

オートサンプラーの自動希釈機能を用いた 簡単操作による検量線作成の省力化

岩田 奈津紀、金丸 凌大

ユーザーベネフィット

- ◆ オートサンプラーの自動希釈機能により、手動での希釈調製の手間が省け、業務効率化と生産性向上が図れます。
- ◆ 同一のメソッドファイルを使用し、バッチテーブルで任意の希釈倍率を指定するだけの簡単な設定で、試料を自動希釈調製し、検量線を作成できます。
- ◆ 希釈倍率に依らずメソッドファイルが1つなので、HPLC条件を変更した際も設定や管理が容易です。

■はじめに

HPLCによる定量を行う際、標準液や試料溶液の希釈調製はピペットなどを用いて手動で行われますが、このような作業には労力と時間がかかります。近年、省力化を目的とした自動化が望まれており、これら希釈調製作業を自動化することができれば、業務の効率化や生産性の向上を図ることができます。

Nexeraシリーズのオートサンプラーには自動前処理機能が搭載されており、自動で希釈、試薬添加、共注入などを実施できます。自動希釈機能を用いることで任意倍率の希釈試料を自動調製し、そのまま分析カラムへ導入することが可能です。ここでは、オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡便な検量線作成方法についてご紹介します。

■前処理プログラムと動作概要

メソッドファイルには、装置パラメーター、解析パラメーター、前処理プログラム等の情報が集約されています。前処理プログラムを使用することで、100倍以上の高い希釈倍率であっても設定可能です。また、バッチアドイン（次頁、図2）を併用することで希釈倍率によらず1つのメソッドファイルを使用するため、設定ミス等の人為的エラーを防ぐことができます。

希釈倍率や混合動作に関する条件はワークステーション LabSolutions™ で設定します。オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面とコマンドを図1と表1に示します。本稿の希釈液には、リンス液を用いました。原液バイアルから希釈率に応じた量を吸引し、予めオートサンプラーに

セットしておいた空のバイアル（混合用バイアル）に希釈液と共に吐出します。その後、混合用バイアルの中で攪拌を行い、バッチテーブルに指定した注入量分だけ混合液を吸引し、カラムへ導入します。この時、自動希釈により得られる最終液量は100 µLです。

表1 前処理プログラムのコマンド（特許出願中）

Line	Command
1	a3=100/a2
2	n.drain
3	disp 600.0,rs
4	d.rinse
5	vial.n a0,a1
6	n.strk ns
7	aspir a3,ss
8	air.a 0.1,ss
9	d.rinse
10	vial.n rn,sn
11	n.strk ns
12	disp 100.1,rs
13	mix 1,5,40,ss,35
14	n.drain
15	disp 100.0,rs
16	d.rinse
17	inj.p
18	v.inj
19	wait 2.0
20	goto f0
21	end



図1 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

■ バッチテーブルの設定方法

バッチ分析のテーブルに、原液を入れたバイアルの場所や任意の希釈倍率を設定するため、SIL前処理変数というバッチアドインをLabSolutionsに事前に適用します*1。図2にバッチテーブルのSIL前処理変数設定画面を示します。SIL前処理変数のA0~A2の欄に、原液を入れたバイアルのプレート番号 (A0) とバイアル番号 (A1)、希釈倍率 (A2) を設定します。自動希釈用 (混合用) の空バイアルは、バッチテーブルのトレイ番号およびバイアル番号で指定した場所にセットします。図2と同様に、サンプルタイプ (標準) とレベル番号を設定すると、分析終了後に検量線が自動生成されます (別途、解析パラメーターの設定が必要です)。

*1 詳細については、当社へお問い合わせください。

■ カフェイン標準液の自動希釈分析

250 mg/Lのカフェイン水溶液を用いて、自動希釈分析を行いました。表2に分析条件を示します。前処理プログラムは表1と同じです。混合用バイアルには1.0 mL ポリプロピレン製バイアルを、原液 (標準および試料) バイアルには、セプタム付きバイアルを用いました。希釈液には、リンス液*2の超純水を用いました。図3に100倍希釈したカフェイン (自動希釈後の濃度: 2.5 mg/L) のクロマトグラムを示します。

*2 マルチリンス機能を搭載したシステムについては、オートサンプラーの装置パラメータ設定で指定したリンス液を使用します。

表2 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ GIST C18*3 (75 mm×3.0 mm I.D., 2 μm)
Flow rate	: 0.6 mL/min
Mobile phase	: A) 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.6) B) Methanol
Time Program	: 20%B (0 min)→23%B (3.30 min)→70%B (3.31-4.30 min)→20%B (4.31-5.50 min)
Column temp.	: 40 °C
Sample	: 250 mg/L Caffeine aq.
Injection volume	: 4 μL
Needle stroke	: 45 mm
Vial for mixing	: Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene*4
Vial for stock solution and sample	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*5
Diluent	: Rinse solution (Ultrapure water)
Detection	: 272 nm (SPD-M40)

*3 P/N: 227-30002-03, *4 P/N: 228-31600-91, *5 P/N: 227-34001-01

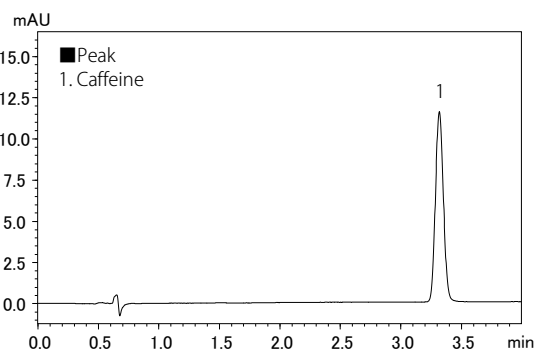


図3 自動希釈したカフェインのクロマトグラム (希釈倍率: 100倍、自動希釈後の濃度: 2.5 mg/L)

■ 再現性

250 mg/Lのカフェイン水溶液を超純水で500倍に自動希釈した標準液 (自動希釈後の濃度は0.5 mg/L) の6回繰り返し分析を行いました。表3にカフェインの保持時間と面積の再現性 (%RSD) を示します。

表3 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Retention time	Peak area
0.02	0.96

■ 検量線

オートサンプラーの自動希釈機能を用いて、カフェインの検量線 (濃度範囲: 0.5~50 mg/L) を作成したところ、寄与率 (r²) は0.999以上と良好な直線性が得られました。図4に検量線を示します。

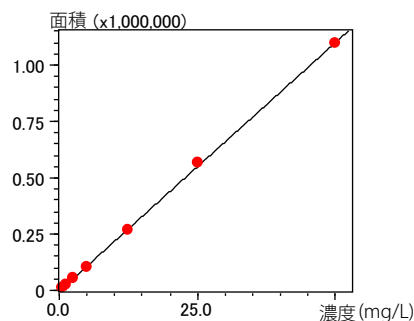


図4 検量線

分析	トレイ	バイアル番号	サンプル名	サンプルID	SIL前処理変数	データコメント	サンプルタイプ	レベル番号	注入量	メソッドファイル
1	1	1	Caffeine	500	A0=1;A1=53;A2=500	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準 (D)	1	4	NS_GE3.lcm
2	1	2	Caffeine	200	A0=1;A1=53;A2=200	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	2	4	NS_GE3.lcm
3	1	3	Caffeine	100	A0=1;A1=53;A2=100	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	3	4	NS_GE3.lcm
4	1	4	Caffeine	50	A0=1;A1=53;A2=50	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	4	4	NS_GE3.lcm
5	1	5	Caffeine	20	A0=1;A1=53;A2=20	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	5	4	NS_GE3.lcm
6	1	6	Caffeine	10	A0=1;A1=53;A2=10	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	6	4	NS_GE3.lcm
7	1	7	Caffeine	5	A0=1;A1=53;A2=5	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	7	4	NS_GE3.lcm

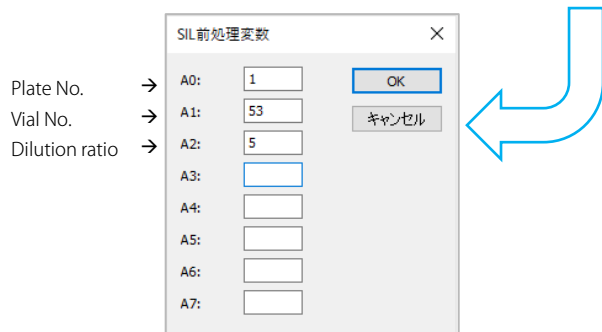


図2 バッチテーブルのSIL前処理変数設定画面

■ 飲料中カフェインの分析

試料は市販の緑茶とコーヒーを用いました。前処理は、緑茶とコーヒーをそれぞれ0.2 μmのメンブランフィルターでろ過しました。

前処理プログラムと分析条件は表1、2と同じです。図5、6にオートサンプラーの自動希釈機能を用いて100倍希釈した緑茶とコーヒーのクロマトグラムを、表4に分析結果（自動希釈後の濃度）を示します。

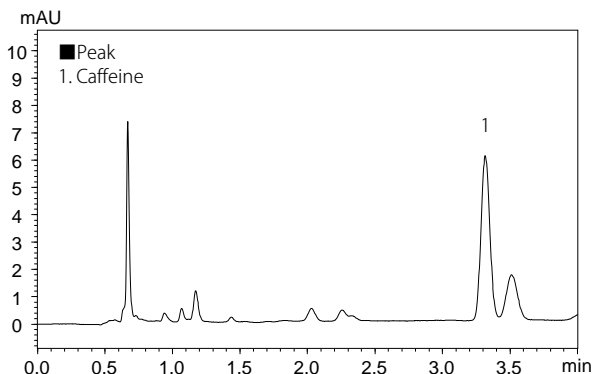


図5 自動希釈した緑茶のクロマトグラム
(希釈倍率：100倍)

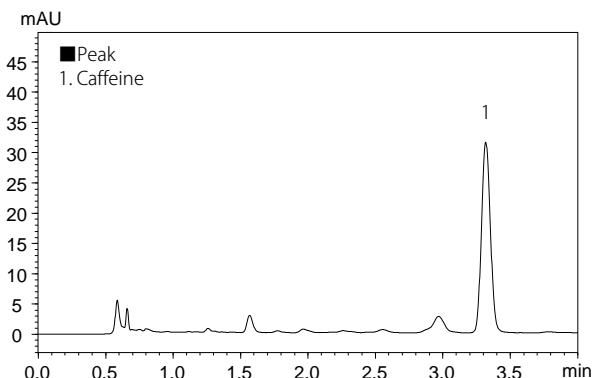


図6 自動希釈したコーヒーのクロマトグラム
(希釈倍率：100倍)

表4 分析結果 (n=6)

Sample	Concentration (mg/L)	%RSD
Green tea	1.32	0.72
Coffee	7.33	1.66

■ 成分含有量の自動計算および出力

バッチテーブルの希釈率セルに含有量を計算したい試料の希釈率を入力すれば、分析結果（濃度）には、自動希釈分析し得られた濃度ではなく、本来の試料に含まれる成分含有量としての濃度を表示することができます。図7にバッチテーブルの希釈率およびレポート自動出力設定画面、図8に緑茶分析を例に自動出力したレポートを示します。

サンプル名	希釈率	SIL前処理変数	レポート出力	レポートフォーマットファイル
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=500	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=200	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=100	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=50	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=20	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=10	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Caffeine	1	A0=1,A1=53,A2=5	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Blank	1	A0=1,A1=54,A2=10	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Coffee	100	A0=1,A1=52,A2=100	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Blank	1	A0=1,A1=54,A2=10	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr
Green Tea	100	A0=1,A1=51,A2=100	<input checked="" type="checkbox"/>	Report.lsr

図7 バッチテーブルの希釈率およびレポート自動出力設定画面

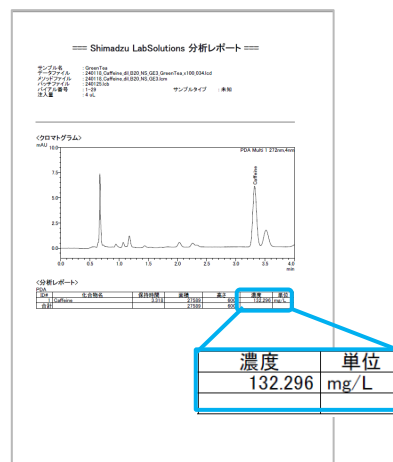


図8 レポート自動出力例（緑茶分析結果）

■ まとめ

任意の希釈率の検量線用試料を自動調製しそのまま分析に供することで、検量線を自動で簡単に作成することができました。標準液や試料溶液の原液のみを準備するだけで、その後の作業はHPLCにより自動で検量線作成から定量まで実施することができ、前処理作業の手間が省けました。本稿の検量線作成方法により、業務効率化と生産性向上を図ることができます。

バッチアラインの適用については、当社へお問い合わせください。

Nexera、LabSolutions、Shim-pack、およびSHIMADZU LabTotalは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



関連分野

▶ 食品・飲料

▶ 食品添加物

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ