

自動サンプル前処理を用いた水系溶媒中の ギ酸の分析

Agilent 7693A オートサンプラによる自動誘導体化



Authors

伊藤結花、杉立久仁代
アジレント・テクノロジー
株式会社

概要

Agilent 7693A オートサンプラ (ALS) と水素炎イオン化検出器 (FID) を搭載した Agilent 8890 GC で構成されるシステムを使用し、水系溶媒中のギ酸の自動サンプル前処理および GC/FID 測定を行いました。本アプリケーションノートでは、サンプル前処理で行う誘導体化から抽出の全工程を自動化しました。水溶液中のギ酸濃度 5-100 ppm の 5 点検量線の決定係数 (R^2) が 0.999 以上となり、手作業と同等以上の再現性および検量線の直線性が得られました。

Key word : ギ酸、短鎖脂肪酸、自動前処理、誘導体化、サンプルプレップ、7693A

1. はじめに

メタボロミクス分野における短鎖脂肪酸および石油石化・エネルギー分野における電解液中のギ酸・酢酸など、短鎖脂肪酸の分析の需要が高まっています。揮発性および親水性の高い脂肪酸をGCで分析する際には、多くの場合、前処理が必要です。既報 (5991-9103JAJ) では、Agilent 7693Aオートサンプラ (ALS) による、哺乳類糞便中の短鎖脂肪酸の自動サンプル前処理を紹介しました。本アプリケーションノートでは、電解液中のギ酸・酢酸の分析を想定し、水系溶媒中のギ酸の自動誘導体化へ応用しました。ギ酸のみの結果を示していますが、酢酸も同様に誘導体化できることが確認されています。なお、既報ではクロロギ酸イソブチル添加以降の操作を自動化していますが、本アプリケーションノートでは、誘導体化の第一段階であるイソブタノールの添加から自動で行いました。前処理を自動化することで作業時間の短縮および添加試薬への暴露の低減が実現できます。

2. 方法

1. 装置構成

インジェクタ 2台および150検体サンプルトレイから構成されるAgilent 7693A とAgilent 8890 GC/FIDで構成された装置を使用しました。誘導体化の自動化メソッド作成には、OpenLab CDS 2とアドオンソフトウェアのEasy SamplePrepを使用しました。

2. 試薬および器具

イソブタノール、ピリジン、クロロギ酸イソブチル、ヘキサン (残留農薬・PCB試験用、濃縮5000、富士フィルム和光純薬)、沸騰石 (ボイルストーン、フナコシ株式会社)、スリット入りバイアルキャップ (p/n 5185-5824)

3. サンプル

5, 10, 20, 50, 100 ppmのギ酸水溶液 500 μ L

クロロギ酸イソブチルの添加後CO₂が発生します。これによって溶媒が突沸しないように、あらかじめ沸騰石1粒とギ酸水溶液 500 μ Lを2 mL バイアルに入れ、スリット入りバイアルキャップで蓋をします。スリット入りバイアルキャップを用いるのは、CO₂を逃がしやすくするためです。

4. 試薬の添加を行うAgilent 7693A ALSの設定

全ての試薬をバックインジェクタで添加します。

バックシリンジ: 100 μ L

吸引スピード: 300 μ L/min

排出スピード: 2000 μ L/min

粘性待ち時間: 3 sec

混合速度: 3500 rpm

5. ギ酸誘導体化 Easy SamplePrep メソッド

Easy SamplePrepを用いて、下記の工程を自動化しました。

- 50 μ L イソブタノール添加
添加前: サンプル洗浄 20 μ L, 1回、ポンピング 80 μ L, 3回
添加後: 洗浄なし
- 40 sec 混合
- 50 μ L ピリジン添加
添加前: サンプル洗浄 20 μ L, 1回、ポンピング 80 μ L, 3回
添加後: 水洗浄 80 μ L, 2回、アセトン洗浄 80 μ L, 2回
- 40 sec 混合
- 50 μ L クロロギ酸イソブチル添加
添加前: 20 μ L, 1回、ポンピング 80 μ L, 3回
添加後: アセトン洗浄 80 μ L, 2回、ヘキサン洗浄 80 μ L, 2回
(CO₂がバイアル内に発生します)
- 1 min 待機
- 50 μ L 空打ち
(バイアル中のCO₂をバイアル外に逃がします)
- 40 sec 混合 2回
- 500 μ L ヘキサン添加
添加前: ポンピング 80 μ L, 3回
添加後: 洗浄なし
- 40 sec 混合 2回
- 5 min 待機

6. 添加試薬および洗浄溶媒の準備

添加する試薬、洗浄溶媒を準備します。洗浄用アセトン、水をそれぞれ4 mL洗浄バイアルに入れ、バックインジェクタのターレットに設置します。各試薬、洗浄用ヘキサンを2 mLバイアルに1.5 mL程度採取し、所定の位置にバイアルを設置します。図1にバイアル設置のレイアウトを示します。

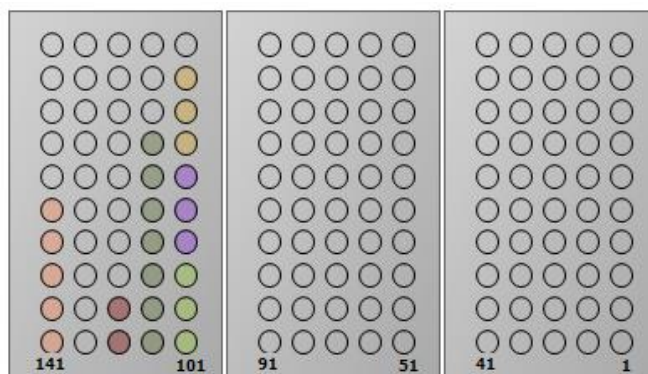


図1 バイアルレイアウト

101-103: イソブタノール、104-106: ピリジン、107-109: クロロギ酸イソブチル、111-117:ヘキサン、121-122: 空バイアル、141-145:洗浄用ヘキサン

7. GC測定メソッド

GC/FID システム: Agilent 8890
 カラム: HP-5MS UI、30 m、内径0.25 mm、膜厚1.0 μm (p/n 19091S-233UI)
 注入量: 1 μL
 注入口: スプリット/スプリットレス
 注入口温度: 250°C
 注入方式: スプリットモード、スプリット比1:50
 注入口ライナ: Agilent ウルトライナート、スプリット、シングルテーパー、ガラスウール入り (p/n 5190-2295)
 キャリアガス: ヘリウム、1.0 mL/min、コンスタントフロー
 オープン温度: 40°C (5 min) - 10°C/min-200°C (1 min) (測定時間: 22 min)
 FID 温度: 250°C
 エアー流量: 400 mL/min
 水素流量: 30 mL/min
 メークアップガス (N2) 流量: 30 mL/min

3. 結果

1. クロマトグラムの確認

7693A ALSによる水溶液中のギ酸の誘導体化を行い、ピークの確認を行いました。図2に100 ppmギ酸のクロマトグラム、表1に主なピークとそのRTおよび化合物名を示しました。

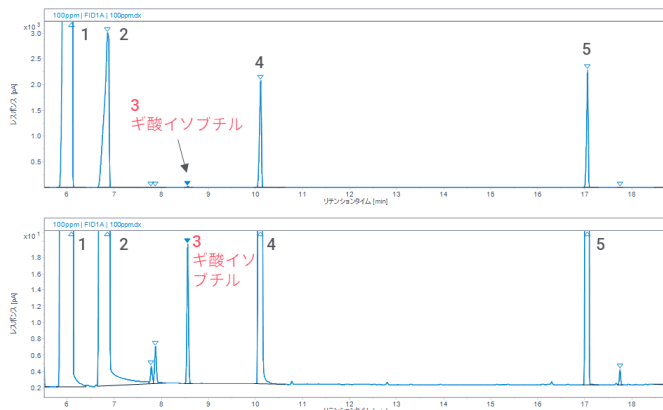


図 1 100 ppm ギ酸のクロマトグラム (上: 全体図、下: 拡大図)

表1 主なピークのRTと化合物名

	RT (min)	化合物名
1	6.08	ヘキサン
2	6.85	イソブタノール
3	8.56	ギ酸イソブチル (誘導体化ギ酸)
4	10.10	ピリジン
5	17.05	ジイソブチルカーボネート(副生成物)

2. 検量線の確認

各濃度のギ酸水溶液を3回繰り返し自動前処理およびGC測定を行い、5-100 ppmの5点で検量線を作成したところ、検量線の決定係数 (R^2) が0.999以上となりました。各濃度の前処理およびGC測定のn=3での再現性についてRSDが6%以下となりました。図3にギ酸の検量線、表2に誘導体化ギ酸ピークの面積を示しました。n=1で手動での前処理およびGC測定を行ったところ、手作業より自動前処理のほうが直線性が改善されました。手動添加の場合、反応溶液の混合やヘキサン抽出にばらつきが生じたと考えられます。一方で、自動前処理では、作業者の熟練度によらず、安定した結果が得られます。

本手法によるギ酸の誘導体化は、サンプルのpHや塩濃度などの影響を受けることが確認されています。そのため、定量の際はサンプルと同じ溶媒での検量線の作成や標準添加法の利用を検討ください。

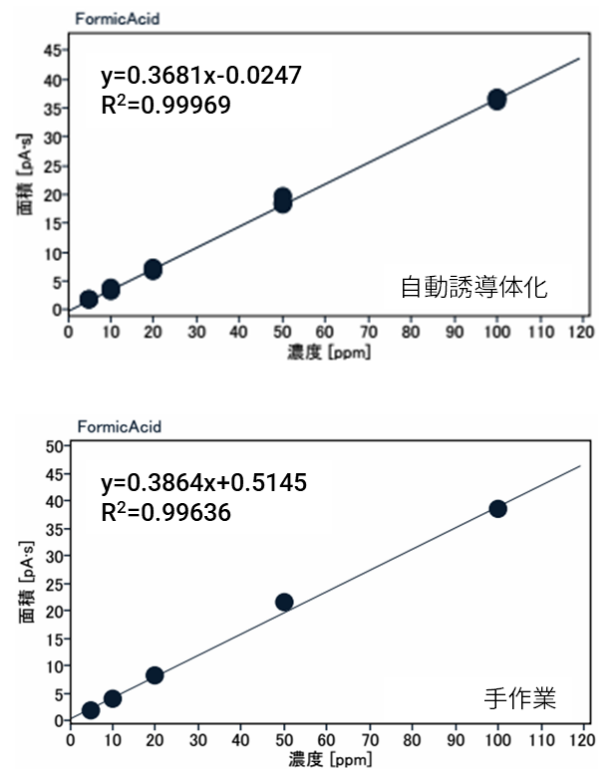


図 3 ギ酸の5点検量線 (上: 自動誘導体化、下:手作業)

表2 自動前処理による各濃度の誘導体化ギ酸ピーク的面積 (pA·s)

濃度 (ppm)	5	10	20	50	100
1	1.77	3.72	6.82	18.24	36.84
2	1.83	3.44	7.11	19.63	36.77
3	1.78	3.86	7.31	18.51	36.28
平均	1.80	3.67	7.08	18.79	36.63
RSD (%)	1.7	5.7	3.5	3.9	0.8

4. まとめ

7693A ALSによる水溶液中のギ酸の自動サンプル前処理を検討した結果、手動と同等以上の良好な再現性および5-100 ppmの範囲での検量線の直線性が得られました。さらに、サンプル前処理の自動化により、作業時間が短縮されるとともに添加試薬への暴露が低減されました。本手法は水溶液中のギ酸などの低級脂肪酸の誘導體化の自動化に有効であることが示唆されました。

参考文献

1. 古橋ら、自動サンプル前処理を用いた GC/MS による哺乳類糞便中の短鎖脂肪酸の分析 (5991-9103JAJP)
2. Furuhashi, *et al.*, Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GCMS, *Analytical Biochemistry* 543 (2018) 51–54

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。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. 2017

Printed in Japan, August 19, 2021

GC-202108YU-001

DE44426.2486111111

