

オートサンプラーの自動希釈機能を用いた高正確性自動希釈法の開発 および簡単操作による検量線作成の省力化/省溶媒化

○岩田奈津紀, 金丸凌大, 馬場栄里花, 小林まなみ 島津製作所 分析計測事業部

1. はじめに

LC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やメスフラスコなどを用いて手動で行われるが、業務の効率化や生産性の向上を図るため、近年、省力化を目的とした自動化が望まれている。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するが、LC分析に必要な試料量は数十μL以下と小容量である。本研究では、標準液や試料溶液の原液を準備するだけで、任意の希釈率の検量線用標準液をオートサンプラーで自動調製しそのまま分析に供することにより、簡便かつ正確に検量線を自動作成可能なメソッドを開発した。

2. 実験

2-1. 自動希釈法の検証

装置は、オートサンプラーを備えたLC(島津製作所製)を用いた。標準品にはカフェイン(アセトニトリル希釈の場合はナフタレン)を用いた。各標準品を各種溶媒(超純水、メタノールおよびアセトニトリル)で溶解し標準原液(各250 mg/L)を調製した。検量線用標準液の希釈液(溶媒)は、オートサンプラーのリンス液(洗浄液)と共用した。任意の倍率で正確に自動希釈するために、オートサンプラーの前処理プログラムを用いた(表1)。本研究で開発した前処理プログラムを実行することにより、任意の希釈率に応じた検量線用標準液を自動調製後、そのまま分析に供し、得られた結果を用いて検量線を自動作成した(図1、2)。

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 |

| 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=[A]=S0,A2=500 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 1 | 4 | NS GE30cm |
| 2 | 1 | 2 | Caffeine | 250 | A0=[A]=S0,A2=250 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 2 | 4 | NS GE30cm |
| 3 | 1 | 3 | Caffeine | 100 | A0=[A]=S0,A2=100 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 3 | 4 | NS GE30cm |
| 4 | 1 | 4 | Caffeine | 50 | A0=[A]=S0,A2=50 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 4 | 4 | NS GE30cm |
| 5 | 1 | 5 | Caffeine | 25 | A0=[A]=S0,A2=25 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 5 | 4 | NS GE30cm |
| 6 | 1 | 6 | Caffeine | 10 | A0=[A]=S0,A2=10 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 6 | 4 | NS GE30cm |
| 7 | 1 | 7 | Caffeine | 5 | A0=[A]=S0,A2=5 | A0: Plate No, A1: Vial No, A2: Dilution ratio | 1標準品(D) | 7 | 4 | NS GE30cm |



図1 バッチテーブルのSIL前処理変数設定画面

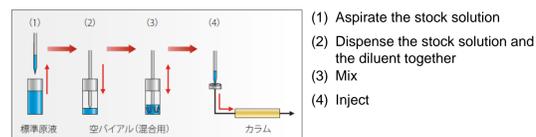


図2 オートサンプラーによる自動希釈の動作概要



図3 Nexera™ XR

表2 分析条件(検証用)

| | | | |
|------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------|
| System | : Nexera™ XR | | |
| Column | : Shim-pack™ XR-ODS II (75 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) | | |
| Diluent (Rinse solution) | Ultrapure water | Methanol | Acetonitrile |
| Flow rate | : 0.7 mL/min | : 0.7 mL/min | : 0.5 mL/min |
| Mobile phase | A) Water | B) Methanol | B) Acetonitrile |
| | B) Methanol | B) Methanol | B) Acetonitrile |
| Time program | : B. Conc. 40% | B. Conc. 40% | B. Conc. 70% |
| Column temp. | : 40 °C | : 40 °C | : 25 °C |
| Sample | : 250 mg/L Caffeine aq. | : 250 mg/L Caffeine aq. | : 250 mg/L Naphthalene aq. |
| Injection volume | : 3 μL | : 3 μL | : 3 μL |
| Vial for mixing | : Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene | | |
| Vial for stock solution and sample | : SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass | | |
| Detection | : 272 nm (SPD-M40) | : 272 nm (SPD-M40) | : 273 nm (SPD-M40) |

2-2. 実試料(飲料)分析への適用

本法を実試料分析に適用した。実試料は市販の緑茶とコーヒーを用いた。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た。オートサンプラーを用いて100倍希釈した緑茶およびコーヒーの自動定量を行った。分析条件を表3に示す。前処理プログラムは表1と同じである。また、分析時に実試料の希釈率を指定することで分析、定量および結果出力工程まで自動化した(図4)。

表3 分析条件(定量用)

| | | |
|------------------------------------|--|--|
| System | : Nexera XR | |
| Column | : Shim-pack GIST C18 (75 mm × 3.0 mm I.D., 2 μm) | |
| Diluent (Rinse solution) | : Ultrapure water | |
| 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., Green tea, Coffee | |
| Injection volume | : 4 μL | |
| Vial for mixing | : Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene | |
| Vial for stock solution and sample | : SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL, Glass | |
| Detection | : 272 nm (SPD-M40) | |

| 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=[A]=S0,A2=500 | ✓ | Report1.rpt |
| Caffeine | 1 | A0=[A]=S0,A2=200 | ✓ | Report1.rpt |
| Caffeine | 1 | A0=[A]=S0,A2=100 | ✓ | Report1.rpt |
| Caffeine | 1 | A0=[A]=S0,A2=50 | ✓ | Report1.rpt |
| Caffeine | 1 | A0=[A]=S0,A2=20 | ✓ | Report1.rpt |
| Caffeine | 1 | A0=[A]=S0,A2=10 | ✓ | Report1.rpt |
| Coffee | 100 | A0=[A]=S0,A2=100 | ✓ | Report1.rpt |
| Green tea | 100 | A0=[A]=S0,A2=100 | ✓ | Report1.rpt |

図4 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

3. 結果と考察

3-1. 直線性、希釈正確さ、再現性

各希釈液について、本研究で開発したメソッドを評価した。自動希釈による分析結果から作成した検量線の直線性(寄与率, r^2)、各希釈率における希釈正確さ(標準原液の平均面積と希釈率から算出した理論値および実測値の比較、各濃度につきn=6)および面積再現性(%RSD, n=6)を確認した(表4)。超純水希釈、メタノール希釈、およびアセトニトリル希釈による検量線の r^2 はいずれも0.999以上であった。希釈正確さ(希釈率:500倍以下)は、92~100%(超純水希釈)、87~100%(メタノール希釈)および100~103%(アセトニトリル希釈)の結果が得られた。500倍希釈(0.5 mg/L)の面積%RSDは、それぞれ1.8%(超純水希釈)、3.2%(メタノール希釈)および2.1%(アセトニトリル希釈)であった。

表4 検証結果(n=6)

| 希釈率 | 平均面積 | 面積%RSD | 希釈正確さ(%)* |
|------|---------|--------|-----------|
| 1000 | 2859 | 5.40 | 88.87 |
| 500 | 5939 | 1.82 | 92.31 |
| 100 | 31072 | 1.78 | 96.59 |
| 50 | 62664 | 1.36 | 97.40 |
| 10 | 315297 | 4.72 | 98.01 |
| 5 | 636351 | 0.90 | 98.91 |
| 2 | 1610830 | 1.04 | 100.15 |
| 原液 | 3216917 | | |

| 希釈率 | 平均面積 | 面積%RSD | 希釈正確さ(%)* |
|------|---------|--------|-----------|
| 1000 | 2602 | 7.61 | 80.93 |
| 500 | 5567 | 3.16 | 86.60 |
| 100 | 29450 | 2.16 | 91.62 |
| 50 | 61508 | 1.94 | 95.68 |
| 10 | 319230 | 1.87 | 99.31 |
| 5 | 636091 | 0.31 | 98.94 |
| 2 | 1586815 | 0.48 | 98.73 |
| 原液 | 3214379 | | |

| 希釈率 | 平均面積 | 面積%RSD | 希釈正確さ(%)* |
|------|---------|--------|-----------|
| 1000 | 3455 | 4.49 | 102.02 |
| 500 | 6951 | 2.10 | 102.62 |
| 100 | 33731 | 0.73 | 99.60 |
| 50 | 67393 | 0.46 | 99.50 |
| 10 | 339022 | 0.42 | 100.11 |
| 5 | 677757 | 0.55 | 100.06 |
| 2 | 1688945 | 0.42 | 99.74 |
| 原液 | 3386633 | | |

* 標準原液の平均面積と希釈率から算出した理論値および実測値の比較

3-2. 飲料中カフェインの自動定量

図5~7にカフェイン標準液(自動希釈後の濃度:2.5 mg/L)、緑茶およびコーヒーのクロマトグラムを、表5に分析結果(自動希釈後の濃度)を示す。カフェインの検量線(濃度範囲:0.5~50 mg/L)の r^2 は0.999以上と良好な直線性が得られた(図8)。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が可能であった。

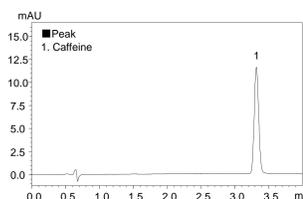


図5 自動希釈したカフェインのクロマトグラム
(希釈率:100倍、自動希釈後の濃度:2.5 mg/L)

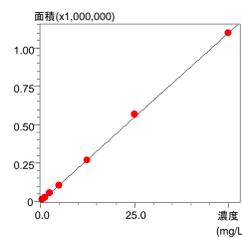


図8 検量線

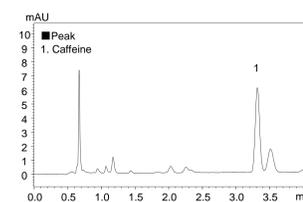


図6 自動希釈した緑茶のクロマトグラム
(希釈率:100倍)

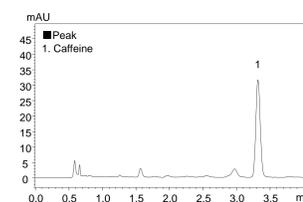


図7 自動希釈したコーヒーのクロマトグラム
(希釈率:100倍)

表5 分析結果(n=6)

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

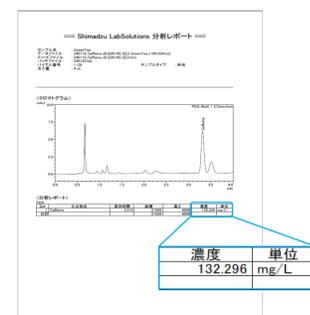


図9 レポート自動出力例(緑茶分析結果)

4. 結論

- ✓ 任意の希釈率の検量線用標準液を自動調製しそのまま分析に供することで、検量線を簡便かつ正確に自動作成するメソッドを開発した。
- ✓ 手動での希釈調製の労力と時間および各種溶媒の消費量を削減できた。
- ✓ 本法は任意の希釈率においても同一のメソッドを使用するため、分析者が簡便に実施可能であると考えられる。

以上より、オートサンプラーを用いて検量線用標準液調製から解析(定量)結果の出力まで自動化できたため、分析者の省力化、さらにはサステナブルの観点において省溶媒化につながることを期待できる。