

# Technical Report

## マイクロシリンジを用いた微量注入分析の再現性向上検討

～標準的な消耗品をより活用する～

Investigation on Improving the Reproducibility of Nanoliter Injections Using a Standard Syringe

Gregory King<sup>1</sup>、見小田裕一<sup>1</sup>

### Abstract:

GCにおける微量注入では、良好な再現性を得られるプランジャ・イン・ニードルシリンジがよく用いられています。しかし、プランジャ・イン・ニードルシリンジは、プランジャ・イン・ニードルタイプではない一般的なマイクロシリンジと比較して高価です。そこで本稿では、マイクロシリンジを用いた微量注入の可能性を検討しました。その結果、マイクロシリンジを使用した場合においても、注入後待ち時間(試料注入後にニードルが気化室に留まる時間)を設定することにより、再現性が著しく改善されることが分かりました。

**Keywords:** AOC-30i、微量注入、シリンジ

### 1. はじめに

近年、検出器や注入技術の発展に伴い、微量のサンプルを分析することが可能となってきています。そのため、再現性の高い微量サンプルの注入が求められています。

サンプルの微量注入は、試料の気化体積がライナーの体積を超えるオーバーフローによるキャリアオーバーや汚染などのリスクを抑えることができるため、効率的かつ経済的です。

GCにおける液体サンプルの注入では、プランジャ・イン・ニードルタイプではないマイクロシリンジが頻繁に使用されています。しかし、このようなマイクロシリンジは微量注入(0.1 μLなど)には向かないとされています。その理由の1つに、再現性の悪さが挙げられます。マイクロシリンジは、ニードル先端に数百ナノリットル程度のデッドボリューム(Fig. 1)を有しており、微量サンプルを正確に注入することができません。そのため、微量サンプルの注入には、マイクロシリンジの代わりにプランジャ・イン・ニードルシリンジが用いられています。プランジャ・イン・ニードルシリンジは、プランジャが針先まで到達するため、デッドボリュームが限りなくゼロになります(Fig.1)。しかし、プランジャ・イン・ニードルシリンジは、マイクロシリンジと比較して高価であり、選択できるシリンジ容量が少ないといった問題点を抱えています。

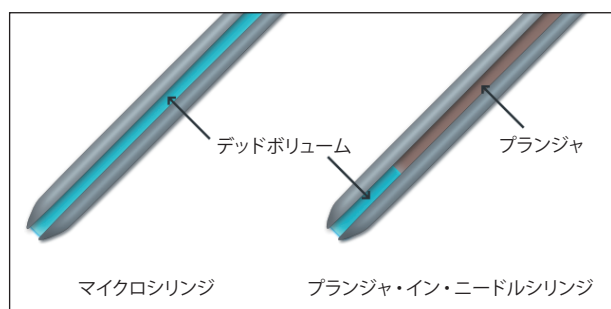


Fig. 1 マイクロシリンジとプランジャ・イン・ニードルシリンジのデッドボリューム

本稿では、プランジャ・イン・ニードルシリンジに代わり、マイクロシリンジを用いた微量注入の可能性を検討しました。その結果、注入後待ち時間(試料注入後にニードルが気化室に留まる時間)を設定することにより、ピーク面積の再現性が改善されることが明らかになりました。

### 2. 実験

n-ドデカン(C12)、n-テトラデカン(C14)及びn-ヘキサデカン(C16)をヘキサンに溶解し、100 ppm(v/v)に調製しました(標準試料A)。また、オクタノールとジシクロヘキシルアミンをヘキサンに溶解し、100 ppm(v/v)に調製しました(標準試料B)。

調製した標準試料の10回の繰り返し測定を実施し、ピーク面積の再現性(RSD)を算出しました。加えて、標準試料Aでは、データの信頼性を確認するために、10回の繰り返し測定を複数セット実施し、得られたピーク面積再現性(RSD)からボックスプロットを作成しました。作成したボックスプロットから中央値とデータのばらつきを検討しました。データのばらつきは、取得したデータの50%が分布する四分位範囲(IQR)により評価しました(Fig. 2)。

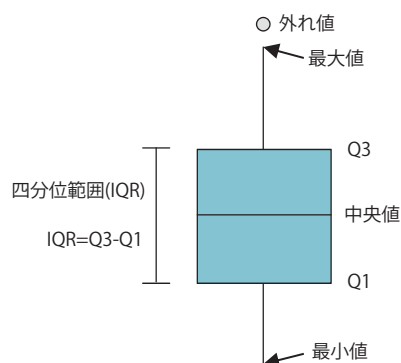


Fig. 2 ボックスプロットの各部名称

本試験の装置構成および分析条件をTable1に示します。

Table 1 装置構成と分析条件

|                  |   |
|------------------|---|
| モデル              | : Nexis™ GC-2030/AOC-30i  |
| 注入量              | : 0.1 μL~1 μL   |
| 気化室温度            | : 250°C   |
| 注入モード            | : スプリット   |
| スプリット比           | : 39.5  |
| キャリアガス           | : He  |
| 制御モード            | : 線速度 (87.1 cm/s)   |
| カラム              | : SH-I-1 HT (PN:227-36089-01)<br>(15 m x 0.32 mm I.D., 0.10 μm) |
| カラムオープン温度        | : 120°C (3分)  |
| 検出器              | : FID-2030  |
| 検出器温度            | : 300°C   |
| 検出器ガス            | : H <sub>2</sub> 32.0 mL/min, Air 200 mL/min                    |
| メイクアップガス         | : N <sub>2</sub> 24.0 mL/min                                    |
| インジェクタ設定         |   |
| 注入前洗浄            | : 1   |
| 注入後洗浄            | : 2   |
| 試料洗浄             | : 2   |
| シリンジ注入速度         | : 高速  |
| 注入後待ち時間          | : 0 (既定値)   |
| 使用したシリンジ         |   |
| PN: 227-35002-01 | 0.5 μL プランジャ・イン・ニードルシリンジ  |
| PN: 221-75173    | 5 μL マイクロシリンジ   |
| PN: 221-34618    | 10 μL マイクロシリンジ  |

### 3. 結果

0.5 μLのプランジャ・イン・ニードルシリンジ、5 μLおよび10 μLのマイクロシリンジを用いて、標準試料の繰り返し測定を10回行いました。その後、各シリンジでの繰り返し測定におけるピーク面積の再現性 (RSD) を算出しました。加えて、標準試料Aの10回の繰り返し測定を複数セット実施し、それぞれの結果のピーク面積の再現性 (RSD) からボックスプロットを作成し、結果の信頼性も同時に確認しました。

また、マイクロシリンジを使用した分析で再現性が改善できないかを検討するため、5 μL マイクロシリンジを用い、注入後待ち時間を5秒に設定し同様の試験を行いました。各実験の結果を以下に示します。

#### 3.1 種々のシリンジにおける再現性の比較

種々のシリンジ (0.5 μL プランジャ・イン・ニードルシリンジ、5 μL・10 μL マイクロシリンジ) を用いて標準試料Aを0.1 μL注入したときのn-ドデカンの10回の繰り返し測定を9セット実施しました。Fig. 3は、ピーク面積の再現性 (RSD) の分布を示したものです。Fig. 3の5 μL (post inj delay) は、5 μL マイクロシリンジを用いて、注入後の待ち時間を5秒に設定したデータを示しています。

Fig. 3から、小容量のシリンジを使用することで、ピーク面積の再現性 (RSD) が改善されることが分かります。デッドボリュームがゼロに近いプランジャ・イン・ニードルシリンジ (0.5 μL) を用いた場合、ピーク面積の再現性 (RSD) 9セットの中央値は約1%でした。また、注入後待ち時間を5秒に設定することにより、5 μL マイクロシリンジを用いた場合でも、良好なピーク面積の再現性を得ることができました。また、プランジャ・イン・ニードルシリンジ (0.5 μL) と5 μL マイクロシリンジ (注入後待ち時間 5秒) を使

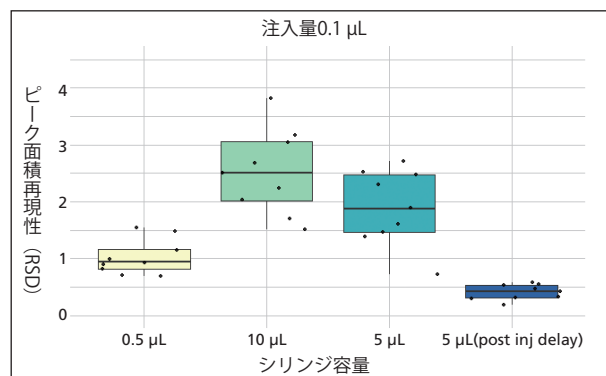


Fig. 3 種々のシリンジを用いた0.1 μL注入に対するn-ドデカンのピーク面積再現性 (RSD) の分布

用した分析では、注入後待ち時間を設定していない10 μLと5 μLシリンジのデータと比較してIQRが小さく、信頼性高く良好な再現性を得られることが分かります。

注入後待ち時間を設定することで気化室にニードルが長時間留まることにより、ニードル内の試料がより効率的に揮発するためと推測されます。

注入後待ち時間を設定することで、微量注入の再現性が改善されることが分かりましたが、次のセクションで説明するように、微量サンプルの分析にはいくつかの留意点があります。

#### 3.2 微量注入分析の留意点

3.1の結果から、注入後待ち時間を設定することで、微量注入時の再現性が改善されることが分かりました。しかし、気化室にサンプルが長時間留まることから、注入後待ち時間を設定しての分析は、熱に不安定な成分やディスクリミネーションを起こしやすいサンプルには適していません。一方で、プランジャ・イン・ニードルシリンジは、注入後待ち時間を設定する必要がないため、注入後待ち時間による影響を受けてしまう成分やサンプルの分析も可能です。

しかしながら、注入後待ち時間がサンプルに影響を及ぼさない場合、多少の注意を払うことでマイクロシリンジをプランジャ・イン・ニードルシリンジの代替として使用することができます。

#### 3.3 様々な成分の微量注入に対する注入後待ち時間の有効性

本セクションでは、5 μL マイクロシリンジを用いて、GCでよく分析されるいくつかの成分を測定し、注入後待ち時間の有効性を検討しました。

##### 3.3.1 沸点に近いn-アルカンの分析

Fig. 4は、標準試料A 0.1 μLの10回の繰り返し測定を15セット実施した際の、n-ドデカン (C12)、n-テトラデカン (C14) およびn-ヘキサデカン (C16) のピーク面積再現性 (RSD) の分布を示したものです。注入後待ち時間は5秒に設定しています。

Fig. 4の結果から、一般的なアルカンの分析では、注入後待ち時間を5秒に設定することで、各成分のピーク面積の再現性 (RSD) の中央値が0.5%未満と良好な結果を得られました。

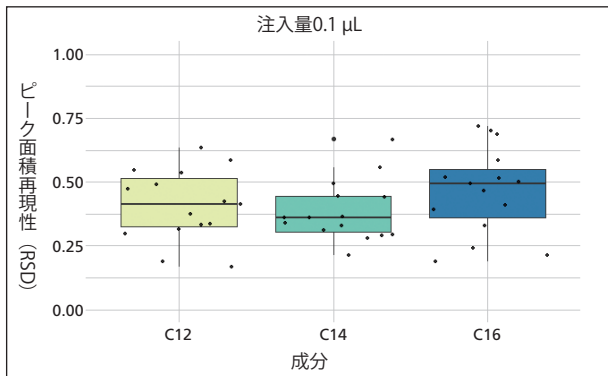


Fig.4 n-ドデカン、n-テトラデカン、n-ヘキサデカンのピーク面積再現性 (RSD) の分布 (5 µL シリンジ・注入後待ち時間は5秒に設定)

### 3.3.2 オクタノール (アルコール) とジシクロヘキシルアミン (アミン) の分析

オクタノール (アルコール) とジシクロヘキシルアミン (アミン) に関しても、標準試料B 0.1µLの10回の繰り返し分析におけるピーク面積再現性 (RSD) を評価しました。注入後待ち時間は3秒に設定しています。オクタノールとジシクロヘキシルアミンのそれぞれのピーク面積の再現性 (RSD) はそれぞれ0.3%~0.4%と良好な結果を得られました。

## 3.4 注入後待ち時間設定時の注意点

注入後待ち時間を長く設定すると、ニードルのデッドボリューム内の試料が気化し、設定値以上の試料が注入されることが予想されます。Fig. 5は、注入後待ち時間を3秒で一定に保ち、標準試料Aの注入量を0.1 µLから1 µLに変化させた際のレスポンスファクター (ピーク面積/設定上の注入量)を示しています。シリンジは5 µLのマイクロシリンジを使用しています。

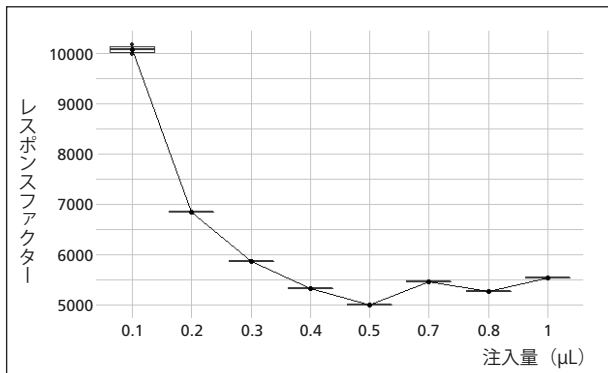


Fig. 5 n-ドデカンの注入量 vs レスポンスファクター (注入後待ち時間は3秒)

Fig. 5では、設定した注入量がいほどレスポンスファクターが大きくなる傾向を示しており、デッドボリューム内の試料が気化し、設定した注入量よりも多くの試料が導入されていることが分かります。

そのため、異なる注入量を比較する場合や、近接ピークとの分離が必要な分析では注意が必要です。一方で、このようなレスポンスファクターの考慮が不要な分析においては、注入後待ち時間を設定することで、気化室の汚染を防ぎつつ良好な再現性を得る

ことができます。

また、ニードルのデッドボリュームから気化するサンプル量は、注入後待ち時間や分析対象サンプル、気化室温度などの条件によって変化します。そのため、サンプルや条件毎に最適かつ最小の待ち時間をあらかじめ検討することで、気化室の汚染を防ぎつつ良好な再現性を実現することが可能です。

## 4. 結論

GC分析において、注入量を減らすことは、日常的なメンテナンスの頻度を減らすことにつながります。現在、微量注入ではプランジャ・イン・ニードルシリンジが頻繁に使用されています。しかし、プランジャ・イン・ニードルシリンジはマイクロシリンジと比較して、高価であり、選択できるシリンジ容量が少ないといった課題がありました。

本稿では、プランジャ・イン・ニードルシリンジに代わり、マイクロシリンジを使用した微量注入について検討しました。その結果、注入後待ち時間を設定することで、マイクロシリンジにおいても良好な再現性が得られることが分かりました。この手法によって、マイクロシリンジでも微量注入が可能であることが示されました。

なお、注入後待ち時間を設定する分析は、全ての分析に適用可能な方法ではありません。注入口にサンプルが長く滞留するため、熱的に不安定な成分等の分析には適していません。また、レスポンスファクターが注入量に依存して変化する可能性があります。そのため、マイクロシリンジを用いて微量サンプルの分析を行う場合、事前に分析条件を検討することが重要になります。

GC、GC-MS用オートインジェクタ/オートサンプリング

## AOC-30 シリーズ Next Industry Standard

新しいAOC-30シリーズは、確かな分析信頼性を提供するとともに、ラボの幅広い分析ニーズに応えます。優れた拡張性により、最大150検体までの自動分析が実現できます。高い精度での長期安定分析、ラボの省スペース化/生産性向上、分析熟練者のアイデアが詰まった、これまでにないオートインジェクタです。



Nexis GC-2030 + AOC-30i + AOC-20s U

### 注入ノウハウが詰まったSampler Navigator

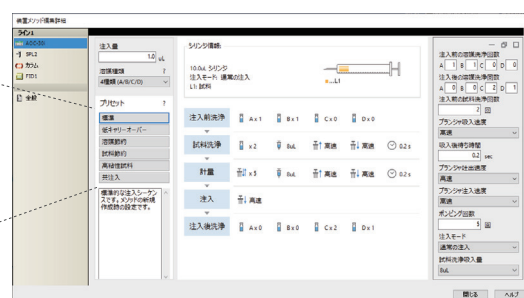


AOC-30シリーズは高品質な分析のための注入ノウハウが詰まったプリセットレシピを搭載。熟練の技が詰まったメソッドを1クリックで作ることができます。また、注入後待ち時間も簡単に設定可能です。

#### 搭載プリセット

- 標準
- 低キャリアオーバー
- 溶媒節約
- 試料節約
- 高粘性試料
- 共注入

#### Sampler Navigator



Analytical Intelligenceは、島津製作所が提案する分析機器の新しい概念です。システムやソフトウェアが、熟練技術者と同じように操作を行い、状態・結果の良し悪しを自動で判断し、ユーザーへのフィードバックやトラブルの解決を行います。また、分析機器に対する知識や経験の差を補完し、データの信頼性を確保します。

NexisおよびAnalytical Intelligenceロゴは、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

**株式会社 島津製作所**  
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2021年12月  
© Shimadzu Corporation, 2021