

Application News

高速液体クロマトグラフ Nexera™ XR

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 (2)

岩田 奈津紀、金丸 凌大、馬場 栄里花

ユーザーベネフィット

- ◆ 手動での希釈調製の手間および有機溶媒の消費量を削減できます。
- ◆ 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、業務の効率化や生産性の向上を図るため、省力化を目的とした自動化が望まれています。また、有機溶媒が希釈液の場合、メスフラスコを用いた検量線用標準液の調製に大量の溶媒を消費しますが、HPLC分析に必要な試料量は数十μL以下と小容量です。

Nexeraシリーズのオートサンプラーに搭載されている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。アプリケーションニュースNo. 01-00717-JPでは、超純水を希釈液とした検量線作成法についてご紹介しました。ここでは、有機溶媒を希釈液とした分析例についてご紹介いたします。

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 rm,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

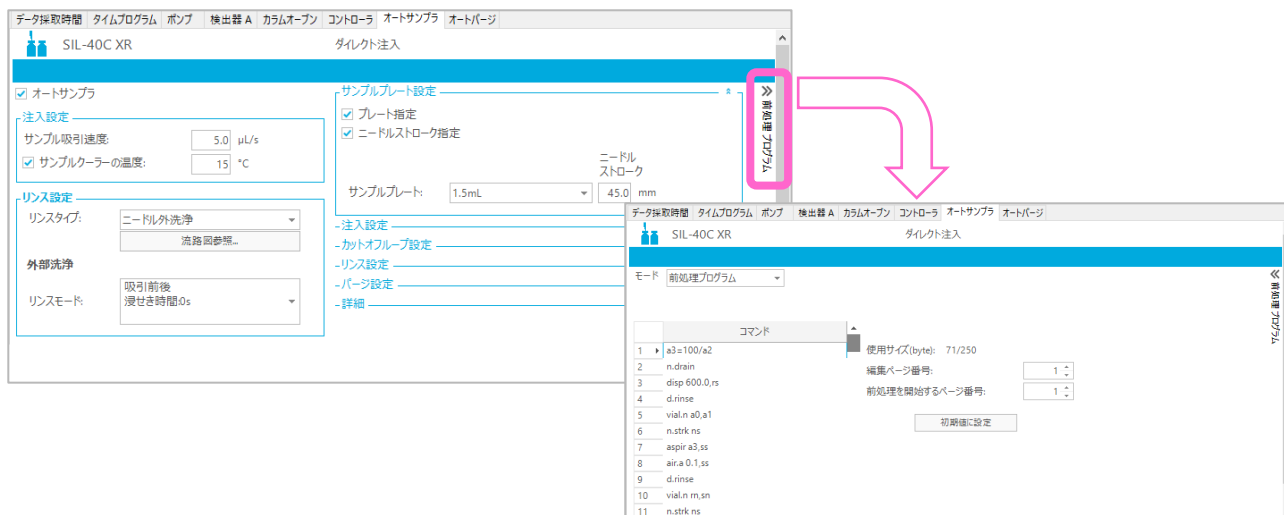


図1 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

■ 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合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。

■ 混合標準液の自動希釈分析

100 mg/Lのクマリンおよびシナムアルデヒドの混合標準液 (アセトニトリルに溶解) 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のアセトニトリルを用いました。図3に100倍希釈した混合標準液 (自動希釈後の濃度: 1.0 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-HP C18*3 (150 mm×3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Mobile phase	: A) Water B) Acetonitrile
Time Program	: 50%B (0-2.0 min)→60%B (4.0 min)→100%B (4.1-5.0 min)→50%B (5.1-5.5 min)
Column temp.	: 40 °C
Sample	: 100 mg/L Coumarin and Cinnamaldehyde in Acetonitrile
Injection volume	: 5 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 (Acetonitrile)
Detection	: Ch1 (Coumarin): 276 nm, Ch2 (Cinnamaldehyde): 288 nm (SPD-M40)

*3 P/N: 227-30040-05, *4 P/N: 228-31600-91, *5 P/N: 227-34001-01

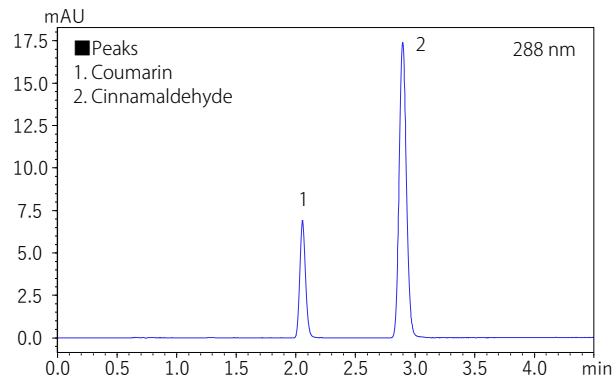
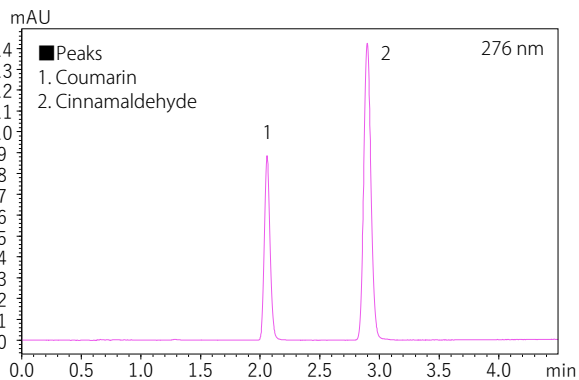


図3 自動希釈したクマリンおよびシナムアルデヒド混合標準溶液のクロマトグラム (希釈倍率: 100倍、自動希釈後の濃度: 1.0 mg/L)

■ 再現性

自動希釈機能を用いて、混合標準溶液 (希釈倍率: 500倍、希釈後の濃度: 各0.2 mg/L) の6回繰り返し分析を行いました。表3に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)

Compound	Retention time	Peak area
Coumarin	0.09	1.46
Cinnamaldehyde	0.06	1.82

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	サンプルタイプ	レベル番号	注入量	メソッドファイル
1	2	3	Standard	×1000	A0=2,A1=51,A2=1000	1:標準(1)	1	5	45_5.5m.lcm
2	2	4	Standard	×500	A0=2,A1=51,A2=500	1:標準	2	5	45_5.5m.lcm
3	2	5	Standard	×200	A0=2,A1=51,A2=200	1:標準	3	5	45_5.5m.lcm
4	2	6	Standard	×100	A0=2,A1=51,A2=100	1:標準	4	5	45_5.5m.lcm
5	2	7	Standard	×50	A0=2,A1=51,A2=50	1:標準	5	5	45_5.5m.lcm
6	2	8	Standard	×20	A0=2,A1=51,A2=20	1:標準	6	5	45_5.5m.lcm
7	2	9	Standard	×10	A0=2,A1=51,A2=10	1:標準	7	5	45_5.5m.lcm

SIL前処理変数

Plate No. → A0: 2

Vial No. → A1: 51

Dilution ratio → A2: 10

A3:

A4:

A5:

A6:

A7:

OK

キャンセル

図2 バッチテーブルのSIL前処理変数設定画面

■ 検量線

オートサンプラーの自動希釈機能を用いて、クマリンおよびシナナムアルデヒドの3回繰り返し分析による検量線（濃度範囲：0.1～10 mg/L）を作成しました。寄与率（ r^2 ）は0.9999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。

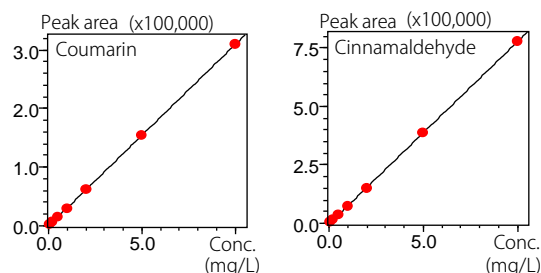


図4 検量線 (n=3)

■ シナモンの分析

試料は市販のカシアシナモンを用いました。前処理は、アプリケーションニュースNo. 01-00233-JP（図3）のフィルターろ過までの工程と同じです。なお、No. 01-00233-JPでは、前処理の最終工程にて、試料をアセトニトリルで希釈していましたが、本稿ではオートサンプラーで自動希釈しました。図5に前処理プロトコルを示します。抽出溶媒はアセトニトリルを用いました。脂質除去には、分散型固相抽出（dSPE）カートリッジ（Merck製Supel QuE Z-Sep+）を用いました。このカートリッジは試料負荷前のコンディショニングが不要であり、操作が簡便です。

図6にオートサンプラーの自動希釈機能を用いて100倍希釈したカシアシナモンのクロマトグラムを示します。対象の2成分と夾雑成分との分離は良好でした。表4に分析結果（自動希釈後の濃度）を示します。なお、表4には検量線試料の調製と前処理済シナモン抽出液のアセトニトリル希釈（100倍希釈）を手動で行った場合の分析結果を併せて示します。

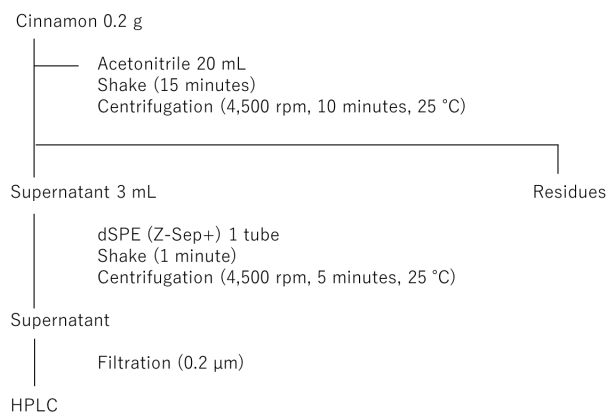


図5 前処理プロトコル

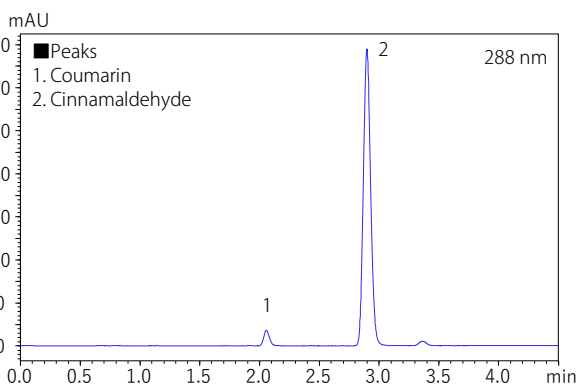
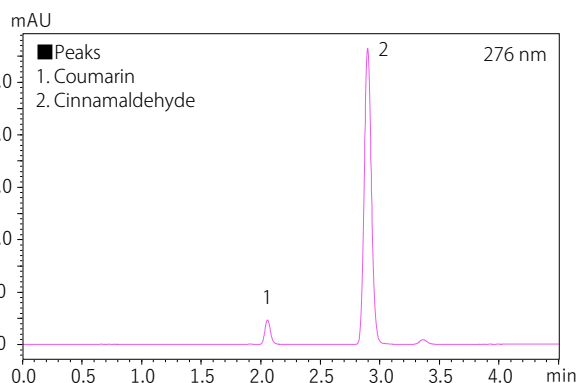


図6 自動希釈したカシアシナモンのクロマトグラム（希釈倍率：100倍）

表4 定量結果 (n=3)

Compound	Concentration (mg/L) *6	
	Automatic	Manual
Coumarin	0.28 (0.72)	0.27 (0.38)
Cinnamaldehyde	1.90 (1.08)	2.02 (0.59)

*6 括弧の値は、%RSD, n=3を示す

■ まとめ

任意の希釈倍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。また、実試料の定量において、試料の希釈調製も自動で行うことにより、簡便な前処理のみで自動定量可能でした。本稿の検量線作成方法により、分析者の省力化、ならびにサステナブルの観点において省溶媒化が期待できます。

<関連アプリケーション>

1. 産地別シナモン中のクマリンおよびシナナムアルデヒド同時定量分析法 [Application News No.01-00233](#)
2. 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 [Application News No.01-00717](#)

バッチアド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

▶ 栄養・機能性成分

▶ 自然毒

▶ 食事制限

▶ 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