメソッドは優れた分離能を示し、所要時間21分間のHPLCグラジエントと比較して約81%の分析時間の短縮と89%の溶媒消費量の削減を達成しました(図9)。ファストグリーンFCFのピークとその不純物(図1で13.526分に溶出するピーク)との分離度が、このHPLCメソッドのすべてのピークの中で最も低いことがわかったため、UHPLCで分析時間を短縮して行く場合には、この部分の分離をモニターすることで、全体的なピークの変離能を評価しました。HPLCメソッドではこの分離度は3.71でしたが、分析時間の短いUHPLCメソッドでは、この値は1.8を下回りました。UHPLCメソッドで観察されたLOD(検出下限)、LOQ(定量下限)、および直線性の結果を表8に示します。メソッドの精度を評価するために、リテンションタイムのRSD値(相対標準偏差)と10ngのオンカラム濃度の面積を計算しました。サンセットイエローが最もピーク面積のRSD値、リテンションタイムのRSD値とともに最も大きく、それぞれ0.84%と0.04%でした。この結果を図10に示します。面積とリテンションタイムのRSD値が小さいほど、そのメソッドが高精度であることを示しています。これらの結果は、開発したUHPLCメソッドの信頼性を証明するものです。この方法を使用すると、菓子サンプルに含まれる着色料の迅速定量が可能になります。

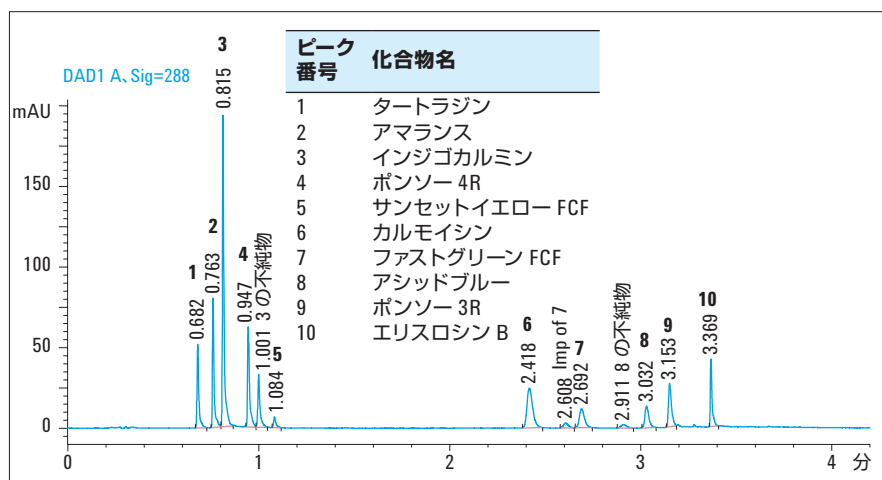


図9 Agilent 1290 Infinity LC システムでUHPLCメソッドを使用した10種類の着色料の分離

ピーク番号	化合物名	LOD (ng)	LOQ (ng)	総合的なレベル (n=6)	オンカラムの直線範囲 (ng)	線型方程式	R ² 値
1	タートラジン	0.05	0.1	9	0.1~200	$y = 4.6746x + 2.5573$	0.9998
2	アマランス	0.1	0.25	8	0.25~200	$y = 3.7682x + 0.585$	0.9996
3	インジゴカルミン	0.05	0.1	9	0.1~200	$y = 4.3278x + 3.0266$	0.9998
4	ボンソー 4R	0.1	0.25	8	0.25~200	$y = 3.9616x + 1.4427$	0.9997
5	サンセットイエロー FCF	0.5	1	6	1~200	$y = 0.6479x + 0.8958$	0.9993
6	カルモイシン	0.25	1	6	1~200	$y = 3.8231x + 0.5447$	0.9996
7	ファストグリーン FCF	0.1	0.25	8	0.25~100	$y = 9.008x + 3.0979$	0.9998
8	アシッドブルー	0.1	0.25	8	0.25~100	$y = 10.083x + 14.681$	0.9991
9	ボンソー 3R	0.1	0.25	8	0.25~200	$y = 4.1461x + 0.4156$	0.9995
10	エリスロシン B	0.05	0.1	9	0.1~100	$y = 11.354x + 11.912$	0.9996

表8 Agilent 1290 Infinity LC システムを用いたUHPLCメソッドでのLOD(検出下限)およびLOQ(定量下限)の値

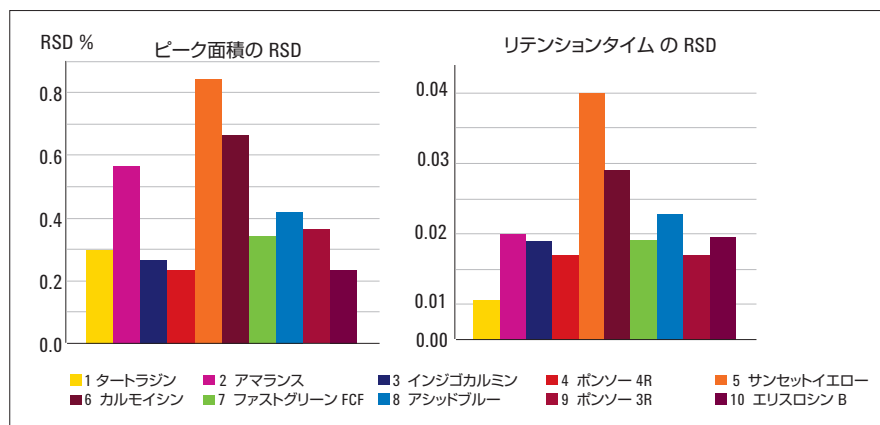


図10 10 ng レベルのオンカラム濃度で10種類の全着色料についてUHPLCの結果から得られたピーク面積とリテンションタイムのRSD(相対標準偏差)値。注入量は1μL(6回の繰り返し注入)

結論

Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いて 10 種類の着色料を分離し、定量しました。Agilent 1260 Infinity LC システムで、所要時間 20 分間の堅牢な HPLC グラジエントメソッドを開発しました。このメソッドについては、部分バリデーションを実施し、タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ポンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー/エリオグラウシン、ポンソー 3R、エリスロシン B などの着色料の定量に有効であることを証明しました。このメソッドはシンプルで、高い特異性、感度、迅速性を備えており、優れた精度、直線性、および回収率値も提供します。5 種類の異なる色のついた菓子中の着色料を定量することで、このメソッドが効率的に使用出来ることが確認されました。その後、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した所要時間 4 分間の UHPLC メソッドに応用し、約 81 % の分析時間の短縮と 89 % の溶媒使用量の削減を達成しました。Agilent 1260 および 1290 Infinity LC システムを使用したこれらのメソッドは、着色料の正確なルーチン分析に使用することができます。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによって、直線性を確認する実験のためのサンプル前処理を迅速化しました。優れた直線性の結果から、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによって得られた結果により、この手法が非常に高精度であり、分析者の操作の違いに由来する誤差を軽減することが確認されました。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration. Food Ingredients and Colors, International Food Information Council (IFIC). November 2004; revised April **2010**.
2. The role of natural color additives in food allergy. Christine d. Lucas, john b. Hallagan, International Association of Color Manufacturers, 1620 I Street, NW, Suite 925, Washington DC, USA, **2006**.
3. Smart GuideTo Food Dyes: Buying foods that can help learning. David Wallinga, M.D., Director of the Institute for Agriculture and Trade Policy' s Food and Health Program, with the assistance of Robin Schow, **2009**.
4. W.D. Snyder, 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる連続希釈の前処理自動化：水素炎イオン化検出器の性能評価に使用するサンプルセットの作成」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6850JAJP, **2010**.
5. Duncan Thorburn Burns, Klaus Danzer, and Alan Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 11, pp. 2201–2205, **2002**.

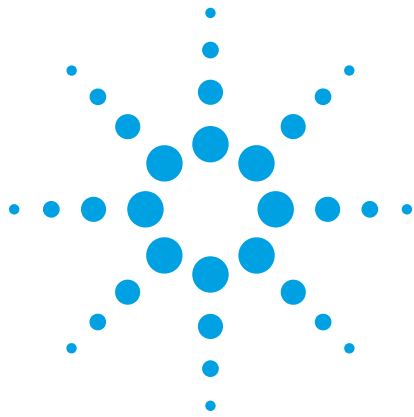
www.agilent.com/chem/jp

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., 2012
Published in Japan, January 1, 2012
5990-9525JAJP



Agilent Technologies



自動サンプル前処理を使用した サケ油中の脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定

アプリケーションノート

食品

著者

Norbert Helle、Monika Bzduch
TeLA GmbH Bremerhaven
Rebecca Veeneman,
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して、脂肪酸 (FA) の誘導体化を自動で行いました。遊離脂肪酸はガスクロマトグラフでテーリングが起こるため、脂肪酸を脂肪酸メチルエステル (FAME) に変換する方法が広く使用されています。手動によるサンプルの誘導体化には時間が掛かり、繰り返し再現性が低下することがあります。自動的な誘導体化では、再現性が大きく向上し、時間が短縮されます。特に高度不飽和脂肪酸では、手動手順を使用した場合、反応温度と反応時間のわずかな変動が、繰り返し再現性にマイナスの影響を与えることがあります。

サケ油は、多価不飽和オメガ-3 脂肪酸の優れた供給源です。2つの主要な脂肪酸、つまりエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) は健康上の重要な要素として特定されており、心臓の正常な働きに関連しています。EPA および DHA の濃度は、サケ油カプセルの重要な品質指標です。このアプリケーションノートでは、サケ油カプセルにおける EPA および DHA の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる誘導体化とその後の測定について説明しています。



Agilent Technologies

材料と実験方法

サンプル前処理では、10 mg のサケ油を 2 mL のオートサンプルバイアルに測り取りました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの液体分注モジュールを使用して、サンプルを 500 μ L の tert-ブチルメチルエーテル (TBME) で希釈し、搭載されたボルテックスミキサを使用して 90 秒間混合しました。前処理を行ったサンプルの 250 μ L を空バイアルに移し、125 μ L のトリメチルスルホニウムヒドロキシド (TMSH) 誘導体化試薬 (MachereyNagel, Düren) を加え、ワークベンチのボルテックスミキサを使用して混合しました。バイアルヒータを使用し、この混合物を 80 °C で 5 分間加熱しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでの自動前処理のフローを図 1 に示します。

測定条件を表 1 に示します。

表 1. GC/FID の条件

ピークの特徴

C14:0	ミリスチン酸
C16:0	パルミチン酸
C16:1	パルミトレイン酸
C18:0	ステアリン酸
C18:1	オレイン酸
C18:2	リノール酸
C20:0	アラキシン酸
C18:3	γ -リノレイン酸
C20:1	ガドレイン酸
C18:3	リノレイン酸
C22:1	エルカ酸
C20:4	アラキドン酸
C20:5	エイコサペンタエン酸
C24:1	ネルボン酸
C22:6	ドコサヘキサエン酸

GC の条件

機器	Agilent 6890 シリーズ GC
カラム	HP 88、100 m \times 250 μ m、0.20 μ m
注入量	2 μ L
インジェクタ	スプリット/スプリットレス、スプリット 50:1
キャリアガス	H ₂
温度プログラム	70 ~ 260 °C
流量	1.4 mL/min
検出器	250 °C、FID
	H ₂ 流量: 40 mL/min
	空気流量: 450 mL/min
	メイクアップ流量、N ₂ : 45 mL/min

Agilent ワークベンチのプログラム

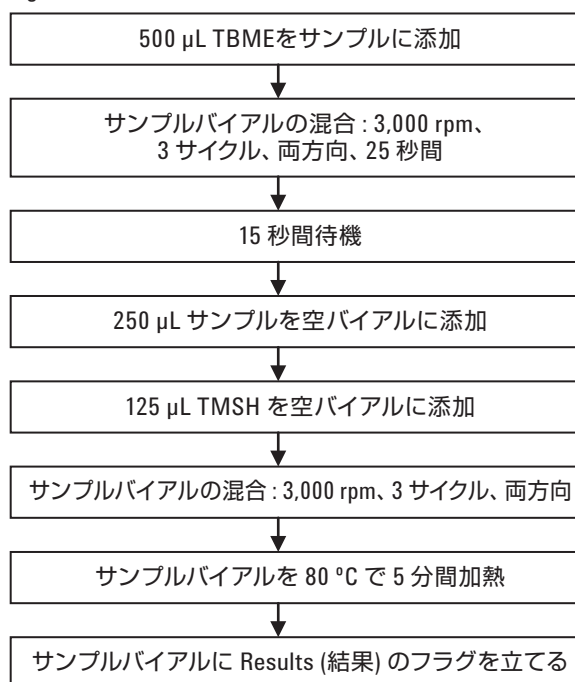


図 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用した FAME サンプル前処理のフロー

結果と考察

図 2 に Agilent 7696A ワークベンチでサケ油から得られた FAME の分離を示します。この分離によって、すべての FAME を明確に同定することができます。主要な 2 つの化合物のリテンションタイムは、35.07 分 (EPA) と 40.55 分 (DHA) です。EPA (23.7 %) と DHA (20.0 %) を除き、サケ油は不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (12 %)、リノール酸 (11 %)、パルミトレイン酸 (8 %) で構成されています。飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸の含有量は低く、それぞれ 4 % および 5 % です。

繰り返し再現性のテストでは、10 個の個別のサケ油サンプルを誘導体化および分析を行い、自動サンプル前処理とクロマトグラムの再現性を確認しました。図 3 に示すように、優れた繰り返し再現性が得られました。

EPA と DHA のピークの絶対面積値の標準偏差は 1 % 未満でした (EPA が 0.51 %, DHA が 0.78 %)。さらに、EPA と DHA の相対濃度の変動は安定していました。相対標準偏差は、EPA では 0.85 %, DHA では 1.22 % を達成しました。10 個のサンプルで異常値は観察されませんでした。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでのサンプル前処理の合計時間は、サンプルあたりわずか 20 分間でした。これに対し、手動による誘導体化の時間はラボ技術者の技術によって異なり、最大で 2 時間となりました。

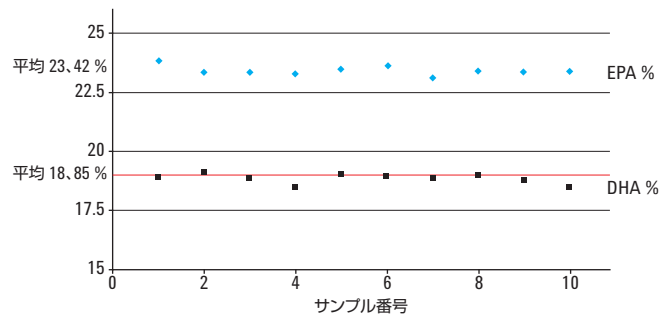


図 3. サケ油に含まれる FAME の自動測定のリターン再現性データ

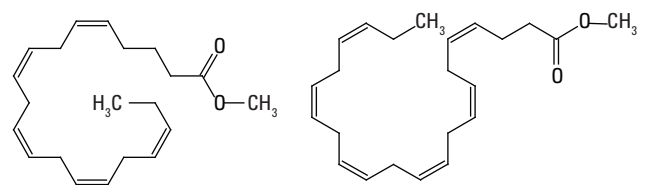


図 4. EPA メチルエステル (左) および DHA メチルエステル (右) の構造

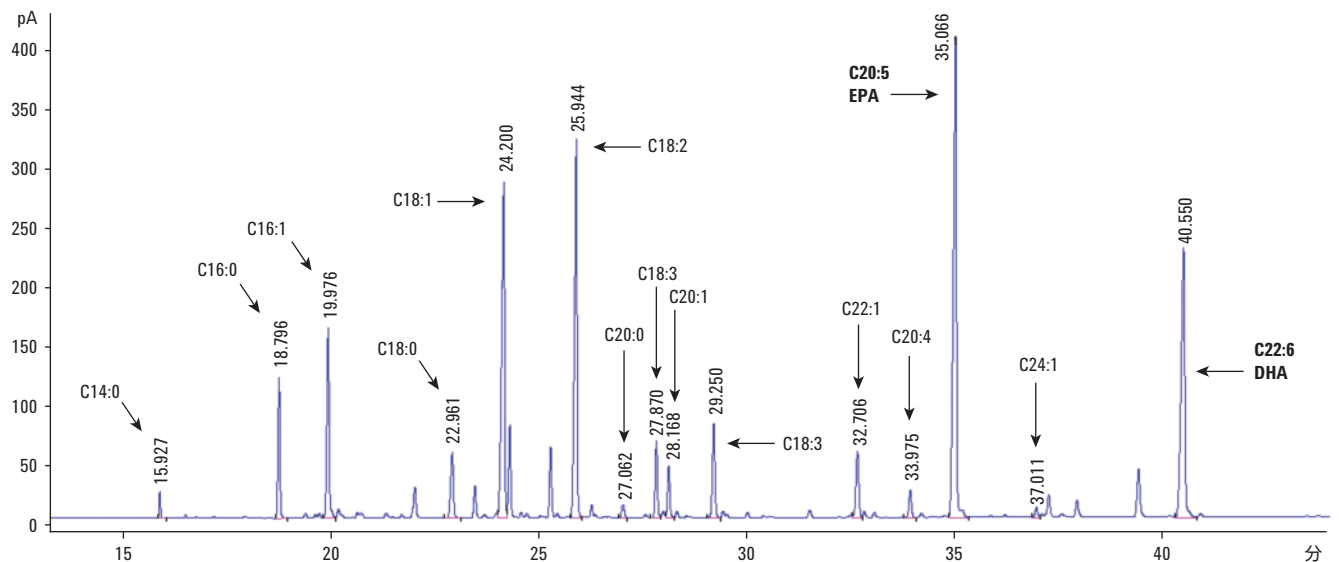


図 2. Agilent ワークベンチ 7696A を使用して前処理したサケ油サンプルの GC/FID クロマトグラム

表 2. サケ油サンプル中の脂肪酸の構成比

C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C18:3	C20:1	C18:3	C22:1	C20:4	C20:5	C24:1	C22:6
0.71	4.68	7.95	3.54	12.95	13.86	0.36	2.61	1.71	3.33	3.35	0.87	23.79	0.36	19.93

結論

サンプルの自動誘導体化は、信頼性が高く、容易で迅速です。特に多価不飽和脂肪酸の相対濃度が比較的高いサンプルでは、自動化によって手動よりも信頼性が大幅に向上します。

参考文献

1. Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) (ISO 12966-3:2009)

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012

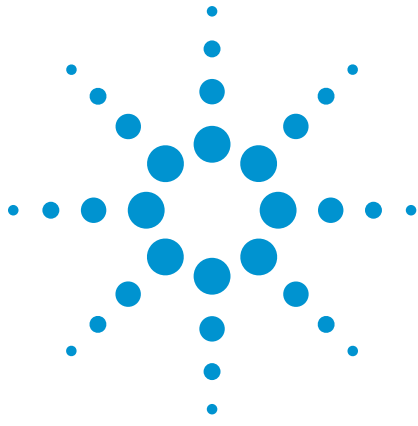
Printed in Japan

January 30, 2012

5990-9799JAJP



Agilent Technologies



Agilent 1260 Infinity LC を使用した ステビア葉中のステビオシドおよび レバウジオシド A の定量

アプリケーションノート

食品テストおよび農業



著者

Srividya Kailasam
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity LC を使用したステビア葉抽出物に含まれるステビオシドおよびレバウジオシド A の定量について説明します。以前のアプリケーションノートから、Agilent ZORBAX 糖分析カラムは、この 2 つの化合物の分離に最も適していることが判明しています。重要なメソッドパラメータの堅牢性をバリデーションした後、線形ダイナミックレンジを求めました。検量線の作成に必要な標準試料の調製には Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。いずれの化合物も、 R^2 値は 0.9999 を超え、1~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で優れた直線性を示しました。2 つの化合物の LOD と LOQ の値は、いずれも 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることがわかりました。実試料においても、良好な結果が得られました。

はじめに

ステビア葉から抽出したジテルペングリコシド (ステビオシドおよびレバウジオシド) は、食品や飲料において合成甘味料の代替品として使用されています。これらの化合物にはカロリーがなく、効果が高いため (ステビオシドはショ糖の 300 倍、レバウジオシドは 400 倍の甘味度)、ステビア葉抽出物は伝統的に糖尿病患者に対して使用されてきました^{1, 2}。ステビア抽出物は製品の品質に大きな影響を与えることから、抽出物中の様々なグリコシドの相対量を確認することが必要です。以前に公開したアプリケーションノートでは、Agilent ZORBAX 糖分析カラムを使用したこれら 2 つのジテルペングリコシドの定量について、70~700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検証しています³。今回のアプリケーションノートでは Agilent 1260 Infinity LC を使用して、最大 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のステビオシドとレバウジオシド A を含むステビア葉抽出物のバリデーションの一部と定量について説明します。



Agilent Technologies

メソッド

機器およびソフトウェア

次のモジュールで構成される Agilent LC システム:

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity デガッサ (G1379B)
- Agilent 1260 Infinity オートサンブラ (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B)、Max-Light 60 mm 高感度フローセル搭載

ソフトウェア: Agilent ChemStation
リビジョン B.04.03

試料調製: Agilent 7696A サンプル
前処理ワークベンチ

試薬および材料

レバウジオシド A、ステビオシド、ステビア葉 (Sigma)、およびアセトニトリル (Labscan) を今回の検討で使用しました。

クロマトグラフィパラメータ

カラム Agilent ZORBAX 糖分析カラム
4.6 x 150 mm、
5 μm (p/n 843300-908)

移動相 A: 水 30 %
B: ACN 70 %

注入量 5 μL

ALS 6 °C

サーモスタット

流量 1.0 mL/min
(アイソクラティック分析)

カラム温度 30 °C

検出 205 nm、4 nm BW、参照: なし
PW > 0.25 秒 (20 Hz)

標準試料

標準物質を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で調製しました。それぞれの化合物が 100 μg/mL の溶液を用いてメソッドのバリデーションを行いました。各標準物質の濃度が 0.5、1.5、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1,000 μg/mL となるように 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で調製し、これらを用いて検量線を作成しました。

上記の各濃度溶液の調製には、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ⁴を使用しました。レバウジオシド A とステビオシドの濃度が 1.0、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1,000 μg/mL となるよう 2000 μg/mL の溶液を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で段階的に希釈するプログラムを用いました。表 1 に、今回使用したワークベンチの各パラメータを示します。

サンプル前処理

ステビア葉を粉砕し、約 0.1 g の粉末を 20 mL ガラスバイアルに計量しました。10 mL の 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液をバイアルに加え、攪拌しました。その後、超音波処理を 60 分行い、遠心分離し、上澄み液を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で 10 倍に希釈しました。10 倍に希釈したサンプル溶液に、2,000 μg/mL のレバウジオシド A およびステビオシドを加え、添加テストを行いました。化合物添加の有無にかかわらず、5 mL の試料を LC に注入し、分析しました。

結果と考察

分離

様々な HPLC カラムとクロマトグラフィ条件を検討した結果、Agilent ZORBAX 糖分析カラムが、レバウジオシド A およびステビオシドの分析に最適であることがわかりました。100 μg/mL 標準溶液のクロマトグラムを図 1 に示します。

	溶媒プレ洗浄 1	排出洗浄	排出ポンプ	排出設定
洗浄回数	1	1	2	-
洗浄ボリューム (μL)	100	50	50	-
吸引速度 (μL/min)	1,000	200	200	200
排出速度 (μL/min)	1,000	200	200	200
ニードル深さオフセット (mm)	0	-2	-2	-2
粘性待ち時間 (秒)	-	0	0	0
タレット溶媒	A	-	-	-
エアギャップ (% シリンジ体積)	-	-	-	0

表 1
Agilent 7696A ワークベンチのパラメータ

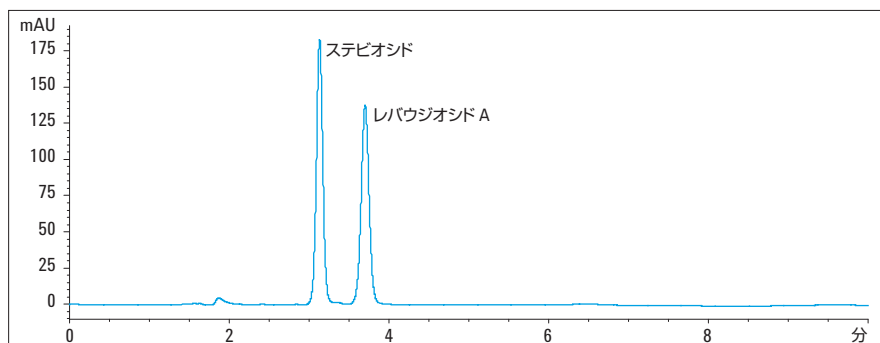


図 1
100 μg/mL 標準溶液のクロマトグラム

検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ)

LOD と LOQ の値は、ピーク高さを 0.1～0.4 分のピーク間ノイズで割ることにより求めました。1 µg/mL におけるステビオシドとレバウジオシド A のピークの S/N 比は 56.2 と 43.7 でした。0.5 µg/mL ではピークは検出されなかったため、1 µg/mL をこのメソッドの LOD および LOQ としました。

直線性

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して調製した各濃度の試料で、今回のメソッドの直線性を試験しました。濃度値に対してプロットした面積値が、両方の対象化合物について 1.0～1,000 µg/mL の範囲で良好な直線性を示しました。ステビオシドおよびレバウジオシド A のキャリブレーションデータを表 2 に示します。手動ではなく 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して検量線用の試料を調製すると R² 値が向上することがわかりました。

リテンションタイムと面積の精度

0.5～1,000 µg/mL の検量線用試料を手動で調製したところ、0.5 µg/mL の試料で積分できないほど非常に小さなピークが検出されました。その他の試料に関しては、10 回注入したうちの、最後の 6 回の繰り返し注入のデータを用いて、ピーク面積とリテンションタイムの RSD 値を計算しました。その結果、すべての濃度において 2 つの化合物のリテンションタイムの RSD は 0.13 % 以下でした。2 つの化合物のピーク面積の RSD は、5 % を上回った 1.5 および 2.5 µg/mL のステビオシドを除き、4 % 未満でした。

堅牢性

予備的なメソッドを開発した後、一連のメソッドパラメータを部分的に変動させて、メソッドの堅牢性を試験しました。パラメータの変動が結果に与える影響を確認するために、リテンションタイムとピーク面積の偏差を算出しました。パラメータが変動したときの、対象化合物のリテンションタイムとピーク面積の

偏差パーセンテージを表 3 に示します。リテンションタイムの偏差は、設定された限界値である 3 % 以内に全てのパラメータ変動において十分に収まりました。ピーク面積の偏差は、設定された限界値である 5 % 以内に検出波長を除く全てのパラメータ変動において収まることが確認できました。

化合物	R ²	直線回帰
ステビオシド	0.99991	面積 = 9.86 x 濃度 + 20.18
レバウジオシド	0.99995	面積 = 9.50 x 濃度 + 13.30

表 2
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して調製したステビオシドおよびレバウジオシド A 標準試料のキャリブレーションデータ

変動させたパラメータ	ステビオシド		レバウジオシド A	
	リテンションタイムの偏差 (%)	面積の偏差 (%)	リテンションタイムの偏差 (%)	面積の偏差 (%)
流量 - 2 % (0.98 mL/min)	2.51	1.36	2.75	1.79
流量 + 2 % (1.02 mL/min)	-2.31	-2.55	-2.48	-2.48
カラム温度 - 5 % (28.5 °C)	-0.33	0.33	-0.47	-0.22
カラム温度 + 5 % (31.5 °C)	-1.04	-0.73	-1.5	-0.96
注入量 - 5 % (4.8 µL)	-0.54	-3.81	-0.93	-3.73
注入量 + 5 % (5.2 µL)	-0.85	4.33	-1.36	3.76
検出波長 - 3 nm (202 nm)	-1.16	19.09	-1.78	17.06
検出波長 + 3 nm (208 nm)	-1.30	-31.33	-2.01	-31.40

表 3
メソッドの堅牢性: メソッドパラメータの変動がリテンションタイムとピーク面積に与える影響

実試料での試験

ステビア葉抽出物に化合物を添加した溶液と添加していない溶液のクロマトグラムを図 2 に重ねて示します。化合物添加の有無における算出濃度の偏差を表 4 に示します。

結論

このアプリケーションノートでは、ステビアの葉から抽出した 2 つのジテルペングリコシド (ステビオシドおよびレバウジオシド A) の検出と定量について検討しました。開発したメソッドは、堅牢で高い感度と再現性を示しました。検量線を作成するために必要な各濃度の試料調製には Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。両者の化合物ピークの面積は 1~1,000 µg/mL の範囲で直線になり、 R^2 の値が 0.9999 を超えることがわかりました。7696A サンプル前処理ワークベンチは、品質管理におけるルーチン分析に威力を発揮し、手動調製による検量線の誤差を軽減することができます。ステビア抽出物においても、化合物添加の有無における算出濃度の変動も良好な結果を示しました。

参考文献

1. N. W. Megeji, J. K. Kumar, Virendra Singh, V. K. Kaul and P. S. Ahuja, "Introducing Stevia rebaudiana, a natural zero-calorie sweetener", CURRENT SCIENCE, 88 (5), 801-804, 2005.
2. N. Kolb, J. L. Herrera, D. J. Ferreyra, and R. F. Uliana, "Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from Stevia rebaudiana: Improved HPLC Method", J. Agricultural and Food Chem, 49, 4538-4541, 2001.
3. "Isocratic Stevia Sweetener Analysis using Selective ZORBAX Columns", Agilent Application Note, Publication Number 5990-3933EN, 2010.

4. 「Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用したヘッドスペース標準の自動サンプル前処理」アジレント・テクノロジー技術資料、資料番号 5990-9025JAJP, 2011.

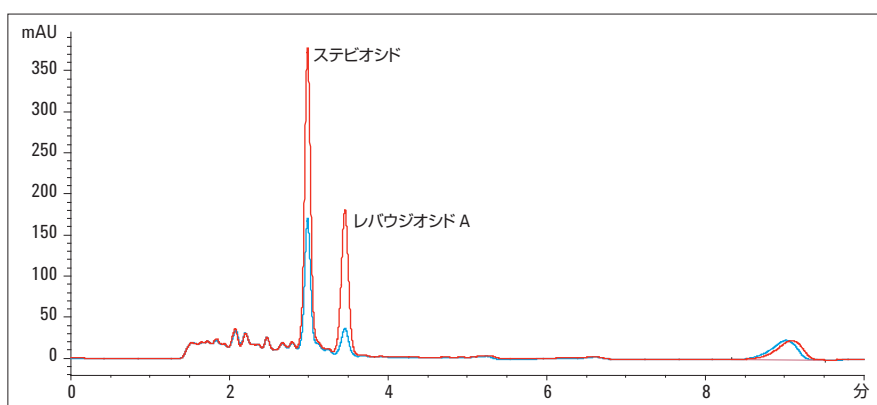


図 2
化合物添加ありおよび無しステビア葉抽出物の重ね書きクロマトグラム

	10 倍に希釈した抽出物中の算出濃度 (µg/mL)	希釈液に添加した増量分 (µg/mL)	添加試料における算出濃度 (µg/mL)	濃度の偏差
ステビオシド	84.30	100	192.83	108.53 %
レバウジオシド A	21.56	100	114.57	93.01 %

表 4
化合物添加ありおよび無し各化合物の算出濃度とその偏差

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Published in Japan, December 1, 2011
5990-9524JAJP



Agilent Technologies



自動サンプル前処理による オリーブオイル中の 脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定

アプリケーションノート

食品テスト

著者

Ramon Hernandez and Pablo Castillo
Lab de Microbiologia de Andaluza
Instrumentacion in Spain

Enrique Longueira and Jose Pineda
Laboratorio Químico Microbiológico,
S.A. Murcia

Spain

Rebecca Veeneman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

オイル中の脂肪酸 (FA) を分析するにはさまざまな方法があります。このアプリケーションノートでは、塩基触媒反応を用いた FA の分析方法および Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用したサンプル前処理の利点について説明します。

はじめに

FA の分析はオリーブオイル業界では非常に一般的であり、通常はガスクロマトグラフを使用して行います。FA は極性が高く、沸点が高いため、通常は良好なピーク形状が得られず、再現性も低くなります。このような問題を避けるために、ほとんどのメソッドでは誘導体化反応を使用して FA を脂肪酸メチルエステル (FAME) にします。FAME は FA よりも分離が容易で、ピーク形状も良好です。

誘導体化反応には数多くの方法があります。最も一般的な方法の 1 つは塩基触媒反応です。この反応では、メタノールに溶解したヘキサンと水酸化カリウム (KOH) メタノール溶液を使用します。このメソッドは迅速でシンプルであり、優れた結果が得られますが、遊離脂肪酸では使用できません。



Agilent Technologies

実験方法

試薬

使用した試薬は、Baker の n-ヘプタン (ヘキサンでも可)、メタノール (GC グレード)、および水酸化カリウムです。11.2 g の KOH を 100 mL のメタノールに加えて、KOH 2N の溶液を調製しました。

7696A サンプル前処理ワークベンチの洗浄溶媒としてヘプタンと水を使用しました。KOH 溶液を分取するシリンジの洗浄には両方の溶媒を使用する必要がありました。最初に水、次にヘプタンを使用してシリンジ洗浄を行いました。ヘプタンの分取用シリンジは、ヘプタンだけを使用して洗浄しました。

機器

塩基誘導体化によりオリーブオイル中の脂肪酸を分析する通常のメソッドでは、20 mL の試験管で 100 mg のサンプル、10 mL のヘプタン、100 μ L の水酸化カリウムを使用します。この実験ではワークベンチの有効性を調べました。ワークベンチでは 2 mL バイアルを使用するため、すべての量を 10 分の 1 にスケールダウンしました。

この塩基触媒反応は、数分間の 1 回のステップで行われます。

ワークベンチを使用して、GC/MS システムに注入するすべてのサンプルを自動的に前処理しました。

使用したメソッド

このソフトウェアでは、すべてのバイアルと試薬のトレイの割り当てを設定するリソースマネージャの機能があります (図 1 を参照)。

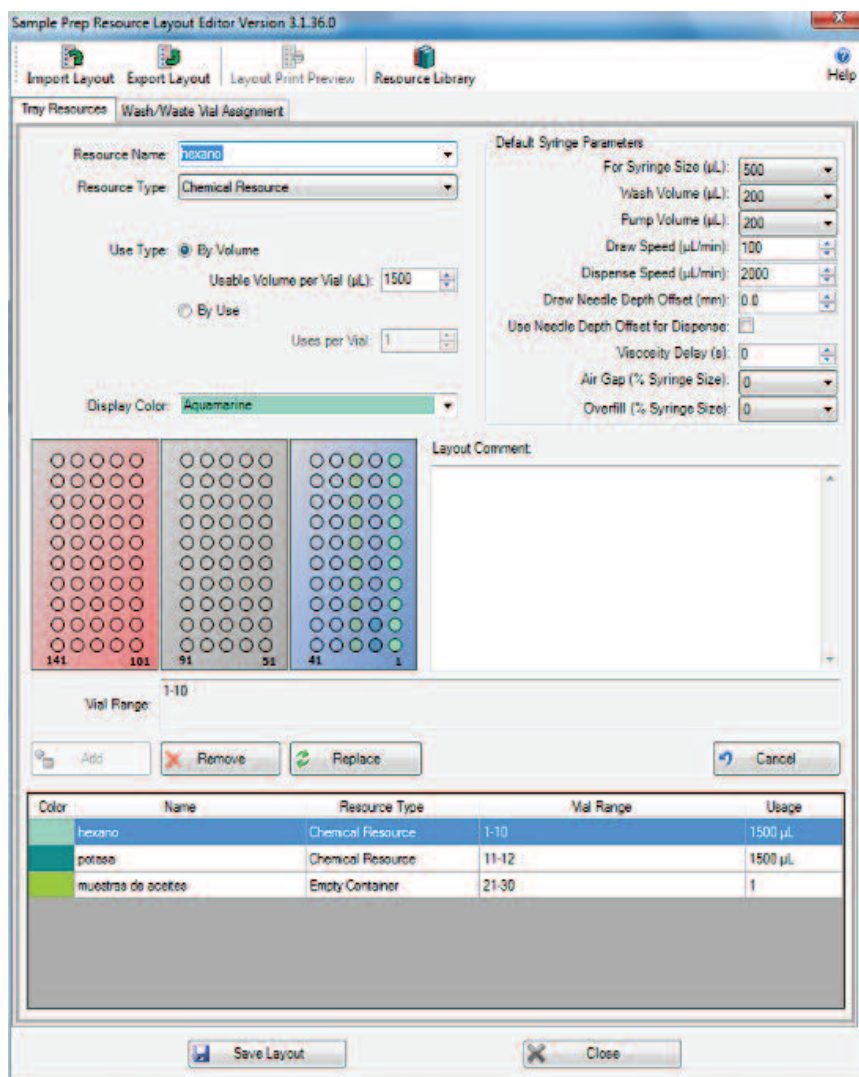


図 1. リソースのレイアウト

サンプル前処理に使用したメソッドを図 2 に示します。

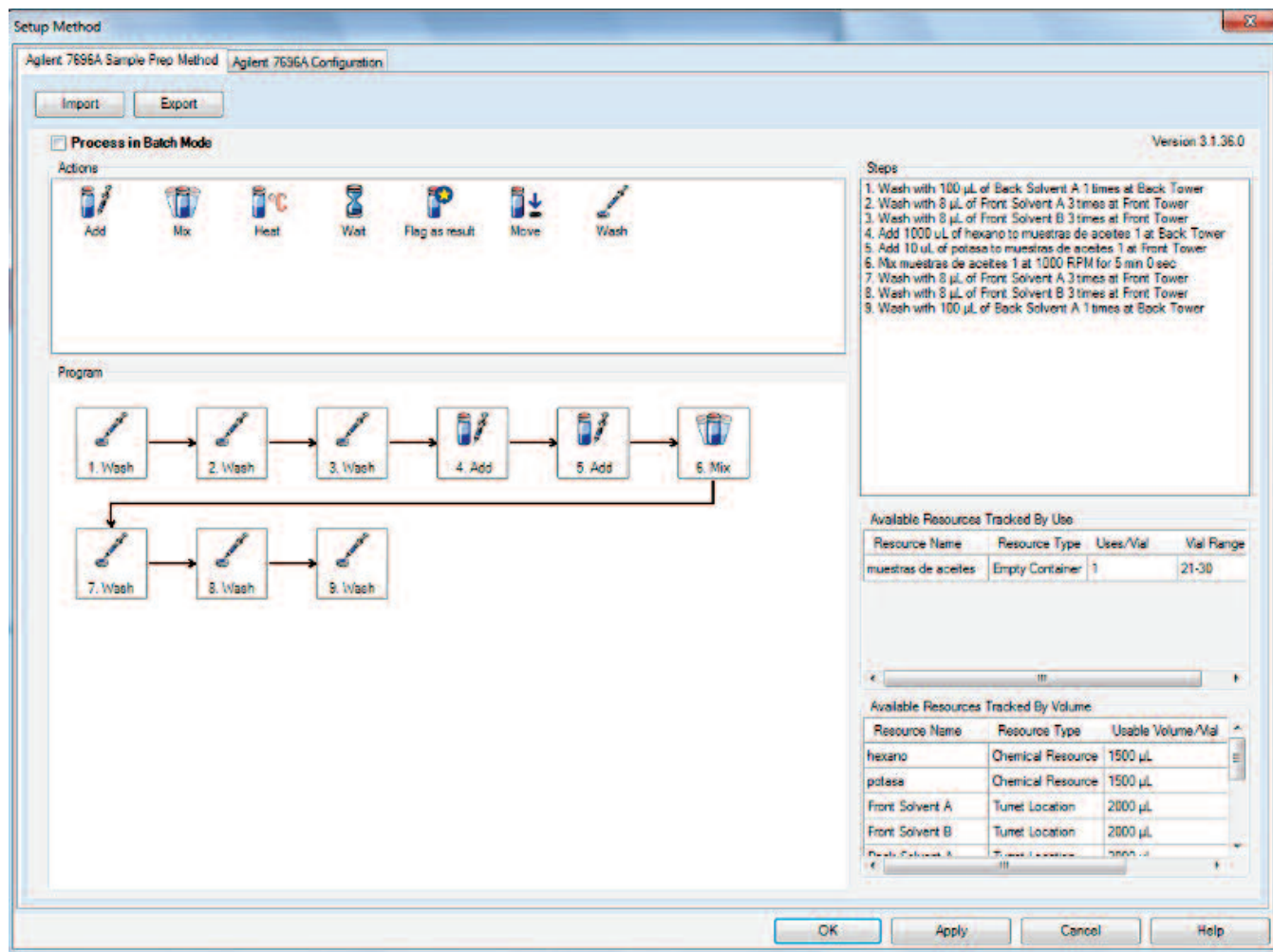


図 2. Agilent 7696A サンプル前処理メソッド

トレイの 1 つに 2 mL バイアルを 3 列セットしました。それぞれの列にはヘプタン、KOH、約 10 μL のオリーブオイルが 1 滴 (重量を記録しておく必要がある) 入ったバイアルが含まれます。サンプル前処理ワークベンチでは、2 つのシリンジを使用して、各試薬を必要量 (ヘプタンを 1 mL、KOH を 10 μL) 加えます。両方を加えた後、バイアルを 10 分間振とうしました。

バイアルを混合後、スプリット/スプリットレス注入口 (250 $^{\circ}\text{C}$) を備えた GC/MS に最終サンプル溶液の上層を注入しました。使用したカラムは、カラム流量 1 mL/min の HP88 (60 m x 250 μm 、0.2 μm) です。オープン温度プログラムは、175 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間、5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 250 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温するように設定し、脂肪酸を分離しました。注入口は、スプリット比 100:1 のスプリットモードに設定し、すべての分析は SIM と SCAN の両方のモードで実施しました。

結果と考察

ワークベンチを使用して得られたクロマトグラムの再現性と精度を評価するために、ワークベンチを使用して前処理した 10 本のバイアルを GC/MS に注入しました。表 1 にその結果を示します。

このアプリケーションノートでは、オリーブオイルの 4 つの主要な化合物の結果を比較します。クロマトグラムのピーク形状を図 3 に、ピーク面積値を表 2 に示します。

最初に、オイルを1滴添加後に10本のバイアルを計量しました。表1に得られた値を示します。

表1. 測定したオリーブオイルの重量

バイアル	オリーブオイル重量 (mg)
1	12.9
2	13.4
3	14.8
4	14.5
5	14.2
6	14.7
7	13.2
8	14.9
9	13.8
10	13.6

これらのバイアルをワークベンチのトレイに置きました。ここで、プログラミングされた量の各試薬が自動的に注入されます。

前処理を行ったサンプルは、GC/MSで測定します。図3に結果を示します。

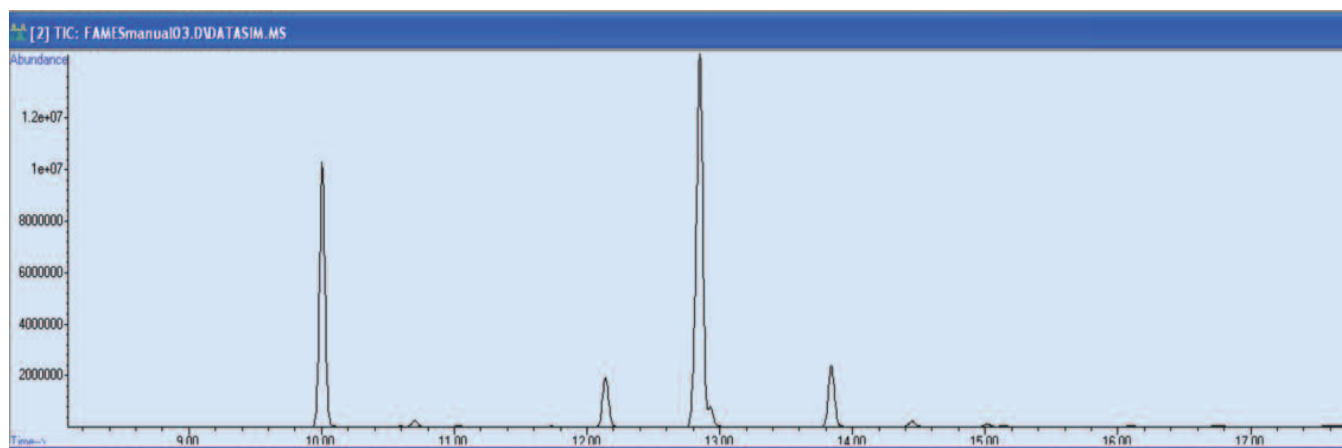


図3. SIMモードでのクロマトグラム

表2. オリーブオイルの4つの主要な化合物の面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	317343837.0	63331226.0	569320584.0	80584679.0
2	373510457.0	74825501.0	660064790.0	94609910.0
3	389137859.0	74174710.0	683431450.0	98106712.0
4	350160186.0	69553324.0	621849766.0	88281829.0
5	350311578.0	69513586.0	622622625.0	88233984.0
6	363692227.0	71973045.0	643859326.0	91639831.0
7	298792007.0	58778562.0	534781631.0	74997383.0
8	376569059.0	74878674.0	666439996.0	95109185.0
9	352698458.0	68424565.0	654254324.0	82569566.0
10	351745852.0	70145747.0	602155656.0	86951448.0
平均	350409359.2	69188856.3	622601967.1	87561952.4
相対標準偏差	27119463.9	5161865.2	46358289.5	7182432.9
%RSD	7.7	7.5	7.4	8.2

表 3 にオリーブオイル 1 mg あたりの各化合物の面積を示します。

表 3. オイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	24600297.4	4909397.4	44133378.6	6246874.3
2	27873914.7	5583992.6	49258566.4	7060441.0
3	26293098.6	5011804.7	46177800.7	6628831.9
4	24155874.9	4796781.0	42886190.8	6088402.0
5	24669829.4	4895323.0	43846663.7	6213660.8
6	24740967.8	4896125.5	43799954.1	6234002.1
7	22635758.1	4452921.4	40513759.9	5681619.9
8	25273091.2	5025414.4	44727516.5	6383166.8
9	25557859.3	4958301.8	47409733.6	5983301.9
10	25863665.6	5157775.5	44276151.2	6393488.8
平均	25097420.2	4954369.4	44585290.7	6272059.8
相対標準偏差	1391411.9	284657.5	2430391.6	371694.7
%RSD	5.5	5.7	5.5	5.9

表 4 に各 FAME の面積パーセンテージを示します。

表 4. クロマトグラムの各ピーク的面積パーセンテージ

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	30.8	6.1	55.2	7.8
2	31.0	6.2	54.9	7.9
3	31.3	6.0	54.9	7.9
4	31.0	6.2	55.0	7.8
5	31.0	6.1	55.1	7.8
6	31.1	6.1	55.0	7.8
7	30.9	6.1	55.3	7.8
8	31.0	6.2	54.9	7.8
9	30.5	5.9	56.5	7.1
10	31.7	6.3	54.2	7.8
平均	31.0	6.1	55.1	7.7
相対標準偏差	0.3	0.1	0.6	0.2
%RSD	1.0	1.9	1.0	2.9

オリジナルの手動によるメソッド (オイル 100 mg) と比較を行います。オリジナルメソッドの分析結果を表 5 に示します。

表 5. オリジナルの手動によるメソッドを使用したときのオイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	2674181.8	529275.8	4610749.8	674892.3
2	2562129.3	505970.3	4442449.3	648040.5
3	2596966.1	511187.6	4504510.0	655770.4
4	2388663.8	466760.2	4168008.4	601931.7
5	2721157.8	535230.9	4722598.6	688465.5
6	2789232.0	549999.6	4813189.6	704034.8
7	2330855.0	453164.1	4057061.6	589335.4
8	2645696.1	528725.3	4579552.0	669544.2
9	2650632.8	520264.3	4600138.2	668931.5
10	2660736.3	520639.8	4632201.2	671882.6
平均	2594658.8	510416.9	4501404.4	655410.2
相対標準偏差	142531.1	30276.4	236121.4	36110.5
%RSD	5.5	5.9	5.2	5.5

ここからわかるように、%RSD はワークベンチを使用したときの結果と類似しています。

ワークベンチと同一のサンプル前処理を手動で行いました。2 mL バイアルに計量済みのオイルを 1 滴加え、アジレントのマニユアルシリンジを用いて 1 mL のヘプタンと 10 µL の KOH をメタノールに添加して、静かに混合しました。分析結果を表 6 に示します。

表 6. ワークベンチの量を使用して手動でサンプル前処理を行った後のオイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	24414278.4	4280301.6	34483064.7	5405051.1
2	21953969.5	4385041.9	34340981.7	5496525.8
3	25176754.2	4987565.4	39311102.4	6258162.4
4	23806050.0	4723341.1	36249791.4	5917479.9
5	23413864.7	4659269.7	36103230.9	5862013.3
6	22388861.8	4441774.0	34988087.2	5625015.1
7	23345774.4	4655270.9	36540218.6	5654628.9
8	21758664.6	4326697.7	31010500.3	5465899.5
9	22268704.8	4448969.7	34833834.8	5598507.6
10	21726270.7	4324528.6	34099881.5	5188441.0
平均	22970768.0	4513461.5	35078976.3	5633014.3
相対標準偏差	1194355.0	226067.9	2129375.1	301856.8
%RSD	5.2	5.0	6.1	5.4

ここからわかるように、%RSD はワークベンチを使用したときの結果と類似しています。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、サンプル前処理など、ラボの一般的な操作の一部を自動化する、非常に使いやすく、迅速、容易、そして信頼性の高いツールです。このアプリケーションノートの結果は、ワークベンチを使用して実行した場合の分析の再現性を詳細に示しています。ワークベンチを使用した前処理で得られた結果は、元のメソッドのリソース量でも、ワークベンチスケールの量でも、手動による前処理と非常に類似しています。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012

Printed in Japan

July 19, 2012

5991-0761JAJP



Agilent Technologies

医薬品

点眼薬の品質管理におけるサンプル前処理の自動化

医薬品分野では、正確なサンプル前処理と、精度・再現性についての確実さが求められます。このアプリケーションでは、WeighStation を搭載するサンプル前処理ワークベンチを用いて自動較正用サンプル作成およびサンプル希釈を行い、高い精度で分析を実行する方法について説明します。

[目次に戻る](#)

[アプリケーションノートを見る](#)



医薬品



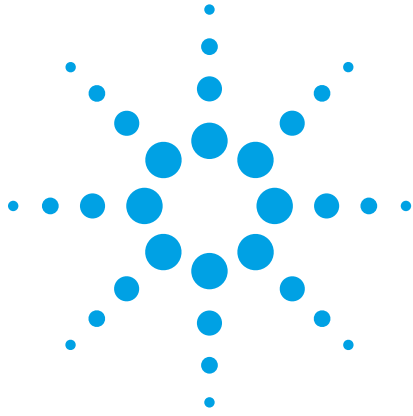
サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。
agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

点眼薬の品質管理におけるサンプル前処理の自動化.....122

[目次に戻る](#)

[アプリケーション分野の紹介に戻る](#)



点眼薬の品質管理における サンプル前処理の自動化

アプリケーションノート

著者

Bart Tienpont, Maria Rambla Alegre,
Frank David, and Pat Sandra
Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

概要

点眼薬の品質管理メソッドに、WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを導入しました。自動サンプル前処理は、2 つの活性成分を含む較正用の標準溶液の作成 (4 レベル) と、計量および希釈による点眼薬サンプルの前処理で構成されます。この 2 つのシーケンスを完全に自動化しました。この分析では、優れた再現性と直線性が得られています。



Agilent Technologies

はじめに

WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、点眼薬に含まれる 2 つの活性成分 (デキサメタゾンとクロラムフェニコール) を測定しました。デキサメタゾンは、もっとも強力なコルチコステロイドの 1 つで、プレドニゾロンの 5~14 倍、コルチゾンおよびヒドロコルチゾンの 25~75 倍の効能があります。広域スペクトル抗生物質であるクロラムフェニコールをデキサメタゾンに加えれば、ブドウ膜前部の炎症 (虹彩炎、虹彩毛様体炎) の治療で高い効果が得られます。炎症治療用の点眼薬には、上記のいずれか、または両方の成分が含まれることがあります。通常は、粘度の高い水性溶液として処方されます。

一般的な QC 分析手順は、1) 水 (水性移動相) に活性成分を含む 4 レベル校正用標準溶液の作成、2) 水 (水性移動相) による一定量の点眼薬の希釈で構成されます。表 1A に示すように、サンプル前処理は通常、メスフラスコでおこなわれます。まず、デキサメタゾンとクロラムフェニコールをそれぞれ含む 2 つの原液を作成します。校正用標準溶液には、デキサメタゾンの場合は 16~64 µg/mL、クロラムフェニコールの場合は 80~320 µg/mL の範囲で、両方の成分が含まれています。サンプルは通常、水性移動相で 25 倍に希釈されます。サンプル前処理後、校正用標準溶液とサンプルを HPLC と UV 検出で分析します。標準溶液は安定性が低いいため、通常はサンプルを分析するたびに毎回作成します。

このアプリケーションノートでは、校正用標準溶液の作成とサンプル希釈の自動化について説明しています。一般的なメソッド設定を表 1B に示しています。正確な校正用標準溶液濃度の維持とサンプルの計量には、WeighStation を使用しました。

実験方法

化学物質

デキサメタゾンとクロラムフェニコールを Sigma-Aldrich (ペーアセ、ベルギー) から入手しました。水とアセトニトリル (AcCN) は HPLC グレードのものを使用しました (BioSolve、オランダ)。リン酸と水酸化ナトリウムを Sigma-Aldrich から入手しました。

構成

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチに、2 つの Agilent 7693A オートサンブラを設置しました。フロントインジェクタには、大容量シリンジキャリッジと 500 µL シリンジ (p/n G4513-60561) が含まれています。バックインジェクタには、大容量シリンジキャリッジと 50 µL シリンジ (p/n 5183-0314) が含まれています。

ワークベンチメソッド

リソースレイアウト

図 1 に、ワークベンチのリソースレイアウトを示しています。移動相 A (0.3 % リン酸水、水酸化ナトリウムで pH = 3 に調整) とアセトニトリルを「ケミカルリソース」として、それぞれポジション 81~150 および 71~72 に配置しました。フロントおよびバックタワーのバイアル A1 および B1 中の溶媒は水です。希釈標準溶液を作成するすべてのバイアルは、「空のコンテナ」と定義されます。

ワークベンチメソッドプログラムの手順

4 つの校正用標準溶液作成のための 7696A サンプル前処理ワークベンチプログラムを、図 2 に示しています。空のバイアルを計量したのち、システムを一時停止し、固体標準試料を添加します。その後、自動プロセスを再開すると、溶媒が添加され、4 つの濃度の校正用標準溶液が作成されます。最低濃度については 6 回繰り返して作成します。

表 1A. 一般的なサンプル前処理 (USP または EP メソッド)

	コード	原液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL)
較正用標準溶液	DEX Stck	25 mL バイアルでデキサメタゾン 10 mg を計量し、水 25 mL を添加	400
	CLO Stck	25 mL バイアルでクロラムフェニコール 10 mg を計量し、水 25 mL を添加	400
		標準溶液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL) デキサメタゾン/クロラムフェニコール
	LVL1	移動相 25 mL 中で Dex Stck 1 mL + CLO Stck 5 mL	16/80
	LVL2	移動相 25 mL 中で Dex Stck 2 mL + CLO Stck 10 mL	32/160
	LVL3	移動相 25 mL 中で Dex Stck 3 mL + CLO Stck 15 mL	48/240
	LVL4	移動相 25 mL 中で Dex Stck 4 mL + CLO Stck 20 mL	64/320
		点眼薬サンプルの前処理	
サンプル	SAM	点眼薬サンプル 1 mL または 1 g + 移動相 25 mL	

表 1B. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理

	コード	原液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL)
較正用標準溶液	DEX Stck-1	2 mL バイアル*でデキサメタゾン 4 mg を計量し、AcCN 1 mL を添加	4,000
	DEX Stck	DEX Stck-1 150 µL + 移動相 1,350 µL (1/10 で希釈)	400
	CLO Stck-1	2 mL バイアル*でクロラムフェニコール 4 mg を計量し、AcCN 1 mL を添加	4,000
	CLO Stck	CLO Stck-1 150 µL および移動相 1,350 µL (1/10 で希釈)	400
		標準溶液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL) デキサメタゾン/クロラムフェニコール
	LVL1	Dex Stck 20 µL + CLO Stck 100 µL + 移動相 380 µL	16/80
	LVL2	Dex Stck 40 µL + CLO Stck 200 µL + 移動相 260 µL	32/160
	LVL3	Dex Stck 60 µL + CLO Stck 300 µL + 移動相 140 µL	48/240
	LVL4	Dex Stck 80 µL + CLO Stck 400 µL + 移動相 20 µL	64/320
		最終サンプルの前処理	
サンプル	SAM	点眼薬サンプル 1 滴* + 移動相 1 mL (約 35~40 mg)	

*固体粉末または粘度の高い液体は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを一時停止して手作業で添加します。その後、計量手順をおこないます。

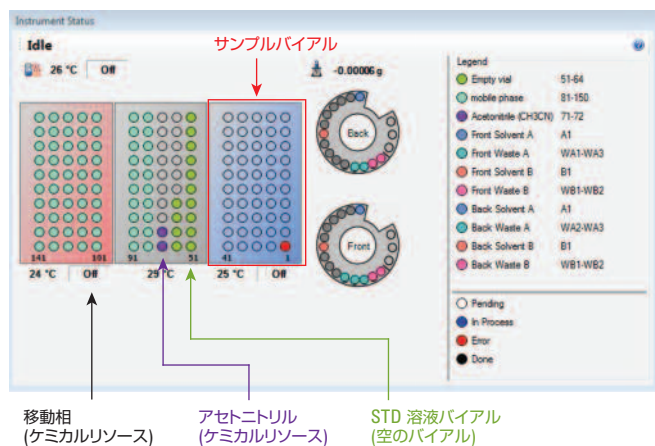


図 1. デキサメタゾンおよびクロラムフェニコールの連続希釈に対応する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのリソースレイアウト

DEX stck-1 および CLO stck-1 バイアルの風袋引き

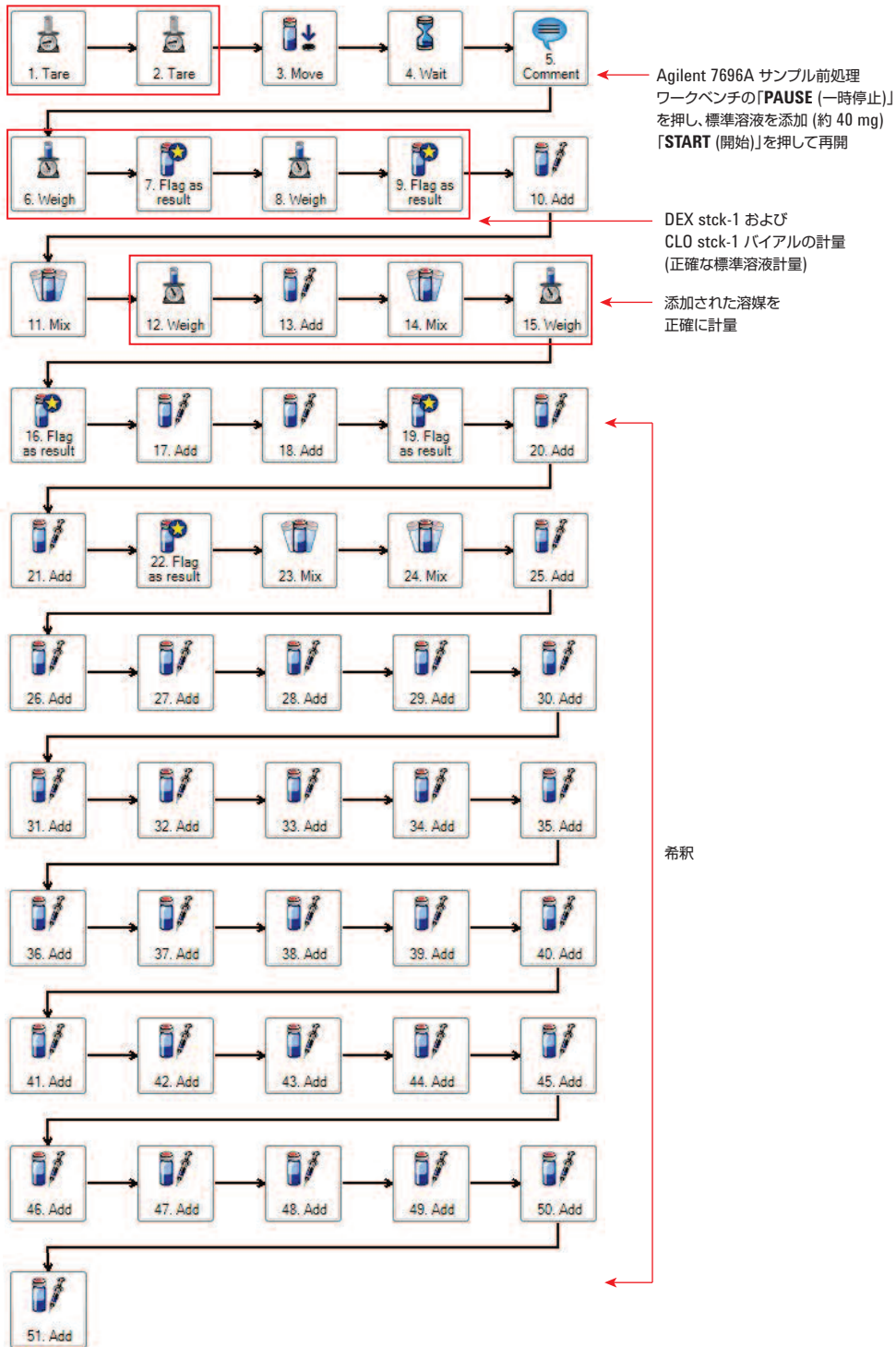


図 2. 較正用標準溶液用の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのメソッド設定プログラミングに用いたフローチャート図

次のシーケンスは、サンプルを希釈するためのものです。空のバイアルが風袋引きされ、システムが待機状態になります。粘性サンプル1滴を各バイアルに添加します。これは手作業でおこなう必要があります。サンプルの粘度が高いため、シリンジでは液体を移せないからです。その後、ワークベンチを再開します。バイアルがふたたび計量され(図3)、正確なサンプル重量が計算され、シーケンスレポートで報告されます。最後に、サンプル希釈用の溶媒が添加されます(図4のメソッド設定参照)。

較正用標準溶液の作成、サンプルの前処理のいずれについても、1つのシーケンスとしてプログラムが設定されています。

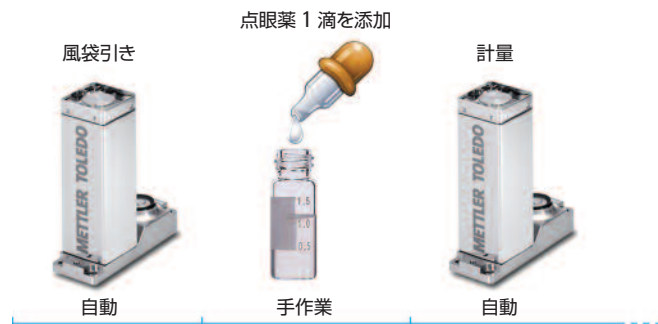
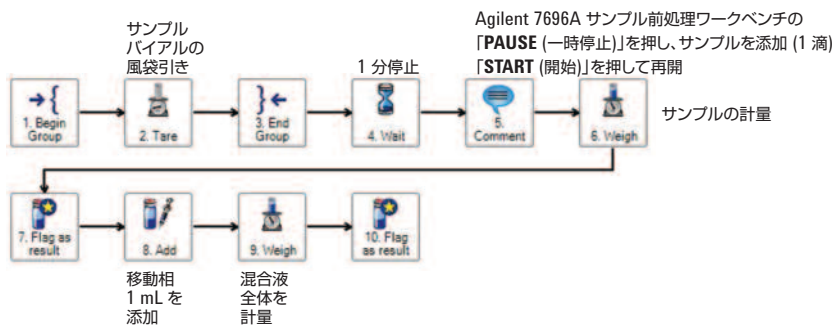


図3. 風袋引き、サンプル添加、サンプル計量のイラスト



1. グループ開始
2. サンプルの風袋引き
3. グループ終了
4. 1分0秒待機
5. ワークベンチの「PAUSE (一時停止)」を押すサンプル添加後、「START (開始)」を押す
6. サンプル計量
7. サンプルを「RESULT (結果)」としてフラグging
8. フロントタワーで移動相 1,000 μ L をサンプルに添加 (洗浄、ポンプ)
9. サンプルの計量
10. サンプルを「RESULT (結果)」としてフラグging

図4. サンプル用の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのメソッド設定

HPLC 分析の実験条件

分析には Agilent 1290 Infinity HPLC システムを使用しました。分離には Agilent Poroshell 120 カラム (2.1 mm × 400 mm, 2.4 μm dp (p/n 695775-902)) を使用しました。移動相 A は 0.3 % リン酸水 (水酸化ナトリウムで pH = 3 に調整)、移動相 B はアセトニトリルです。20 % B (0 分) ~ 50 % B (5 分) のグラジエントを使用しました。流量は 0.5 mL/min です。注入量は 1 μL で、UV により 254 nm で検出しました。

結果と考察

4 つの較正レベルに対応するクロマトグラムを図 5 で重ねて示しています。検量線を図 6 に示しています。デキサメタゾンとクロラムフェニコールのいずれについても、優れた直線性が得られています ($R^2 > 0.999$)。

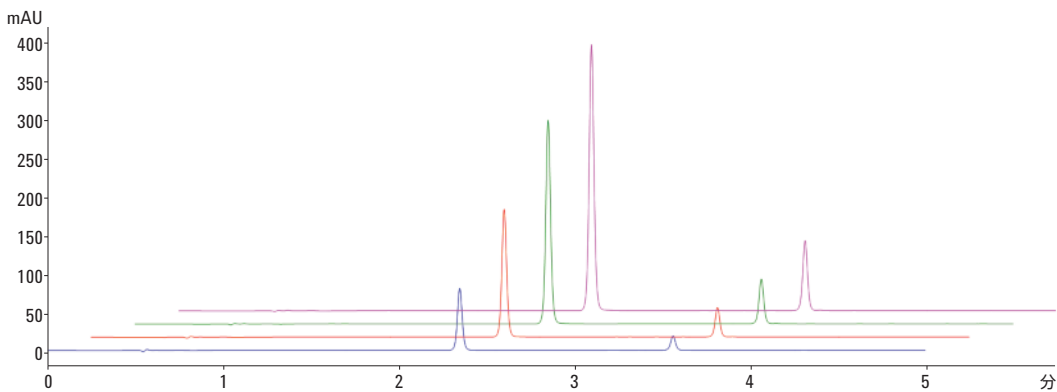


図 5. 4 つの較正レベルのクロラムフェニコール (2.35 分) およびデキサメタゾン (3.55 分) のクロマトグラム (X/Y 軸オフセットで重ね表示)

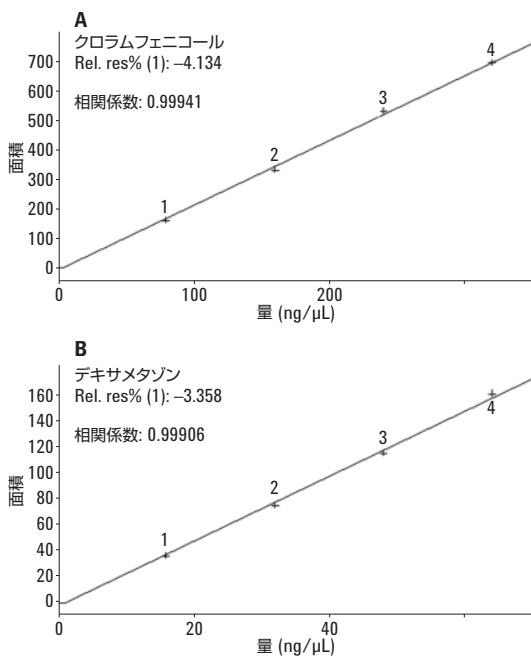


図 6. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた自動較正用標準溶液作成で得られたクロラムフェニコール (2.35 分) およびデキサメタゾン (3.55 分) の検量線

最低濃度のサンプルを6回繰り返して作成し、サンプル前処理の再現性を検証しました。図7に示すクロマトグラムの重ね表示は、優れた再現性を示しています。クロラムフェニコールのRSDは1.5%、デキサメタゾンのRSDは2.7%でした。

次に、3種類のサンプルを分析しました。クロマトグラムを図8に示しています。サンプルAにはデキサメタゾン、サンプルBにはクロラムフェニコール、サンプルCには両方が含まれています。

3種類いずれのサンプルについても、正確な量の活性成分が検出されました(検出値はいずれも表示濃度の90%~105%)。同じシーケンスで前処理した、種類の異なるサンプルの分析では、クロス汚染が生じないことも明らかになりました(デキサメタゾンのみを含むサンプルではクロラムフェニコールは検出されず、逆も同様)。

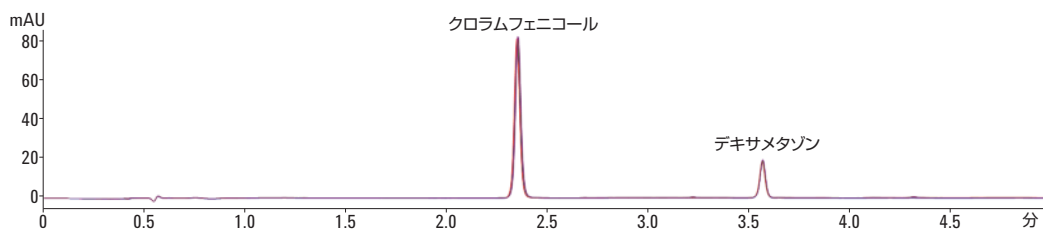


図7. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた自動較正用標準溶液作成で得られたクロラムフェニコール(2.35分)およびデキサメタゾン(3.55分)の6つの較正用標準溶液のクロマトグラムの重ね表示。クロラムフェニコールとデキサメタゾンの相対標準偏差は、それぞれ1.5%および2.7%です。

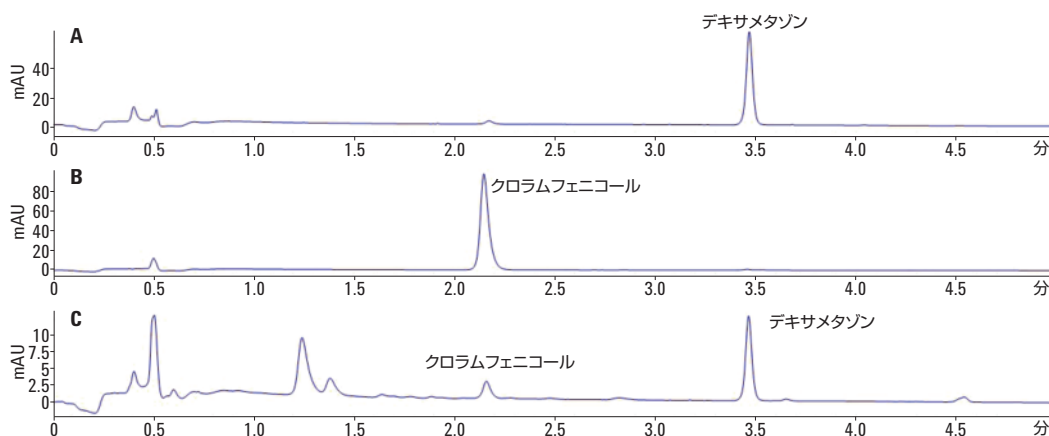


図8. 3種類の点眼薬で得られたクロマトグラム

サンプル前処理の再現性を表 2 に示しています。サンプルタイプ B のクロラムフェニコールの測定濃度、サンプル重量、最終濃度を記載しています。このサンプルは 6 回繰り返して作成しました。測定濃度の相対標準偏差は 1 % 未満でした。

これらの定量的データが得られることに加えて、全体的な溶媒消費量も大幅に少なくなります。計量用のガラス器具を使用しないため、溶液が無駄になることはほとんどありません。

結論

WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを、自動校正用サンプル作成およびサンプル希釈に問題なく適用することができました。サンプルの粘度が高いため、シリンジを用いた容積測定による希釈は不可能でしたが、WeighStation の使用により、正確なサンプル重量が測定されました。希釈後は、活性成分を正確に測定することができました。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

表 2. 点眼薬タイプ B のサンプル前処理の再現性

	測定濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	サンプル重量 (mg)	正確な濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
SAM-rep01	124	27.72	4.59
SAM-rep02	121	26.95	4.61
SAM-rep03	114	25.41	4.61
SAM-rep04	103	23.07	4.57
SAM-rep05	143	32.58	4.53
SAM-rep06	138	31.27	4.53
		RSD (%)	0.74

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。

本資料に記載の情報、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. 2014

February 6, 2014

5991-3591JAJP



Agilent Technologies

分析一般

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、エラーが発生しやすいサンプル前処理ワークフローを自動化します。

高精度の自動化機能を直感的なソフトウェアと組み合わせることで、一貫性のあるサンプル処理が保証され、分析者間の変動が排除されます。研究者は、より重要なタスクに注力することができます。

[目次に戻る](#)

[アプリケーションノートを見る](#)



分析一般



サンプル前処理ワークベンチは、前処理の一貫性と再現性を維持します。詳しくはホームページをご覧ください。

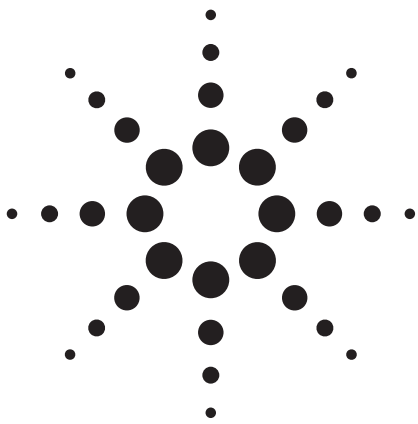
agilent.com/chem/jp

目次をクリックすると、それぞれの分析を紹介する文献にジャンプすることができます。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる連続希釈の前処理自動化：水素炎イオン化検出器の性能評価に使用するサンプルセットの作成.....	132
アジレントサンプル前処理ワークベンチを使用した QC テストの自動化.....	136
バッチモードによるサンプル前処理ワークベンチの機能向上.....	138

[目次に戻る](#)

[アプリケーション分野の紹介に戻る](#)



Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ による連続希釈の前処理自動化： 水素炎イオン化検出器の性能評価に使用する サンプルセットの作成

アプリケーションノート

著者

W. Dale Snyder
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

はじめに

連続希釈によるサンプルセットの作成は、分析化学者が頻繁に直面する課題です。連続希釈は、既知濃度のサンプルから開始し、このサンプルを使用して一連の希釈を行います。通常は、直前に希釈されたサンプルと溶媒を一定の割合で混合し、異なる濃度のサンプルを順次作成します。この操作は、特定の対象化合物によって機器のキャリブレーションを行う必要がある場合、または直線性、感度、検出下限値 (MDL) などの検出器の性能を評価する必要がある場合に行います。経時的に安定性がないサンプルの場合は、週に一度、または毎日の前処理が必要です。多くの場合、手動による前処理のエラーを最小限に抑えるため、または手間のかかる希釈の頻度を削減するために、必要以上に多くのサンプルを前処理しています。そのため、不要な廃棄物やコストが発生しています。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、連続希釈を高い精度で自動化することができ、必要な濃度範囲で少量のサンプルを作成することが可能です。連続希釈の前処理メソッドでは、最初に一定量の溶媒を空バイアルに分注し、次に一定量のサンプルをここに添加します。これを混合後、この希釈溶液と新しい溶媒バイアルを使用して、この手順を繰り返します。例えば、水素炎イオン化検出器 (FID) の性能を測定するには、直前のサンプルを 10 倍に希釈したサンプルのセットが必要です。最初のサンプルは、n-トリデカン (C₁₃) などの炭化水素です。各希釈溶液は、90 % の溶媒と 10 % の直前の希釈サンプル (v/v) で構成されています。通常 7 桁を評価する FID の直線性に対しては、7 または 8 段階のサンプルセットを作成することが必要です。本アプリケーションでは 2 週間にわたり、8 セットのテストサンプルを作成する前処理を行いました。3 セットは手動で、5 セットは Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して行い、サンプルあたりの最終液量は 1 mL または 0.5 mL となるようにしました。全 8 セットの繰り返し再現性は、各セットのサンプル重量および FID 性能のいずれにおいても良好な結果を示しました。



Agilent Technologies

実験方法

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、 C_{13} 10 % 溶液の 10 倍希釈を段階的に行い、8 つの濃度レベルのサンプルを作成する前処理プログラムを実行しました。シーケンスは溶媒分注後にバイアル重量を量れるように、2 つに分けて行いました。1 つ目のシーケンスでは、各バイアルに一定量の溶媒を分注する操作を行います。2 つ目のシーケンスは、分注した溶媒バイアルの 1 つに C_{13} 10 % 溶液を添加して 10 倍希釈をし、さらに、その希釈溶液を別の溶媒バイアルへ添加するというように、段階的に 10 倍希釈を行う操作です。これによって、8 つの濃度レベルのサンプルが完成します。空バイアル、および各シーケンス後のサンプルバイアル重量を計量し、添加される液量の繰り返し再現性を確認しました。比較のため、同じサンプル前処理を手動でも行いました。

ハードウェアの構成

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチに 2 本の Agilent 7693A オートサンブラを取り付けました。バックインジェクタには、500 μ L シリンジ (部品番号 G4513-60561) をセットした拡張サンプルハンドリングシリンジキャリッジを使用しました。フロントインジェクタには、100 μ L シリンジ (部品番号 5183-2042) をセットした標準サンプルハンドリングシリンジキャリッジを使用しました。1 つ目のシーケンスではバックインジェクタを使用し、2 つ目のシーケンスではフロントインジェクタを使用しました。

サンプル前処理

このサンプル前処理は 2 通りの方法で行いました。1 つは最終液量が 1 mL (溶媒 900 μ L + サンプル 100 μ L) になるように希釈する方法で、もう 1 つは、最終液量が 0.5 mL (溶媒 450 μ L + サンプル 50 μ L) になる方法です。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのリソースレイアウトは両方のシーケンスで同じものを使用しました。

リソースレイアウト:

バイアル範囲	名称	タイプ	使用方法
2-9	MT バイアル	空コンテナ	1 回使用/バイアル
12-19	溶媒	ケミカルリソース	1 回使用/バイアル

必要となる 10 % C_{13} 溶液は、100 μ L の C_{13} 溶液をイソオクタンが適量入った 1 mL メスフラスコに添加後、印が付いた部分までイソオクタンでメスアップをして作成しました*。

1 つ目のシーケンスでは空バイアルに 900 μ L の溶媒を分注します (シリンジのパラメータについては付録を参照)。このシーケンスでは、バイアル範囲は 2~9 を指定しています。

第 2 のシーケンスでは、以下のプログラムに従ってサンプル希釈を行いました (シリンジのパラメータについては付録を参照)。

手順	操作
1	100 μ L のサンプル (フロント) をバイアル #2 に加える
2	バイアル #2 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
3	バイアル #2 からバイアル #3 に 100 μ L を加える
4	バイアル #3 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
5	バイアル #3 からバイアル #4 に 100 μ L を加える
6	バイアル #4 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
7	バイアル #4 からバイアル #5 に 100 μ L を加える
8	バイアル #5 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
9	バイアル #5 からバイアル #6 に 100 μ L を加える
10	バイアル #6 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
11	バイアル #6 からバイアル #7 に 100 μ L を加える
12	バイアル #7 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
13	バイアル #7 からバイアル #8 に 100 μ L を加える
14	バイアル #8 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する
15	バイアル #8 からバイアル #9 に 100 μ L を加える
16	バイアル #9 を 1500 RPM で 0 分 5 秒間混合する

結果

2 週間にわたって、一連のサンプル前処理を 8 回行いました。その内の 3 回は手動で行い (最終液量が 1 mL は 2 回、0.5 mL は 1 回)、5 回は Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して行いました (最終液量が 1 mL は 3 回、0.5 mL は 2 回)。

表 1. 2 つ目のシーケンスにおける添加量の再現性 (8 回の平均)

タイプ	手動	手動	手動	7696A	7696A	7696A	7696A	7696A
体積 (mL)	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
平均重量 (g)	*	0.6165	0.6151	0.3089	0.6176	0.6195	0.6180	0.3088
%SD	*	0.17	0.26	0.11	0.16	0.09	0.06	0.17

* 測定しませんでした。

2 つ目のシーケンスの添加量の再現性 (n = 8) は、最終液量が 1 mL と 0.5 mL のどちらの場合も $\pm 1 \mu$ L でした。各サンプルに添加する液量と採取される液量は同じであるため、操作の前後で液量変化が小さければ精度が良いといえます。この液量変化の平均は $\pm 1 \mu$ L となりました。この値は最低濃度のサンプルの添加された量を基準としています (最終液量が 1 mL では添加量は 100 μ L、0.5 mL では添加量が 50 μ L です)。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの稼働時間の合計は、最終液量が 1 mL の場合は 49 分、0.5 mL の場合は 41 分でした。手動による前処理に費やした時間は測定していません。

* 2 種類の 100 % 化合物を混合した際、体積が小さくなる可能性があるため、 C_{13} 溶液は 100 % ではなく、10 % から希釈を開始しました。

FID 性能の再現性

FID の直線性、感度および検出下限値 (MDL) は、ASTM の手順にほぼ従って算出しました [1]。ASTM との大きな違いは、気体サンプルではなく液体サンプルを使用した点です。すべての測定は同じ FID で行いました。直線性の結果 (図 1) は、サンプル前処理を Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで行った場合と手動で行った場合で基本的に差は見られませんでした。感度の平均と % SD は、それぞれ 26.3 と 2.4 と算出されました。この結果は、FID の性能が非常に良好なものであることを示すものです。MDL の変動 (表 2) は、C₁₃ の溶出領域におけるノイズ平均が日変動するために生じるものです。

表 2. FID の MDL

タイプ	手動	手動	手動	7696	7696	7696	7696	7696
体積 (mL)	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
感度 (ma-s/gC)	27.2	25.7	25.8	26.8	26.8	25.5	26.6	25.5
MDL (pgC/s)	0.96	1.14	1.66	0.92	0.68	1.31	1.23	1.15

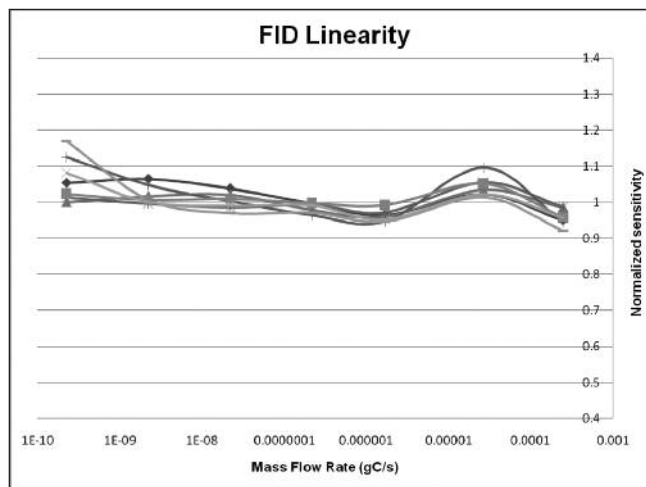


図 1. 直線性のプロット (全 8 回の分析を重ねて表示)

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチにより、連続希釈によるサンプルセットの作成が容易になります。分析要件を満たすために必要な量だけ、必要な時にのみ新しいサンプルの作成を実行できます。その結果、効率の向上、人為的なミスの軽減、試薬使用量の減少、廃棄コストの削減、繰り返し再現性の向上が達成されます。

付表

500 μ L シリンジのパラメータ :

	バック インジェクタ	溶媒 プレ洗浄 1	溶媒 プレ洗浄 2	排出 洗浄	排出 ポンプ	排出 設定	溶媒 ポスト洗浄 1	溶媒 ポスト洗浄 2
ポンプまたは洗浄回数					3			
洗浄ボリューム (μ L)					50			
吸引速度 (μ L/min)					1250	1250		
排出速度 (μ L/min)					3000	3000		
ニードル深さオフセット (mm)					0	0		
粘性待ち時間					2	2		
タレット溶媒								
エアギャップ (% シリンジ体積)						0		

100 μ L シリンジのパラメータ :

	フロント インジェクタ	溶媒 プレ洗浄 1	溶媒 プレ洗浄 2	排出 洗浄	排出 ポンプ	排出 設定	溶媒 ポスト洗浄 1	溶媒 ポスト洗浄 2
ポンプまたは洗浄回数		1		1	2			
洗浄ボリューム (μ L)		10		20	10			
吸引速度 (μ L/min)		300		300	300	300		
排出速度 (μ L/min)		6000		6000	6000	6000		
ニードル深さオフセット (mm)		0		0	0	0		
粘性待ち時間		2		2	2	2		
タレット溶媒		A						
エアギャップ (% シリンジ体積)						0		

参考資料

1. ASTM E594-96 (2006) Standard Practice for Testing Flame Ionization Detectors used in Gas or supercritical Fluid Chromatography

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., 2010
Printed in Japan
November 10, 2010
5990-6850JAJP



Agilent Technologies

アジレントサンプル前処理ワークベンチを使用した QC テストの自動化

品質管理



正確でエラーのない QC サンプル前処理を実現する 使いやすく、高い信頼性を誇る Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ

標準物質のキャリブレーションが正確で、信用できることは、GC/MS 分析を実施しているすべてのラボに不可欠です。ULTRA Scientific 社は、正確性と信頼性を保証します。また、現在は ISO Guide 34 の遵守を証明するために、厳しい QC (品質管理) 手順を実行して、認証標準物質を提供しています。

ULTRA Scientific の手順では、混合標準試料中の各化合物が均質であることを監視し、その濃度が正しいことを確認するために、分析するサンプルをランダムに選択する必要があります。標準試料中の成分濃度の決定には、各成分の検量線を作成してキャリブレーションします。キャリブレーションには、精密な希釈に加えて内部標準の添加を必要とします。規定量の内部標準物質をランダムに選ばれた各バイアルに加えます。バイアル内の各標準物質の正確な濃度は、標準物質のピーク面積と内部標準のピーク面積比を GC で測定することによって得られます。この面積比をキャリブレーションで得られる同じ面積比と比較します。キャリブレーションの面積比は、一連の QC 手順の始めに測定され、濃度既知であるその成分は、パッケージの標準試料に含まれます。これにより、バイアル中の化合物濃度を非常に高い確度で測定した結果が得られます。

これまで ULTRA Scientific では、ピペットを使用して内部標準を手動で処理することにより、この QC 手順を実行していました。先ごろ、ULTRA Scientific は、揮発性と半揮発性の両方を含む混合物を使用して、Agilent サンプル前処理ワークベンチによるピペット操作の自動化をテストしました。ほとんどの場合、ワークベンチによる処理は手動による処理と同じか、それを上回る正確さを示しました。内部標準を加えるときにワークベンチがバイアルシールに穴を開けるにもかかわらず、この結果は揮発性標準物質の混合試料の場合にも当てはまりました。

サンプル前処理ワークベンチは、製造環境における QC といった、正確で信頼性の高いピペット操作が必要なアプリケーションの自動化にとって非常に有益なツールです。

この実験は、ULTRA Scientific の Scott A. Lorimer 氏とアジレントの Jared Bushey が共同で実施したものです。

主な利点

- 手動による前処理では防げないエラーの可能性を排除
- 手動メソッドと同じか、それを上回る正確性
- ワークベンチに QC 用メソッドを保存できるので、迅速なアクセスが可能
- 覚えやすい、ユーザーフレンドリなテンプレートを使用したソフトウェア
- サンプルの追跡が容易なバーコード機能



アジレントワークベンチで QC サンプルを生成するために使用したメソッド

メソッドの手順

- 315 µL の塩化メチレン (標準試料 A) またはメタノール (標準試料 B) を、バックタワーの空バイアル 1 に加えます。
- 35 µL のサンプルをフロントタワーの空バイアル 1 に加えます。
- 35 µL のビフェニル (標準試料 A) またはフルオロベンゼン (標準試料 B) を内部標準としてフロントタワーの空バイアル 1 に加えます。
- 空バイアル 1 を、ミキサーを使用して 2000 RPM で 5 秒間、両方向に 2 サイクル撹拌します。
- 空バイアル 1 に "Results (結果)" のフラグを付けます。

ワークベンチの構成

フロントインジェクタのシリンジサイズ	100 µL
リアインジェクタのシリンジサイズ	500 µL
バーコードヒーター	50 °C

QC サンプルの各対象化合物の量の計算に使用した式：

$$\left(\frac{\left(\frac{\text{標準試料成分の面積}}{\text{内部標準の面積}} \right)_{\text{サンプル}}}{\left(\frac{\text{標準試料成分の面積}}{\text{内部標準の面積}} \right)_{\text{キャリブレーション}}} \right) \times (\text{内部標準の濃度})_{\text{サンプル}}$$

生産品から取り出したバイアルの QC の正確性の結果*

標準試料 A

標準試料成分	手動による 差違 (%)	ワークベンチ による差違 (%)
2-ピコリン	-1.1960	0.6202
アセトフェノン	-3.2765	0.3384
N-ニトロソピペリジン	-3.3925	-2.6848
a,a-ジメチルフェネチルエチルアミン	0.9115	1.0354
N-ニトロソジ-n-ブチルアミン	-0.2920	0.2560
1,2,4,5-テトラクロロベンゼン	-0.8785	0.8129
1-クロロナフタレン	9.4015	0.1805
ペンタクロロベンゼン	-2.2000	0.7535
ジフェニルアミン	-0.0380	-0.4711
フェナセチン	-2.1165	2.0917
4-アミノビフェニル	-9.6435	5.1187
ペンタクロロニトロベンゼン	-2.5130	1.0443
プロナミド	-3.7865	2.5000
p-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン	2.1465	3.1419
7,12-ジメチルベンズ [A] アントラセン	-1.5785	0.0849
3-メチルコラントレン	1.6965	-0.4717
ジベンズ [A,J] アクリジン	2.2478	1.7602

* 正確性は、サンプルに含まれることが確認された特定の対象化合物の量と、キャリブレーションの測定データに基づいて存在するはずの量の差 (%) として定義されます。

標準試料 B

標準試料成分	手動による 差違 (%)	ワークベンチ による差違 (%)
1,1-ジクロロエテン	-7.7578	-1.0566
trans-1,2-ジクロロエテン	-1.4115	-3.8288
cis-1,2-ジクロロエテン	3.0163	-1.6658
ベンゼン	3.1771	-0.5289
トリクロロエテン	3.2273	-5.9651
cis-1,3-ジクロロプロペン	5.7795	-4.1192
トルエン	4.5507	-1.5242
trans-1,3-ジクロロプロペン	6.4737	-2.8953
テトラクロロエテン	4.1876	-4.7692
クロロベンゼン	7.0025	-1.8823
エチルベンゼン	6.4856	-0.9086
m- および p-キシレン	6.5132	-1.9300

ホームページ：

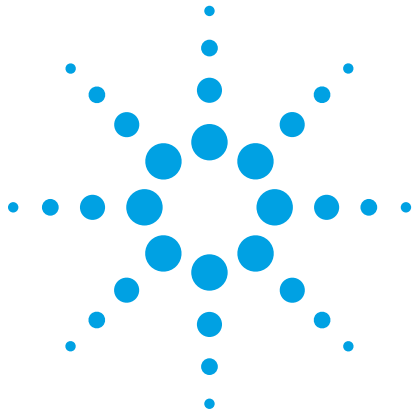
www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ：

フリーダイヤル **0120-477-111**

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。





バッチモードによる サンプル前処理ワークベンチの 機能向上

アプリケーションノート

著者

Rebecca Veeneman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808
USA

概要

バッチモードを備えている Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用することで、さらなる時間の短縮とリソースの削減を実現することができます。非バッチモードとバッチモードのサンプル処理を使用し、一般的なサンプル前処理タスクを実行しました。洗浄溶媒の使用量およびサンプルあたりの所要時間を比較しました。



Agilent Technologies

はじめに

Agilent 7696A 自動サンプル前処理ワークベンチは、ガスクロマトグラフィー (GC) または液体クロマトグラフィー (LC) 分析用の多くのサンプル前処理タスクを実行することができます。ワークベンチは 2 つの液体処理タワー、最高温度が 80 °C の 1 つのバイアルヒータ、1 つのバイアルポルテックスミキサ/バーコードリーダで構成されています (図 1)。したがって、希釈/分注、液体の添加、サンプルの加熱、液液抽出、サンプルの混合が可能です。ラックは個別に加熱/冷却することもできます。このサンプル前処理装置は、GC に設置する 7693A 液体オートサンプラ [1] と同じ正確さと精度でタスクを実行することができます。



図 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでは、Easy SamplePrep のソフトウェアを使用して、サンプル前処理プログラミングを大幅に簡略化することが可能です。Easy SamplePrep (ESP) の機能には、アイコンによるプログラミングとリソースマネージャがあります。ドラッグ & ドロップエディタを使用することで、ラボノートのプロトコルや手順に従うようにサンプル前処理メソッドを作成することができます。ESP は、サンプル前処理ステップをテキストでも表示できます。ESP には、バッチモードと非バッチモードの 2 つの操作モードがあります。非バッチモードでは、各サンプルを 1 つずつ順番に処理します。つまり、すべてのステップを 1 サンプルずつ実行するため、次のサンプルに移る前にそのサンプルの前処理が完了します。逆に、バッチモードでは、サンプルを並行して処理します。つまり、すべてのサンプルで個々の各ステップを実行してから次のサンプル前処理ステップに移るため、すべてのサンプルがほぼ同時に完了します。

非バッチモードとバッチモードの両方の処理を使用して、脂肪酸をエステル化するための自動化メソッド [2] を実行しました。各モードでは、洗浄溶媒の使用量に加えて、サンプル前処理の実行時間についても違いがあります。

結果と考察

バッチモード処理により、大幅な時間の短縮とリソースの削減が可能になります (表 1)。[2] で概説したメソッドを使用して 6 つのサンプルを作成したところ、非バッチモード処理ではサンプルあたりの所要時間は 45 分間 (6 つのすべてのサンプルを作成するには 270 分間) でした。一方、バッチモードを使用したところ、6 つのすべてのサンプルの前処理は 138 分間で完成し、サンプルあたりの平均所要時間は 23 分間でした。時間が大きく短縮されたのは、すべてのサンプルを加熱ラックに移動し、20 分間の反応時間の後に、すべてのサンプルを元の場所に戻すことができたからです。このようにバッチモードでは、すべてのサンプルを同時に加熱することができます。これに対し、非バッチモードは各サンプルを加熱するのに 20 分ずつ時間がかかります。

表 1. 時間の短縮とリソースの削減

バッチサイズ n = 6	非バッチ	バッチ	改善点
プログラミングステップの数	12	12	n/a
洗浄ステップ	9	9	n/a
洗浄回数の合計	54	9	1/n (n 回)
時間の合計	4.5 時間	2.3 時間	~50 %
サンプルあたりの所要時間	45 分	23 分	~50 %
洗浄量	15.3 mL	2.55 mL	1/n (n 回)

同様に、洗浄溶媒使用量を比較すると、バッチモードの優位性は明らかです。バッチモードを使用してサンプルを処理すると、洗浄ステップは 9 回だけで、溶媒使用量は合計で 2.6 mL でした。非バッチモードを使用して 6 つのサンプルを処理した場合も、使用した洗浄ステップの回数は 9 回でしたが、洗浄回数は合計で 54 回になり、溶媒使用量は 15.3 mL でした。バッチモードを使用してサンプルを処理することにより、このアプリケーションでは、洗浄溶媒の使用量が 6 分の 1 に減少しました。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ向けに開発されたバッチモードと非バッチモードの処理を比較して、バッチモードを使用したときのメリットを示しました。バッチモードによりサンプルあたりの所要時間が短縮されます。ここで挙げた例では、バッチモードによりサンプルを 2 倍速く処理できるようになりました。さらに、バッチモードを使用すると、洗浄溶媒を大幅に削減することができます。バッチ機能を使用すると、洗浄ステップが n (n はサンプルの数) 分の 1 に減少し、洗浄溶媒の使用量も n 分の 1 に減少します。6 つのサンプルでは、この結果、洗浄溶媒の使用量は、非バッチモードで処理した場合の 15.3 mL に対して、6 分の 1 の 2.6 mL になりました。この結果、機器のスループットが向上するため、時間とリソースの大幅な削減となります。

参考文献

1. Susanne Moyer, Dale Synder, Rebecca Veeneman, and Bill Wilson, "Typical Injection Performance for the Agilent 7693A Autoinjector," Agilent Technologies Publication 5990-4606EN
2. Rebecca Veeneman, 「自動サンプル前処理テクニックを用いた脂肪酸メチルエステル分析法の開発」、アジレント資料番号 5990-6873JAJP

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012

Printed in Japan

October 19, 2012

5990-9271JAJP



Agilent Technologies



Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ

クイックリファレンスガイド

ワークベンチ用部品と消耗品

ラボの生産性を向上させるためには、効率的な前処理が欠かせません。Agilent 7696A ワークベンチは、HPLC、GC、LC/MS、GC/MS 分析の前処理を自動化します。アジレントの高性能消耗品もあわせてご利用ください。



バイアル

品名	カラー	入数	部品番号
2 mL スクリューバイアル、 広口	透明	100 個	5182-0714
		1000 個	5183-2067
	透明、 ラベル付	100 個	5182-0715
		1000 個	5183-2068
	茶色	100 個	5188-6535
		1000 個	5188-6536
	茶色、 ラベル付	100 個	5182-0716
		1000 個	5183-2069

スクリーキャップ

品名	セプタムの タイプ	入数	部品番号
マルチカラー スクリーキャップ パック	PTFE/ シリコン	各色 50 個： 青、緑、赤、 水色、紫	5040-4682
スリット入りセプタム	PTFE/ 白シリコン	100 個	5183-2074

シリンジ

品名	容量 (μL)	部品番号
PTFE チップ付、ニードル固定型、 23/42/HP	500	G4513-60561
PTFE チップ付、ニードル固定型、 23-26s/42/HP	100	G4513-80222
PTFE チップ付、ニードル固定型、 23-26/42/HP	10	G4513-80203

ラベルとリボン

品名	入数	部品番号
2 mL バイアル用 プリンターリボンとラベル	2500/ roll	5190-3177
2 mL バイアル用ラベル	2500/ roll	5190-3180
バーコードラベルプリンティングバンドル： プリンター、ソフトウェア、テンプレート、 バーコード印刷用ラベルを含む	1	G9201AA



分析の成功を支える アジレントの高性能消耗品

正しい分析結果を得るためには、分析装置はもちろん、消耗品の性能も優れていることが求められます。アジレントの消耗品は、ISO 9001 で認定された品質管理システムのもとで設計・製造されており、厳しい基準をクリアした高い品質でお客様の分析をサポートします。

www.agilent.com/chem/jp



バイアル選択に便利な オンラインツール

お使いの装置やアプリケーションに適したバイアルをホームページ上で選択・検索できます。詳しくは下記のサイトをご覧ください。

www.agilent.com/chem/SelectVials

www.agilent.com/chem/jp
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本資料に記載の情報は、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. 2013
Published in Japan, July 15, 2013
5991-2500JAJP



Agilent Technologies



分析結果の信頼性は、 サンプル前処理の精度によって決まります

高精度の自動化機能と直感的なソフトウェアインターフェースを兼ね備えた Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、次のような処理を支援します。

- 手動によるサンプル前処理手順を自動化
- 精度と再現性を損なうことなく、ガラス容器、溶媒、試薬、溶媒廃棄に関連するコストを削減
- 分析者間のばらつきによる再分析の必要性を低減
- 生産性を向上し、サンプルあたりのコストを削減
- 有害化合物に対する曝露を最小化
- 液体分注の重量の確認を自動化

詳細情報

Agilent 7696A サンプル前処理
ワークベンチの詳細については、
agilent.com/chem/jpをご覧ください。

お客様がお住まいの国の
アジレントカスタマセンター：
agilent.com/chem/contactus

日本
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2014
Printed in the Japan, October 27, 2014
5991-4741JAJP



Agilent Technologies